

**Lösliche Phenylpropane im Primärblatt von Gerste
(*Hordeum vulgare* L.) und ihre Bedeutung
als UV-B-Schutzsubstanzen für die Photosynthese**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Petra Burchard

aus Köln

Köln 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Weißenböck

Prof. Dr. J. Willenbrink

Danksagung

Mein erster ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Weißenböck als meinem Doktorvater für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen; für seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung sowie seine stetige Bereitschaft, ein offenes Ohr für Probleme aller Art zu haben.

Herrn Prof. J. Willenbrink gilt mein besonderer Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine hilfreichen Tipps.

Nicht nur für ein angenehmes Arbeitsklima, auch für Diskussionen und Hilfestellungen aller Art bedanke ich mich bei meinen Kollegen aus dem Labor: Rainer Schmitz, Markus Klein, Jürgen Brückmann, Maria Knapstein, Carsten Koblischke, Claudia Storm, Jürgen Krüger, Andreas Krämer, Sebastian Reuber, Gesine Sachs und Katja Töttel.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau Dr. D. Godde. Sie stellte mir nicht nur den D1-Antikörper zur Verfügung, sondern auch sehr viel Zeit für wissenschaftliche Diskussion. Ihre Ideen, Anregungen und Interpretationshilfen waren für mich enorm hilfreich und der Kontakt ausgesprochen angenehm.

Ebenso angenehm war die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. W. Bilger, dem ich für seine Unterstützung und Hilfestellung bei Fragen zur Chlorophyll Fluoreszenz dankbar bin.

Mein Dank gilt den vielen Mitarbeitern im Institut, die mir in unterschiedlicher Weise geholfen haben: Georg Kreimer für viele Tipps und Anregungen, Siggi Werth für die Hilfe beim Einscannen der unzähligen Blots, Herrn Leson und den Mitarbeitern aus der Werkstatt für schnelle Hilfestellung bei allen technischen Problemen und den Mitarbeitern aus der Gärtnerei.

Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, die dieses Projekt finanziell unterstützt hat.

Für
Jan und Detlef

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ant	ant 30-287, Bezeichnung einer Gersten-Mutantenlinie aus einer speziellen Komplementationsgruppe proanthocyanidinfreier Gersten
Chl	Chlorophyll
CHS	Chalkon-Synthase
CHI	Chalkon-Isomerase
cv.	Kultivar
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfallsrate
F ₀	Grundfluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand
fl.	flüssig
F _m	maximale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand
F _v	variable Fluoreszenz
F _v /F _m	Effizienz der Photosystem II-Aktivität
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCA	Zimtsäure
Hege	Hege 550/75, korrespondierende Gerste-Muttervarietät der Mutantenlinie ant 30-287
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
kDa	Kilo-Dalton
kHz	Kilo-Hertz
LHCII	Lichtsammelkomplex
M	Molarität (mol l ⁻¹)
Met	Methionin
MeOH	Methanol
min	Minute
n	Anzahl der Einzelbestimmung
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung (400-700 nm)
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II

Q _A	Chinon, Elektronen-Akzeptor der photosynthetischen Elektronentransportkette
Q _B	Chinon, Elektronen-Akzeptor der photosynthetischen Elektronentransportkette
qE	energieabhängiger Löschungskoeffizient
qN	nicht-photochemischer Löschungskoeffizient
qP	photochemischer Löschungskoeffizient
rpm	Umdrehung pro Minute
Rubisco	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Tab	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
UV	ultraviolette Strahlung
UV-A	ultraviolette Strahlung (320-400 nm)
UV-B	ultraviolette Strahlung (280-320 nm)
UV-B _(BE)	biologisch effektive UV-Strahlung
UV-C	ultraviolette Strahlung (< 280 nm)
v/v	Volumen pro Volumen
WL	Weißlicht
$\Delta F/F_m'$	effektive Quantenausbeute am Photosystem II

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	UV-B-Strahlung im bodennahen Bereich.....	1
1.2	Die biologische Wirkung von UV-B-Strahlung.....	2
1.3	UV-B-Effekte bei Pflanzen.....	3
1.3.1	Entwicklung, Wachstum und Morphologie.....	3
1.3.2	Oxidativer Stress.....	4
1.3.3	DNA-Schädigung.....	5
1.3.4	Photosynthese.....	5
1.3.5	UV-absorbierende Substanzen.....	7
1.4	Der Phenylpropanstoffwechsel im Gersten-Primärblatt.....	7
1.4.1	Allgemeine Biosynthese und Strahlungsregulation.....	7
1.4.2	Phenylpropane im Gersten-Primärblatt.....	8
1.4.3	Phenylpropane in einer flavonoidarmen Gerstenmutante.....	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	10
1.5.1	Flavonoidakkumulation.....	11
1.5.2	Photosynthese im Gersten-Primärblatt unter dem Einfluss erhöhter UV-B-Strahlung.....	12
1.5.3	Akklimatisierung während der Blattentwicklung.....	13
1.5.4	Naturnahe Strahlungs- und Klimabedingungen.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Pflanzenmaterial.....	15
2.1.2	Geräte.....	15
2.1.3	Chemikalien.....	17
2.1.3.1	Käufliche Chemikalien.....	17
2.1.3.2	Nicht-käufliche Chemikalien.....	18
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Einrichtung eines neuen Pflanzenanzuchtschranks mit UV-Bestrahlungsanlage.....	18
2.2.1.1	Vorgegebene technische Spezifikationen der neuen UV-Kammer.....	18
2.2.1.2	UV-Bestrahlungseinrichtung.....	20

2.2.1.3	Strahlungsvermessung.....	22
2.2.1.3.1	PAR-Strahlung.....	23
2.2.1.3.2	UV-Strahlung.....	24
2.2.1.4	Klimaprogrammierung.....	30
2.2.1.5	Standard-Bestrahlungsprogramme.....	31
2.2.2	UV-Experimente in der UV-Kammer.....	31
2.2.2.1	Aussaat.....	31
2.2.2.2	Bestrahlung und Ernte der Primärblattsegmente.....	32
2.2.2.3	Chlorophyllbestimmung der Blattsegmente.....	33
2.2.2.4	Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe.....	33
2.2.2.4.1	Extraktion der löslichen Phenylpropane in Gersten-Primärblattsegmenten.....	33
2.2.2.4.2	Extraktion der löslichen Phenylpropane in Roggen-Primärblattsegmenten.....	34
2.2.2.4.3	HPLC-Analyse.....	34
2.2.2.4.3.1	Gerste.....	34
2.2.2.4.3.2	Roggen.....	35
2.2.2.5	Chlorophyll-Fluoreszenz.....	36
2.2.2.5.1	Bestimmung von F_v/F_m	38
2.2.2.5.2	Bestimmung der quenching-Faktoren qP und qN.....	38
2.2.2.5.3	Untersuchungen zur epidermalen Transmission durch Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen.....	39
2.2.2.6	Bestimmungen zum Gehalt, Turnover und zur Synthese des D1-Proteins	44
2.2.2.6.1	Aufarbeitung der Blattsegmente.....	44
2.2.2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.2.2.6.3	Chlorophyll-Bestimmung.....	46
2.2.2.6.4	Proteintransfer.....	46
2.2.2.6.5	Densitometrie.....	46
2.2.2.6.6	Bestimmung des D1-Gehaltes.....	48
2.2.2.6.7	Immunodetektion (verändert nach Johnson et al. 1984).....	48
2.2.2.6.8	Identifizierung der D1-Proteinbande durch den spezifischen Antikörper...	49
2.2.2.6.9	D1-Turnover.....	50
2.2.2.6.9.1	Linearität der radioaktiven Signale im Autoradiogramm.....	52
2.2.2.6.10	D1-Synthese.....	53

2.2.2.6.11	Aufnahme der Radioaktivität in die Blätter.....	54
2.2.2.6.11.1	Abnahme von ³⁵ S-Met in der radioaktiven Inkubationslösung während der pulse-Phase.....	54
2.2.2.6.11.2	Anteil der aufgenommenen Aminosäure ³⁵ S-Met in den aufgearbeiteten Blattproben.....	55
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Wachstumsparameter.....	57
3.1.1	Frischgewicht der Blattsegmente.....	57
3.1.2	Blattlänge.....	58
3.2	Inhaltsstoffe.....	60
3.2.1	Chlorophyllgehalt der Blattsegmente.....	60
3.2.2	Flavonoidakkumulation in den Primärblattsegmenten.....	62
3.3	Epidermale UV-Strahlungsabsorption durch Messung der Chlorophyll Fluoreszenz.....	71
3.3.1	Roggen Kustro.....	72
3.3.1.1	Akkumulation der Inhaltsstoffe.....	72
3.3.1.2	Epidermale UV-Absorption.....	74
3.3.2	Gerste.....	77
3.4	Einfluss von erhöhter UV-B-Strahlung auf das Photosystem II.....	81
3.4.1	Effizienz des Photosystems II während der Blattentwicklung.....	82
3.4.2	Untersuchung der quenching-Parameter qP und qN.....	84
3.4.3	D1-Gehalt.....	94
3.4.4	D1-Turnover.....	97
3.4.4.1	D1-Turnover bei 5 d alten Primärblattsegmenten.....	98
3.4.4.2	D1-Turnover bei 7 d alten Primärblattsegmenten.....	102
3.4.4.3	D1-Turnover bei 10 d alten Primärblattsegmenten.....	106
3.4.5	D1-Gehalt der Proben vor und nach der UV-B-Bestrahlung.....	111
3.4.6	D1-Synthese.....	117
3.4.6.1	D1-Synthese bei 7 d alten Primärblattsegmenten.....	118
3.4.6.2	D1-Synthese bei 10 d alten Primärblattsegmenten.....	121
3.4.6.3	D1-Synthese bei 15 d alten Primärblattsegmenten.....	121
3.5	Anhang.....	127

4	Diskussion.....	130
4.1	Methoden.....	130
4.1.1	Bestrahlungsbedingungen.....	130
4.1.2	Pflanzenmaterial.....	132
4.1.3	D1-Extraktion und D1-Gehalt.....	133
4.2	Flavonoidakkumulation und epidermale UV-Absorptionskapazität im apikalen Blattsegment von Gersten-Primärblättern.....	133
4.2.1	Flavonoidakkumulation.....	133
4.2.2	Epidermale UV-Strahlungsabsorption.....	136
4.2.3	Etablierung der Methode.....	137
4.2.4	Epidermale Strahlungsabsorption im Gersten-Primärblatt.....	138
4.3	Wachstum der Gersten-Primärblattsegmente unter Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung.....	140
4.4	Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung auf die Photosynthese im apikalen Gersten-Primärblattsegment.....	143
4.4.1	Chlorophyllgehalt der Primärblattsegmente.....	143
4.4.2	Effizienz des Photosystems II nach Dunkeladaption und unter "steady-state Photosynthese".....	144
4.4.2.1	Effizienz des Photosystems II.....	144
4.4.2.2	Fluoreszenz-Quenching.....	146
4.4.3	CO ₂ -Assimilation und O ₂ -Produktion.....	147
4.4.4	Einfluss auf das D1-Protein im Reaktionszentrum von Photosystem II.....	148
4.4.4.1	D1-Gehalt in den Blattsegmenten.....	148
4.4.4.2	D1 Protein-Turnover.....	150
4.4.4.3	D1-Synthese.....	152
4.5	Schlussbetrachtung und Ausblick.....	152
5	Zusammenfassung.....	157
6	Summary.....	160
7	Literaturverzeichnis.....	163

1 EINLEITUNG

1.1 UV-B-Strahlung im bodennahen Bereich

Aus dem Strahlungsspektrum der Sonnenstrahlung (225 - 3200 nm) werden verschiedene Wellenlängenbereiche beim Durchtritt durch die Erdatmosphäre absorbiert oder gestreut, so dass nur ein Teil der Strahlung als sogenannte Globalstrahlung die Erdoberfläche erreicht (Tevini & Häder 1985). Der Anteil der UV-Strahlung an der Sonnenstrahlung beträgt 5 % und reduziert sich nach Durchtritt durch die Erdatmosphäre auf 2 % der verbleibenden Gesamtstrahlung (von Willert et al. 1995). Unter der UV-Strahlung versteht man den Bereich elektromagnetischer Strahlung von 10 - 400 nm, der wie folgt unterteilt wird: extremes UV ($\lambda=10-100$ nm), UV-C ($\lambda=100-280$ nm), UV-B ($\lambda=280-320$ nm) und UV-A ($\lambda=320-400$ nm) (Tevini & Häder 1985).

UV-Strahlung < 290 nm wird von der Atmosphäre vollständig absorbiert; im wesentlichen von der Ozonschicht in der Stratosphäre, in geringen Mengen auch von anderen Spurengasen wie SO_2 oder CO_2 (Madronich 1993). Die Dicke der Ozonschicht verteilt sich nicht gleichmäßig über die Erdatmosphäre und unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen. Eine Reduktion der Ozonschicht führt zu einer Erhöhung der UV-B-Strahlungsintensität auf der Erdoberfläche und zu einer Verschiebung des UV-B-Spektrums zum kurzwelligen Bereich hin. Die Vermutung von Molina & Rowland (1974), dass Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKWs) die Ozonschicht schädigen könnten, fand seine Bestätigung durch die Entdeckung des sogenannten "Ozonlochs" (Farman et al. 1985). Seither belegen regelmäßige Messungen eine zunehmende Reduktion der Ozonschicht; der letzte Bericht der Organisation UNEP (United Nations Environmental Program 1998) zu diesem Thema geht vom Erreichen einer maximalen Ozonreduktion zum Jahr 2000 aus mit einer Zunahme der erythem-wirksamen UV-Strahlung von 7 % in mittleren Breiten der nördlichen Hemisphäre im Winter und Frühling bzw. 4 % im Sommer und Herbst; einer 6 %igen Zunahme in mittleren Breiten der südlichen Hemisphäre im Jahresdurchschnitt; einer etwa 130 %igen Zunahme über der Antarktis im Frühjahr bzw. einer 22 %igen Zunahme über der Arktis ebenfalls im Frühjahr (Madronich et al. 1998).

1.2 Die biologische Wirkung von UV-B-Strahlung

Photobiologische Prozesse bei Pflanzen werden durch Strahlung im gesamten Wellenlängenbereich von UV-B bis Dunkelrot in Gang gesetzt. Nicht nur für den Prozess der Photosynthese werden Lichtquanten genutzt; viele regulatorische Prozesse werden über die Perzeption von Strahlung unterschiedlicher Wellenlängen kontrolliert (Schopfer & Brenneke 1999). Man unterscheidet drei Photorezeptorsysteme: einen bis dato nicht identifizierten UV-B-Photorezeptor für den Bereich von 280-350 nm; Cryptochrom, einen ebenfalls bisher nicht eindeutig identifizierten Photorezeptor für den Bereich von 350-520 nm und das Phytochromsystem, eine Proteinfamilie mit verschiedenen Proteinformen, deren chromophore Gruppe wesentlich im roten Strahlungsbereich absorbiert (Schopfer & Brenneke 1999). Anhand von Wirkungsspektren läßt sich feststellen, welche biologischen Effekte bei einem Organismus durch Strahlung unterschiedlicher Qualität ausgelöst werden. In der Regel sind solche Wirkungsspektren monochromatische Aktionsspektren, bei denen in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahnten monochromatischen Lichts eine spezifische biologische Wirkung, z.B. die Schädigung der DNA, untersucht wird. Für die Wirkung von UV-Strahlung gibt es eine Vielzahl solcher Aktionsspektren (s. Madronich et al. 1991).

Aus dem Produkt des Wirkungsspektrums und der gemessenen Intensität der Strahlung bei jeder Wellenlänge ermittelt man die sogenannte Wichtungsfunktion (Caldwell et al. 1986). Die Integration der Wichtungsfunktion über einen bestimmten Wellenlängenbereich liefert ein Maß für die biologische Wirksamkeit der Strahlung, mit der man die Strahlungswirkung auf unterschiedliche biologische Systeme quantifizieren und vergleichen kann. Man bezeichnet dies als die biologisch gewichtete Strahlungsdosis, gemessen in $\text{J m}^{-2} \text{s}^{-1}$, versehen mit dem Index BE für "biologically effective". Hinsichtlich der Beurteilung der Wirkung von UV-Strahlung finden sich in der Literatur mehrere Wichtungsfunktionen, die auf unterschiedliche Wirkungsspektren zurückgehen (Abb. 1.1). Für die Beurteilung von UV-Effekten auf Pflanzen hat sich das "Generalized Plant"-Aktionsspektrum nach Caldwell et al. (1986) durchgesetzt.

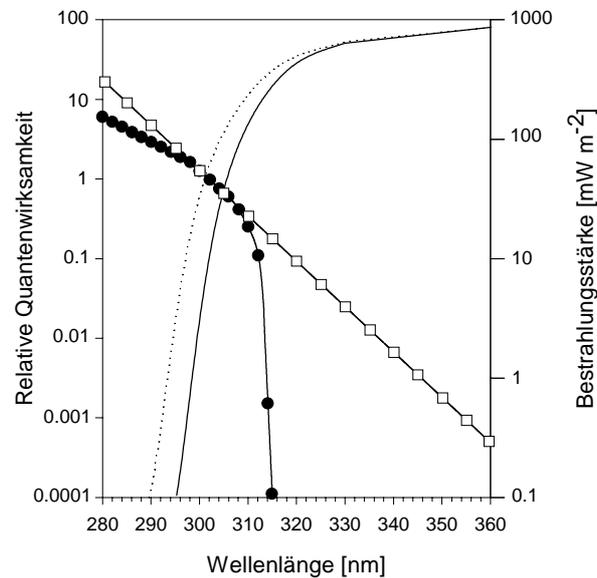


Abb. 1.1: Solare UV-B-Strahlungskante bei einer Ozonschichtdicke von 360 DU (—) und 180 DU (...) (kalkuliert für den 15. Juli, bei 49° N und Sonnenhöchststand). Zusätzlich sind die Wirkungsspektren für allgemeine Pflanzenschäden (●) nach Caldwell (1971) und der Thymin-Dimergehalt in der DNA von Schneckenklee-Keimlingen (□) nach QUAITE et al. (1992) als Maß für die DNA-Schädigung abgebildet (aus Brückmann, 1998).

1.3 UV-B-Effekte bei Pflanzen

Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf Pflanzen kann direkt und indirekt erfolgen und umfasst die Schädigung von DNA, Proteinen und Membranen, Veränderungen der Transpiration und Photosynthese sowie Änderungen im Wachstum, der Entwicklung und Morphologie. UV-B-Toleranz hängt ab vom Gleichgewicht zwischen Art und Stärke der Schädigung und entsprechenden Reparaturprozessen und Akklimatisierungsreaktionen (Jansen et al. 1998).

1.3.1 Entwicklung, Wachstum und Morphologie

Änderungen der Pflanzenmorphologie, im Wachstum und in der Entwicklung als Reaktion auf UV-B-Strahlung gehören zu den meistbeobachteten Effekten. Reduktionen der

Blattfläche, des Blatt-Frisch- und -Trockengewichts, der Pflanzenhöhe und weiterer morphologischer Parameter findet man nicht nur bei verschiedenen Pflanzenarten (*Cucumis sativus* L.: Adamse & Britz 1992, *Lycopersicon esculentum* Mill.: Hao et al. 1997, *Secale cereale* L.: Deckmyn & Impens 1997, *Oryza sativa* L.: Teramura et al. 1991, *Vigna unguiculata* L.: Lingakumar et al. 1999, *Helianthus annuus* L.: Ros & Tevini 1995, *Quercus ruba*, *Pinus ponderosa*, *Populus trichocarpa*: Nagel et al. 1998); oft unterscheiden sich die Effekte innerhalb einer Gattung oder Art (Poaceae: Deckmyn & Impens 1999, *Zea mays*: Correira et al. 1998, *Pisum sativum*: Gonzáles et al. 1998, *Oryza sativa* L.: Caasa-Lit et al. 1997). Zunahmen in der Blattdicke oder der Dicke der Epidermis werden von einigen Autoren als Akklimatisierungsreaktionen verstanden, um den Strahlungsweg in der Pflanze zu verlängern und die Möglichkeit der UV-Strahlungsabsorption zu erhöhen. Die hinter den morphologischen Veränderungen stehenden Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt.

1.3.2 Oxidativer Stress

Zu den schädigenden Auswirkungen von UV-B-Strahlung auf Pflanzen zählt die Bildung von aktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen (Caldwell et al. 1998). Die Induktion von PR-Proteinen (pathogenesis-related proteins) durch UV-B-Strahlung konnte bei Tabak nachgewiesen werden (Green & Fluhr 1995), erhöhte Superoxid-Dismutase Aktivitäten konnten bei *Arabidopsis*-Mutanten und bei *Spirodela oligorrhiza* festgestellt werden (Rao et al. 1996, Jansen et al. 1996a). Auch bei Reis konnten erhöhte Konzentrationen an O_2^- mit einer Erhöhung der Malondialdehydkonzentration (Nachweis für Lipid-Peroxidation) und der Membranpermeabilität korreliert werden (Dai et al. 1997). Studien an Erbsenpflanzen konnten einen Zusammenhang aufzeigen zwischen dem zunehmenden Gehalt an reaktiven O_2^- -Spezies, der Zunahme von Aktivitäten antioxidativer Enzyme (Ascorbat-Peroxidase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Reduktase) und der Reduktion von Photosynthese-Gentranskripten (Lhcb und psbA) (Mackerness et al. 1998, 1999). Die Autoren vermuten einen über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelten Signaltransduktionsweg, der die Transkription verschiedener Gene (Photosynthese, antioxidatives System) beeinflusst.

1.3.3 DNA-Schädigung

Die Absorption von UV-B-Photonen kann die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPDs) und in geringerem Umfang von Pyrimidin (6-4)-Pyrimidondimeren (6-4 Photoprodukte) verursachen, die zum Abbruch von Gentranskription oder DNA-Replikation führen können (Britt 1996). Die Reparatur derart geschädigter DNA erfolgt über den Prozess der Photoreaktivierung, wo spezifische Photolyasen in der Lage sind, die Schadensstellen zu erkennen, die Dimerisierung aufzuheben und den nativen Zustand wiederherzustellen. Die Aktivierung der Photolyasen erfolgt lichtabhängig durch Strahlung im Wellenlängenbereich von 350 bis 500 nm. *Arabidopsis*-Mutanten, die nicht fähig zur Photoreaktivierung sind, haben sich als sehr UV-sensitiv erwiesen (Landry et al. 1997, Jiang et al. 1997). Die Bedeutung der Photoreaktivierung konnten Taylor et al. (1996) an Weizen-Primärblättern aufzeigen, die unter reiner UV-B-Bestrahlung CPDs und 6-4 Photoprodukte nachwies. Unter Bestrahlung mit zusätzlicher PAR (400-700 nm) konnten sie nur eine leichte Zunahme von 6-4 Photoprodukten feststellen und dies mit einer höheren Reparaturkapazität für CPDs unter Weißlicht erklären.

1.3.4 Photosynthese

Die Photosynthese ist der elementare Lebensprozess für jede Pflanze. Der komplexe Vorgang zur Gewinnung von chemischer Energie aus Lichtenergie ist an eine Vielzahl von Strukturen gebunden, die zum Teil als UV-B-sensibel beschrieben werden.

Photosystem II gilt bei vielen Autoren als besonders UV-B-sensibel (Bornman 1989, Bornman & Sundby-Emanuelsson 1995, Kulandaivelu et al. 1997, Jansen et al. 1988). Das Photosystem II ist ein Multiproteinkomplex aus mindestens 25 verschiedenen Proteinen. Sie bilden das Reaktionszentrum, in dessen Mitte das Heterodimer D1/D2 alle Cofaktoren bindet, die zur Elektronengewinnung und zum Elektronentransport notwendig sind (Barber et al. 1997). Dazu gehören der primäre Elektronendonator P_{680} , ein spezialisiertes Chlorophyllmolekül, welches ein Elektron weiterleitet auf den primären Akzeptor, ein Pheophytinmolekül. Von dort wird das Elektron weiter auf ein Plastochinonmolekül, Q_A , übertragen. Ein weiteres Plastochinonmolekül, Q_B , empfängt insgesamt 2 Elektronen von Q_A und verlässt vollständig reduziert den Komplex. Auf der luminalen Seite des Photosystems II

ist der wasserspaltende Komplex lokalisiert, ein Proteinkomplex mit einem aus 4 Mn-Atomen bestehenden katalytischen Zentrum. In einem 4-Stufen-Prozess wird H_2O zu O_2 und H^+ umgewandelt und die freigesetzten Elektronen über einen Tyrosinrest im D1-Protein auf den im oxidierten Zustand vorliegenden Elektronendonator P680^+ übertragen (Barber et al. 1997, Trebst 1999). Eine Besonderheit in diesem Komplex kommt dem D1-Protein zu, das bekannt ist für seine hohe Turnover-Rate. Dieser hohe Turnover wird als Reparaturprozess verstanden, über den geschädigte PS II-Komplexe erneuert werden. Eine Schädigung des D1-Proteins wird durch überschüssige Lichtenergie verursacht und führt zu der vielfach beobachteten Abnahme der effektiven photosynthetischen Quantenausbeute, die man als Photoinhibition bezeichnet.

UV-Effekte auf das Photosystem II sind vielfach gezeigt worden. Mit Hilfe von Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen lassen sich Aussagen zur Effizienz des Elektronentransports über das Photosystem II treffen, die unter dem Einfluss von UV-B-Strahlung in den verschiedensten Pflanzen abnimmt (Erbse: Strid et al. 1990, Reis: He et al. 1993, Coniferen: Robakowski & Laitat 1999). In vivo und in vitro-Untersuchungen konnten einen erhöhten Turnover des D1-Proteins nachweisen, wobei die Autoren unterschiedliche Meinungen darüber entwickelten, ob die Plastochinone Q_A und Q_B primär geschädigt werden oder ob ein Einfluss auf den wasserspaltenden Komplex Ursache für den D1-Abbau ist (Greenberg et al. 1989a,b, Melis et al. 1992, Wilson & Greenberg 1993, Friso et al. 1995, Spetea et al. 1996, Jansen et al. 1996b,c, Hideg & Vass 1996, Chaturvedi et al. 1998, Barbato et al. 1995, 1999, 2000).

Während eine Schädigung des Photosystems I bisher nicht nachgewiesen werden konnte, gibt es Berichte, die einen negativen Einfluss auf die ATPase aufzeigen (Zhang et al. 1994).

Der Einfluss der UV-B-Strahlung auf den pflanzlichen Gaswechsel und den Calvin-Cyclus war ebenfalls Gegenstand vieler Untersuchungen. Dabei konnten Reduktionen der Netto-Photosynthese, gemessen als $\text{mol CO}_2 \cdot \text{Blattfläche}^{-1}$, festgestellt werden (Nogués & Baker 1995, Singh 1996, Moorthy & Kathiresan 1997, Allen et al. 1997). Diese Effekte wurden häufig in Zusammenhang gebracht mit einer Beeinträchtigung der Rubisco-Funktion (Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) bzw. einer Reduktion des Rubisco-Gehaltes (Huang et al. 1993, Wilson et al. 1995, Rao et al. 1995, Greenberg et al. 1996, Gerhardt et al. 1999) oder einem Einfluss auf den stomatären Blattwiderstand (Middleton & Teramura 1993, Day & Vogelmann 1995, Dai et al. 1995, Nogués et al. 1999).

Nicht nur Gehalt und Funktionalität vieler Enzyme werden durch UV-B-Strahlung beeinträchtigt, auch die Genexpression wird oft nachhaltig gestört. Mehrere Untersuchungen konnten eine Reduktion der Gentranskriptmenge für die kleine und die große Untereinheit der Rubisco nachweisen, wobei die Transkription nukleus-codierter Proteine grundsätzlich UV-sensitiver ist als die chloroplasten-codierter Proteine (Jordan et al. 1994, Mackerness et al. 1996, 1997b). Dies drückt sich beispielsweise in einer sehr viel geringeren Sensitivität der psbA-Transkripte (D1-Protein) aus (Mackerness et al. 1996, 1997b).

1.3.5 UV-absorbierende Substanzen

Die Strahlungsabsorption durch UV-absorbierende Substanzen in epidermalen Geweben ist eine weitverbreitete Strategie im Pflanzenreich (Jordan 1996). Verantwortlich hierfür sind phenylpropanoide Verbindungen, hauptsächlich Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate. Diese Substanzen besitzen eine hohe Absorptionskapazität im UV-Bereich und nehmen unter dem Einfluss von UV-Strahlung zu (Grammatikopoulos et al. 1999, Olsson et al. 1999, Mazza et al. 2000). Untersuchungen zur epidermalen UV-Strahlungsabsorption weisen erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzengruppen auf (Day et al. 1992), wonach Coniferen eine Absorption bis zu 100 % aufweisen, während bei manchen krautigen Dicotylen noch 40 % der UV-B-Strahlung im Mesophyll detektierbar ist. Der Einsatz von flavonoiddefizienten Mutanten konnte die Schutzfunktion dieser Substanzen besonders deutlich machen (Li et al. 1993, Lois & Buchanan 1994, Stapelton & Walbot 1994, Mazza et al. 2000).

1.4 Der Phenylpropanstoffwechsel im Gersten-Primärblatt

1.4.1 Allgemeine Biosynthese und Strahlungsregulation

Der Phenylpropanstoffwechsel nimmt seinen Ausgang in der Bildung von Zimtsäure aus Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Durch anschließende Modifikationen und Aktivierung als CoA-Ester entsteht 4-Cumaroyl-CoA, welches durch schrittweise Kondensation mit 3 Molekülen Malonyl-CoA unter Decarboxylierung und Abspaltung von CoA das C₁₅-Grundgerüst des Flavonoidstoffwechsels bildet, ein 2', 4, 4', 6'-

Tetrahydroxychalkon (Heller & Forkmann 1999). Katalysiert wird diese komplexe Reaktion durch die Chalkon-Synthase (CHS). Die Cyclisierung des Chalkons zum Flavanon erfolgt durch die Chalkon-Isomerase (CHI) und davon ausgehend die Biosynthese verschiedenster Klassen von Flavonoiden, z. B. Flavone, Isoflavone, Flavonole, Anthocyane und andere. Nicht nur die Vielzahl an Substanzklassen, auch die Vielfalt der Modifizierungen, die diese Substanzen erfahren können (Glycosylierung, Methylierung, Hydroxylierung, Glucuronidierung, etc.), erweitern die Palette flavonoider Substanzen (Heller & Forkmann 1999).

Die Biosynthese der Phenylpropane erfolgt entwicklungsabhängig (Peters 1987, Reuber 1991), wird aber durch eine Vielzahl äußerer Stimuli, u.a. hohe PAR- oder UV-Strahlung induziert (s. Dixon & Paiva 1995). Die Strahlungsregulation erfolgt häufig auf der Ebene der Transkription (Schmelzer et al. 1988, Strid 1993, Brosché et al. 1999) unter Beteiligung verschiedener Photorezeptoren (Phytochrom, Cryptochrom und UV), die entweder allein (Beggs et al. 1987) oder gemeinsam in synergistischer Weise (Ohl et al. 1989, Jenkins 1997) auf die Genexpression wirken. Der Einfluss der UV-Strahlung auf das Eingangsenzym PAL und auf die CHS (Kubasek et al. 1992, Wu & Hahlbrock 1992, Haussühl et al. 1996, Kalbin et al. 1997) bzw. auf die vermehrte Akkumulation der Phenylpropane ist in vielen Untersuchungen nachgewiesen worden (Beggs & Wellmann, 1985, Frohnmeyer et al. 1992, Lois 1994).

1.4.2 Phenylpropane im Gersten-Primärblatt

Im Gersten-Primärblatt akkumulieren hauptsächlich C-Glucosylflavone (Fröst et al. 1977) und bilden den Hauptanteil an löslichen Phenylpropanen. Der Anteil an löslichen HCA-Derivaten ist sehr viel geringer (Liu et al. 1985). Die flavonoide Hauptkomponente ist Saponarin mit einem Anteil von 80 - 90% am Gesamtflavonoidgehalt (Peters 1987; Berger 1989, Reuber 1991, Liu et al. 1995). Als flavonoide Nebenkompenten wurden Lutonarin, Lutonarin-4'-Methylether, Isovitexin, Vitexin und Isoorientin identifiziert (Reuber et al. 1996a). Abb. 1.2 gibt die Strukturformeln der wichtigsten Substanzen wieder. Unter den HCA-Derivaten wurden Ferulasäure und p-Cumarsäure identifiziert.

Gramineen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht nur in der Epidermis, sondern auch im Mesophyll Phenylpropane akkumulieren (Effertz & Weissenböck 1980, Knogge & Weissenböck 1986, Schulz et al. 1985, Jähne et al. 1993). Im Gersten-Primärblatt zeichnen sich Epidermis und Mesophyll durch ein identisches Phenylpropanmuster aus (Peters 1987, Liu et al. 1995). Liu et al. (1995) konnten in der oberen Epidermis etwa 40 % Saponarin und 20 % Lutonarin wiederfinden. Die untere Epidermis konnte nicht isoliert untersucht werden, aber die Autoren schätzten den Flavonoidanteil auf ca. 10 % des Gesamtgehaltes, so dass sie 50 % der Flavonoide im Mesophyll vermuten. Eine Zunahme der Flavonoide unter UV-Bestrahlung erfolgte gleichmäßig über beide Gewebetypen. Darüber hinaus konnten sie der oberen Epidermis einen Anteil an löslicher Ferulasäure von ca. 8-10 % zuordnen.

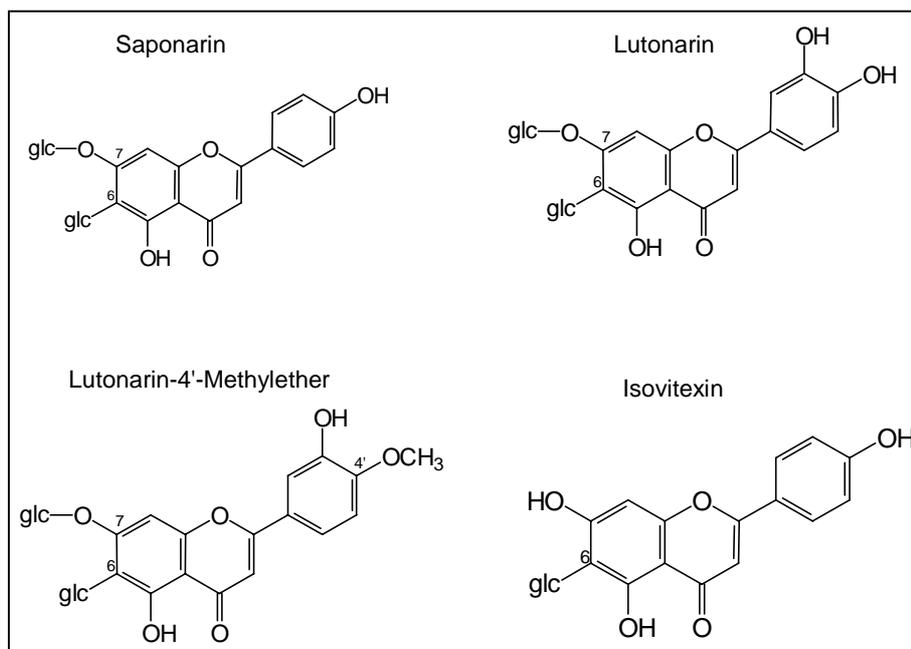


Abb. 1.2: Lösliche Flavonoide im Primärblatt von Gerste. Saponarin = Isovitexin-7-O-Glucosid, Lutonarin = Isoorientin-7-O-Glucosid. Dargestellt sind die wichtigsten Flavonoide.

1.4.3 Phenylpropane in einer flavonoidarmen Gerstenmutante

Die UV-Reaktivität des Gersten-Primärblatts im Hinblick auf den Phenylpropanstoffwechsel wurde auch von Reuber (1996) gezeigt. Zur Bewertung der Rolle von löslichen Flavonoiden

als UV-Schutzsubstanzen verglich er den Einfluss von UV-Strahlung auf die Effizienz des Photosystems II mittels F_v/F_m -Messungen an einer 7 d alten flavonoidarmen Gerstenmutante im Vergleich zu Muttervarietät. Die Gerstenmutante stammte aus der Sammlung proanthocyanidin-freier Mutanten des Carlsberg-Research-Laboratoriums in Kopenhagen, Dänemark. Alle diese mit "ant" bezeichneten Gerstenmutanten weisen unter anderem eine Mutation im Phenylpropanstoffwechsel auf (Jende-Strid 1993) und wurden mit der Intention erzeugt, phenylpropanfreie Gerstekaryopsen zur einfacheren Bierherstellung zu gewinnen. Die proanthocyanidin-freien Gerstenmutanten zeigen keine stark eiweißfällenden Eigenschaften, was zu einer deutlich höheren Haltbarkeit und Stabilität des Bieres führt (Reuber, 1996). Reuber konnte aus der umfangreichen Sammlung vier Mutantenlinien ausfindig machen, deren Phenylpropanstoffwechsel im Primärblatt reduziert war (Reuber et al. 1997). Die Untersuchung der Phenylpropanmuster im Primärblatt aller vier Mutanten entsprach im wesentlichen den Mustern der jeweiligen Muttervarietät, wies jedoch einen erheblich reduzierten Gehalt an Flavonoiden auf (Reuber et al. 1996a). Zusätzlich akkumulierte eine neue Substanz, die durch NMR-Spektroskopie, Massenspektroskopie, Diodenarray-HPLC und Co-Chromatographie mit authentischem Standard als Isosalipurposid = 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxychalkon-2'-O- β -Glucopyranosid identifiziert wurde (Reuber et al. 1997). Eine genetische Analyse der phänotypisch ähnlichen Mutantenlinien führte zur Identifikation eines bisher nicht bekannten Mutationsortes und zur Bildung einer weiteren Komplementationsgruppe mit der Bezeichnung Ant 30. Danach werden die vier Mutantenlinien wie folgt bezeichnet: 1. *ant* 30-287 (Muttervarietät Hege 550/75), *ant* 30-310 (Muttervarietät Ca 33787), *ant* 30-272 (Muttervarietät VP 116) und *ant* 30-245 (Muttervarietät Gunhild) (Reuber et al. 1997). Die Mutation beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf einem Defekt der Chalkon-Isomerase, die die enzymatische Cyclisierung des Chalkons zum Flavanon bewirkt. Die geringen detektierten Flavonoidgehalte im Mutanten-Primärblatt kommen durch chemische Autocyclisierung zustande (Mol et al. 1985).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Thema dieser Arbeit ist die Frage, ob und inwieweit Flavonoide, speziell Flavonglykoside, in der Lage sind, als epidermales „Schutzschild“ den Photosyntheseapparat im Primärblatt junger Gerstenpflanzen vor dem Einfluss schädigender UV-Strahlung, insbesondere UV-B-Strahlung zu schützen. Für die Beantwortung der Frage war eine vergleichende Untersuchung

der flavonoidarmen Gerstenmutante *ant* 30-287 und der flavonoidreichen Muttervarietät *Hege* 550/75 notwendig. Im Mittelpunkt stand hierbei der Einfluss erhöhter UV-B-Strahlung auf die Flavonoidakkumulation und auf die Photosynthese in den Primärblättern beider Gerstevarietäten.

1.5.1 Flavonoidakkumulation

1. Es sollte die Flavonoidakkumulation im Primärblatt über eine Entwicklungszeit von mehreren Tagen charakterisiert werden, um Akklimatisierungseffekte in der Mutter (im weiteren Verlauf nur noch mit "*Hege*" bezeichnet) bzw. in der Mutante (im weiteren Verlauf nur noch mit "*ant*" bezeichnet) aufgrund UV-B-bedingter Flavonoidzunahme mit der Photosynthese in Beziehung setzen zu können. Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund: Ist die Mutante in der Lage, ihren Gehalt an UV-Schutzsubstanzen allein durch den nicht-enzymatischen Mechanismus der autocyclischen Entstehung der Flavanone bzw. Flavonglykoside kontinuierlich zu erhöhen? Wenn ja, wie groß ist dieser potentielle UV-Schutz in Relation zur Muttervarietät?

2. Ein zweiter wichtiger Aspekt war die Untersuchung der UV-Strahlungsabsorption in der Epidermis von Mutter und Mutante. In dieser Arbeit sollte eine kürzlich neu entwickelte Methode auf der Grundlage der Messungen von Chlorophyll Fluoreszenz eingesetzt werden (Bilger et al. 1997), die eine Beurteilung der epidermalen UV-Strahlungsabsorption auf nicht-invasive Weise erlaubt. Reuber (1996) konnte mit Hilfe der "micro-fiber optic" zeigen, dass in das Mesophyll der Mutante im Vergleich zur Muttervarietät etwa die doppelte Menge an monochromatischer Strahlung der Wellenlänge 310 nm eindringen konnte. Für das Gerstenblatt der Gerstensorte Atlas ist bekannt, dass das Hauptflavonoid Saponarin in beiden Geweben Epidermis und Mesophyll lokalisiert ist, wobei die Epidermen einen Anteil von ca. 50 % aufweisen, der ungleich auf die abaxiale und adaxiale Seite verteilt ist (Liu et al. 1995). Mit Hilfe dieser Methode sollte an den Gersten-Primärblättern beider Varietäten gezeigt werden, ob eine Korrelation zwischen epidermaler Transmission und dem Flavonoid- bzw. Phenylpropangehalt vorliegt. Damit könnte eine Abschätzung der epidermalen Strahlungsabsorption bei Mutante und Muttervarietät erfolgen. Ein solcher experimenteller Ansatz war bisher an Gramineen noch nicht etabliert worden. Aufgrund der Schwierigkeit einer Zuordnung der phenylpropanoiden Inhaltsstoffe zur Epidermis bzw. zum Mesophyll bei Gerste sollte die Methode vorab an Roggen-Primärblättern ausprobiert und etabliert werden,

da diese sich durch eine strikte gewebespezifische Verteilung verschiedener Flavonoidgruppen in Epidermis und Mesophyll auszeichnen, die einer einfachen HPLC-Analyse zugänglich sind.

1.5.2 Photosynthese im Gersten-Primärblatt unter dem Einfluss erhöhter UV-B-Strahlung

Die bisherigen Untersuchungen an einer Vielzahl von Pflanzenarten haben deutlich gemacht, dass mehrere "targets" der Photosynthese als UV-sensibel gelten können. Wo und wie UV-Strahlung, insbesondere UV-B-Strahlung in diese Prozesse aber schädigend eingreift, ist offenbar von Pflanzenart zu Pflanzenart verschieden. Mit dem Einsatz der flavonoidarmen Gerstenmutante sollte der vermutete negative Einfluss erhöhter UV-Strahlung charakterisiert werden. Diese Charakterisierung galt drei Schwerpunkten:

1. Wie wirkt sich erhöhte UV-Strahlung auf den Elektronentransport und die Effizienz des Photosystems II, nachweisbar durch Untersuchungen zur Chlorophyll-Fluoreszenz (F_v/F_m), über eine mehrtägige Entwicklungsperiode im Primärblatt von Mutante und Muttervarietät aus? Hierzu waren begleitende Untersuchungen zum photochemischen (qP) und nicht-photochemischen quenching (qN) vorgesehen. Darunter versteht man die im Verlauf der Photosynthese einsetzenden Prozesse, die zur Löschung ("quenching") der Chlorophyll-Fluoreszenz beitragen. Dazu gehört die photochemische Energieumwandlung am Photosystem II (qP) bzw. der nicht-photochemische Verlust der Anregungsenergie (qN), der unterschiedliche Ursachen haben kann. Diese ergänzenden Ergebnisse erlauben eine umfassendere Beurteilung der Effizienz des Photosystems II (von Willert et al. 1995).

2. Die Effizienz des Photosystems II korreliert nicht unbedingt mit der CO_2 -Fixierung. Gaswechsellmessungen sind daher zur umfassenden Beurteilung der photosynthetischen Leistung sehr nützlich (Maxwell & Johnson 2000). Die Untersuchung der Sauerstoffentwicklung auf der einen Seite und die Untersuchung der CO_2 -Fixierung auf der anderen Seite geben Aufschluss über verschiedene mögliche Orte einer UV-Schädigung, beispielsweise im Bereich des Calvin-Cyclus, wo die Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Rubisco) ein mögliches "target" sein könnte (Gerhardt et al. 1999). UV-bedingte Änderungen am wasserspaltenden Komplex können durch direkte Messung der O_2 -Entwicklung erfasst werden.

Diese Untersuchungen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Jürgen Brückmann (1998) in der Arbeitsgruppe von Prof. Weißenböck durchgeführt. Die in der Diplomarbeit veröffentlichten Ergebnisse (Brückmann 1998) werden in der Diskussion vorgestellt und diskutiert.

3. Neben der Charakterisierung von Beeinträchtigungen oder Schädigungen am Photosyntheseapparat sollte eine eventuelle Akklimatisierung an erhöhte UV-Strahlung untersucht werden. Akklimatisierungsprozesse können neben dem oben erwähnten Aspekt der UV-Abschirmung durch epidermale Flavonoidakkumulation auch durch effiziente Reparatur geschädigter Strukturen charakterisiert sein, wie dies beispielsweise bei UV-induzierten DNA-Schäden der Fall ist (Jansen et al. 1998). Im Bereich der Photosynthese ist die Möglichkeit einer erhöhten Synthese des D1-Proteins bzw. einer gesteigerten D1-Turnoveraktivität sehr wahrscheinlich, da das D1-Protein als UV-sensible Struktur beschrieben ist (Mackerness et al. 1997a). Eine erhöhte Reparaturaktivität im Photosyntheseapparat bei der Gerstenmutante war durchaus zu erwarten, nachdem Reuber (1996) das verstärkte Eindringen von UV-Strahlung in das Mesophyll der Mutante im Vergleich zur Muttervarietät gezeigt hatte.

Wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Bearbeitung waren zuverlässige, homogene und naturnahe Strahlungs- und Klimabedingungen sowie die Verwendung eines entwicklungsphysiologisch möglichst homogenen Blattmaterials:

1.5.3 Akklimatisierung während der Blattentwicklung

Akklimatisierungsprozesse sollten in Primärblättern verschiedenen Alters bzw. Entwicklungsstadiums verfolgt werden. Aufgrund des für das Gramineenblatt typischen Basalmeristems wächst bzw. altert das Blatt von basal nach apikal, d.h. es bildet sich ein Entwicklungsgradient vom Blattgrund zur Blattspitze hin aus (Baier et al. 1996). Daher sollte nicht das gesamte Blatt untersucht werden, sondern apikale Blattsegmente, um eine weitestgehende entwicklungsphysiologische Homogenität der Blattproben zu gewährleisten. Um verschiedene Phasen einer möglichen Akklimatisierung, z.B. durch zunehmende epidermale Flavonoidkonzentrationen, studieren zu können, wurden 5, 7, 10 und 15 d alte Primärblattsegmente untersucht.

1.5.4 Naturnahe Strahlungs- und Klimabedingungen

Die in der umfangreichen (UV-)Literatur veröffentlichten Untersuchungen zum Einfluss von UV-Strahlung auf Pflanzen basieren auf vielfältigen und wenig standardisierten Versuchsbedingungen, insbesondere hinsichtlich des Strahlenklimas, dem die Versuchspflanzen jeweils ausgesetzt waren. Untersuchungen in Feldversuchen und in Pflanzenanzuchtkammern mit naturnahen Strahlungsbedingungen konnten zeigen, dass die Strahlungszusammensetzung bzw. die Berücksichtigung eines hohen Anteils der PAR an der Gesamtstrahlung für die Interpretation beobachteter UV-Effekte von wesentlicher Bedeutung ist (Caldwell und Flint 1994). Zur Durchführung des Versuchsprogramms war daher die Einrichtung einer UV-Bestrahlungsanlage erforderlich, die innerhalb der technisch vorgegebenen Grenzen optimale Bestrahlungsbedingungen aufwies und eine Simulation naturnaher Versuchsbedingungen ermöglichte. Diese Bedingung war bisher nicht gegeben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Das Saatgut von *Hordeum vulgare* L. stammt ursprünglich aus der Mutanten-Sammlung "Proanthocyanidin-freier Gersten" des Carlsberg-Research-Laboratory, Kopenhagen, Dänemark und wurde von Frau Dr. B. Jende-Strid zur Verfügung gestellt. Vier Mutantenlinien aus dieser Sammlung mit den entsprechenden Muttervarietäten werden durch die freundliche Unterstützung des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung, Köln, Abt. Prof. Salamini, seit mehreren Jahren dort vermehrt und nach der Ernte im Samenlager des MPIZ kühl und trocken gelagert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete ungebeizte Saatgutcharge wurde aus dem Original-Saatgut in einer Kalthaus-Anzucht vermehrt.

Das mit Sibutol gebeizte Saatgut von *Secale cereale* L. cv. Kustro wurde von der Fa. Lochow-Petkus, Bergen, bezogen.

2.1.2 Geräte

Klimakammer:	Pflanzenanzuchtschrank Typ VB 0714/S, Fa. Vötsch, Balingen.
Lampen:	Krypton-Glühbirnen 100 W, Fa. Osram, München HQI-T-Strahler 400 W, Fa. Osram, München UV-B-Leuchtstoffröhren des Typs TL 20 W/12, Fa. Philips, Hamburg Kaltlichtlampe KL 1500, Fa. Schott, Mainz
Filter:	Plexiglas-Filter GS 231, Fa. Röhm, Darmstadt Filterfolie URT (100 µm), Fa. Digefra, München
Photometer:	Spektralphotometer Uvikon 810, LS Printer 48, Uvikon Recorder 21, alle Fa. Kontron Hermle, Goßheim

Strahlungsmessung:	Spektroradiometer Modell DM 150 BC, Fa. Bentham Instruments, Berkshire (GB) Quantameter LI-185 A, Fa. Lambda Instruments, Lincoln (USA)
HPLC:	System Controller SCL-10A, Fa. Shimadzu, Kyoto (J) zwei Pumpen LC-10AS, Fa. Shimadzu, Kyoto (J) Autoinjector SIL-10A, Fa. Shimadzu, Kyoto (J) UV-spektrophotometrischer Detektor SPD-10A, Fa. Shimadzu, Kyoto (J) Integrator Chromatopac C-R5A, Fa. Shimadzu, Kyoto (J) Vertex-Säule 125 x 4,6 mm, Fa. Bischoff, Leonberg Nucleosil 100-5 C8 (Partikelgröße 5 µm), Fa. CS Chromatographie-Service, Langerwehe
Fluorometer:	PAM Fluorometer 101 Kontrolleinheit Zusatzmodulen PAM 102 und 103, alles Fa. Walz, Effeltrich Mini-PAM Fluorometer, Fa. Walz , Effeltrich Blattkammer 2030-B, Fa. Walz, Effeltrich Xenon-PAM-Fluorometer, Fa. Walz , Effeltrich
Filter Xenon-PAM:	2 DUG 11, 2mm, Fa. Schott, Mainz UG 11, 1 mm, Fa. Schott, Mainz GG 19, 2 mm, Fa. Schott, Mainz DUG 11, 2 mm, Fa. Schott, Mainz BG 39, 4 mm, Fa. Schott, Mainz BG 39, 4 mm, Fa. Schott, Mainz NG 3, 1 mm, Fa. Schott, Mainz NG 5, 2 mm, Fa. Schott, Mainz RG 9, 2 mm, Fa. Schott, Mainz RG 695, 2 mm, Fa. Schott, Mainz UV-blocking filter, Fa. Balzers, Liechtenstein DT-red, Fa. Balzers, Liechtenstein
Gelelektrophorese:	Mini-Protean II Elektrophoresezelle, Fa. Biorad, München Power Supply Modell 3000, Fa. Biorad, München
Blot:	Semi-Dry-Blotapparatur, Fa. LTF Labortechnik, Wasserburg
Scanner:	Agfa Arcus II, Fa. Agfa, Mortsel (B)
Scintillationszähler:	Beckmann Betaszint LS 6000 TA, Fa. Beckmann, München

pH Meter:	HI 9017 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Thermoblock:	Bioblock Scientific, Thermolyne, Iowa (USA)
Waagen:	Analysenwaage, Fa. Mettler Spoerhase, Zürich (CH) Präzisionswaage FA-110-4, Fa. Faust, Köln
Zentrifugen:	Biofuge A, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode Rotixa K, Fa. Hettich, Tuttlingen

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Käufliche Chemikalien

Fa. Linde, Köln:	Flüssiger Stickstoff
Fa. Merck, Darmstadt:	Quarzsand, <i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 % (reinst), Dimethylsulfoxid (DMSO)
Fa. Schindler, Köln:	Methanol (wurde vor Verwendung im Labor destilliert)
Fa. Baker, Großgerau:	Acetonitril (ACN)
Fa. Beckmann, München:	Readysafe Universalflüssigszintillationscocktail
Fa. Roth, Karlsruhe:	PVDF-Membran, Rotiphorese Gel 30
Fa. Amersham, Freiburg:	Hyperfilm β -max
Fa. ICN Pharmaceuticals, Kalifornien (USA):	^{35}S -Methionin, 370 MBq/ml, 43.5 MBq/mmol
Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren:	Papier-Rundfilter 615
Fa. Schleicher & Schuell, Dassel:	Gel blotting paper GB 002
Fa. Biomol, Hamburg:	Tricine, Tris ultra pure, BSA, SDS, Glycine
Fa. Sigma, Deideshofen:	alle nicht extra gelisteten Feinchemikalien

Wasser wurde der Millipore Super-Q-Anlage des Botanischen Institutes entnommen.

2.1.3.2 Nicht-käufliche Chemikalien

Der D1-Antikörper wurde freundlicherweise von Frau Dr. Doris Godde, Universität Bochum, zur Verfügung gestellt. Die Flavonoide aus Gerste (Saponarin, Lutonarin) und Roggen (R1, R2, R3, R4) entstammten aus dem Laborbestand.

2.2 Methoden

2.2.1 Einrichtung eines neuen Pflanzenanzuchtschranks mit UV-Bestrahlungsanlage

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in einer neu eingerichteten Pflanzenanzuchtkammer durchgeführt. Die Notwendigkeit zur Einrichtung und Nutzung einer solchen Kammer ergab sich aufgrund der zunehmenden Erkenntnis in der wissenschaftlichen Literatur, dass die Beurteilung von UV-Effekten wesentlich von der Zusammensetzung der Gesamtstrahlung abhängt und nicht allein von der Dosis und der spektralen Qualität der verwendeten UV-Strahlung (Caldwell & Flint 1994). Die Entwicklung optimaler Bestrahlungsbedingungen unter den vorgegebenen technischen Spezifikationen des in Betracht kommenden Pflanzenanzuchtschranks war eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführbarkeit der Experimente und soll im folgenden detaillierter erläutert werden.

2.2.1.1 Vorgegebene technische Spezifikationen der neuen UV-Kammer

Maßgeblich für die Auswahl des Pflanzenanzuchtschranks VB 0714/S (Fa. Vötsch, Balingen) war die Erfüllung von Mindestanforderungen an die Intensität der PAR (sichtbares Licht, $\lambda = 400-700$ nm) und die Kontrollierbarkeit bzw. Variierbarkeit von Temperatur und Luftfeuchte. Zur Durchführung von UV-Experimenten war der Einbau einer entsprechenden Strahlungseinrichtung erforderlich. Die Konzeption hierzu wurde in Zusammenarbeit mit dem zuständigen Ingenieur der Fa. Vötsch von den beiden Doktoranden der Arbeitsgruppe (R. Schmitz und P. Burchard) erstellt. Die darüber hinaus erforderlichen Untersuchungen zur Kammerausstattung und zur Strahlungsvermessung wurden mit unterschiedlichen Schwerpunkten von R. Schmitz und der Autorin durchgeführt.

Die Kammer wies folgende Standardspezifikation auf:

- Stellfläche für Pflanzenmaterial 94 cm x 72 cm, über die gesamte Prüfraumhöhe von
- 1,40 m verstellbar;
- Temperatur von +5 bis +45 °C; bei voller Leistung des Beleuchtungsmoduls kann eine Temperatur von +10 °C nicht unterschritten werden;
- Rel. Luftfeuchte von 40 % bis 95 % einstellbar; bei voller Leistung des Beleuchtungsmoduls wird eine obere Grenze von 85 % erreicht;
- Die Bestrahlungsstärke der PAR lag nach Herstellerangaben bei einer Distanz von 50 cm zwischen Stellfläche und Beleuchtungsmodul bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Das Beleuchtungsmodul der Kammer war mit 4 Krypton-Glühlampen 100 W (Osram) und 8 HQI-T 400 W (Osram) bestückt. Nachfolgendes Schema gibt die Anordnung der Lampen wieder (1-8 = HQI-T, G = Krypton Glühlampe)

1	2	3
G		G
4		5
G		G
6	7	8

Dieses Beleuchtungsmodul war in 6 Stufen schaltbar:

alle Glühbirnen und HQI-Lampen aus,

4 Glühlampen;

4 Glühlampen + 2 x HQI (4,5);

4 Glühlampen + 4 x HQI (2,4,5,7);

4 Glühlampen + 6 x HQI (1-3,6-8);

4 Glühlampen + alle HQI.

2.2.1.2 UV-Bestrahlungseinrichtung

In Zusammenarbeit mit dem Werkstattleiter des Botanischen Instituts, Herrn Leson, wurde ein Filtergestell für das UV-Bestrahlungsmodul entwickelt, um mit Hilfe von Filterfolien oder Plexiglas-Filtern unerwünschte spezifische Bereiche des Strahlungsspektrums der UV-B-Röhren (s. Abb. 2.1 - Emissionsspektrum), wie UV-C-Strahlung, herauszufiltern. Die bis dato verwendeten WG-Glasfilter (Fa. Schott) konnten aus Kostengründen nicht herangezogen werden; als Ersatz kamen Folien mit geeigneten spektralen Filterqualitäten in Betracht. Mehr als 30 verschiedene Folientypen wurden im Photometer spektral vermessen. Besondere Beachtung fanden dabei folgende Gesichtspunkte:

- a) die Folie sollte im Bereich der PAR eine Transmission von mindestens 90 % aufweisen;
- b) die Absorptionskante sollte zum Ausschluß von UV-C-Strahlung im Bereich von 280-290 nm möglichst steil sein und bei $\lambda < 280$ nm eine Transmission von 0 % aufweisen;
- c) eine weitere Folie sollte entsprechende Charakteristika für den Ausschluß von UV-B-Strahlung aufweisen, um im Bedarfsfall Unterschiede in UV-B- und UV-A-Effekten studieren zu können. Diese Folie kam in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zum Einsatz.

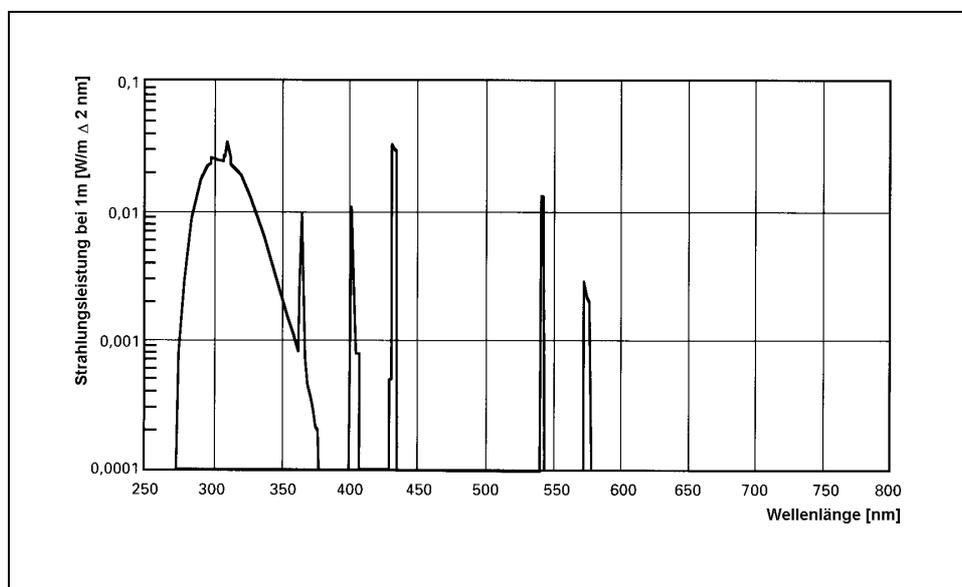


Abb. 2.1: Emissionsspektrum der UV-B-Leuchtstoffröhre TL 12/20 W, Fa. Philips, Hamburg (Herstellerangaben). UV-B = 280 - 320 nm, UV-A = 320 - 400 nm. Der UV-C-Bereich ($\lambda < 280$ nm) wurde in vorliegender Arbeit mit Hilfe geeigneter Folien aus dem Spektrum herausgefiltert.

Die spektralen Eigenschaften der Folien verändern sich unter dem Einfluß der UV-Strahlung, wobei häufig eine Veränderung in den ersten Stunden der Bestrahlung festzustellen ist, die bei längerer Dauer abnimmt. Unter Berücksichtigung eines wöchentlichen Folienwechsels im Routinegebrauch und einer täglichen Bestrahlungszeit von 6 h (s. Kapitel 2.2.1.4: Klimaprogrammierung) wurden die in Frage kommenden Folien über einen Zeitraum von 72 h der Bestrahlung mit den UV-B-Leuchtstoffröhren ausgesetzt. Die Transmissionveränderung wurde über kurzfristige Zeitspannen (von 10 min bis 12 h) als auch über langfristige (24 h, 36 h, 48 h, 54 h, 66 h, 72 h) durch spektralphotometrische Messungen (Uvikon 810, Fa. Kontron Hermle, Goßheim) verfolgt und die beiden besten Folien für den Ausschluss von UV-C- bzw. UV-B-Strahlung ausgewählt. In Abb. 2.2 wird die Veränderung der spektralen Eigenschaften dieser beiden Folien nach 24 bzw. 72 h UV-Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Folie dargestellt. Während die Transmission im Bereich der PAR unverändert blieb, veränderte sich bei den Folien die Absorptionskante mit einer abnehmenden Transmission im UV-Bereich. Diese Abnahme vollzog sich in den ersten 24 h deutlich stärker als in den darauffolgenden weiteren 48 h. Da sich die Transmissionseigenschaften in den ersten 24 h der Bestrahlung am stärksten und nachfolgend deutlich weniger änderten, wurden die Folien im Standardgebrauch 24 h lang vorbestrahlt, bevor sie für weitere 42 h (7 * 6 h täglich) eingesetzt wurden. Die Untersuchungen zur Vorauswahl der Folien wurde von der Autorin durchgeführt, die endgültige Untersuchung der beiden in Frage kommenden Folien sowie die graphische Auswertung aller Daten von R. Schmitz.

Folgende Folien standen somit als Filter zur Verfügung:

- a) die UV-C-absorbierende Folie URT (100 µm) (Fa. Digefra, München)
- b) die UV-B-absorbierende Folie Folanorm (100 µm) (Fa. Folex, Dreieich)
- c) der UV-absorbierende Filter aus Plexiglas GS 231, 3 mm, (Fa. Röhm, Darmstadt). Dieser Filter hatte sich bereits früher als Filter für die Kontrollexperimente bewährt. Die spektralen Eigenschaften dieses Filters verändern sich nicht unter UV-Einfluss.

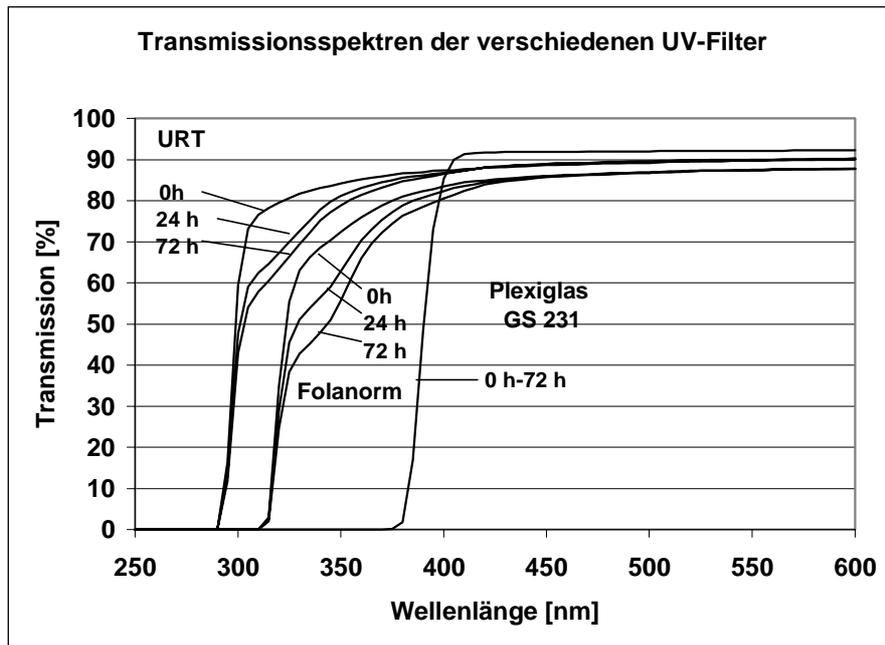


Abb. 2.2: Transmissionsspektren der Folien URT (UV-C-Filter), Folanorm (UV-B-Filter) und des Plexiglasses GS 231 (UV-Filter) nach Bestrahlung mit den UV-B-Leuchtstoffröhren TL12/20 W, Fa. Philips. Die Messungen erfolgten mit einem Spektralphotometer (Uvikon 810, Fa. Kontron Hermle). Die Transmission der beiden Folien URT und Folanorm nimmt mit zunehmender UV-Bestrahlung im UV-Bereich ab, wobei sich in den ersten 24 h der Bestrahlung die stärksten Veränderungen vollziehen. Danach ändert sich die Transmission der UV-C-Filterfolie nur noch geringfügig, die der UV-B-Filterfolie etwas stärker. Der Plexiglas-Filter zeigt keine Transmissionsveränderungen. Der Bereich der PAR (400-700 nm) bleibt unverändert. (Abbildung von R. Schmitz, verändert, mit freundlicher Erlaubnis).

Die Filter wurden in einen Rahmen eingespannt, der mit der UV-Bestrahlungseinheit direkt verbunden war und die gleichen Ausmaße hatte. Der Abstand zwischen dem Filter und den UV-B-Röhren betrug 10 cm.

2.2.1.3 Strahlungsvermessung

Im Vorfeld der Strahlungsvermessung wurde ein Anforderungsprofil an die erwünschten Strahlungsbedingungen erstellt, welches sich an folgenden Eckdaten orientierte:

1. um dem Ziel der Simulation von naturnahen Strahlungsbedingungen weitestgehend gerecht zu werden, musste die PAR-Strahlung so hoch wie möglich sein;

2. die Tagesdosis der UV-Strahlung sollte sich an der Dosis orientieren, die in der bis dato genutzten UV-Kammer etabliert worden war. Diese betrug für eine 6-stündige Bestrahlungsdauer je nach Filtertyp zwischen 8.8 und 11.7 kJ m⁻² UV-B_(BE). Eine solche Tagesdosis wurde in tropischen Gegenden Asiens gemessen (Bachelet et al. 1991) wie auch in Portugal an klaren Julitagen im Jahr 1989 (Braun 1990); unter Berücksichtigung einer angenommenen 15%igen Ozonreduktion entsprechen 13 kJ m⁻² UV-B_(BE) einer kalkulierten Tagesdosis (Björn & Murphy 1985) an einem wolkenlosen Sommertag (15. Juli) in Lund, Schweden (56 °N, 13 °O) (Reuber 1996).

2.2.1.3.1 PAR-Strahlung

Mit der Einrichtung des UV-Bestrahlungsmoduls in den Prüfraum des Pflanzenanzuchtschranks mussten Einschränkungen in der Bestrahlungsstärke und -verteilung des darüberliegenden PAR-Moduls hingenommen werden:

1. Die vom Hersteller der Kammer ausgewiesene maximale Bestrahlungsstärke von 1000 μmol m⁻² s⁻¹ PAR bei einem Abstand der Stellfläche von 50 cm zum Bestrahlungsmodul konnte durch den Einbau des UV-Moduls nicht erreicht werden;
2. zusätzlich wurde das Bestrahlungsfeld durch Beschattungseffekte weiter eingeschränkt.

Um zu erfassen, wie sich die Beschattung durch das UV-Modul auf die PAR-Verteilung auswirkt, wurde diese auf Pflanzenhöhe mit einem Quantameter (LiCor 1851, Fa. Lambda Instruments, Lincoln, USA) untersucht. Die Stellfläche wurde rasterartig mit 42 Messpunkten versehen. In dem sich hin- und herbewegenden UV-Modul wurden vier UV-Röhren in mehreren Anordnungen installiert. Filter wurden nicht eingesetzt. An jedem Punkt wurden Maximum (= unbeschattet durch das UV-Modul) und Minimum (= beschattet durch das UV-Modul) der PAR bei 100 % Strahlungsleistung festgestellt. Die Strahlungsverteilung ergab ein deutlich inhomogenes Bestrahlungsfeld, das jedoch nicht nur auf der Beschattung durch das UV-Modul, sondern auch auf der Verteilung der PAR-Strahlungsquellen im kammereigenen Bestrahlungsmodul beruhte. Die beste Strahlungsverteilung ergab sich aus einer Anordnung der UV-Röhren in alternierender Weise: in den mit 8 Plätzen versehenen Rahmen wurden vier Röhren von rechts beginnend mit jeweils einem Leerplatz Abstand zwischen ihnen angeordnet (s. Abb. 2.5). Die maximale Bestrahlungsstärke lag bei 650-700 μmol m⁻² s⁻¹ PAR.

2.2.1.3.2 UV-Strahlung

Mit der Vermessung der Bestrahlungsbedingungen durch ein Spektroradiometer erhält man ein genaues Bild der Strahlungsqualität, die auf die Pflanzen einwirkt. Für die Untersuchung von UV-Effekten ist dies von grundlegender Bedeutung, da die Photonenwirksamkeit im UV-Bereich mit abnehmender Wellenlänge der Strahlung steil ansteigt (Madronich 1993). Mit Hilfe von sogenannten "Wichtungsfunktionen", die auf der Grundlage verschiedener Wirkungsspektren beruhen, können die physikalischen Daten in Dosis-Werte umgewandelt werden (Caldwell et al. 1986). Diese Werte ermöglichen den Vergleich von Ergebnissen, die auf der Grundlage unterschiedlichster Bestrahlungsbedingungen gewonnen wurden.

Die spektroradiometrische Vermessung der Bestrahlungsverhältnisse in der UV-Kammer erfolgte mit der freundlichen Unterstützung der "Landesanstalt für Arbeitsschutz Nordrhein-Westfalen", Düsseldorf. Grundlage für die Entwicklung einer Standard-Bestrahlungsbedingung war der Einsatz von vier UV-Röhren wie in der früher verwendeten UV-Kammer (Burchard 1994). Um die Möglichkeiten unterschiedlicher UV-Belastung zu variieren, wurden weitere Variationen in Zahl und Anordnung der UV-Röhren getestet (s. Tab. 2.1). Der Messkopf des Gerätes (Spektroradiometer Model DM 150 BC, Bentham Instrument, Berkshire, GB) war auf eine mittlere Pflanzenhöhe (13.5 cm) eingestellt. Der Motor des UV-Rahmens wurde aus messtechnischen Gründen festgestellt. Im Bereich größtmöglicher Homogenität bei maximaler PAR-Strahlung wurden je ein unbeschatteter und ein beschatteter Messpunkt ausgewählt. Der Abstand zwischen den UV-Röhren und der Bodenplatte betrug 50 cm. Die Absorption der UV-C-Strahlung erfolgte durch eine 24 h lang vorbestrahlte Filterfolie (URT 100, s.o.). In Tab. 2.1 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

In weiteren Messungen wurde die Strahlungsqualität inklusive PAR-Bestrahlung und unter Einsatz beider relevanter Filter (UV-C-Filter URT sowie der UV-absorbierende Filter Röhmplexiglas für die Kontrollexperimente) spektroradiometrisch erfasst. Für die Kontrollbedingungen (WL = Weißlicht) wurden die UV-Röhren ausgeschaltet und in gleicher Position belassen. Leider war es aufgrund der Spezifikation des Spektroradiometers nicht möglich, den gesamten Bereich der PAR abzudecken. Das Gerät konnte nur Strahlung bis $\lambda = 600$ nm messen. Daher wird der Bereich der PAR im folgenden besonders gekennzeichnet (PAR* = 400–600 nm). Der Einfluss der Filter auf die Standardbestrahlung wird in Tab. 2.2 deutlich.

Belegung der 8 Röhrenplätze x=belegt; o=nicht belegt	UV-B (280-320nm) [W/m ²]	UV-B_{BE} [kJ/m ² d]	UV-A (320-400nm) [W/m ²]
o o o x o x o o	0,9	8	8,2
o o x o x o x o	1,1	10	8,5
o o o x x x o o	1,5	14	9,2
o x o x o x o x	1,4	12	8,5
o o x x x x o o	1,8	16	8,1
o x x x x x x o	2,5	22	8,2

Tab. 2.1: Spektrale Strahlungsleistung verschiedener UV-Röhrenanordnungen. Die in dieser Arbeit verwendete Standard-Bestrahlungsbedingung ist mit Fettdruck wiedergegeben. Die Bestrahlungsstärke ist in der Tabelle für den UV-B- und UV-A-Bereich getrennt ausgewiesen. In der mittleren Spalte steht die nach Björn & Murphy (1985) berechnete UV-B-Dosis (der Index (BE) steht für "biologisch effektive Strahlung") für die Dauer einer 6-stündigen Bestrahlung, die in der vorliegenden Arbeit der täglichen Bestrahlungsdosis entspricht.

Bestrahlungs- Bedingung	Filter	UV-B (280-320nm) [W/m ²]	UV-B_{BE} [kJ/m ² d]	UV-A (320-400nm) [W/m ²]	PAR* (400-600nm) [W/m ²]
WL	Röhm-PG	-	-	2,0	110
UV+WL	URT 100	1,4	12	8,5	110

Tab. 2.2: Strahlungsleistung in verschiedenen spektralen Bereichen unter dem UV-C-Filter URT und unter dem UV-Filter Röhm-Plexiglas.

Im Bereich der PAR* zeigten beide Filter identische Transmissionsgrade und somit gleiche Strahlungsleistung. Die Absorptionskanten deckten allerdings die entsprechenden UV-Bereiche nicht ganz ab:

der Röhm-Plexiglas Filter zeigte eine geringe Transmission im UV-A-Bereich ($\lambda < 380$ nm; entspricht 2% der Gesamtstrahlungsleistung, allerdings 24 % der Gesamt-UV-A-Strahlung, siehe auch Abb. 2.2). Darin kam der von den HQI-Lampen emittierte UV-A-Anteil zum Ausdruck, der nicht vollständig gefiltert werden konnte;

der URT 100 Filter absorbierte vollständig UV-C-Strahlung bis 250 nm und UV-B-Strahlung (< 290 nm). Die Spektren der Strahlungsverteilung unter beiden Filtern gibt Abb. 2.3 wieder:

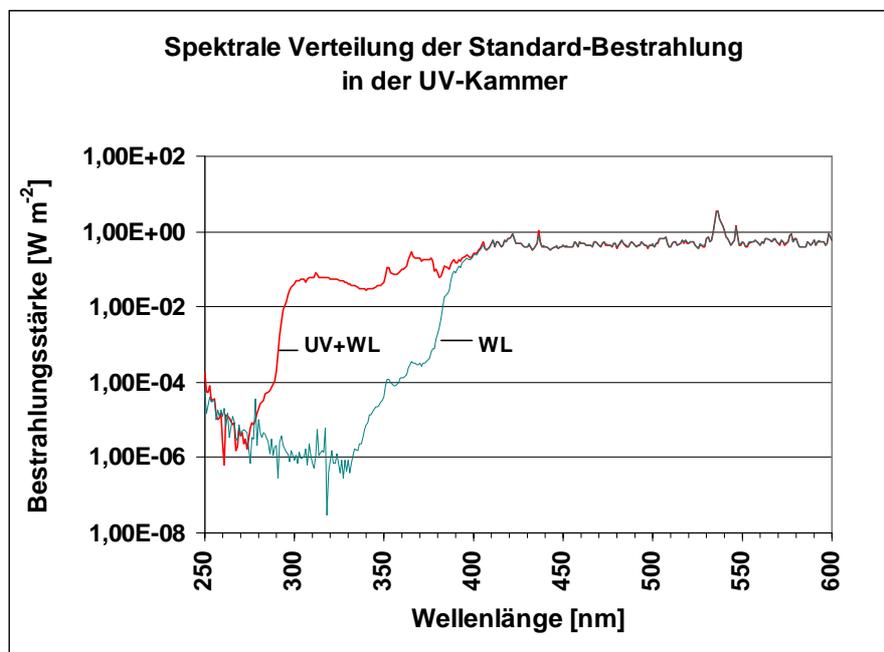


Abb. 2.3: Spektrale Verteilung der Strahlung unter Standardbedingungen für die UV-Experimente (UV+WL) und der Kontrolle (WL) in halblogarithmischer Darstellung. Unter UV+WL-Bedingungen wurden 4 UV-B-Leuchtstoffröhren in alternierender Anordnung plus 100 % Strahlungsleistung des PAR-Strahlungsmoduls eingesetzt. UV-C-Strahlung wurde durch den Einsatz der URT-Folie gefiltert, die zuvor 24 h eingebrannt worden war. Für die WL-Strahlungsbedingung wurden die UV-B-Röhren ausgeschaltet. Die von den HQI-Lampen ausgehende UV-Strahlung wurde durch den Einsatz von dem Röhm-Plexiglasfilter bis auf den langwelligeren Bereich > 380 nm weitgehend absorbiert.

Darüber hinaus wurde die Strahlungsleistung unter der UV-C-absorbierenden Folie im Standardgebrauch untersucht. Die Folie wurden 24 und 66 h (Einbrenndauer bzw. Bestrahlungsdauer bei einwöchiger Benutzung) vorher bestrahlt. Es wurden je ein beschatteter und ein unbeschatteter Messpunkt ausgewählt. Die Ergebnisse fasst Tab. 2.3 zusammen:

Bestrahlungs- bedingung		UV-B (280-320nm) [W/m ²]	UV-B _{BE} [kJ/m ² d]	UV-A (320-400nm) [W/m ²]	PAR* (400-600nm) [W/m ²]
URT	B	1,39	12,2	6,20	82
24 h	U	1,35	11,9	8,54	110
URT	B	1,25	10,8	6,07	83
66 h	U	1,28	11,2	8,36	114

Tab. 2.3: Einfluss der Beschattung und der Filteralterung auf die Strahlungsleistung (B = beschattet, U = unbeschattet).

Die Alterung der UV-C-absorbierenden Folie URT führte im UV-B-Bereich zu einer Minderung der Strahlungsleistung von 6 bis 11 %, im UV-A- und PAR-Bereich um 2 %. Die Unterschiede zwischen den beschatteten und unbeschatteten Messpunkten erwies sich im UV-B-Bereich als gering (< 5 %). Dagegen zeigten sich im UV-A- und im PAR-Bereich deutliche Unterschiede von mehr als 30 %. Diese Beschattungsunterschiede wurden durch die seitliche Bewegung des UV-Moduls mit Hilfe des angebrachten Motors minimiert.

Eine abschließende Rastervermessung des Bestrahlungsfeldes bei UV+WL-Bestrahlung lieferte die Daten für die Strahlungsverteilung auf Pflanzhöhe. Abb. 2.4 gibt die Ergebnisse wieder.

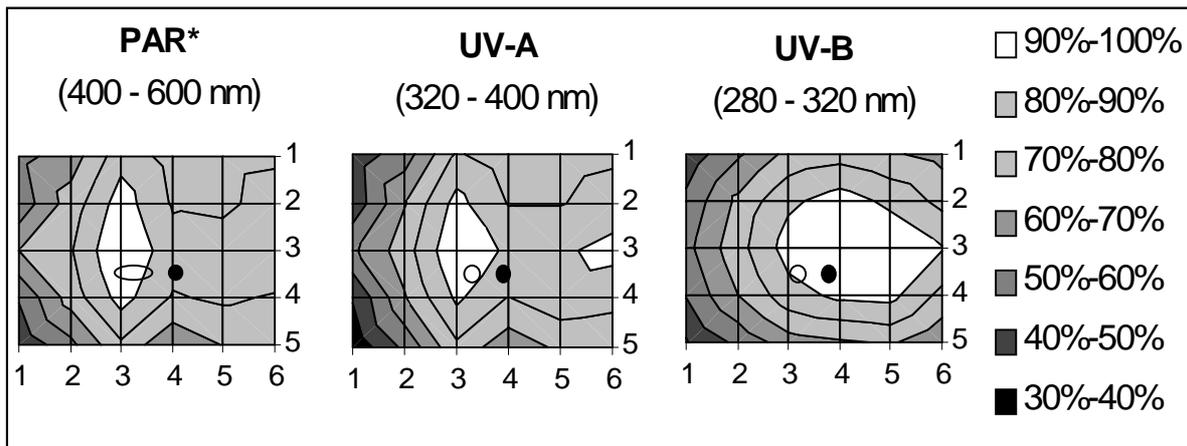


Abb. 2.4: Verteilung der drei spektralen Bereiche PAR*, UV-A und UV-B unter UV+WL-Strahlungsbedingungen im Bestrahlungsfeld auf Pflanzhöhe. Durch den Einbau des UV-B-Bestrahlungsmoduls mussten deutliche Einschränkungen in der Homogenität des Bestrahlungsfeldes hingenommen werden. Die Strahlungsleistung ist in % angegeben, die 100 %-Werte entsprechen 110 W m^{-2} ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) für PAR, 8.54 W m^{-2} für UV-A und 1.35 W m^{-2} für UV-B. Die Punkte geben den Standort des Messkopfes (hell = unbeschattet, dunkel = beschattet) wieder. (Abb. von R. Schmitz, mit freundlicher Erlaubnis).

Abb. 2.5 gibt die Sicht in den Prüfraum der UV-Kammer nach vollständiger Einrichtung wieder.

Eine Vermessung des Bestrahlungsfeldes an den gleichen Messpunkten mit einem Quantameter (Brückmann 1998) ergab für die PAR eine maximale Bestrahlungsstärke von $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Aus dieser Strahlungsverteilung ergab sich für die experimentelle Nutzung der Kammer die Konsequenz, die Pflanzen möglichst in den Bereich optimaler Bestrahlung zu stellen. In den Fällen, in denen das Pflanzenmaterial mehr Platz beanspruchte, wurde die Anordnung durch Rotation täglich verändert, so dass alle Pflanzen im Durchschnitt gleiche Bestrahlungsdosen erfuhren.

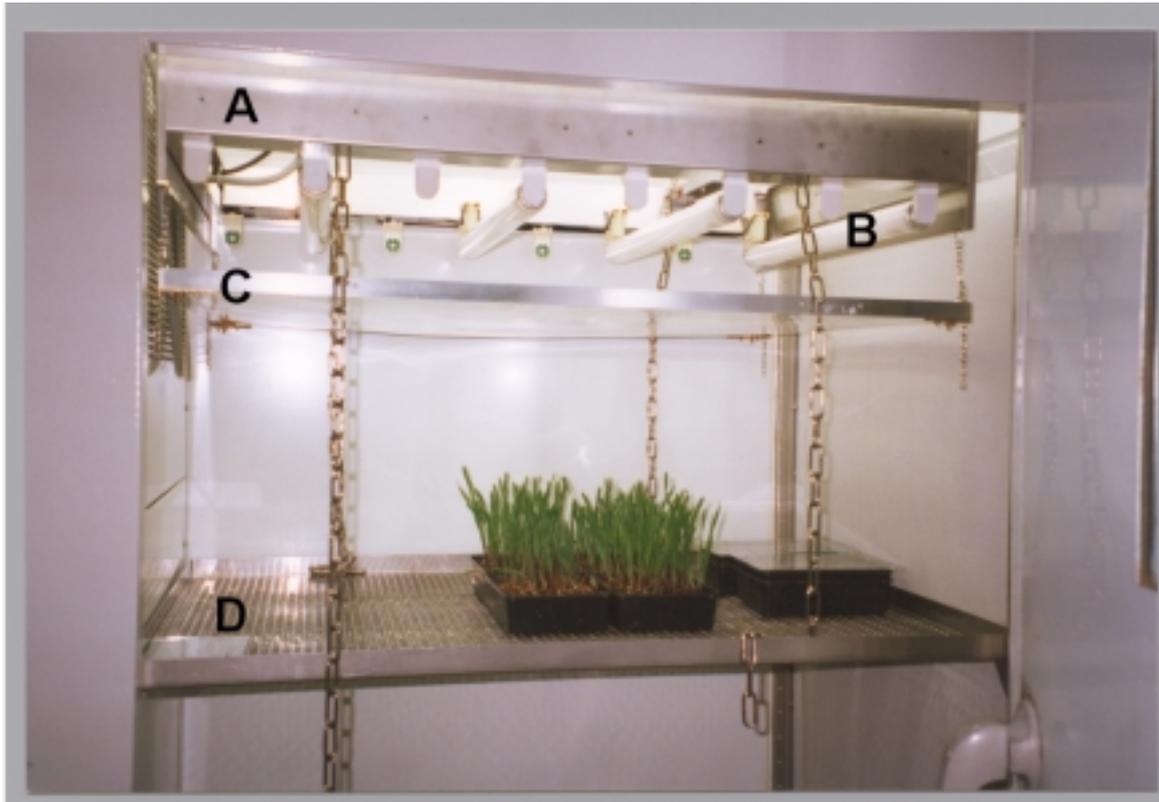


Abb. 2.5: Sicht auf die UV-Bestrahlungsanlage im Prüfraum des Pflanzenanzuchtschranks. A: Rahmen mit Platz für insgesamt 8 UV-B-Leuchtstoffröhren des Typs TL 12/20 W (Fa. Philips). B: Vier Leuchtstoffröhren waren von rechts beginnend mit jeweils einem Leerplatz dazwischen angeordnet. C: In einem Abstand von 10 cm wurden die UV-Filter (UV-C-Filter URT, UV-Filter Röhm Plexiglas) in einem Rahmen installiert, der die gesamte Stellfläche D abdeckte. Der Abstand der Stellfläche zur unteren Kante der UV-B-Röhren betrug 50 cm, zum Bestrahlungsmodul der Kammer (im Photo nicht sichtbar) 84 cm. Der Bewegungsmotor für das UV-Modul befand sich auf der linken Seite neben dem Rahmen des Modul (etwa in Höhe A) und bewegte diesen über eine Strecke von 3 cm in seitlicher Richtung hin und zurück.

Die Messungen im Vorfeld zur Beurteilung des PAR-Bestrahlungsfeldes wurden von P. Burchard durchgeführt, die Auswertung und graphische Aufarbeitung der Daten zur spektroradiometrischen Vermessung erfolgte durch R. Schmitz.

2.2.1.4 Klimaprogrammierung

Das Klimaprogramm in der Kammer orientierte sich an gemessenen Daten des Wetteramtes Essen (1993) aus dem Monat April mit der Absicht, naturnahe Frühlingsbedingungen zu simulieren. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 13/11 h. Temperatur und Luftfeuchte blieben über den Tages- bzw. Nachtgang konstant, um zusätzliche Klimaeffekte in der Kammer auszuschließen. Die PAR-Bestrahlung wurde in 6 Stufen über einen Zeitraum von 3.5 h automatisch hochgeschaltet und erreichte morgens um 10.00 Uhr 100 % Bestrahlungsleistung. Parallel hierzu wurde die UV-Bestrahlung angeschaltet. Ab 16.00 Uhr wurde die Bestrahlung in umgekehrter Reihenfolge zurückgefahren. Abb. 2.6 gibt einen vollständigen Überblick über die Standardklima- und Bestrahlungsbedingungen wieder:

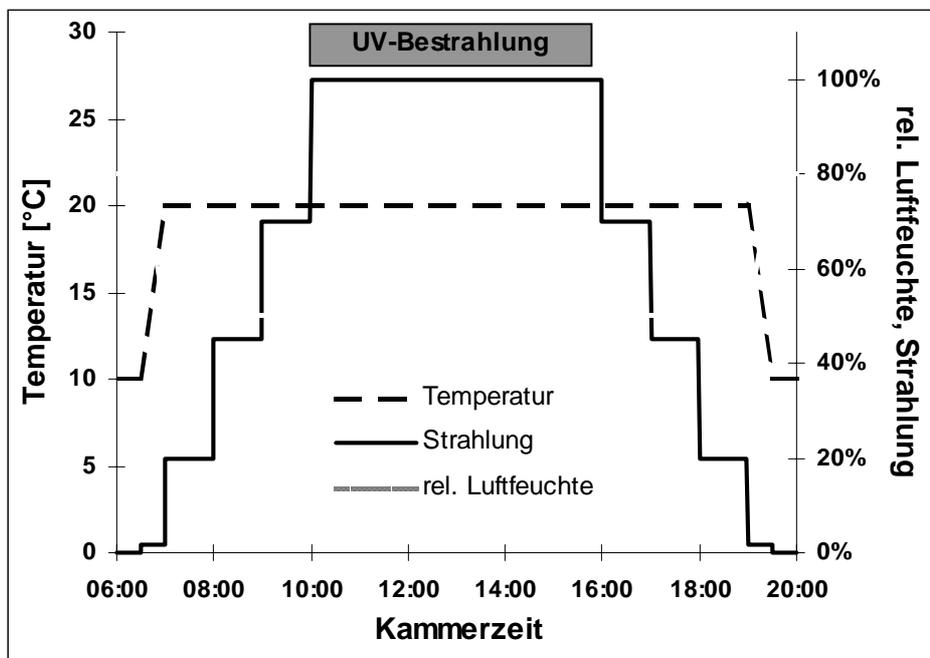


Abb. 2.6: Standard-Tagesgang der Parameter Bestrahlung, Temperatur und Luftfeuchte in der neuen UV-Kammer. Bei einem Tag/Nachtrhythmus von 13/11 h wurde die Bestrahlung ab 6.30 Uhr morgens in den verfügbaren 6 Bestrahlungsstufen bis auf 100 % Bestrahlungsleistung um 10.00 Uhr hochgeschaltet. Die UV-Zusatzbestrahlung wurde mit der PAR-Strahlung gekoppelt, so dass bei Einschalten von 100 % Bestrahlungsleistung automatisch die UV-Bestrahlung zugeschaltet wurde. Nach einer Bestrahlungsdauer von 6 h wurde diese in umgekehrter Stufenfolge in ebenfalls 3.5 h wieder bis auf 0 % Bestrahlung heruntergefahren. Mit dem Tag/Nachtrhythmus wurde das Temperatur- und Luftfeuchteprogramm gekoppelt: die Tagestemperatur betrug 20 +/- 1 °C bei einer Luftfeuchte von 50 %; die Nachttemperatur betrug 10 +/- 1 °C bei einer Luftfeuchte von 80 %. Die Klimawerte orientierten sich an Messungen des Wetteramtes Essen aus dem Monat April. Die angegebenen Uhrzeiten entsprechen nicht den tatsächlichen Tageszeiten, da die Zeitprogrammierung unabhängig einstellbar war.

Die Entwicklung der Klimaprogramme erfolgte durch P. Burchard und R. Schmitz, die Programmierung der Kammer wurde von R. Schmitz durchgeführt.

2.2.1.5 Standard-Bestrahlungsprogramme

Zusammenfassend seien hier nochmals die Bestrahlungs- und Klimabedingungen wiedergegeben, die auf Grundlage oben dargestellter Ergebnisse als Standard-Bestrahlungsprogramme definiert wurden:

1. Weißlicht-Programm (WL)

- Klimaprogramm s. Abb. 2.6
- Keine zusätzliche UV-Bestrahlung
- Filter Röhm Plexiglas 231 (Absorption von UV-Strahlung, s. Tab. 2.2)
- Distanz UV-Bestrahlungsmodul – Kammerboden 50 cm

2. UV+WL-Bestrahlungsprogramm (UV+WL)

- Klimaprogramm s. Abb. 2.6
- mit zusätzlicher UV-Bestrahlung (4 UV-B-Leuchtstoffröhren in alternierender Anordnung)
- Filter URT 100 (Absorption von UV-C-Strahlung, s. Tab. 2.2)
- Distanz UV-Bestrahlungsmodul – Kammerboden 50 cm

2.2.2 UV-Experimente in der UV-Kammer

2.2.2.1 Aussaat

Die Aussaat der Gerstekaryopsen erfolgte jeweils morgens vor Einsetzen der UV-Bestrahlung in der Kammer. Je 20 Karyopsen wurden in einem Topf (7 x 7 x 8 cm) in einem 1:1-Gemisch aus Torf und Einheitserde (Typ „T“) ausgesät. Die Karyopsen wurden in fünf Reihen ausgelegt, um die gegenseitige Beschattung der Einzelpflanzen so gering wie möglich zu halten. Nach dem Auslegen im Topf wurden sie mit dem Erdgemisch übersiebt und gut gewässert. Um eine komplette Keimung zu gewährleisten, wurden die Töpfe mit Glas abgedeckt. Nach

dem Durchbruch der Coleoptile am dritten Tag wurden die Glasplatten abgenommen und die Pflanzen jeden Morgen ausreichend gegossen.

Die Aussaat der Roggenkaryopsen erfolgte in gleicher Weise wie die der Gerstekaryopsen, jedoch wurden die Roggenkaryopsen nicht übersiebt. Der Durchbruch der Coleoptile und die Abnahme der Glasplatte erfolgte am 2. Tag.

2.2.2.2 Bestrahlung und Ernte der Primärblattsegmente

Die Bestrahlung der Pflanzen in der UV-Kammer erfolgte bis zur Ernte in den Töpfen unter den jeweiligen Bestrahlungsprogrammen.

Die Erntezeiten waren je nach Versuchsbedingung unterschiedlich: Für die Fluoreszenz-Messungen erfolgte die Ernte nach bzw. während der 6-stündigen UV-Bestrahlungsphase, für die biochemischen Untersuchungen wurden die Segmente in der Regel vor Einsetzen dieser Bestrahlungsphase geerntet. In der Regel wurden zur Ernte die Töpfe aus der Kammer entnommen und die benötigten Primärblätter außerhalb der Kammer aus den Töpfen geerntet. Für die Fluoreszenz-Messungen während der UV-Bestrahlungsphase wurden jeweils einzelne Pflanzen (Primärblätter) aus den in der Kammer verbleibenden Töpfen entnommen.

Alle Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit Primärblattsegmenten durchgeführt, nicht mit dem Gesamtblatt. Die Länge des Segmentes betrug jeweils 1.5 cm und begann 1 cm unterhalb der Blattspitze. Bei den Roggenversuchen (s. Kap. 2.2.2.5.3) wurden zusätzlich Segmente gleicher Länge verwendet, die 3.5 cm unterhalb der Blattspitze begannen. Unmittelbar nach der Ernte wurde das Frischgewicht der Segmente bestimmt, entweder einzeln oder gemittelt aus dem Gesamtfrischgewicht von je 10 Blattsegmenten. Zusätzlich wurde in einem Experiment die Blattlänge 5, 7 und 10 d alter Gersten-Primärblätter bestimmt. Proben, die nicht zum sofortigen experimentellen Einsatz bestimmt waren, wurden anschließend in fl. N₂ eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Chlorophyllbestimmung der Blattsegmente

Die Extraktion zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes ganzer Blattsegmente erfolgte mittels DMSO (Hiscox & Israelstam 1979). Einzelne Segmente wurden mit 1 ml DMSO, 10 Blattsegmente zusammen mit 5 ml DMSO inkubiert. Die Extraktion wurde über Nacht unter Lichtabschluss bei 60 °C im Thermoblock durchgeführt. Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte photometrisch nach Zentrifugation des auf Raumtemperatur abgekühlten Überstandes bei 663 und 647 nm. Die Berechnung des Chlorophyll-Gehalts erfolgte nach Lichtenthaler (1987) wie folgt:

$$\text{Chl a (mg/Probe)} = ((12,25 * E_{663}) - (2,79 * E_{647})) * \text{Verdünnung}$$

$$\text{Chl b (mg/Probe)} = ((21,5 * E_{647}) - (5,1 * E_{663})) * \text{Verdünnung}$$

2.2.2.4 Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe

2.2.2.4.1 Extraktion der löslichen Phenylpropane aus Gersten-Primärblattsegmenten

Die bei -80 °C gelagerten Primärblattsegmente wurden in flüssigem N₂ homogenisiert und mit 80 %igem Methanol (6 ml/g FG) 3 min lang gemörsert. Bei dem überwiegenden Anteil der Proben wurden 10 bzw. 5 Blattsegmente gemeinsam aufgearbeitet. Ein geringerer Teil der Proben bestand aus Einzelsegmenten, die in Eppendorfgläsern mit entsprechendem Pistill homogenisiert wurden. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein zweites Gefäß überführt. Das Pellet wurde zweimal mit 80 %igem Methanol nachextrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit 80 %igem Methanol auf ein einheitliches Volumen eingestellt. Die Extrakte standen während der gesamten Extraktion auf Eis und wurden in der Regel noch am gleichen Tag mittels HPLC analysiert oder bis zur Analyse am nächsten Tag bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.4.2 Extraktion der löslichen Phenylpropane aus Roggen-Primärblattsegmenten

Die Extraktion der phenolischen Roggeninhaltsstoffe erfolgte an Einzelblattsegmenten mit 40 %igem Methanol. Die Durchführung entsprach der oben beschriebenen Methode.

2.2.2.4.3 HPLC-Analyse

Zur Probenvorbereitung wurde der methanolische Extrakt in der Haereus-Tischzentrifuge bei 13000 rpm = 18000 g fünf Minuten zentrifugiert. Ein Aliquot des klaren Überstandes wurde über den automatischen Probengeber der HPLC-Analyse zugänglich gemacht.

2.2.2.4.3.1 Gerste

Die Chromatographie der Gerstenextrakte erfolgte mit 1% (v:v) ortho-Phosphorsäure in H₂O (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B). Als Säule für die Auftrennung der Inhaltsstoffe wurde eine mit Nucleosil RP-8 befüllte Säule (Länge 125 mm, Durchmesser 4.6 mm, Fa. Bischoff, Leonberg; mittlere Korngröße des Trägermaterials 5 µm, Fa. CS Chromatographie-Service, Langerwehe) verwendet. Der Lösungsmittelfluss betrug 1 ml/min im folgenden Gradientensystem (nach Reuber 1996):

Zeit	Konzentration Acetonitril (v/v)
0 – 18 min	13 % - 25 %
18 – 22 min	25 % - 40 %
22 – 23 min	100 %
23 – 32 min	100 % - 13 %

Die Detektion der Gersten-Flavonoide erfolgte je nach Fragestellung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Für die Quantifizierung des Flavonoidgehalts in den Blattsegmenten der Gerstenmutante und ihrer Muttervarietät während der Blattentwicklung (s. Kap. 3.2 ff) erfolgte die Detektion bei 340 nm. Für die Ermittlung der epidermalen UV-Transmission (s. Kap. 3.3 ff) erfolgte die Detektion bei 313 und 366 nm. Die Identifizierung der Flavone in

den Segmenten erfolgte durch Co-Chromatographie mit authentischen Substanzen aus Gersten-Primärblättern. Die Referenzsubstanzen stammten aus Beständen der Laborsammlung der Arbeitsgruppe von Prof. Weißenböck.

2.2.2.4.3.2 Roggen

Die Auftrennung der Inhaltsstoffe (Flavonoide und HCAs) erfolgte mit der gleichen Säule wie bei den Gerstenextrakten, aber mit einem anderen Laufmittelgemisch. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1ml/min in folgendem Gradientensystem nach Peters (1987):

Laufmittel A	Laufmittel B
H ₂ O, 1%ig an H ₃ PO ₄	H ₂ O, 1%ig an H ₃ PO ₄
MeOH	MeOH
THF	THF
(84 : 6 : 10)	(66 : 16 : 18)

0-15 min	100% - 0% A
15-16 min	0%-100 % A
16-24 min	100 % A

Die Detektion der Flavonoide und HCAs erfolgte bei 313 und 366 nm (s. Kap. 3.3 ff). Auch hier erfolgte die Identifizierung der Substanzen durch Co-Chromatographie mit authentischen Substanzen aus dem Laborbestand.

Für die direkte Vergleichbarkeit der Chromatogramme auf Blattsegmentebene wurden jeweils gleiche Volumina Extrakt erstellt und gleiche Aliquots per HPLC analysiert. Die vom HPLC-System detektierte Absorption wurde in integrierte Flächeneinheiten umgewandelt und als solche ("area") ausgegeben, d.h. die Fläche war der Stoffmenge proportional. Für die Ermittlung der epidermalen UV-Transmission bei Gersten- und Roggenblättern (s. Kap. 3.3 ff) wurde auf eine Umrechnung der ausgewiesenen Flächeneinheiten in molare Konzentrationen pro Blattsegment verzichtet, da die absoluten Mengen der einzelnen Substanzen nicht von vorrangigem Interesse waren. Unsere Fragestellung zielte zunächst im

wesentlichen darauf, relative Änderungen im Gesamtgehalt aller phenylpropanoiden Substanzen wie auch einzelner, besonders herausgehobener Substanzen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern (Alter, Bestrahlung, Gerstevarietät) zu erfassen und diese relativen Änderungen in Beziehung zu setzen zu der damit verbundenen UV-Absorptionskapazität, die sich direkt in den via HPLC ermittelten integrierten Flächeneinheiten ausdrücken.

Auch bei der Bestimmung des Flavonoidgehalts der Gersten-Blattsegmente während der Blattentwicklung wurde auf diese Umrechnung verzichtet (s. Kap. 3.2.2). Um jedoch einen Einblick in die Größenordnung der molaren Konzentration für die besonders wichtigen Substanzen zu vermitteln, gelten hier folgende Umrechnungsfaktoren (bestimmt von Jürgen Krüger, AG Prof. Weißenböck):

Flavonoide	nmol/area	Eichsubstanz
Saponarin	$1,70535 \cdot 10^{-6}$	Saponarin
Lutonarin	$2,07035 \cdot 10^{-6}$	Luteolin

2.2.2.5 Chlorophyll-Fluoreszenz

Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen, da diese Methode dank einer mittlerweile relativ einfachen Handhabung schnellen Einblick in die aktuelle Photosyntheseleistung erlaubt. Die auf ein Blatt einfallende Strahlung, die weder durch die Photosynthese genutzt noch als überschüssige Energie in Form von Wärme wieder abgeben wird, re-emittiert als längerwellige Strahlung und wird als Chlorophyll-Fluoreszenz bezeichnet. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von Fluorometern. Die modulierten Fluorometer (z.B. PAM-Fluorometer = Puls-Amplituden-Modulation) sind in der Lage, eine Trennung von Meßlicht und aktinischem Licht zu erreichen, so dass nur Fluoreszenz-Signale detektiert werden, die vom Meßlicht angeregt wurden. Störungen durch überlagernde Lichtsignale werden so vermieden.

Die Untersuchung der Chlorophyll-Fluoreszenz erlaubt in erster Linie Aussagen über den aktuellen Status des Photosystems II, inwieweit dieses in der Lage ist, die absorbierte Energie zu nützen und inwieweit es durch überschüssige Energie geschädigt wird. Wichtige Parameter zur Beurteilung des PS II-Status sind die Grundfluoreszenz (F_0) und die maximale

Fluoreszenz (F_m). Die Grundfluoreszenz gibt die Fluoreszenzstrahlung wieder, die durch die Anregungsenergie in den Antennensystemen des PS II vor Erreichen der Reaktionszentren verursacht wird. Diese Grundfluoreszenz ist notwendig zur Standardisierung anderer Fluoreszenzparameter. Maximale Fluoreszenz tritt auf, wenn alle Primärakzeptoren (Q_A) in reduziertem Zustand vorliegen und jeder weitere Elektronentransport zum Erliegen kommt. Die Differenz zwischen diesen beiden Fluoreszenz-Zuständen wird als variable Fluoreszenz (F_v) bezeichnet. Das Verhältnis von variabler Fluoreszenz zur maximalen Fluoreszenz (F_v/F_m) wird als Maß für die Effizienz des Photosystems II angesehen, mit der die Anregungsenergie von den Antennenkomplexen zu den offenen Reaktionszentren im PSII geleitet wird.

Die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie einerseits und die Abführung von überschüssiger Lichtenergie in Form von Wärme andererseits führt im Lauf des photosynthetischen Prozesses zu einem Rückgang der Fluoreszenz auf ein steady-state-level (F_t). Dieses Phänomen bezeichnet man als Fluoreszenz-Löschung (quenching) mit der Unterscheidung zwischen der photochemischen und der nicht-photochemischen Löschung. Beide Aspekte können mit Hilfe der Fluoreszenz-Messungen erfasst werden. Die Messung des photochemischen quenching erlaubt Aussagen über das Verhältnis der offenen PS II-Reaktionszentren zur Gesamtzahl der Zentren. Das nicht-photochemische quenching setzt sich aus einer Reihe unterschiedlicher Faktoren zusammen:

- a) der Aufbau des Protonengradienten über die Thylakoidmembran ist direkt proportional zur Fluoreszenz-Löschung und trägt den größten Anteil an der Fluoreszenz-Löschung;
- b) die durch reversible Phosphorylierung gesteuerte Ablösung der LHCII-Komplexe von den PS II-Kernkomplexen und deren Verlagerung von den Grana-Bereichen in die Stroma-Bereiche ermöglicht eine Übernahme der Anregungsenergie aus diesen Zentren durch die PS I-Zentren ("spill over") und damit eine Löschung der Fluoreszenz. Dieses Phänomen spielt nur unter Schwachlichtbedingungen eine größere Rolle;
- c) die unter Starklicht zu beobachtende photoinhibitorische Fluoreszenz-Löschung, deren Zusammenhänge noch nicht geklärt sind.

2.2.2.5.1 Bestimmung von F_v/F_m

Die Bestimmung von F_v/F_m erfolgte im Anschluss an die 6-stündige Bestrahlungsperiode nach einer Dunkeladaptationphase der Blätter von 30 min. Die Messungen erfolgten am apikalen Blattsegment, beginnend 1 cm unterhalb der Blattspitze auf der abaxialen Seite. Der Abstand der Probe zum Lichtleiter betrug 1 mm. Der Durchmesser des Lichtleiters (Bestrahlungsfenster) betrug 1.4 cm.

Die Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte mit einem PAM Fluorometer (Fa. Walz), bestehend aus der Kontrolleinheit 101 und Detektor-Emitter-Einheit 101 mit den Zusatzmodulen PAM 102 und 103. Folgende Standard-Einstellungen (PAM 101) wurden gewählt: gain 4, damp 8, light intensity 8, Frequenz 1.6 kHz. Die Pulslänge des Sättigungspulses betrug 0.8 s bei einer Frequenz von 100 kHz und einer Lichtintensität von $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Schott Kaltlichtlampe KL 1500). Die Bestimmung der Parameter F_o und F_m erfolgte zum Teil durch die Auswertung der entsprechenden Signale über einen angeschlossenen Schreiber, zum Teil direkt über die zugehörige Computer-Software (Fa. Walz).

2.2.2.5.2 Bestimmung der quenching-Faktoren qP und qN

Die Ermittlung der quenching-Faktoren erfolgte mittels der Sättigungspulsmethode (Schreiber et al. 1996). Nach der Ermittlung der Grundfluoreszenz und der maximalen Fluoreszenz dunkeladaptierter Blätter wird aktinisches Licht zugeschaltet. Sättigende Lichtpulse führen zu einem transienten Ausschalten des photochemischen quenchings, da alle Reaktionszentren des PS II geschlossen werden. Die zu diesem Zeitpunkt detektierte Fluoreszenz (F_m') unterscheidet sich von der maximalen Fluoreszenz um den Betrag, der durch den nicht-photochemischen Prozeß gelöscht wird.

Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Mini-PAM Fluorometers (Fa. Walz) detektiert (Gerätesettings nach Standard-Voreinstellung, Ausnahme ML (measuring light) = 10). Eine Schott Kaltlichtlampe KL 1500 diente extern als Lichtquelle für das aktinische Licht. Die Lichtintensität betrug ca. $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Sättigungspulse hatten eine Länge von 1 s bei einer Lichtintensität von $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Pulse erfolgten in einem Abstand von 10 s bei einer Gesamtmesszeit von 5 min. Vor der Messung erfolgte die Bestimmung von F_o und

F_m nach einer 15-minütigen Dunkeladaption, welche sich nach vergleichenden Untersuchungen als ausreichend erwiesen hatte. Auf der Grundlage der so bestimmten Fluoreszenzgrößen F_o und F_m wurden die quenching-Berechnungen und die Berechnung des Parameters Yield ($=\Delta F/F_m'$) automatisch vom Gerät durchgeführt. Der Parameter Yield stellt ein Maß für die effektive Quantenausbeute dar (Genty et al. 1989). Laut Herstellerangaben erfolgten die Berechnungen der Quench-Parameter nach folgenden Gleichungen:

$$qP = F_m' - F_t / F_m' - F_o \quad qN = F_m - F_m' / F_m - F_o$$

Die Messungen erfolgten während der Bestrahlungsphase zwischen 10 und 16 Uhr. Die Pflanzen wurden in der UV-Kammer geerntet und bis zur Messung in einer lichtdichten Box aufbewahrt. Die Bestimmung erfolgte am apikalen Blattsegment, 1 cm unterhalb der Blattspitze beginnend.

2.2.2.5.3 Untersuchungen zur epidermalen Transmission durch Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen

Im folgenden soll eine Methode vorgestellt werden, die am Botanischen Institut der Universität Würzburg entwickelt wurde (Bilger et al. 1997). Grundlage dieser Methode ist die Tatsache, dass die Chlorophyll-Fluoreszenz auch durch UV-Strahlung angeregt wird. Somit ist es möglich, Strahlung unterschiedlicher spektraler Qualität auf ein Blatt einzustrahlen und die Signale mit einem Fluorometer zu detektieren. Sichtbares Licht passiert die Epidermis ungehindert und liefert ein Fluoreszenz-Signal. Strahlung im UV-Bereich wird jedoch durch UV-Schutzpigmente absorbiert, die in der Epidermis lokalisiert sind und erreicht kaum noch das Mesophyll, so dass das detektierbare Signal deutlich abgeschwächt wird. Aus dem Verhältnis der beiden Signalstärken zueinander erhält man ein relatives Maß für die Transmission der Strahlung durch die Epidermis. Ein erheblicher Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden zur Messung der epidermalen Transmission (z.B. die Messung der Transmission mittels einer Mikrofiber, s. Reuber 1996) liegt in der Tatsache, dass nicht-invasiv gearbeitet wird.

Die Anregung und Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte mit einem Xenon-PAM-Fluorometer der Fa. Walz (Effeltrich, Deutschland). Abb. 2.7 gibt den Aufbau der Messanlage

wieder. Das jeweilige Blattsegment wurde auf einen geschwärzten Messingblock mit Hilfe doppelseitigen Klebebandes befestigt und in einem Winkel von 45° zur Anregungs- wie zur Emissionsstrahlung positioniert. Durch Verwendung verschiedener Filterkombinationen wurde die Anregungsenergie in drei distinkt getrennte Anregungsbereiche unterteilt: UV-B-, UV-A- und Blau-Grün-Anregung (Abb. 2.8). Der UV-B-Bereich zeigte ein Maximum bei 314 nm mit einer Halbbandbreite von 18 nm. Der UV-A-Bereich besaß sein Maximum bei 366 nm und eine Halbbandbreite von 32 nm. Das Maximum der Blau-Grün-Anregung lag bei 475 nm mit einer Halbbandbreite von 140 nm.

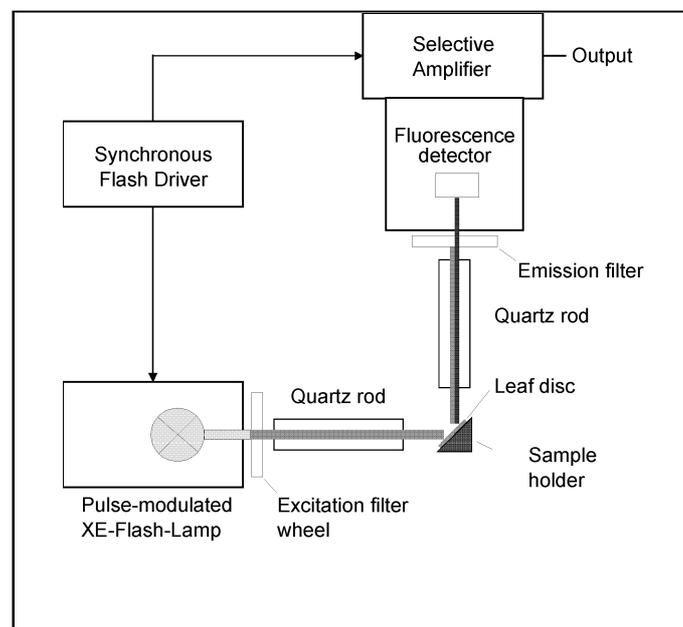


Abb. 2.7: Schematische Wiedergabe des Aufbaus des Messapparatur. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer Xenon-Lampe. Das Anregungslicht wurde durch verschiedene Filter, die in einem beweglichen Rad vor der Lichtquelle installiert waren, in drei spektrale Bereiche (UV-B, UV-A und Blau-Grün) getrennt und auf die Probe geleitet. Diese lag in einem Winkel von 45° zur Anregungs- und Emissionsstrahlung auf einem Probenhalter. Die Fluoreszenzemission wurde über einen Emissionsfilter in den Detektor geleitet und amplifiziert. Die Ausgabe erfolgte über einen Schreiber. (Abb. von Markus Veit, Universität Würzburg, mit freundlicher Erlaubnis).

Folgende Filterkombinationen fanden hierbei Verwendung:

- UV-B: 2 DUG 11 (Fa. Schott, Mainz), 2 mm; UG 11 (Fa. Schott), 1 mm; GG 19 (Fa. Schott), 2 mm
- UV-A: DUG 11 (Fa. Schott), 2 mm; BG 39 (Fa. Schott), 4 mm

-Blau-Grün: BG 39 (Fa. Schott), 4 mm; UV-blocking filter (Fa. Balzers, Liechtenstein); NG 3 (Fa. Schott), 1 mm; NG 5 (Fa. Schott), 2 mm.

Die Filter wurden direkt vor der Anregungsquelle (Xenon flash lamp, EG&G, Typ FX-134) positioniert. Die Anregungsintensitäten wurden mit Hilfe von Aluminium-Lochblenden, integriert in die Filtereinrichtung, so justiert, dass ein epidermisfreies Spinatblatt bei Anregung durch die drei unterschiedlichen Spektralbereiche ein annähernd gleich großes Fluoreszenz-Signal lieferte.

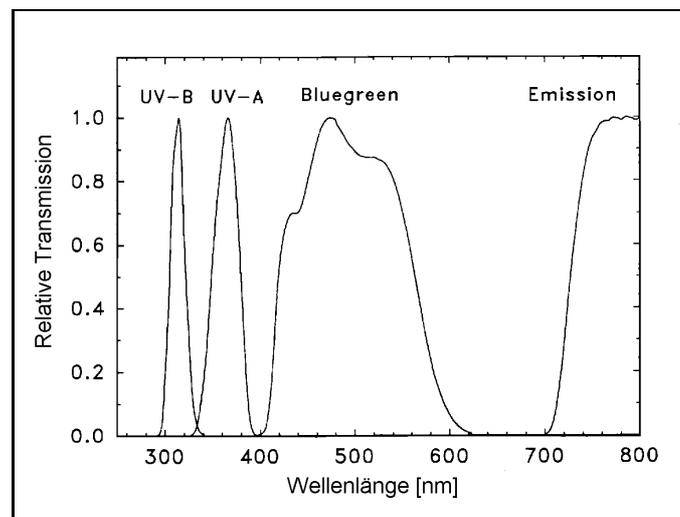


Abb. 2.8: Durch Einsatz verschiedener Filter wurde die Anregungsstrahlung einer Xenonlampe in drei verschiedene Anregungsbereiche unterteilt: UV-B mit einem Maximum bei 314 nm, UV-A mit einem Maximum bei 366 nm und ein Blau-Grün-Bereich mit einem Maximum 475 nm. Die Anregungsintensitäten waren so justiert, dass jeder Spektralbereich ein annähernd gleich starkes Fluoreszenz-Signal lieferte. (Abb. aus Bilger et al. 1997).

Die Emission wurde durch folgende Filterkombination gemessen:

UV-blocking filter (Fa. Balzers), DT-red (Fa. Balzers), RG 9 (Fa. Schott), 2 mm, RG 695 (Fa. Schott), 2 mm. Die Messpuls-Frequenz lag bei 4 Hz.

Die Untersuchungen sollten Aufschluss geben über die epidermale Transmission von UV-Strahlung in den Primärblättern der beiden Gerstenvarietäten, insbesondere die der flavonoidarmen Gerstenmutante. Es sollten Primärblattsegmente unterschiedlicher Altersstufen mit unterschiedlichem Flavonoidgehalt untersucht werden im Hinblick auf die Frage, ob man eine Korrelation zwischen dem Gehalt an löslichen Inhaltsstoffen und der Absorption von UV-Strahlung in der Epidermis feststellen kann. Wenn epidermale Flavonoide tatsächlich UV-

Schutzstoffe sind, müssen sie nicht nur eine UV-induzierte zunehmende Akkumulation zeigen, sondern diese Akkumulation sollte sich auch in einer stärkeren Absorption von UV-Strahlung niederschlagen.

Die Frage der Lokalisation der flavonoiden Substanzen im Gewebe ist hierbei von besonderer Bedeutung. Gramineenblätter zeichnen sich im Gegensatz zu vielen Dicotylen durch die Anwesenheit von Flavonoiden auch im Mesophyll aus. Die Zuordnung einzelner Substanzen zu den beiden Geweben Epidermis und Mesophyll ist aus methodischen Gründen schwierig und konnte für Gerste bislang nicht eindeutig geklärt werden. Demgegenüber ist eine solche eindeutige Zuordnung der Inhaltsstoffe in Roggen-Primärblättern möglich. Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um im Vorfeld der Gerste-Untersuchungen die Fluoreszenz-Methode am Roggen-Primärblatt zu testen.

Im Roggen-Primärblatt findet man im wesentlichen vier lösliche Haupt-Flavone, von denen zwei (R3 = Isovitexin-2"-O-Arabinosid, R4 = Isovitexin-2"-O-Galactosid) ausschließlich epidermal und die anderen beiden (R1 = Luteolin-4'-Glucuronyl-7-O-Diglucuronid, R2 = Luteolin-7-O-Diglucuronid) ausschließlich im Mesophyll lokalisiert sind (Dellamonica et al. 1983, Schulz et al. 1985). Im Mesophyll findet man darüber hinaus noch zwei Anthocyane (RI = Cyanidin-3-O-Glucosid, RII = Cyanidin-3-O-Gentiobiosid), die für die Fragestellung nicht weiter bedeutsam sind (Strack et al. 1982). Für die UV-Absorption von Bedeutung sind jedoch die ebenfalls ausschließlich epidermal lokalisierten Hydroxyzimtsäure-Ester, die sich hauptsächlich aus p-Cumar- und Ferulasäure-Derivaten zusammensetzen (Strack et al. 1987). Die Strukturformeln der Verbindungen sind in Abb. 2.9 dargestellt.

Die Akkumulation der Substanzen erfolgt entwicklungsabhängig, wird aber auch durch äußere Faktoren induziert. Insbesondere die epidermalen Flavonoide zeichnen sich durch eine erhöhte Akkumulation unter dem Einfluß von UV-Strahlung aus, während die Mesophyll-Flavonoide mäßig oder kaum reagieren (Reuber et al. 1996). Die strikte Gewebelokalisation ermöglicht eine schnelle und einfache Zuordnung der Substanzen zu den beiden Gewebetypen bei der HPLC-Analyse von methanolischen Gesamtblattextrakten. Aus diesem Grund bot sich das Roggen-Primärblatt an, um die Korrelation von epidermalen UV-Schutzsubstanzen und der epidermalen UV-Absorption mit Hilfe der Fluoreszenz-Messungen zu untersuchen. Nach erfolgreicher Anwendung beim Roggen sollte bei der Gerste überprüft werden, ob eine solche

Korrelation hier auch nachweisbar ist und diese Ergebnisse zur Beurteilung der UV-Strahlungsabsorption in den beiden Gerstenvarietäten herangezogen werden.

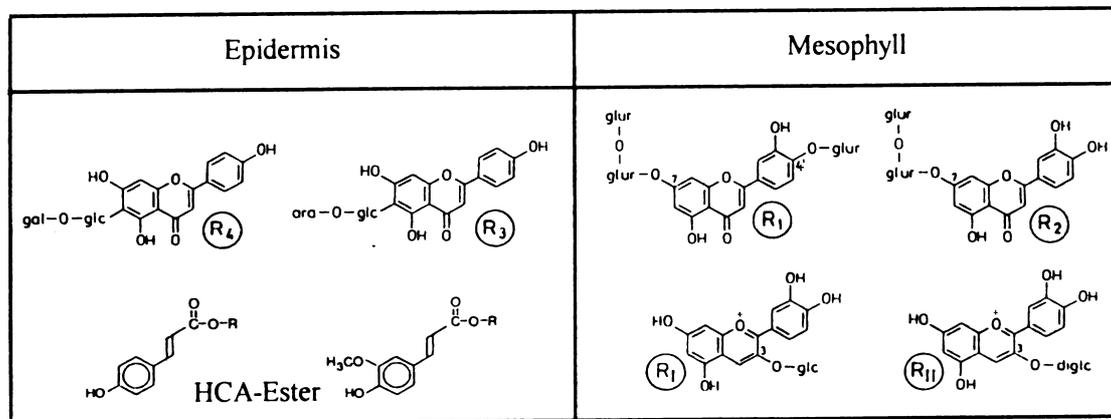


Abb. 2.9: Lösliche Flavonoide und Phenylpropane im Primärblatt von Roggen. Die einzelnen Substanzen sind strikt gewebespezifisch lokalisiert. Epidermis: R3 = Isovitexin-2''-O-Arabinosid, R4 = Isovitexin-2''-O-Galactosid, HCA-Ester (p-Cumar- und Ferulasäure-Derivate). Mesophyll: R1 = Luteolin-4'-Glucuronyl-7-O-Diglucuronid, R2 = Luteolin-7-O-Diglucuronid, R1 = Cyanidin-3-O-Glucosid, R11 = Cyanidin-3-O-Gentiobiosid.

Die Untersuchungen wurden an 4 bis 10 Tage alten Roggen-Primärblattsegmenten durchgeführt. Die Pflanzen wurden unter dem UV+WL-Bestrahlungsprogramm angezogen. Jeweils 10 Blattsegmente wurden pro Altersstadium vermessen. Zusätzlich zu dem apikalen Blattsegment wurde – sofern möglich - ein zweites Segment vermessen, welches jeweils 3.5 cm unterhalb der Blattspitze begann. Da die Flavonoidakkumulation im Roggen-Primärblatt einem Gradienten folgt, der von basal nach apikal zunimmt, konnte so die Probenanzahl deutlich erhöht und damit auf eine zuverlässige statistische Größe angehoben werden. Von jedem Blattsegment wurden Frischgewicht und Blattfläche bestimmt. Nach den Fluoreszenz-Messungen wurden die Segmente einzeln in fl. N₂ eingefroren und bis zur Aufarbeitung der Inhaltsstoffe bei –80 °C gelagert. Die Extraktion und Quantifizierung der Inhaltsstoffe über HPLC erfolgte für jedes Segment einzeln.

Die Gersten-Primärblätter (*Hege* und *ant*) wurden ebenfalls unter UV+WL-Bedingungen angezogen. Die Messungen erfolgten an 6, 9 und 11 d alten Gersten-Primärblattsegmenten. Pro Altersstadium wurden sechs Segmente untersucht.

Von jedem Segment wurden die Fluoreszenzdaten nach Anregung durch UV-B, UV-A und blau-grüner Strahlung ermittelt. In der Mehrzahl der Fälle wurde die Fluoreszenz sowohl auf

adaxialer wie auch auf abaxialer Seite gemessen, in den anderen Fällen nur adaxial. Als Maß für die epidermale Transmission wurde das Verhältnis der Fluoreszenzsignale von UV-B zu Blau-grün bzw. UV-A zu Blau-Grün berechnet. Daneben wurde die Fluoreszenz an epidermis-freien 7 d Roggensegmenten ermittelt, um den Wert für 100 % Transmission zu erhalten. Der Mittelwert (Referenzwert) wurde mit Hilfe einer blauen Plastikfolie (Fa. Walz) normiert und die Daten für die epidermale Transmission anhand des Referenzwertes relativiert. Die Transmissionswerte wurden über die Gleichung $A = -\log T$ in Absorptionswerte umgewandelt.

Aus den Absorptionswerten der adaxialen und abaxialen Messungen wurde der Mittelwert gebildet und gegen den Gehalt an epidermalen oder Mesophyll-Phenylpropanen bei Roggen bzw. gegen den Gesamtgehalt der phenylpropanoiden Substanzen bei Gerste aufgetragen. Fehlende abaxiale Werte wurden durch Regression ermittelt, in dem die vorhandenen abaxialen Werte gegen die korrespondierenden Fluorenzwerte aufgetragen ("geplottet") und fehlende Werte mittels der Regressionsgleichung berechnet wurden.

2.2.2.6 Bestimmungen zum Gehalt, Turnover und zur Synthese des D1-Proteins

2.2.2.6.1 Aufarbeitung der Blattsegmente

Die Aufarbeitung der Blattsegmente erfolgte nach einer abgewandelten Prozedur von Hertwig et al. (1992). Die Auswahl dieser Methode bot sich an, weil sie mit einem einfach handhabbaren Protokoll bereits erfolgreich an Roggen-Primärblättern etabliert worden war. Pro Probe wurden je 10 Segmente unter Zugabe von Extraktionspuffer gemörsert. Der Extrakt wurde gefiltert (Papier-Rundfilter 615, Macherey, Nagel & Co., Düren), um alle groben Pflanzenreste (Zellwand etc.) zu entfernen. Es folgte eine Zentrifugation bei 9000 g, um ein Rohmembranpellet zu erhalten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Lysepuffer versetzt und geschüttelt (Vortex). Nach Zentrifugation bei 9000 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 2M NaCl versetzt und zentrifugiert (dies dient der Entfernung membran-assoziiertes Proteine, so dass nur noch überwiegend membranintegrierte Proteine vorhanden sind). Es wurde nochmals mit Lysepuffer gewaschen und das verbleibende Pellet mit dem Resuspensionspuffer versetzt und bei -20° gelagert.

Extraktionspuffer:	10mM Tricine/NaOH 0.4 M Sorbitol 10 mM MgCl ₂
Lysepuffer:	10mM Tricine/KOH pH 7.6 2 mM Na-EDTA
Resuspensionspuffer:	6.2 mM Tris/HCl pH 8.3 48 mM Glycin 10 % Glycerin

2.2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode erlaubt die Auftrennung von Proteingemischen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Die Auftrennung erfolgte auf Mini-Gelen in einer Mini-Protean II Elektrophoresezelle (Fa. Biorad) nach dem System von Laemmli (1970). Die Geldicke betrug 0.75 mm mit einer konstanten Acrylamidkonzentration von 12 % im Trenngel. Die Konzentration des Acrylamids im Sammelgel betrug 5 %.

Als Proteingrößenstandard wurde ein Gemisch aus Rinderserum Albumin (66 kDa), Hühnerei-Albumin (45 kDa), Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase (36 kDa), Carbon Anhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Trypsin Inhibitor (20 kDa) und α -Lactalbumin (14.2 kDa) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurde der Chlorophyllgehalt der Proben bestimmt und auf 1 μ g Chlorophyll eingestellt. Dann wurden die Proben entweder 1-2 h bei 30 °C vor dem Probenauftrag (bei der Einzelsegment-Aufarbeitung) oder über Nacht bei 4° C (bei allen Aufarbeitungen von 10 Blattsegmenten pro Probe) in 1x Laemmli-Probenpuffer (4 ml H₂O, 1 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.8 ml Glycerin, 1.6 ml 10 % SDS, 5 % β -Mercaptoethanol) solubilisiert. Die Anwendung anderer Detergenzien zur Solubilisierung der Membranproteine hatte sich in Vorversuchen als nicht notwendig erwiesen. Die Probe wurde ohne vorhergehendes Erhitzen in 20 μ l Probenpuffer auf das Gel aufgebracht. Die Elektrophorese

wurde bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke von 15 mA pro Mini-Gel durchgeführt.

2.2.2.6.3 Chlorophyll-Bestimmung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach Porra et al. (1989) in 100 % Methanol durch Messung von drei Parallelproben.

2.2.2.6.4 Proteintransfer

Im Anschluß an die Proteintrennung im Gel wurden die Proteine nach der "semi-dry"-Methode auf eine PVDF-Membran (Fa. Roth) transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotapparatur der Fa. LTF Labortechnik (Wasserburg) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von drei Transferpuffern. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA über 90 min. Die Vollständigkeit des Protein-Transfers wurde durch anschließende Färbung des Gels überprüft.

Transferpuffer:

Anode 1:	300 mM Tris/HCl, pH 10.4
Anode 2:	25 mM Tris/HCl, pH 10.4
Kathode:	40 mM Norleucin, 25 mM Tris/HCl, pH 9.4

Je nach Fragestellung wurden die Blots einer Immunodetektion unterworfen oder nach Coomassie-Färbung getrocknet und anschließend autoradiographiert.

2.2.2.6.5 Densitometrie

Alle Blots, Gele und Autoradiogramme wurden mit einem Scanner (Agfa Arcus II, Fa. Agfa, Morsel, Belgien) digitalisiert (Graustufenscan 1:1, Auflösung 300 dpi, tif-Format). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit einem darauf spezialisierten Computerprogramm (Scion Image, Release Beta 2, Fa. Scion Corporation, Maryland, USA). Die mit dem Programm möglichen verschiedenen Auswertungsmöglichkeiten wurden an mehreren

Beispielen (Immuno-Blots und Autoradiogramme) getestet und verglichen. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Auswertungen erfolgten ohne weitere digitale Bildbearbeitung an den Originalscans mit Hilfe des integrierten Densitometrie-Makros (gelplot2.txt). Bei der Auswertung der Daten wurde Wert darauf gelegt, dass nur Signale miteinander verglichen wurden, die auf dem gleichen Blot, Gel oder Autoradiogramm aufgetragen waren und somit vergleichbarer methodischer Behandlung ausgesetzt waren (z. B. identischer Proteintransfer, dieselben Färbungsbedingungen, Autoradiographiebedingungen etc.). Damit konnten jedoch nicht alle methodischen Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Die densitometrische Auswertung eines Immunoblots mit nebeneinander aufgetragenen identischen Proben wies Signalunterschiede von bis zu 40 % aus (Abb. 2.10):

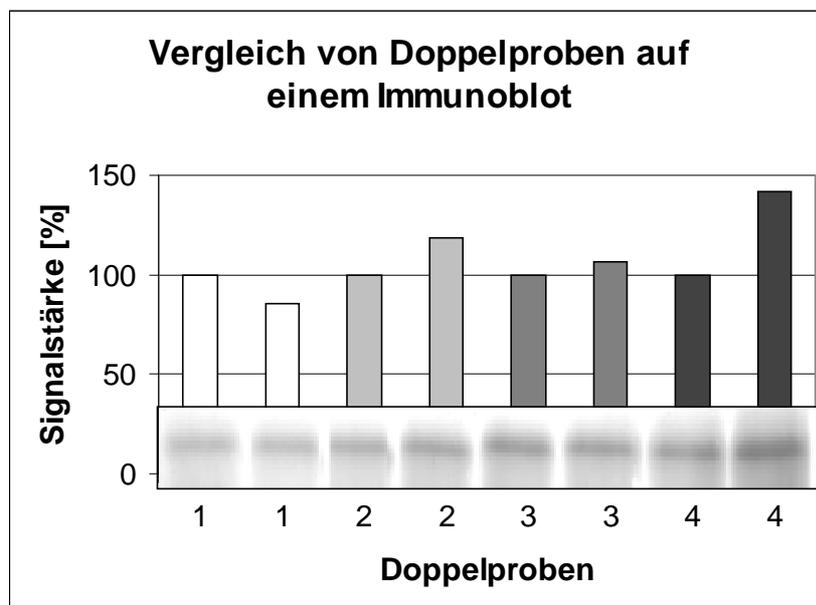


Abb. 2.10: Exemplarischer Immunoblot (D1-Protein) von 10 d alten ant-Proben (1 - ant UV+WL, $t = 0$ h; 2 - ant UV+WL, $t = 5.5$ h; 3 - ant WL, $t = 0$ h; 4 - ant WL, $t = 5.5$ h) mit nebeneinander aufgetragenen identischen Doppelproben. Nach densitometrischer Auswertung wiesen die identischen Proben Signalunterschiede zwischen 6 und 40 % auf.

Die Auftragung von Doppelproben war dann nicht möglich, wenn die Probenanzahl der Einzelproben, die direkt miteinander verglichen werden sollten, die Anzahl der verfügbaren Spuren im Gel überschritt. Dies war insbesondere bei den Versuchen zur D1-Synthese und zum D1-Turnover der Fall. Hier wurde eine gewisse Überprüfung der Signale dadurch gewährleistet, dass verbleibende nicht genutzte Spuren mit anderen Vergleichsproben bestückt wurden. Bei einem Gel mit beispielsweise ant WL-Proben wurden die restlichen

freien Spuren mit vergleichbaren Hege WL-Proben beladen und umgekehrt. Auf diese Weise konnten relative Signalstärken zueinander auf verschiedenen Autoradiogrammen verglichen und in die Beurteilung der densitometrischen Auswertung einbezogen werden. Ein direkter Vergleich der absoluten Signalstärken war in solchen Fällen nicht möglich.

2.2.2.6.6 Bestimmung des D1-Gehaltes

Die Bestimmung des D1-Gehaltes erfolgte durch immunologische Detektion der D1-Bande mit einem spezifischen D1-Antikörper. Es handelte sich hierbei um einen Antikörper gegen ein Fusionsprotein bestehend aus einem Teil des D1-Proteins (AS 167-353) und β -Galactosidase (Johannigmeyer 1987), der uns freundlicherweise von Frau Dr. Doris Godde, Universität Bochum, zur Verfügung gestellt wurde.

2.2.2.6.7 Immunodetektion (verändert nach Johnson et al. 1984)

Die an den Außenseiten der Membran gelegene Spur mit Proteinmarkern wurde von der Membran entfernt und mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die restliche Membran wurde zur Vorbereitung der Immunodetektion des D1-Proteins für 1 h in Blocking-Puffer (1.2 g Magermilchpulver in 15 ml PBT pro Membran) gelegt, um alle unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen.

Die Inkubation der Membranen mit dem D1-Antikörper erfolgte über Nacht bei 30 °C. Die Verdünnung betrug 1:4000 in Na-PBS / 1 % BSA. Nach Entfernen des Antikörpers und zweimaligem Waschen wurde der Sekundär-Antikörper, ein anti-Kaninchen-IgG Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Verdünnung 1:10000, Fa. Sigma), zugegeben. Die Inkubation dauerte 1 h. Die Färbung der markierten Proteine erfolgte über eine durch die alkalische Phosphatase gekoppelte Farbreaktion mit NBT (Nitro-Tetrazoliumblau) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat). Die Membran wurde nach mehrmaligem Waschen vor Zugabe der Farbregenzien 15 min in dem alkalischen Farbreaktionspuffer (AP-Puffer) äquilibriert und danach die Färbung durchgeführt (Endkonzentration NBT 0.02 % bzw. BCIP 0.005% in AP-Puffer). Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

Na-PBS:	8.0 g NaCl; 0.2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O; 0.2 g KH ₂ PO ₄ ; Aqua bidest ad 1000 ml
PBT:	Na-PBS; 0.025 % Tween 20; 1 % BSA
Waschlösung:	Na-PBS; 0,1 % Triton 100
AP-Puffer:	100 mM Tris, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂

2.2.2.6.8 Identifizierung der D1-Proteinbande durch den spezifischen Antikörper

Die Identifizierung der D1-Proteinbande erfolgte durch Größenvergleich mit Molekulargewichts-Standards. Das D1-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 32 kDa. Auf dem abgebildeten Immunoblot (Abb. 2.11) wird die Spezifität des Antikörpers deutlich, der keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aufwies. Die Identifizierung wurde durch Frau Dr. Godde persönlich bestätigt (Godde and Dannehl, 1994; Dannehl et al. 1996; Kilb et al. 1996).

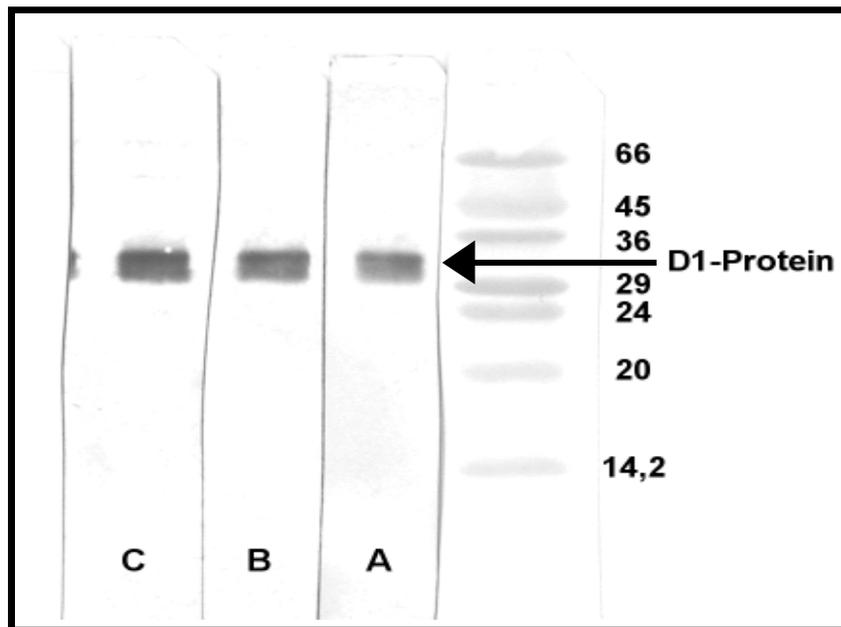


Abb. 2.11: Identifizierung der D1-Proteinbande durch den spez. Antikörper und durch Vergleich des Molekulargewichts. Die Proben auf dem Gel unterschieden sich durch die Verdünnung des spezifischen Antikörpers. In diesem Test wurde die geeignete Antikörper-Verdünnung untersucht: A: 1:4000, B: 1:3000 und C: 1:2000. In den Versuchen wurde eine Verdünnung von 1:4000 eingesetzt. Das D1-Protein zeichnet sich durch seine spezifische diffuse Auftrennung im elektrophoretischen Verfahren aus (D für "diffuse"), die keine scharfe Einzelbande wie z.B. bei der Markerproteinen erkennen lässt.

2.2.2.6.9 D1-Turnover

Die Pflanzenanzucht erfolgte in der UV-Kammer unter Bestrahlungsprogramm WL bzw. UV+WL. Im Alter von 5, 7 und 10 d wurden die Primärblattsegmente um 8 h morgens geerntet, d.h. zwei Stunden vor Beginn der maximalen Bestrahlungsintensität und dem Einsetzen der UV-Zusatzbestrahlung in der UV-Kammer. Nach Bestimmung des Frischgewichtes wurden jeweils 10 Segmente in ein Eppendorfgefäß (1.5 ml) überführt und mit 0.6 ml radioaktivem Inkubationspuffer (s.u.) versetzt. Diese Menge reichte aus, um die Segmente vollständig in die Lösung einzutauchen. Die Eppendorfgefäße wurden in einen Vakuumexsikkator eingebracht und die Segmente 2 min vakuuminfiltriert. Danach wurden die Segmente je eines Eppendorfgefäßes samt Inkubationslösung in Kristallisationsschalen (Durchmesser 4 cm) überführt und nebeneinander angeordnet, um eine gegenseitige Beschattung auszuschließen bzw. auf ein Minimum zu reduzieren. In diesen Schalen wurden die Segmente unter leichtem Schütteln 90 min bei $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt ("pulse"-Phase).

Die auftretende Wärme wurde mit Hilfe eines Ventilators abgeführt. Als Verdunstungsschutz diente eine aufgelegte Glasplatte.

Nach 90 min Inkubation wurde die Lösung entnommen und die Segmente zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Der dritte Waschschrift wurde im nicht-radioaktiven Inkubationspuffer (s.u.) vorgenommen. Die Segmente wurden mit Apura (Labor-Papiertüchern) getrocknet und in neue Kristallisationsschalen mit 2 ml nicht-radioaktivem Inkubationspuffer überführt. Eine Probe wurde nach dem Abtrocknen sofort in fl. N₂ eingefroren (t₀ = 100 % radioaktiv markiertes D1-Protein). Die anderen Proben wurden danach den Bestrahlungsprogrammen WL bzw. UV+WL in der UV-Kammer unterworfen ("chase"-Phase). Die Proben wurden nach 1, 2, 4 und 5.5 h entnommen, gewaschen, getrocknet und sofort in fl. N₂ eingefroren. Während der Bestrahlungsphase wurde der nicht-radioaktive Inkubationspuffer halbstündig gewechselt.

Nach der Probenaufarbeitung, elektrophoretischer Trennung der Proteine und dem Transfer auf PVDF-Membran wurden die Blots kurz mit Coomassie gefärbt und getrocknet. Dann wurden sie für 72 h auf einen Film (Hyperfilm - β-max, Fa. Amersham, Freiburg) aufgelegt. Die Identifikation der D1-Bande auf dem Autoradiogramm erfolgte durch den direkten Vergleich mit Immuno-Blots. Die Coomassie-Färbung diente in erster Linie zur Abschätzung der Frage, ob Unregelmäßigkeiten im Probenauftrag auf das Gel zu erkennen waren, die möglicherweise Unstimmigkeiten bei der Bewertung der Autoradiogramm-Signale erklären könnten. Da die D1-Bande auf einem Coomassie-gefärbten Blot von dem 33 kDa-Protein des wasserspaltenden Komplexes überlagert wird (pers. Mitteilung von Frau Dr. Godde), diente diese Bande nicht direkt als Nachweis für die D1-Bande, gestattete aber eine relative Zuordnung auf den Autoradiogrammen, die eine fortgesetzte Identifikation via Immuno-Blots überflüssig machte.

Inkubationspuffer (radioaktiv):	5 mM Na-Phosphat, pH 7.4
	0.01 % (v/v) Tween 20
	1 mM Methionin
	0.1 μCi ³⁵ S-Methionin

Inkubationspuffer (nicht-radioaktiv): 5 mM Na-Phosphat, pH 7.4
0.01 % (v/v) Tween 20
1 mM Methionin

Abb. 2.12 gibt ein typisches Autoradiogramm wieder:

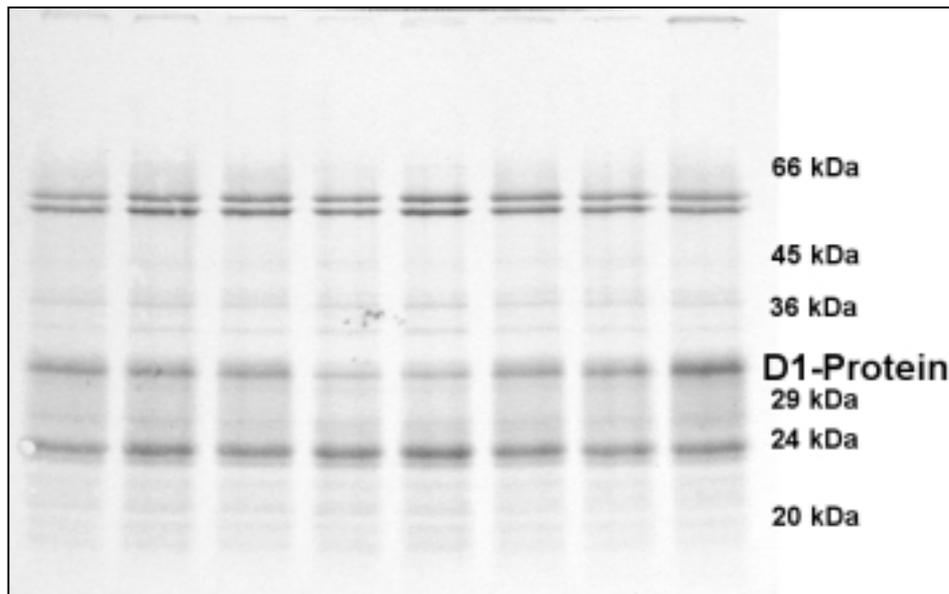


Abb. 2.12: Exemplarisches Autoradiogramm der nach radioaktiver Markierung mit ^{35}S -Met elektrophoretisch aufgetrennten Proteine: Vier Banden waren deutlich auf jedem Autoradiogramm herausgehoben. Nach Vergleich mit den entsprechenden Immunoblots konnte die markierte Bande als D1-Bande identifiziert werden. Die Molekulargewichtsangaben stammen von dem zu diesem Autoradiogramm entsprechenden Coomassie-Blot. Dargestellt sind die Proben *Hege* 7 d WL (Spur 1 bis 4 von $t = 0$ h, 1 h, 2 h, 5.5 h chase-Phase; von links außen beginnend) und *ant* 7 d WL (Spur 1 bis 4 von $t = 0$ h, 1 h, 2 h, 5.5 h chase-Phase; von rechts außen beginnend).

2.2.2.6.9.1 Linearität der radioaktiven Signale im Autoradiogramm

Eine Überprüfung der Linearität der radioaktiven Signale auf dem Film erfolgte durch den Auftrag einer identischen Probe mit steigendem Chlorophyllgehalt. Abb. 2.13 weist die Linearität des Signals bis zu einer Chlorophyllmenge von $3 \mu\text{g}$ nach:

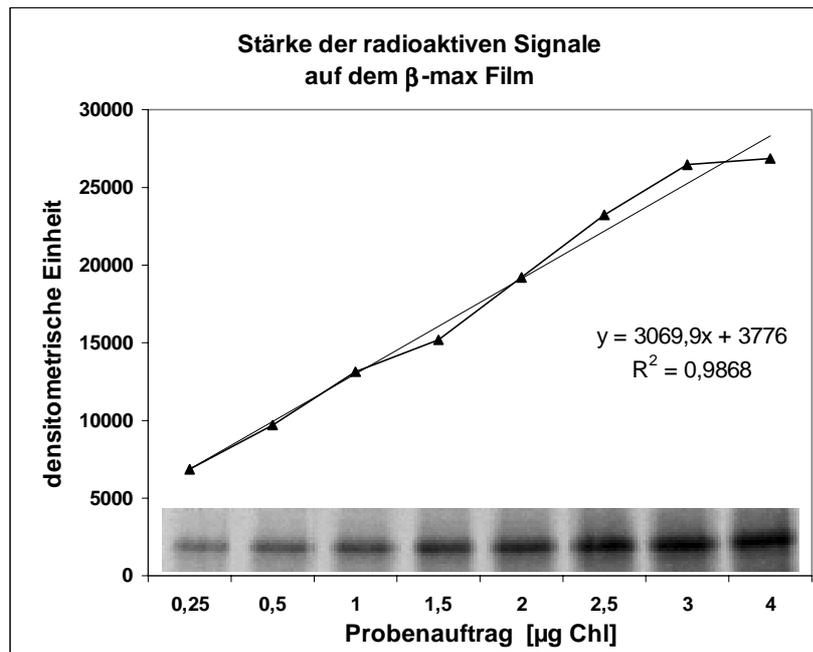


Abb. 2.13: Linearität des radioaktiven Signals auf dem Hyperfilm β -max (Fa. Amersham). Es wurden unterschiedliche Mengen derselben Probe (^{35}S -markiertes D1-Protein) auf ein Gel aufgetragen, auf PVDF-Membran geblottet und anschließend autoradiographiert. Nach densitometrischer Auswertung mit dem Programm Scion Image ergab sich eine Linearität des radioaktiven Signals auf dem Film bis zu einer Chlorophyllmenge von 3 μg pro Probe.

Damit lag die standardmäßig aufgetragene Menge von 1 μg pro Probe innerhalb der Linearität des Films.

2.2.2.6.10 D1-Synthese

Die Untersuchung der Synthese des D1-Proteins unter UV+WL-Bedingungen war aufgrund der Sicherheitsbestimmungen zum Umgang mit radioaktivem Material in der UV-Kammer ausgeschlossen. Somit war es nicht möglich, eine Aussage zum unmittelbaren Einfluss der UV-Strahlung auf die D1-Synthese zu gewinnen. Allerdings konnte die Frage, ob eine längerfristige UV-Einwirkung negativen Einfluß auf die Synthese des D1-Proteins nimmt, konnte allerdings (im Rahmen der Sicherheitsbestimmungen) methodisch verfolgt werden: Ein solcher Einfluß sollte sich in einer unterschiedlichen Syntheseleistung zwischen den WL-bestrahlten und den UV+WL-bestrahlten Blattsegmenten zeigen.

Die Versuchsdurchführung entsprach der Durchführung zum D1-Turnover bis zum Überführen der Blattsegmente in die Kristallisationsschalen. Die Segmente wurden nach

Bestimmung des Frischgewichts mit dem radioaktiven Inkubationspuffer (s. Kap. 2.2.2.6.9) versetzt und die Vakuuminfiltration durchgeführt. Danach wurden die Segmente mit dem Inkubationspuffer in die Kristallisationsschalen überführt und einer Bestrahlung bei $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR ausgesetzt. Nach 15, 30, 45, 60 und 90 min Bestrahlung wurde jeweils eine Probe entnommen.

Nach Probenaufarbeitung und SDS-PAGE wurden die Gele getrocknet und 11 d lang autoradiographiert. Nach Entwicklung des Films wurde dieser densitometrisch ausgewertet.

2.2.2.6.11 Aufnahme der Radioaktivität in die Blätter

Die Aufnahme des ^{35}S -Met in die Blattsegmente wurde einerseits verfolgt durch die Abnahme der Radioaktivität im radioaktiven Inkubationspuffer während der pulse-Phase und andererseits durch die Zunahme von ^{35}S -Met in den nach Probenaufarbeitung untersuchten Thylakoidsuspensionen. Aliquots der radioaktiven Inkubationslösung wurden nach Beendigung der verschiedenen pulse-Phasen (15, 30, 45, 60, 90 min) im Scintillationszähler untersucht. Nach der Aufarbeitung der zu den verschiedenen pulse-Zeiten entnommenen Blattsegmente (s. Kap. 2.2.2.6.10) wurden Aliquots der jeweiligen Thylakoidsuspensionen ebenfalls im Scintillationszähler untersucht.

2.2.2.6.11.1 Abnahme von ^{35}S -Met in der radioaktiven Inkubationslösung während der pulse-Phase

Abb. 2.14 verdeutlicht die relative Abnahme des ^{35}S -Met in der Inkubationslösung der Blattsegmente während der pulse-Zeit von 90 min. Die im Scintillationszähler ermittelten Werte der radioaktiven Ausgangslösung entsprachen 100 %. Über die Pulse-Zeit von 90 min nahm der Gehalt an ^{35}S -Met in der Ausgangslösung +/- kontinuierlich ab und koinzidierte mit der Aufnahme der Radioaktivität in die Blattsegmente (s.u.). Die auftretenden Unterschiede sowie die über 100 % liegenden Werte beruhten auf einer unterschiedlichen Anzahl von Proben (n (WL) = 3, n (UV+WL) = 6), die den hier dargestellten Mittelwerten zugrunde lagen. Ein Trend zur unterschiedlichen Aufnahme bei verschiedenen alten Blattsegmenten konnte nicht ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt), daher geben die Mittelwerte einen Durchschnitt

über alle gemessenen Aliquots mit Segmenten unterschiedlichen Alters wieder. Die Ergebnisse belegen trotz geringer Differenzen zwischen den Proben gleicher pulse-Zeiten, dass kein Trend für eine unterschiedliche Aufnahme des ^{35}S -Met aufgrund unterschiedlicher Vorbehandlung (WL oder UV+WL) zu sehen ist.

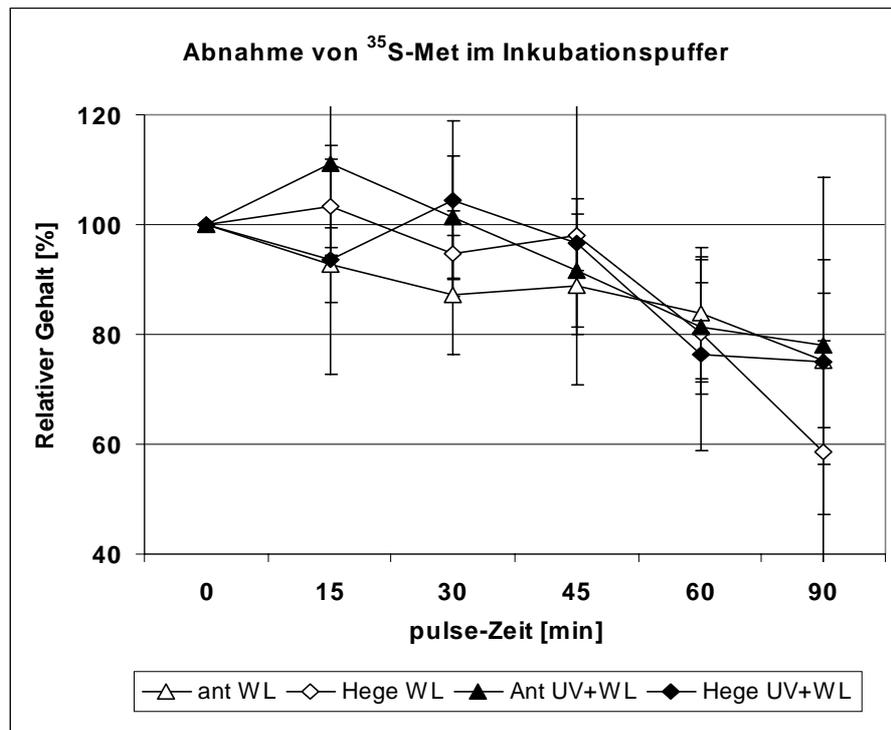


Abb. 2.14: Aliquots des radioaktiven Inkubationspuffers wurden während der pulse-Zeit der Blattsegmente auf ihren Gehalt an radioaktiv markiertem ^{35}S -Met mittels Scintillationszählung untersucht. Die radioaktive Ausgangslösung (0 min) wurde gleich 100 % gesetzt. Der relative Gehalt an ^{35}S -Met nahm über die pulse-Zeit mehr oder weniger kontinuierlich ab.

2.2.2.6.11.2 Anteil der aufgenommenen Aminosäure ^{35}S -Met in den aufgearbeiteten Blattproben

In den Thylakoidsuspensionen am Ende jeder Probenaufarbeitung fanden sich in allen Proben gleicher pulse-Zeit vergleichbare Mengen an ^{35}S -Met, d.h. radioaktiv markiertes ^{35}S -Met wurde von allen Proben unabhängig von der Art ihrer Vorbestrahlung in vergleichbarer Weise in das Blattinnere aufgenommen. Der relative Anteil an Radioaktivität bezogen auf den Inkubationspuffer stieg von 0.2 % auf knapp 0.7 %. Anhand der Daten konnte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse zum D1-Abbau- bzw. zur D1-Synthese nicht durch unterschiedliche Aufnahmeraten des ^{35}S -Met verfälscht wurden.

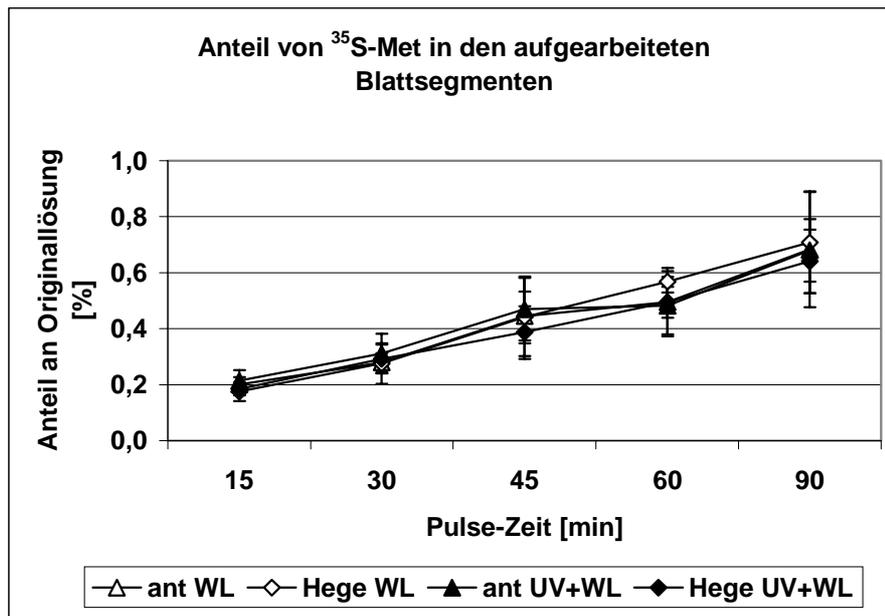


Abb. 2.15: Je 10 Blattsegmente wurden unterschiedlich lang mit radioaktivem Inkubationspuffer ($0,1 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S}$ -Met) gepulst. Nach Aufarbeitung der Blattsegmente wurde je ein Aliquot der Thylakoidsuspension mittels Scintillationszählung auf seinen Gehalt an radioaktiv markierter Aminosäure ^{35}S -Met untersucht. Der relative Anteil am Gehalt der Ausgangslösung (= 100 %) wurde bestimmt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wachstumsparameter

In die Untersuchungen zum Flavonoidgehalt der Blattsegmente wurden einzelne Wachstumsparameter einbezogen. Dazu zählten das Frischgewicht der Blattsegmente wie die Blattlänge.

3.1.1 Frischgewicht der Blattsegmente

Von jedem untersuchten Blattsegment wurde das Frischgewicht entweder einzeln oder als Mittelwert von 10 Blattsegmenten ermittelt. Es wurden alle Altersstadien (5-15 d) berücksichtigt.

Der Vergleich der Kontrollpflanzen (WL-Bedingungen) und der UV+WL-bestrahlten Pflanzen beider Gerstevarietäten wies wenig signifikante Unterschiede auf (Abb. 3.1). Auffällig war der Unterschied bei den 5 d alten Pflanzen. Die UV+WL-bestrahlten Blattsegmente beider Varietäten wiesen ein deutlich höheres Frischgewicht auf als die Kontrollen. Die *Hege*-Blattsegmente waren unter UV+WL-Einfluss um 66 % schwerer als die Kontrollen, die *ant*-Segmente um 25 %. Im weiteren Verlauf der Blattentwicklung wurden bei der Muttervarietät *Hege* keine Unterschiede im Frischgewicht festgestellt, die auf unterschiedliche Bestrahlungsbedingungen hätten zurückgeführt werden können. 7 d alte *ant*-Pflanzen zeigten signifikante Unterschiede ($P \ll 0.01$), wobei die Kontrollpflanzen höhere Frischgewichte (5 % mehr) aufwiesen als die UV+WL-bestrahlten. Das gleiche ließ sich auch bei 9 d und 15 d alten *ant*-Pflanzen feststellen, allerdings betrug der Unterschied trotz statistischer Signifikanz mit $P < 0.05$ nicht mehr als 5 %.

Deutlichere Unterschiede ließen sich beim Vergleich von Muttervarietät und Mutante feststellen. Unter WL-Bedingungen zeigten nur die älteren Blattsegmente unterschiedliche Frischgewichte. 8 d alte *Hege*-Segmente wiesen ein höheres Frischgewicht auf als *ant* (10 % bei $P < 0.05$), 10 und 15 d alte Segmente bestätigten den Trend (14 bzw. 13 % bei $P \ll 0.01$). Unter UV+WL-Bedingungen zeigte sich dieser Trend bis auf eine Ausnahme (8 d) über alle

Altersstadien hinweg ($P \ll 0.01$). *Hege*-Blattsegmente wiesen ein zwischen 10 und 33 % höheres Frischgewicht auf als die entsprechenden *ant*-Segmente.

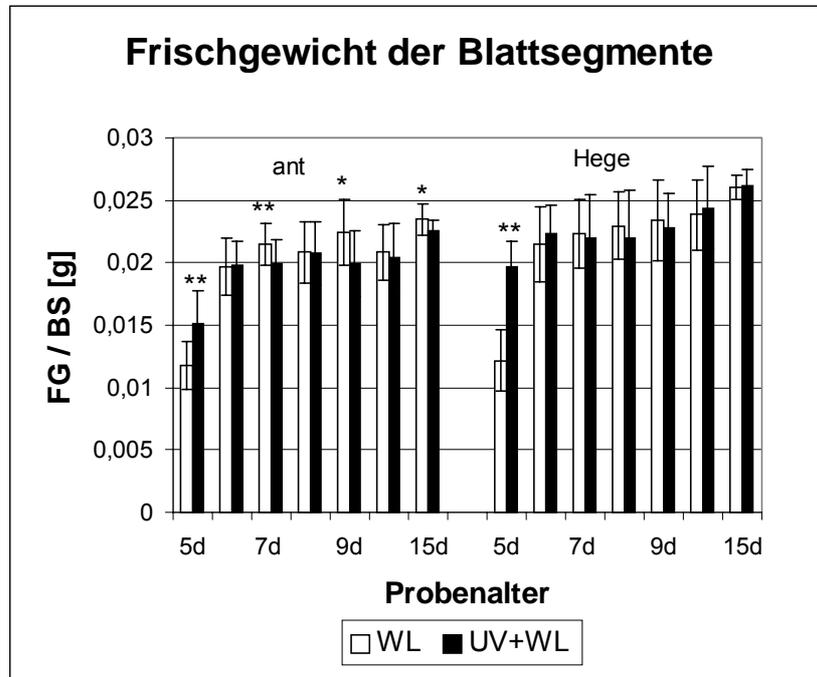


Abb. 3.1: Mittleres Frischgewicht des oberen Primärblattsegments von *Hege* und *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (helle Balken = WL-Anzucht, dunkle Balken = UV+WL-Anzucht). Signifikante Unterschiede aufgrund der Bestrahlungsbedingungen sind mit ** oder * gekennzeichnet (** = $P \ll 0.01$, * = $P < 0.05$, $n = 13-51$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder.

3.1.2 Blattlänge

Die Blattlänge wurde nur bei den 5, 7 und 10 d alten Pflanzen untersucht (Abb. 3.2). Unter dem Einfluss von UV+WL-Strahlung zeigten die 5 d alten Primärblätter geringfügig höhere Blattlängen (*Hege* UV+WL 7 % mehr, *ant* UV+WL 3 % mehr) als die Kontrollen, wobei der Unterschied bei *Hege* ein Signifikanz-Niveau von $P \ll 0.01$ aufwies. Dies kehrte sich bei den älteren Blattstadien um; unter UV+WL-Bedingungen war die Blattlänge geringer als unter WL-Bedingungen. Bei den 7 d alten Primärblättern wies die Mutante eine etwas größere Differenz von 8 % zwischen WL-bestrahlten und UV+WL-bestrahlten Blättern auf als die Muttervarietät mit 2 %. Deutlich geringer war die Blattlänge bei beiden Varietäten am 10.

Tag. *Hege* musste eine Blattlängenreduktion auf 86 % der Kontrolle und *ant* auf 77 % hinnehmen ($P \ll 0.01$).

Der unmittelbare Vergleich von *Hege* und *ant* zeigte in allen Altersstufen unabhängig von der Bestrahlung eine größere Primärblattlänge bei *Hege* ($P \ll 0.01$). Unter WL-Bedingungen nahm die Differenz zwischen *Hege* und *ant* jedoch mit zunehmendem Alter ab (5 d 21 %, 7 d 15 %, 10 d 8 % Unterschied in der Blattlänge). Unter UV+WL-Bedingungen blieben die Unterschiede von Alterstufe zu Altersstufe konstant (5 d 26 %, 7 d 22 %, 10 d 22 % Unterschied in der Blattlänge).

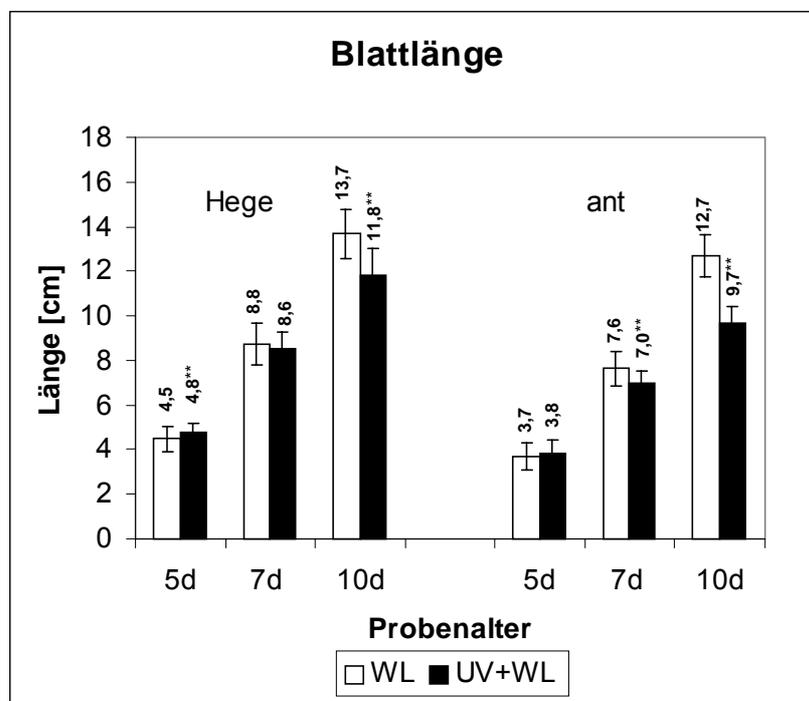


Abb. 3.2: Mittlere Primärblattlänge von *Hege* und *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (helle Balken = WL-Anzucht, dunkle Balken = UV+WL-Anzucht). Signifikante Unterschiede aufgrund der Bestrahlungsbedingungen sind mit ** gekennzeichnet (** = $P \ll 0.01$, $n = 56-118$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder.

Zusammenfassung: Im Vergleich zur Mutante *ant* entwickelte die Muttervarietät *Hege* unter beiden Bestrahlungsbedingungen WL bzw. UV+WL längere Primärblätter mit höheren Segment-Frischgewichten. Die Differenzen in der Blattlänge zwischen den beiden Varietäten

nahmen bei WL-Bestrahlung mit zunehmendem Alter ab, blieben unter Einfluss von zusätzlichem UV jedoch konstant.

Der Einfluss der erhöhten UV-Strahlung drückte sich deutlich in einer Blattlängenreduktion aus, die bei der Mutante zu einem früheren Zeitpunkt einsetzte und sich im Alter von 10 d stärker auswirkte als bei der Mutter *Hege*. Ein UV-Einfluss auf das Segment-Frischgewicht war bei *Hege* nur am 5. Tag, bei *ant* am 5., 7., 9. und 15. Tag zu beobachten, wobei die Differenzen trotz statistischer Signifikanz gering waren.

3.2 Inhaltsstoffe

3.2.1 Chlorophyllgehalt der Blattsegmente

Unter WL-Bedingungen nahm der Chlorophyllgehalt (Gesamtchlorophyll pro Frischgewicht) der untersuchten Blattsegmente bei *Hege* bis zum 10. Tag kontinuierlich zu (Abb. 3.3). Der Zuwachs lag bei 89 %. Am 15. Tag war der Gehalt etwas niedriger. Ähnlich sah der Verlauf der Chlorophyllzunahme bei *ant* aus: Ausgehend vom Gehalt an d = 5 erreichten die Blattsegmente am 10. Tag einen Chlorophyllzuwachs um 85 % und zeigten dann am 15. Tag ebenfalls einen verringerten Gehalt, der im Vergleich zu *Hege* deutlich niedriger ausfiel. Der Gehaltsunterschied zwischen *Hege* und *ant* betrug am 5. Tag 12 % zugunsten von *Hege* und erhöhte sich am 15. Tag auf 23 % (signifikant nur an d = 15 mit $P < 0.05$, $n = 7-10$). Beiden Varietäten gemeinsam war eine Zunahme des Chlorophyll a-Anteils im Verhältnis beider Chlorophylle a und b zueinander: 5 d alte *Hege*-Segmente wiesen ein a/b-Verhältnis von 4.14 auf gegenüber einem Verhältnis von 4.87 bei 15 d. Der entsprechende Unterschied bei *ant*-Segmenten betrug 3.87 gegenüber 5.08.

Der Gesamtgehalt an Chlorophyll a und b war bei beiden Varietäten zu allen Zeitpunkten unter UV+WL-Bedingungen gleich hoch. Beide Varietäten legten bis zum 10. Tag zu, danach war ein weiterer Anstieg nicht erkennbar. Der Gehalt am 15. Tag entsprach dem vom 10. Tag. Der Zuwachs bei *Hege* betrug vom 5. bis zum 15. Tag 64 % und bei *ant* 68 %. Die niedrigere Zuwachsrate unter UV+WL-Bedingungen beruhte auf höheren Gehalten in den 5 d alten

Segmenten im Vergleich zur Kontrollanzucht. *Hege*-Segmente wiesen unter UV+WL-Bedingungen einen 17 % höheren Chlorophyll-Gehalt pro Frischgewicht auf, entsprechende *ant*-Segmente gar einen 28 % höheren Gehalt. Während sich bei *Hege* diese Differenz mit zunehmendem Alter nicht veränderte, zeigten 15 d alte *ant*-Segmente einen um 42% höheren Gehalt an Gesamtchlorophyll gegenüber Segmenten aus der WL-Anzucht. Signifikante Unterschiede zwischen WL- und UV+WL-Anzuchten ergaben sich bei der Mutante (Ausnahme: 7 d alte Blattsegmente) mit $P < 0.01$ und bei 15 d alten *Hege*-Segmenten mit $P < 0.05$. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis betrug bei *Hege* am 5. Tag 4,12 und erhöhte sich bis zum 10. Tag auf 4,41; am 15. Tag jedoch betrug das Verhältnis 4,02. 5 d alte *ant*-Segmente wiesen gegenüber der Kontrolle einen leicht höheren Wert von 4,08 auf, der bis zum 15. Tag auf 4,54 anstieg und damit unter dem der Kontrolle blieb.

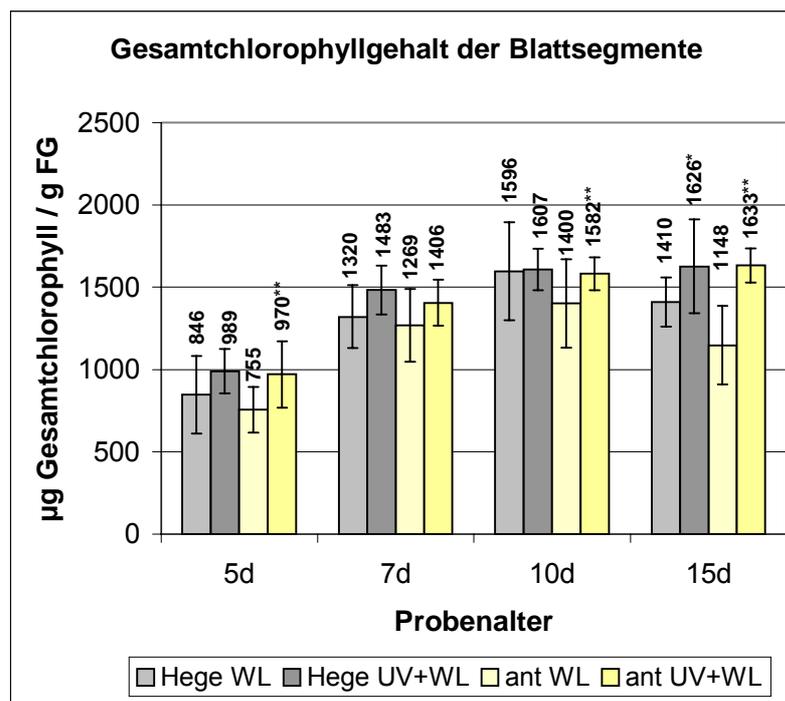


Abb. 3.3: Mittlerer Gesamtchlorophyllgehalt in den oberen Primärblattsegmenten von *Hege* und *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (ohne Muster = WL-Anzucht, mit Muster = UV+WL-Anzucht). Signifikante Unterschiede aufgrund der Bestrahlungsbedingungen sind mit ** oder * gekennzeichnet (** = $P < 0.01$, * = $P < 0.05$, $n = 9-22$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder.

Zusammenfassung: Während der Blattentwicklung vom 5. zum 15. Tag stieg der Chlorophyllgehalt pro g Frischgewicht (Chl a und b) im oberen Blattsegment von *Hege*- und *ant*-Primärblättern unter WL-Bedingungen bis zum 10. Tag an und nahm danach wieder ab. Unter diesen Bedingungen gab es Unterschiede von 12-23 % im Chlorophyllgehalt zwischen *Hege* und *ant* zugunsten von *Hege*. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis nahm bei beiden Varietäten bis zum 15. Tag zu. Gehaltsunterschiede zwischen *Hege* und *ant* waren unter UV+WL-Bedingungen nicht auszumachen; der Gehalt blieb auch nach dem 10. Tag konstant. In der Regel waren die Chlorophyllgehalte bei beiden Varietäten unter UV+WL höher als unter WL-Bedingungen, was aber nur bei *ant* als statistisch signifikant belegbar war. Unter beiden Bestrahlungsbedingungen stieg bei *Hege* und *ant* das Chlorophyll a/b-Verhältnis bis zum 10. Tag und fiel danach mit Ausnahme von *ant* UV+WL wieder ab.

3.2.2 Flavonoidakkumulation in den Primärblattsegmenten

Eine Mutation im Sekundärstoffwechsel führt bei *ant* zu einem veränderten Phenylpropangehalt und -muster gegenüber der Muttervarietät *Hege*. Ein vermuteter Defekt in der Chalkon-Flavanon-Isomerase (Reuber et al. 1997) verhindert die enzymatische Cyclisierung des 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxychalkons zum Flavanon; lediglich ein geringer Anteil wird durch Autocyclisierung gebildet. Daher ist die Menge der gerstentypischen Flavone drastisch reduziert. Reuber (1996) konnte für 7 d alte *ant* Primärblattsegmente (1.5 cm ab der Blattspitze) einen um 70 % reduzierten Phenylpropangehalt gegenüber der Muttervarietät *Hege* feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Akkumulation der löslichen Phenylpropane im oberen Blattsegment über den Zeitraum von 5 bis 10 d und am 15. Tag unter den Bestrahlungsbedingungen des neuen UV-Anzuchtschranks untersucht. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 340 nm.

Abb. 3.4 A und B zeigt je ein typisches HPLC-Chromatogramm der Muttervarietät *Hege* und der Mutante *ant* nach WL- bzw. UV+WL-Anzucht. Wie erwartet, erwies sich bei *Hege* unter WL-Bedingungen Saponarin (Sap = Isovitexin-7-O-glucosid) als Hauptkomponente und Lutonarin (Lut = Isoorientin-7-O-glucosid) als Nebenkomponekte. Reuber (1996) konnte darüber hinaus noch Lutonarin 4'-Methylether, Vitexin und Isovitexin als weitere Flavone

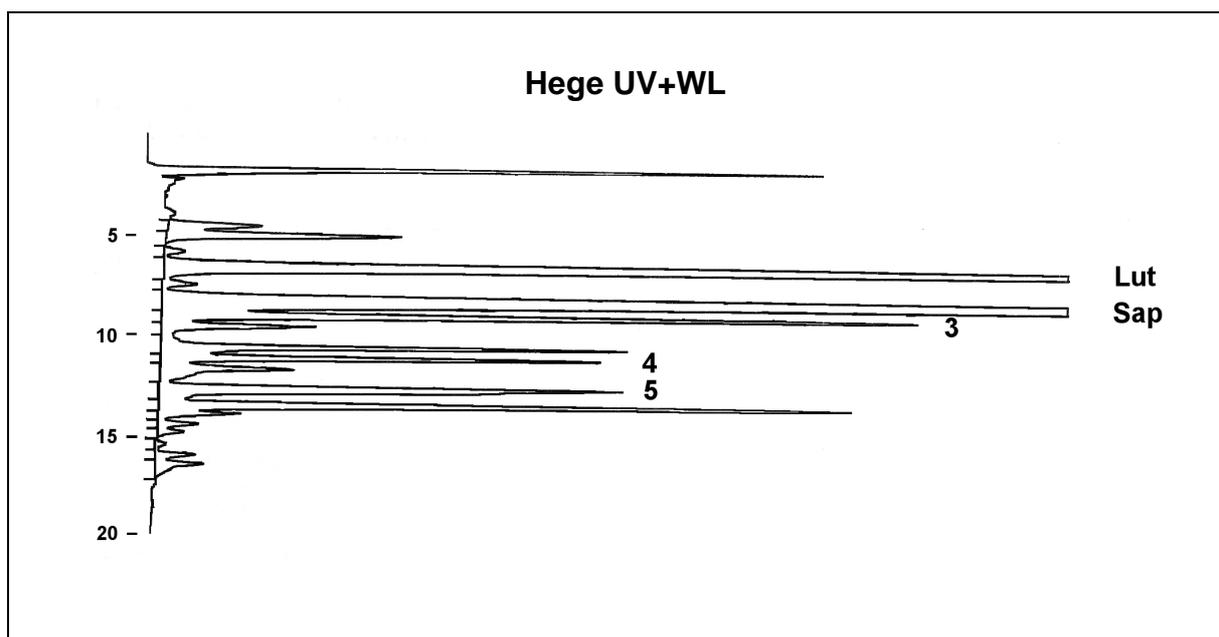
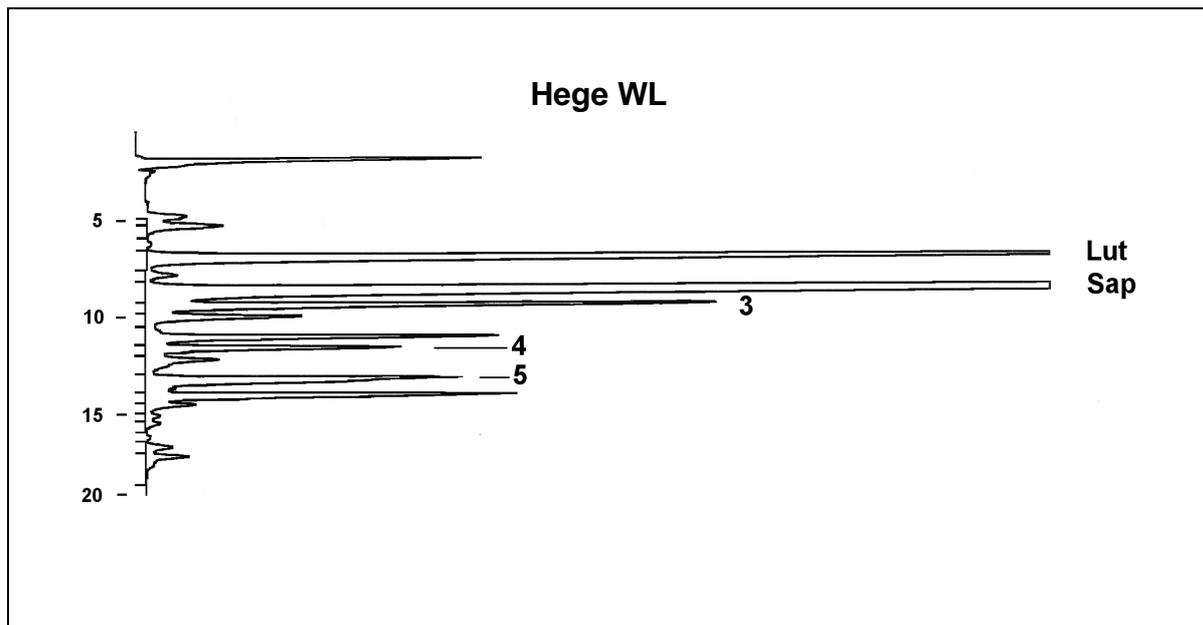


Abb. 3.4 A: HPLC-Chromatogramme von methanolischen Extrakten aus 10 d alten *Hege*-Primärblattsegmenten. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte bei 340 nm. Die Chromatogramme sind auf Blattebene direkt miteinander vergleichbar, auch mit denen aus Abb. 3.4 B. Folgende Flavone sind markiert: Lut = Lutonarin, Sap = Saponarin, 3 = Lutonarin 4'-Methylether, 4 = Isovitexin, 5 = Vitexin. Unmarkierte peaks sind z. T. noch nicht identifizierte Flavone sowie HCA-Derivate (s. Reuber et al. 1997). Für die Berechnung des Gesamtgehalts an phenolischen Inhaltsstoffen wurden alle peaks berücksichtigt.

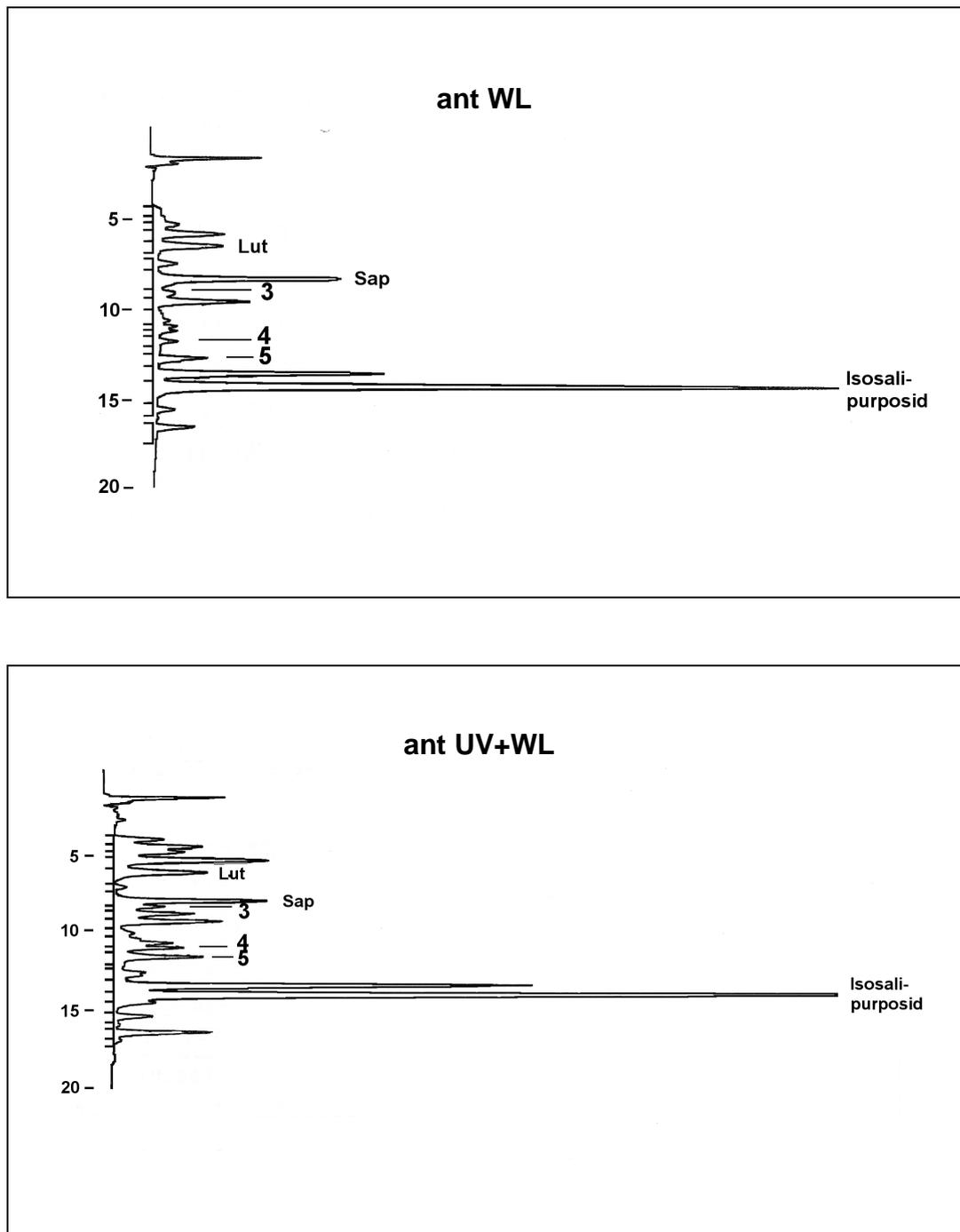


Abb. 3.4 B: HPLC-Chromatogramme von methanolischen Extrakten aus 10 d alten *ant*-Primärblattsegmenten. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte bei 340 nm. Die Chromatogramme sind auf Blattebene direkt miteinander vergleichbar, auch mit denen aus Abb. 3.4 A. Folgende Flavone sind markiert: Lut = Lutonarin, Sap = Saponarin, 3 = Lutonarin 4'-Methylether, 4 = Isovitexin, 5 = Vitexin. Isosalipurposid ist die mutanten-spezifische Substanz. Unmarkierte peaks sind z. T. noch nicht identifizierte Flavone sowie HCA-Derivate (s. Reuber et al. 1997). Für die Berechnung des Gesamtgehalts an phenolischen Inhaltsstoffen wurden alle peaks berücksichtigt.

identifizieren, die aber mengenmäßig eine vernachlässigbare Rolle spielten. Unter UV+WL-Bedingungen stieg der Gehalt der Substanzen an, insbesondere der des Lutonarins. Die Mutante offenbarte erwartungsgemäß ein deutlich anderes Inhaltsstoffmuster mit einer herausragenden Substanz, dem 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxychalkon-2'-O- β -Glucopyranosid Isosalipurposid (Reuber et al. 1997). Daneben fanden sich in geringeren Mengen vor allem Saponarin und Lutonarin. Dieses Muster veränderte sich nicht unter UV+WL-Bedingungen, nahm aber in der Quantität etwas zu.

Unter den neuen Kammerbedingungen ließ sich im Lauf der Entwicklung eine kontinuierliche Zunahme an Inhaltsstoffen im untersuchten oberen Blattsegment feststellen (Abb. 3.5).

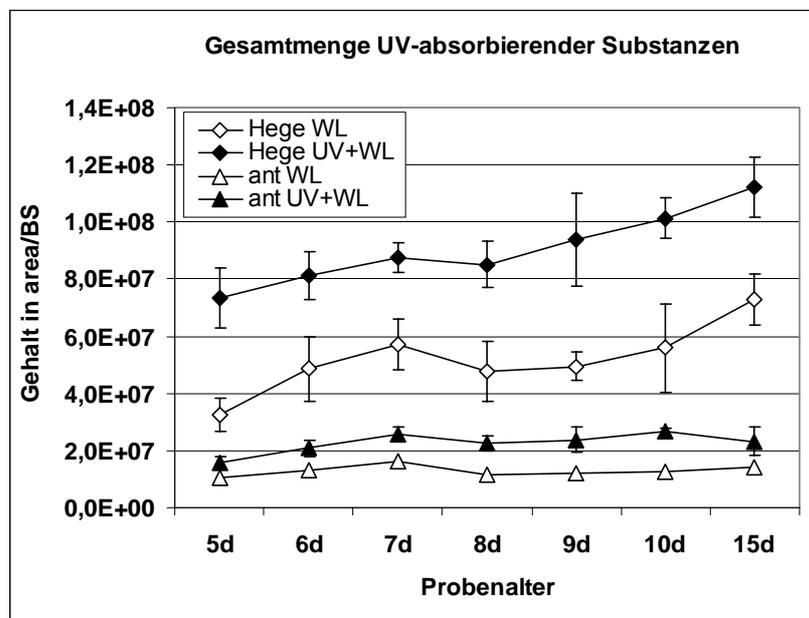


Abb. 3.5: Akkumulation aller löslichen UV-absorbierenden phenylpropanoiden Substanzen im oberen Primärblattsegment von *Hege* und *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 340 nm. Die angegebenen area-Werte (Summe aller HPLC-peaks eines Extraktes) sind proportional zur Stoffmenge und geben somit direkt die Absorptionskapazität der entsprechenden Substanzen bei 340 nm wieder. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder; nicht sichtbare Fehlerbalken sind kleiner als das entsprechende Symbol.

Unter WL-Bedingungen nahm der Gesamtgehalt an löslichen Inhaltsstoffen bei *Hege* vom 5. zum 15. Tag um 123 % zu. Die Hauptsubstanz Saponarin nahm unter diesen Bedingungen um 139 % zu, Lutonarin um 66 % (Abb. 3.6). Gemessen am Gesamtgehalt aller löslichen Phenylpropane lag der Anteil an Saponarin über den gesamten Zeitraum zwischen 60 und 70 %, der des Lutonarins zwischen 8 und 10 %. Unter UV+WL-Bedingungen nahm der Gesamtgehalt über diesen Zeitraum nur um 52 % zu, allerdings erwies sich der Einfluss der zusätzlichen UV-Strahlung auf den Gesamtgehalt an löslichen Inhaltsstoffen als bedeutsamer verglichen mit dem Entwicklungseinfluss. Schon die 5 d alten UV+WL-bestrahlten *Hege*-Blattsegmente wiesen einen mehr als doppelt so hohen Gesamtgehalt auf als die Kontrollen (Abb. 3.5). Diese Relation wurde im Lauf der Entwicklung geringer, dennoch zeigten die UV+WL-Proben zwischen 50 und 100 % mehr phenolischen Inhaltsstoffgehalt (Abb. 3.8). Die flavonoiden Substanzen Saponarin und Lutonarin nahmen unter diesen Bestrahlungsbedingungen vom 5. zum 15. Tag um 45 % bzw. 134 % zu (Abb. 3.6). Der Anteil des Saponarins am Gesamtgehalt blieb wie bei den WL-Kontrollen unverändert bei 62 bis 68 %, während der Lutonarin-Anteil von 11 % am 5. Tag auf 17 % am 15. Tag stieg. Gegenüber der WL-Kontrolle lag der Saponaringehalt bis auf d 5 (146 %) im Schnitt 70 % höher (Abb. 3.9). Dagegen nahm der Lutonaringehalt mit zunehmender UV-Bestrahlung kontinuierlich zu, erfuhr aber ab dem 9. Tag einen leichten Rückgang (Abb. 3.9).

Bei der Mutante *ant* betrug der Zuwachs an löslichen Inhaltsstoffen unter WL-Bedingungen im Zeitraum von 5 bis 15 d 38 % (Abb. 3.5). Der Gehalt an Isosalipurposid, der Hauptsubstanz der löslichen Phenylpropane, stieg bis zum 10. Tag um 31 % an und fiel bis zum 15 d wieder auf das Niveau von 5 d ab (Abb. 3.7). Dies entsprach bis zum 10. Tag einem Anteil am Gesamtgehalt von durchschnittlich 38 ± 2 %, der zum 15. Tag auf 24 % abfiel. Unter UV+WL-Bedingungen nahm der Gesamtgehalt im Beobachtungszeitraum um 47 % zu (Abb. 3.5). Wie bei *Hege* waren die Gesamtgehalte der Blattsegmente unter dem Einfluss zusätzlicher UV-Strahlung höher als unter WL-Bedingungen, wenn auch der Gehaltsunterschied am 5. Tag nicht ganz so hoch war wie bei der Muttervarietät (um 54 % höher als der Gesamtgehalt unter WL-Bedingungen). Relativ zu den WL-Proben stieg der Gesamtgehalt der UV+WL-Proben am 8. und 9. Tag an auf maximal 114 % mehr Gehalt, fiel aber zum 15. Tag hin wieder auf das Niveau der frühen Blattstadien (Abb. 3.8). Im

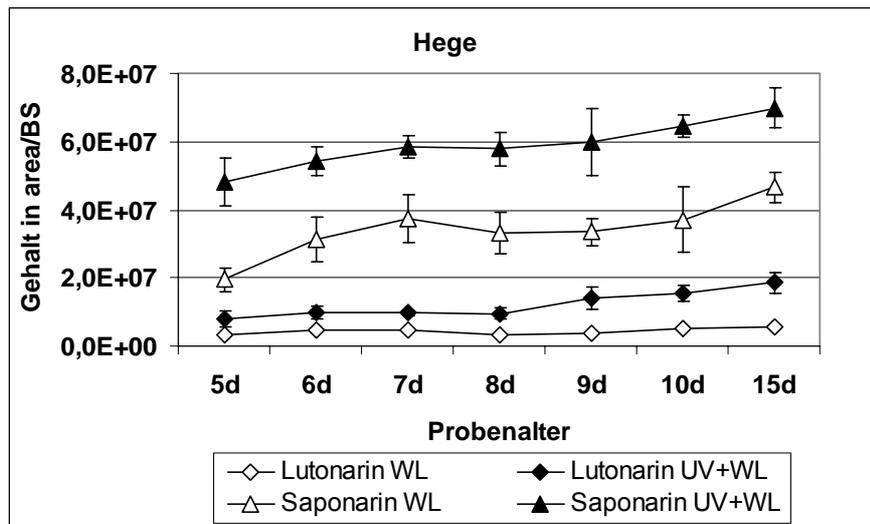


Abb. 3.6: Akkumulation der Glycosylflavone Saponarin und Lutonarin im oberen Primärblattsegment von *Hege* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder; nicht sichtbare Fehlerbalken sind kleiner als das entsprechende Symbol. $1,0E+07$ area entsprechen 17 nmol Saponarin bzw. 21 nmol Lutonarin / Blattsegment.

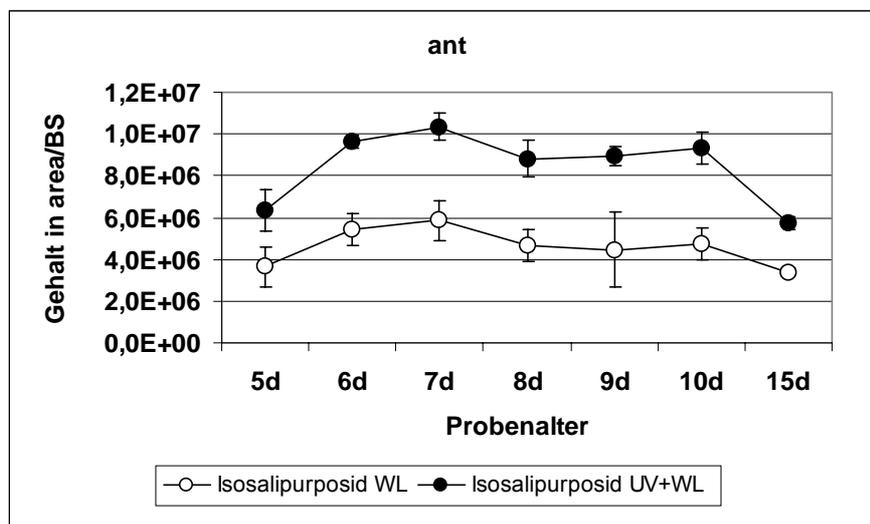


Abb. 3.7: Akkumulation des Tetrahydrochalkonglucosids Isosalipurposid im oberen Primärblattsegment von *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder; nicht sichtbare Fehlerbalken sind kleiner als das entsprechende Symbol.

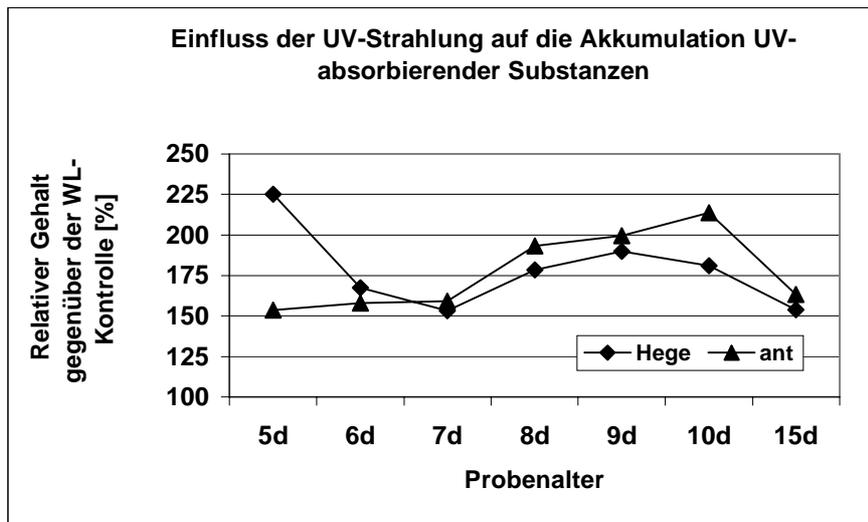


Abb. 3.8: Relativer Gehalt aller löslichen UV-absorbierenden Substanzen (340 nm) im oberen Primärblattsegment von *Hege* und *ant* unter UV+WL-Bestrahlungsbedingungen. Der Gehalt in den entsprechenden Kontrollsegmenten (WL-Anzucht) ist jeweils gleich 100%. Die Berechnungen beruhen auf den Werten aus Abb. 3.5.

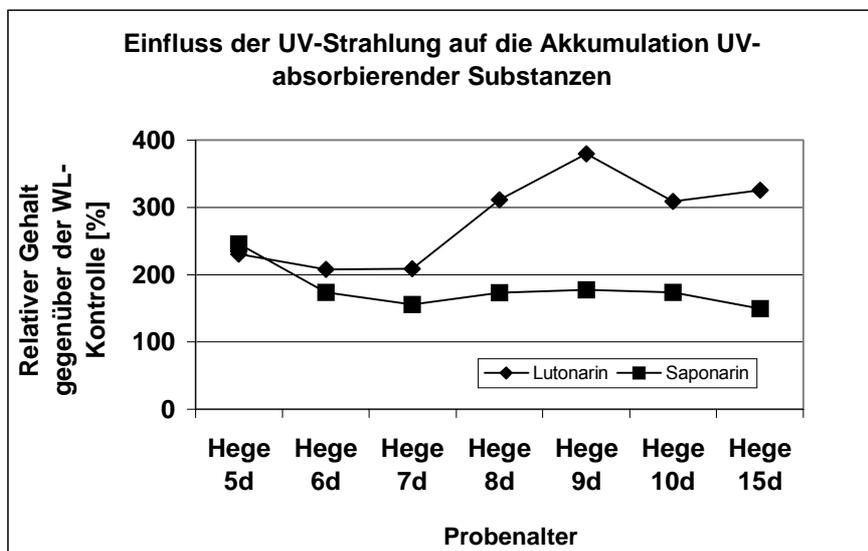


Abb. 3.9: Relativer Gehalt von Saponarin und Lutonarin im oberen Primärblattsegment von *Hege* unter UV+WL-Bestrahlungsbedingungen. Der Gehalt in den entsprechenden Kontrollsegmenten (WL-Anzucht) ist jeweils gleich 100%. Die Berechnungen beruhen auf den Werten aus Abb. 3.6.

wesentlichen akkumulierte bis zum 10. Tag das Chalkon als Reaktion auf zusätzliches UV (Abb. 3.11). Hier zeigte sich das gleiche Phänomen wie unter WL-Bedingungen: nach einer Zunahme um 47 % bis zum 10 d erreichte der Gehalt am 15. Tag nur 91 % des Gehaltes vom 5. Tag (entspricht einem Anteil von 40 ± 4 % bis $d = 10$ bzw. 25 % an $d = 15$). Der Anteil an Saponarin und Lutonarin am Gesamtgehalt der löslichen Substanzen in der Mutante blieb bis zum 15. Tag unter beiden Bestrahlungsbedingungen gering, wenn auch die relative Zunahme für Saponarin bei 277 % unter WL- bzw. 231 % unter UV+WL-Bedingungen und für Lutonarin bei 300 % unter WL- bzw. bei knapp unter 600 % unter UV+WL-Bedingungen lag (Abb. 3.10). Verglichen mit dem Gesamtgehalt an löslichen Inhaltsstoffen betrug der Anteil an Saponarin unter WL-Bedingungen bei 5 d alten Segmenten 5% und nahm bis zum 15. Tag kontinuierlich auf 10 % Anteil zu, blieb aber unter UV+WL-Bedingungen konstant zwischen 5 und 7 %. Der Anteil des Lutonarins am Gesamtgehalt erhöhte sich unter beiden Bestrahlungsbedingungen von 2 % (WL) bzw. 1 % (UV+WL) auf 5 % am Gesamtgehalt. Im Vergleich zur WL-Anzucht lag der Gehalt an Isosalipurposid während der Beobachtungszeit zwischen 70 und 100 % höher (Abb. 3.11). Dagegen nahm der Saponaringehalt relativ zur Kontrolle ab. Nur der Gehalt an Lutonarin nahm relativ zur WL-Kontrolle von annähernd gleichem Gehalt am 5. Tag auf insgesamt 180 % Gehalt am 15. Tag zu.

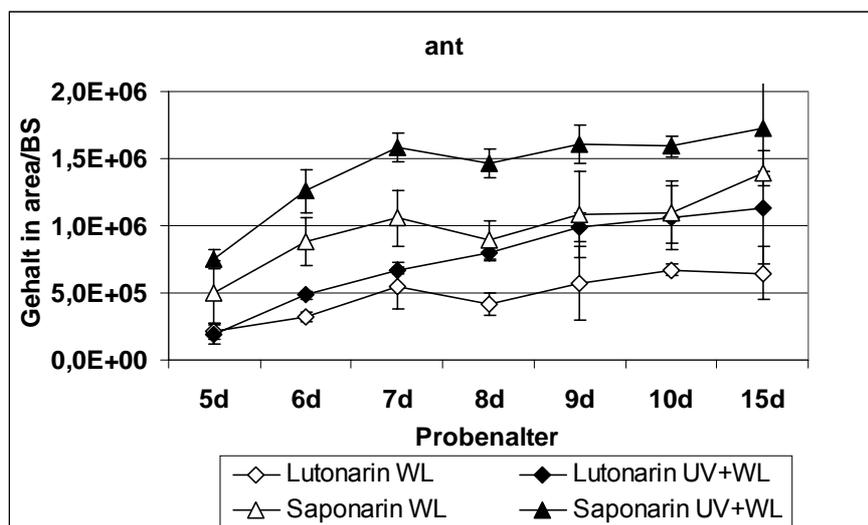


Abb. 3.10: Akkumulation der Glycosylflavone Saponarin und Lutonarin im oberen Primärblattsegment von *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder. $1,0E+05$ area entsprechen 0.17 nmol Saponarin bzw. 0.21 nmol Lutonarin / Blattsegment.

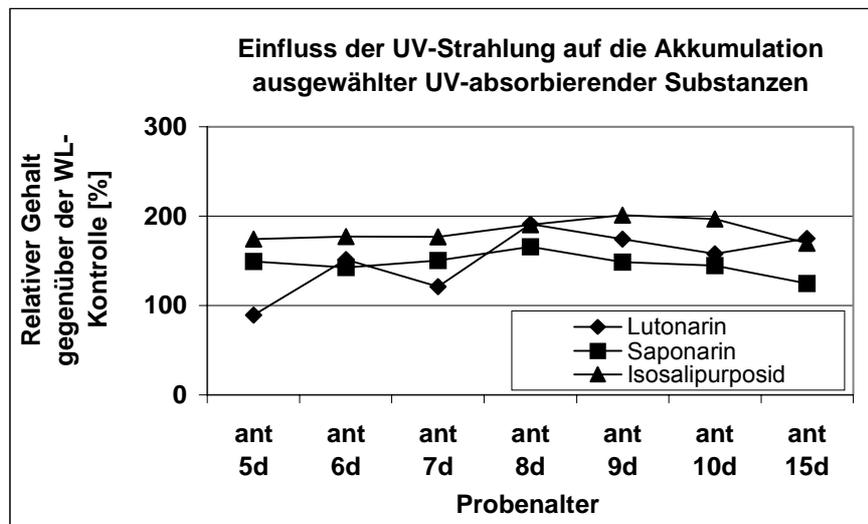


Abb. 3.11: Relativer Gehalt von Saponarin, Lutonarin und Isosalipurposid im oberen Primärblattsegment von *ant* unter UV+WL-Bestrahlungsbedingungen. Der Gehalt in den entsprechenden Kontrollsegmenten (WL-Anzucht) ist jeweils gleich 100%. Die Berechnungen beruhen auf den Werten aus Abb. 3.7 und 3.8.

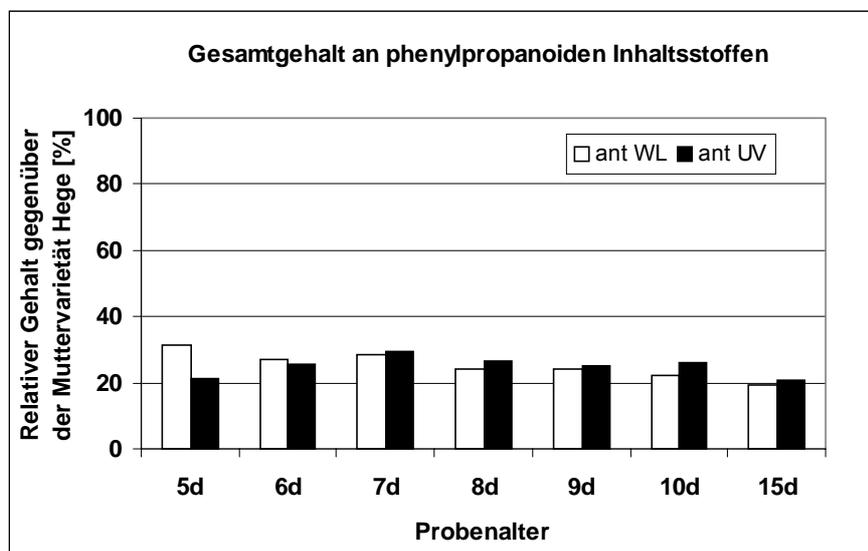


Abb. 3.12: Vergleich des relativen Gesamtgehalts an UV-absorbierenden Substanzen im oberen Primärblattsegment von *ant* vs. *Hege*. Der Gesamtgehalt in den entsprechenden *Hege*-Segmenten ist jeweils = 100 %.

Die Untersuchung der Flavonoidakkumulation über den Zeitraum von 5 bis 15 d bestätigte die phänotypische Ausprägung der Gerstenmutante im Primärblatt bei allen untersuchten Altersstadien. Abb. 3. 12 macht den erheblichen Gehaltsunterschied an UV-absorbierenden Substanzen zwischen der Muttervarietät und der Mutante deutlich. Unabhängig vom Alter und den Bestrahlungsbedingungen betrug der Gesamtgehalt an phenylpropanoiden Inhaltsstoffen nur maximal 30 % dessen, was in der Muttervarietät akkumulierte. Damit erfüllte die Mutante die Voraussetzung als geeignetes Objekt, um den Einfluss von erhöhter UV-Strahlung auf den Photosyntheseapparat bei reduziertem potentielltem UV-Schutz in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen.

Zusammenfassung: Über den Zeitraum von 5 bis 15 d nahm der Gehalt phenylpropanoider Substanzen im oberen Segment von *Hege*-Primärblättern sowohl unter WL- als auch unter UV+WL-Bedingungen kontinuierlich zu. Die flavonoide Hauptkomponente war Saponarin, die Nebenkomponekte Lutonarin erwies sich als die UV-reaktivere Substanz von beiden. Bereits die 5 d alten Segmente hatten unter UV+WL-Bedingungen einen mehr als doppelten Inhaltsstoffgehalt gegenüber der Kontrolle. Die Mutante erreichte insgesamt unter beiden Bestrahlungsbedingungen nur einen Gesamtgehalt an phenolischen Inhaltsstoffen von 20-30 % im Vergleich zur Muttervarietät. Die Hauptsubstanz war das Chalkon Isosalipurposid. Unter UV+WL-Bedingungen erhöhte sich der Gesamtgehalt in etwa gleicher Relation wie bei *Hege*. Das Flavonoid Lutonarin erwies sich auch in der Mutante als die UV-reaktivste Substanz, hatte aber, wie auch die Substanz Saponarin, nur einen geringen Anteil am Gesamtgehalt phenolischen Inhaltsstoffe.

3.3 Epidermale UV-Strahlungsabsorption durch Messung der Chlorophyll Fluoreszenz

Die Funktion von Flavonoiden als UV-Schutzsubstanzen in epidermalen Geweben wird allgemein anerkannt. Untersuchungen von Bornman & Vogelmann (1991), Day et al. (1992, 1993, 1994) u.a. mit Hilfe der "microfiber-optic" belegen den Zusammenhang einer abnehmenden epidermalen Transmission bei zunehmendem Flavonoidgehalt. Bilger et al. (1997) verfolgten mit der Einführung der Chlorophyll-Fluoreszenz-Messung in dieser Fragestellung einen anderen methodischen Ansatz, mit der geklärt werden sollte, ob die Korrelation einer

zunehmenden UV-Absorption in der Epidermis mit einer zunehmenden Konzentration UV-absorbierender Schutzsubstanzen in diesem Gewebe gegeben ist. Die flavonoidarme Mutante im Vergleich zu ihrer flavonoidreichen Mutter war besonders geeignet, diesen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an UV-absorbierenden Substanzen und der Strahlungsabsorption durch die Epidermis zu untersuchen. Da die Gewebeverteilung der Flavonoide in der Gerste nicht eindeutig geklärt ist, wurde die Methode zuerst an Roggen-Primärblättern etabliert, die den Vorteil einer strikten Gewebeverteilung zweier unterschiedlicher Flavonoidgruppen auf Epidermis und Mesophyll aufweisen. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Wolfgang Bilger (Universität Ås, Norwegen) durchgeführt. Die Konzeption des Versuches sowie die Auswertung erfolgte durch die Autorin. Alle Untersuchungen fanden am Botanischen Institut in Köln statt.

3.3.1 Roggen Kustro

Man findet im Roggen-Primärblatt im wesentlichen vier Haupt-Flavonoide, von denen zwei (R3 = Isovitexin-2"-O-Arabinosid, R4 = Isovitexin-2"-O-Galactosid) ausschließlich epidermal und die anderen beiden (R1 = Luteolin-4'-O-Glucuronyl-7-O-Diglucuronid, R2 = Luteolin-7-O-Diglucuronid) ausschließlich im Mesophyll lokalisiert sind (Dellamonica et al. 1983, Schulz et al. 1985). Zusätzlich findet man nur in der Epidermis diverse HCA-Ester (Strack et al. 1987). Die Akkumulation der Substanzen erfolgt entwicklungsabhängig, wird aber auch durch äußere Faktoren induziert. Insbesondere die epidermalen Flavonoide zeichnen sich durch eine erhöhte Akkumulation unter dem Einfluß von UV-Strahlung aus, während die Mesophyll-Flavonoide und die epidermalen HCA-Ester mäßig oder kaum reagieren (Reuber et al. 1996b).

3.3.1.1 Akkumulation der Inhaltsstoffe

4 bis 10 d alte Primärblätter wurden unter UV+WL-Bedingungen angezogen in der Absicht, unterschiedliche Gehalte an epidermal lokalisierten phenolischen Verbindungen zu induzieren, insbesondere an Flavonoiden und HCA-Estern.

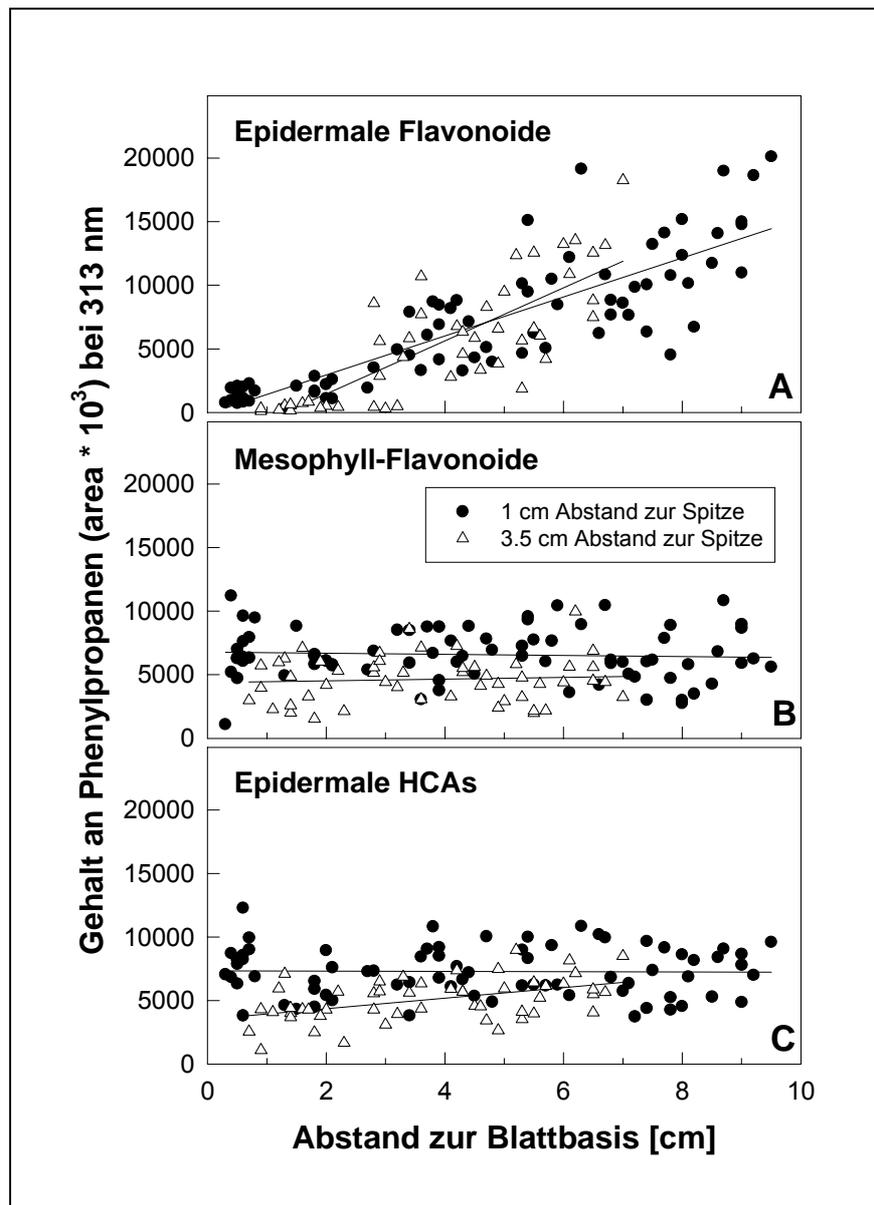


Abb. 3.13: Akkumulation UV-absorbierender löslicher Inhaltsstoffe in Roggen-Primärblattsegmenten nach UV+WL-Anzucht. Die 1.5 cm langen Blattsegmente wurden entweder 1 cm oder 3.5 cm unterhalb der Blattspitze abgeschnitten. Die streng gewebespezifische Lokalisation der unterschiedlichen Flavonoide und HCA-Ester erlaubt eine genaue Unterscheidung der Akkumulation dieser Substanzen in den verschiedenen Geweben. A: Akkumulation epidermal lokalisierter Flavonoide, B: Akkumulation der im Mesophyll lokalisierten Flavonoide, C: Akkumulation der ausschließlich epidermal lokalisierten HCA-Ester. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 313 nm. Die angegebenen area sind proportional zur Stoffmenge und geben somit direkt die Absorptionskapazität der entsprechenden Substanzen bei 313 nm wieder.

In Abb. 3.13 ist der Flavonoidgehalt der untersuchten Primärblattsegmente in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungszustand dargestellt. Dieser ist hier nicht als Blattalter in d zu verstehen, sondern als physiologischer Zustand des in Entwicklung befindlichen Blattseg-

menten unter den gewählten Anzuchtbedingungen. Aufgrund des basipetalen Wachstums eines Gramineenblattes unterscheiden sich die einzelnen, vertikal betrachteten Blattsegmente in ihrer physiologischen Ausprägung, wobei die basalen Blattsegmente physiologisch jünger sind als die apikalen. In Abb. 3.13 ist der Abstand der unteren Schnittkante eines untersuchten Blattsegmentes zur Blattbasis angegeben (Länge in cm). Beispiel: Das apikale Blattsegment eines 10 cm langen Primärblattes wurde 1 cm unterhalb der Blattspitze entnommen. Die Länge jedes Blattsegmentes betrug 1.5 cm. Die hier aufgetragene Länge beträgt $10 \text{ cm} - 1.5 \text{ cm} - 1 \text{ cm} = 7.5 \text{ cm}$. Analog wurden in der Abbildung auch die basalen Blattsegmente miteinbezogen, die 3.5 cm unterhalb der Blattspitze abgeschnitten wurden.

Abb. 3.13 A zeigt den Gehalt an epidermal lokalisierten Flavonoiden in den untersuchten Blattsegmenten. Erwartungsgemäß nahm der Gehalt über den Zeitraum von 10 d unter dem Einfluss von erhöhter zusätzlicher UV-Strahlung zu. Im Gegensatz dazu blieb der Gehalt an Mesophyll-Flavonoiden über den Zeitraum konstant; zu beobachten war nur die individuelle Variabilität des Flavonoidgehaltes unabhängig von der Blatentwicklung (Abb. 3.13 B). Das gleiche galt auch für die epidermal lokalisierten HCAs (Abb. 3.13 C).

3.3.1.2 Epidermale UV-Absorption

Mit der Zunahme von phenolischen Inhaltsstoffen in der Epidermis des Roggen-Primärblattes stieg auch die Absorption der Strahlung. UV-A-Strahlung wurde durch die epidermalen Flavonoide absorbiert (Abb. 3.14 A). Die Einbeziehung der ebenfalls epidermal lokalisierten HCAs hatte keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis (nicht gezeigt), was angesichts des UV-Spektrums von HCA-Estern auch nicht zu erwarten war (Abb. 3.15). Zwischen der durch Fluoreszenz-Messungen ermittelten Absorption und dem Gehalt an Mesophyll-Flavonoiden ergab sich erwartungsgemäß keine Beziehung (Abb. 3.14 B).

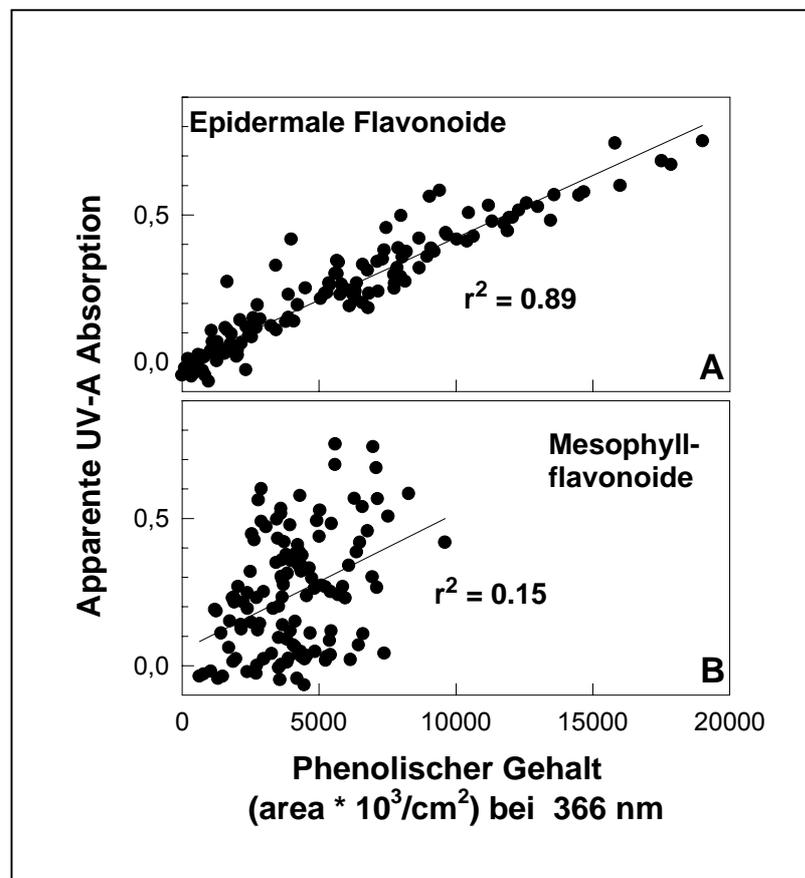


Abb. 3.14: Regressionsanalyse zwischen dem Gehalt an epidermalen Flavonoiden (A) bzw. Mesophyll-Flavonoiden (B) und der Absorption von UV-A-Strahlung in der Epidermis von Roggen-Primärblättern. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 366 nm.

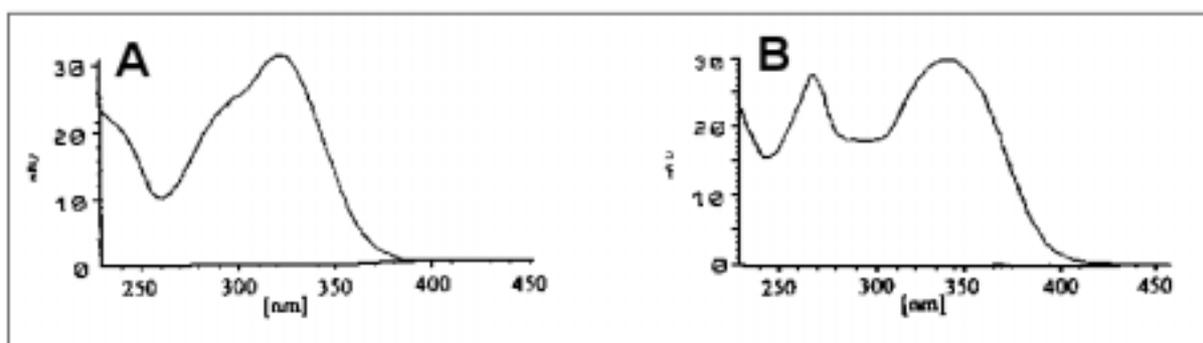


Abb. 3.15: UV-Absorptionsspektren epidermal lokalisierter Phenylpropane im Roggen-Primärblatt. A: Absorptionsspektrum eines HCA-Esters (nicht näher identifiziert). B: Absorptionsspektrum des Flavonoids R3 (aus: Reuber 1996, verändert).

Abb. 3.16 A zeigt, daß die Absorption der UV-B-Strahlung nicht allein durch die Flavonoide gewährleistet wurde. Die Korrelationsgerade ging nicht durch den Nullpunkt, d.h. der Gehalt an Flavonoiden im jungen Blattstadium reichte nicht aus, um die einfallende UV-B-Strahlung zu absorbieren. Durch Einbeziehung der HCA-Ester in die Korrelationsanalyse ergab sich ein anderes Bild: Die Absorptionslücke konnte hier vollständig geschlossen werden (Abb. 3.16 B). Es zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Absorption von UV-B-Strahlung und dem Gehalt an Mesophyll-Flavonoiden (Abb. 3.16 C).

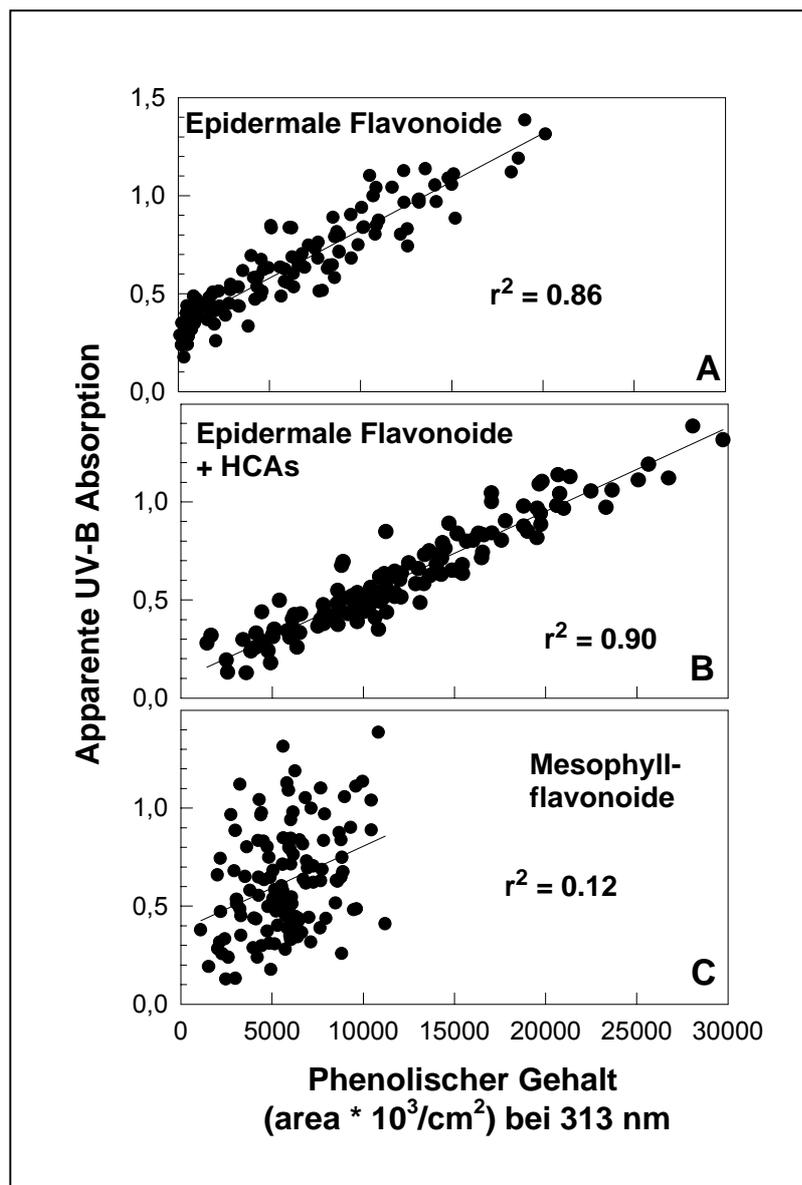


Abb. 3.16: Regressionsanalyse zwischen dem Gehalt an epidermalen Flavonoiden (A), epidermalen Flavonoiden + HCA-Estern (B) bzw. Mesophyll-Flavonoiden (B) und der Absorption von UV-B-Strahlung in der Epidermis von Roggen-Primärblättern. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 313 nm.

3.3.2 Gerste

Nachdem am Roggen-Primärblatt die Korrelation zwischen der Absorption von UV-Strahlung und der Menge an epidermal lokalisierten UV-absorbierenden Substanzen in so eindeutiger Weise dokumentiert werden konnte, wurden die Experimente an der Gerste durchgeführt. Es wurden Blattsegmente der flavonoidreichen Muttervarietät und der flavonoidarmen Mutante im Alter von 6, 9 und 11 d untersucht. In den vorangegangenen Untersuchungen zur entwicklungsbedingten und UV-abhängigen Akkumulation von Flavonoiden war deutlich geworden, dass beide Varietäten unter UV-Einfluss ihren Inhaltsstoffgehalt zwischen 50 und 100 % erhöhten. Da jedoch nicht eindeutig geklärt ist, welche Substanzen in welchem Verhältnis den beiden Geweben Epidermis und Mesophyll zugeordnet werden können und ob sich dies unter dem Einfluss von UV ändert, konnten die Ergebnisse aus diesen Fluoreszenz-Messungen zu einer besseren Abschätzung der UV-Schutzkapazität der Flavonoide im Gersten-Primärblatt beitragen. Eine Minderung von Fluoreszenzsignalen bei Erhöhung des Inhaltsstoffgehaltes ist vermutlich auf eine Erhöhung der epidermalen Substanzen und nicht auf eine Erhöhung im Mesophyll zurückzuführen.

Abb. 3.17 zeigt das Ergebnis der Korrelationsanalyse der Absorption von Hege-Primärblattsegmenten und dem Gesamtgehalt an phenolischen Inhaltsstoffen. Die Korrelation zwischen den beiden Parametern war im UV-A-Bereich noch deutlich besser als bei den Roggenexperimenten, im UV-B-Bereich waren die Ergebnisse vergleichbar gut. Die Regressionskurve zeigte jedoch keinen durch den Koordinaten-Ursprung führenden Verlauf, sondern schnitt die Achse bei Werten zwischen 0.1 und 0.2.

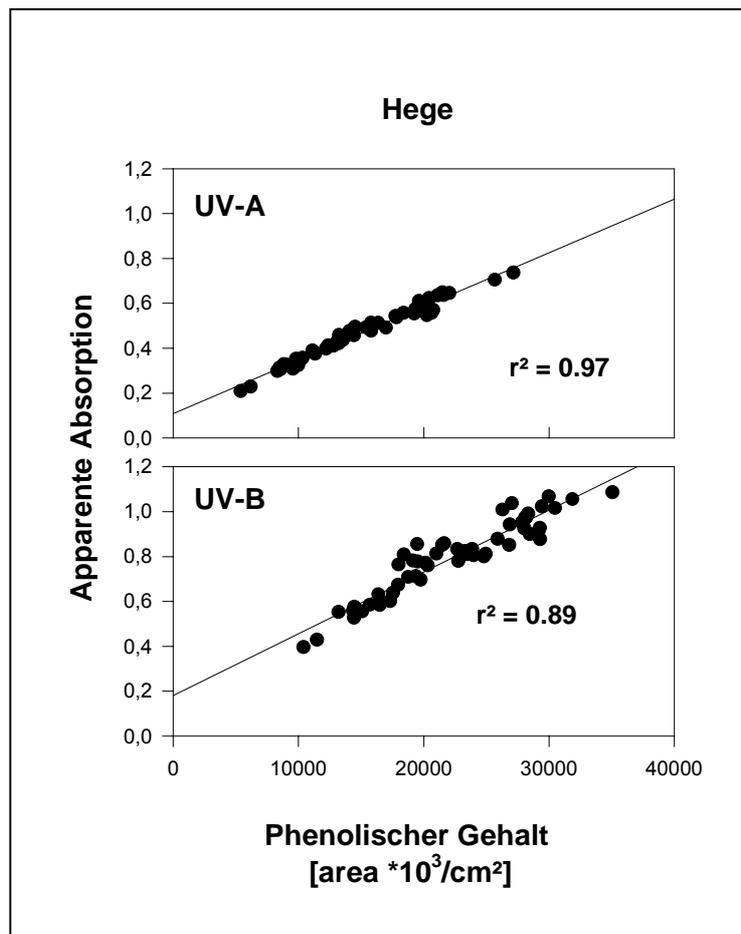


Abb. 3.17: Regressionsanalyse zwischen dem Gesamtgehalt an phenolischen Inhaltsstoffen in *Hege*-Primärblattsegmenten und der Absorption von UV-A- bzw. UV-B-Strahlung. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 366 bzw. 313 nm. Die Anzucht der Blätter erfolgte unter UV+WL-Bestrahlung.

Die Ergebnisse bei der Mutante wiesen ähnlich hohe Korrelationskoeffizienten aus und einen deutlich näher an Null liegenden Ordinaten-Schnittpunkt (Abb. 3.18). Allerdings zeigte die statistische Auswertung der Daten für die Schnittpunkte keine gesicherte Wahrscheinlichkeit ($P > 0.05$ für UV-A und UV-B), so dass der Schnittpunkt bei einer Erhöhung der Probenzahl auch höher ausfallen könnte.

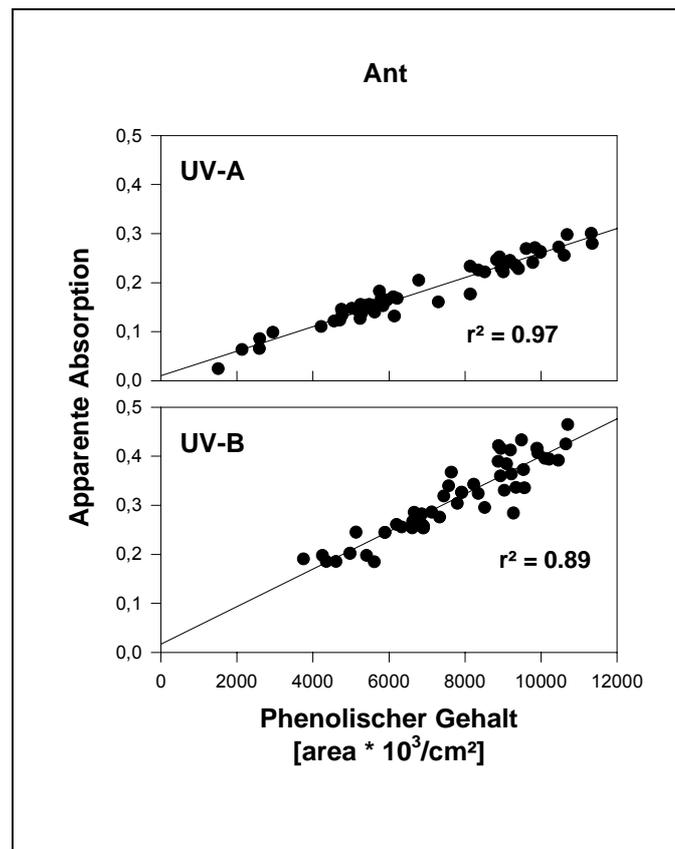


Abb. 3.18: Regressionsanalyse zwischen dem Gesamtgehalt an phenolischen Inhaltsstoffen in *ant*-Primärblattsegmenten und der Absorption von UV-A- bzw. UV-B-Strahlung. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 366 bzw. 313 nm. Die Anzucht der Blätter erfolgte unter UV+WL-Bestrahlung.

Die Daten ergänzten sich sehr gut nach einer Zusammenfassung von Muttervarietät und Mutante als eine Gruppe (Abb. 3.19). Die Korrelationskoeffizienten lagen sehr nahe 1. Die Regressionskurve der UV-A-Daten verlief nahezu durch den Ursprung, zugehörige statistische Daten wiesen die Signifikanz des Schnittpunkts jedoch als sehr unwahrscheinlich aus ($P \gg 0.05$).

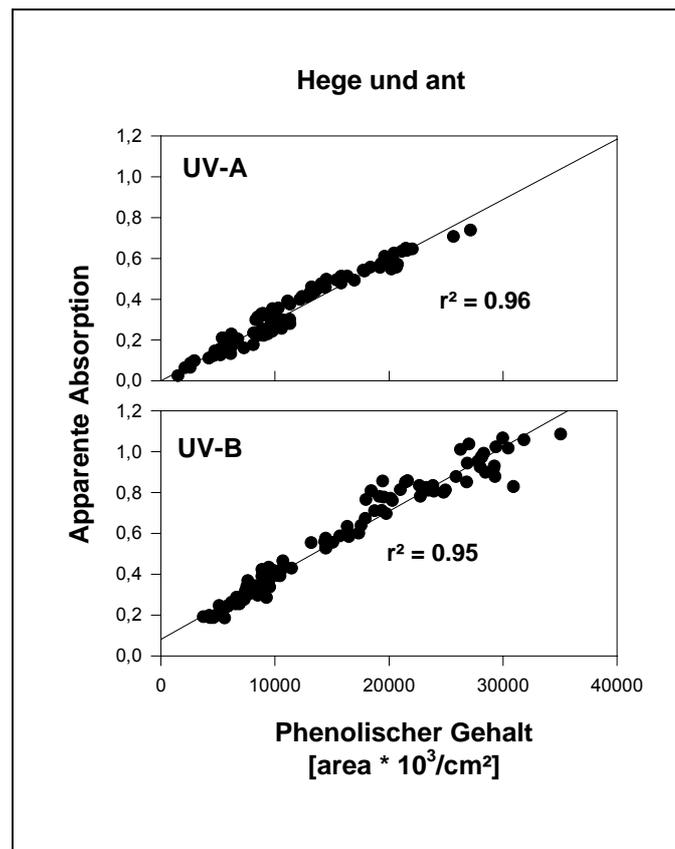


Abb. 3.19: Regressionsanalyse zwischen dem Gesamtgehalt an phenolischen Inhaltsstoffen in *ant*- und *Hege*-Primärblattsegmenten (als eine zusammengefasste Gruppe) und der Absorption von UV-A- bzw. UV-B-Strahlung. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte via HPLC bei 366 bzw. 313 nm. Die Anzucht der Blätter erfolgte unter UV+WL-Bestrahlung.

Der von Null abweichende Schnittpunkt könnte darin begründet sein, daß hier der Gesamtgehalt an UV-absorbierenden phenolischen Inhaltsstoffen erfasst war, auch die im Mesophyll lokalisierten Inhaltsstoffe. Sollten diese, ähnlich wie beim Roggen, wenig zur UV-Absorption und damit zur Abschwächung der Fluoreszenzanregung beitragen, könnte sich dies im Kurvenverlauf niederschlagen. Dennoch bestätigte sich auch in Gersten-Primärblattsegmenten der eindeutige Zusammenhang zwischen der Abschwächung einer durch UV-Strahlung verursachten Chlorophyll-Fluoreszenz bei einer Zunahme von phenolischen Inhaltsstoffen, so dass man vermuten kann, dass auch bei Gerste hauptsächlich die epidermal lokalisierten Flavonoide durch UV-Strahlung induziert werden.

Zusammenfassung: Die epidermale Absorption von UV-Strahlung wird durch phenylpropanoide Substanzen, insbesondere Flavonoide und HCA-Ester gewährleistet. Durch Messung der durch UV-A- bzw. UV-B-Strahlung verursachten Chlorophyll Fluoreszenz mit Hilfe eines PAM-Fluorometers konnte die Zunahme der epidermalen Absorption mit der Zunahme an Flavonoiden in Roggenprimärblättern eindeutig korreliert werden. Die im Roggenprimärblatt akkumulierenden epidermalen Flavonoide sind allein an der Absorption von UV-A-Strahlung beteiligt. Für die Absorption der UV-B-Strahlung spielen daneben die epidermal lokalisierten HCA-Ester eine maßgebliche Rolle. Flavonoide im Mesophyll dagegen haben keinen Einfluss auf die UV-Absorption. Eine hohe Korrelation zwischen dem Gesamtgehalt an phenylpropanen Inhaltsstoffen und der Absorption von UV-Strahlung wurde auch bei Gersten-Primärblättern festgestellt. Das legt die Vermutung nahe, dass die Zunahme der Phenylpropane hauptsächlich in der Epidermis stattfindet. Die Fluoreszenz-Messungen belegten in besonderer Weise die Annahme, dass die Gerstenmutante *ant* aufgrund ihrer Flavonoidarmut wesentlich UV-sensibler sein sollte als die Muttervarietät *Hege*. Sie wies Absorptionswerte auf, die im Vergleich zur Muttervarietät nur etwa die Hälfte betragen, d.h. einfallende UV-Strahlung wurde bei *ant* nur halb so effektiv absorbiert wie bei der Muttervarietät.

3.4 Einfluss von erhöhter UV-B-Strahlung auf das Photosystem II

Eine Charakterisierung der Chlorophyll Fluoreszenz im oberen Blattbereich 5 bis 10 d alter Gersten-Primärblätter unter den Klima- und Strahlungsbedingungen der neuen Anlage sollte zum einen einer ersten Abschätzung von eventuellen Schädigungen am Photosystem II dienen oder aber erste Hinweise auf Akklimatisierungseffekte im Verlauf der Entwicklung liefern. Darüber hinaus sollte damit eine Grundlage zur umfassenderen Beurteilung der weiteren geplanten Photosynthese-Untersuchungen geschaffen werden.

3.4.1 Effizienz des Photosystems II während der Blattentwicklung

Über einen Zeitraum von 5 bis 10 d wurden die Muttervarietät *Hege* und die Mutante *ant* den beiden Bestrahlungsprogrammen WL bzw. UV+WL ausgesetzt. Nach der täglichen Bestrahlungsphase wurden die Pflanzen 30 min dunkeladaptiert, bevor die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messung erfolgte. Es wurde durchgehend das 1 cm unterhalb der Blattspitze beginnende 1.5 cm lange Blattsegment untersucht.

Die Ergebnisse offenbarten geringe Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten (Abb. 3.20). Die jungen Blattsegmente zeigten unter WL-Bedingungen geringe F_v/F_m -Werte, beginnend bei 0.672 für *Hege*-Primärblätter und 0.665 für *ant*-Primärblätter. Offensichtlich besaßen sie in diesem jungen Stadium noch kein voll effizientes Photosystem II. Die F_v/F_m -Werte nahmen mit wachsendem Alter zu; im Alter von 8-9 d erreichte die Entwicklungskurve das Plateau bei mittleren F_v/F_m -Werten von 0.795 ± 0.011 (*ant*) bzw. 0.797 ± 0.01 (*Hege*). Damit wurde in guter Näherung der optimale Wert von 0.8 erreicht.

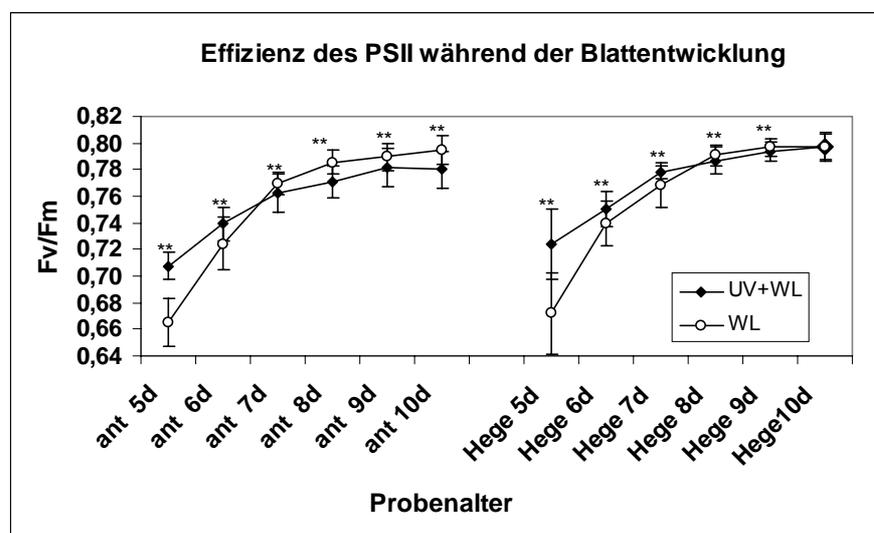


Abb. 3.20: Chlorophyll Fluoreszenz (F_v/F_m) in oberen Primärblattsegmenten von *Hege* und *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Direkter Vergleich von *Hege* bzw. *ant* bei unterschiedlicher Bestrahlung. Signifikante Unterschiede aufgrund der Bestrahlungsbedingungen sind mit ** oder * gekennzeichnet (** = $P < 0.01$, * = $P < 0.05$, $n = 30-60$).

Auch die UV+WL-bestrahlten Proben zeigten eine entwicklungsbedingte Zunahme ihres F_v/F_m -Wertes. 5 d alte *Hege*-Primärblätter wiesen einen Wert von 0.724 auf. Der Endwert am 10. Tag lag bei 0.797 ± 0.011 und entsprach damit dem Kontrollwert. Das F_v/F_m -Verhältnis lag bis zum 7. Tag über dem Niveau der Kontrollwerte; anschließend wiesen die Kontrollen statistisch signifikant leicht höhere Werte auf, die sich am letzten Tag angleichen. Die Mutante wies am 5. Tag einen F_v/F_m -Wert von 0.708 auf und erreichte am 10. Tag ein Maximum von 0.78 ± 0.014 . Hier blieb das F_v/F_m -Verhältnis nur an den ersten beiden Tagen über den Kontrollwerten; ab dem 7. Tag lagen die UV+WL-Werte signifikant unter den Kontrollwerten.

Der direkte Vergleich von Muttervarietät und Mutante (Abb. 3.21) unter beiden Bestrahlungsbedingungen zeigte Unterschiede nur bei der Bestrahlung mit UV; die WL-Kontrollen wiesen zwar innerhalb der Kurve geringe, signifikante Differenzen auf, im wesentlichen aber deckte sich der Kurvenverlauf. Die Entwicklung unter Einfluss zusätzlicher UV-Strahlung wirkte sich für die Mutante beeinträchtigender auf die Effizienz des Photosystems II aus als für die Muttervarietät und führte auch im Verlauf der Blattentwicklung nicht zu einer Angleichung auf das WL-Niveau.

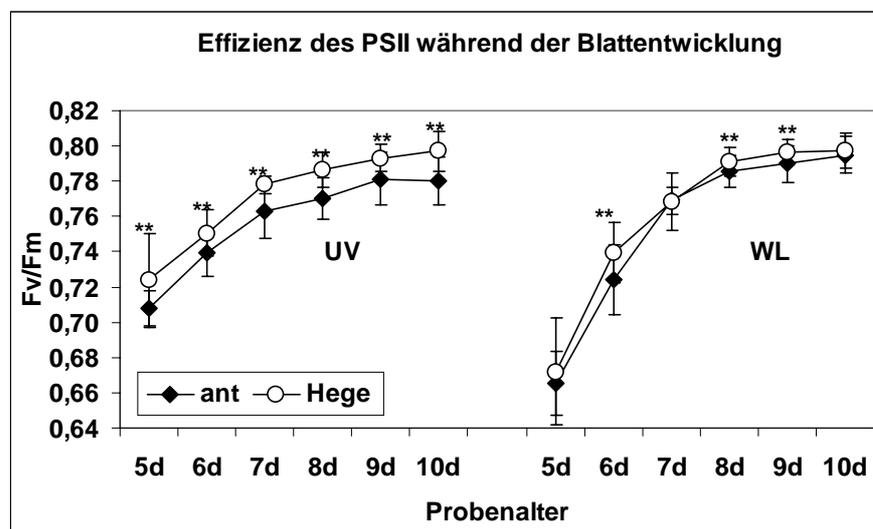


Abb. 3.21: Chlorophyll Fluoreszenz (F_v/F_m) in oberen Primärblattsegmenten von *Hege* und *ant* unter zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = *Hege*, geschlossene Symbole = *ant*). Direkter Vergleich beider Gerstenvarietäten bei jeweils gleicher Bestrahlung. Signifikante Unterschiede zwischen den Varietäten sind mit ** oder * gekennzeichnet (** = $P < 0.01$, * = $P < 0.05$, $n = 30-60$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) wieder.

Durch die statistische Auswertung der Daten wurde die Bedeutung des Blattalters für die gemessene Effizienz des Photosystems II deutlich: F_v/F_m -Werte von 0.8 und darüber wurden nur mit höherem Blattalter erreicht, unabhängig von der Tatsache, dass immer der entwicklungsphysiologisch älteste Blattteil untersucht wurde. Auch eine Verlängerung der Dunkeladaptationsphase führte zu keiner Erhöhung der Werte, so dass man davon ausgehen konnte, dass sich alle Reaktionszentren im "offenen Zustand" befanden. Die Unterschiede in den F_v/F_m -Werten von einem Blattalter zum nächsten waren durch hohe Signifikanz-Niveaus ($P \ll 0.01$) gekennzeichnet (nicht abgebildet). Lediglich zwischen den Mittelwerten von *ant* UV 9 d und 10 d bzw. *Hege* 9 d WL und 10 d WL konnte kein Unterschied festgestellt werden.

3.4.2 Untersuchung der quenching-Parameter qP und qN

Die Untersuchung der Fluoreszenz-Parameter zum photochemischen und nicht-photochemischen quenching wurde in einer zweiten Versuchsreihe durchgeführt. Die Versuchs- und Messbedingungen waren geringfügig geändert: Die Messungen wurden nicht im Anschluss an die tägliche Bestrahlungsphase (UV+WL bzw. WL) vorgenommen, sondern während dieser Phase durchgeführt. Zudem wurden die Messungen mit einem Mini-PAM durchgeführt (s. Material und Methoden, Kapitel 2.2.2.5.2.). Ergänzend zu der 1. Versuchsreihe wurden 15 d alte Blattsegmente in die Untersuchungen mit einbezogen, um zu überprüfen, ob entwicklungsphysiologische Prozesse eventuelle UV-Effekte in den jüngeren Blättern maskieren. Auf die Untersuchung der 5 d alten Blattsegmente wurde hier verzichtet.

Die in dieser 2. Versuchsreihe ermittelten F_v/F_m -Verhältnisse unterschieden sich an einigen Stellen von denen der 1. Versuchsreihe (Abb. 3.22). 7 d und 10 d alte Pflanzen zeigten in beiden Untersuchungen signifikant verschiedene F_v/F_m -Werte ($P \ll 0.01$, Ausnahme *Hege* UV+WL 10 d). Die jüngeren Pflanzen zeigten niedrigere Werte, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen *ant* UV+WL (0.748) und *ant* WL (0.751) nachzuweisen war. Zwischen den beiden *Hege*-Anzuchten gab es einen leichten, nicht-signifikanten Unterschied (WL 0.755, UV+WL 0.762), wobei auch hier eine eher förderliche Tendenz unter UV-Einfluss zu beobachten war. Bei den 10 d alten Pflanzen zeigten sich zwischen beiden Anzuchten sowohl

bei der Muttervarietät als auch bei der Mutante Unterschiede auf unterschiedlichem Niveau (*ant* WL 0.787, *ant* UV+WL 0.794, $P \ll 0.01$; *Hege* WL 0.79, *Hege* UV+WL 0.794, $P < 0.05$). Unter gleichen Bestrahlungsbedingungen dagegen zeigte sich kein Unterschied zwischen Muttervarietät und Mutante. Mit dem Erreichen des Alters von 15 d traten keine Unterschiede mehr auf; die Effizienz des Photosystems II erreichte unter allen Bedingungen ein Niveau von 0,791 bis 0.793. Auch hier bestätigte sich die Altersabhängigkeit der Fluoreszenz-Daten. 7 d alte Primärblätter wiesen gegenüber den entsprechenden 10 d alten Blattproben signifikant niedrigere F_v/F_m -Werte auf ($P \ll 0.01$; nicht abgebildet). Dieser Unterschied hob sich von den 10 d alten zu den 15 d alten Blattsegmenten bis auf eine Ausnahme (*ant* WL, $P < 0,05$) auf. Die Unterschiede in den F_v/F_m -Werten 7 d alter Blattsegmente zwischen der 1. und der 2. Versuchsreihe deutete darauf hin, dass das gleiche Blattalter nicht unbedingt mit dem physiologischen Alter der Blattsegmente übereinstimmte.

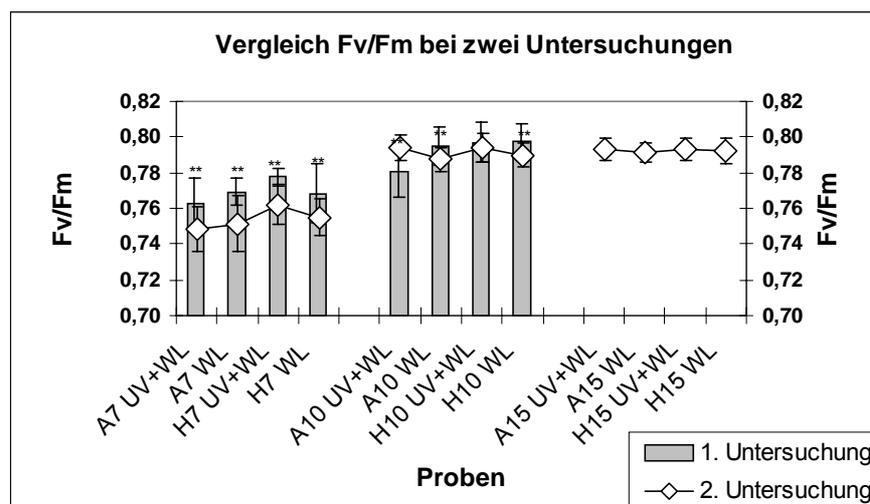


Abb. 3.22: Die Bestimmung des F_v/F_m -Wertes bei zwei Versuchsreihen mit identischen Versuchsbedingungen führte zu signifikanten Unterschieden bei jüngeren Altersstadien (** = $P \ll 0.01$, $n = 17-34$). Insbesondere die 7d alten Primärblattsegmente wiesen in beiden Versuchsreihen unterschiedliche mittlere F_v/F_m -Werte auf. 7, 10, 15 = Alter in Tagen. H = *Hege*, A = *ant*.

Die Untersuchungen zum Fluoreszenz-quenching wurden an den drei Altersstadien 7 d, 10 d und 15 d vorgenommen. Die Messdauer betrug 304 s. In den Tab. 3.1 und 3.2 sind die Ergebnisse für die 7 d alten Pflanzen im Zeitraum von 180 bis 304 s zusammengefasst. In diesem Zeitraum erreichten die Kurven ein Plateau, welches zur Auswertung der Daten herangezogen wurde:

	ant 7d - WL			ant 7d - UV+WL		
s	qN	qP	$\Delta F_m'$	qN	qP	$\Delta F_m'$
180	0.441 ± 0.041	0.915 ± 0.018	0.574 ± 0.023	0.419 ± 0.033	0.885 ± 0.013	0.562 ± 0.020
192	0.435 ± 0.025	0.914 ± 0.013	0.576 ± 0.023	0.418 ± 0.029	0.888 ± 0.014	0.563 ± 0.019
203	0.433 ± 0.024	0.916 ± 0.013	0.578 ± 0.024	0.417 ± 0.025	0.887 ± 0.014	0.564 ± 0.019
214	0.432 ± 0.024	0.920 ± 0.013	0.581 ± 0.023	0.417 ± 0.024	0.889 ± 0.015	0.565 ± 0.019
225	0.433 ± 0.023	0.922 ± 0.014	0.582 ± 0.023	0.415 ± 0.022	0.892 ± 0.017	0.567 ± 0.019
237	0.434 ± 0.023	0.924 ± 0.016	0.583 ± 0.024	0.414 ± 0.022	0.894 ± 0.016	0.569 ± 0.020
248	0.434 ± 0.021	0.924 ± 0.015	0.583 ± 0.026	0.415 ± 0.023	0.897 ± 0.017	0.570 ± 0.019
259	0.434 ± 0.022	0.927 ± 0.015	0.585 ± 0.024	0.414 ± 0.020	0.899 ± 0.017	0.572 ± 0.020
271	0.433 ± 0.020	0.927 ± 0.016	0.585 ± 0.025	0.413 ± 0.020	0.901 ± 0.015	0.573 ± 0.020
282	0.433 ± 0.020	0.931 ± 0.016	0.588 ± 0.026	0.413 ± 0.021	0.901 ± 0.017	0.573 ± 0.020
293	0.432 ± 0.018	0.930 ± 0.015	0.588 ± 0.025	0.416 ± 0.023	0.901 ± 0.015	0.573 ± 0.020
304	0.432** ± 0.018	0.930** ± 0.016	0.587 ± 0.026	0.413 ± 0.018	0.901 ± 0.015	0.575 ± 0.017

Tab. 3.1: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz in oberen Primärblattsegmenten von 7 d alten *ant*-Primärblattsegmenten unter WL- und UV+WL-Anzucht im Zeitraum von 180 bis 304 s Messzeit. Die Endwerte sind fett wiedergegeben. * = P < 0.05, ** = P < 0.01 geben das Signifikanz-Niveau für die Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten an.

Die 7 d alte Mutante *ant* zeigte sowohl unter reiner WL- als auch unter UV+WL-Anzucht gleiche Kurvenverläufe für qN, qP und Yield (= $\Delta F/F_m'$) über den Beobachtungszeitraum von 5 min. Die beiden Yield-Kurven, die ein Maß für die effektive Quantenausbeute darstellen (Genty et al. 1989), wiesen statistisch keine signifikanten Unterschiede auf (0.587 und 0.575 für WL bzw. UV+WL). Dies galt nicht für die beiden quenching-Kurven, auch wenn die Unterschiede sehr gering waren. So zeigte die 7 d alte Mutante ein leicht erhöhtes

photochemisches quenching unter WL-Bedingungen ($qP = 0.930$ vs. 0.901 , $P < 0.01$), aber auch ein leicht erhöhtes nicht-photochemisches quenching ($qN = 0.432$ vs. 0.413 , $P < 0.01$).

s	Hege 7d - WL			Hege 7d - UV+WL		
	qN	qP	$\Delta Fm'$	qN	qP	$\Delta Fm'$
180	0.465 ± 0.041	0.930 ± 0.019	0.578 ± 0.013	0.404 ± 0.020	0.902 ± 0.020	0.586 ± 0.015
192	0.460 ± 0.037	0.931 ± 0.017	0.581 ± 0.012	0.404 ± 0.017	0.904 ± 0.019	0.588 ± 0.016
203	0.456 ± 0.036	0.934 ± 0.015	0.584 ± 0.013	0.404 ± 0.016	0.905 ± 0.020	0.590 ± 0.016
214	0.452 ± 0.033	0.936 ± 0.014	0.587 ± 0.012	0.405 ± 0.015	0.908 ± 0.022	0.592 ± 0.015
225	0.450 ± 0.030	0.939 ± 0.014	0.590 ± 0.012	0.405 ± 0.015	0.910 ± 0.020	0.593 ± 0.015
237	0.447 ± 0.030	0.941 ± 0.014	0.593 ± 0.011	0.403 ± 0.015	0.912 ± 0.021	0.595 ± 0.015
248	0.445 ± 0.028	0.942 ± 0.012	0.595 ± 0.012	0.403 ± 0.014	0.914 ± 0.022	0.596 ± 0.015
259	0.441 ± 0.028	0.943 ± 0.012	0.596 ± 0.012	0.404 ± 0.015	0.915 ± 0.019	0.597 ± 0.014
271	0.441 ± 0.025	0.943 ± 0.012	0.596 ± 0.012	0.403 ± 0.015	0.918 ± 0.018	0.598 ± 0.015
282	0.441 ± 0.025	0.944 ± 0.012	0.598 ± 0.011	0.401 ± 0.016	0.920 ± 0.018	0.600 ± 0.014
293	0.441 ± 0.023	0.944 ± 0.015	0.598 ± 0.011	0.403 ± 0.015	0.920 ± 0.018	0.600 ± 0.013
304	$0.439^{**} \pm 0.026$	$0.946^{**} \pm 0.010$	0.600 ± 0.012	0.403 ± 0.015	0.920 ± 0.017	0.599 ± 0.013

Tab. 3.2: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz in oberen Primärblattsegmenten von 7 d alten *Hege*-Primärblattsegmenten unter WL- und UV+WL-Anzucht im Zeitraum von 180 bis 304 s Messzeit. Die Endwerte sind fett wiedergegeben. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ geben das Signifikanz-Niveau für die Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten an.

Auch die Muttervarietät *Hege* wies annähernd gleiche Kurvenverläufe bei der Yield- und der qP-Kurve auf, während die qN-Kurven nach ca. 50 s deutlicher voneinander abwichen und sich im späteren Verlauf wieder angleichen. Die Yield-Kurven zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede (0.6 bzw. 0.599 für beide Anzuchten), im Gegensatz zu den quenching-Kurven. Auch hier fand man bei der WL-Anzucht ein höheres qP (0.946 vs. 0.920, $P < 0.01$) und qN (0.439 vs. 0.403, $P < 0.01$) als bei der UV+WL-Anzucht.

Der Vergleich zwischen *ant* und *Hege* bei gleicher Bestrahlung zeigte eine leicht höhere effektive Quantenausbeute bei *Hege* unter UV+WL-Bedingungen, da der Yield-Wert im

steady-state-Bereich der Photosynthese etwas höher lag als bei *ant* (0.599 vs. 0.575, $P < 0.01$). Im Gegensatz dazu gab es bei der WL-Anzucht kaum Unterschiede. *Hege* zeigte unter WL-Bedingungen geringfügig höhere qP- (0.946 vs. 0.930, $P < 0.01$) und qN-Werte (0.439 vs. 0.432, $P < 0.01$). Unter UV+WL-Bedingungen erwiesen sich die geringen Unterschiede im photochemischen quenching als signifikant (0.920 bei *Hege* vs. 0.901 bei *ant*, $P < 0.01$), nicht jedoch beim nicht-photochemischen quenching.

Die 10 d alten Pflanzen vermittelten ein ähnliches Bild:

s	ant 10d - WL			ant 10d - UV+WL		
	qN	qP	$\Delta Fm'$	qN	qP	$\Delta Fm'$
180	0.367 ± 0.027	0.892 ± 0.015	0.637 ± 0.012	0.361 ± 0.026	0.872 ± 0.015	0.620 ± 0.011
192	0.373 ± 0.026	0.902 ± 0.018	0.640 ± 0.011	0.365 ± 0.026	0.877 ± 0.017	0.623 ± 0.011
203	0.378 ± 0.026	0.907 ± 0.011	0.640 ± 0.009	0.370 ± 0.025	0.883 ± 0.017	0.626 ± 0.011
214	0.382 ± 0.027	0.909 ± 0.013	0.640 ± 0.009	0.373 ± 0.026	0.887 ± 0.018	0.628 ± 0.012
225	0.385 ± 0.027	0.914 ± 0.012	0.642 ± 0.007	0.377 ± 0.025	0.893 ± 0.017	0.630 ± 0.011
237	0.390 ± 0.028	0.916 ± 0.009	0.641 ± 0.007	0.382 ± 0.026	0.896 ± 0.016	0.631 ± 0.011
248	0.394 ± 0.029	0.918 ± 0.010	0.640 ± 0.007	0.386 ± 0.023	0.899 ± 0.015	0.632 ± 0.010
259	0.397 ± 0.027	0.922 ± 0.014	0.641 ± 0.007	0.389 ± 0.023	0.901 ± 0.013	0.632 ± 0.009
271	0.398 ± 0.029	0.922 ± 0.011	0.640 ± 0.007	0.393 ± 0.024	0.903 ± 0.013	0.633 ± 0.009
282	0.402 ± 0.029	0.922 ± 0.010	0.640 ± 0.006	0.396 ± 0.024	0.903 ± 0.013	0.632 ± 0.009
293	0.404 ± 0.029	0.923 ± 0.011	0.640 ± 0.006	0.399 ± 0.023	0.904 ± 0.012	0.632 ± 0.008
304	0.407 ± 0.028	0.925** ± 0.012	0.640** ± 0.005	0.400 ± 0.023	0.903 ± 0.011	0.631 ± 0.008

Tab. 3.3: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz in oberen Primärblattsegmenten von 10 d alten *ant*-Primärblattsegmenten unter WL- und UV+WL-Anzucht im Zeitraum von 180 bis 304 s Messzeit. Die Endwerte sind fett wiedergegeben. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ geben das Signifikanz-Niveau für die Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten an.

Die Mutante wies einen sehr geringen Unterschied bei den Yield-Werten auf, der unter WL-Bedingungen leicht höher war (0.640 vs. 0.631, $P < 0.01$; Tab.3.3). Dies deckte sich mit den leicht höheren qP-Werten (0.925 vs. 0.903, $P < 0.01$), während sich qN zumindest in der

steady-state-Phase nicht unterschied (0.407 für WL vs. 0.400 für UV+WL). Man sah jedoch in der Anfangsphase einen deutlich unterschiedlichen Kurvenverlauf (Abb. 3.23), wonach die UV+WL-bestrahlte Pflanze in den ersten 150 Sekunden der Photosynthese einen wesentlich höheren nicht-photochemischen quenching aufwies. Zum Ende der Beobachtungszeit waren die Unterschiede aufgehoben.

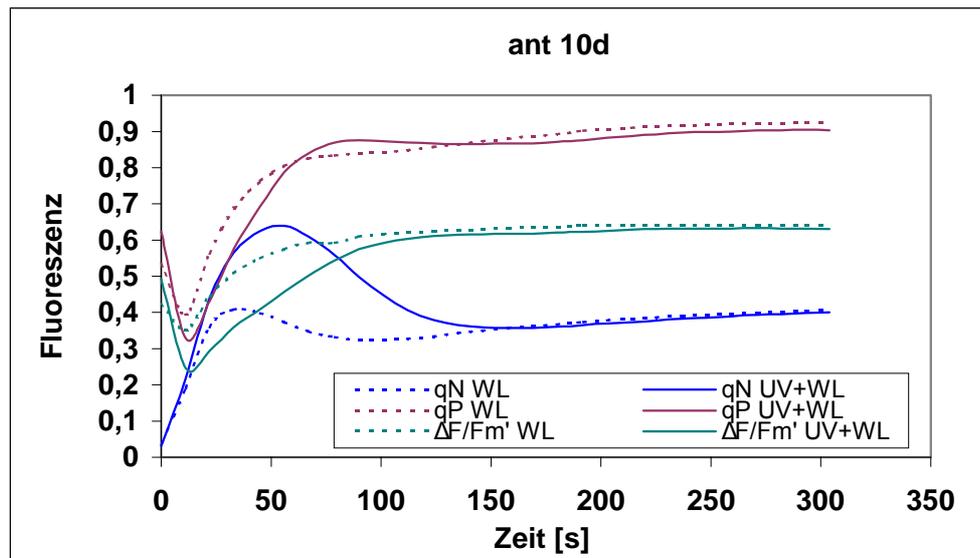


Abb. 3.23: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz ($\Delta F/F_m'$ = Yield, qP , qN) in oberen Primärblattsegmenten von 10 d alten *ant*-Primärblattsegmenten unter zwei Bestrahlungsbedingungen (---- = WL-Anzucht, — = UV+WL-Anzucht).

Die Muttervarietät *Hege* zeigte bei dem Vergleich zwischen den beiden Bestrahlungsbedingungen kaum ein anderes Bild (Tab.3.4). Die effektive Quantenausbeute lag unter WL-Bedingungen geringfügig höher (0.636 vs. 0.629, $P < 0.01$), ebenso wie die qP -Kurven (0.908 vs. 0.898, $P < 0.05$). Die beiden qN -Kurven zeigten einen vergleichbaren unterschiedlichen Verlauf wie bei der Mutante und waren im steady-state-Bereich ohne Differenzen (0.397 für WL vs. 0.390 für UV+WL).

s	Hege 10d - WL			Hege 10d - UV+WL		
	qN	qP	$\Delta Fm'$	qN	qP	$\Delta Fm'$
180	0.364 ± 0.032	0.876 ± 0.018	0.629 ± 0.013	0.353 ± 0.025	0.851 ± 0.017	0,603 ± 0.027
192	0.369 ± 0.032	0.883 ± 0.018	0.632 ± 0.010	0.358 ± 0.025	0.858 ± 0.016	0,608 ± 0.021
203	0.374 ± 0.032	0.888 ± 0.013	0.633 ± 0.009	0.363 ± 0.026	0.866 ± 0.016	0,613 ± 0.018
214	0.378 ± 0.033	0.895 ± 0.016	0.635 ± 0.009	0.367 ± 0.025	0.873 ± 0.014	0,618 ± 0.015
225	0.380 ± 0.033	0.898 ± 0.013	0.636 ± 0.008	0.373 ± 0.023	0.880 ± 0.014	0,621 ± 0.013
237	0.383 ± 0.033	0.900 ± 0.012	0.637 ± 0.007	0.376 ± 0.026	0.885 ± 0.014	0,624 ± 0.012
248	0.387 ± 0.034	0.903 ± 0.012	0.637 ± 0.007	0.378 ± 0.026	0.890 ± 0.015	0,627 ± 0.012
259	0.390 ± 0.035	0.905 ± 0.013	0.637 ± 0.008	0.381 ± 0.024	0.893 ± 0.014	0,628 ± 0.011
271	0.394 ± 0.035	0.907 ± 0.010	0.636 ± 0.007	0.384 ± 0.024	0.894 ± 0.013	0,628 ± 0.010
282	0.397 ± 0.035	0.907 ± 0.013	0.636 ± 0.007	0.384 ± 0.025	0.895 ± 0.013	0,629 ± 0.010
293	0.398 ± 0.035	0.908 ± 0.012	0.636 ± 0.006	0.386 ± 0.026	0.897 ± 0.014	0,630 ± 0.009
304	0.397 ± 0.030	0.908* ± 0.012	0.636** ± 0.007	0.390 ± 0.029	0.898 ± 0.014	0,629 ± 0.009

Tab. 3.4: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz in oberen Primärblattsegmenten von 10 d alten *Hege*-Primärblattsegmenten unter WL- und UV+WL-Anzucht im Zeitraum von 180 bis 304 s Messzeit. Die Endwerte sind fett wiedergegeben. * = P < 0.05, ** = P < 0.01 geben das Signifikanz-Niveau für die Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten an.

Der Vergleich der Mutter und der Mutante bei gleicher Bestrahlung zeigte unter WL-Bedingungen eine statistische Signifikanz (P < 0.05) in den kaum differierenden Yield-Werten (0.640 bei *ant* bzw. 0.636 bei *Hege*) und in den beiden qP-Werten (0.925 für *ant* vs. 0.908 für *Hege*, P < 0.01). Unter UV-Bedingungen zeigte sich keine solche statistische Signifikanz. Weder die qN-Kurve unter gleichen Bestrahlungsbedingungen noch alle anderen Kurven unter UV+WL-Bedingungen wichen statistisch gesehen signifikant voneinander ab.

15 d alte *Hege*- und *ant*-Primärblattsegmente zeigten sowohl unter UV-Einfluss als auch ohne keine signifikanten Unterschiede in der effektiven Quantenausbeute (Tab. 3.5 und 3.6).

Die Kurvenverläufe unterschieden sich im ersten Teil der Kurve geringfügig, erreichten aber die gleichen steady-state-level (WL: 0.625 bei *Hege* vs. 0.630 bei *ant*, UV+WL: 0.632 bei *Hege* vs. 0.637 bei *ant*). Die quenching-Kurven zeigten bei *Hege* in beiden Fällen leichte signifikante Unterschiede. Im Gegensatz zu den jüngeren Blattstadien lagen die UV+WL-Werte geringfügig über den WL-Werten (qP: 0.898 vs. 0.884, P<0.05; qN: 0.377 vs. 0.351, P<0.01). Bei der Mutante war das nicht-photochemische quenching ohne Differenzen (0.374 für UV+WL vs. 0.361 für WL), nicht aber der qP-Wert (0.903 für UV+WL vs. 0.893 für WL, P<0.05). Der Verlauf der Kurven zum nicht-photochemischen quenching unterschieden sich wie bei den 10 d alten Pflanzen sehr deutlich zu Beginn der Kurve, im steady-state-Bereich aber nur unwesentlich.

	ant 15d - WL			ant 15d - UV+WL		
s	qN	qP	$\Delta Fm'$	qN	qP	$\Delta Fm'$
180	0.316 ± 0.025	0.860 ± 0.022	0.616 ± 0.016	0.338 ± 0.024	0.877 ± 0.018	0.629 ± 0.014
192	0.322 ± 0.024	0.864 ± 0.022	0.619 ± 0.015	0.342 ± 0.023	0.883 ± 0.019	0.632 ± 0.016
203	0.328 ± 0.027	0.869 ± 0.020	0.621 ± 0.014	0.348 ± 0.022	0.889 ± 0.017	0.635 ± 0.014
214	0.332 ± 0.028	0.873 ± 0.019	0.623 ± 0.013	0.351 ± 0.023	0.892 ± 0.015	0.636 ± 0.012
225	0.335 ± 0.026	0.876 ± 0.019	0.624 ± 0.014	0.356 ± 0.024	0.895 ± 0.016	0.637 ± 0.014
237	0.340 ± 0.030	0.882 ± 0.017	0.627 ± 0.012	0.360 ± 0.024	0.895 ± 0.015	0.636 ± 0.013
248	0.343 ± 0.029	0.882 ± 0.017	0.627 ± 0.012	0.363 ± 0.024	0.897 ± 0.015	0.636 ± 0.013
259	0.347 ± 0.029	0.886 ± 0.017	0.628 ± 0.013	0.366 ± 0.025	0.899 ± 0.016	0.637 ± 0.013
271	0.350 ± 0.030	0.887 ± 0.016	0.629 ± 0.013	0.367 ± 0.026	0.900 ± 0.016	0.637 ± 0.013
282	0.354 ± 0.030	0.889 ± 0.015	0.629 ± 0.013	0.369 ± 0.025	0.900 ± 0.017	0.636 ± 0.013
293	0.357 ± 0.029	0.889 ± 0.016	0.628 ± 0.012	0.371 ± 0.025	0.900 ± 0.016	0.636 ± 0.013
304	0.361 ± 0.029	0.893* ± 0.020	0.630 ± 0.015	0.374 ± 0.023	0.903 ± 0.015	0.637 ± 0.012

Tab. 3.5: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz in oberen Primärblattsegmenten von 15 d alten *ant*-Primärblattsegmenten unter WL- und UV+WL-Anzucht im Zeitraum von 180 bis 304 s Messzeit. Die Endwerte sind fett wiedergegeben. * = P < 0.05, ** = P < 0.01 geben das Signifikanz-Niveau für die Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten an.

s	Hege 15d - WL			Hege 15d - UV+WL		
	qN	qP	$\Delta F_m'$	qN	qP	$\Delta F_m'$
180	0.310 ± 0.027	0.859 ± 0.029	0.617 ± 0.019	0.352 ± 0.065	0.867 ± 0.024	0.619 ± 0.021
192	0.316 ± 0.027	0.865 ± 0.028	0.620 ± 0.017	0.354 ± 0.058	0.874 ± 0.023	0.629 ± 0.015
203	0.319 ± 0.029	0.869 ± 0.026	0.623 ± 0.016	0.355 ± 0.050	0.878 ± 0.021	0.624 ± 0.018
214	0.325 ± 0.027	0.872 ± 0.026	0.623 ± 0.016	0.359 ± 0.043	0.884 ± 0.022	0.620 ± 0.018
225	0.329 ± 0.026	0.874 ± 0.026	0.623 ± 0.015	0.364 ± 0.042	0.887 ± 0.019	0.625 ± 0.016
237	0.333 ± 0.025	0.876 ± 0.026	0.623 ± 0.015	0.366 ± 0.039	0.889 ± 0.019	0.627 ± 0.015
248	0.336 ± 0.026	0.876 ± 0.025	0.623 ± 0.014	0.369 ± 0.037	0.891 ± 0.019	0.629 ± 0.015
259	0.340 ± 0.026	0.878 ± 0.025	0.624 ± 0.014	0.370 ± 0.033	0.889 ± 0.018	0.627 ± 0.014
271	0.342 ± 0.026	0.880 ± 0.024	0.624 ± 0.013	0.371 ± 0.031	0.892 ± 0.018	0.629 ± 0.013
282	0.345 ± 0.026	0.881 ± 0.024	0.625 ± 0.013	0.373 ± 0.028	0.895 ± 0.018	0.630 ± 0.011
293	0.348 ± 0.026	0.882 ± 0.024	0.624 ± 0.013	0.373 ± 0.026	0.896 ± 0.018	0.631 ± 0.013
304	0.351** ± 0.026	0.884* ± 0.023	0.625 ± 0.012	0.377 ± 0.023	0.898 ± 0.018	0.632 ± 0.011

Tab. 3.6: Vergleich verschiedener Parameter der Chlorophyll Fluoreszenz in oberen Primärblattsegmenten von 15 d alten *Hege*-Primärblattsegmenten unter WL- und UV+WL-Anzucht im Zeitraum von 180 bis 304 s Messzeit. Die Endwerte sind fett wiedergegeben. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ geben das Signifikanz-Niveau für die Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten an.

Der direkte Vergleich von *ant* und *Hege* bei gleicher Bestrahlung zeigte keine Unterschiede in den Yield-Kurven. Die quenching-Kurven lagen im späten Bereich alle auf gleichem Niveau, sie unterschieden sich nur in den frühen Phasen, aber auch hier nicht besonders auffällig.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Unterschiede zwischen der Muttervarietät *Hege* und der Mutante *ant* zwar in vielen Fällen signifikant, aber sehr gering waren. Stärker bestätigte sich jedoch die Tendenz einer Veränderung mit zunehmendem Blattalter. Im direkten Vergleich wurden diese Unterschiede deutlich:

Sowohl bei *ant* als auch bei *Hege* lagen die $\Delta F/F_m'$ -Kurven für die 7 d alten Pflanzen im steady-state-Bereich unterhalb derer für die älteren Pflanzen. Die entsprechenden Werte (*ant*

WL: 0,587, *ant* UV+WL: 0,575, *Hege* WL: 0,600, *Hege* UV+WL: 0,599) unterschieden sich in allen Fällen signifikant ($P < 0.01$) von den Werten für 10 d (*ant* WL: 0,640, *ant* UV+WL: 0,631, *Hege* WL: 0,636, *Hege* UV+WL: 0,629) und 15 d alte Pflanzen (*ant* WL: 0,630, *ant* UV+WL: 0,637, *Hege* WL: 0,625, *Hege* UV+WL: 0,632). Diese wiesen in allen Fällen fast identische Kurvenverläufe auf mit sehr geringfügigen Unterschieden, die jedoch bis auf *Hege* UV+WL auf unterschiedlichem Niveau statistisch signifikant waren. Zusätzliches UV führte offensichtlich nicht zu Einbußen in der photosynthetischen Leistung.

Die quenching-Kurven zeigten für beide Varietäten unter WL-Bedingungen ähnliche Kurvenverläufe. Je jünger die Blätter, desto höher war das nicht-photochemische quenching im steady-state-Zustand der Photosynthese (*ant*: 7 d: 0,432, 10 d: 0,407; 15 d: 0,361; *Hege*: 7 d: 0,439, 10 d: 0,397, 15 d: 0,351). Dies galt auch unter zusätzlicher UV-Belastung (*ant*: 7 d: 0,413, 10 d: 0,400; 15 d: 0,374; *Hege*: 7 d: 0,403, 10 d: 0,390, 15 d: 0,377). Die 7 d alten *ant* und *Hege*-Pflanzen wiesen im frühen Kurvenverlauf allerdings ein deutlich höheres Maximum auf als die älteren Pflanzen.

Hinsichtlich des photochemischen quenchings zeigte sich eine leichte Tendenz dahingehend, dass unter WL-Bedingungen der qP-Wert mit dem Blattalter fiel; bei *Hege* war diese Tendenz ausgeprägter (*ant*: 7 d: 0,930, 10 d: 0,925; 15 d: 0,893; *Hege*: 7 d: 0,946, 10 d: 0,908, 15 d: 0,884). Unter UV-belastenden Bedingungen zeigten sich bei *ant* keine Unterschiede im Blattalter; bei *Hege* war die Differenz zwischen den ganz jungen Blättern und den älteren ausgeprägter als bei *ant* (*ant*: 7 d: 0,901, 10 d: 0,903; 15 d: 0,903; *Hege*: 7 d: 0,920, 10 d: 0,898, 15 d: 0,898).

Zusammenfassung: Die Untersuchung zur Effizienz des Photosystems II mit Hilfe des Parameters F_v/F_m lieferte in zwei Versuchsreihen nicht ganz deckungsgleiche Ergebnisse. In einer ersten Charakterisierung dieses Parameters im Lauf der Blattentwicklung vom 5. bis zum 10. Tag offenbarte sich bei der Mutante unter dem Einfluss zusätzlicher UV-Strahlung eine Beeinträchtigung des Photosystems II. Dieser Einfluss war bei *Hege* nicht feststellbar. In einer zweiten Versuchsserie wurden diese Ergebnisse nicht bestätigt; die 10 d alte Mutante wies keinen Unterschied zwischen WL- und UV+WL-Anzucht auf. 15 d alte Primärblattsegmente wiesen ebenfalls keine Unterschiede auf. Unabhängig von der

Bestrahlung erwies sich aber das Blattalter selbst als einflussreicher Faktor bezüglich des Parameters F_v/F_m . Erst im Alter von 8-9 d konnte unter WL-Bedingungen ein F_v/F_m -Wert von annähernd 0.8 gemessen werden, jüngere Blätter erreichten diesen Wert nicht. Die Untersuchungen zum Fluoreszenz quenching (qP und qN) und zur Effizienz der Quantenausbeute ($\Delta F/F_m'$) offenbarten bei allen drei untersuchten Altersstufen vernachlässigbar geringe, wenn auch in vielen Fällen statistisch signifikante Unterschiede zwischen der WL- und der UV+WL-Anzucht. Dies galt für *Hege* und *ant* gleichermaßen. Auch der direkte Vergleich beider Varietäten unter gleichen Bestrahlungsbedingungen ließ keine auffälligen Differenzen im steady-state-Bereich der Photosynthese erkennen. Abhängig vom Blattalter ließen sich deutlichere Unterschiede festmachen: Die Effizienz der Quantenausbeute nahm mit zunehmendem Alter zu, das nicht-photochemische quenching nahm ebenso wie das photochemische quenching tendenziell ab.

3.4.3 D1-Gehalt

Parallel zu den Fluoreszenz-Messungen wurde bei einem Teil der Proben der D1-Proteingehalt einzelner Blattsegmente auf der Grundlage von Immunoblots untersucht. Insgesamt wurden je 7 Blattsegmente pro Varietät, Altersstufe und Bestrahlungsbedingung als Einzelproben untersucht. Die Ausbeute an Thylakoidsuspension bei diesen Einzelblattsegmenten war so gering (50 μ l), dass die Probenmenge eben ausreichte für die notwendigen Untersuchungen und daher keine Doppelproben auf ein Gel aufgetragen werden konnten. Der Grund hierfür war, dass zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den beiden Gerstevarietäten zwei Vergleichsebenen berücksichtigt werden mussten:

- a) der Vergleich beider Gerstevarietäten unter gleichen Bestrahlungsbedingungen, d.h. ein Vergleich *Hege* WL vs. *ant* WL bzw. *Hege* UV+WL vs. *ant* UV+WL;
- b) der Vergleich von *Hege* und *ant* bei unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen, d.h. ein Vergleich *Hege* WL vs. *Hege* UV+WL bzw. *ant* WL vs. *ant* UV+WL. Auf diese Weise wurden identische Proben auf zwei Gele aufgetragen. Damit war eine relative Beurteilung der Signale untereinander und auch im Vergleich mit dem Parallelblot möglich. Darüber hinaus wurden pro Blot Proben aufgetragen, die parallel aufgearbeitet waren: einmal 3 Einzelproben und einmal 4 Einzelproben.

Trotz dieser eingebauten Kontrollen erwies sich eine Interpretation der Daten nach Auswertung der Densitometrie als schwierig, da sowohl die Signale der verschiedenen Einzelproben als auch die Signale der auf verschiedenen Blots aufgetragenen identischen Proben stark differierten. Anhand dieser Auswertung war nicht auszumachen, ob die Unterschiede in der Signalstärke tatsächlich auf Unterschieden im D1-Gehalt der einzelnen Blattsegmente, d.h. auf der Variabilität des Probenmaterials oder auf methodischen Fehlern während der Probenaufarbeitung beruhte. Daher wurden die Signale der parallel auf einem Blot aufgetragenen Proben gemittelt, die Standardabweichung ermittelt und die WL-Proben gleich 100% gesetzt.

In Abb. 3.24 wurden die Ergebnisse aus den beiden Blot-Reihen gegenübergestellt. Anhand der Fehlerbalken wird die Variabilität der ermittelten D1-Signale deutlich. Die Ergebnisse aus den Blots mit 3 parallelen Proben spiegelten ein etwas einheitlicheres Bild wieder, dennoch betrug die Standardabweichung hier bis zu 40 %. Sehr viel höher fiel diese in der 2. Blot-Reihe mit einer maximalen Abweichung von über 80 % aus. Mithin ließen diese Ergebnisse keine wirklich signifikanten Aussagen über den mittleren D1-Gehalt in den einzelnen Blattsegmenten zu. Um dennoch einen möglichen Trend herauszufinden, wurden die jeweiligen Mittelwerte der UV+WL-Proben den Kontrollen gegenübergestellt und verglichen. Dabei zeigten sich in beiden Versuchsreihen bei den jüngeren Blattstadien vergleichbare Tendenzen. 5 d alte *ant*- und *Hege*-Blattsegmente ließen eine Tendenz zur D1-Gehaltsabnahme unter UV+WL-Bedingungen von ca. 30-40 % gegenüber der WL-Kontrolle erkennen. Eine ähnlich hohe Gehaltsabnahme zeigte sich jeweils bei 7 d alten *ant*-Blattsegmenten, während bei *Hege* die Ergebnisse aus beiden Blot-Reihen zwischen einer Abnahme um 30 % und einer Gehaltskonstanz differierten. Bei den 10 d alten Blattsegmenten offenbarten sich einander widersprechende Ergebnisse: bei *ant* wurde eine Zunahme des D1-Gehalts um knapp 25 % (3 Parallelproben) bzw. eine Abnahme um ca. 30 % (4 Parallelproben) festgestellt; bei *Hege* zeigten sich ähnlich hohe Zu- bzw. Abnahmen, jedoch jeweils in der anderen Versuchsreihe.

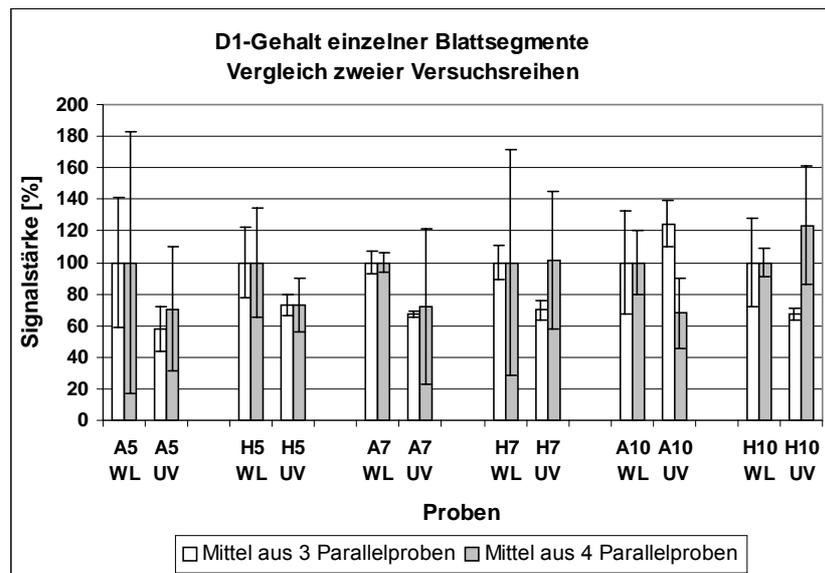


Abb. 3.24: Der D1-Gehalt von insgesamt 7 Blattsegmenten pro Altersstadium, Varietät und Bestrahlungsbedingung wurde in zwei verschiedenen Blot-Serien immunologisch ermittelt. In einer Blot-Serie wurden 3 Proben parallel auf ein Gel aufgetragen und anschließend geblottet, in der anderen Blot-Serie 4 Proben. Die densitometrisch ermittelten Signalwerte wurden gemittelt und die Kontrollen (WL) = 100% gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. 5, 7, 10 = Alter in Tagen; H = *Hege*, A = *ant*; UV = UV+WL-Bestrahlung.

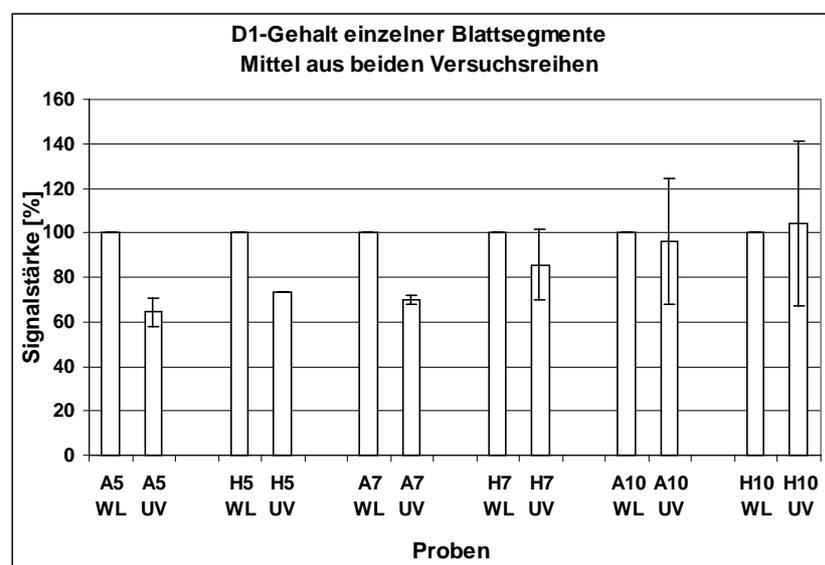


Abb. 3.25: Mittelwert des relativen D1-Gehaltes aus zwei Blot-Serien (Werte aus Abb. 3.24). Die Fehlerbalken geben die absolute Abweichung vom Mittelwert wieder (bei H5 UV keine Abweichung, s. Abb. 3.24). 5, 7, 10 = Alter in Tagen; H = *Hege*, A = *ant*; UV = UV+WL-Bestrahlung.

Da nicht auszuschließen war, dass die Einzelblattsegmente tatsächlich eine solch starke Variabilität aufwiesen, wurden die relativen Signalstärke-Werte aus beiden Versuchsreihen nochmals gemittelt, wobei die WL-Kontrolle als 100 %-Bezugspunkt erhalten blieb. Dies ermöglichte die Ermittlung eines Gesamttrends aus den unterschiedlichen Einzelergebnissen beider Blot-Reihen (Abb. 3.25). Die Fehlerbalken gaben hier die absolute Abweichung vom Mittelwert wieder und stellten somit ein Maß für die Differenz zwischen den beiden Versuchsreihen dar. Aufgrund der starken Differenzen in der Einzelsignale blieb die Signifikanz der Ergebnisse fraglich, dennoch wurde ein Trend erkennbar, wonach die jüngeren Blätter offensichtlich stärker dem UV-Einfluss ausgesetzt waren und Einbußen am D1-Gehalt hinnehmen mussten. Mit zunehmendem Alter manifestierte sich jedoch eine Konstanz im D1-Gehalt. Der Vergleich von *Hege* und *ant* auf jeder Altersstufe offenbarte geringere Gehaltseinbußen für die Muttervarietät. Dies bedeutete für 5 d alte *ant*-Segmente einen um 9% niedrigeren D1-Gehalt und für 7 d einen um 16 % niedrigeren D1-Gehalt verglichen mit *Hege*. Bei 10 d konnte sich ein solcher Unterschied nicht manifestieren.

Zusammenfassung: Die Ermittlung des D1-Proteins in einzelnen Blattsegmenten erwies sich als diffizil. Die durch immunologische Detektion mit einem spezifischen D1-Antikörper gewonnenen Signale mehrerer parallel aufgearbeiteter Proben erwiesen sich als sehr variabel, wobei trotz aller Kontrollen nicht abschließend beurteilt werden konnte, ob die Variabilität im Probenmaterial selbst oder in der Aufarbeitung der Proben begründet war. Tendenziell aber konnte bei 5 d alten Blattsegmenten eine Abnahme des D1-Gehaltes nach UV+WL-Bestrahlung gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Dies galt für die Muttervarietät und die Mutante gleichermaßen. Eine Reduktion wurde auch bei den 7 d alten Segmenten offenbar; hier allerdings war der Trend bei der Mutante deutlicher als bei der Muttervarietät. Die 10 d alten Segmente ließen keine Gehaltsreduktion erkennen, weder bei *Hege* noch bei *ant*.

3.4.4 D1-Turnover

Es wurden Primärblattsegmente 5 d, 7 d und 10 d alter Pflanzen untersucht. Fünf Proben mit je 10 Blattsegmenten der Mutante *ant* und der Muttervarietät *Hege* wurden einer 90minütigen

pulse-Phase mit ^{35}S -Methionin zur Bildung von radioaktiv markiertem D1-Protein ausgesetzt. Nach Wechsel der Blattsegmente in Puffer mit nicht-radioaktivem Methionin wurden diese einer UV+WL- bzw. WL-Bestrahlung unterworfen und der Turnover des D1-Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt, wobei eine Probe mit radioaktiv markiertem D1-Protein als Probe für $t = 0$ h direkt nach der pulse-Phase in fl. N_2 eingefroren wurde. Die anderen Proben wurden nach 1 h, 2 h, 4 h und 5.5 h chase-Phase geerntet. Die Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt. Die Proteine wurden extrahiert, über SDS-Gele aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Nach Autoradiographie wurden die Filme densitometrisch ausgewertet.

3.4.4.1 D1-Turnover bei 5 d alten Primärblattsegmenten

Der D1-Turnover der Muttervarietät *Hege* führte unter WL-Bedingungen (Abb. 3.26) im ersten Versuch zu einer stetigen Abnahme des radioaktiven Signals auf 67 %, im zweiten Versuch auf 88 % der Ausgangswerte (=100%). Das zweite Autoradiogramm zeigte eine leichte Verstärkung des Signals in der letzten Probenspur, was sich auch auf dem zugehörigen Coomassie-Blot andeutete (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war diese Probe etwas höher konzentriert als die anderen und der ermittelte densitometrische Wert etwas zu hoch bewertet, was aber nicht abschließend beurteilt werden konnte. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde eine lineare Regression durchgeführt, aus der sich die negative Steigung der Geraden ermitteln und vergleichen ließ. Die negative Steigung im ersten Durchgang betrug -5.6, im zweiten Versuch -2.8.

Die Ergebnisse zum Turnover der 5 d alten *Hege*-Blattsegmente unter UV+WL-Bedingungen entsprachen etwa denen der Kontrolle (Abb. 3.27). Im ersten Versuch betrug die Abnahme des radioaktiven Signals 23 %, im zweiten Versuch 19 %. Die errechneten negativen Steigungen betrugen -6.4 bzw. -4.8 und wiesen damit eine etwas stärkere Abbautendenz unter UV-Bedingungen auf.

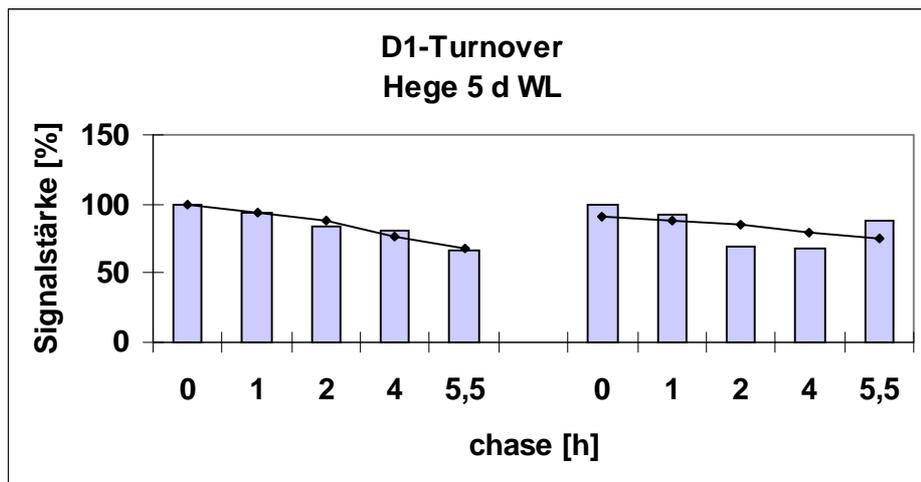


Abb. 3.26: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 5 d alter Hege-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 67 % bzw. 88 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -5.6 bzw. -2.8.

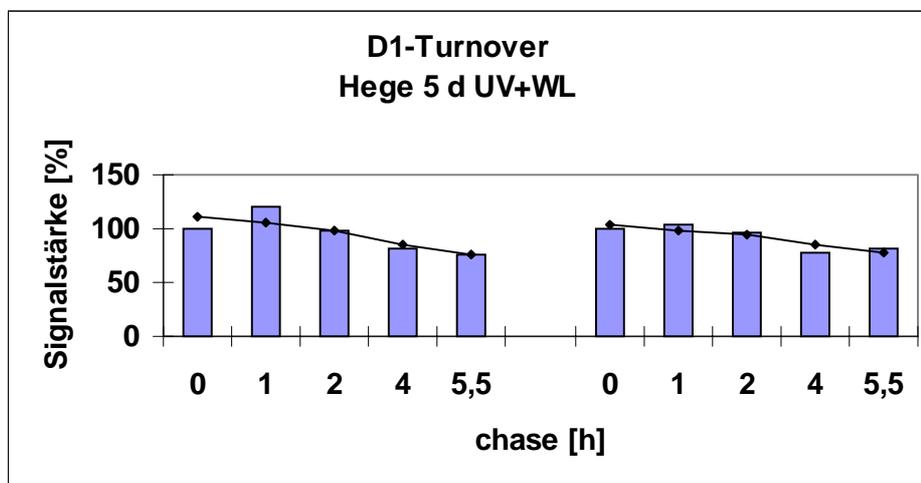


Abb. 3.27: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 5 d alter Hege-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 77 % bzw. 81 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -6.4 bzw. -4.8.

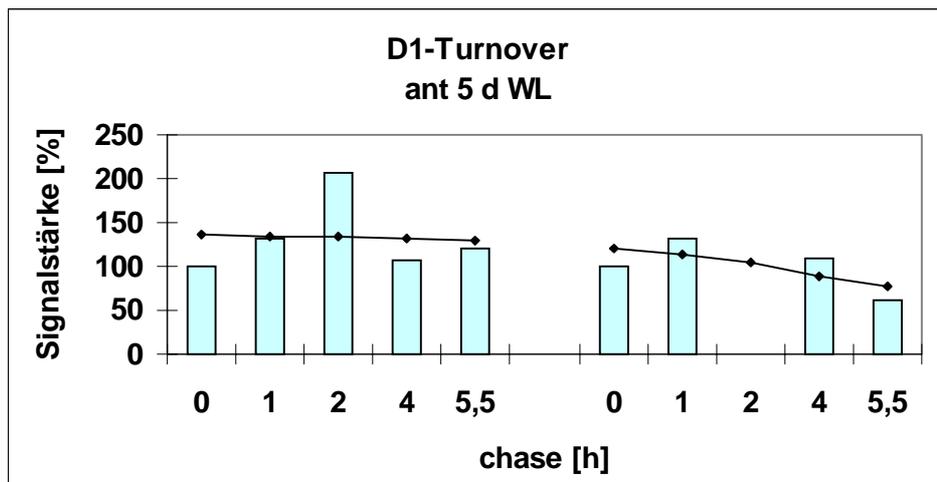


Abb. 3.28: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 5 d alter ant-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h >100 % bzw. 61 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -1.4 bzw. -7.9.

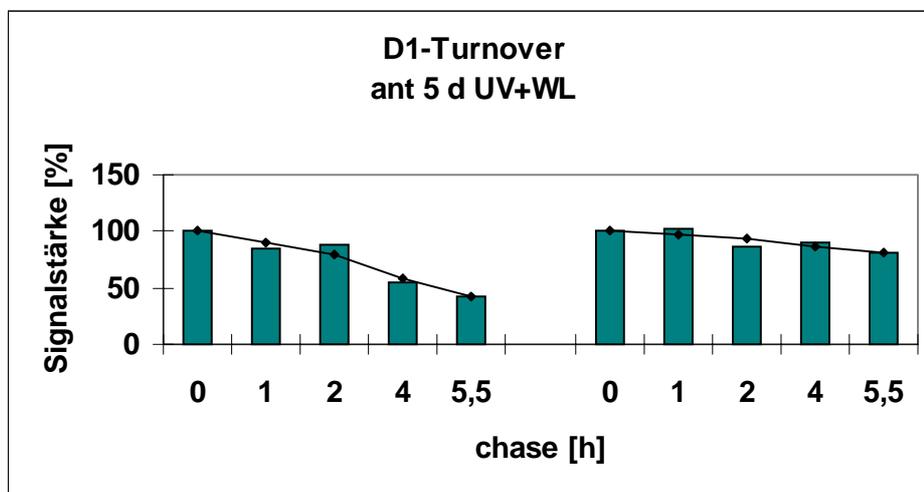


Abb. 3.29: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 5 d alter ant-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 43 % bzw. 80 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -10.6 bzw. -3.6.

Bei der Mutante *ant* zeichnete sich unter WL-Bedingungen ein unerwarteter Turnover-Verlauf ab. Die Radioaktivität nahm während der chase-Phase zu und fiel gegen Ende wieder auf Anfangsniveau ab (Abb. 3.28). Dies bestätigte sich im Parallelexperiment ansatzweise; die Radioaktivität nahm jedoch hier zum Ende der chase-Phase auf 61 % des Anfangswertes ab. Aus den zugehörigen coomassie-gefärbten Blots ergaben sich keine Hinweise auf eine erhöhte Proteinkonzentration in einzelnen Spuren, was auf einen experimentellen Fehler als Ursache für die hohen Signalstärken hätte hindeuten können. Ein verstärkter Einbau der markierten Aminosäure in der chase-Phase war insofern unerwartet, als nach der pulse-Phase die Blattsegmente gründlich gewaschen und in nicht-radioaktives Medium überführt worden waren. So konnte nur bereits ins Blattgewebe aufgenommenes, aber noch nicht umgesetztes freies ³⁵S-Methionin zur fortgesetzten Proteinbiosynthese verwendet werden. Die Ursache für diesen unerwarteten und im weiteren Experiment einmaligen Kurvenverlauf konnte nicht ermittelt werden. Auch konnte der Verlauf aus dem zweiten Experiment diesen Trend nicht eindeutig belegen, da hier zum Ende der chase-Zeit ein deutlicher D1-Abbau zu verzeichnen war. Daher wurde für diese Daten trotz der uneindeutigen Ergebnisse eine lineare Regression berechnet, wonach sich für die 1. Versuchsreihe eine neg. Steigung von -1.4 bzw. für die 2. Versuchsreihe eine von -7.9 ergab.

Unter UV+WL-Bedingungen zeigte sich eine Abnahme der Radioaktivität auf 43 % des Anfangswertes im ersten Versuch und auf 80 % im zweiten Versuch (Abb. 3.29). Daraus ergaben sich Steigungswerte von -10.6 bzw. -3.6, womit sich bei der Mutante sowohl unter WL- als auch unter UV+WL-Bedingungen stärkere Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen dokumentierte als bei der Muttervarietät *Hege*.

Um die Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande zwischen Muttervarietät und Mutante bei gleichen Bestrahlungsbedingungen besser beurteilen zu können, wurden die beiden Regressionskurven gemittelt und auf einen gemeinsamen Ursprung bei 100 % normiert. Abb. 3.30 zeigt einen direkten Vergleich dieser mittleren Regressionskurven. Die Muttervarietät zeigte unter WL-Bedingungen den geringsten Turnover mit einer mittleren Steigung von -4.2, gefolgt von *ant* WL mit einer mittleren Steigung von -4.6. Unter UV+WL-Bedingungen nahm der Abbau des D1-Proteins bei *Hege* etwas zu; die mittlere Steigung betrug -5.6. Die 5 d alte Mutante zeigte unter UV+WL-Bedingungen den stärksten Abbau mit

einer mittleren Steigung von -7.1. Auffällig höher war bei der Mutante der Fehler, mit dem die Mittelwerte behaftet waren. Unter UV+WL-Bedingungen war die Turnover-Rate bei *Hege* um 33% höher als unter WL-Bedingungen, bei der Mutante *ant* entsprechend um 54 % höher.

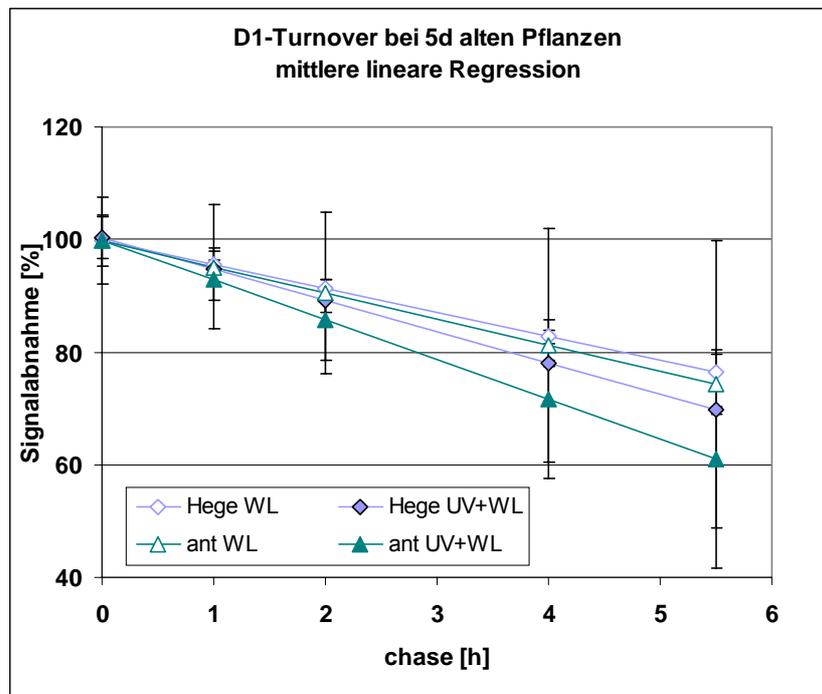


Abb. 3.30: Vergleich des D1-Turnovers 5d alter Hege- und ant-Primärblattsegmente bei zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Regressionsgeraden aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt und auf 100% normiert. Die negativen Steigungen betragen für *Hege* WL -4.2, für *Hege* UV+WL -5.6, für *ant* WL -4.7 und für *ant* UV+WL -7.1.

3.4.4.2 D1-Turnover bei 7 d alten Primärblattsegmenten

Die Mutter *Hege* (Abb. 3.31) zeichnete sich unter WL-Bedingungen durch zwei differierende Ergebnisse aus: in einem Fall betrug die Abnahme des D1-Signals 11 %, im anderen Fall 47 %. Dementsprechend unterschiedlich waren auch die ermittelten Steigungen: -2.4 bzw. -8.8 %. Zu diesem unterschiedlichen Ergebnis trug die Tatsache bei, dass eines der beiden Autoradiogramme (in Übereinstimmung mit dem Autoradiogramm der entsprechenden *ant*-Probe) einen sehr viel höheren Schwärzungsgrad aufwies als alle anderen Autoradiogramme. Es konnte nicht geklärt werden, ob hier ein experimenteller Fehler vorlag.

Unter UV+WL-Bedingungen herrschte eine größere Übereinstimmung in den Ergebnissen (Abb. 3.32). Am Ende der Bestrahlungszeit wurden in einem Fall 69 % und im anderen Fall 56 % des Ausgangswertes detektiert. Die zugehörigen ermittelten Steigungen lagen bei -7.6 bzw. -9.7.

Auch bei den unter WL-Bedingungen angezogenen *ant*-Pflanzen erbrachten die Parallelversuche zwei deutlich unterschiedliche Ergebnisse: im ersten Versuch ließ sich eine Signalabnahme von 15 %, im zweiten von 52 % feststellen (Abb. 3.33). Dies führte zur Ermittlung einer Steigung von -2.1 im ersten Fall und von -8.5 im zweiten Fall. Dies stimmte auffällig überein mit den *Hege*-Daten. Da in jeder Versuchsreihe die beiden Varietäten den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt waren, konnten diese Differenzen auf mögliche Unterschiede in den Anzuchtbedingungen oder in der Probenvorbereitung bedingt sein, deren Ursachen weder bekannt noch nachträglich erschlossen werden konnten. Die Parallelität der Ergebnisse allerdings deutete darauf hin, dass die Mutante und die Muttervarietät sich in ihrem Verhalten nicht unterscheiden.

Unter UV+WL-Bedingungen war die Abnahme des radioaktiven Signals über den Beobachtungszeitraum in den beiden Parallelversuchen ähnlich stark und endete bei 51 bzw. 48 % des Ausgangswertes (Abb. 3.34). Die errechneten Steigungen lagen bei -7.5 und -8.1.

Da bei den Einzelergebnissen nicht beurteilt werden konnte, ob stark differierende Ergebnisse auf eventuellen Fehlern oder auf der Variabilität des Probenmaterials beruhten, wurden auch hier die Regressionskurven gemittelt und verglichen (Abb. 3.35). Die bereits oben angedeutete Übereinstimmung in den beiden WL-Versuchen zeigte sich in der Deckung beider mittlerer Regressionskurven, deren Einzelwerte allerdings mit einem hohen absoluten Fehler behaftet sind. Die beiden UV+WL-Kurven lagen deutlich darunter, unterschieden sich aber untereinander weniger stark als bei den 5 d alten Primärblättern. Der Turnover der UV+WL-bestrahlten *Hege*-Primärblätter war um 55 % schneller gegenüber den Kontrollen; bei *ant* war der Turnover entsprechend um 47 % schneller.

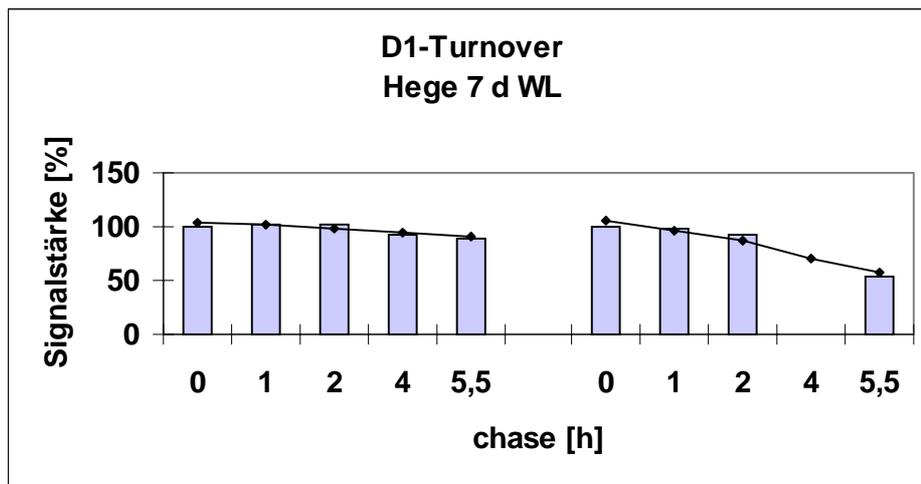


Abb. 3.31: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 7 d alter *Hege*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 89 % bzw. 53 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -2.4 bzw. -8.8.

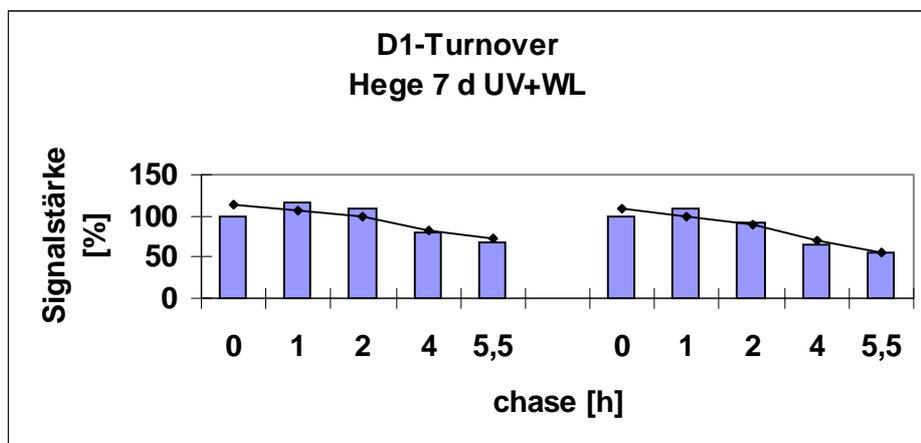


Abb. 3.32: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 7 d alter *Hege*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 69 % bzw. 56 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -7.6 bzw. -9.7.

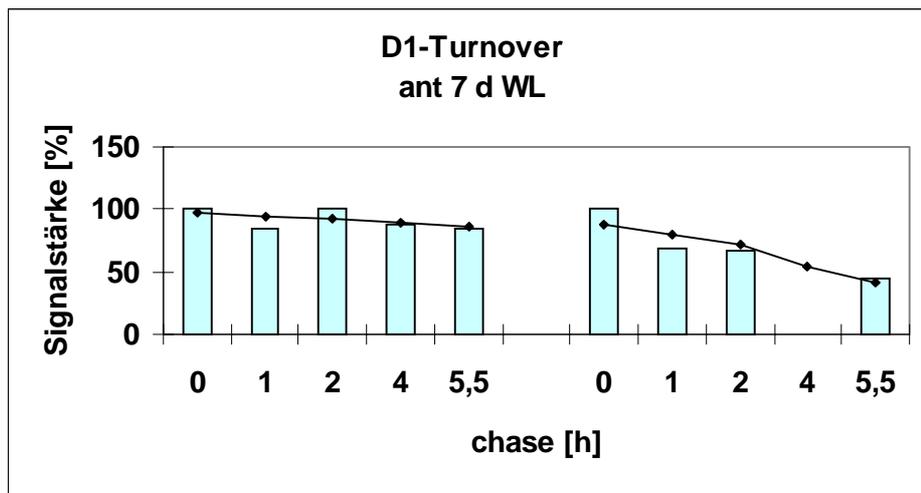


Abb. 3.33: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 7 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 85 % bzw. 48 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -2.1 bzw. -8.5.

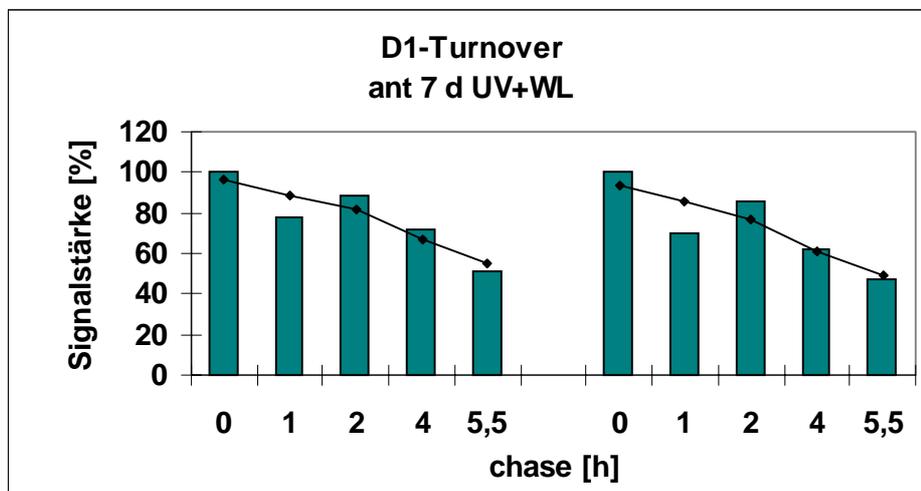


Abb. 3.34: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 7 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 51 % bzw. 48 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -7.5 bzw. -8.1.

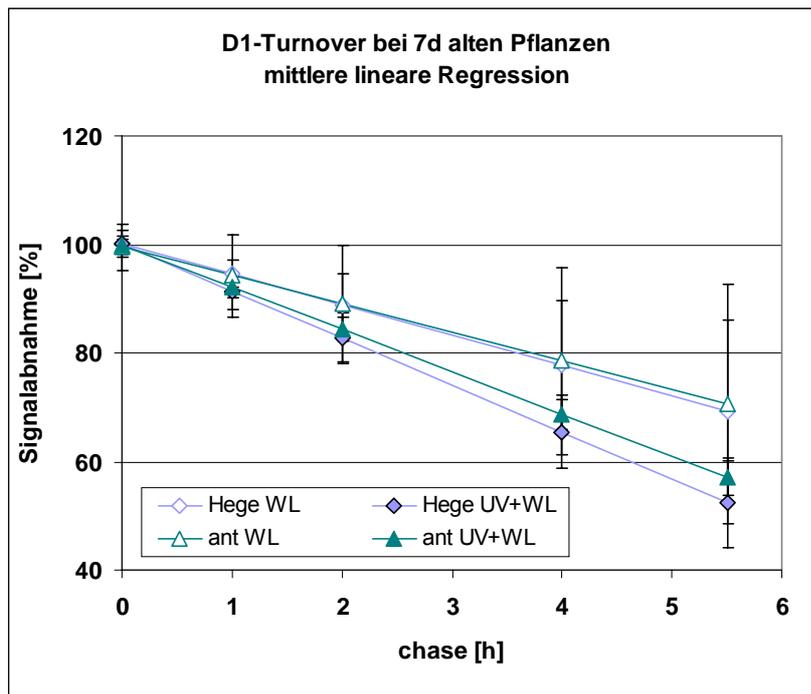


Abb. 3.35: Vergleich des D1-Turnovers 7 d alter Hege- und ant-Primärblattsegmente bei zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Regressionsgeraden aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt und auf 100% normiert. Die negativen Steigungen betragen für *Hege WL* -5.6, für *Hege UV+WL* -8.7, für *ant WL* -5.3 und für *ant UV+WL* -7.9.

3.4.4.3 D1-Turnover bei 10 d alten Primärblattsegmenten

Die Mutter *Hege* konnte unter WL-Bedingungen folgenden D1-Abbau verzeichnen: Die Signalwerte nach 5.5 h lagen bei 47 bzw. 76 % des Ausgangswertes (Abb. 3.36). Die entsprechenden Steigungen betragen -10.5 bzw. -6.8. Unter UV+WL-Bedingungen war der Abbau in beiden Versuchen weniger unterschiedlich: 43 bzw. 53 % vom Ausgangswert (Abb. 3.37). Die Regressionskurven zeigten Steigungen von -8 bzw. -9.6.

In beiden Parallelversuchen zeigten 10 d alte *ant*-Pflanzen unter WL-Bedingungen eine Abnahme der D1-Signale um 23 bzw. 48 % (Abb. 3.38). Die Steigungen betragen -3.9 bzw. -9. Unter UV+WL-Bedingungen wurde in beiden Parallelversuchen ein starker Abbau auf 37 bzw. 38 % des Ausgangswertes mit Steigungen von -11.7 bzw. -9.6 festgestellt (Abb. 3.39).

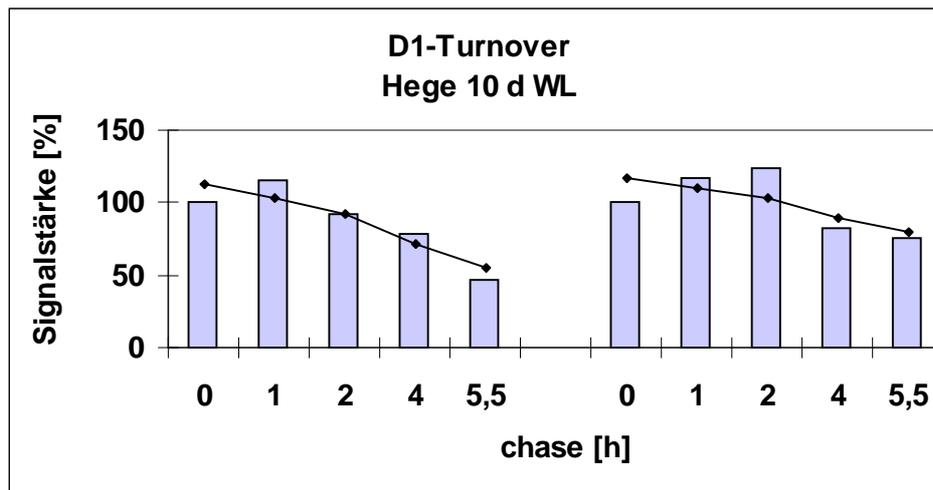


Abb. 3.36: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *Hege*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 47 % bzw. 76 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -10.5 bzw. -6.8.

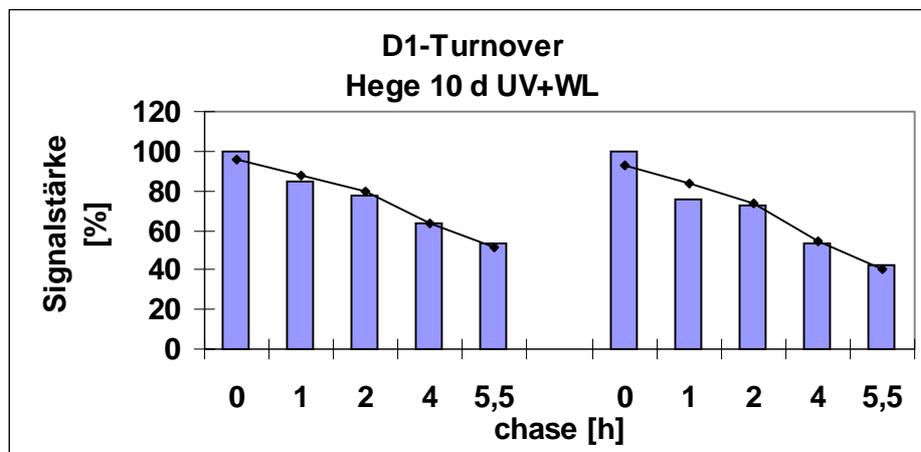


Abb. 3.37: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *Hege*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 43 % bzw. 53 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -8 bzw. -9.6.

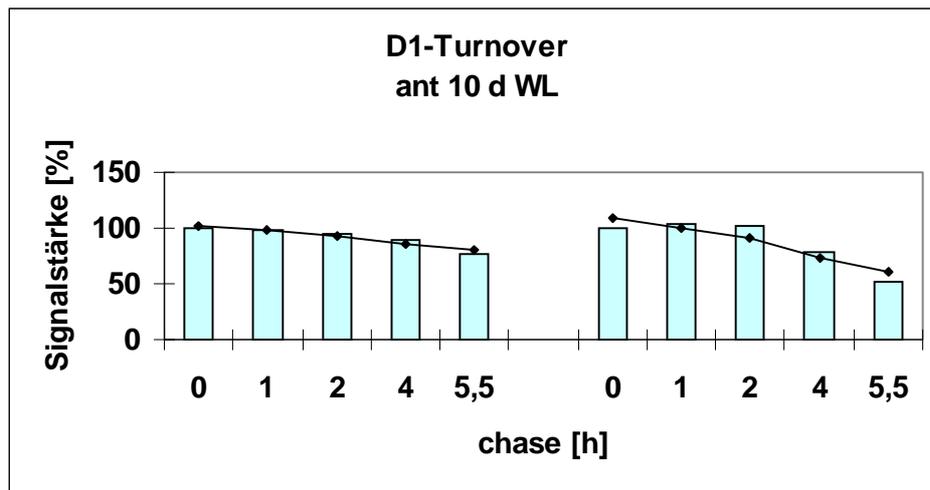


Abb. 3.38: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 77 % bzw. 52 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -3.9 bzw. -9.

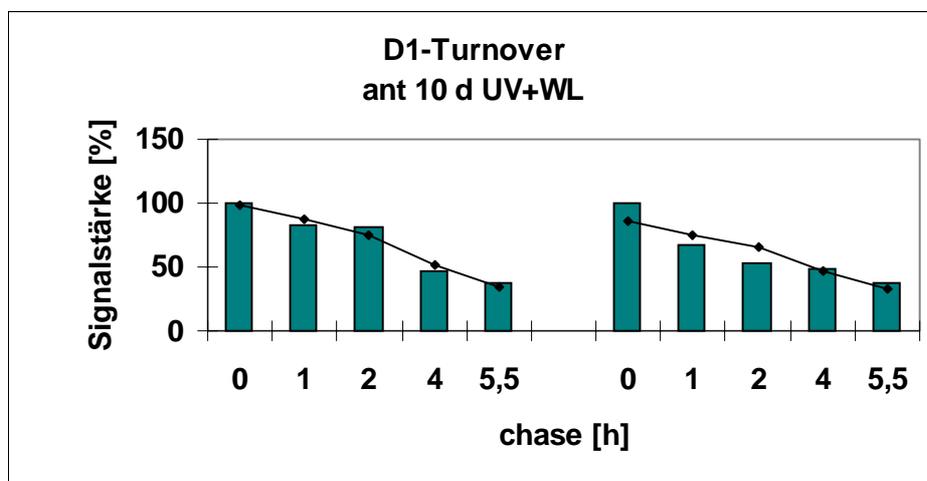


Abb. 3.39: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 37 % bzw. 38 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -11.7 bzw. -9.6.

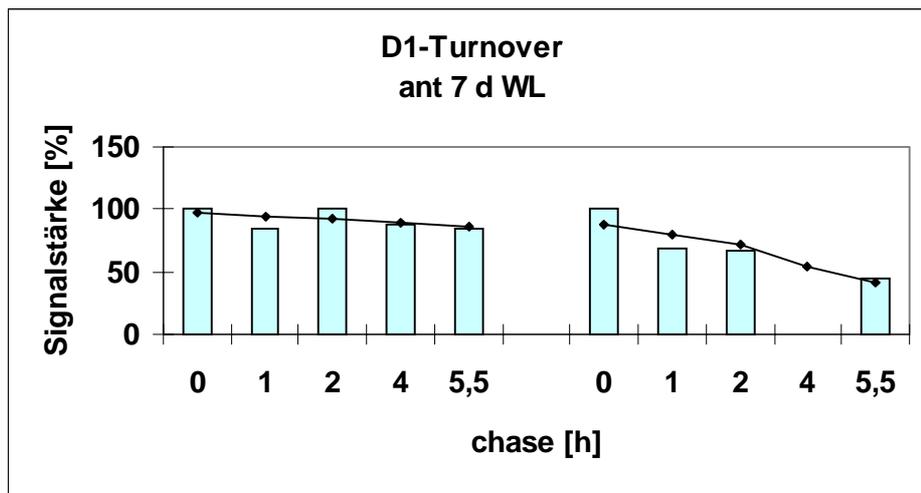


Abb. 3.33: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 7 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 85 % bzw. 48 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -2.1 bzw. -8.5.

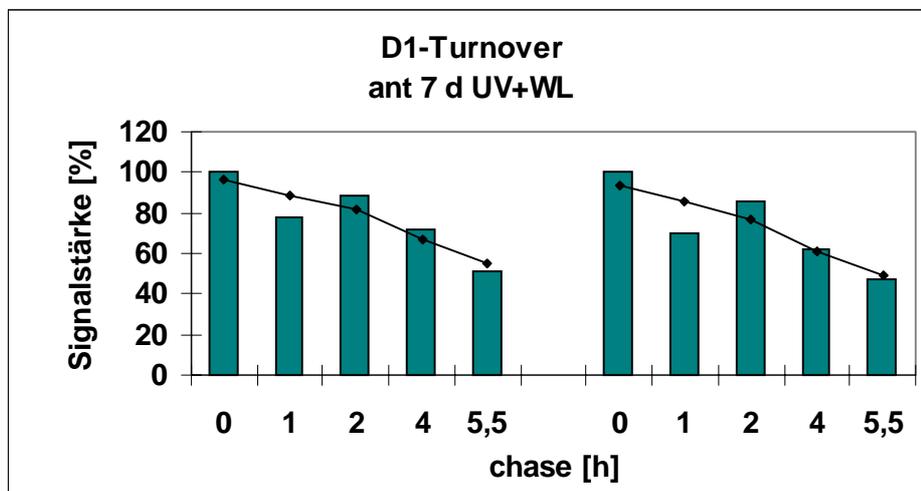


Abb. 3.34: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 7 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 51 % bzw. 48 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -7.5 bzw. -8.1.

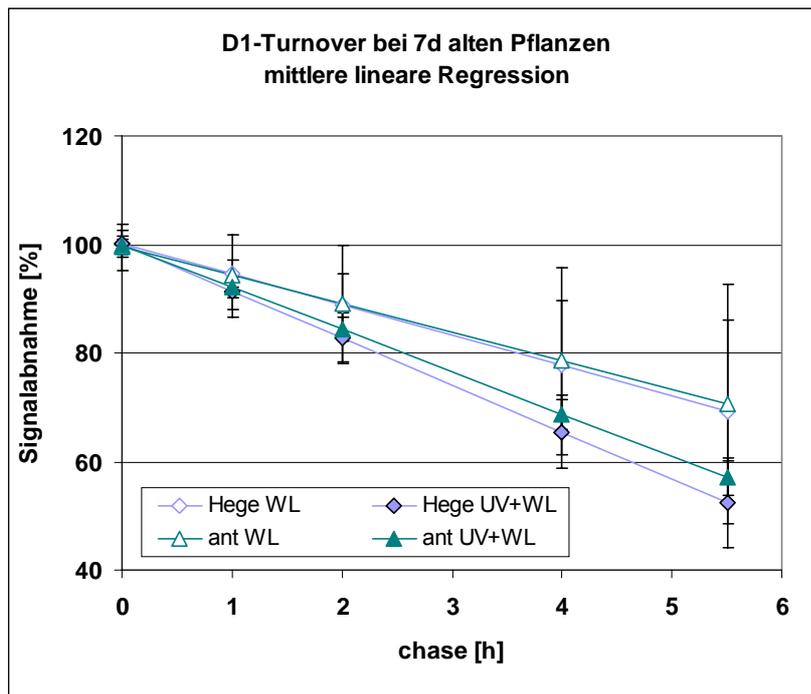


Abb. 3.35: Vergleich des D1-Turnovers 7 d alter Hege- und ant-Primärblattsegmente bei zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Regressionsgeraden aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt und auf 100% normiert. Die negativen Steigungen betragen für *Hege WL* -5.6, für *Hege UV+WL* -8.7, für *ant WL* -5.3 und für *ant UV+WL* -7.9.

3.4.4.3 D1-Turnover bei 10 d alten Primärblattsegmenten

Die Mutter *Hege* konnte unter WL-Bedingungen folgenden D1-Abbau verzeichnen: Die Signalwerte nach 5.5 h lagen bei 47 bzw. 76 % des Ausgangswertes (Abb. 3.36). Die entsprechenden Steigungen betragen -10.5 bzw. -6.8. Unter UV+WL-Bedingungen war der Abbau in beiden Versuchen weniger unterschiedlich: 43 bzw. 53 % vom Ausgangswert (Abb. 3.37). Die Regressionskurven zeigten Steigungen von -8 bzw. -9.6.

In beiden Parallelversuchen zeigten 10 d alte *ant*-Pflanzen unter WL-Bedingungen eine Abnahme der D1-Signale um 23 bzw. 48 % (Abb. 3.38). Die Steigungen betragen -3.9 bzw. -9. Unter UV+WL-Bedingungen wurde in beiden Parallelversuchen ein starker Abbau auf 37 bzw. 38 % des Ausgangswertes mit Steigungen von -11.7 bzw. -9.6 festgestellt (Abb. 3.39).

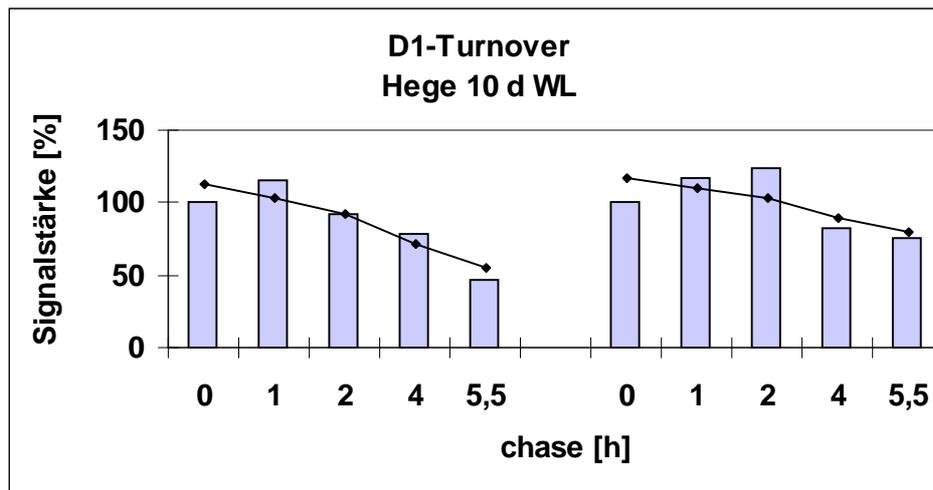


Abb. 3.36: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *Hege*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 47 % bzw. 76 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -10.5 bzw. -6.8.

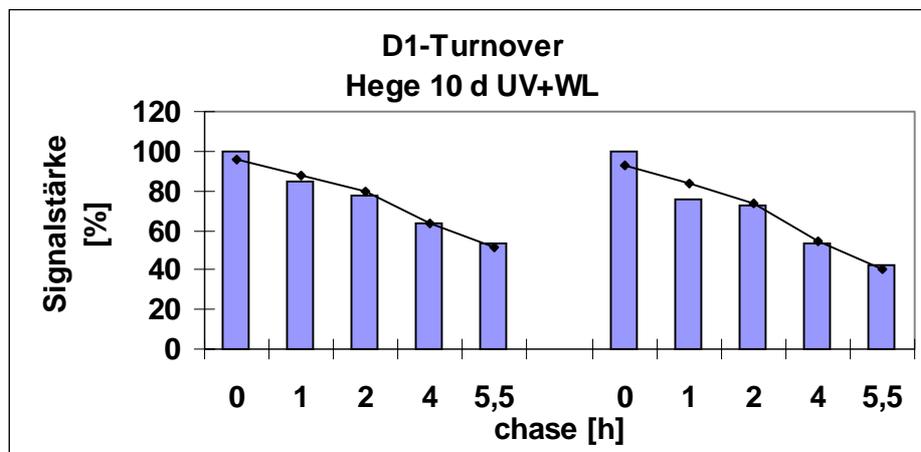


Abb. 3.37: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *Hege*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 43 % bzw. 53 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -8 bzw. -9.6.

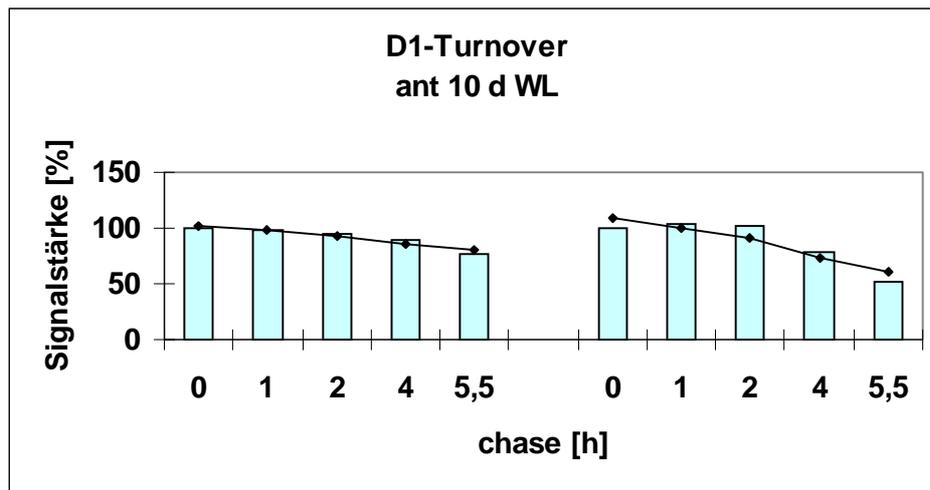


Abb. 3.38: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 77 % bzw. 52 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -3.9 bzw. -9.

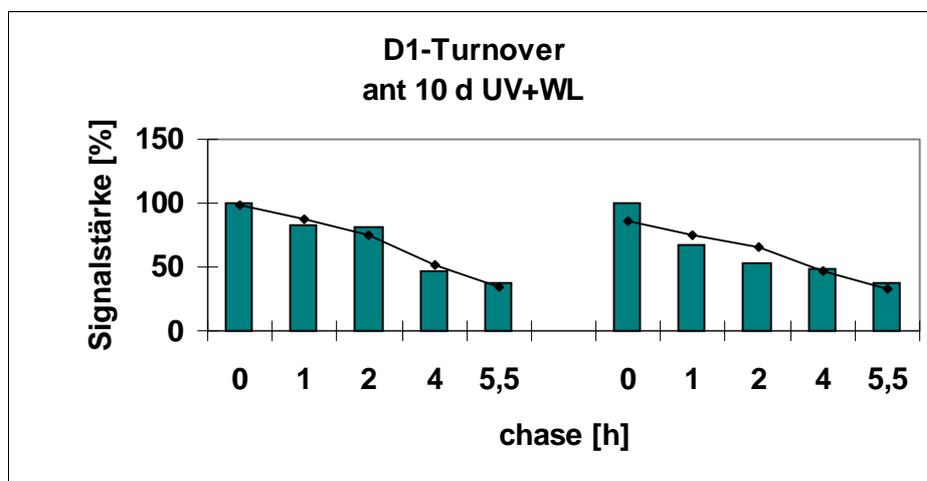


Abb. 3.39: Abnahme des radioaktiven Signals in der D1-Proteinbande 10 d alter *ant*-Primärblattsegmente unter UV+WL-Strahlungsbedingungen (2 unabhängig durchgeführte Versuchsreihen). Das Signal zum Zeitpunkt 0 h wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balken geben die densitometrischen Daten wieder, die Kurve entspricht den berechneten Daten nach linearer Regression. Signalstärke nach 5.5 h 37 % bzw. 38 %; die entsprechenden negativen Steigungen der Regressionskurve betragen -11.7 bzw. -9.6.

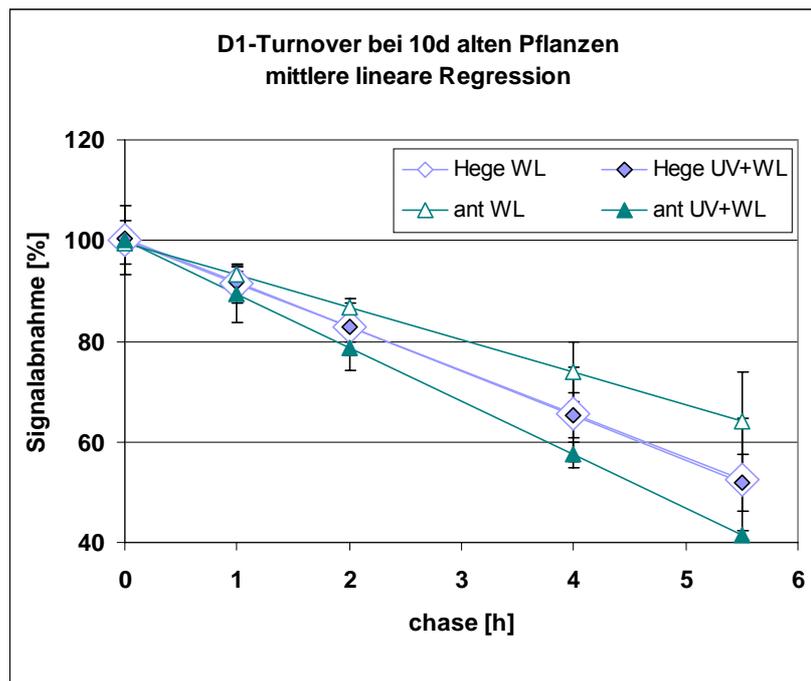


Abb. 3.40: Vergleich des D1-Turnovers 10d alter *Hege*- und *ant*-Primärblattsegmente bei zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Regressionsgeraden aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt und auf 100% normiert. Die negativen Steigungen betragen für *Hege* WL -8.7, für *Hege* UV+WL -8.8, für *ant* WL -6.5 und für *ant* UV+WL -10.7.

Der Vergleich der gemittelten Regressionskurven in Abb. 3.40 zeigt für *Hege* übereinstimmende Turnover-Raten unabhängig von Bestrahlungsbedingungen. Allerdings zeigen die WL-Pflanzen einen höheren Turnover als die Mutante unter gleichen Bedingungen. Zwischen *ant* WL und *ant* UV+WL ist der Turnover deutlich unterschiedlich: unter UV+WL-Bedingungen ist dieser um 65 % schneller.

Abb. 3.41 stellt die mittleren Regressionskurven aller Altersstadien für *ant* und *Hege* getrennt noch einmal gegenüber. Es zeigte sich bei beiden Sorten eine Zunahme der Turnover-Geschwindigkeit mit zunehmendem Blattalter. Dieser Trend war bei *Hege* weniger deutlich abhängig von den Bestrahlungsbedingungen, da es Übereinstimmungen in der Turnover-Rate bei 7 d alten WL-Proben und 5 d alten UV+WL-Proben gab ebenso wie bei den 7 d alten

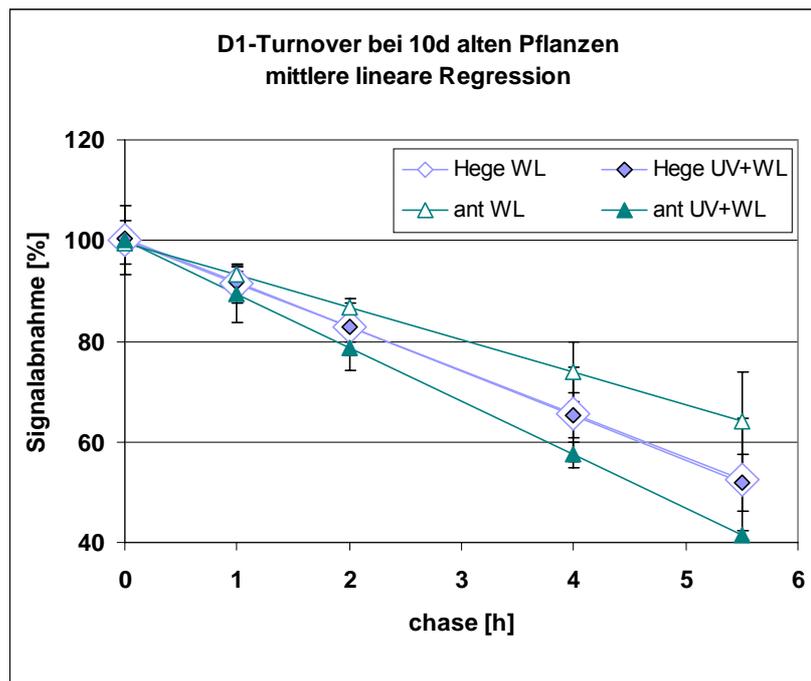


Abb. 3.40: Vergleich des D1-Turnovers 10d alter *Hege*- und *ant*-Primärblattsegmente bei zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Regressionsgeraden aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt und auf 100% normiert. Die negativen Steigungen betragen für *Hege* WL -8.7, für *Hege* UV+WL -8.8, für *ant* WL -6.5 und für *ant* UV+WL -10.7.

Der Vergleich der gemittelten Regressionskurven in Abb. 3.40 zeigt für *Hege* übereinstimmende Turnover-Raten unabhängig von Bestrahlungsbedingungen. Allerdings zeigen die WL-Pflanzen einen höheren Turnover als die Mutante unter gleichen Bedingungen. Zwischen *ant* WL und *ant* UV+WL ist der Turnover deutlich unterschiedlich: unter UV+WL-Bedingungen ist dieser um 65 % schneller.

Abb. 3.41 stellt die mittleren Regressionskurven aller Altersstadien für *ant* und *Hege* getrennt noch einmal gegenüber. Es zeigte sich bei beiden Sorten eine Zunahme der Turnover-Geschwindigkeit mit zunehmendem Blattalter. Dieser Trend war bei *Hege* weniger deutlich abhängig von den Bestrahlungsbedingungen, da es Übereinstimmungen in der Turnover-Rate bei 7 d alten WL-Proben und 5 d alten UV+WL-Proben gab ebenso wie bei den 7 d alten

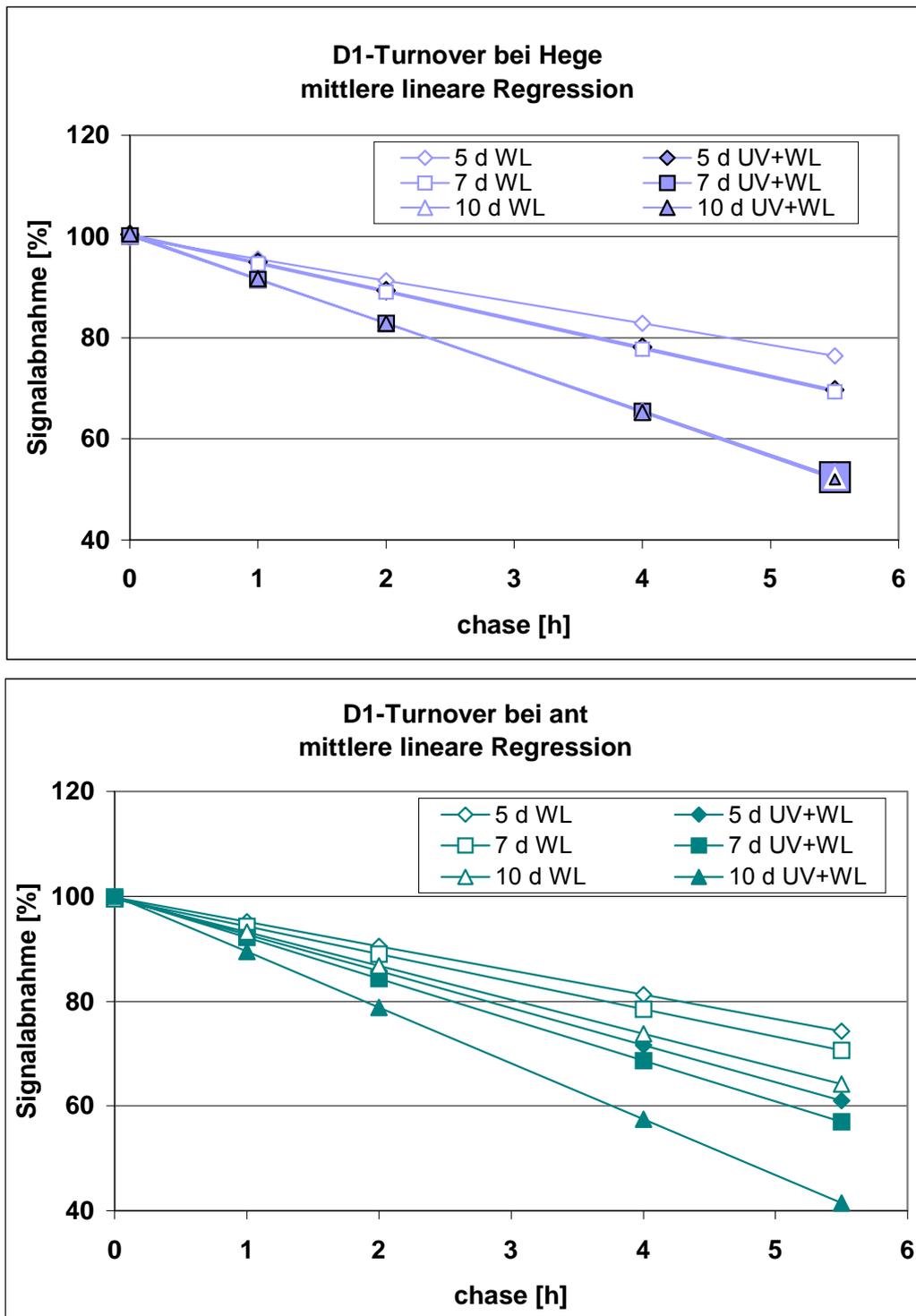


Abb. 3.41: Altersvergleich des D1-Turnovers von *Hege*- und *ant*-Primärblattsegmenten bei zwei Bestrahlungsbedingungen (offene Symbole = WL-Anzucht, geschlossene Symbole = UV+WL-Anzucht). Die Regressionsgeraden aus zwei Versuchsreihen wurden gemittelt und auf 100% normiert. (Unterschiedliche Symbolgrößen dienen der besseren Anschaulichkeit).

UV+WL-Proben mit den 10 d alten Proben unabhängig von der Bestrahlung. Bei *ant* zeigte sich dieser Trend deutlich zunehmend von 5 d alten WL-bestrahlten Pflanzen über 7 und 10 d alte WL-Proben, gefolgt von 5 d alten, danach 7 d alten und schließlich 10 alten UV+WL-Proben.

Zusammenfassung: Die Untersuchungen zum D1-Turnover unter WL- und UV+WL-Bestrahlungsbedingungen lieferte in zwei unabhängigen Versuchsreihen zum Teil deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Tendenziell jedoch zeigten die WL-bestrahlten Proben in allen untersuchten Altersstadien einen langsameren Turnover als die UV+WL-bestrahlten Proben. Dabei nahm die Turnover-Rate mit zunehmenden Blattalter insbesondere bei der Mutante *ant* zu. Die UV+WL-bestrahlten *Hege*-Segmente zeigten einen weniger ausgeprägten altersabhängigen Unterschied in der Turnover-Rate.

3.4.5 D1-Gehalt der Proben vor und nach der UV-B-Bestrahlung

Neben der Gehaltsbestimmung in Einzelblattsegmenten parallel zu den Fluoreszenz-Messungen wurden auch Gehaltsbestimmungen parallel zu den Turnover-Versuchen durchgeführt. Es wurde der D1-Gehalt direkt vor und direkt nach der WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsperiode parallel zu den chase-Zeiten $t = 0$ und $t = 5.5$ h immunologisch bestimmt. Dies sollte die Ergebnisse der Turnover-Messungen komplettieren, da auf diese Weise auch die Neusynthese unmarkierten Proteins nach Abbau des radioaktiv markierten erfaßt wurde. Zur Gehaltsbestimmung wurden ebenfalls je 10 Blattsegmente gemeinsam aufgearbeitet. Auf einem Gel wurden Doppelproben aufgetragen und anschließend geblottet: a) Muttervarietät und Mutante unter WL bzw. UV+WL-Bedingungen, b) Muttervarietät bzw. Mutante unter beiden Bestrahlungsbedingungen. Nur diese Doppelproben auf gleichen blots wurden nach densitometrischer Auswertung direkt miteinander verglichen. Die Signalmittelwerte zum Zeitpunkt 0 h wurden gleich 100 % gesetzt.

5 d alte, WL-bestrahlte *Hege*- und *ant*-Keimlinge zeigten keinen Gehaltsunterschied vor und nach der chase-Phase. Dies galt in gleicher Weise für die UV+WL-bestrahlten Pflanzen (Abb. 3.42).

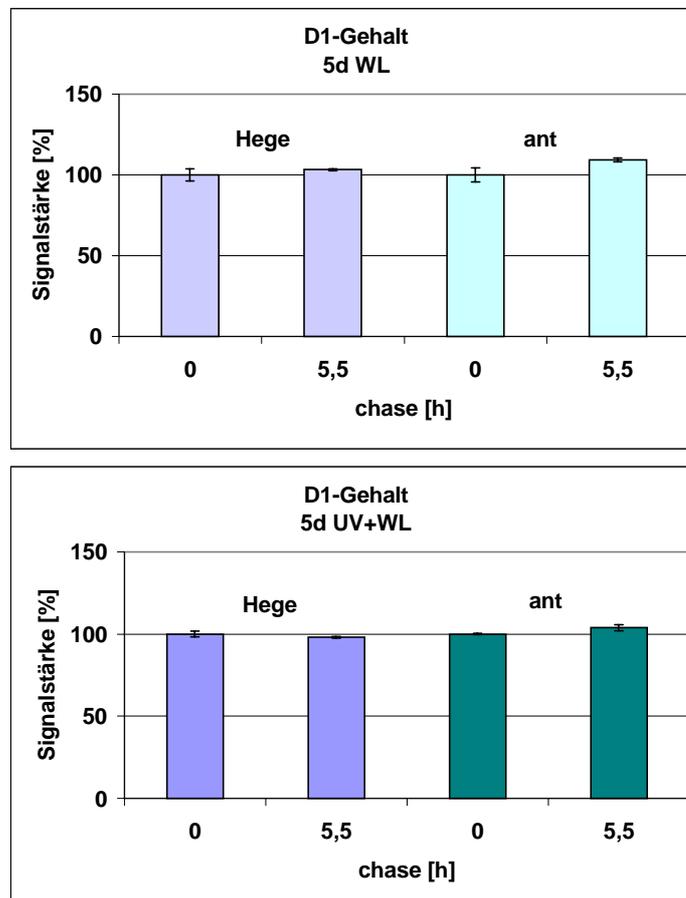


Abb. 3.42: D1-Gehalt 5 d alter Gersten-Primärblattsegmente zu Beginn und nach Beendigung einer 6-stündigen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsphase in der UV-Kammer. Vergleich zwischen *Hege* und *ant* unter gleichen Bestrahlungsbedingungen. (0 h = 100 %).

Die zum direkten Vergleich von WL- und UV+WL-bestrahlten Pflanzen aufgetragenen gleichen Proben auf einem zweiten Blot unterschieden sich leicht von dem ersten durch einen höheren D1-Gehalt (+ 25 %) bei den *Hege*-Keimlingen nach 5.5 h WL-Bestrahlung (Abb. 3.43).

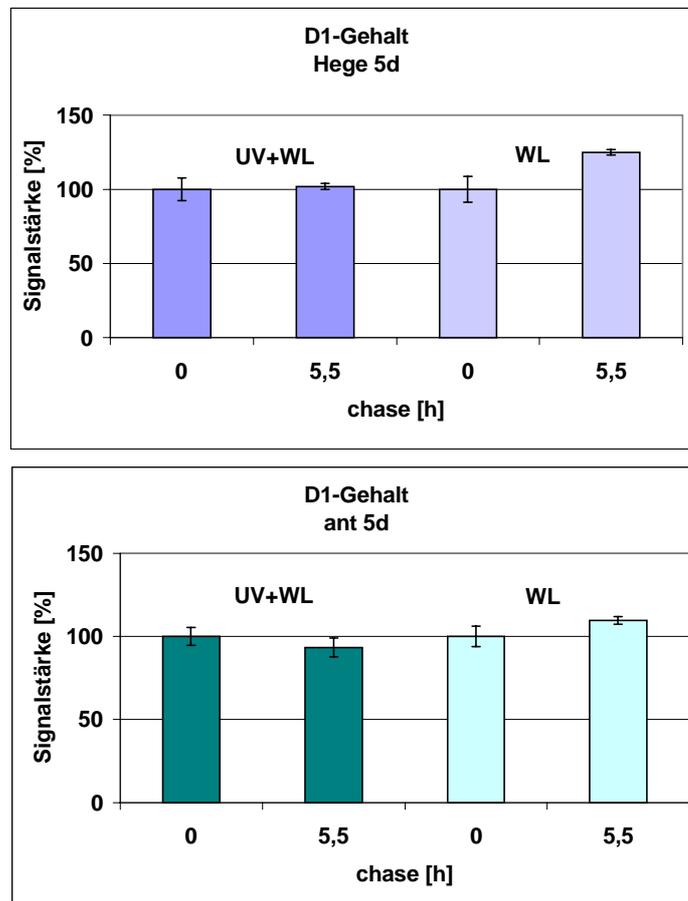


Abb. 3.43: D1-Gehalt 5 d alter Gersten-Primärblattsegmente zu Beginn und nach Beendigung einer 6-stündigen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsphase in der UV-Kammer. Vergleich zwischen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlung bei *Hege* bzw. *ant*. (0 h = 100 %).

Bei den 7 d alten Pflanzen war das Bild nicht ganz einheitlich. Unter WL-Bedingungen zeigte sich bei *ant* eine Gehaltszunahme von ca. 30 % innerhalb der Beobachtungszeit. *Hege* ließ einen leichte D1-Abnahme erkennen. Zwischen den UV+WL-Proben von *Hege* und *ant* zeigten sich keine Gehaltsunterschiede, weder vor noch nach der chase-Phase. (Abb. 3.44).

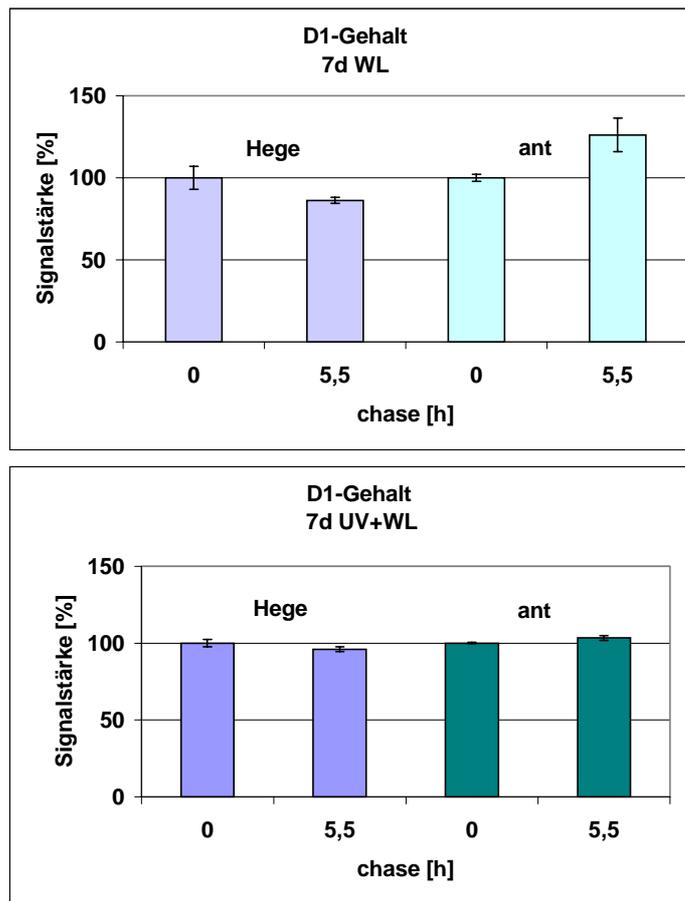


Abb. 3.44: D1-Gehalt 7 d alter Gersten-Primärblattsegmente zu Beginn und nach Beendigung einer 6-stündigen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsphase in der UV-Kammer. Vergleich zwischen *Hege* und *ant* unter gleichen Bestrahlungsbedingungen. (0 h = 100 %).

Im Parallelblot wurden die Ergebnisse bei *Hege* im wesentlichen bestätigt (Abb. 3.45). Bei *ant* wurde eine Abnahme (ca. 35 %) des D1-Gehaltes unter UV+WL-Bedingungen am Ende der Bestrahlungszeit deutlich, die sich im Ergebnis des ersten Blots nicht niedergeschlagen hatte. Dagegen bestätigte sich hier die D1-Zunahme unter WL-Bedingungen.

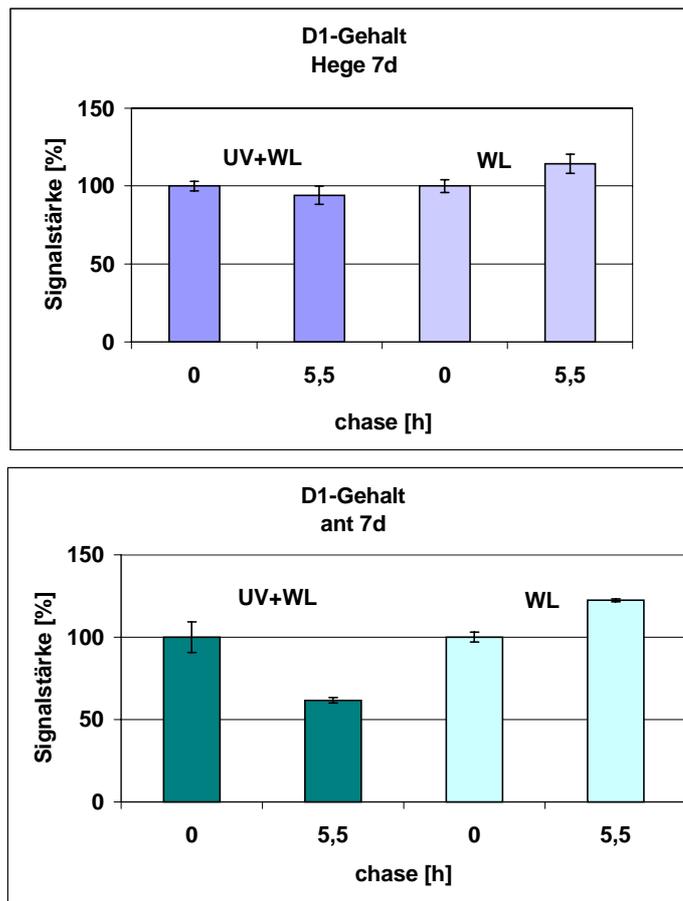


Abb. 3.45: D1-Gehalt 7 d alter Gersten-Primärblattsegmente zu Beginn und nach Beendigung einer 6-stündigen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsphase in der UV-Kammer. Vergleich zwischen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlung bei *Hege* bzw. *ant*. (0 h = 100 %).

Die 10 d alten Pflanzen zeigten insgesamt ein übereinstimmenderes Bild (Abb. 3.46). *Hege* zeigte unter WL-Bedingungen keine Gehaltsunterschiede, unter UV+WL-Bedingungen eine Gehaltsreduktion von 10 %. Dies wurde in den Parallelblots bestätigt. Bei *ant* konnte man eine Zunahme des D1-Gehaltes unter WL-Bedingungen um 11 % nach der Bestrahlungsphase

detektieren, die sich allerdings im Parallelblot als 50%iger Zuwachs erwies (Abb. 3.47). Diese 50 %ige Zunahme beruhte auf zwei unterschiedlichen Signalstärken einer Doppelprobe, was sich in der Größe des Fehlerbalkens dokumentierte und somit auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen ist. Die UV+WL-bestrahlten *ant*-Pflanzen zeigten eine geringfügige Gehaltszunahme (20 %) nach der chase-Phase in beiden Blots.

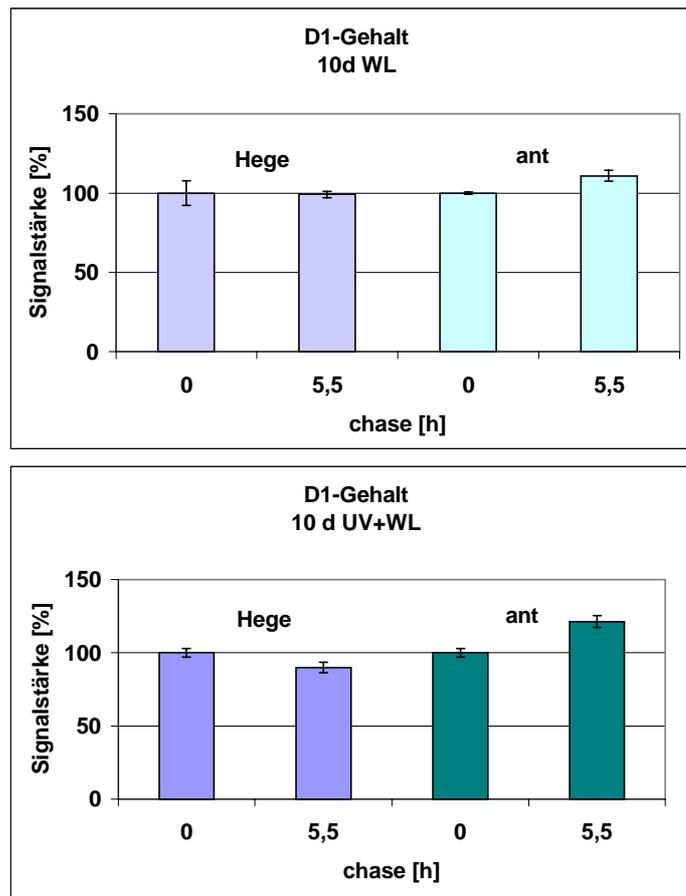


Abb. 3.46: D1-Gehalt 10 d alter Gersten-Primärblattsegmente zu Beginn und nach Beendigung einer 6-stündigen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsphase in der UV-Kammer. Vergleich zwischen Hege und *ant* unter gleichen Bestrahlungsbedingungen. (0 h = 100 %).

Zusammenfassung: Aufgrund der Ergebnisse ließen sich keine signifikant erscheinenden Veränderungen im D1-Gehalt vor und nach der täglichen Bestrahlungsphase (WL bzw. UV+WL) feststellen. Eine Tendenz zur Gehaltsveränderung ließ sich nur in zwei Fällen bestätigen (*ant* 7 d WL und *ant* 10 d UV+WL). In allen anderen Fällen blieb der D1-Gehalt unabhängig von Bestrahlungsbedingung, Varietät oder Blattalter relativ konstant.

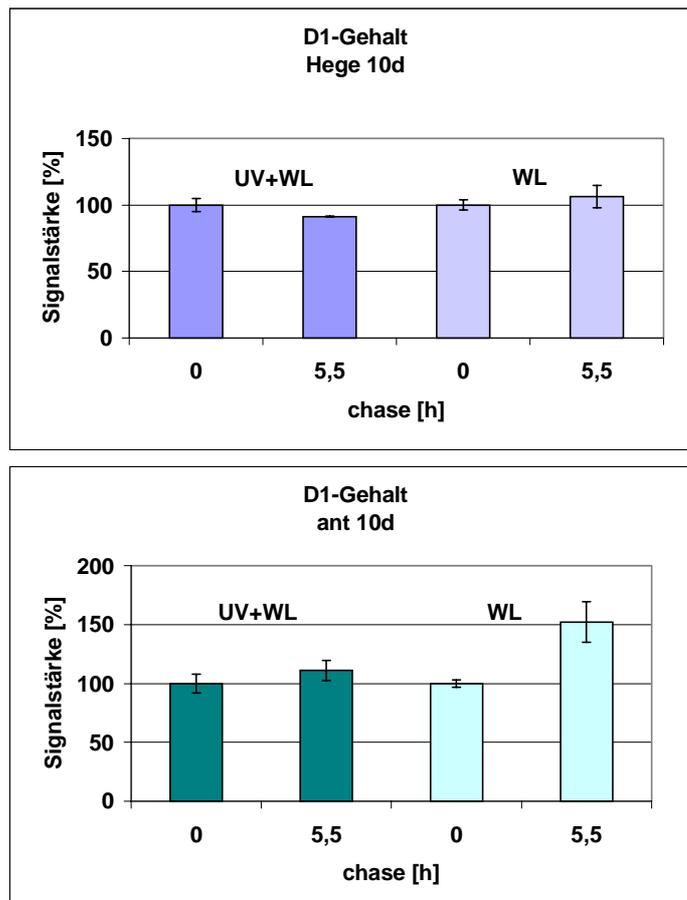


Abb. 3.47: D1-Gehalt 10 d alter Gersten-Primärblattsegmente zu Beginn und nach Beendigung einer 6-stündigen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlungsphase in der UV-Kammer. Vergleich zwischen WL- bzw. UV+WL-Bestrahlung bei *Hege* bzw. *ant*. (0 h = 100 %).

3.4.6 D1-Synthese

Die Untersuchungen zur D1-Synthese wurden an 7, 10 und 15 d alten UV+WL- bzw. WL-bestrahlten Pflanzen durchgeführt. Der geringe Unterschied im Turnover-Verhalten der Muttervarietät und der Mutante war Anlass zu Überlegungen, ob in einem 5, 7 oder 10 d alten Primärblatt Entwicklungsprozesse einen durch UV-B-Zusatz erhöhten Turnover maskieren. In einem abschließenden Versuch wurde durch Einbeziehung des älteren Blattstadiums 15 d dieser Aspekt berücksichtigt. Die Untersuchung erfolgte in gleicher Weise wie bei den Turnover-Experimenten: Je 10 Blattsegmente wurden in einer radioaktiven Lösung mit ^{35}S -Methionin gefüttert. Diese Fütterung erfolgte unter einer Bestrahlung mit $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, um die D1-Synthese anzuregen. Die Proben wurden nach 15, 30, 45, 60 und 90 min geerntet

und wie üblich aufgearbeitet. Im Gegensatz zu den Turnover-Experimenten wurde hier auf das Blotten der Proteine verzichtet und die Gele nach Trocknung direkt autoradiographiert. Von jeder Probe wurden zwei identische Aliquots auf zwei Gelen aufgetrennt: auf einem Gel wurden Mutter und Mutante unter gleichen Bestrahlungsbedingungen verglichen, auf einem zweiten Gel wurden jeweils die Mutter bzw. die Mutante unter den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen (WL bzw. UV+WL) verglichen.

Bei der densitometrischen Auswertung der Autoradiogramme wurden nur Signale von Proben verglichen, die auf dem gleichen Gel aufgetragen waren. Für die Bewertung der D1-Synthese wurden in erster Linie die relative Zunahme (ausgehend vom ersten ermittelten Wert nach 15 min Bestrahlung) über den Beobachtungszeitraum von 90 min berücksichtigt. Die absoluten Signalstärken wurden nur zur Bewertung innerhalb des gleichen Gels hinzugezogen.

3.4.6.1 D1-Synthese bei 7 d alten Primärblattsegmenten

Hege wies unter beiden Bestrahlungsbedingungen kaum Unterschiede bei der Zunahme der Radioaktivität im D1-Protein auf (Abb. 3.48). Die relative Zunahme konnte nur bei der UV+WL-Probe ermittelt werden, da der 15 min-Wert der WL-Probe ausfiel. Diese lag bei 124 %. Die absoluten Signalwerte nach 90 min Synthesezeit waren allerdings bei beiden Proben nahezu identisch. Die Mutante wies unter den unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen eine ähnlich deckungsgleiche D1-Synthese auf. Die relative Zunahme der Radioaktivität im D1-Protein betrug 81 % für die WL-Proben bzw. 90 % für die UV+WL-Proben.

Der direkte Vergleich der Muttervarietät mit der Mutante unter jeweils gleichen Bestrahlungsbedingungen ergab vergleichbare Werte mit geringen Abweichungen bei den erreichten absoluten Endwerten (Abb. 3.49). *Hege* WL lag um 22 % höher als *ant* WL; *Hege* UV+WL dagegen um 11 % unter dem entsprechenden *ant*-Wert. Für die relative Zunahme der Radioaktivität im D1-Protein bedeutete dies eine um 20 % höhere Zunahme bei *ant* UV+WL gegenüber *Hege*, während der Vergleich für die WL-Proben aufgrund des fehlenden Ausgangswertes nicht möglich war.

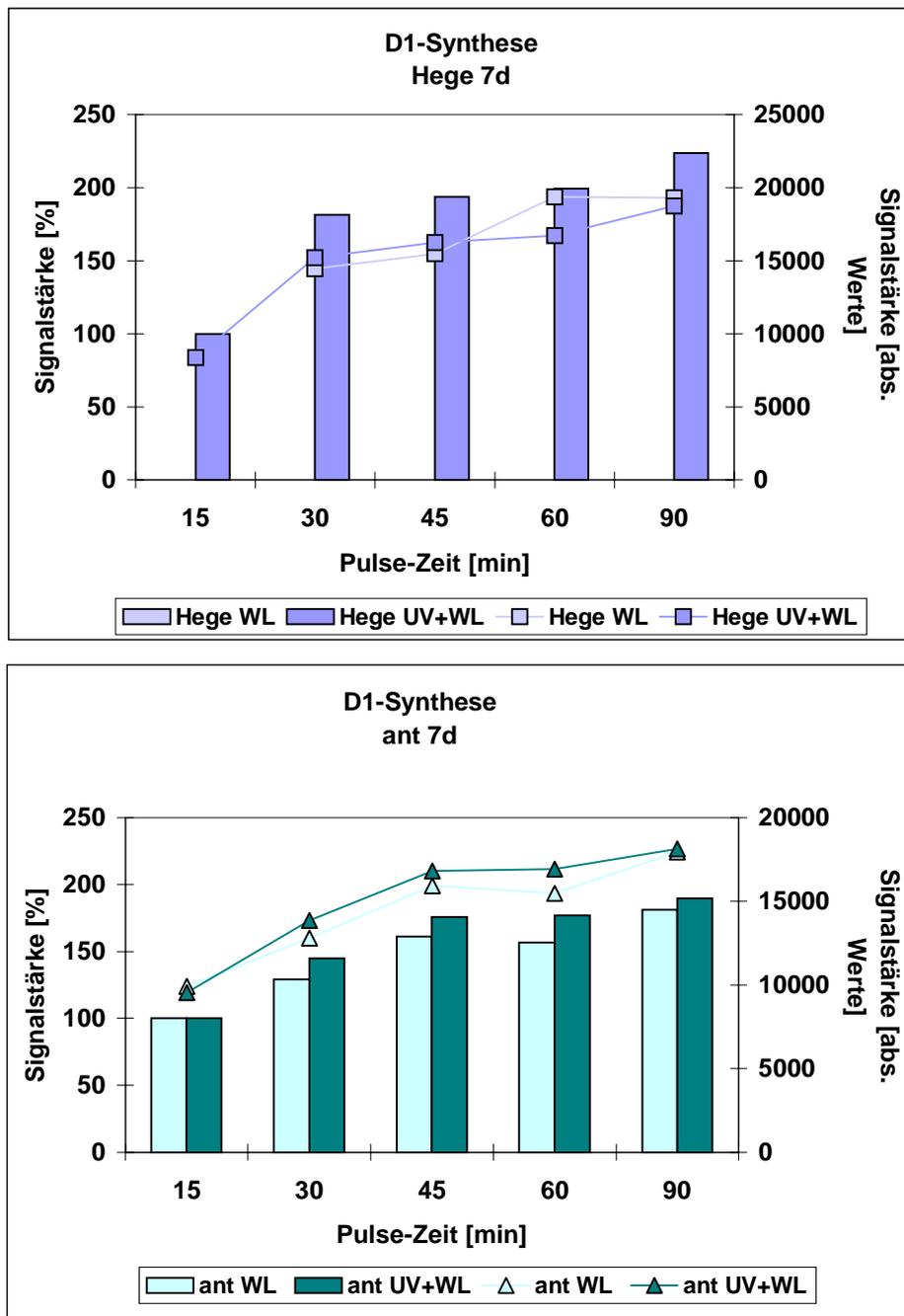


Abb. 3.48: D1-Synthese bei 7 d alten *Hege*- bzw. *ant*-Primärblattsegmenten. Vergleich von Muttervarietät bzw. Mutante unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen (helle Farben = WL-Anzucht, dunkle Farben = UV+WL-Anzucht). Die Proben wurden jeweils auf einem Gel aufgetrennt. Die durch Linien verbundenen Symbole geben die absolute Signalstärke nach Densitometrie der Autoradiogramme wieder. Die relative Zunahme der Signalstärke wird durch die Balken wiedergegeben (15 min = 100%).

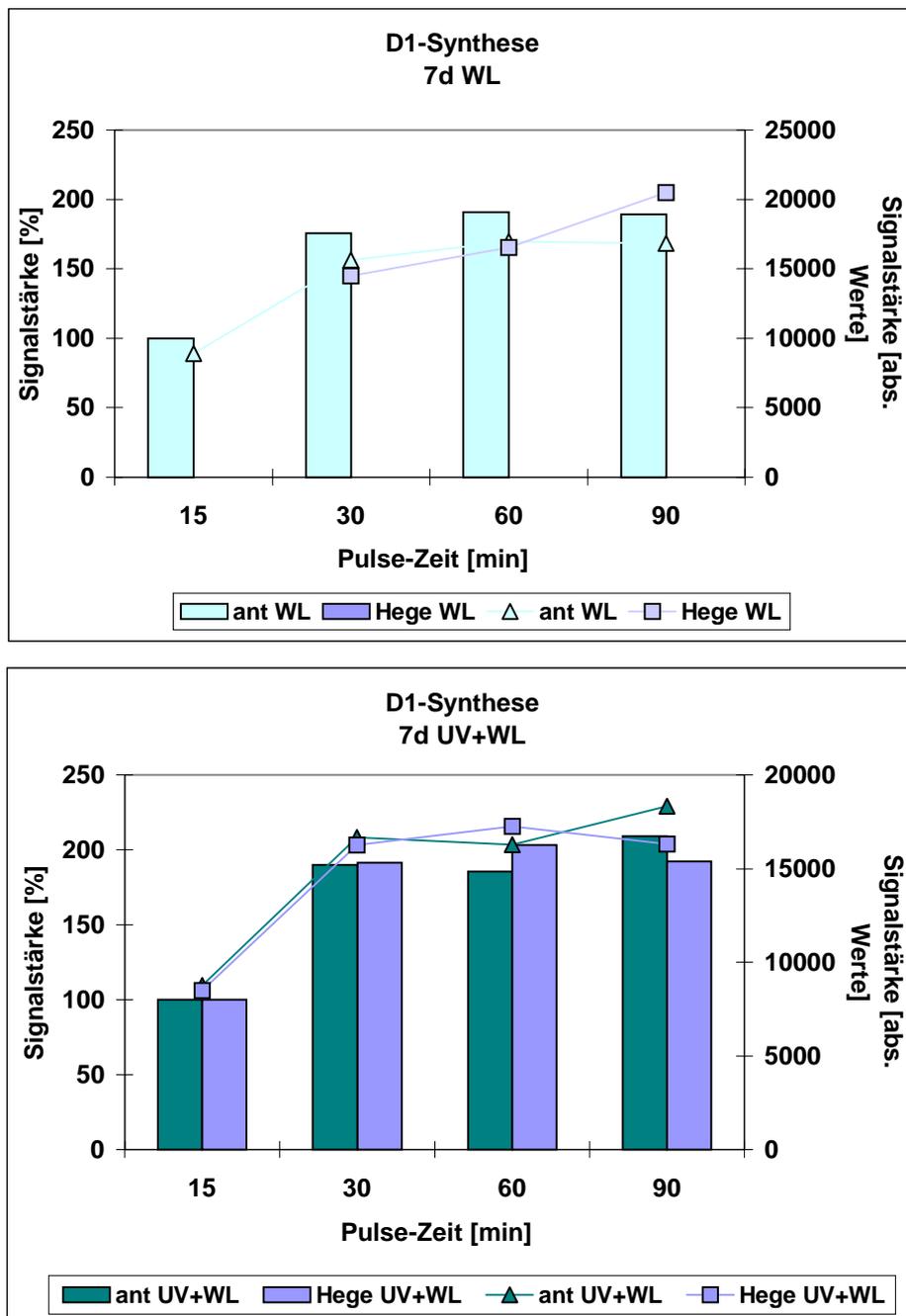


Abb. 3.49: D1-Synthese bei 7 d alten *Hege*- und *ant*-Primärblattsegmenten. Vergleich von Muttervarietät und Mutante unter den jeweils gleichen Bestrahlungsbedingungen (helle Farben = WL-Anzucht, dunkle Farben = UV+WL-Anzucht). Die Proben wurden jeweils auf einem Gel aufgetrennt. Die durch Linien verbundenen Symbole geben die absolute Signalstärke nach Densitometrie der Autoradiogramme wieder. Die relative Zunahme der Signalstärke wird durch die Balken wiedergegeben (15 min = 100%).

3.4.6.2 D1-Synthese bei 10 d alten Primärblattsegmenten

Bei *Hege* betrug die relative Zunahme 166 % unter WL- und 188 % unter UV+WL-Bestrahlung. Die absoluten Anfangs- und Endwerte der WL und UV+WL-Probe lagen nah beieinander, nur der Verlauf der Aufnahme an Radioaktivität war etwas unterschiedlich (Abb. 3.50). Bei der Mutante betrug die relative Zunahme bei *ant* WL 82 % und bei *ant* UV+WL 100 %. Die absoluten Endwerte wiesen Unterschiede auf, wobei die UV+WL-Probe um 24 % höher lag als die WL-Probe.

Der direkte Vergleich von Muttervarietät und Mutante offenbarte größere Unterschiede (Abb. 3.51). *Hege* WL wies einen Zuwachs von 155 % auf, *ant* WL dagegen nur einen Zuwachs von 81 %. Die UV+WL-Proben zeigten gleichartige Unterschiede: *Hege* 180 % Zuwachs, *ant* 90 %. Diese Syntheseunterschiede erklären sich bei Betrachtung der absoluten Signal dadurch, dass sowohl die WL-bestrahlten als auch die UV+WL-bestrahlten *ant*-Segmente von Beginn an, d.h. zum Zeitpunkt von 15 min einen höheren Gehalt an ³⁵S-Met aufwiesen. Die absoluten Signale am Ende der Bestrahlungsphase unterschieden sich dagegen kaum. Die Frage, ob die hohen Signalwerte am Anfang der Bestrahlungsphase auf eine sehr hohe Synthesetätigkeit bei *ant* zurückzuführen sind oder auf eine erhöhte Aufnahme an Radioaktivität in das Blatt (beispielsweise bei der Vakuuminfiltration), bleibt unbeantwortet. Die Ergebnisse konnten in jedem Fall deutlich zeigen, dass die D1-Synthese bei beiden Gerstenvarietäten nicht durch UV-B-Strahlung beeinträchtigt war. Im Vergleich zu den 7 d alten Blattsegmenten zeigten die *Hege*-Segmente unter beiden Bestrahlungsbedingungen eine höhere Einbaurrate der radioaktiven Aminosäure in das neu synthetisierte D1-Protein, während die Zunahmen bei *ant* in vergleichbaren Größenordnungen lag.

3.4.6.3 D1-Synthese bei 15 d alten Primärblattsegmenten

Bei der densitometrischen Auswertung der Gele mit den Proben 15 d alter Segmente fiel das 90 min-Signal der *Hege* WL-Proben unerwarteterweise geringer aus als das 60 min-Signal (Abb. 3.52). Dieser Wert wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. *Hege* wies geringfügige Unterschiede im Einbau der Radioaktivität auf: Unter UV+WL-Bedingungen

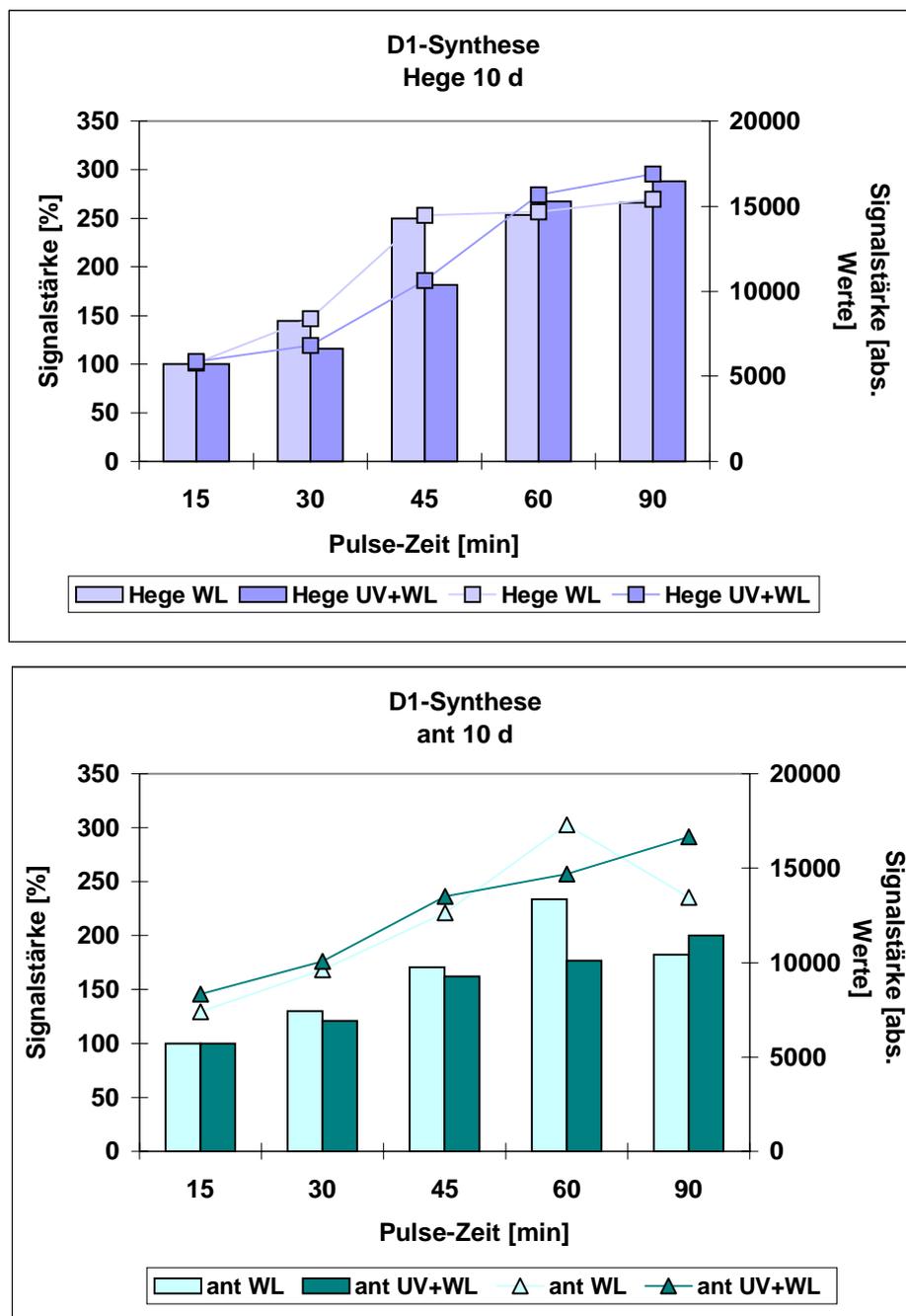


Abb. 3.50: D1-Synthese bei 10 d alten *Hege*- bzw. *ant*-Primärblattsegmenten. Vergleich von Muttervarietät bzw. Mutante unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen (helle Farben = WL-Anzucht, dunkle Farben = UV+WL-Anzucht). Die Proben wurden jeweils auf einem Gel aufgetrennt. Die durch Linien verbundenen Symbole geben die absolute Signalstärke nach Densitometrie der Autoradiogramme wieder. Die relative Zunahme der Signalstärke wird durch die Balken wiedergegeben (15 min = 100%).

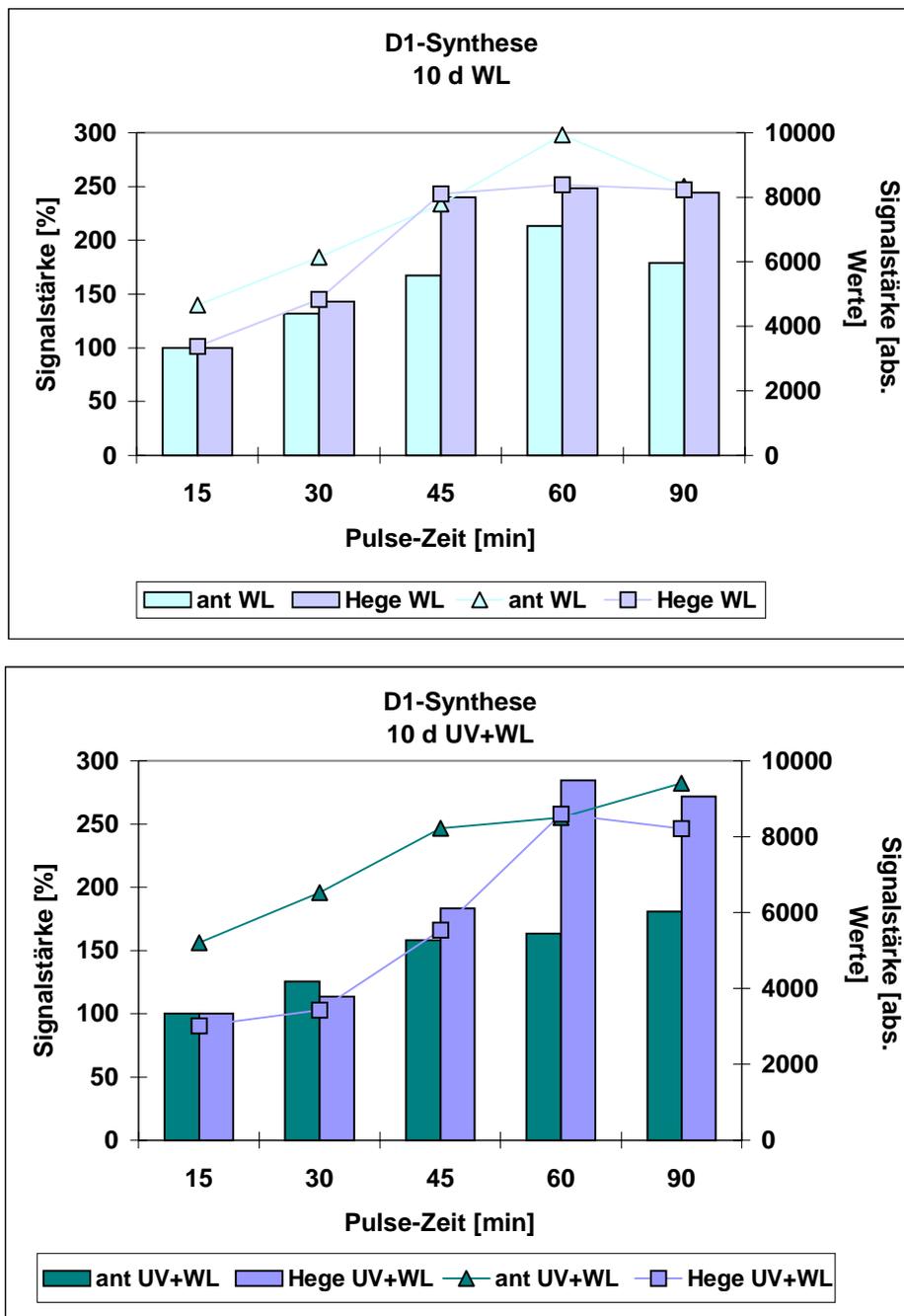


Abb. 3.51: D1-Synthese bei 10 d alten Hege- und ant-Primärbblattsegmenten. Vergleich von Muttervarietät und Mutante unter den jeweils gleichen Bestrahlungsbedingungen (helle Farben = WL-Anzucht, dunkle Farben = UV+WL-Anzucht). Die Proben wurden jeweils auf einem Gel aufgetrennt. Die durch Linien verbundenen Symbole geben die absolute Signalstärke nach Densitometrie der Autoradiogramme wieder. Die relative Zunahme der Signalstärke wird durch die Balken wiedergegeben (15 min = 100%).

betrug die relative Zunahme nach 1 h Einbauzeit 234 % vs. 184 % unter WL-Bedingungen; der absolute Signalstärkewert lag in dieser Zeit bei UV+WL um 18 % höher als bei WL. Der Unterschied bei *ant* UV+WL gegenüber *ant* WL fiel wesentlich geringer aus. Die absoluten Endwerte unterschieden sich um 9 % zugunsten der UV+WL-Probe, was einen Zuwachs-Unterschied von 16 % darstellte (UV+WL 144 %, WL 126 % Zuwachs).

Der direkte Vergleich von *ant* und *Hege* wies unter beiden Bestrahlungsbedingungen eine etwas höhere Einbaurrate bei *ant* aus (Abb. 3.53). Unter WL-Bedingungen wies *Hege* eine höhere relative Zunahme auf (142 % vs. 121 % bei *ant*), der absolute Signalwert für *ant* nach 60 min Einbauzeit lag um 27 % über dem für *Hege*. Unter UV+WL-Bedingungen wichen die Ergebnisse für *Hege* deutlich voneinander ab, obwohl es sich um Aliquots der gleichen Proben handelte. Beim Vergleich von *Hege* WL mit *Hege* UV+WL lag die relative Zunahme nach Auswertung der Autoradiogramme bei 234 % für *Hege* UV+WL (s. Abb. 3.52), beim Vergleich von *Hege* UV+WL mit *ant* UV+WL betrug die relative Zunahme für *Hege* nur 143 % (Abb. 3.53). Obwohl aufgrund der densitometrischen Auswertungsmethode ein Vergleich der absoluten Signalstärken zwischen verschiedenen Autoradiogrammen nur vorsichtig bewertet werden kann, zeigte der Vergleich der absoluten Signalstärken auf den vier Gelen eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür, dass die hohe Zunahme von 234 % von einem zu geringen 100 %-Wert ausgeht, d.h. die relative Zunahme liegt wahrscheinlich niedriger; eine genauere Quantifizierung ist jedoch nicht möglich. Die Syntheserate UV+WL-bestrahlter *ant*-Segmente unterschied sich im direkten Vergleich nicht von *Hege*; sie wies einen Zuwachs von 141 % auf.

Zusammenfassung: 7, 10 und 15 d alte Blattsegmente von *Hege* und *ant* lieferten keinen Hinweis darauf, dass unter UV+WL-Bestrahlung die Syntheserate des D1-Proteins negativ beeinflusst wird. Im direkten Vergleich der unterschiedlich bestrahlten Segmente fanden sich weder bei der Muttervarietät noch bei der Mutante deutliche Unterschiede in der Syntheserate. Es zeichnete sich aber ähnlich wie beim D1-Proteinturnover ein entwicklungsabhängiger Trend ab, wonach mit zunehmendem Blattalter die D1-Syntheserate geringfügig zunimmt. Wegen der nicht eindeutig quantifizierbaren Daten bei den 15 d alten *Hege*-Segmenten war der Trend bei *Hege* weniger deutlich als bei *ant*.

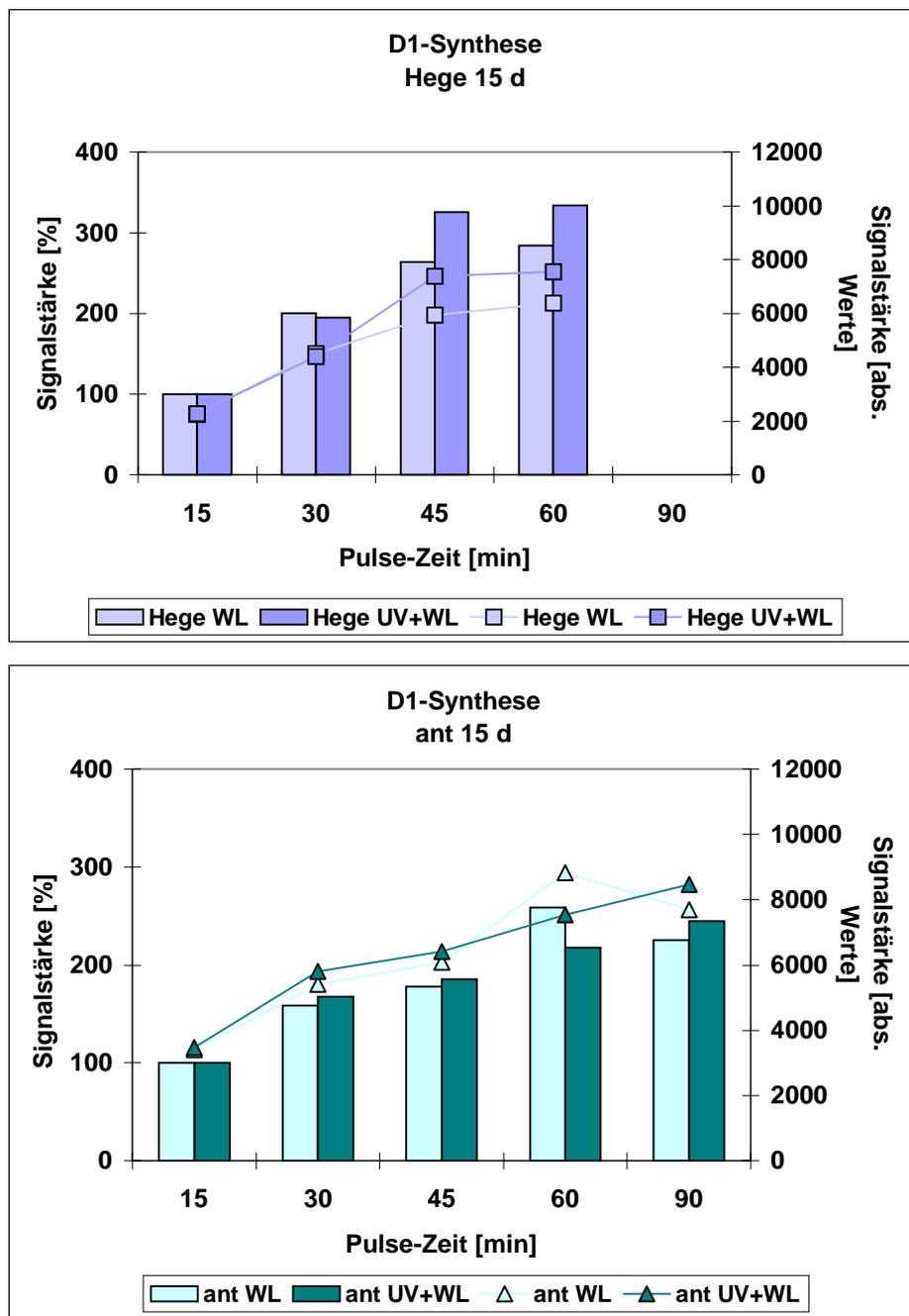


Abb. 3.52: D1-Synthese bei 15 d alten *Hege*- bzw. *ant*-Primärblattsegmenten. Vergleich von Muttervarietät bzw. Mutante unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen (helle Farben = WL-Anzucht, dunkle Farben = UV+WL-Anzucht). Die Proben wurden jeweils auf einem Gel aufgetrennt. Die durch Linien verbundenen Symbole geben die absolute Signalstärke nach Densitometrie der Autoradiogramme wieder. Die relative Zunahme der Signalstärke wird durch die Balken wiedergegeben (15 min = 100%).

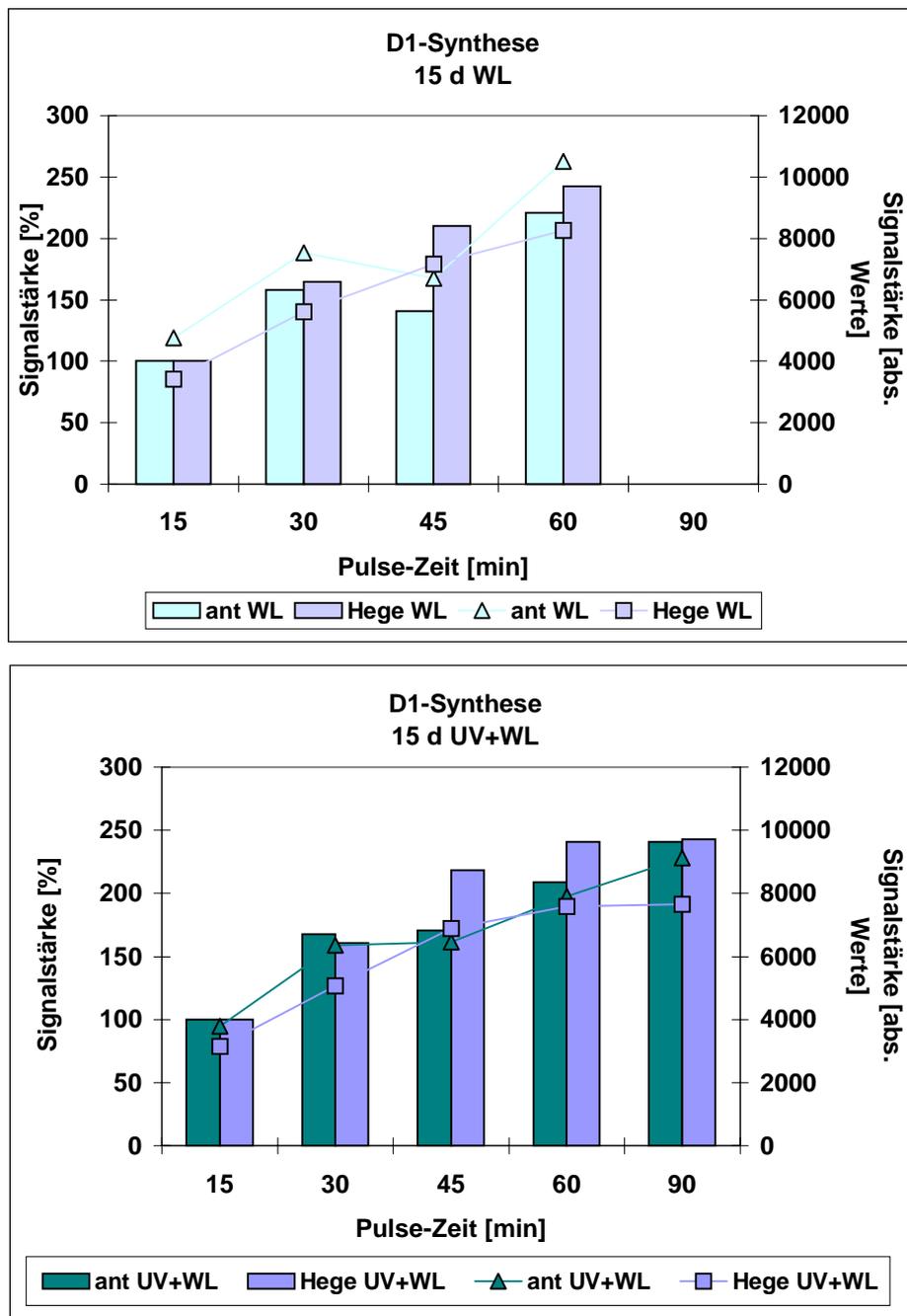


Abb. 3.53: D1-Synthese bei 15 d alten *Hege*- und *ant*-Primärblattsegmenten. Vergleich von Muttervarietät und Mutante unter den jeweils gleichen Bestrahlungsbedingungen (helle Farben = WL-Anzucht, dunkle Farben = UV+WL-Anzucht). Die Proben wurden jeweils auf einem Gel aufgetrennt. Die durch Linien verbundenen Symbole geben die absolute Signalstärke nach Densitometrie der Autoradiogramme wieder. Die relative Zunahme der Signalstärke wird durch die Balken wiedergegeben (15 min = 100%).

3.5 Anhang

Tabellarische Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Jürgen Brückmann (1998): Unter den in vorliegender Arbeit beschriebenen Anzucht- und Bestrahlungsbedingungen (WL bzw. UV+WL) wurden Untersuchungen zum Wachstum, zum Phenylpropanstoffwechsel und zum photosynthetischen Gaswechsel vorgenommen. Bei den Untersuchungen zum Wachstum wurde zusätzlich das Trockengewicht bzw. der Wassergehalt der Primärblattsegmente bestimmt. Bei der Betrachtung der Phenylpropane im Primärblatt beider Varietäten wurde zusätzlich zum Flavonoidstoffwechsel eine differenzierte qualitative und quantitative Untersuchung der löslichen und zellwandgebundenen Hydroxycimtsäure-Ester 7 d und 10 d alter Primärblattsegmente durchgeführt.

		Alter 7 d							
		<i>Hege</i>				<i>ant 287</i>			
		WL	UV+WL	Zu/Abnahme (%)	Signifikanz	WL	UV+WL	Zu/Abnahme (%)	Signifikanz
Allgemeine Wachstumsparameter	Pb-Länge (cm)	7,7 ± 0,5	7,1 ± 0,7	-8	*	6,8 ± 0,5	5,7 ± 0,5	-16	*
	Pb-Frischgewicht (mg)	108 ± 14	105 ± 16	-3	-	87 ± 11	77 ± 14	-11	*
	Pb-Trockengewicht (mg)	9,0 ± 1,2	9,2 ± 1,4	+2	-	7,5 ± 1,0	7,1 ± 1,0	-5	-
	Pb-Wassergehalt (mg)	99 ± 13	95 ± 15	-4	-	79 ± 10	70 ± 13	-11	**
Phenylpropane	Flavonoide (nmol·Pb ⁻¹)	231 ± 16,4	378 ± 32,6	+64	n.b.	6,1 ± 0,4	9,0 ± 0,6	+48	n.b.
	lösliche HCAs (nmol·Pb ⁻¹)	41,6 ± 6,2	54,7 ± 0,3	+31	n.b.	34,7 ± 1,4	40,2 ± 0,3	+16	n.b.
	unlösliche HCAs (nmol·Pb ⁻¹)	52,7 ± 1,8	65,9 ± 2,9	+25	n.b.	38,1 ± 2,8	36,9 ± 2,0	-3	n.b.
Photosyntheseleistung	CO ₂ -Assimilation A_{max} (μmol CO ₂ ·g ⁻¹ ·Chl·s ⁻¹)	92,6 ± 4,8	83,0 ± 3,6	-10	*	94,1 ± 7,8	72,4 ± 5,6	-23	*
	CO ₂ -Assimilation A_{max} (μmol CO ₂ ·m ⁻² ·s ⁻¹)	11,9 ± 0,6	13,6 ± 1,0	+14	*	11,3 ± 0,9	10,6 ± 1,2	-6	-
	Photosynthesekapazität P_m (μmol O ₂ ·m ⁻² ·s ⁻¹)	19,6 ± 0,7	15,7 ± 0,6	-20	n.b.	19,0 ± 0,7	15,5 ± 0,7	-18	n.b.
	Quantenausbeute QY (μmol O ₂ ·μmol ⁻¹ Photonen)	0,0479 ± 0,0011	0,0445 ± 0,0026	-7	n.b.	0,0446 ± 0,0010	0,0463 ± 0,0025	+4	n.b.
	Chlorophyll-Gehalt (μg Chl·cm ⁻²)	12,8 ± 0,7	16,4 ± 1,6	+28	*	12,1 ± 1,4	14,6 ± 0,9	+21	*

Tab. 3.7: Ergebnisse der Untersuchung zum Wachstum, Phenylpropanstoffwechsel und photosynthetischem Gaswechsel an 7 d alten *Hege* und *ant*-Primärblättern aus der Diplomarbeit von Jürgen Brückmann (1998). Die Trocknung der ganzen Primärblätter erfolgte bei 60° C über 48 h. Die Bestimmung der löslichen Hydroxyzimtsäure-Ester erfolgte nach alkalischer Hydrolyse aus methanolischen Rohextrakten. Zellwandgebundene Hydroxyzimtsäure-Ester wurden ebenfalls durch alkalische Hydrolyse gewonnen. Die qualitative und quantitative Analyse der Zimtsäuren erfolgte via HPLC. Die CO₂-Messungen erfolgten mit einem portablen CO₂/H₂O-Porometer LCA-2 an apikalen Primärblattsegmenten unter Raumtemperatur (25±1 °C) und einem CO₂-Partialdruck von 500±50 vpm. Die Messung der maximalen CO₂-Austauschrate erfolgte bei einer Bestrahlung mit 2000 μE·m⁻²·s⁻¹. Die photosynthetische O₂-Entwicklung wurde polarographisch mit Hilfe der O₂-Blattstückelektrode LD1 ermittelt. Signifikanz: * $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,05$; - nicht signifikant; n.b. = aufgrund nicht ausreichender Stichprobenanzahl nicht bestimmt.

		Alter 10 d							
		<i>Hege</i>				<i>ant 287</i>			
		WL	UV+WL	Zu/Abnahme (%)	Signifikanz	WL	UV+WL	Zu/Abnahme (%)	Signifikanz
Allgemeine Wachstumsparameter	Pb-Länge (cm)	13,1 ± 0,8	11,4 ± 0,7	-13	*	12,1 ± 0,6	9,1 ± 1,1	-25	*
	Pb-Frischgewicht (mg)	175 ± 24	167 ± 22	-5	**	161 ± 16	135 ± 14	-16	*
	Pb-Trockengewicht (mg)	15,5 ± 2,4	15,3 ± 2,1	-1	-	13,2 ± 1,4	12,1 ± 1,2	-8	*
	Pb-Wassergehalt (mg)	160 ± 21	152 ± 15	-5	**	148 ± 15	122 ± 13	-18	*
Phenylpropane	Flavonoide (nmol·Pb ⁻¹)	384 ± 23	627 ± 15	+63	n.b.	11,6 ± 0,9	17,2 ± 1,4	+48	n.b.
	lösliche HCAs (nmol·Pb ⁻¹)	54,4 ± 4,5	68,1 ± 1,2	+25	n.b.	33,3 ± 3,1	56,1 ± 2,6	+68	n.b.
	unlösliche HCAs (nmol·Pb ⁻¹)	132,2 ± 9,9	124,1 ± 11,9	-6	n.b.	105,1 ± 3,5	77,7 ± 10,7	-26	n.b.
Photosyntheseleistung	CO ₂ -Assimilation A_{\max} (μmol CO ₂ ·g ⁻¹ ·Chl ·s ⁻¹)	76,3 ± 7,5	68,7 ± 7,9	-10	*	88,7 ± 6,4	74,7 ± 5,6	-16	*
	CO ₂ -Assimilation A_{\max} (μmol CO ₂ ·m ⁻² ·s ⁻¹)	12,7 ± 0,7	12,5 ± 0,8	-2	-	12,9 ± 0,6	12,6 ± 0,8	-2	-
	Photosynthesekapazität P_{\max} (μmol O ₂ ·m ⁻² ·s ⁻¹)	15,7 ± 0,6	18,1 ± 0,6	+15	n.b.	18,5 ± 0,6	19,7 ± 0,6	+6	n.b.
	Quantenausbeute QY (μmol O ₂ ·μmol ⁻¹ Photonen)	0,0483 ± 0,0008	0,0503 ± 0,0024	+4	n.b.	0,0480 ± 0,0010	0,0471 ± 0,0014	-2	n.b.
	Chlorophyll-Gehalt (μg Chl·cm ⁻²)	16,9 ± 2,2	18,5 ± 2,6	+9	-	14,6 ± 1,0	16,9 ± 1,3	16	*

Tab. 3.8: Ergebnisse der Untersuchung zum Wachstum, Phenylpropanstoffwechsel und photosynthetischem Gaswechsel an 10 d alten *Hege* und *ant*-Primärblättern aus der Diplomarbeit von Jürgen Brückmann (1998). Signifikanz: * $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,05$; - nicht signifikant; n.b. = aufgrund nicht ausreichender Stichprobenanzahl nicht bestimmt

4 DISKUSSION

4.1 Methoden

4.1.1 Bestrahlungsbedingungen

Mit der Entdeckung des sogenannten "Ozonlochs" und der damit verbundenen Erkenntnis, dass der Abbau stratosphärischen Ozons - verursacht durch anthropogene Einflüsse - zu einer qualitativen und quantitativen Zunahme von UV-B-Strahlung auf der Erde führt, wurde das Forschungsinteresse auf die Frage gelenkt, welche Auswirkungen dies auf Pflanzen hat, insbesondere auf Wachstum und Ertrag von Kulturpflanzen. Dabei wurden von Anfang an zwei Versuchsstrategien verfolgt: a) die Untersuchung von UV-Effekten direkt im Freiland und b) die Untersuchung von UV-Effekten unter kontrollierten Versuchsbedingungen in Gewächshäusern oder Pflanzenanzuchtkammern.

Bei den Freilandstudien kann man zwei experimentelle Ansätze unterscheiden:

- a) der Vergleich des Einflusses von ambienter UV-B-Strahlung auf Pflanzen im Vergleich zum Ausschluss dieser Strahlung mittels geeigneter, UV-absorbierender Folien oder
- b) die Simulation einer durch Berechnungen zum erwarteten Ozonabbau ermittelten erhöhten UV-B-Strahlung durch künstliche UV-B-Strahlungsquellen. Mit dem ersten Versuchsansatz lassen sich ökologische Fragestellungen nur bedingt verfolgen, da der Ausschluss von UV-Strahlung keine Naturrelevanz hat; es lassen sich aber mechanistische Fragestellungen verfolgen, die beispielsweise Eingang finden können bei der Auswahl verschiedener Pflanzenrassen oder -kultivare zur Weiterzucht. Die Simulation erwarteter Umweltszenarien läßt direkte Einblicke auf mögliche Veränderungen zu, ist aber zum einen sehr kostenintensiv und beinhaltet wie bei allen Freilandstudien den Nachteil, dass man den Einfluss eines einzelnen Faktors, z.B. UV-B-Strahlung, nur schwer bestimmen kann.

Die Untersuchung ökologischer Fragestellungen in kontrollierten Umgebungen an einem Modellsystem ist eine Alternative zur Freilandstudie. Hier kann der Einfluss eines einzelnen Umweltparameters genau studiert werden. Allerdings birgt dieser Ansatz den Nachteil, dass die Ergebnisse nur mit Vorsicht auf Freilandbedingungen zu übertragen sind, da die wechselseitige Beeinflussung aller im Freiland wirkenden Faktoren ausgeschlossen wird. Viele Untersuchungen zum Einfluss von erhöhter UV-B-Strahlung auf Pflanzen wurden in

Kammern und Gewächshäusern durchgeführt und die Ergebnisse als umweltrelevant dargestellt. Caldwell & Flint (1994) haben ca. 300 solcher Untersuchungen verglichen und festgestellt, dass in einer Vielzahl dieser Untersuchungen die beschriebenen Bestrahlungsbedingungen bestenfalls eine vorsichtige Übertragung der Ergebnisse auf Bedingungen im Freiland zulassen. Insbesondere das Verhältnis von UV-Strahlung zu PAR-Strahlung wurde in vielen Untersuchungen nicht beachtet; oft wurden Ergebnisse unter Schwachlichtbedingungen auf erwartete Szenarien bei erhöhtem Ozonabbau übertragen. Gezielte vergleichende Untersuchungen zum Einfluss erhöhter UV-B-Strahlung auf Pflanzen unter unterschiedlichen PAR-Strahlungsbedingungen konnten jedoch zeigen, dass die PAR-Hintergrundstrahlung für die Ausprägung der UV-Effekte bedeutsam ist (Cen & Bornman 1990; Caldwell et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von erhöhter UV-B-Strahlung auf die Photosynthese im Gersten-Primärblatt unter Berücksichtigung der Schutzfunktion UV-absorbierender, epidermal lokalisierter Phenylpropane in einer Pflanzenanzuchtkammer untersucht werden. Dabei sollten die experimentellen Bedingungen möglichst naturnah sein, wobei hier von vorne herein klare Einschränkungen in Kauf genommen werden mussten. Dies betrifft besonders die Nachahmung der natürlichen Strahlung. In den Solarkammern der Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF) in Oberschleißheim bei München konnte mit einem enormen technischen Aufwand die Simulation der natürlichen Strahlung erreicht werden (Seckmeyer & Payer 1993); im Rahmen unserer technischen Möglichkeiten wurden die Strahlungsbedingungen so gewählt, dass die PAR-Strahlung mit $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deutlich im naturrelevanten Bereich lag. Messungen im Botanischen Garten der Universität Köln von R. Schmitz konnten solche Strahlungsintensitäten an einem sonnigen, wenn auch dunstigen Tag Ende April 1996 bestätigen (persönliche Mitteilung). Die UV-B-Strahlungsqualität konnte durch die Auswahl geeigneter absorbierender Folien dem natürlichen Strahlungsspektrum angepaßt werden. Da die Folien unter dem Einfluss der UV-Strahlung ihre spektralen Eigenschaften verändern, wurden sie wöchentlich ausgetauscht, so dass das UV-B-Spektrum für die Pflanzen konstant blieb. Die UV-B-Bestrahlungsintensität war mit $12 \text{ kJ UV-B}_{(\text{BE})} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ sehr hoch im Hinblick auf die Belastung in unseren Breitengraden, lag aber durchaus im Bereich natürlicher UV-B-Strahlung in stärker UV-belasteten Gegenden (Bachelet et al. 1991, Braun 1990). Technisch nicht zu beseitigen war die Inhomogenität des Bestrahlungsfeldes (Abb. 2.4). Nur ein kleiner Teil der gesamten Stellfläche wurde gleichmäßig mit der höchsten PAR- und UV-B-Bestrahlungsintensität versorgt. In den Fällen,

in denen dieser Platz für die Pflanzen nicht ausreichte, wurden die Anordnung der Töpfe täglich gewechselt, so dass im Schnitt alle Pflanzen die gleiche UV-Belastung erfuhren.

Eine zusätzliche Annäherung an naturnahe Strahlungsbedingungen konnte dadurch gewonnen werden, dass die Strahlungsintensität in der Kammer in sechs Stufen regelbar war. Auf diese Weise wurden die Pflanzen nicht einer sofortigen hohen Bestrahlungsintensität nach der Nacht- bzw. Dunkelphase ausgesetzt, sondern einer zunehmenden Lichtintensität am Morgen bzw. einer abnehmenden am Abend.

Die Temperatur- und Luftfeuchtebedingungen wurden bewusst konstant gehalten, damit ein zusätzlicher mikroklimatischer Effekt auf die Pflanzen ausgeschlossen werden konnte. Dennoch wurden die Einstellungen der beiden Parameter mit tatsächlich gemessenen Werten abgeglichen. Die gewählten Tages- und Nachtbedingungen entsprachen Durchschnittswerten, die vom Deutschen Wetterdienst im April 1993 registriert worden waren.

Insgesamt konnten auf diese Weise Versuchsbedingungen geschaffen werden, die im Rahmen der technischen Möglichkeiten eine Simulation naturnaher Frühjahrsbedingungen ermöglichte. Diese erheblich verbesserten experimentellen Versuchsbedingungen machten eine realistischere, d.h. eine an natürlichen Lebensbedingungen orientierte Einschätzung des Einflusses erhöhter UV-B-Strahlung auf die Photosynthese möglich.

4.1.2 Pflanzenmaterial

Alle Untersuchungen wurden mit definierten Primärblattsegmenten durchgeführt. Jedes dieser 1.5 cm langen Segmente begann 1 cm unterhalb der Blattspitze. 5 d alte Primärblätter bildeten eine Ausnahme: aufgrund ihrer geringen Blattlänge wurde das 1.5 cm lange Segment direkt ab der Blattspitze verwendet. Die Untersuchung des Gesamtblattes bot sich nicht an, da das Gramineenblatt durch einen entwicklungsphysiologischen Gradienten charakterisiert ist mit einer zunehmenden Ausdifferenzierung von apikal nach basal. Mit der Auswahl des apikalen Blattsegmentes wurde der jeweils am weitesten differenzierte Teil des Blatts berücksichtigt.

4.1.3 D1-Extraktion und D1-Gehalt

Bei der Auswahl der Methode zur Isolierung des D1-Proteins wurde aus der Vielzahl der Möglichkeiten die Methode von Hertwig et al. (1992) ausgewählt, da diese bereits an Roggen-Primärblattsegmenten etabliert worden war und zudem ein einfaches Protokoll enthielt. Die Anwendbarkeit auf Gerste erwies sich als problemlos; nach Auftrennung der Proteine aus einer angereicherten Thylakoidfraktion konnte das D1-Protein problemlos von einem spezifischen Antikörper erkannt werden. Allerdings wurde das Protokoll von Hertwig et al. (1992) insofern abgeändert, als der Solubilisierungsschritt mit Decyl-Maltosid nicht weiter verfolgt wurde, nachdem sich in einem Vergleich mit mehreren Detergenzien gezeigt hatte, dass man Aliquots der Thylakoidsuspension direkt mit Probenpuffer versetzen konnte.

Unerwartet problematisch erwies sich die Interpretation der Daten zum D1-Proteingehalt in einzelnen Blattsegmenten. Obwohl sich die Extraktionsmethode als grundsätzlich geeignet erwiesen hatte und die Identifikation mit dem spezifischen D1-Antikörper unproblematisch war, zeigten Parallelproben auf verschiedenen Blots zum Teil deutlich unterschiedliche Signale. Da die auf den Gelen aufgetragenen Aliquots aus der gleichen Probe entnommen wurden und alle Proben der gleichen Extraktionsprozedur unterlagen, konnte keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden. Daher wurde bei allen densitometrischen Auswertungen, d.h. bei den Auswertungen der Immunoblots wie auch der Autoradiogramme, so vorgegangen, dass nur Proben auf gleichen Gelen, Blots oder Autoradiogrammen direkt verglichen wurden. Die densitometrischen Ergebnisse verschiedener Blots oder Autoradiogramme wurden auch bei Auftragung identischer Proben nicht verglichen bzw. in Einzelfällen mit Vorsicht interpretiert (z.B. bei der D1-Synthese).

4.2 Flavonoidakkumulation und epidermale UV-Absorptionskapazität im apikalen Blattsegment von Gersten-Primärblättern

4.2.1 Flavonoidakkumulation

Unter beiden Bestrahlungsbedingungen (WL bzw. UV+WL) zeigten die Muttervarietät *Hege* und die Mutante *ant* im Lauf der Blattentwicklung ein konstantes Phenylpropanmuster, das sich nur quantitativ mit steigendem Blattalter änderte. Es entsprach dem von Reuber et al.

(1996a) beschriebenen phenolischen Inhaltsstoffmuster. In der Muttervarietät *Hege* akkumulierten im wesentlichen Flavonoide, von denen Saponarin als Hauptsubstanz auszumachen war. Unter UV+WL-Bedingungen nahm der Gehalt an Flavonoiden deutlich zu, wobei neben Saponarin vor allem Lutonarin stark akkumulierte (Abb. 3.6). Die Mutante *ant* zeichnete sich durch einen deutlich reduzierten Anteil an Flavonoiden aus. Reuber et al. (1997) vermuteten einen Defekt der Chalkon-Isomerase, da die Mutante eine Substanz anreichert, die in der Muttervarietät nicht auftaucht und die als Isosalipurposid (= 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxychalkon-2'-O- β -glucopyranosid) identifiziert wurde. Isosalipurposid war mit einem Anteil von ca. 40 % am Gesamtgehalt aller phenylpropanoiden Verbindungen Hauptsubstanz in der Mutante. Saponarin und Lutonarin konnten ebenfalls detektiert werden, allerdings in sehr viel geringeren Mengen als bei der Muttervarietät (Abb. 3.7 und 3.10).

Die Zunahme der Gerstenflavonoide erfolgt entwicklungs- und lichtabhängig (Blume & McClure 1979, Liu et al. 1995, diese Arbeit). Unter WL-Bedingungen nahm der Gehalt an Flavonoiden in den apikalen *Hege*-Blattsegmenten bis zum 15. Tag kontinuierlich zu, was im wesentlichen auf eine Steigerung des Saponaringehaltes zurückzuführen war. Unter Einfluss der zusätzlichen UV-B-Strahlung stieg der Gesamtgehalt an UV-absorbierenden Substanzen noch weiter an. Der Zuwachs betrug zwischen 50 und 100 % je nach Alter des Blattsegmentes, wobei die ganz jungen, 5 d alten Blattsegmente einen noch höheren transienten Zuwachs von ca. 125 % aufwiesen (Abb. 3.8). Diese Größenordnung entsprach etwa der, die auch Liu et al. (1995) bei ihren Untersuchungen an Gerste cv. Atlas feststellen konnten. Relativ zum Saponarin nahm der Gehalt an Lutonarin unter den UV+WL-Bedingungen stärker zu, der Anteil an der Gesamtmenge blieb jedoch deutlich unter 20 %, während der Anteil des Saponarins unter beiden Bestrahlungsbedingungen zwischen 60 und 70 % lag. Liu et al. (1995) konnten in ihren Untersuchungen einen Saponarin-Anteil von 90 % ermitteln, was vielleicht sortenspezifisch ist.

Die Mutante *ant* wies unter WL-Bedingungen nur eine gering zunehmende Akkumulation an phenylpropanoiden Inhaltsstoffen auf. Die Hauptsubstanz Isosalipurposid nahm in den ersten Tagen stärker zu und fiel nach einer Plateauphase zwischen dem 7. und dem 10. Tag wieder auf das Anfangsniveau zurück. Der Anteil an Saponarin und auch Lutonarin nahm dagegen bis zum 15. Tag zu (Abb. 3.10). Möglicherweise wies der Rückgang an Isosalipurposid auf das Erreichen des entwicklungsbedingten Maximums in der Akkumulation der phenylpropanoiden Inhaltsstoffe hin. Da die Flavonoide nur durch autocyclische Umwandlung des

Chalkons zum Flavanon entstehen können (Reuber et al. 1997), nahm ihr Gehalt weiter zu auf Kosten des Chalkons. Liu et al. (1995) konnten in ihren Untersuchungen einen Rückgang der Flavonoidakkumulation unter WL-Bedingungen nach dem 15. Tag beobachten. Für die Muttervarietät *Hege* konnte in dieser Arbeit ein Einsetzen der Seneszenz nicht beobachtet werden; es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei der Mutante Entwicklungsprozesse früher beendet wurden bzw. Seneszenzerscheinungen früher eintraten als bei der Muttervarietät. Unter dem Einfluss der zusätzlichen UV-B-Strahlung nahm der Gehalt an phenylpropanoiden Substanzen zu. Relativ zum Gehalt der WL-Kontrolle lag der Zuwachs ähnlich hoch wie bei der Muttervarietät, nämlich zwischen 50 und 100 % (Abb. 3.11). Das läßt darauf schließen, dass die Anlieferung der Vorstufen bis hin zum Chalkon bei Muttervarietät und Mutante der gleichen UV-bedingten Induktion folgten. Dies wird unterstützt durch den Befund von Chalkonsynthase-Aktivität in der Mutante (Reuber 1996a). Die Akkumulationskurve für Isosalipurposid über den beobachteten Zeitraum glich der Kurve im Weißlicht, d.h. am 15. Tag ging der Gehalt auf das Anfangsniveau zurück, während die Gehalte von Saponarin und Lutonarin weiter stiegen. Auch in der Mutante *ant* stieg der Lutonaringehalt relativ viel stärker an als der Saponaringehalt. Jedoch blieb der Gesamtgehalt an phenylpropanoiden Substanzen in der Mutante *ant* weit hinter dem Gehalt der Muttervarietät *Hege* zurück; er bewegte sich unter beiden Bestrahlungsbedingungen zwischen 20 und 30 % (Abb. 3.12). Der Gesamtanteil an Flavonoiden (Saponarin und Lutonarin) betrug dabei im Maximum 12 %. Diese Daten decken sich mit den Inhaltsstoffanalysen aus ganzen Blättern von Reuber et al. (1996a), der die Absorption des methanolischen Gesamtextraktes von 7 d alten *Hege*- und *ant*-Pflanzen bei 310 nm verglich und für *ant* eine Absorptionskapazität von nur ca. 25 % verglichen mit *Hege* feststellte.

Neben den Flavonoiden und Isosalipurposid konnte Reuber (1996a) auch Hydroxyzimtsäuren in den methanolischen Extrakten von *Hege* und *ant* nachweisen. Brückmann (1998) untersuchte die nach alkalischer Hydrolyse freigesetzten löslichen und zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren (HCAs) an 7 und 10 d alten Primärblättern und fand zwei HCAs: Ferulasäure als Hauptkomponente und p-Cumarsäure als Nebenkomponente. In den *ant*-Primärblättern betrug der Anteil der Ferulasäure am Gesamtgehalt 16 %, bei *Hege* nur etwa 7 % (Tab. 3.7 und 3.8). Unter dem Einfluss der zusätzlichen UV-Strahlung erhöhte sich der Gehalt an löslichen Hydroxyzimtsäuren um knapp 70 % am 10. Tag; dies war wahrscheinlich die Folge einer UV-induzierten höheren PAL-Aktivität (Kalbin et al. 1997, Heller & Forkmann 1999) und einer damit verbundenen erhöhten Anlieferung von Vorstufen für die

Flavonoidbiosynthese, die bei der Mutante gestört war und zu einem Rückstau der Vorstufen führte. Dies war gleichbedeutend mit einer Erhöhung der molaren HCA-Konzentration im Primärblatt auf das Dreifache der molaren Flavonoidkonzentration. Da die Flavonoide im UV-B-Bereich eine relativ niedrige Absorption aufweisen, führte dies sicher zu einer gewissen Erhöhung des UV-Schutzes; die durch den quantitativen Unterschied im Flavonoidgehalt begründete höhere Absorptionskapazität im *Hege*-Primärblatt wurde auf diese Weise jedoch nicht ausgeglichen.

Der Anteil der zellwandgebundenen HCA-Ester am HCA-Gesamtpool im Primärblatt war sowohl bei *Hege* als auch bei *ant* höher als der Anteil an löslichen HCAs (Brückmann 1998). Ferulasäure stellte sich auch bei den zellwandgebundenen HCA-Estern als Hauptkomponente dar, der Anteil an p-Cumarsäure war sowohl bei *Hege* als auch bei *ant* wesentlich geringer. Im Gegensatz zu den löslichen HCAs blieb der Zuwachs unter Einfluss von UV am 7. Tag bei beiden Varietäten relativ gering und wies am 10. Tag sogar Einbußen auf. Diese Gehaltseinbußen koinzidierten mit der Reduktion der Blattlänge und können somit mit einer Reduktion des benötigten Zellwandmaterials erklärt werden.

4.2.2 Epidermale UV-Strahlungsabsorption

Die Unfähigkeit der *ant*-Mutante, Flavonoide in hohen Mengen als UV-Schutzsubstanz in der Epidermis zu akkumulieren, war nach Reuber (1996a) Ursache für eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-B-Strahlung. Die geringe Menge an phenolischen Inhaltsstoffen konnte mit einer hohen Penetration monochromatischer Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 310$ nm in das Mesophyll des Primärblattes korreliert werden; im Vergleich dazu wurde rund 90 % der monochromatischen Strahlung in der Epidermis des flavonoidreichen Primärblatts der Muttervarietät *Hege* absorbiert. Der entsprechende Anteil bei *ant* lag bei ca. 60 % epidermal absorbiert Strahlung. Mit einer neuen nicht-invasiven Technik auf der Basis von Fluoreszenz-Messungen (Bilger et al. 1997) sollte dieses Ergebnis verifiziert und für verschiedene Altersstadien der beiden Gerstenvarietäten die epidermale Absorption mit dem Gehalt an phenylpropanoiden Inhaltsstoffen korreliert werden.

4.2.3 Etablierung der Methode

Um zu belegen, dass mit dieser Methode eine Korrelation der epidermalen Strahlungsabsorption mit dem Gehalt an Phenylpropanen in den epidermalen Geweben möglich ist, wurde diese Methode vor Anwendung an der Gerste an Roggen-Primärblättern etabliert. Der Vorteil des Roggen-Primärblattes gegenüber der Gerste liegt in der strikten Gewebelokalisation zweier verschiedener Flavonoidgruppen sowie von HCA-Estern, wonach in der Epidermis ausschließlich die beiden Isovitexinderivate R3 und R4 zusammen mit den HCA-Estern zu finden sind, im Mesophyll ausschließlich die beiden Luteolinderivate R1 und R2 (Dellamonica et al. 1983, Schulz et al. 1985). Die beiden Substanzgruppen lassen sich per HPLC einfach detektieren und quantifizieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Akkumulation von R3 und R4 nicht nur entwicklungsabhängig gesteuert wird, sondern auch durch äußere Einflüsse wie z.B. UV-Strahlung stimuliert wird (Burchard 1994, Reuber et al. 1996b). Letzteres ist bei den Mesophyll-Flavonoiden nur in geringem Maß zu beobachten. Dadurch war es möglich, den Gehalt an epidermalen Flavonoiden abhängig vom Blattalter und durch Einsatz zusätzlicher UV-Strahlung zu variieren und die Chlorophyll-Fluoreszenz dieser Blätter nach Anregung mit UV-B-, UV-A- und sichtbarer Strahlung zu korrelieren.

Nach Anregung der Chlorophyll-Fluoreszenz mit UV-A-Strahlung erwiesen sich die Flavonoide als die verantwortlichen Substanzen für die Absorption der Strahlung in der Epidermis (Abb. 3.14). Dies galt im wesentlichen auch für die Absorption von UV-B-Strahlung, allerdings gab es offensichtlich eine Schwellenkonzentration an epidermal lokalisierten Flavonoiden, ab der diese Substanzen erst in der Lage waren, hauptverantwortlich die Strahlung zu absorbieren (Abb. 3.16). Unterhalb dieser Schwellenkonzentration wäre das Primärblatt nicht in der Lage, effektiven UV-Schutz durch epidermale Strahlungsabsorption zu leisten, wenn nicht eine zweite Substanzgruppe, nämlich lösliche Hydroxyzimtsäure-Ester diese Funktion übernähmen. Hydroxyzimtsäuren kommen im Roggen-Primärblatt ebenfalls ausschließlich epidermal vor und ergänzen bei geringen Flavonoidkonzentrationen die fehlende Absorptionskapazität des epidermalen Gewebes. Dies ist vor allem für ganz junge Pflanzen von außerordentlicher Bedeutung, wenn sie mit noch geringen Mengen an flavonoiden Schutzsubstanzen im Primärblatt aus der Coleoptile austreten und dem Einfluss der UV-Strahlung ausgesetzt sind.

Die Bedeutung der Hydroxyzimtsäuren für den UV-B-Schutz findet in der Literatur weniger Beachtung als die der Flavonoide, dennoch zeigen Untersuchungen an *Arabidopsis*-Mutanten, dass sie ebenso große Bedeutung haben können wie Flavonoide. Landry et al. (1995) und Sheahan (1996) kamen aufgrund ihrer Untersuchungen an den *Arabidopsis*-Mutanten *tt4*, *tt5* und *fah1* sogar zu dem Schluss, dass Sinapinsäureester für *Arabidopsis*-Pflanzen eine wichtigere UV-Schutzfunktion wahrnehmen als Flavonoide. Die *tt4*-Mutante zeichnet sich durch einen Defekt der Chalkon-Synthase aus, der zu einem geringen Flavonoidgehalt, aber hohem Gehalt an Sinapinsäure-Ester führt; die *tt5*-Mutante hat einen geringen Flavonoid- sowie Sinapinsäure-Estergehalt aufgrund eines Defekts der Chalkon-Isomerase und ein Defekt der Ferulasäure 5-Hydroxylase führt bei der *fah 1*-Mutante zu einem geringen Flavonoidgehalt ohne Sinapinsäure-Ester. Aus den präsentierten Daten wird nicht deutlich, in welchen Mengenverhältnissen sich Flavonoide und Sinapinsäureester - sofern vorhanden - in den verschiedenen Mutanten gegenüberstanden, so dass hier möglicherweise ein zu geringer Flavonoidgehalt Ursache für die vermeintlich überragende Bedeutung der Sinapinsäure war. Es bestätigt aber in jedem Fall die Tatsache, dass beide Substanzgruppen zusammen eine umfassendere UV-Absorptionskapazität aufweisen als Flavonoide allein. Noch deutlicher zeigt sich dies an Nadelbäumen, deren Blätter nach Day et al. (1993) bis zu 100 % UV-Absorption zeigen. Die Inhaltsstoffe von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* L. sind Flavonolglycoside, die mit jeweils zwei HCAs verestert sind und die unter dem Einfluss von erhöhtem UV-B zunehmen. Die intramolekulare Verbindung von Flavonolen und Zimtsäurederivaten erwies sich als effektiver in Bezug auf die UV-Absorption, insbesondere UV-B, als die von nicht-acylierten Flavonolen (Schnitzler et al. 1996, 1997; Fischbach et al. 1999).

4.2.4 Epidermale Strahlungsabsorption im Gersten-Primärblatt

Die Gerste zeichnet sich weder durch eine gewebespezifische Verteilung bestimmter Flavonoidgruppen aus, noch ist die genaue Verteilung des Hauptflavonoids Saponarin auf die Gewebetypen Epidermis und Mesophyll bekannt. Hinweise auf die Verteilung gaben Liu et al. (1995), wonach der Saponaringehalt in 8 d alten Primärblättern der Gerstensorte Atlas sich zu etwa gleichen Teilen auf Mesophyll und Epidermen aufteilte. In der Epidermis wiesen die Autoren eine Ungleichverteilung zugunsten eines Anteils von 40 % in der abaxialen Epidermis und nur 10 % in der adaxialen Epidermis auf. Dies konnte in der vorliegenden

Arbeit bei ganz jungen Blattsegmenten (5 d, 6 d) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt): tendenziell wiesen die jüngeren Blattsegmente höhere Absorptionswerte in der abaxialen Epidermis auf, allerdings in einem geringeren Verhältnis. Diese Unterschiede verschwanden mit zunehmendem Blattalter. Die Regressionsanalyse zur Korrelation der phenolischen Inhaltsstoffe mit der epidermalen Strahlungsabsorption erfolgte auf der Grundlage der Absorptionsmittelwerte von abaxialer und adaxialer Epidermis, da auch die Phenylpropangehalte Mittelwerte darstellten, in die allerdings auch der im Mesophyll lokalisierte Anteil mit einging. Aus den Ergebnissen der Roggenversuche war deutlich geworden, dass die Roggen-Mesophyllflavonoide keinen Einfluss auf die Absorption der UV-Strahlung haben. Da die Regressionsanalyse für die Gersten-Blattsegmente auf der Grundlage des Gesamtgehaltes aller Phenylpropane ebenso gute Korrelationskoeffizienten auswies wie die aus den Roggenexperimenten (Abb. 3.19), ist anzunehmen, dass die Zunahme der Flavonoide unter UV-Einfluss im wesentlichen in den Epidermen erfolgt und weniger im Mesophyll. Eine mögliche Alternative wäre auch eine vermehrte Akkumulation von Mesophyll-Flavonoiden im subepidermalen Bereich, wo ins Mesophyll eindringende UV-Strahlung frühzeitig absorbiert werden kann und somit die Fluoreszenzausbeute reduziert. Der vermutete Defekt der Chalkon-Isomerase bei der Mutante *ant* hatte nach den Ergebnissen der Regressionsanalyse keinen Einfluss auf die UV-Strahlungsabsorption. Die Daten bestätigten die micro-fibre-Untersuchungen von Reuber (1996a); die epidermale Strahlungsabsorption in der Muttervarietät *Hege* ist doppelt so hoch wie bei der Mutante *ant*.

Die Bedeutung der Zimtsäuren für den UV-Schutz im jungen Gersten-Primärblatt wurde aus den Daten nicht so deutlich sichtbar wie bei den Roggenprimärblättern, da auch die Zuordnung der HCA-Ester im Gersten-Primärblatt auf der Gewebeebene nicht klar ist. Die Daten von Brückmann (1998) ließen vermuten, dass sie in der Mutante eine höhere Bedeutung haben könnten, da der Anteil an Zimtsäuren gegenüber den Flavonoiden höher war als bei der Muttervarietät. Diesem Umstand trägt wahrscheinlich die Tatsache Rechnung, dass die Regressionsgerade bei *ant* dem Koordinatenursprung deutlich näher kommt als bei *Hege*, d.h. dass der relativ höhere Anteil an HCA-Estern die Absorptionslücke der fehlenden Flavonoide schließt (Abb 3.15). Das Absorptionsspektrum von Isosalipurposid weist allerdings auch eine deutliche UV-B-Absorption auf (s. Reuber et al. 1997), die aufgrund der höheren Stoffmenge hier mitgewirkt haben könnte. Dagegen läßt der Verlauf der Regressionsgeraden bei *Hege* eine ähnliche UV-Funktion der Hydroxymimtsäure-Derivate in jüngeren Blättern wie bei Roggen nicht vermuten.

In jüngerer Zeit wird zunehmend ein weiterer Aspekt diskutiert, der auch für die Akkumulation des Flavonoids Lutonarin in der Gerste zutreffen könnte. Die Tatsache, dass Lutonarin unter dem Einfluss der UV-B-Strahlung relativ stärker zunahm als Saponarin, deutet auf eine Funktion hin, die nicht direkt mit der Strahlungsabsorption verbunden ist. Markham et al. (1998a, 1998b) konnten an UV-B-bestrahltem Lebermoos (*Marchantia polymorpha*) und Reis (*Oryza sativa* L.), Olsson et al. (1998) an *Brassica napus* eine Verschiebung im Gehalt von Flavonoiden zugunsten solcher Substanzen ausmachen, die eine ortho-dihydroxy-Gruppe aufwiesen. Dies ist bei Lutonarin der Fall. Da die Absorptionsspektren von Lutonarin und Saponarin keine wesentliche Unterschiede im UV-B-Bereich aufweisen, wird angenommen, dass die bessere Effizienz der ortho-dihydroxy-Substanzen als Radikalfänger einen erhöhten Schutz vor UV-bedingtem oxidativem Stress bieten (Tournaire et al. 1993, Hu et al. 1995) oder dass sich diese Substanzen durch eine effektivere Energiedissipation auszeichnen.

4.3 Wachstum der Gersten-Primärblattsegmente unter Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung

Aufgrund der veränderten experimentellen Anzuchtbedingungen in dem neu eingerichteten Pflanzenanzuchtschrank konnte auf bereits bekannte Wachstumsdaten nicht zurückgegriffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur zwei ausgewählte Wachstumsparameter berücksichtigt; eine detailliertere Untersuchung des Wachstums wurde von Jürgen Brückmann (1998) in der Arbeitsgruppe von Prof. Weißenböck durchgeführt. Darin wurden neben der Blattlänge und dem Blatt-Frischgewicht auch das Blatt-Trockengewicht bzw. der Wassergehalt der Blätter von 5, 7 und 10 d alten Primärblättern unter WL- bzw. UV+WL-Bedingungen berücksichtigt.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene, mit steigender UV-Bestrahlung zunehmende Blattlängenreduktion bei beiden Gerstevarietäten (Abb. 3.2) bestätigt den Befund von Brückmann und anderen (Gerste: Diplomarbeit Sebastian Reuber 1991; Roggen: Diplomarbeit Petra Burchard 1994; Diplomarbeit Rainer Schmitz 1995). Letztere Ergebnisse wurden unter gleicher UV-B-Belastung, allerdings unter sehr viel geringerer PAR-Intensität (ca. $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erzielt. Reuber (1996a) konnte in ersten Experimenten mit der Mutante und der Muttervarietät an 7 d alten Primärblättern ebenfalls UV-bedingte Längenunterschiede bei -

mit den in vorliegender Arbeit gewählten - annähernd vergleichbaren experimentellen Strahlungsbedingungen zeigen. Offensichtlich führt eine beinahe zehnfach erhöhte PAR-Hintergrundstrahlung ($750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nicht zu einer Milderung der Wachstumsdefizite unter UV-B-Einfluss. Dies gilt offenbar nicht für alle Gerstevarietäten. Liu et al. (1995) konnten unter geringerer PAR-Bestrahlung bei vergleichbaren UV-B_(BE)-Tagesdosen ($13,56 \text{ kJ m}^{-2}$) ein langsames Wachstum für 6 bis 9 d alte Gersten-Primärblätter der Varietät Atlas ausmachen, die allerdings am 10. Tag keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle aufwies.

Die Differenzen in der Blattlänge von UV+WL-bestrahlten *ant*-Primärblättern im Vergleich zu den WL-Kontrollen war größer als bei *Hege*. Dies konnte nicht allein einem UV-Effekt zugeschrieben werden. Die Mutante zeigte schon unter Kontrollbedingungen eine langsamere Wachstumsrate, konnte aber mit zunehmendem Blattalter die Unterschiede zu den *Hege*-Primärblättern kontinuierlich verringern. Dies war unter UV+WL-Bedingungen nicht der Fall; die Mutante reagierte hinsichtlich ihres Blattlängenwachstums sensibler als die Muttervarietät, da die Längendifferenz zwischen beiden mit zunehmendem Alter bestehen blieb.

Brückmann (1998) konnte neben der Reduktion der Blattlänge bei der Mutante auch eine Reduktion des Blatt-Frischgewichts, und zwar des Wassergehalts, unter dem Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung feststellen. Die Muttervarietät zeigte demgegenüber keine signifikante Abnahme (Tab. 3.7 und 3.8). Eine solche Reduktion im Frischgewicht konnte zum Teil auch bei den oberen *ant*-Blattsegmenten festgestellt werden, allerdings war der Unterschied sehr gering. Nur die ganz jungen, 5 d alten Primärblattsegmente von *ant* und *Hege* wiesen unter UV-B-Einfluss ein deutlich höheres Segment-Frischgewicht auf.

Solche morphologischen Änderungen werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich interpretiert: Für die Gerstevarietät Atlas konnten Liu et al. (1995) unter dem Einfluss von zusätzlichem UV-B geringe Einbußen an Blatt-Frischgewicht und Blattfläche bis zum 10. Tag feststellen wie auch eine geringe, nicht-signifikante Zunahme des Trockengewichts. Die Autoren vermuteten einen Einfluss der UV-B-Strahlung auf das Zellstreckungswachstum durch Veränderungen der Zellwanddehnung verbunden mit einer Erhöhung zellwandgebundener Ferulasäure-Ester.

Eine Reduktion der Blattfläche um 39 % bei Erbse fanden Nogués et al. (1998) nach 12-tägiger Bestrahlung mit erhöhtem UV-B_(BE) (Tagesdosis 32 kJ m⁻²) bei einer PAR-Strahlung von 500 μmol m⁻² s⁻¹ und konnten dies mit einem Rückgang der Zellzahl im Palisadenparenchym und in beiden Epidermen in Verbindung bringen.

Ein negativer UV-Effekt auf die Zellteilung wurde von Ros & Tevini (1995) an Gurkenkotyledonen bzw. von Staxen et al. (1993) an Blattprotoplasten von Petunie beschrieben. Ros & Tevini vermuten eine Photodestruktion des Phytohormons Auxin als mögliche Ursache für Zellwachstumsstörungen, Staxen et al. vermuteten DNA-Schäden oder eine direkte UV-B-induzierte Oxidation von Tubulin als mögliche Ursachen.

Auch die Auswirkung auf verschiedene Wuchsformen wird in diesem Zusammenhang diskutiert: Furness et al. (1999) untersuchten den Einfluss von 6-wöchiger UV-B-Bestrahlung bei drei verschiedenen Wildkräutern (*Cynoglossum officinale* L., *Centaurea diffusa* Lam. und *Tragopogon pratensis* L.). Sie benutzten zwei verschiedene UV-B_(BE)-Tagesdosen (7 und 11 kJ) und konnten bei den drei Pflanzenarten unterschiedliche UV-Effekte feststellen. *Cynoglossum*-Blätter wiesen drastische Schäden mit dem Verlust von ca. 90 % Blattfrischgewicht und Blattfläche auf, *Centaurea* reagierte weniger sensibel mit einem etwa 60-70 %igen Frischgewichtsverlust und Blattflächenverlust. *Tragopogon* verlor etwa 30 % an Blattfrischgewicht und etwa 40 % an Blattfläche bei höchster UV-B-Belastung verglichen mit den Kontrollen und reagierte somit deutlich weniger sensitiv. Die Autoren führen die unterschiedliche Wirkung auf die verschiedenen Wuchsformen der Pflanzen und ihre Orientierung zum einfallenden Licht zurück. Danach sollen *Cynoglossum* und *Centaurea* durch ihr Rosettenwachstum mit einer horizontalen Blatorientierung gegenüber *Tragopogon* mit einer vertikalen Blattstellung und einer verdeckten terminalen Knospe benachteiligt sein. Cline & Salisbury (1966) hatten in diesem Zusammenhang einen entsprechenden Vorteil von Monocotylen mit eher vertikaler Blattausrichtung gegenüber Dicotylen mit mehr horizontaler Ausrichtung vermutet.

4.4 Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung auf die Photosynthese im apikalen Gersten-Primärblattsegment

4.4.1 Chlorophyllgehalt der Primärblattsegmente

Die Muttervarietät *Hege* wies unter WL-Bedingungen einen geringfügig höheren Gehalt an Gesamtchlorophyll auf als die Mutante *ant*, welcher jedoch nur am 15. Tag statistisch signifikant war. Beide wiesen zu diesem Zeitpunkt einen Rückgang des Chlorophyllgehaltes bezogen auf das Segment-Frischgewicht auf, was auf eine beginnende Seneszenz hinweisen könnte. Diese beginnende Seneszenz findet zwar keine Entsprechung in den Fluoreszenzdaten (Abb. 3.21), aber Humbeck et al. (1996) konnten an Fahnenblättern von Gersten zeigen, dass der Seneszenz-Prozess in mehreren Phasen abläuft. Die Autoren stellten eine zeitliche Übereinstimmung zwischen Chlorophyllgehaltsreduktion und einer Reduktion der Effizienz des Photosystems II (F_v/F_m) fest, wobei ihre Messungen alle zwei Tage erfolgten. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass Gersten-Primärblätter im Alter von 15 d unter den gewählten experimentellen Bestrahlungsbedingungen langsam in den Seneszenz-Zustand übergehen.

Unter UV+WL-Bedingungen fanden sich keine Gehaltsunterschiede in den Blattsegmenten beider Gerstevarietäten (Abb. 3.3). Zudem wiesen beide Sorten gegenüber WL eine Erhöhung des Chlorophyllgehaltes unter diesen Bestrahlungsbedingungen auf. Bei der Mutante *ant* erwies sich der Unterschied zwischen den beiden Anzuchten in der Regel als signifikant, d.h. unter dem Einfluss von zusätzlichem UV-B erhöhte sich sowohl der Gehalt an Chlorophyll a wie auch der Gehalt an Chlorophyll b pro Segment-Frischgewicht. Auch bei *Hege* war diese Tendenz zu sehen, allerdings nicht statistisch gesichert. Dies deckte sich mit den Ergebnissen von Brückmann (1998), der eine Erhöhung des Chlorophyllgehaltes bei 7 und 10 Tage alten *ant*- und *Hege*-Blattsegmenten pro Blattfläche feststellte (ohne Veränderung des Blatt-Trockengewichts).

Ein solcher Einfluss auf den Chlorophyllgehalt durch zusätzliches UV-B ist ein mehrfach dokumentiertes Phänomen. Ormrod et al. (1997) konnten bei *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Landsberg erecta*) eine Zunahme nach 6-tägiger UV-B-Bestrahlung mit 7 kJ UV-B_(BE) feststellen, während die *fah1*-Mutante, eine Sinapinester-freie Mutante, einen Abbau von Chlorophyll zu verzeichnen hatte. Dillenburg et al. (1995) wiesen eine Zunahme des Chlorophyllgehaltes an *Liquidambar styraciflua*-Blättern unter UV-B-Bestrahlung mit einer

Tagesdosis von 12-13 kJ m⁻² UV-B_(BE) nach. Deckmyn & Impens (1995) zeigten in einer Studie an Bohnenblättern einen negativen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter während der Vegetationsperiode, wohingegen der Chlorophyllgehalt im Seneszenz-Stadium gegenüber der Kontrolle höher war: die Seneszenz wurde verzögert. Deckmyn et al. (1997) fanden auch an Roggenblättern eine Zunahme des Chlorophyllgehaltes unter Einfluss von UV-B.

4.4.2 Effizienz des Photosystems II nach Dunkeladaption und unter "steady-state Photosynthese"

4.4.2.1 Effizienz des Photosystems II

Der Einfluss zusätzlicher UV-Strahlung auf die Effizienz des Photosystems II bei intakten Pflanzen ist abhängig von der Art der Pflanze und auch von der Art der Strahlenbelastung. Verschiedene Untersuchungen von Nogués et al. (1995, 1998) an Erbsenpflanzen konnten selbst bei höchsten UV-Tagesdosen bis 40 kJ UV-B_(BE) und einer PAR-Hintergrundstrahlung von 450 µmol m⁻² s⁻¹ keinen Einfluss auf F_v/F_m, wohl aber auf A_{sat} (CO₂-Assimilation unter lichtsättigenden Bedingungen) und Φ_{PSII} (ΔF/F_m') feststellen. Untersuchungen an zwei unterschiedlichen Varietäten von *Brassica napus* unter identischen Bedingungen (Allen et al. 1997) offenbarten bei einer der beiden Sorten nach 5-tägiger Bestrahlung eine drastische Abnahme in F_v/F_m auf 0.3, begleitet von Abnahmen bei A_{sat}, qP und ΔF/F_m', während die andere Sorte leichte Einbußen in A_{sat} und einen Rückgang von F_v/F_m auf 0.7 erfuhr. DeLong & Steffen (1997) bestrahlten 14 d alte Spinatblätter über 12 d mit 13.5 kJ UV-B_{BE} m⁻² d⁻¹ bei einer PAR-Strahlung von 350 µmol und konnten eine Zunahme von F_o feststellen, die bei unverändertem F_m Ursache für die Reduktion von F_v/F_m war.

Die Ergebnisse zur Chlorophyll-Fluoreszenz in dieser Arbeit widersprechen früheren Untersuchungen von Reuber et al. (1996a) an der Gerstenmutante. Danach zeigten die Primärblätter der 7 d alten Mutante unter vergleichbaren Bestrahlungsbedingungen (720 µmol PAR, 13 kJ UV-B_(BE) m⁻² d⁻¹) eine Reduktion des F_v/F_m-Wertes unter UV+WL-Bedingungen auf 0.73 verglichen mit einer WL-Kontrolle von 0.8. Die Muttervarietät zeigte sich unbeeinflusst von der zusätzlichen UV-Strahlung. Die Reduktion der PS II-Aktivität (F_v/F_m) beruhte auf einer Erhöhung von F_o und einer Abnahme von F_m, was auf eine Beeinträchtigung

im Photosystem II hindeutete. Deutliche Unterschiede fanden die Autoren auch hinsichtlich der effektiven Quantenausbeute ($\Delta F/F_m'$). Diese erwies sich unter UV+WL-Bedingungen als deutlich weniger effektiv verglichen mit der Kontrolle. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden. Die Untersuchung zur Effizienz des Photosystems II während der Primärblattentwicklung vom 5. bis zum 15. Tag wies unter WL-Bedingungen eine entwicklungsabhängige Zunahme der PS II-Aktivität nach, die erst ab dem 8.-9. Tag maximale Werte von knapp 0.8 erreichte (Abb. 3.21). Dies galt sowohl bei der Muttervarietät als auch bei der Mutante. Unter UV+WL-Bedingungen wiesen die jüngeren Blätter beider Varietäten ein höheres F_v/F_m -Verhältnis auf als die WL-Kontrollwerte. Dieses glich sich den WL-Werten mit zunehmendem Alter bei *Hege* mehr und mehr an, während bei der Mutante in den älteren Blättern eine signifikante Reduktion zu beobachten war. Dennoch war zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zu beobachten, wie er bei Reuber et al. (1996a) beschrieben worden war. Auch eine zweite Versuchsreihe konnte die Ergebnisse nicht bestätigen, vielmehr zeigte die 7 d alte Mutante unter WL- bzw. UV+WL-Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz des Photosystems II.

Es ist anzunehmen, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse auf andere Ursachen als die Strahlungsbedingungen zurückzuführen sind. Hier kommen in erster Linie mikroklimatische Faktoren in Frage, da die Experimente von Reuber et al. (1996a) in einem Gewächshaus durchgeführt wurden, welches sich hinsichtlich der Temperaturbedingungen als nicht optimal regelbar erwies wie die in dieser Arbeit benutzte Anzuchtammer, die ein geregeltes Temperaturprogramm (Abb. 2.6) mit einer konstanten Nachttemperatur von 10° C bzw. Tagestemperatur von 20° C aufwies. Darüber hinaus betrug der Unterschied in der Tages- und Nachttemperatur bei Reuber et al. (1996a) nur 4° C, so dass hier unterschiedliche physiologische Bedingungen bei gleichem Blattalter (7 d) vorgelegen haben können.

Die Zunahme der Effizienz der PS II-Aktivität mit dem Blattalter deckt sich mit den Untersuchungen von Baier et al. (1996) zur Photosyntheseleistung in den basalen Zonen von Gerste. Die Messungen der PS II-Aktivität entlang des Blattgradienten eines 8 d alten Primärblattes offenbarten eine Abnahme des Wertes von apikal nach basal von nahe 0.8 auf 0.65 in der Blattbasis. Der Wert von 0.65 liegt in guter Übereinstimmung mit dem Wert, der in der vorliegenden Arbeit an 5 d alten Primärblättern festgestellt wurde. Aufgrund des typischen basioplasten Wachstums von Gerstenblättern ist es wahrscheinlich, dass die beiden unterschiedlichen Blattzonen am 5 d (apikal) und am 8 d alten Blatt (basal) entwicklungs-

physiologisch miteinander vergleichbar sind. Auch andere Pflanzenarten zeigen eine Zunahme der PS II-Aktivität mit zunehmendem Alter. Diese können geringer ausfallen wie z.B. bei *Phaseolus vulgaris* cv. Kinghorn, wo das Primärblatt eine Zunahme von F_v/F_m von 0.73 auf 0.76 zeigte (Madey et al. 1995). Manche Pflanzen weisen auch deutlich größere Unterschiede auf: bei *Actinidia deliciosa* steigt F_v/F_m parallel mit der Blattfläche von 0.39 auf 0.74 im Freiland (Greer, 1995). Sehr oft findet man jedoch auch den umgekehrten Fall, wonach der F_v/F_m -Wert mit zunehmendem Alter abnimmt (z.B. im Fahnenblatt von Gerste (*Hordeum vulgare*), Humbeck et al. 1996; bei Baumwollblättern (*Gossypium hirsutum*) vom 1. zum 4. Blatt, Warner & Burke 1993).

4.4.2.2 Fluoreszenz-Quenching

Ergänzend zu den F_v/F_m -Bestimmungen zeigten die Untersuchungen zum Fluoreszenz-Quench in allen Altersstadien und bei beiden Varietäten unter den beiden Bestrahlungsbedingungen WL und UV+WL vernachlässigbar geringe Unterschiede. Wenn auch die Statistik für die meisten Unterschiede eine Signifikanz von $P < 0.01$ auswies, bewegten sich die Unterschiede zwischen den WL- und UV+WL-Werten in einem Bereich von maximal 3 % bei qP und maximal 8 % bei qN (Tab. 3.1-3.6). Auch die Quantenausbeute differierte um nicht mehr als 3 %. Unterschiede zwischen der WL- und der UV+WL-Anzucht gab es jedoch in der Entwicklung des nicht-photochemischen quenchings in den ersten ca. 100 s nach Einsatz des aktinischen Lichts bei den älteren Blattsegmenten (10 d und 15 d). Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die zum nicht-photochemischen quenching beitragen. Die energieabhängige Fluoreszenz-Löschung (qE) wird allgemein als die Komponente angesehen, die den Hauptanteil zum nicht-photochemischen quenching beiträgt (Maxwell & Johnson 2000). qE korreliert mit dem Aufbau des Protonengradienten über die Thylakoidmembran, die zu einer Ansäuerung des Thylakoidlumens führt. Durch den Prozess der Photophosphorylierung werden die Protonen ins Stroma zurückgeführt und somit ein Ausgleich geschaffen. Wenn diese Balance gestört wird, steigt der Protonengradient an und führt zu einer Reihe von Reaktionen, die in Zusammenhang mit qN gebracht werden. Dazu zählt z.B. die Aktivierung der Violaxanthin De-epoxidase, die den Xanthophyllzyklus einleitet; ein Prozess, der überschüssige Energie aus den Reaktionszentren ableiten soll (Björkman & Demmig-Adams 1994). Möglicherweise war eine Verzögerung des Einsatzes ATP-verbrauchender Prozesse bei den UV+WL-bestrahlten Blattsegmenten Ursache für das

anfängliche hohe nicht-photochemische quenching, welches jedoch nur eine transiente Erscheinung war und die Photosynthese im weiteren Verlauf nicht negativ beeinflusste. Ob man daraus einen UV-Effekt ableiten kann, scheint fraglich, da auch die jungen, 7 d alten Pflanzen im Gegensatz zu den älteren unter WL-Bedingungen dieses Phänomen zeigten.

4.4.3 CO₂-Assimilation und O₂-Produktion

Jürgen Brückmann untersuchte im Rahmen seiner Diplomarbeit die O₂-Evolution und die CO₂-Assimilation an 7 und 10 d alten Primärblattsegmenten von *Hege* und *ant* unter den gleichen Bestrahlungsbedingungen, wie sie in Kapitel 2.2.1.5 vorgestellt wurden. Die Ergebnisse komplettieren die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen und sollen daher hier im Zusammenhang mit den Daten aus vorliegender Arbeit diskutiert werden.

Der Einfluss zusätzlicher UV-Strahlung auf die O₂-Entwicklung führte bei den 7 d alten Primärblattsegmenten zu einer Reduktion der Photosyntheseleistung um ca. 20 % bei beiden Varietäten, die aber nicht statistisch signifikant abgesichert werden konnte (Tab. 3.7). Es könnte als Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Photosystems II gedeutet werden, der auch von den Daten zum D1-Gehalt in den Einzelsegmenten gestützt würde. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass hierin die Variabilität der Gersten-Primärblattsegmente zum Ausdruck kommt und solche nicht-signifikanten Differenzen mit Vorsicht interpretiert werden müssen. Im Alter von 10 d war eine Reduktion der O₂-Produktion nicht mehr zu beobachten, es zeigte sich im Gegenteil eine geringfügige Erhöhung der Photosynthesekapazität, aber auch diese war statistisch nicht signifikant. Zwischen den beiden Varietäten war im Hinblick auf die Art der Bestrahlung kein Unterschied in der Photosyntheseleistung auszumachen. Der Anstieg der O₂-Produktion im Alter von 10 d koinzidiert mit dem Anstieg an Chlorophyll und kann als Akklimatisierungsreaktion angesehen werden.

Ein negativer Einfluss von UV-B-Strahlung auf die CO₂-Assimilation wird vor allem mit einer Schädigung der Rubisco in Zusammenhang gebracht. Jordan et al. (1992) konnten eine Reduktion des Rubisco-Gehaltes sowie eine Beeinträchtigung der Rubisco-Funktion nach 3-tägiger UV-B-Bestrahlung bei Erbse feststellen. Die Reduktion des Rubisco-Gehaltes war zurückzuführen auf eine Reduktion der Rbc S- und rbc L-Transkripte (Rbc S = LSU der Rubisco, rbc L = SSU der Rubisco) unter Einfluss von UV-B (Mackerness et al. 1997a).

Wilson et al. (1995) entdeckten bei Untersuchungen an *Brassica napus* L. ein neu auftretendes 66 kDa-Protein nach UV-Bestrahlung und identifizierten dieses als eine durch UV photomodifizierte Form der großen Untereinheit der Rubisco. Dieses Protein konnten sie in der Folge auch bei Tomate, Tabak und Erbse nachweisen.

Bei *ant* und *Hege* Primärblattsegmenten zeigte sich eine Reduktion der CO₂-Assimilation pro Chlorophyllgehalt, nicht aber pro Blattfläche. Da die Primärblätter unter Zusatz-UV mit einer Erhöhung des Chlorophyllgehaltes durch Chlorophyll a und b reagierten, wurde so offensichtlich die Reduktion in der Photosyntheseleistung ausgeglichen. Dies spricht nicht dafür, dass Rubisco durch die zusätzliche UV-B-Strahlung in ihrer Funktion beschädigt wurde oder der Enzymgehalt vermindert wurde. Eine solche Einschränkung würde auch die Photosyntheseleistung auf Blattflächenbasis beeinträchtigen; vielmehr spricht es für eine Beeinträchtigung im Bereich der photochemischen Reaktionen, die durch verminderte oder verlangsamte Anlieferung von Elektronen den biochemischen Bereich der Photosynthese in Mitleidenschaft zog und durch eine verstärkte Reparatur von PS II-Komplexen ausgeglichen wurde.

4.4.4 Einfluss auf das D1-Protein im Reaktionszentrum von Photosystem II

4.4.4.1 D1-Gehalt in den Blattsegmenten

Eine Interpretation der Daten aus den Untersuchungen zum D1-Gehalt in einzelnen Blattsegmenten von Gersten-Primärblättern durch Immunoblotting erwies sich als unerwartet schwierig, da die Signalstärken zwischen vergleichbaren Proben hohe Schwankungen aufwiesen. Die Sorgfalt bei der Probenaufarbeitung wie auch die Sorgfalt bei der Auswertung der Ergebnisse legten die Wahrscheinlichkeit nahe, dass die Ergebnisdifferenzen auf die Variabilität im Probenmaterial zurückzuführen waren. Aufgrund der großen Unterschiede konnten zwar keine signifikanten Aussagen zum Einfluss der UV-B-Strahlung auf den D1-Proteingehalt im oberen Primärblattsegment getroffen werden; aus den Daten konnte jedoch ein klarer Trend zu einer zunehmenden Unempfindlichkeit mit steigendem Alter entnommen werden (Abb. 3.25). Die 5 d alten Primärblattsegmente der Muttervarietät *Hege* und der Mutante *ant* zeigten unter Einfluss von UV-B eine Abnahme des D1-Gehaltes um 30-40 % gegenüber den WL-Kontrollen. Bei den 7 d alten Segmenten wies die Mutante gegenüber der

Mutter eine etwas höhere Sensitivität auf, die jedoch angesichts der allgemeinen Variabilität in den Ergebnissen vorsichtig beurteilt werden musste. Im Alter von 10 d schien eine signifikante Abnahme des D1-Gehaltes durch UV-B-Bestrahlung bei beiden Varietäten unwahrscheinlich.

Zu anderen Ergebnissen kam eine Untersuchung von Barbato et al. (2000). Sie führten Experimente an 7 bis 10 d alten Gersten-Primärblättern durch, ohne diese alters- bzw. entwicklungsmäßig zu unterscheiden. Unter dem Einfluss reiner UV-Strahlung (UV-B-Lampe des Typs Vilbert-Lourmat 312M: Strahlung im UV-A und UV-B-Bereich ohne zusätzliche PAR-Hintergrundstrahlung - kein UV-C) ermittelten die Autoren einen Abbau von D1-Protein von über 50 % nach 8-stündiger UV-Bestrahlung. Auch die Synthese von D1-Protein wurde durch diese Bedingungen beeinträchtigt; Kontrollexperimente mit reiner PAR von $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigten eine doppelt hohe D1-Synthese. In einer früheren Untersuchung (Barbato et al. 1995) unter den gleichen Bestrahlungsbedingungen fanden sie bei in vivo-Untersuchungen an Spinat und Mais nach einer 3-stündigen Bestrahlung nur ein 20 kDa-Abbauprodukt für das D1-Protein, während die Proteine CP43, CP47, Cytochrom b_{559} α -subunit und LHCII unbeeinflusst blieben.

Es gibt wenige vergleichbare Experimente, die den Altersaspekt bei der Untersuchung des Einflusses erhöhter UV-B-Strahlung auf den D1-Gehalt berücksichtigen, geschweige denn zeigen, dass mit zunehmendem Alter die Sensitivität der Blätter abnimmt. Untersuchungen zum UV-Einfluss auf mRNA-Transkripte verschiedener Photosynthesegene in Erbsenblättern unterschiedlichen Entwicklungsstadiums zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Jordan et al. (1994) untersuchten *cab* mRNA-Transkripte (*cab* = chlorophyll a/b binding protein) aus jungen und älteren ergrünten Erbsenblättern und konnten bei jüngeren Blättern eine relativ stärkere Reduktion der Transkriptmenge feststellen. Die Bestrahlung von etiolierten Erbsenblättern führte jedoch nicht zu einer solchen Reduktion von *cab* mRNA-Transkripten, was die Autoren darauf zurückführten, dass die Reduktion in den grünen Blättern weniger auf einen nicht-spezifischen DNA-Schaden durch UV als auf eine unterschiedliche Regulation der *cab*-Gene zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien beruhte und dass eine entwicklungsbedingte Genregulation andere äußere Einflüsse überlagerte. Eine andere Untersuchung an der gleichen Erbsensorte von Mackerness et al. 1998 konnte eine Reduktion von *psbA*-Transkripten (D1-Protein) an grünen Blättern nach 8-tägiger UV-Bestrahlung feststellen, während Transkripte von *Lhcb* (light harvesting complex binding protein) bereits

nach 2 d reduziert wurden. Die Reduktion der Transkripte in den älteren Blättern erfolgte schneller als in jüngeren Blättern. Die Verwendung von unterschiedlicher Hintergrund-PAR-Strahlung führte dazu, dass unter geringerer PAR die Reduktion beider Transkripte schneller erfolgte.

4.4.4.2 D1 Protein-Turnover

Die Tatsache des unterschiedlichen UV-Einflusses auf den D1-Gehalt der Blattsegmente führte zu der Untersuchung des D1-Abbauverhaltens beider Gerstevarietäten unter zusätzlicher UV-B-Strahlung. Der D1-Abbau in den apikalen Blattsegmenten bei *ant* wies in allen untersuchten Altersstadien eine schnellere Abbaurate unter UV+WL-Bedingungen auf verglichen mit den WL-Kontrollen (Abb. 3.41). Der Unterschied zwischen *ant* WL und *ant* UV+WL dokumentierte sich in einer 1.5fach schnelleren Abbaurate unter UV+WL, bei *Hege* waren die Unterschiede im Alter von 5 d und 7 d vergleichbar. 10 d alte *Hege*-Primärblattsegmente zeigten keinen Unterschied in der Abbaurate. Damit ließ sich zumindest für die beiden jüngeren Altersstadien der beobachtete Trend zur Reduktion des D1-Proteins unter UV+WL-Bedingungen erklären. Dies setzt allerdings voraus, dass sich die Rate der D1-Neusynthese unter WL bzw. UV+WL-Bestrahlung nicht unterscheidet. Diese Frage konnte nicht untersucht werden. Daher wurde der D1-Gehalt in den Blattsegmenten vor dem Beginn der "chase-Phase" und am Ende untersucht. Die D1-Gehalte in den radioaktiv markierten Blattsegmenten vor und nach der UV-B-Bestrahlung unterschieden sich in allen Altersstufen nur unwesentlich voneinander, d.h. die unter UV-B-Einfluss um den Faktor 1.5 erhöhte Abbaurate drückte sich nicht in einem entsprechend reduzierten D1-Proteingehalt aufgrund eines unmittelbaren Einflusses aus und läßt auch keinen auf die Neusynthese von D1-Protein vermuten. Der festgestellte Unterschied im D1-Gehalt bei den jungen Blattsegmenten ist möglicherweise auf ein Phänomen zurückzuführen, welches erst kürzlich von Olsson et al. (2000) beschrieben wurde. Sie konnten an *Brassica napus* Blättern eine reduzierte de-novo-Synthese in der Erholungsphase nach UV-B-Bestrahlung feststellen, die in der UV-Bestrahlungsphase selbst nicht zu beobachten war. Allerdings war die reduzierte de-novo-Synthese nicht mit einer Reduktion des D1-Gehaltes verbunden. Sie vermuteten einen Precursor-Pool für D1-Protein, der schneller mobilisiert werden kann als die Neusynthese des Proteins. Für Gerste ist ein solcher Precursor-Pool bisher unbekannt.

Beiden Varietäten war gemeinsam, dass mit steigendem Alter der D1-Abbau unter beiden Bestrahlungsbedingungen zunahm. Die Tatsache, dass die Abbauraten von 7 d und 10 d alten UV+WL-bestrahlten *Hege*-Primärblattsegmenten gleich hoch waren, deutet möglicherweise auf ein Maximum im D1-Abbau hin, dessen Mechanismus bisher noch nicht eindeutig geklärt ist, an dem aber enzymatische Prozesse beteiligt sind (Andersson et al. 1994). Bei der Mutante schien dieses Maximum noch nicht unbedingt erreicht zu sein, da die 10 d alte Mutante unter dem Einfluss von UV+WL deutlich mehr D1 in gleicher Zeit abbaute als die 7 d alte Mutante. Insgesamt aber war der Effekt einer Zunahme des D1-Abbaus nicht allein ein Entwicklungseffekt, sondern auch abhängig vom UV-Einfluss, da bei *ant* unabhängig vom Blattalter diese Differenzen zu beobachten waren. Wilson & Greenberg (1993) untersuchten den Einfluß von erhöhter UV-B-Strahlung auf Blätter unterschiedlichen Alters bei *Brassica napus* L. cv. Topas. Die Pflanzen wurden bis zum Alter von 21 d unter Schwachlichtbedingungen ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen und erfuhren danach eine 12-tägige UV-B-Behandlung bei $2.6 \text{ kJ UV-B}_{(\text{BE})}$. Es wurden Blattstücke von Blättern geerntet, die entweder vor der UV-Behandlung voll entfaltet waren (alte Blätter) oder sich erst während der UV-Behandlung entfalteten (junge Blätter). Die Blattstücke wurden mit ^{35}S -Methionin gefüttert und der Abbau des D1-Proteins unter WL- und UV-B-Bestrahlung bzw. im Dunkeln bis zu 24 h verfolgt. Unter dem Einfluß der WL-Strahlung zeigte sich kein Unterschied im D1-Abbau zwischen den alten und den neuen Blättern, unter UV-Einfluß jedoch zeigten die alten Blätter einen um 70% verlangsamten Turnover gegenüber den jungen Blättern. Die Autoren führten dies auf den unterschiedlichen Gehalt von UV-absorbierenden Substanzen (gemessen als methanolischer Gesamtextrakt bei 300 nm) zurück, der in den älteren Blättern höher war als in den jüngeren.

Diese Beobachtungen decken sich nicht mit denen an Gersten-Primärblättern. Trotz der deutlichen Unterschiede im Flavonoidgehalt zwischen *ant* und *Hege* gab es keinen durchgängigen Hinweis darauf, dass die flavonoidreiche *Hege*-Pflanze einen grundsätzlich langsameren D1-Turnover zeigte. Tatsächlich war der D1-Abbau bei *ant* UV+WL im Alter von 5 und 10 d um 30 bzw. 20 % höher als bei *Hege* (Abb. 3.30 bzw. 3.40), die 7 d alte Mutante zeigte hingegen eine um 10 % langsamere Abbaurate als *Hege* (Abb. 3.35). Ob sich aus der Tatsache, dass die 10 d alte *ant*-Pflanze ihren D1-Abbau nochmals steigerte, während bei *Hege* die Abbaurate konstant blieb, eine Tendenz ableiten läßt, wonach der unterschiedliche Flavonoidgehalt diese Unterschiede verursacht, bleibt ungeklärt und ließe sich letztendlich nur mit weiteren Untersuchungen an noch älteren Blattsegmenten zeigen.

Immerhin könnte der erhöhte Flavonoidgehalt bei der Muttervarietät ein Grund dafür sein, dass durch vermehrte Absorption der UV-B-Strahlung tatsächlich nur noch der PAR-Anteil der Strahlung für den D1-Turnover verantwortlich ist.

4.4.4.3 D1-Synthese

Die D1-Syntheseleistung unter dem Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Primärblattsegmente wurde jeweils morgens vor Einsetzen der UV-B-Strahlung untersucht. Insofern sind die Ergebnisse nicht Ausdruck des unmittelbaren Einflusses der UV-B-Strahlung auf die D1-Synthese, sondern einer längerfristigen und möglicherweise kumulativen Beeinträchtigung dieses Prozesses. Statt eines sehr jungen Blattes (5 d) wurde ein 15 d altes Blattstadium untersucht, um entwicklungsbedingte Einflüsse auf die D1-Synthese ausschließen und so reine UV-B-Effekte feststellen zu können. Die ermittelten Syntheseraten lieferten bei beiden Varietäten in allen untersuchten Altersstadien (7, 10 und 15 d) keinen eindeutigen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der D1-Synthesekapazität durch den Einfluss von UV-B-Strahlung (Abb. 3.48-53). Auch nach einer 13-tägigen Bestrahlung mit zusätzlichem UV-B wiesen sowohl die *Hege*- als auch die *ant*-Segmente ähnliche hohe Syntheseraten wie die UV-B-freien Kontrollsegmente auf. Im Gegenteil sprach der mit einigem Vorbehalt zu bewertende Trend einer Zunahme der Syntheseleistung mit zunehmendem Alter - auch unter UV+WL-Bedingungen - für eine ungestörte D1-Synthese, die auch nicht durch verringerte UV-Schutzsubstanzen in den Abschlussgeweben der Primärblätter beeinträchtigt wurde.

4.5 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die zentrale Frage, die dieser Arbeit zugrunde lag, war die, ob und inwieweit Flavonoide in der Lage sind, als epidermales "Schutzschild" den Photosyntheseapparat im Primärblatt junger Gerstenpflanzen vor dem Einfluss schädigender UV-Strahlung, insbesondere UV-B-Strahlung zu schützen. Diese Frage wurde untersucht an einer flavonoidarmen Gerstenmutante im Vergleich zur flavonoidreichen Muttervarietät. Die Daten zur Flavonoidakkumulation und zur epidermalen Absorption der UV-B-Strahlung dokumentierten einen deutlichen Unterschied im phenolischen Inhaltsstoffgehalt zwischen den beiden

Gerstevarietäten. Die ursprüngliche Erwartung, dass die Mutante aufgrund des geringeren Phenylpropangehaltes entweder größere Schädigungen des Photosyntheseapparates oder höhere Reparaturaktivitäten verglichen mit der Muttervarietät zeigen würde, wurde nur bedingt bestätigt. Unter all den gemessenen Parametern erwies sich nur einer als UV-B-sensitiv: der Abbau des D1-Proteins unterschied sich bei WL-bestrahlten und UV+WL-bestrahlten in der Geschwindigkeit, so dass es einen begründeten Verdacht auf einen erhöhten Reparaturbedarf gab. Dieser Unterschied trat bei allen untersuchten Altersstadien auf, auch bei der flavonoidreichen Muttervarietät in den beiden jüngeren Altersstadien (5 d und 7 d); erst die 10 d alte *Hege*-Pflanze wies zwischen WL- und UV+WL-Bestrahlung keine Differenzen auf, im Gegensatz zur flavonoidarmen Mutante, die unter UV+WL einen stärkeren D1-Turnover aufwies. Alle anderen Parameter (Effizienz des Photosystems II, Effektive Quantenausbeute am Photosystem II, photochemischer und nicht-photochemischer Quench, CO₂-Assimilation, O₂-Entwicklung, D1-Gehalt einzelner Blattsegmente, Synthese des D1-Proteins) erwiesen sich als gar nicht oder nicht durchgängig UV-sensitiv und es bestätigte sich der Eindruck, dass die Netto-Photosyntheseleistung unbeeinflusst von den Bestrahlungsbedingungen blieb. Eine Zunahme des Chlorophyllgehaltes unter dem Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung muss hierbei als Akklimatisierungsprozess an die Bestrahlungsbedingungen angesehen werden, mit der es der Gerste gelingt, ihre Netto-Photosyntheseleistung auf dem gleichen Niveau zu halten, welches sie unter (fast) UV-freier Bestrahlung erreicht (die Kontrollpflanzen waren immer einem Anteil an langwelliger UV-A-Strahlung ausgesetzt, s. Tab. 2.2).

Es stellt sich die Frage, ob die Gerste oder allgemeiner Gramineen in besonderer Weise an hohe UV-Strahlungsdosen angepasst sind, so dass der Photosyntheseapparat und die Photosynthese in besonderer Weise geschützt sind oder ob es andere Gründe dafür gibt, dass in der einschlägigen Literatur dieser elementare physiologische Prozess als sensitives UV-target beschrieben wird. Gramineen zählen zu den Charakterpflanzen von Steppen, Prärien und Savannen (von Sengbusch 1989) und sind somit an hohe Strahlungsintensitäten angepasst. Man darf also vermuten, dass sie zumindest im Umgang mit hohen PAR-Strahlungsintensitäten Anpassungsmechanismen zum Schutz der Photosynthese entwickelt haben. Die Erhöhung der Chlorophyllmenge beispielsweise kann als eine solche Anpassung gewertet werden: sie führt zu einer Zunahme an Photosynthesezentren, um unter Stressbedingungen den Anteil an geschädigten Zentren besser ausgleichen zu können, verbunden mit einer Zunahme des Carotinoidgehalts, welcher seinerseits über den

Xanthophyllzyklus überschüssige Lichtenergie bzw. Photonen abfängt, bevor sie das Reaktionszentrum schädigen (Adams III & Demmig-Adams 1993).

Inwieweit der epidermale Schutz durch Akkumulation UV-absorbierender Substanzen einen direkten Einfluss auf den Schutz der Photosynthese oder des Photosyntheseapparates nimmt, ist anhand der einschlägigen Literatur nicht eindeutig belegbar. Liu et al. (1995) sehen einen Zusammenhang zwischen dem Schutz der Photosynthese und einer erhöhten Flavonoidkonzentration in 8 d alten Gersten-Primärblättern der Sorte Atlas. Diese Einschätzung kann anhand der hier vorgestellten Ergebnisse bezüglich der Mutante *ant* nicht ohne weiteres geteilt werden. He et al. (1993) verglichen zwei Reissorten unter dem Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung und stellten unterschiedliche Einbußen hinsichtlich der Effizienz der Photosystems II, der maximalen Photosyntheserate und der Menge an Rubisco fest. Interessanterweise zeigte das UV-Absorptionsspektrum des methanolischen Blattextraktes der sensibleren Sorte eine höhere Absorption verglichen mit der insensitiveren Sorte. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei einem ähnlichen Vergleich von 7 verschiedenen Reissorten erzielt (Teramura et al. 1991). Jansen et al. (1996a) untersuchten den Einfluss von UV-B-Strahlung auf den D1-Turnover in der Wasserlinse (*Spirodela oligorrhiza*). Sie konnten einen reduzierten D1-Turnover mit einer erhöhten Konzentration an sekundären Inhaltsstoffen bei solchen Pflanzen feststellen, die im Vorfeld keiner UV-Bestrahlung ausgesetzt gewesen waren. Pflanzen, die vorab einer UV-Bestrahlung ausgesetzt wurden, wiesen den gleichen Gehalt an sekundären Inhaltsstoffen auf wie die Kontrollpflanzen, zeichneten sich aber nicht durch einen höheren D1-Turnover aus. Daher vermuten die Autoren, dass die Photosynthese bei der Wasserlinse durch unterschiedliche Mechanismen geschützt wird, wobei die UV-Absorption durch Phenylpropane nur einer von mehreren ist.

Ohne Zweifel zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen negativen Einfluss der UV-B-Strahlung auf die Morphologie des Gersten-Primärblatts. Eine beeinträchtigte Photosynthese als Ursache ist ausgeschlossen, andere Ursachen für dieses in zahlreichen Untersuchungen beobachtete Phänomen sind bislang nicht bekannt bzw. werden unterschiedlich diskutiert. Auch hierbei bleibt eine Schutzfunktion der Flavonoide fraglich, da in vielen Untersuchungen morphologische Veränderungen mit einer Zunahme an UV-Schutzsubstanzen koinzidieren (Adamse & Britz 1992, Lingakumar et al. 1999, Deckmyn & Impens 1999).

Darüber hinaus stellt sich bei vielen Untersuchungen die Frage, ob die unter teilweise recht artifiziellen experimentellen Bedingungen gewonnenen Erkenntnisse für die Pflanze unter Freilandbedingungen relevant sind. Eine erst kürzlich veröffentlichte Freilandstudie mit vier Gerstensorten (Stephen et al. 1999) konnte zeigen, dass die Effizienz des Photosystems II unter dem Einfluss von erhöhter UV-B-Belastung bei Simulation einer 15 %igen Ozon-Reduktion in unseren Breitengraden (entspricht einer durchschnittlichen UV-B_(BE)-Tagesdosis von 2.5-3 kJ m⁻²) bei keiner Sorte negativ beeinflusst wurde. Eine ähnliche Freilandstudie (Allen et al. 1999) mit Erbsenpflanzen, die unter Kammerbedingungen Beeinträchtigungen oder Schädigungen am Photosyntheseapparat oder an Regulationsvorgängen zur Photosynthese zeigen (Jordan et al. 1992, Day & Vogelmann 1995), lieferte entsprechende Ergebnisse. Insbesondere Freilandstudien an Pflanzen, die an erhöhte UV-Belastungen adaptiert sind, z.B. Pinien oder Olivenbäume, zeigten im Freiland keine Beeinträchtigung der Photosynthese aufgrund einer erhöhten UV-B-Strahlenbelastung (Petropoulou et al. 1995 bzw. Liakura et al. 1999).

Kammerexperimente eignen sich besonders, um mechanistische Fragestellungen zu bearbeiten, die zum Teil immer noch nicht geklärt sind, z. B. der Einfluss der UV-B-Strahlung auf Zellteilung- oder Zellstreckungsprozesse, die Ursache für morphologische Änderungen sein können. Auch Reparaturprozesse, z. B. bei Schädigung der Photosynthesestrukturen oder bei DNA-Schädigungen, lassen sich in Kammerexperimenten untersuchen. Viele in vitro-Untersuchungen wurden durchgeführt, um sich der Frage zu nähern, welche Strukturen im Photosystem II besonders UV-sensibel sind (Melis et al. 1992; Vass et al. 1995,1996; Spetea et al. 1996; Salter et al. 1997). In vivo-Untersuchungen zeigen jedoch, dass nicht alle diese Ergebnisse auf die Verhältnisse in der intakten Pflanze übertragbar sind (Baker et al. 1997). Noch problematischer wird es, wenn man versucht, die Ergebnisse aus solchen Kammerexperimenten auf Freilandsituationen zu übertragen, wie dies in den letzten Jahren vielfach geschehen ist. Nicht nur die strahlungsklimatischen Unterschiede, auch andere mikroklimatische Faktoren können die Situation für die Pflanze im Freiland unter erhöhtem UV-B-Stress völlig verändern und sind unter Kammer- oder Gewächshausbedingungen nicht zu simulieren. Dies gilt auch für die Ergebnisse aus vorliegender Arbeit: Die Tatsache, dass das Primärblatt der flavonoidarmen Mutante *ant* offensichtlich gut mit einer erhöhten UV-B-Strahlungsdosis leben kann, ist keine Garantie dafür, dass die Pflanze im Freiland ebenso gut wächst. Eine Vermehrung der Mutante im Freiland zur Sicherstellung ausreichender Mengen an Saatgut hat sich aufgrund einer

veränderten Morphologie und einer höheren Pathogen-Anfälligkeit verglichen mit der Muttervarietät als unmöglich erwiesen. Der herabgesetzte Sekundärstoffwechsel führt vermutlich zu einer reduzierten Lignin-Bildung und auch zu einer verminderten Phytopathogen-Resistenz, welche das Pflanzenwachstum nachhaltiger beeinflussen als eine erhöhte UV-Belastung. Darüber hinaus zeigen erste Untersuchungen an der Gerstenmutante *ant 30-310*, die zur gleichen Komplementationsgruppe gehört, dass die Bestrahlung der Pflanze mit UV-B unter den hier vorgestellten Bestrahlungsbedingungen zu einer erhöhten Bildung von DNA-Schäden führt, die im Verlauf einer fortgesetzten UV-B-Bestrahlung nicht genügend repariert werden können und so kontinuierlich zunehmen (R. Schmitz, persönliche Mitteilung).

5 ZUSAMMENFASSUNG

In einer vergleichenden Studie wurde der Schutz der Photosynthese durch UV-absorbierende phenylpropanoide Substanzen unter dem Einfluss erhöhter UV-B-Strahlung in apikalen Gersten-Primärblattsegmenten untersucht. Die flavonoidreiche Gerstevarietät *Hege 550/75* wurde mit der flavonoidarmen Mutante *ant 30-287* verglichen. Dabei wurden verschiedene Altersstadien (5, 7, 10, 15 d) berücksichtigt. Die tägliche UV-B-Strahlungsdosis betrug $12 \text{ kJ UV-B}_{(\text{BE})} \text{ m}^{-2}$ bei einer PAR-Strahlung von $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Unter Kontrollbedingungen wurde die UV-Strahlung bis auf einen unvermeidbaren geringen Anteil an langwelliger UV-A-Strahlung ausgeschlossen.

Beide Gerstevarietäten zeichneten sich durch ein Phenylpropanmuster aus, das sich weder mit zunehmendem Alter noch unter dem Einfluss zusätzlicher UV-B-Strahlung veränderte. Der Flavonoidgehalt im oberen Primärblattsegment der Gerstevarietät *Hege 550/75* nahm mit steigendem Alter kontinuierlich zu. Die flavonoide Hauptkomponente stellte Saponarin dar mit einem Anteil am Gesamtgehalt von 60-70 %. Die Mutante *ant 30-287* wird durch einen Defekt in der Flavonoidbiosynthese charakterisiert, der sehr wahrscheinlich die Funktion der Chalkon-Isomerase betrifft und die Synthese hoher Mengen an Flavonoiden verhindert. Sie reichert Isosalipurposid (2', 4', 4, 6'-Tetrahydroxychalkon) an, von dem ein geringer Anteil durch autocyclische Umwandlung zum Flavanon in die Biosynthese von Flavonoiden eingeht. Der Gehalt an phenylpropanoiden Inhaltsstoffen nahm wie bei der Muttervarietaet mit dem Alter zu, lag jedoch im Durchschnitt um 75 % unter dem von *Hege 550/75*.

Unter UV-B-Einfluss stieg der Gesamtgehalt der Phenylpropane im oberen Blattbereich von *Hege 550/75* bereits in sehr jungen Blättern auf mehr als das Doppelte. Der Anteil an Saponarin blieb verhältnismäßig gleich, während Lutonarin als flavonoide Nebenkomponente unter UV-B-Einfluss verhältnismäßig viel stärker anstieg. Bei der Mutante stieg der Gesamtgehalt an Phenylpropanen unter UV-B-Einfluss ebenfalls um das Doppelte. Auch hier stieg der Gehalt an Lutonarin verhältnismäßig viel stärker als der anderer Substanzen, hatte aber zusammen mit Saponarin nur einen geringen Anteil am Gesamtgehalt aller Phenylpropane.

Der unterschiedliche phenylpropanoide Inhaltsstoffgehalt in den Primärblättern beider Gerstevarietäten korrelierte mit einer unterschiedlich hohen Absorption von UV-B-Strahlung in den untersuchten Segmenten. Es wurde eine neue Methode zur Untersuchung der UV-Strah-

lungsabsorption über Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen an Roggen-Primärblättern etabliert, da man hier aufgrund einer strikten Gewebelokalisierung unterschiedlicher Flavonoidgruppen in Epidermis und Mesophyll Aufschluss darüber erhalten konnte, wie weit epidermal sowie im Mesophyll lokalisierte Phenylpropane an der Strahlungsabsorption beteiligt sind. Ein Einfluss von Mesophyllflavonoiden auf die Strahlungsabsorption konnte ausgeschlossen werden. Da die Untersuchungen der Gersten-Primärblattsegmente vergleichbare Ergebnisse lieferten, kann davon ausgegangen werden, dass die UV-B-induzierte Erhöhung der Phenylpropane in der Epidermis bzw. im subepidermalen Gewebe erfolgt.

Gersten-Primärblätter der flavonoidreichen Muttervarietät *Hege 550/75* und der flavonoidarmen Mutante *ant 30-287* reagierten auf die erhöhte UV-B-Strahlung mit einer Reduktion der Blattlänge. Das Blattfrischgewicht wurde bei *Hege 550/75* nicht, bei *ant* nur in geringem Maß beeinträchtigt.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse zur Photosynthese in den apikalen Blattsegmenten der beiden Gerstevarietäten *Hege 550/75* und *ant 30-287* gibt es keinen Hinweis, dass die Photosynthese durch den Einfluss der zusätzlichen UV-B-Strahlung im adulten Blatt nachhaltig negativ beeinträchtigt wird. Die auffälligsten Unterschiede waren nicht auf den Einfluss durch die Art der Bestrahlung, sondern auf das Entwicklungsstadium der Blattsegmente zurückzuführen. So erreichten die Primärblattsegmente von *Hege 550/75* und *ant 30-287* unter WL-Bedingungen erst im Alter von 8-9 d ein F_v/F_m -Verhältnis von annähernd 0.8. Die Fluoreszenz-Daten wiesen zwischen WL- und UV+WL-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede auf, so dass der Elektronentransport und die Effizienz des Photosystems II weder bei der Mutante *ant 30-287* noch bei der Muttervarietät *Hege 550/75* unter UV-B-Einfluss beeinträchtigt wurden. Lediglich das nicht-photochemische quenching ließ eine leichte Verzögerung zu Beginn der Photosynthese erkennen, die sich aber im steady-state-Bereich nicht negativ auswirkte.

Gaswechsellmessungen zeigten, dass die Photosyntheseleistungen im biochemischen Bereich nicht beeinträchtigt wurden. Die Nettphotosyntheserate bei 7 und 10 d alten Primärblattsegmenten, gemessen als $\mu\text{mol CO}_2$, nahm unter UV-B-Einfluss pro Chlorophyllmenge ab. Dies wurde durch eine Erhöhung des Chlorophyllgehaltes kompensiert, so dass die Nettphotosyntheserate pro Blattfläche unter WL bzw. UV+WL-Bedingungen identisch war. Dies galt für die Muttervarietät und die Mutante im Alter von 7 und 10 d gleichermaßen. Die

O₂-Entwicklung wies im Alter von 7 d eine nicht-signifikante Reduktion auf, die jedoch im Alter von 10 d nicht mehr zu sehen war. Es konnte kein Unterschied zwischen der Muttervarietät und der Mutante festgestellt werden.

Ein beeinträchtigender Einfluss der UV-B-Strahlung fand sich in Form einer Reduktion im D1-Proteingehalt bei jüngeren Pflanzen, der mit zunehmendem Alter nicht mehr detektiert werden konnte. Das Reparatursystem im Photosynthesebereich, gekennzeichnet durch einen hohen Turnover des geschädigten D1-Proteins, ließ Unterschiede im D1-Abbau erkennen, die sowohl vom Blattalter als auch durch UV-B-Strahlung beeinflusst waren. Unter WL-Bedingungen nahm der D1-Turnover mit dem Alter zu, wobei zwischen 7 und 10 d alten *Hege 550/75*-Primärblattsegmenten kein Unterschied festzustellen war, im Gegensatz zur Mutante *ant 30-287*. Im Vergleich zu den WL-bestrahlten Segmenten wiesen die UV+WL-bestrahlten Segmente beider Gerstevarietäten einen höheren D1-Turnover aus; lediglich die 10 d alten *Hege 550/75*-Segmente ließen keinen solchen Unterschied erkennen.

Die Synthese des D1-Proteins wurde durch eine fortgesetzte Bestrahlung der Gerstenpflanzen mit erhöhtem UV-B nicht negativ beeinträchtigt. Dies galt für beide Gerstevarietäten. Es zeichnete sich ähnlich wie beim D1-Abbau ein Trend ab, wonach die D1-Synthese in Abhängigkeit vom Blattalter zunimmt.

6 SUMMARY

The protection of photosynthesis due to UV-absorbing phenylpropanoid compounds under the influence of supplementary UV-B radiation was investigated in apical segments of barley primary leaves. A barley variety called *Hege 550/75* which accumulates high amounts of flavones was compared to a corresponding barley mutant line called *ant 30-287* with only low amounts of flavones. Different leaf age (5, 7, 10, 15 d) was considered. Daily dose of UV-B irradiation amounted to $12 \text{ kJ UV-B}_{(\text{BE})} \text{ m}^{-2}$ with a background PAR radiation of $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Control irradiation conditions avoided UV apart from a small amount of UV-A $> 380 \text{ nm}$.

The pattern of phenylpropanoid compounds of both barley varieties detected via HPLC remained unchanged with both increasing leaf age and the influence of supplementary UV-B radiation. However, the content of flavones in apical segments of the mother variety *Hege 550/75* increased with leaf development. Saponarin turned out to be the main flavone with 60-70 % of the overall amount of phenylpropanoid compounds. The corresponding barley mutant *ant 30-287* is defective in flavonoid biosynthesis probably due to a defective chalcone isomerase gene and thus unable to accumulate high amounts of flavonoids. Isosalipurposid (2', 4', 4, 6'-tetrahydroxychalcone) is accumulated instead and very low amounts of flavones are synthesized via chemical autocyclization of the chalcone into flavanone. As with the corresponding mother variety the content of overall phenylpropanoid compounds increased but amounted to only about 25 % compared to *Hege 550/75*.

Even in 5 d old leaves the overall amount of phenylpropanoids doubled under the influence of UV-B radiation in apical leaf segments of *Hege 550/75* and remained or rose even higher in all investigated stages of leaf development. While saponarin remained more or less constant the amount of another flavone, lutonarin, increased relatively. The corresponding mutant line *ant 30-287* responded in a similar way to UV-B radiation by doubling the overall content of phenolic compounds. Lutonarin was found to be most UV-reactive but remained low as compared to all phenylpropanoid compounds just as to saponarin.

Differences in overall amounts of phenolic compounds in primary leaves of both barley varieties correlated with differences in absorption of UV-B radiation. A new method for investigating absorption of UV radiation via chlorophyll fluorescence measurements was

established with rye primary leaves. Rye primary leaves are characterized by a distinct distribution of two different groups of flavonoids to epidermis and mesophyll. Thus it was possible to investigate which of the two groups took part in UV absorption showing that mesophyll flavonoids had no influence on UV absorption. Flavonoid distribution in barley primary leaves is not yet conclusively known, but as the results with barley primary leaves were comparable to these of rye primary leaves, one might suggest that the increase of flavones induced by UV-B radiation occurs in the epidermis or subepidermal mesophyll.

Under the influence of supplementary UV-B radiation both barley varieties *Hege 550/75* and *ant 30-287* showed a reduction in leaf length. Leaf fresh weight was only little affected with the mutant line *ant 30-287* but not with *Hege 550/75*.

Considering all results concerning photosynthesis in apical leaf segments of the mother variety *Hege 550/75* and the corresponding mutant *ant 30-287* there is no indication that photosynthesis undergoes lasting damage by supplementary UV-B radiation in adult primary leaves. The most striking differences were due to leaf developmental stage rather than to irradiation wavelength. Maximum efficiency of photosystem II, measured as F_v/F_m was not reached until the age of 8-9 days in apical leaf segments of both barley varieties. There was no difference between UV-B irradiated and control leaf segments indicating that electron transport and quantum efficiency of photosystem II was not affected in both varieties. Analysis of non-photochemical quenching revealed higher maximum values in older UV-B irradiated leaf segments at the onset of photosynthesis but did not affect steady-state-photosynthesis.

Measurements of CO₂ fixation and O₂ evolution confirmed that there was no damage in photosynthesis concerning the biochemical reactions. The rate of net photosynthesis measured as $\mu\text{mol CO}_2$ was reduced under the influence of UV-B radiation in 7 and 10 d old leaf segments compared on chlorophyll basis. This was compensated by increasing the amount of chlorophyll. Therefore the net rate of photosynthesis compared on a leaf area basis showed no differences between UV-B irradiated leaves and controls for both the mother variety and the mutant. Younger leaf segments (7 d old) showed a non-significant reduction of O₂ evolution due to UV-B radiation which was absent with 10 d old leaf segments. There was no difference between *Hege 550/75* and *ant 30-287*.

UV-B induced damage was detected in younger plant leaves as the D1 protein content was reduced. With increasing age D1 protein reduction could no longer be detected. Differences in D1 protein turnover due to leaf age as well as UV-B radiation were detected. Under control conditions D1 protein turnover increased with age in the mutant *ant* 30-287 and in the mother variety *Hege* 550/75 although the latter showed no difference between 7 and 10 d old leaf segments. Under the influence of supplementary UV-B D1 protein turnover increased compared to the control with the exception of 10 d old *Hege* 550/75 leaf segments where no differences could be detected.

Synthesis of D1 protein was not affected by constant irradiation (6 h per day) of barley plants with supplementary UV-B. This was true for both barley varieties. Similar to D1 protein turnover there seemed to be a trend for an increasing D1 protein synthesis depending on leaf age.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams III W.W. & Demmig-Adams B. (1993). Energy Dissipation and Photoprotection in Leaves of Higher Plants. In: Yamamoto H.Y. & Smith C.M. (Hrg.): Photosynthetic Responses to the Environment. Current Topics in Plant Physiology: An American Society of Plant Physiologists Series, Vol. 8, Rockville, Maryland
- Adamse P. & Britz S.J. (1992). Amelioration of UV-B damage under high irradiance. I: role of photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* **56**, 645-650
- Allen D.J., McKee I.F., Farage P.K. & Baker N.R. (1997). Analysis of the limitation to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. *Plant Cell Environment* **20**, 633-640
- Allen D.J., Nogués S., Morison J.I.L., Greenslade P.D., McLeod A.R. & Baker N.R. (1999). A thirty percent increase in UV-B has no impact on photosynthesis in well-watered and droughted pea plants in the field. *Global Change Biology* **5**, 235-244
- Andersson B., Ponticos M., Barber J., Koivuniemi A., Aro E.-M., Hagman Å., Salter A.H., Dan-Hui Y. & Lindahl M. (1994). Light-induced proteolysis of photosystem II reaction centre and light-harvesting complex II proteins in isolated preparations. In: Baker N.R. & Boyer J.R. (Hrg.): Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, UK
- Bachelet D., Barnes P.W., Brown D. & Brown M. (1991). Latitudinal and seasonal variation in calculated ultraviolet-B irradiance for rice-growing regions of asia. *Photochemistry and Photobiology* **54**, 411-422
- Baier M., Bilger W., Wolf R. & Dietz K.-J. (1996). Photosynthesis in the basal growing zone of barley leaves. *Photosynthesis Research* **49**, 169-181
- Baker N.R., Nogués S. & Allen D.J. (1997). Photosynthesis and photoinhibition. In: Lumbden P.J. (Hrg.): Plants and UV-B. Responses to Environmental Change. University Press, Cambridge
- Barbato R., Frizzo A., Friso G., Rigoni F. & Giacometti G.M. (1995). Degradation of the D1 protein of photosystem-II reaction centre by ultraviolet-B radiation requires the presence of functional manganese on the donor side. *European Journal of Biochemistry* **227**, 723-729
- Barbato R., Bergo E. & Giacometti G.M. (1999). Effects of ultraviolet-B light on photosystem II phosphoproteins in barley wild type and its chlorophyll *b*-less mutant chlorina f2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **48**, 189-193
- Barbato R., Bergo E., Szabò I., Dalla Vecchia F. & Giacometti G.M. (2000). Ultraviolet B exposure of whole leaves of barley affects structure and functional organization of photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10976-10982
- Barber J., Nield J., Morris E.P., Zheleva D. & Hankamer B. (1997). The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiologia Plantarum* **100**, 817-827.

- Beggs C.J. & Wellmann E. (1985). Analysis of light-controlled anthocyanin formation in coleoptiles of *Zea mays* L.: The role of UV-B, blue, red and far-red light. *Photochemistry and Photobiology* **41**, 481-486
- Beggs C.J., Kuhn K., Böcker R. & Wellmann E. (1987). Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* **172**, 121-126
- Berger S. (1989). Aktivitätsverlauf und -verteilung der UDP-Glucose: Isovitexin-7-O-Glucosyltransferase – einem Endenzym der Flavonoidbiosynthese – während der Primärblattentwicklung von Gerste. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Bilger W., Veit M., Schreiber L. & Schreiber U. (1997). Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* **101**, 754-763.
- Björkman O. & Demmig-Adams B. (1994). Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: Schulze E.-D. & Caldwell M.M. (Hrg.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Björn L.O. & Murphy T.M. (1985). Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. *Physiologie Végétale* **23**, 555-561
- Blume D.E. & McClure J.W. (1979). Developmental changes in flavonoids and enzyme activities of primary leaves from field-grown barley. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **95**, 121-128
- Bornman J.F. (1989). Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *Photochemistry and Photobiology* **4**, 145-158.
- Bornman J.F. & Vogelmann, T.C. (1991). Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fibre optics. *Journal of Experimental Botany* **42**, 547-554
- Bornman J.F. & Sundby-Emanuelsson C. (1995). Response of plants to UV-B radiation: some biochemical and physiological effects. In: Smirnoff N. (Hrg.): *Environment and Plant Metabolism flexibility and acclimation*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK
- Braun J. (1990). UV-Schutzfunktion von phenolischen Inhaltsstoffen und deren Regulation in Roggen- und Haferkeimlingen. *Karlsruher Beiträge zur Entwicklungs- und Ökophysiologie der Pflanzen*, Band 9, Hrg. M. Tevini
- Britt A.B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 75-100
- Brosché M., Fant C., Bergkvist S.W., Strid H., Svensk A., Olsson O. & Strid Å. (1999). Molecular markers for UV-B stress in plants: alteration of the expression of four classes of genes in *Pisum sativum* and the formation of high molecular mass RNA adducts. *Biochimica et Biophysica acta* **1447**, 185-198

- Brückmann G.J. (1998). Untersuchungen zur Bedeutung der Phenylpropane als UV-B-Schutzsubstanzen im Gersten-Primärblatt (*Hordeum vulgare* L.) durch Vergleich der UV-B-Sensitivität einer flavonoiddefizienten Gersten-Mutante mit der korrespondierenden Muttervarietät hinsichtlich Wachstum, Photosyntheseleistung und Transpiration. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Burchard P. (1994). Der Einfluß erhöhter UV-Strahlung auf den Flavonoidstoffwechsel im Primärblatt verschiedener Roggensorten (*Secale cereale* L.). Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Caasa-Lit M., Whitecross M.I., Nayudu M. & Tanner G.J. (1997). UV-B Irradiation induces differential leaf damage, ultrastructural changes and accumulation of specific phenolic compounds in rice cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology* **24**, 261-274
- 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.C. & Caldwell M.M. (Hrg.): *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Caldwell M.M. & Flint S.D. (1994). Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change* **28**, 375-394
- Caldwell M.M., Flint S.D. & Searles P.S. (1994). Spectral balance and UV-B sensitivity of soybean: a field experiment. *Plant, Cell and Environment* **17**, 267-276
- Caldwell M.M., Björn L.O., Bornman J.F., Flint S.D., Kulandaivelu G., Teramura A.H. & Tevini M. (1998). Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**, 40-52
- Cen Y-P. & Bornman J.F. (1990). The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiances of background visible light. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1489-1495
- Cline M.G. & Salisbury F.B. (1966). Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. *Radiation Botany* **6**, 151-166
- Chaturvedi R., Shyam R. & Sane P.V. (1998). Steady state level of D1 protein and *psbA* transcripts during UV-B inactivation of photosystem II in wheat. *Biochemistry and Molecular Biology International* **44**, 925-932
- Correia C.M., Areal E.L.V., Torres-Pereira M.S. & Torres-Pereira J.M.G. (1998). Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. I. Growth and morphological aspects. *Field Crops Research* **59**, 81-89
- Dai Q., Peng S., Chavez A.Q. & Vergara B.S. (1995). Effects of UVB radiation on stomatal density and opening in rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **76**, 65-70
- Dai Q., Yan B., Huang S., Liu X., Peng S., Lourdes M., Miranda L., Chavez A.Q., Vergara B.S. & Olszyk D.M. (1997). Responses of oxidative stress defence systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B-radiation. *Physiologia Plantarum* **101**, 301-308

- Dannehl H., Wietoska H., Heckmann H. & Godde D. (1996). Changes in D1-protein turnover and recovery of photosystem II activity precede accumulation of chlorophyll in plants after release from mineral stress. *Planta* **199**, 34-42
- Day T.A., Vogelmann T.C. & DeLucia E.H. (1992). Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? *Oecologia* **92**, 513-519.
- Day T.A. (1993). Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* **95**, 542-550
- Day T.A., Howells B.W. & Rice W.J. (1994). Ultraviolet absorption and epidermal-transmittance spectra in foliage. *Physiologia Plantarum* **92**, 207-218
- Day T.A. & Vogelmann T.C. (1995). Alterations in photosynthesis and pigment distribution in pea leaves following UV-B exposure. *Physiologia Plantarum* **94**, 433-440.
- Deckmyn G. & Impens I. (1995). UV-B increases the harvest index of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant, Cell and Environment* **18**, 1426-1433
- Deckmyn G. & Impens I. (1997). The ratio UV-B/photosynthetically active radiation (PAR) determines the sensitivity of rye to increased UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany* **37**, 3-12
- Deckmyn G. & Impens I. (1999). Seasonal responses of six Poaceae to differential levels of solar UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany* **41**, 177-184
- Dellamonica G., Meurer B., Strack D., Weissenböck G. & Chopin J. (1983). Two isovitexin 2"-O-glycosides from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* **22**, 2627-2628
- DeLong J.M. & Steffen K.L. (1997). Photosynthetic function, lipid peroxidation, and α -tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation. *Canadian Journal of Plant Science* **77**, 453-459
- Dillenburg L.R., Sullivan J.H. & Teramura A.H. (1995). Leaf expansion and development of photosynthetic capacity and pigments in *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) - effects of UV-B radiation. *American Journal of Botany* **82**, 878-885.
- Dixon R.A. & Paida N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097
- Effertz B. & Weissenböck G. (1980). Tissue specific variation of C-Glycosylflavone patterns in oat leaves as influenced by the environment. *Phytochemistry* **19**, 1669-1672
- Farman J.C., Gardiner B.G. & Shanklin J.D. (1985): Large losses of ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature* **315**, 207-210
- Fischbach R.J., Kossmann B., Panten H., Steinbrecher R., Heller W., Seidlitz H.K., Sandermann H., Hertkorn N. & Schnitzler J.-P. (1999). Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant, Cell and Environment* **22**, 27-37

- Friso G., Vass I., Spetea C., Barber J. & Barbato R. (1995). UV-B induced degradation of the D1 protein in isolated reaction centres of photosystem II. *Biochimica et Biophysica acta* **1231**, 41-46
- Frohnmeier H., Ehmann B., Kretsch T., Rocholl M., Harter K., Nagatani A., Furuja M., Bartschauer A., Hahlbrock K. & Schäfer E. (1992). Differential usage of photoreceptors during plant development for chalcone synthase expression. *Plant Journal* **2**, 899-906
- Fröst S., Harborne J. B. & King L. (1977). Identification of the flavonoids in five chemical races of cultivated barley. *Hereditas* **85**, 163-168
- Furness N.H., Upadhyaya M.K. & Ormrod D.P. (1999). Seedling growth and leaf surface morphological responses of three rangeland weeds to ultraviolet-B radiation. *Weed Science* **47**, 427-434
- Genty B., Briantais J.-M. & Baker N.R. (1989). The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica acta* **990**, 87-92
- Gerhardt K.E., Wilson M.I. & Greenberg B.M. (1999). Tryptophan photolysis leads to a UVB-induced 66 kDa photoproduct of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) *In Vitro*. *Photochemistry and Photobiology* **70**, 49-56
- Godde D. & Dannehl H. (1994). Stress-induced chlorosis and increase in D1-protein turnover precede photoinhibition in spinach suffering under magnesium/sulphur deficiency. *Planta* **195**, 291-300
- González R., Wellburn A.R. & Paul N.D. (1998). Dose responses of two pea lines to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum* **104**, 373-378
- Grammatikopoulos G., Petropoulou Y. & Manetas Y. (1999). Site-dependent differences in transmittance and UV-B-absorbing capacity of isolated leaf epidermes and mesophyll in *Urginea maritima* (L.) Baker. *Journal of Experimental Botany* **50**, 517-521
- Green R. & Fluhr R. (1995). UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *The Plant Cell* **7**, 203-212
- Greenberg B.M., Gaba V., Canaani O., Malkin S., Mattoo A.K. & Edelman M. (1989a). Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **86**, 6617-6620
- Greenberg B.M., Gaba V., Mattoo A.K. & Edelman M. (1989a). Degradation of the 32 kDa photosystem II reaction center protein in UV, visible and far red light occurs through a common 23.5 kDa intermediate. *Zeitschrift für Naturforschung* **44c**, 450-452
- Greenberg B.M., Wilson M.I., Gerhardt K.E. & Wilson K.E. (1996). Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet-B radiation: Photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and potential acclimation processes. *Journal of Plant Physiology* **148**, 78-85

- Greer D.H. (1995). Effect of canopy position on the susceptibility of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves on vines in an orchard environment to photoinhibition throughout the season. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**, 299-309
- Hao X., Hale B.A. & Ormrod D.P. (1997). The effects of ultraviolet-B radiation and carbon dioxide on growth and photosynthesis of tomato. *Canadian Journal of Botany* **75**, 213-219
- Hausühl K., Rohde W. & Weissenböck G. (1996). Expression of chalcone synthase genes in coleoptiles and primary leaves of *Secale cereale* L. after induction by UV radiation: evidence for a UV-protective role of the coleoptile. *Botanica Acta* **109**, 229-238
- He J., Huang L.-K., Chow W.S., Whitecross M.I. & Anderson J. (1993). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on rice and pea plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**, 129-142
- Heller W. & Forkmann G. (1999). Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne J.B. (Hrg.): *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London
- Hertwig B., Streb P. & Feierabend J. (1992). Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology* **100**, 1547-1553
- Hideg E. & Vass I. (1996). UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Science* **115**, 251-260
- Hiscox J. D. & Israelstam G. F. (1979). A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* **57**, 1332-1334
- Hu J.P., Calomme M., Lasure A., De Bruyne T., Pieters L., Vlietinck A. & Vanden Berghe D.A. (1995). Structure-activity relationship of flavonoids with superoxid scavenging activity. *Biological trace element research* **47**, 327-331
- Huang L.-K., He J., Chow W.S., Whitecross M.I. & Anderson J.M. (1993). Responses of detached rice leaves (*Oryza sativa* L.) to moderate supplementary ultraviolet-B radiation allow early screening for relative sensitivity to ultraviolet-B irradiation. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**, 285-297
- Humbeck K., Quast S. & Krupinska K. (1996). Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell and Environment* **19**, 337-344
- Jähne A., Fritzen C. & Weissenböck G. (1993). Chalcone synthase and flavonoid products in primary leaf tissues of rye and maize. *Planta* **189**, 39-46
- Jansen M.A.K., Babu T.S., Heller D., Gaba V., Mattoo A.K. & Edelman M. (1996a). Ultraviolet-B effects on *Spirodela oligorrhiza*: induction of different protection mechanisms. *Plant Science* **115**, 217-223

- Jansen M.A.K, Gaba V., Greenberg B.M. , Mottoo A.K. & Edelman M. (1996b). Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem-II. *Plant Journal* **9**, 693-699
- Jansen M.A.K, Greenberg B.M. ,Edelman M., Mottoo A.K. & Gaba V. (1996c). Accelerated degradation of the D2 protein of photosystem II under ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology* **63**, 814-817.
- Jansen A.K.M., Gaba V., & Greenberg, B.M. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* **3**, 131-135.
- Jende-Strid B. (1993). Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas* **119**, 187-204.
- Jenkins G.I. (1997). UV and blue light signal transduction in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* **20**, 773-778
- Jiang C-Z., Yee J., Mitchell D.L. & Britt A.B. (1997). Photorepair mutants of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **94**, 7441-7445
- Johannigmeyer U. (1987). Expression of the psbA gene in E.coli. *Zeitschrift für Naturforschung* **42c**, 755-757.
- Johnson D.A., Gautsch J.W., Sportsman J.R. & Elder J. jr. (1984). Improved technique utilizing nonfat drymilk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Analytical Techniques* **1**, 1-8
- 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 supplemental UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment* **15**, 91-98
- Jordan B.R., James P.E., Strid A. & Anthony R.G. (1994). The effect of ultraviolet-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue: UV-B-induced changes are gene-specific and dependent upon the developmental stage. *Plant, Cell and Environment* **17**, 45-54
- Jordan B.R. (1996). The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. In: Callow J.A. (Hrg.): *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Academic Press, New York.
- Kalbin G., Ohlsson A.B., Berglund T., Rydström J. & Strid Å. (1997). Ultraviolet-B-radiation-induced changes in nicotinamide and glutathione metabolism and gene expression in plants. *European Journal of Biochemistry* **249**, 465-472
- Kilb B., Wietoska H. & Godde D. (1996). Changes in the expression of photosynthetic genes precede loss of photosynthetic activities and chlorophyll when glucose is supplied to mature spinach leaves. *Plant Science* **115**, 225-235.
- Knogge W. & Weissenböck G. (1986). Tissue distribution of secondary phenolic biosynthesis in developing primary leaves of *Avena sativa* L. *Planta* **167**, 196-205

- Kubasek W.L., Shirley B.W., McKillop A., Goodman H.M., Briggs W. & Ausubel F.M. (1992). Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **4**, 1229-1236.
- Kulandaivelu G., Lingakumar K. & Premkumar A. (1997). UV-B Radiation. In: Prasad M.N.V. (Hrg.): *Plant Ecophysiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Landry L.G., Chapple C.C.S. & Last R.L. (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* **109**, 1159-1166
- Landry L.G., Stapleton A.E., Lim J., Hoffman P., Hays J.B., Walbot V. & Last R.L. (1997). An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **94**, 328-332
- Li J., Ou-Lee T.-M., Raba R., Amundson R.G. & Last R.L. (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Liakura V., Stavrianiakou S., Liakopoulos G., Karabourniotis G. & Manetas Y. (1999). Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. *Tree physiology* **19**, 905-908
- Lichtenthaler, H. K. (1987). *Application of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer, Dordrecht.
- Lingakumar K., Amudha P. & Kulandaivelu G. (1999). Exclusion of solar UV-B (280-315 nm) radiation on vegetative growth and photosynthetic activities in *Vigna unguiculata* L. *Plant Science* **148**, 97-103
- Liu L., Gitz D.C., III & McClure J.W. (1995). Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum* **93**, 725-733
- Lois R. (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* **194**, 498-503
- Lois R. & Buchanan B. (1994). Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. *Planta* **194**, 504-509
- Mackerness S.A.-H., Butt P.J., Jordan R.B. & Thomas B. (1996). Amelioration of ultraviolet-B-induced down-regulation of mRNA levels for chloroplast proteins, by high irradiance, is mediated by photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* **148**, 100-106
- Mackerness S.A.-H., Jordan R.B. & Thomas B. (1997a) UV-B effects on the expression of genes encoding proteins involved in photosynthesis. In: Lumbden P.J. (Hrg.): *Plants and UV-B. Responses to Environmental Change*. University Press, Cambridge

- Mackerness S.A.-H., Thomas B. & Jordan R.B. (1997b) The effect of supplementary ultraviolet-B radiation on mRNA transcripts, translation and stability of chloroplast proteins and pigment formation in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany* **48**, 729-738
- Mackerness S.A.-H., Surplus S.L., Jordan R.B. & 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. *Photochemistry and Photobiology* **68**, 88-96
- Mackerness S.A.-H., Jordan R.B. & 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.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **48**, 180-188
- Madey E., Ghosh S., Thompson J.E. & Dumbroff E.B. (1995). The effects of paclobutrazol on stabilization of photosynthetic components on senescing bean leaves. *In*: Mathis P. (Hrg.). *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. IV., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London
- Madronich S., Björn L.O., Ilyas M. & Caldwell M.M. (1991). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *In*: Environmental effects of ozone depletion, Update, United Nations Environmental Programme
- Madronich S. (1993). The Atmosphere and UV-B Radiation at Ground Level. *In*: Young A.R., Moan J., Björn L.O., Nultsch W. (Hrg): *Environmental UV-Photobiology*. Plenum Press, New York and London
- Madronich S., McKenzie R.L., Björn B.O. & Caldwell M.M. (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46**, 5-19
- Markham K.R., Ryan K.G., Bloor S.J. & Mitchell K.A. (1998a). An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry* **48**, 791-794
- Markham K.R., Tanner G.J., Caasi-Lit M., Whitecross M.I., Nayudu M. & Mitchell K.A. (1998b). Possible protective role for 3', 4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry* **49**, 1913-1919
- Maxwell K. & Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668
- Mazza C.A., Boccalandro H.E., Giordano C.V., Battista D., Scopel A.L. & Ballaré C.L. (2000). Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* **122**, 117-125
- Melis A., Nemson J.A. & Harrison M.A. (1992). Damage to functional components and partial degradation of photosystem II reaction center proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *Biochimica et Biophysica acta* **1100**, 312-320

- Middleton E. M. & Teramura A. H. (1993). The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiology* **103**, 741-752.
- Mol J.N.M., Robbins M.P., Dixon R.A. & Veltkamp E. (1985). Spontaneous and enzymatic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. *Phytochemistry* **24**, 2267-2269
- Molina M.J. & Rowland F.S. (1974). Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature* **249**, 810-812
- Moorthy P. & Kathiresan K. (1997). Influence of ultraviolet-B radiation on photosynthetic and biochemical characteristics of a mangrove *Rhizophora apiculata*. *Photosynthetica* **34**, 465-471
- Nagel L.M., Bassman J.H., Edwards G.E., Robberecht R. & Franceschi V.R. (1998). Leaf anatomical changes in *Populus trichocarpa*, *Quercus rubra*, *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus ponderosa* exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum* **104**, 385-396
- Nogués S. & Baker N.R. (1995). Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO₂ assimilation in pea leaves on exposure to UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment* **18**, 781-787
- Nogués S., Allen D.J., Morison, J.I.L. & Baker N.R. (1998). Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiology* **117**, 173-181
- Nogués S., Allen D.J., Morison, J.I.L. & Baker N.R. (1999). Characterization of stomatal closure caused by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology* **121**, 489-496
- Ohl S., Hahlbrock K. & Schäfer E. (1989). A stable blue light-derived signal modulates UV light-induced chalcone synthase gene activation in cultured parsley cells. *Planta* **177**, 228-236
- Olsson L., Veit M., Weissenböck G. & Bornman J.F. (1998). Different flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*: Isolation, identification and quantification of flavonol glycosides. *Phytochemistry* **49**, 1021-1028
- Olsson L.C., Veit M. & Bornman J.F. (1999). Epidermal transmittance and phenolic composition in leaves of atrazine-tolerant and atrazine-sensitive cultivars of *Brassica napus* grown under enhanced UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* **107**, 259-266.
- Olsson L., Fraysse L. & Bornman J.F. (2000). Influence of high light and UV-B radiation on photosynthesis and D1 turnover in atrazine-tolerant and -sensitive cultivars of *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany* **51**, 265-274
- Ormrod D.P., Schmidt A.-M. & Livingston N.J. (1997). Effect of UV-B radiation on the shoot matter production and stable isotope composition of two *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Physiologia Plantarum* **101**, 497-502

- Peters A. (1987). Differenzierung und Dynamik des Flavonoidstoffwechsels während der Primärblattentwicklung von *Secale cereale* L. und *Hordeum vulgare* L. – Enzymatische, immunologische und spektroskopische Untersuchungen. Dissertation, Universität zu Köln
- Petropoulou Y., Kyparissis A., Nikolopoulos D. & Manetas Y. (1995). Enhanced UV-B radiation alleviates the adverse effects of summer drought in two Mediterranean pines under field conditions. *Physiologia Plantarum* **94**, 37-44
- Porra R.J., Thompson W.A. & Kriedemann P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica acta* **975**, 384-394
- Rao M.V., Paliyath G. & Ormrod D.P. (1995). Differential response of photosynthetic pigments, rubisco activity and rubisco protein of *Arabidopsis thaliana* exposed to UVB and ozone. *Photochemistry and Photobiology* **62**, 727-735
- Rao M.V., Paliyath G. & Ormrod D.P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**, 125-136
- Reuber S. (1991). Untersuchungen zum Einfluß von UV-B- und Weißlicht auf die Stimulation der Flavonoidbiosynthese während der Primärblattentwicklung bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Reuber S. (1996). Die Strahlungsregulation der löslichen Phenylpropane und ihre Bedeutung als UV-B-Schirm- und -Schutzpigmente im Primärblatt von Roggen (*Secale cereale* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Universität zu Köln.
- Reuber S., Bornman J.F. & Weissenböck G. (1996a). A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant, Cell and Environment* **19**, 593-601
- Reuber S., Bornman J.F. & Weissenböck G. (1996b). Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum* **97**, 160-168
- Reuber S., Jende-Strid B., Wray V. & Weissenböck G. (1997). Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase. *Physiologia Plantarum* **101**, 827-832
- Robakowski P. & Laitat E. (1999). Effects of an enhanced ultraviolet-B irradiation on photosynthetic apparatus of several forest coniferous tree species from different locations. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**, 283-296
- Ros J. & M. Tevini (1995). Interaction of UV-Radiation and IAA during growth of seedlings and hypocotyl segments of sunflower. *Journal of Plant Physiology* **146**, 295-302

- Salter A.H., Koivuniemi A. & Strid Å. (1997). UV-B and UV-C irradiation of spinach PSII preparations in vitro. Identification of different fragments of the D1 protein depending upon irradiation wavelength. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**, 809-817
- Sarma A.D. & Sharma R. (1999). Purification and characterization of UV-B induced phenylalanin ammonial-lyase from rice seedlings. *Phytochemistry* **50**, 729-737
- Schmelzer E., Jahnen W. & Hahlbrock K. (1988). In situ localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **85**, 2989-2993
- Schmitz R. (1995). Untersuchungen löslicher und unlöslicher Hydroxyzimtsäuren und der Vergleich ihrer Stimulation durch Weißlicht und UV-Strahlung mit den löslichen Flavonoiden im Primärblatt des Roggens (*Secale cereale* L.). Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Schnitzler J.-P., Jungblut T.P., Heller W., Köfferlein M., Hutzler P., Heinzmann U., Schmelzer E., Ernst D., Langebartels C. & Sandermann H. Jr (1996). Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist* **132**, 247-258
- Schnitzler J.-P., Jungblut T.P., Feicht C., Köfferlein M., Langebartels C., Heller W. & Sandermann H. Jr (1997). UV-B induction of flavonoid biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Trees* **11**, 162-168
- Schopfer P. & Brenneke A. (1999). *Pflanzenphysiologie*. Springer Verlag Berlin
- Schreiber U., Schliwa U. & Bilger W. (1996). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**, 51-62
- Schulz M., Strack D., Weissenböck G., Markham K.R., Dellamonica G. & Chopin J. (1985). Two luteolin O-glucuronides from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* **24**, 343-345
- Seckmeyer G. & Payer H.-D. (1993). A new sunlight simulator for ecological research on plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **21**, 175-181
- Sheahan J.J. (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **83**, 679-686
- Singh A. (1996). Growth, physiological and biochemical responses of three tropical legumes to enhanced UV-B radiation. *Canadian Journal of Botany* **74**, 135-139
- Spetea C., Hideg E. & Vass I. (1996). The quinone electron acceptors are not the main sensitizers of UV-B induced protein damage in isolated photosystem II reaction centre and core complexes. *Plant Science* **115**, 207-215
- Stafford H.A. (1992). *Flavonoid metabolism*. CRC Press, Boca Raton, Florida USA

- Stapleton A.E. & Walbot V. (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology* **105**, 881-889
- Staxen I., Bergounioux C. & Bornman (1993). Effect of ultraviolet radiation on cell division and microtubule organization in *Petunia hybrida* protoplasts. *Protoplasma* **173**, 70-76.
- Stephen J., Woodfin R., Corlett J.E., Paul N.D., Jones H.G. & Ayres P.G (1999). Response of barley and pea crops to supplementary UV-B radiation. *Journal of Agricultural Science* **132**, 253-261
- Strack D., Meurer B. & Weissenböck G. (1982). Tissue specific kinetics of flavonoid accumulation in primary leaves of rye (*Secale cereale* L.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **108**, 131-141.
- Strack D., Keller H. & Weissenböck G. (1987). Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of sugar acids and hydroaromatic acids by protein preparations from rye (*Secale cereale*) primary leaves. *Journal of Plant Physiology* **131**, 61-73
- Strid Å., Chow W.S. & Anderson J.M. (1990). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1020**, 260-268
- Strid, A. (1993). Alteration in expression of defence genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiology* **34**, 949-953
- Taylor M., Nikaido O., Jordan B.R., Rosamond J., Bray C.M. & Tobin A.K. (1996). Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment* **19**, 171-181
- Teramura A.H., Ziska L.H. & Szein A.E. (1991). Changes in growth and photosynthetic capacity of rice with increased UV-B-radiation. *Physiologia Plantarum* **83**, 373-380
- Tevini M. & Häder D.-P. (1985). *Allgemeine Photobiologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Tournaire C., Croux S., Maurette M.-T., Beck I., Hocquaux M., Braun A.M. & Oliveros E. (1993). Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **19**, 205-215
- Trebst A. (1999). Linearer und zyklischer Elektronentransport. *In*: Häder D.-P. (Hrg.): *Photosynthese*. Thieme Verlag, Stuttgart; New York
- Vass I., Spetea C., Hideg E., Barbato R. & Petrouleas V. (1995). Ultraviolet-B radiation induced damage to the function and structure of photosystem II. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungaria* **30**, 47-49
- Vass I., Sass L., Spetea C., Bakou A., Ghanotakis D.F. & Petrouleas V. (1996). UV-B induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochemistry* **35**, 8964-8973
- von Sengbusch P. (1989). *Botanik*. McGraw-Hill Book Company GmbH, Hamburg

- von Willert D.J., Matyssek R. & Herppich W. (1995). Experimentelle Pflanzenökologie, Grundlagen und Anwendungen. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Warner D.A. & Burke J.J. (1993). Cool night temperatures alter leaf starch and photosystem II chlorophyll fluorescence in cotton. *Agronomical Journal* **85**, 836-840
- Wilson M.I. & Greenberg B.M. (1993). Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B. *Photochemistry and Photobiology* **57**, 556-563
- Wilson M.I., Ghosh S., Gerhardt K.E, Holland N., Babu T.S., Edelman M., Dumbroff E.B. & Greenberg B.M. (1995). In vivo photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Ox ygenase Holoenzyme by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology* **109**, 221-229
- Wu S.-C. & Hahlbrock K. (1992). In situ localization of phenylpropanoid-related gene expression in different tissues of light-grown and dark-grown parsley seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung* **47c**, 591-600.
- Zhang J.E., Hu X., Henkow L., Jordan B.R. & Strid Å. (1994). The effects of UV-B radiation on CF₀F₁-ATPase. *Biochimica et Biophysica acta* **1185**, 295-302

Lebenslauf

Name: Petra Burchard
geb. am: 07.05.59
in: Köln
Familienstand: verheiratet, ein Sohn (geb. 1988)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Speestraße 9, 50937 Köln

Schulausbildung:

Ostern 1965 - 7/68 Volksschule
8/68 - 7/74 Edith-Stein-Realschule, Köln,
9/74 - 8/75 Einjährige Berufsfachschule für Ernährung und Hauswirtschaft,
Köln
9/75 - 8/76 Praktikum im Kindergarten St. Joseph, Köln
9/75 - 7/78 Fachschule für Sozialpädagogik, Köln,
8/79 - 7/80 Berufspraktisches Jahr im Kinderhort, Köln,
Abschluß: Staatl. anerkannte Erzieherin
8/80 - 7/81 Fachoberschule Kl. 12, Köln
Abschluß: Fachhochschulreife
8/83 – 12/85 Köln-Kolleg, Städt. Institut zur Erlangung der Hochschulreife,
Köln, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

WS 1982/83 – SS 83 Studium: Chemieingenieurwesen, Fachhochschule Münster
WS 1986/87 Studium: Biologie (Diplom), Universität zu Köln,
Schwerpunkte: Botanik, Biochemie, Genetik
Abschluß: Diplom-Biologe 10/94
SS 96 Beginn der Dissertation

Berufspraxis und Praktika:

8/78 – 7/79 diverse Aushilfsjobs (priv. Haushalt, gewerbl. Produktion,
öffentl. Verwaltung)
9/81 – 4/82 Sekretärin im Rektorat der Katholischen Fachhochschule Köln
5/82 – 7/82 Praktikum im Fachbereich Lebensmittelchemie, Universität
Bonn, zur Vorbereitung auf die Fachhochschule
1/86 – 9/86 Mitarbeiterin bei Verlagsvertreter, Fortführung dieser Tätigkeit
neben dem Studium bis zum Beginn der Diplomarbeit im SS
1993
10/94 – 4/96 Wiss. Hilfskraft im Botanischen Institut der Universität Köln
4/96 – 9/99 Wiss. Mitarbeiterin im Botanischen Institut in einem von der
Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekt
seit 6/2000 Mitarbeiterin bei Fa. Bioropa GmbH, Köln