

**UV- Schutz in Primärblättern von Roggen und Gerste:
Untersuchungen zur Bedeutung der
Flavonoid-Akkumulation und Photoreaktivierung von
DNA-Schäden**

In 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

Rainer Schmitz

aus Köln

2001

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Weissenböck
Priv.-Doz. Dr. E. Schmelzer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2000

Danksagung

An erster Stelle danke ich besonders Herrn Weissenböck für seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Verständnis und seine Hilfe bei allen Fragen und Problemen, die nicht nur fachlicher Natur waren. Besonders bedanken möchte ich mich für die Bereitstellung einer Stelle, ohne die meine Promotion nicht möglich gewesen wäre. Auch möchte ich mich für die sehr gute und schöne Zusammenarbeit bei der Betreuung von Fortgeschrittenen-Praktika bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe bedanken, in der immer ein freundliches, hilfsbereites und sehr kooperatives Klima herrschte. Erwähnen möchte ich besonders Petra Burchard, Jürgen Brückmann, Markus Klein, Maria Knappstein, Carsten Koblischke, Jürgen Krüger, Gesine Sachs und Katja Töttel.

Ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Werkstatt des Botanischen Institutes der Universität zu Köln, insbesondere Herrn Leson, für den Bau des Spezialfilters und der tatkräftigen Unterstützung bei der Aufstellung und in Betriebnahme des neuen Anzuchtschranks. Sehr hilfreich war auch ihre Unterstützung bei allen technischen Problemen, die immer schnell und unkompliziert war.

Den Arbeitsgruppenleitern Werner Heller (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Oberschleißheim), Jörg-Peter Schnitzler (Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung IFU, Garmisch-Partenkirchen) und Markus Veit (früher: Pharmazeutische Biologie Universität zu Würzburg; jetzt: Zentralinstitut für Arzneimittelforschung, Sinzig) möchte ich für ihre Freundschaft und die sehr anregenden und schönen UV-Workshops danken. Zusätzlich möchte ich ihnen und Herrn Hutzler (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Oberschleißheim) für die Kooperation bei der Laser-Scanning-Mikroskopie danken.

Den folgenden Kooperationspartnern danke ich für ihre Hilfestellungen: Herrn Buchholz und Herrn Wellmann (Universität zu Freiburg), Herrn Stockfleth (Landesanstalt für Arbeitsschutz NRW), Herrn K. Schmitz (Botanisches Institut, Universität zu Köln) und Herrn Schmelzer (MPI für Züchtungsforschung, Köln).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, und dem Verein der Freunde und Förder der Universität zu Köln danke ich für die finanzielle Unterstützung mit Sachmitteln.

Ganz besonders lieber Dank gilt meiner Lebensgefährtin Anne Hoerner. Sie opferte manches Wochenende für mich und half mir bei den Ernten. Selbst in der stressigen Endphase ihres Referendariats nahm sie sich Zeit meine Arbeit Korrektur zu lesen. Ohne ihre Liebe und ihren Rückhalt wäre diese Arbeit vielleicht nicht geschrieben worden.

Für Anne

Zusammenfassung

Es wurde bei Roggen und Gerste die Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation im Vergleich zur DNA-Reparatur für den Schutz vor erhöhter UV-B-Strahlung (UV-B_{BE}: 12 kJ m⁻² d⁻¹) in Primärblättern untersucht. UV-B-Strahlung verursacht unter anderem DNA-Schäden, hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die UV-B-Absorptionskapazität beider Gramineen aus einer konstitutiven und einer dynamischen, UV-induzierten Komponente zusammensetzt. Im Roggen stellen die epidermalen Flavone die dynamische Komponente dar und sind gleichzeitig die UV-Hauptabsorber. Saponarin ist Hauptabsorber und dynamische Komponente in der Gerste. Die fast ausschließliche Lokalisation des Saponarins in der Epidermis und der subepidermalen Zellschicht konnte fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. In beiden Gramineen bilden die löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate die konstitutive Komponente.

Eine schnelle Photoreaktivierung von CPD wurde in beiden Gramineen gezeigt. Die UV-B-Absorptionskapazität junger Primärblätter von Roggen und Gerste (Muttervarietät) war durch UV-Strahlung um 20 % erhöht, jedoch blieb die CPD-Akkumulation während einer 6stündigen UV-Bestrahlung davon unbeeinflusst. In einer flavonoiddefizienten Gersten-Mutante akkumulierte während der 6stündigen UV-Bestrahlung eine bis zu 9fach höhere CPD-Menge als in der Muttervarietät, nachfolgend wurde bei beiden, und auch im Roggen, der Großteil des Schadens repariert. Im Roggen wurde gezeigt, dass mindestens 60-70 % des entstandenen Schadens schon während der Bestrahlung durch Photoreaktivierung repariert wurde. Während der Primärblattentwicklung akkumulierten in beiden Gramineen zunehmend mehr CPD, wobei die Mutante im adulten Blatt 9fach soviel Schaden aufwies als die Muttervarietät.

Diese Ergebnisse zeigen zwar eine hohe Effizienz der beiden Schutzmechanismen auf, diese reichte aber nicht aus, um eine DNA-Schädigung völlig zu vermeiden.

Abstract

The thesis investigates the role of the accumulation of phenylpropanoids compared to DNA-repair with respect to protection of rye and barley primary leaves from increased UV-B (UV-B_{BE}: 12 kJ m⁻² d⁻¹). UV-B radiation causes among others DNA damage mainly cyclobutane pyrimidine dimers (CPD).

It could be demonstrated in both cereals that the UV-B absorption capacity consists of a constitutive and a dynamic UV induced component. The epidermal flavones belong to the dynamic component in rye, and they are also the main absorbers of UV radiation. The dynamic component and main UV absorber in barley is Saponarin. The almost exclusive localisation of saponarin in the epidermal and subepidermal cell layers could be demonstrated using fluorescence microscopy. In both cereals the constitutive component consists of derivatives of hydroxycinnamic acids.

Both cereals revealed fast photoreactivation of CPD. The slight increase of 20 percent of the UV-B absorption capacity in young primary leaves of rye and barley through UV radiation does not affect the CPD accumulation during 6h-UV irradiation. In a flavonoid deficient mutant of barley on the other hand a 9fold higher CPD accumulation has been observed than in the wild type during the 6h-UV irradiation. Following the irradiation most of the CPD could be repaired in both barley varieties as well as in rye. It was demonstrated that 60 to 70 percent of the arising CPD could be photoreactivated during irradiation. Nevertheless CPD accumulate during the development of the primary leaves of barley and rye. In the barley mutant this accumulation was 9fold higher than in the wildtype.

These results demonstrate the high efficiency of both UV protection mechanisms, but they also show that these are not sufficient enough to prevent any damage accumulation.

Abkürzungen

6-4PP	6-4-Photoprodukte = Pyrimidin(6-4)pyrimidon-Dimer
Abs.	Absorption
AG	Arbeitsgruppe
aq.	wässrig
BER	Basen-Exzissionsreparatur
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHI	Chalkon-Isomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid
cv.	Kultivar
ED	Epidermis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere
Fa.	Firma
FADH [⊖]	reduziertes Flavin-adenin-dinucleotid
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
L.	Linné
Lam.	Lamarck
lösl.	löslich
MMP	Magermilchpulver
MP	Mesophyll
MPI	Max-Planck-Institut
MV	Muttervarietät
NaKP _i	Natriumdihydrogenphosphat / Dikaliumhydrogenphosphat -Puffer
NER	Nukleotid-Exzissionsreparatur
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
<i>p</i>	<i>para</i>
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAM	Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung (400 - 700 nm)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pbst	Primärblattstück
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPFD	photosynthetische Photonenflussdichte
PR	Photoreaktivierung
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R ₁	Luteolin-7-O-diglucuronyl-4'-O-glucuronid
R ₂	Luteolin-7-O-diglucuronid
R ₃	Isovitexin-2"-O-arabinosid
R ₄	Isovitexin-2"-O-galactosid
R _I	Cyanidin-3-O-glucosid
R _{II}	Cyanidin-3-O-gentiobiosid
rel.	relative
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
S.	Seite
s.	siehe
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TD	Thymin-Dimer
Tris	N-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UNEP	United Nations Environmental Program
UV	ultraviolett
UV-A	elektromagnetische Strahlung der Wellenlänge 320 - 400 nm
UV-B	elektromagnetische Strahlung der Wellenlänge 280 - 320 nm
UV-B _{BE}	biologisch effektive UV-B-Strahlung
UV-C	elektromagnetische Strahlung der Wellenlänge 100 - 280 nm
UVER	UV-Schadens-Exzisionsreparatur
v/v	Volumen pro Volumen
var.	Variation
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZW	Zellwand

1	EINLEITUNG	1
1.1	Umweltfaktor UV-Strahlung.....	1
1.1.1	Herkunft und Auftreten	1
1.1.2	Wirkung auf Pflanzen	4
1.1.2.1	Molekulare, biochemische und physiologische Effekte.....	4
1.1.2.2	Genregulation und UV-Photorezeptoren.....	6
1.1.2.3	Wachstum, Entwicklung, Morphologie, Reproduktion und Ökologie.....	7
1.1.2.4	Wirkungsspektren und Strahlungswichtung.....	8
1.1.3	UV-Schutzmechanismen von Pflanzen.....	10
1.1.3.1	DNA-Reparatur	10
1.1.3.2	Phenylpropanoid-Stoffwechsel	14
1.2	Flavonoid-Stoffwechsel und UV-Schutz in Roggen und Gerste	16
1.2.1	Roggen	16
1.2.2	Gerste	18
1.3	Zielsetzung	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Pflanzenmaterial.....	23
2.1.2	Geräte	23
2.1.3	Chemikalien und Lösungsmittel	25
2.1.3.1	Phenylpropanoid-Extraktion und HPLC	25
2.1.3.2	DNA - Isolierung.....	26
2.1.3.3	ELISA - Test auf Thymin-Dimere	26
2.1.3.4	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Pflanzenanzucht und Ernte.....	27
2.2.1.1	Aussaat	27
2.2.1.2	Anzuchtbedingungen.....	27
2.2.1.3	Strahlungsbedingungen	29
2.2.1.3.1	Das Beleuchtungsmodul des Anzuchtschranks	29
2.2.1.3.2	UV-B-Bestrahlungseinheit	30
2.2.1.3.3	Die Filtereinheit	31
2.2.1.3.4	Strahlungsbedingungen	32

2.2.1.4	Anzucht und Bestrahlung von Roggen- und Gersten-Keimlingen für die Experimente zur Phenylpropanoid-, Thymin-Dimer-Akkumulation und Thymin-Dimer-Reparatur in einem frühen Entwicklungsstadium	36
2.2.1.4.1	Anzucht	36
2.2.1.4.2	Bestrahlungen und Erntezeitpunkte.....	36
2.2.1.4.3	Bestrahlungs- und Reparaturbedingungen	38
2.2.1.5	Anzucht zu den Untersuchungen über die Phenylpropanoid- und Thymin-Dimer-Akkumulation im Verlauf der Primärblattentwicklung von Roggen und Gerste.	40
2.2.1.6	Ernte	41
2.2.2	Extraktion und Analyse der Phenylpropanoide	41
2.2.2.1	Zellaufschluß und Extraktion.....	42
2.2.2.2	Hydrolyse löslicher Hydroxyzimtsäure-Derivate	42
2.2.2.3	Extraktion zellwandgebundener Hydroxyzimtsäuren	43
2.2.2.4	HPLC-Analysen	43
2.2.2.4.1	Gradienten	44
2.2.2.4.2	Berechnung der Stoffmengen.....	46
2.2.2.4.3	Identifikation der Phenylpropanoide	49
2.2.3	Nachweis von Thymin-Dimeren	49
2.2.3.1	DNA-Isolierung.....	49
2.2.3.2	ELISA zur Messung der Thymin-Dimer-Menge in DNA.....	51
2.2.4	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	52
2.2.5	Statistik.....	53
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Die Nachweismethode von Thymin-Dimeren	54
3.1.1	Optimierung des Absorptionshintergrundes.....	56
3.1.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit des Tests.....	57
3.1.3	Auswertung der ELISA-Messwerte.....	60
3.2	Entwicklung der UV-B Spezial-Bestrahlungsanlage	60
3.2.1	Entwicklung eines UV-B-Bandpassfilters.....	61
3.2.2	Aufbau und Vermessung der UV-B-Spezialbestrahlungsanlage.....	64
3.3	Roggen.....	65
3.3.1	Die Phenylpropanoide im Primärblatt.....	66
3.3.1.1	Analyse der Phenylpropanoide.....	66

3.3.1.2	<i>In situ</i> - Lokalisation der Flavone im Primärblatt mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	69
3.3.2	Einfluss von UV-Strahlung auf Phenylpropanoid-, Thymin-Dimer-Akkumulation und Thymin-Dimer-Reparatur in einem frühen Entwicklungsstadium der Roggen-Primärblätter	72
3.3.2.1	Der Phenylpropanoidgehalt 5 Tage alter Primärblätter	73
3.3.2.2	Akkumulation von Thymin-Dimeren durch UV-Bestrahlung	75
3.3.2.3	Photoreaktivierung von Thymin-Dimeren	76
3.3.3	Phenylpropanoid- und Thymin-Dimer-Akkumulation während der Primärblattentwicklung	79
3.3.3.1	Die Phenylpropanoid-Akkumulation während der Primärblattentwicklung	80
3.3.3.1.1	Phenylpropanoid-Akkumulation	80
3.3.3.1.2	UV-B-Absorptionskapazität der Gewebe	83
3.3.3.2	Thymin-Dimer-Akkumulation	85
3.4	Gerste	86
3.4.1	Die Phenylpropanoide im Primärblatt von <i>Ca</i> und <i>ant</i>	86
3.4.1.1	Analyse der Phenylpropanoide	86
3.4.1.2	<i>In situ</i> - Lokalisation der Flavone im Primärblatt mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	89
3.4.2	Einfluss von UV-Strahlung auf Phenylpropanoid-, Thymin-Dimer-Akkumulation und Thymin-Dimer-Reparatur in einem frühen Entwicklungsstadium der Gerste-Primärblätter	93
3.4.2.1	Der Phenylpropanoidgehalt 6 Tage alter Primärblätter	94
3.4.2.2	Akkumulation von Thymin-Dimeren durch UV-Bestrahlung	96
3.4.2.3	Photoreaktivierung von Thymin-Dimeren	98
3.4.3	Phenylpropanoid- und Thymin-Dimer- Akkumulation während der Primärblattentwicklung	100
3.4.3.1	Phenylpropanoid-Akkumulation während der Primärblattentwicklung von <i>Ca</i> und <i>ant</i>	101
3.4.3.1.1	Phenylpropanoid-Akkumulation	101
3.4.3.1.2	UV-B-Absorptionskapazität	103
3.4.3.2	Thymin-Dimer-Akkumulation während der Primärblattentwicklung	106
4	DISKUSSION	108
4.1	ELISA zum Nachweis von Thymin-Dimeren	108

4.2	Die Anzucht- und Bestrahlungsbedingungen	109
4.2.1	Anzuchtbedingungen.....	109
4.2.2	Spezialbestrahlungsanlage.....	110
4.3	Die UV-Schutzpigmente in Roggen und Gerste.....	111
4.3.1	Die Phenylpropanoide	111
4.3.2	Gewebelokalisation der UV-Schutzpigmente	112
4.3.3	Akkumulation und potenzielle UV-B-Absorptionskapazität der UV-Schutzpigmente	117
4.4	Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation und der DNA-Reparatur für die DNA-Schadensakkumulation in einem frühen Primärblattstadium.....	122
4.4.1	Photoreaktivierung	123
4.4.2	Beeinflussung der CPD-Bildung durch Phenylpropanoid-Akkumulation und Photoreaktivierung	125
4.5	Die CPD-Akkumulation während der Primärblattentwicklung	128
4.6	Ausblick.....	130
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	133
6	LITERATUR	135

1 EINLEITUNG

Pflanzen sind an ihrem natürlichen Standort einer Vielzahl von Umweltfaktoren ausgesetzt. Einer der wichtigsten abiotischen Faktoren stellt die Strahlung der Sonne dar. Sie ist die entscheidende Energiequelle für das Leben auf der Erde. Nicht nur, dass alle in Biomasse gespeicherte Energie letztlich aus der Sonne stammt, auch alle atmosphärischen und klimatischen Bewegungen und Erscheinungen sind auf die Sonne und ihre Energieabstrahlung zurückzuführen. Doch Sonnenstrahlung beinhaltet auch kurzwellige, schädigende UV-Strahlung. Die Pflanzen mussten daher Strategien entwickeln, um sich vor den Folgen der Strahlenbelastung zu schützen. Die Untersuchung dieser pflanzlichen Schutzstrategien sind das übergeordnete Thema der vorliegenden Arbeit.

1.1 Umweltfaktor UV-Strahlung

1.1.1 Herkunft und Auftreten

Im "Kraftwerk Sonne" entsteht die Energie durch komplexe Kernfusionsprozesse und wird hauptsächlich in Form von elektromagnetischer Strahlung abgegeben. Das elektromagnetische Spektrum der die Erdatmosphäre erreichenden Strahlung reicht von 200 nm bis 3200 nm (TEVINI UND HÄDER, 1985). Die Energie dieser Strahlung wird als **Solarkonstante** bezeichnet und hat einen Wert von 1360 W / m^2 , der aufgrund der Ekliptik der Erdumlaufbahn jährlichen Schwankungen unterliegt. Der Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Spektrums von 200 - 3200 nm wird in die Bereiche **UV-C** (< 280 nm), **UV-B** (280 - 320 nm), **UV-A** (320 - 400 nm), **PAR** (photosynthetic active radiation, 400 - 700 nm) und **Infrarot** (> 700 nm) unterteilt (TEVINI UND HÄDER, 1985). Der Anteil der UV-Strahlung (alle drei Bereiche) beträgt ca. 5 % (VON WILLERT ET AL., 1995).

Beim Durchtritt der solaren Strahlung durch die Erdatmosphäre wird sie zum Teil reflektiert, absorbiert und gestreut (Abbildung 1.1, S. 2). Von der infraroten Strahlung werden vor allem die Wellenlängen ab 2000 nm von Wasserdampf und Kohlenstoffdioxid absorbiert (VON WILLERT ET AL., 1995). Im kurzwelligen Bereich erfolgt die vollständige Absorption der UV-C-Strahlung schon in den obersten Atmosphärenschichten durch Stickoxide, molekularen Sauerstoff und Ozon (FOUKAL, 1990). Die UV-B-Strahlung wird zum Großteil von der stratosphärischen Ozonschicht absorbiert, deren Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt und deren Absorption dann bis 310 nm stark abfällt. So trifft messbare Strahlung ab ca. 290 nm auf

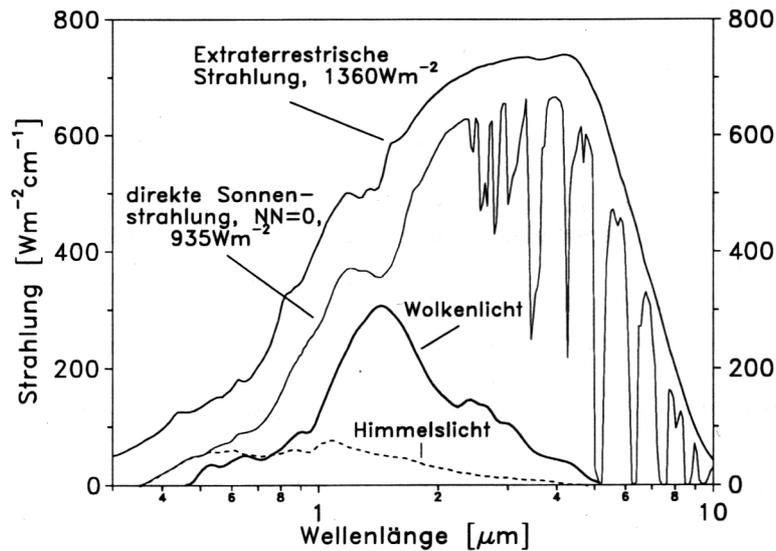


Abbildung 1.1: Spektrale Verteilung der extraterrestrischen Strahlung im Vergleich zur direkten Sonnenstrahlung, zum Himmelslicht und dem Wolkenlicht.

Die auf die Erdatmosphäre treffende extraterrestrische Strahlung wird reflektiert, absorbiert und gestreut. Die Gesamtheit der auf eine horizontalen Ebene an der Erdoberfläche fallende Strahlung heißt Globalstrahlung. Sie setzt sich aus der direkten Sonnenstrahlung (nicht gestreut), dem Himmelslicht (an Molekülen und Partikeln gestreute Strahlung) und dem Wolkenlicht (in Wolken gestreute und mehrfach reflektierte Strahlung) zusammen (aus VON WILLERT ET AL., 1995).

die Erdoberfläche (Abbildung 1.5, S. 9). Die gesamte auf die Erdoberfläche treffende Strahlung nennt man **Globalstrahlung** (Abbildung 1.1). Die Strahlungsleistung der Globalstrahlung ist von der geographischen Breite, der Jahres- und Tageszeit, der Standorthöhe, der Zusammensetzung der Erdatmosphäre (Spurengase, Ozon, CO₂, Aerosole, Luftverschmutzungen), der Bewölkung und dem Reflexionsgrad der Erdoberfläche abhängig (MADRONICH, 1993) und schwankt dementsprechend sehr stark. Sie liegt durchschnittlich (gemittelt über 24 Stunden) in einem Bereich von unter 100 W / m² in den Polargebieten und bis 300 W / m² in einigen Gebieten der Sahara (DOSTROVSKY, 1992). Dabei können Maximalwerte bei einem Sonnenstand von 90° und wolkenlosem Himmel von 1120 W / m² erreicht werden (SCHULZE, 1977).

Trotz der **Ozon-Schicht** erreicht immer noch kurzwellige, energiereiche Strahlung die Biosphäre, durch die Biomoleküle chemisch verändert werden können (s.u.). Ca. 17 % der auf die Erdatmosphäre treffenden Sonnenstrahlung unter 320 nm erreicht die Erdoberfläche (SCHULZE, 1977). In der frühen Geschichte der Erde war dieser Anteil jedoch wesentlich höher (Abbildung 1.2, S. 3). In der Uratmosphäre vor 4 Milliarden Jahren gab es keinen molekularen Sauerstoff, erst mit dem Auftreten der Photosynthese vor vielleicht 2,7 Milliarden Jahren wurde er in die Erdatmosphäre abgegeben. Vor ca. 2 Milliarden Jahren begann der Sauerstoff-

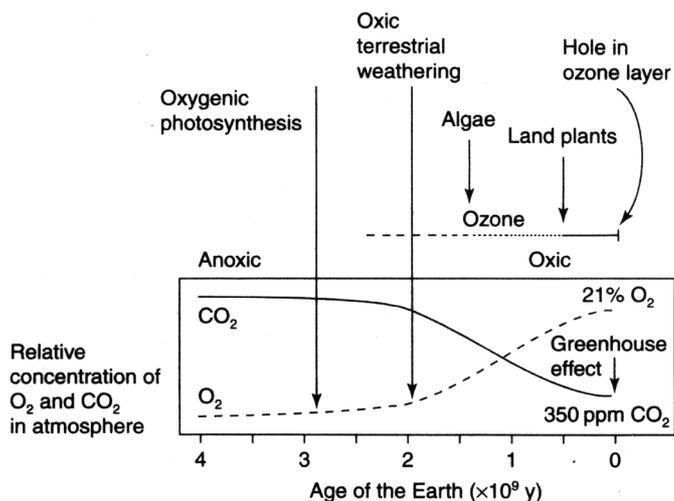


Abbildung 1.2: Die Atmosphäre während der Erdgeschichte.

Relative Konzentrationen an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, Ozonschicht-Entwicklung und das Auftreten einiger wichtiger evolutionärer Schritte während der Erdgeschichte (aus ROZEMA ET AL., 1997a)

Gehalt stark zu steigen und es bildete sich vermutlich dadurch eine Ozon-Schicht (Abbildung 1.2; ROZEMA ET AL., 1997a). Die Ozonschicht stellt ein diffiziles Gleichgewichtssystem dar, das abhängig ist von der Sonnenstrahlung und dem Sauerstoff-Gehalt der Atmosphäre (FOUKAL, 1990). UV-C-Strahlung spaltet molekularen Sauerstoff in zwei Sauerstoffradikale, welche dann sehr schnell mit molekularem Sauerstoff zu Ozon (O₃) reagieren. Ozon kann wieder durch UV-B-Strahlung in molekularen Sauerstoff zerfallen.

Das frühe Leben der Erde war also schon bedroht durch energiereiche Strahlung im UV-B- und UV-C-Bereich unter 320 nm, wobei die Entwicklung des Lebens im Wasser einen gewissen Schutz bot (ROZEMA ET AL., 1997a). Auch für den Zeitpunkt der Evolution der ersten Landpflanzen gibt es Hinweise darauf, dass die Erdatmosphäre einen geringeren Sauerstoff-Gehalt und damit eine geringere Ozonschicht-Dicke aufwies. Folglich kann man von einer höheren UV-B-Belastung der frühen Landpflanzen verglichen mit der heutigen Situation pflanzlicher Organismen ausgehen (Abbildung 1.2; ROZEMA ET AL., 1997a).

Heutzutage wird die Ozonschicht zusätzlich durch den Menschen beeinflusst. Vor allem Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKWs) tragen durch ihre katalytische Beschleunigung des Ozon-Abbaus zu einer Reduzierung der Ozon-Schicht bei (GRAEDEL UND CRUTZEN, 1989). Regelmäßige Messungen der Ozonschicht-Dicke belegen den abnehmenden Trend, wobei im letzten Bericht im Rahmen des UNEP (United Nations Environmental Program, 1998) von einem Maximum der Ozonschicht-Reduktion im Jahre 2000, mit dann folgender allmählicher Regeneration, ausgegangen wird. Dies führt vermutlich zu einer Zunahme von erythem-wirksamer UV-Strahlung verglichen mit 1970 in mittleren Breiten der nördlichen Hemisphäre von 7 % (Winter und Frühling) bzw. 4 % (Sommer und Herbst). In mittleren Breiten der

südlichen Hemisphäre wird die Zunahme mit 6 % im Jahresmittel ähnlich ausfallen. Nur Arktis und Antarktis sind im Frühjahr mit vermutlich 22 % bzw. 130 % sehr viel stärker betroffen (MADRONICH ET AL., 1998).

1.1.2 Wirkung auf Pflanzen

Die photoautotrophen Organismen befinden sich in einem besonderen Dilemma: Für die Photosynthese sind sie auf hohe Strahlungsleistungen im PAR-Bereich angewiesen, was aber unter natürlichen Bedingungen mit einer hohen Belastung mit kurzwelliger Strahlung gekoppelt ist. Die Auswirkungen der UV-B-Strahlung auf höhere Pflanzen sind sehr vielfältiger Natur. Sie beinhalten molekulare, biochemische und physiologische Effekte, die sich auf Wachstum, Entwicklung, Morphologie und Reproduktion auswirken können.

1.1.2.1 Molekulare, biochemische und physiologische Effekte

Die **Schädigung der DNA** ist eine der wichtigsten Folgen von UV-B-Belastung. Durch direkte Photonenabsorption entstehen als Hauptprodukte Dimere benachbarter Basen (Abbildung 1.3). In höheren Pflanzen sind dies Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD, ca. 75 %) und Pyrimidin(6-4)pyrimidon-Dimere (6-4-Photoprodukte, 6-4PP, ca. 25 %), wobei letztere

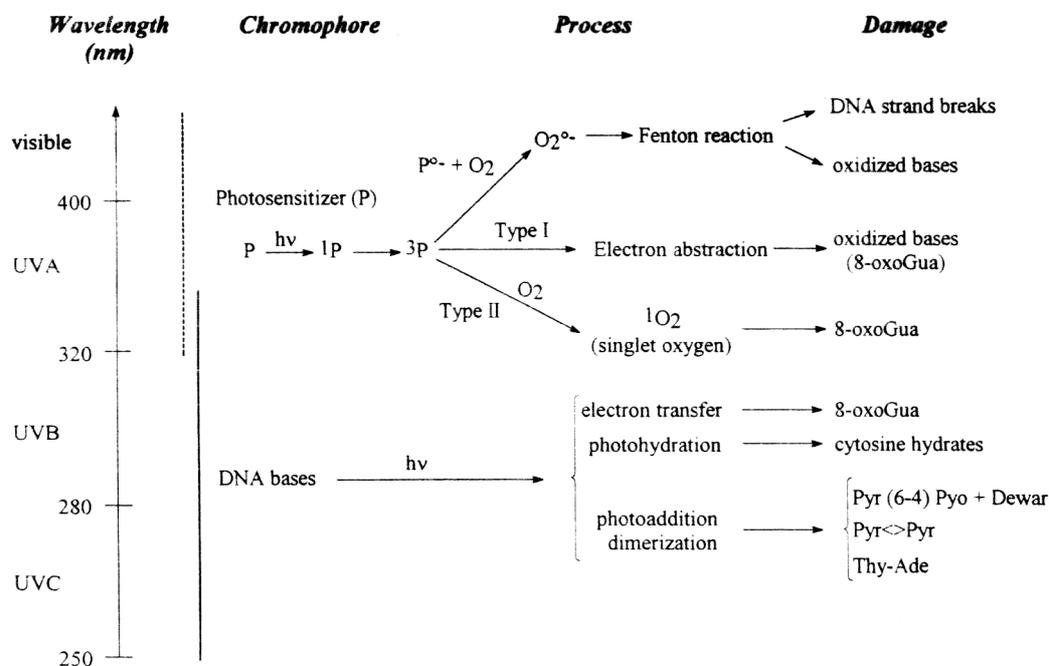


Abbildung 1.3: Schädigung der DNA durch kurzwellige Strahlung.

DNA-Schäden entstehen entweder durch direkte Photonenabsorption im UV-B/C-Bereich, oder im UV-A/PAR-Bereich über durch endogene Photosensitizer vermittelte Oxidationsprozesse. **Thy-Ade**: Thymin-Adenin-Photoprodukt; **Pyr<->Pyr**: Cyclobutan-Pyrimidin-dimer; **Pyr (6-4) Pyo**: Pyrimidin(6-4) pyrimidon-Dimer; **8-oxoGua**: 8-oxo-7,8-dihydro-Guanidin. (Aus CADET ET AL., 1997).

sich durch UV-B-Strahlung zu den Dewar-Isomeren umlagern (Abbildung 1.4; zur Übersicht: DAVIES, 1995; BRITT, 1996; CADET ET AL., 1997). Von den möglichen CPD entstehen hauptsächlich Thymin-Dimere (MITCHELL ET AL., 1992), bei den 6-5PP sind es Thymin-Cytosin-Dimere (CADET ET AL., 1997). Weitere Photoproducte, wie Dimere mit Beteiligung von Purinen (nur mit Adenin möglich) und das Cytosin-Photohydrat, spielen von der Menge her nur eine untergeordnete Rolle (DAVIES, 1997). Auch UV-A kann die DNA über die Anregung endogener Photosensitizer (deren Natur ist weitestgehend unbekannt) und der dann folgenden Bildung reaktiver Sauerstoffspezies schädigen (Abbildung 1.3; BREEN UND MURPHY, 1995; CADET ET AL., 1997; DAVIES, 1997). So können die Basen oxidiert werden (besonders Guanin) oder es bilden sich sogar Strangbrüche.

An verschiedensten Pflanzenarten wurden DNA-Schäden unter naturnahen Kammerbedingungen oder im Freiland unter natürlicher UV-Strahlung nachgewiesen (*Medicago sativa* L.: TAKAYANAGI ET AL., 1994; *Datura ferox* L.: BALLARÉ ET AL., 1996; *Triticum aestivum* L.: TAYLOR ET AL., 1996; *Oryza sativa* L.: HIDEMA ET AL., 1999; *Hordeum vulgare* L.: MAZZA ET AL., 1999; *Gunnera magellanica* Lam.: ROUSSEAU ET AL., 1999; *Glycine max* Merrill: MAZZA ET AL., 2000). Die unmittelbaren Auswirkungen und die Mutagenität der UV-induzierten DNA-Schäden an höheren Pflanzen sind noch nicht näher untersucht worden, doch gibt es dazu Untersuchungen an Säugetierzellen und Eubakterien. Das **Gefahrenpotenzial der Dimere** besteht danach vor allem in der Störung der Transkription. In Säugetierzellen "stolpert" die RNA-Polymerase II an den Dimeren und synthetisiert nicht weiter (PROTIC-SABLJIC UND KRAMER, 1986; MITCHELL ET AL., 1989). Es gibt sogar Hinweise darauf, dass die RNA-Polymerase II an der geschädigten Stelle an der

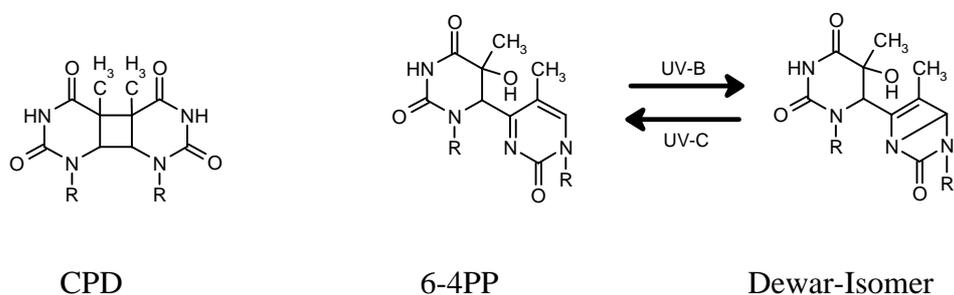


Abbildung 1.4: UV-B-Photoproducte der DNA.

Als Beispiele der durch UV-B-Strahlung induzierten Hauptphotoproducte sind das Cyclobutan-Pyrimidindimer (CPD), das 6-4-Photoproduct (**6-4PP**) und deren Dewar-Isomer zweier benachbarter Thymidine dargestellt. Die Umwandlung von 6-4PP in das entsprechende **Dewar-Isomer** ist strahlungsabhängig. UV-B-Strahlung verschiebt das Gleichgewicht mehr auf die Seite des Dewar-Isomers. Das **R** symbolisiert die Verknüpfung mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA.

DNA gebunden bleibt, was letztendlich zu einer Reduktion der Konzentration an freier RNA-Polymerase führen könnte (DONAHUE ET AL., 1994). Dimere stören auch DNA-Polymerasen in Bakterien und Säugetieren, wirken aber dort nicht direkt mutagen (BRITT, 1996; HORSFALL ET AL., 1997). Die anderen durch UV-Strahlung in viel geringeren Mengen entstehenden DNA-Schäden (Oxidations-Produkte, Photohydrate, s.o.) können zu Punktmutationen führen.

Arabidopsis-Mutanten mit defekter Reparatur UV-B-induzierter DNA-Schäden stellten sich als sehr UV-sensitiv heraus (HARLOW ET AL., 1994; LANDRY ET AL., 1997). In Mais fand WALBOT (1999) einen indirekten mutagenen Effekt durch UV-B-bedingte Aktivierung von Transposons. Aktive Transposons können eine starke mutagene Wirkung haben. Diese Aktivierung kann in die nächste Generation übertragen werden.

Auch der **Photosynthese-Apparat** ist vielfältig betroffen. Beeinträchtigt werden die Pigmente, das Photosystem II, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), die CF₁-ATPase und die Thylakoid-Membranen (zur Übersicht: ALLEN ET AL., 1998; JANSEN ET AL., 1998). Letztere werden über Lipidperoxidation geschädigt. **Lipidperoxidation** führt zur Oxidation von ungesättigten Fettsäure-Resten, wobei UV-induzierte reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind, und betrifft grundsätzlich alle Membranen der Zellen (WINSTON, 1990; BORNMANN UND TERAMURA, 1993; BREEN UND MURPHY, 1995; JORDAN, 1996).

Schädigungen wurden auch am **Cytoskelett** (Verkürzung der kortikalen Mikrotubuli; BORNMANN UND TERAMURA, 1993) und bei **Phytohormonen** gefunden. So kann die Indol-(3)-essigsäure durch UV-B-Strahlung photooxidiert werden (TEVINI ET AL., 1990). ROS UND TEVINI (1995) begründeten damit die Reduktion der Keimlingshöhe bei *Helianthus annuus* L. und HUANG ET AL. (1997) führten eine Reduktion der Pflanzenhöhe und der Blattspreite von UV-bestrahlten Reispflanzen auf diese Photooxidation des Phytohormons zurück.

1.1.2.2 Genregulation und UV-Photorezeptoren

Der UV-Strahlung kommt nicht nur eine schädigende Wirkung zu, sie hat auch regulatorischen Einfluss auf den Stoffwechsel. Zum Beispiel ist die Genexpression einiger Photosynthese-Gene, wie die Gene der RubisCO (*rbc S*, *rbc L*) oder der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine (*cab*-Gene), reduziert (zur Übersicht: MACKERNESS ET AL., 1997; ALLEN ET AL., 1998). Von großer Bedeutung ist die Regulation der Akkumulation UV-absorbierender Verbindungen durch UV-Strahlung, worauf weiter unten noch eingegangen wird.

Eine Regulation der Genexpression durch UV-Strahlung setzt deren Perzeption voraus. Neben dem bestuntersuchten Photorezeptorsystem, dem Phytochromsystem (Rot/Dunkelrot-System), existieren noch zwei weitere Photorezeptoren. Das **Chrytochrom** stellt einen UV-A/Blaulicht - Rezeptor (350 - 520 nm) dar. Die Chrytochrome sind mit den DNA-Photolyasen (s.u.) verwandt und haben wahrscheinlich auch dieselben Chromophoren (5,10-Methylentetrahydrofolat und Flavin-adenin-dinukleotid). Über das Chrytochrom werden Vorgänge wie Hypocotyl-, Internodien- und Blatt-Wachstum, Stomata-Öffnung, Phototropismus, Blütenbildung, Anthocyan-Akkumulation und Chalkonsynthase-Expression gesteuert (zur Übersicht: BATSCHAUER, 1998).

Auch die Existenz eines spezifischen **UV-B-Rezeptors** wird angenommen, jedoch ist die Natur dieses Rezeptors und seines Chromophors bisher völlig unbekannt (JENKINS ET AL., 1997; BATSCHAUER, 1998). Weiterhin wird auch eine indirekte Perzeption der UV-B-Strahlung über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert (JENKINS ET AL., 1997; MACKERNESS ET AL., 1998; MACKERNESS ET AL., 1999). Somit wären dann allerdings beobachtete Genexpressionsänderungen eine Reaktion auf oxidativen Stress und nicht eine direkte Folge von Photoregulation durch UV-B-Strahlung (JENKINS ET AL., 1997). In der Tat hat man für die UV-B-Induktion der Genexpression des PR-1-Proteins (pathogenesis-related protein) in Tabak-Blättern gefunden, dass Antioxidantien die Induktion schwächen und Singulet-Sauerstoff das UV-B-Signal ersetzen kann (GREEN UND FLUHR, 1995).

1.1.2.3 Wachstum, Entwicklung, Morphologie, Reproduktion und Ökologie

Die am häufigsten untersuchten UV-B-Effekte bei Pflanzen sind die Auswirkungen auf das Wachstum. Bei vielen verschiedenen Pflanzenarten fand man unter anderem die Reduktion der Wuchshöhe, der Biomasse und der Blattfläche (zur Übersicht: TERAMURA UND SULLIVAN, 1994; FISCUS UND BOOKER, 1995; JORDAN, 1996; TERAMURA, 1997; ROZEMA ET AL. 1997a; CORLETT ET AL., 1997; JANSEN ET AL., 1998). Dabei sind nicht nur die Auswirkungen von Art zu Art sehr unterschiedlich, sondern können auch innerhalb einer Art zwischen den Varietäten stark fluktuieren. Dies wurde häufig an Nutzpflanzen untersucht, und man fand diese Sorten- bzw. Varietäten-Unterschiede z.B. bei *Glycine max* Merrill (TERAMURA ET AL., 1990), *Oryza sativa* L. (CAASA-LIT ET AL., 1997), *Phaseolus vulgaris* L. (SAILE-MARK UND TEVINI, 1997), *Zea mays* L. (CORREIRA ET AL., 1998) und *Pisum sativum* L. (GONZALES ET AL., 1998). Bei den Nutzpflanzen bestehen auch bezüglich des Ernte-Ertrages zwischen verschiedenen Sorten

große Unterschiede mit positiven und negativen UV-Effekten auf den Ernte-Ertrag, wobei die negativen Effekte überwiegen (CALDWELL ET AL., 1998; CORLETT ET AL., 1997).

Man vermutete in früheren Jahren, dass die Wirkung erhöhter UV-B-Strahlung infolge der Ozonschicht-Reduktion auf Wachstum und Produktivität von Pflanzen schwerwiegende Folgen für Ökosysteme und Kulturpflanzen nach sich ziehe. Aufgrund einer Vielzahl von Untersuchungen herrscht jedoch mittlerweile die Meinung vor, dass eine erhöhte UV-B-Strahlung keine direkten signifikanten Effekte auf das Pflanzenwachstum und die Primärproduktion natürlicher Ökosysteme hat (ROZEMA ET AL., 1997b, CALDWELL ET AL., 1998). Entscheidender für die Konkurrenz zwischen den Arten innerhalb eines Ökosystems und damit seines Gleichgewichtes sind vermutlich indirekte Effekte der UV-B-Strahlung wie morphologische Veränderungen (z.B. Blatt- und Epidermisdicke, Blattstellungswinkel; zur Übersicht: ROZEMA ET AL., 1997a, b; JANSEN ET AL., 1998), zeitliche Veränderungen der Entwicklung (Keimung, Blütenbildung, Samenbildung, Seneszenz; zur Übersicht: ROZEMA ET AL. 1997a) und die Veränderung der Inhaltsstoff-Zusammensetzung (Phenylpropanoide: s.u.; ätherische Öle: JOHNSON ET AL., 1999; Kutikular-Wachse: PILON ET AL., 1999). Letzteres beeinflusst nicht nur die Konkurrenz zwischen Pflanzen-Arten und -Individuen über z.B. unterschiedliche Strahlungsabschwächung in den Blättern, sondern wirkt sich aufgrund der Multifunktionalität der Inhaltsstoffe vermutlich auch auf die Allelopathie, die Pflanze-Pathogen- und die Pflanze-Tier-Interaktion und auf den Abbau des abgestorbenen Pflanzenmaterials aus, wobei zu diesem Themenkomplex bisher erst wenige Untersuchungen vorliegen (ROZEMA ET AL., 1997b; CALDWELL ET AL., 1998).

1.1.2.4 Wirkungsspektren und Strahlungswichtung

Die biologische Wirkung von UV-Strahlung ist abhängig von der Wellenlänge. Diese Beziehung zwischen Wellenlänge und verursachter Wirkung bzw. Schädigung wird durch **Wirkungsspektren** dargestellt. In der Regel sind dies Aktionsspektren, die durch Einstrahlung monochromatischen Lichtes und der Messung einer spezifischen biologischen Wirkung ermittelt werden. Über Wirkungsspektren lassen sich nun in Experimenten verwendete Bestrahlungsbedingungen wichten, integrieren und auf eine Wellenlänge normiert darstellen. Auf diese Art erhält man die **biologisch effektive Strahlung des UV-B-Bereichs**, die mit **UV-B_{BE}** abgekürzt wird. Über die UV-B_{BE}-Dosis lassen sich verschiedene (künstliche und natürliche) Strahlungsbedingungen vergleichen. Je nach beobachteter Wirkung (von DNA-Schäden bis induzierte Akkumulation von UV-absorbierenden Substanzen) können die

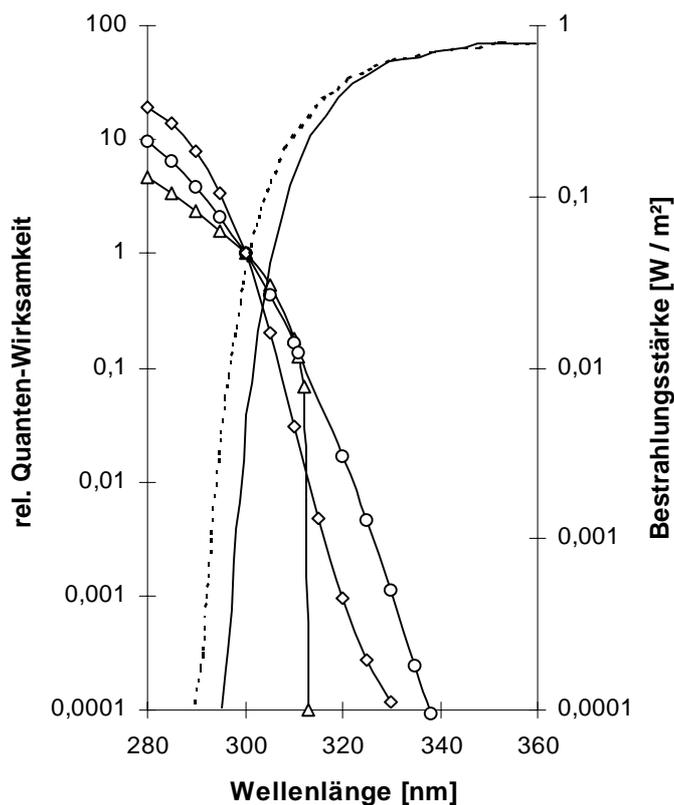


Abbildung 1.5: Solare UV-Strahlung und UV-Wirkungsspektren.

Es sind die Wirkungsspektren für DNA-Schäden in Mikroorganismen nach SETLOW (1974; \diamond) und für allgemeine Pflanzen-Wirkungen nach CALDWELL (1971; \triangle) und THIMIJAAN ET AL. (1978; \square ; Grundlage der Strahlungs-wichtung nach BJÖRN UND MURPHY (1985), wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde) angegeben. Zusätzlich ist die spektrale Verteilung der solaren UV-Strahlung für zwei Ozonschicht-Dicken dargestellt (----- 180 DU, ——— 360 DU; 1 DU = 0,1 mm Höhe der komprimierten Gassäule bei 1013 hPa und 0° C aus purem Ozon). Sie wurde berechnet für den 15. Juli, bei 49° N und Sonnen-höchststand. (Verändert nach CALDWELL ET AL., 1994, und ergänzt durch das Wirkungsspektrum nach THIMIJAAN ET AL., 1978).

Wirkungsspektren aber sehr unterschiedlich ausfallen (WELLMANN, 1993). Daher wurde schon früh begonnen Wirkungsspektren der UV-Strahlung zu Wichtungsfunktionen zusammenzufassen. Einer der frühesten und bekanntesten **Wichtungsfunktionen** ist das "generalised plant"-Wirkungsspektrum nach CALDWELL (1971, Abbildung 1.5). Dieses Spektrum berücksichtigt allerdings nur den Wellenlängen-Bereich von 280 - 313 nm. Aber auch Strahlung größerer Wellenlänge ist biologisch wirksam. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass der Anteil der UV-A-Strahlung im solaren Spektrum sehr viel höher als derjenige der UV-B-Strahlung ist (Abbildung 1.1, Abbildung 1.5). Die Wichtungsfunktion für allgemeine Pflanzen-Wirkungen nach THIMIJAAN ET AL. (1978) geht über den UV-B-Bereich hinaus. Die Diskussion über Wirkungsspektren und ihre Gültigkeit ist immer noch im Gange und eine allgemeingültige Vorgehensweise gibt es zur Zeit nicht (CALDWELL ET AL., 1998; persönliche Mitteilung J. F. Bornman, Lund, Schweden).

In dieser Arbeit wurde eine Wichtung der UV-Strahlung nach der Methode von BJÖRN UND MURPHY (1985) von 280 - 360 nm vorgenommen (s. 2.2.1.3.4), da sie schon früher in der Arbeitsgruppe Weissenböck Anwendung gefunden hat (s. REUBER ET AL., 1996). Dieser Methode liegt die Wichtungsfunktion nach THIMIJAAN ET AL. (1978) zugrunde.

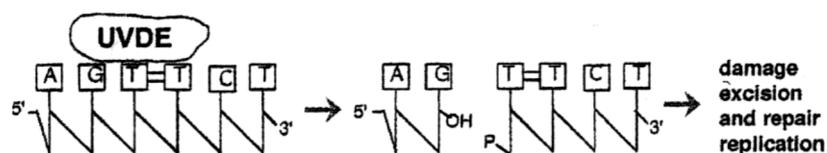
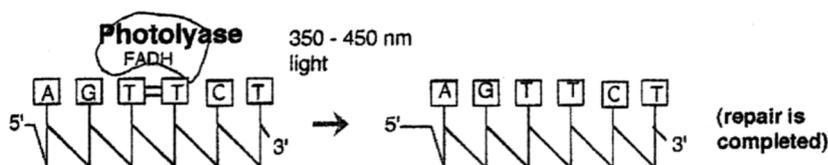
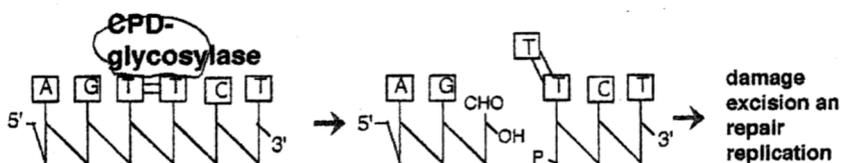
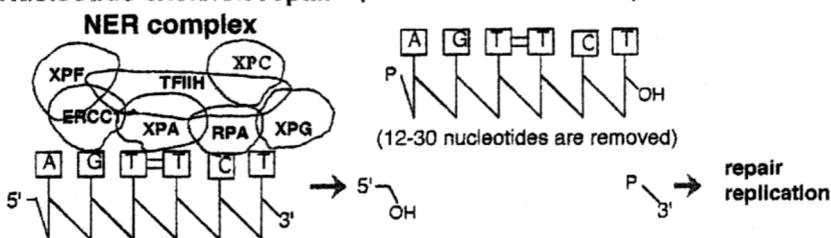
1.1.3 UV-Schutzmechanismen von Pflanzen

Da das Problem der Schädigung durch UV-Strahlung so alt sein dürfte wie das Leben selbst (s.o.), wurden auch sehr früh schon Schutzstrategien entwickelt. Man kann hier zwei prinzipielle Strategien unterscheiden: erstens die Reparatur von entstandenen Schäden, und zweitens die Vermeidung der Schädigung durch Schutzsubstanzen. Zur **Reparaturstrategie** zählt vor allem die Reparatur der DNA, auf die in diesem Kapitel noch weiter eingegangen wird. Auch der hohe Turnover des D1-Proteins im Photosystem II wird als Reparatur geschädigter Photosystem II - Komplexe verstanden (TREBST 1999).

Zur **Vermeidung der Schädigung** durch Schutzsubstanzen zählt an erster Stelle die Bildung von UV-Schutzpigmenten, besonders Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren, auf die auch in diesem Kapitel noch gesondert eingegangen wird. Auch das Antioxidations-System der Pflanze kann als Vermeidungsstrategie hinsichtlich UV-Schäden angesehen werden, da durch UV-B-Strahlung reaktive Sauerstoffspezies entstehen können (s.o.). So findet man einen durch UV-B-Strahlung verursachten Anstieg an Antioxidantien wie Ascorbat und Glutathion (DAI ET AL., 1997) genauso wie eine erhöhte Aktivität einiger Enzyme (Catalase, Superoxid-Dismutase, Ascorbat-Peroxidase) des Antioxidations-Systems (RAO ET AL., 1996; DAI ET AL., 1997; BAUMBUSCH ET AL., 1998; MAZZA ET AL., 1999). UV-B-Strahlung kann z.B. auch die Expression von Catalase-Genen induzieren (BOLDT ET AL., 1997). Die Bedeutung des Antioxidations-Systems als Schutz vor UV-B-Schäden wurde durch die höhere UV-Empfindlichkeit einer *Arabidopsis*-Mutante mit erniedrigtem Ascorbatgehalt (CONKLIN ET AL., 1996) und einer Catalase-defizienten Gersten-Mutante (MAZZA ET AL., 1999) im Vergleich zu deren Muttervarietäten belegt.

1.1.3.1 DNA-Reparatur

Es sind insgesamt vier verschiedene Reparaturwege für UV-induzierte Schäden bekannt (Abbildung 1.6, S. 11; YASUI UND MCCREADY, 1998). Die **Photoreaktivierung** (PR) ist der wichtigste Reparaturprozess für die Hauptprodukte UV-B-induzierter DNA-Schäden (CPD und 6-4PP) in höheren Pflanzen. Durch die PR wird lichtabhängig die UV-B-induzierten Schadensmenge vermindert. Sie ist auf das Enzym Photolyase zurückzuführen, welches die Dimere lichtabhängig in die beiden ursprüngliche Monomere spaltet. Die DNA-Sequenz ist nach dieser Reaktion wieder voll hergestellt, weitere Schritte wie eine Reparatursynthese sind nicht nötig. Photolyasen sind monomere Proteine (SANCAR, 1994), spezifisch für CPD oder 6-4PP, die zwei Chromophore stöchiometrisch nicht-kovalent gebunden haben (TODO ET AL.,

UV damage excision repair (Substrate: CPD and 6-4 PP)**Photoreactivation (Substrate: CPD or 6-4 PP)****Base excision repair (Substrate: CPD)****Nucleotide excision repair (Substrate: CPD and 6-4 PP)****Abbildung 1.6: Die vier Reparaturwege von UV-induzierten DNA-Schäden.**

Die schematisch dargestellten Reparaturwege sind von oben nach unten:

UVDE: UV-Schaden-Exzisionsreparatur;
PR: Photoreaktivierung;
BER: Basen-Exzisionsreparatur;
NER: Nukleotid-Exzisionsreparatur.
 (Aus YASUI UND MCCREADY, 1998).

1997). Einer der beiden Chromophoren dient als Lichtsammler, der andere ist reduziertes Flavin-adenin-dinukleotid (als FADH^\ominus) und stellt den Elektronen-Donor für die Katalyse dar. Bei dem Lichtsammler-Chromophor handelt es sich entweder um 5,10-Methenyltetrahydrofolat oder 8-Hydroxy-5-deazaflavin. Die Reaktion beginnt mit der lichtunabhängigen Bindung an das Dimer. Der Lichtsammler-Chromophor absorbiert ein Photon im UV-A/Blaulicht-Bereich und überträgt dessen Energie auf das FADH^\ominus , welches dann ein Elektron an das Dimer weitergibt. Es kommt zur Dimer-Spaltung und das Elektron wandert zurück auf das FADH^\bullet (SANCAR, 1994). Bei der Reparatur des 6-4PP wird vermutlich vor der ersten Elektronenübertragung vom Enzym noch eine 4er-Ringbildung katalysiert (ZHAO ET AL., 1997).

Photoreaktivierung *in vivo* hat man in vielen höheren Pflanzen gefunden (z.B. *Arabidopsis thaliana* L.: PANG UND HAYS, 1991; *Medicago sativa* L.: TAKAYANAGI ET AL., 1994; *Glycine*

max Merrill: CANNON ET AL., 1995; *Sorghum bicolor* Moench: HADA ET AL., 1996; *Cucumis sativus* L.: TAKEUCHI ET AL., 1996; *Triticum aestivum* L.: TAYLOR ET AL., 1996; *Oryza sativa* L.: HIDEWA ET AL., 1997; *Zea mays* L.: STAPLETON ET AL., 1997; *Spinacia oleracea* L.: HADA ET AL., 1998). Der photoreaktivierende Wellenlängenbereich liegt in höheren Pflanzen zwischen 330 nm und 450 nm, wobei Wellenlängen um 380 nm am effizientesten wirken (*Zea mays* L.: IKENAGA ET AL., 1974; *Arabidopsis thaliana* L.: PANG UND HAYS, 1991; *Cucumis sativus* L.: TAKEUCHI ET AL., 1998). Enzymatische und genetische Analysen erfolgten allerdings vor allem an Bakterien (besonders an *Escherichia coli*) und niederen Eukaryoten (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*; SANCAR, 1994). Aufgrund der Gensequenzen teilt man die Photolyasen (unabhängig vom Lichtsammler-Chromophor !) in zwei Klassen ein. Klasse I Photolyasen fand man in niederen Eukaryoten und Eubakterien, während Klasse II Photolyasen aus Archaeobakterien und höheren, tierischen Eukaryoten isoliert wurden (YASUI ET AL., 1994). Aus höheren Pflanzen wurden bisher nur aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* Photolyase-homologe Gene isoliert und sequenziert (TAYLOR ET AL., 1997). Interessanterweise waren alle Gene, bis auf eine Ausnahme, homolog zu den Klasse I - Photolyasen, aber sie zeigten alle keine Photolyase-Aktivität. Es handelt sich vermutlich um UV-A/Blaulicht-Rezeptor-Gene (Cryptochrom-Gene; AHMAD ET AL., 1997). Aus *Arabidopsis thaliana* L. konnte ein Klasse II homologes Gen isoliert und sequenziert werden. Vermutlich handelt es sich hier um eine Photolyase, denn eine Mutante ohne jegliche CPD-Photolyase-Aktivität, wies eine Mutation in diesem Gen auf (AHMAD ET AL., 1997).

Neben der PR existieren noch drei lichtunabhängige Reparaturwege, die letztlich alle eine Exzisionsreparatur (ER) darstellen (s.u.), bei der die geschädigte Stelle aus der DNA entfernt wird und das fehlende Teilstück neu synthetisiert wird. Die **Nukleotid-Exzisionsreparatur** (NER) ist ein unspezifisches Reparatursystem an dem eine Vielzahl an Proteinen beteiligt sind. Zunächst wird eine Störung der helikalen Struktur der DNA, die durch verschiedenste Schäden, einschließlich CPD und 6-4PP, verursacht werden kann, von einem Protein erkannt. Hieran binden nun weitere Proteine, unter anderem zwei mit Helikase-Aktivität, die die DNA an der geschädigten Stelle entwinden. Schließlich wird durch zwei Endonukleasen ein DNA-Stück mit einer Länge von 12 - 30 Nukleotiden, welches den Schaden enthält, herausgeschnitten. Durch eine Reparatur-DNA-Polymerase wird die entstandene Lücke aufgefüllt und eine Ligase verbindet das neue Teilstück mit der alten DNA (LEHMANN, 1995).

Der erste Schritt der **Basen-Exzisionsreparatur** (BER) besteht aus der Erkennung eines Schadens und der Abspaltung der geschädigten Base vom zugehörigen Desoxyribose-Molekül.

Dieser erste Schritt wird durch eine schadensspezifische Glycosylase katalysiert. Eine Apurin/Apyrimidin-Lyase fügt dann einen Einzelstrangbruch auf der 5'-Seite dieser Stelle ein. Die ursprüngliche Sequenz wird durch das Zusammenwirken von Exonukleasen, der Reparatur-DNA-Polymerase β und DNA-Ligasen wieder hergestellt (TAYLOR ET AL., 1997). Die Bedeutung dieses Reparaturweges für UV-induzierte Schäden ist noch unklar, vor allem in höheren Pflanzen. Eine CPD-spezifische Glycosylase konnte aus *Micrococcus luteus* und dem T4-Bakteriophagen isoliert werden. Beide Enzyme haben die Besonderheit, dass sie neben der Glycosylase auch eine Apurin/Apyrimidin-Lyase-Aktivität aufweisen. Sie werden nicht ganz korrekt kurz UV-Endonukleasen genannt (TAYLOR ET AL., 1997). Diese UV-Endonukleasen werden in der Forschung zum Nachweis von CPD in DNA genutzt (s. Kapitel 3.1).

In *Schizosaccharomyces pombe* und *Neurospora crassa* wurde ein weiterer Reparaturweg für UV-induzierte Dimere gefunden, der **UV-Schaden-Exzisionsreparatur** (UVER) genannt wurde (YASUI UND MCCREADY, 1998). Hierbei fügt ein CPD und 6-4PP gleichermaßen erkennendes Enzym direkt, ohne eine Glycosylase-Aktivität, einen Einzelstrangbruch auf der 5'-Seite des Schadens ein. YAJIMA ET AL. (1995) isolierten diese tatsächliche UV-Endonuklease aus *Neurospora crassa* und nannten sie zur Unterscheidung der oben genannten Enzyme "uv-damage endonuclease" (UVDE).

In höheren Pflanzen ist zwar die lichtunabhängige Reparatur oft *in vivo* beobachtet worden, jedoch wurde kein klarer Nachweis von einem der drei ER-Wege geführt (z.B.: *Arabidopsis thaliana* L.: PANG UND HAYS, 1991; *Medicago sativa* L.: QUAITE ET AL., 1994; *Glycine max* Merrill: SUTHERLAND ET AL., 1996; *Triticum aestivum* L.: TAYLOR ET AL., 1996; *Oryza sativa* L.: HIDEWA ET AL., 1997; *Zea mays* L.: STAPLETON ET AL., 1997). Die ER verläuft in höheren Pflanzen wesentlich langsamer als die PR, da aber in der Natur mit der Nacht eine ausgedehnte Dunkelphase im Tagesgang vorhanden ist, ist die Bedeutung der lichtunabhängigen ER nicht zu unterschätzen. Besondere Bedeutung hat sicherlich auch die NER, da sie aufgrund ihrer unspezifischen Schadenserkenkung eine Vielzahl an Schäden entfernen kann. NER ist bei Bakterien, Hefen, Tieren und beim Menschen gefunden worden (TAYLOR ET AL., 1997). Auch in höheren Pflanzen kann die Existenz von NER angenommen werden. Das Gen *uvh1* aus *Arabidopsis* ist homolog zu dem menschlichen Gen *xpf* und dem Hefe-Gen *rad1*, die beide für eine Untereinheit einer Reparatur-Endonuklease aus dem NER-System codieren (LIU ET AL., 2000). Endonuklease-Aktivität spezifisch für CPD oder 6-4PP konnte aus mehreren Pflanzen in Extrakten angereichert oder sogar gereinigt werden (*Hordeum vulgare* L.: VELEMINSKY ET AL.

1980, *Daucus carota* L.: MCLENNAN UND EASTWOOD, 1986; *Spinacia oleracea* L.: STRICKLAND ET AL., 1991; *Nicotiana tabacum* L.: MURPHY ET AL., 1993).

1.1.3.2 Phenylpropanoid-Stoffwechsel

Die Vermeidung von Schäden durch die **Akkumulation von UV-Schutzpigmenten** vor allem in den Abschlußgeweben, insbesondere in Blättern, stellt einen universeller Schutz dar. Um die Photosynthese nicht zu beeinträchtigen, sollten die UV-Schutzpigmente nur UV-Strahlung und keine PAR absorbieren. Hierfür eignen sich aufgrund ihrer Absorptionsspektren in besonderem Maße Phenylpropanoide. Bei aquatischen Algen dienen noch aromatische Aminosäuren als UV-B-Filter, doch mit steigendem Entwicklungsgrad über Landalgen, Moose und Farne hin zu höheren Pflanzen steigert sich der Polymerisationsgrad und die Komplexität der Phenylpropanoide über Hydroxyzimtsäuren hin zu Flavonoiden, Tanninen und dem Lignin (ROZEMA ET AL., 1997). UV-Schutzfunktion in höheren Pflanzen haben vor allem die Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren, die UV-induziert oder teilweise konstitutiv in den Epidermen akkumulieren (zur Übersicht: TERAMURA UND SULLIVAN, 1994; JORDAN, 1996; BORNMANN ET AL., 1997; ROZEMA ET AL., 1997a; JANSEN ET AL., 1998). Die Ausprägung der Blatt-Epidermis als Strahlungsbarriere ist allerdings aufgrund variierender Schutzpigment-Gehalte und -Lokalisation in den einzelnen systematischen Gruppen sehr unterschiedlich. So reicht die Transmission von UV-B-Strahlung durch die Epidermis von 60 - 80 % bei dicotylen Kräutern, über ca. 10 % bei Laubbäumen und Gräsern bis zu annähernd 0 % bei Nadelbäumen (DAY ET AL. 1992, 1993). DAY ET AL. (1994) zeigten auch eine negative Korrelation zwischen den UV-Absorptionsspektren von Blatt-Rohextrakten und der UV-Transmission der Epidermis in 31 von 42 Arten, was die vorherrschende Lokalisation von UV-absorbierenden Substanzen in der Epidermis belegt. Mutanten, die defizient in der Bildung von Flavonoiden oder Hydroxyzimtsäure-Derivaten sind, sind deutlich UV-B-sensitiv (LI ET AL., 1993; ORMROD ET AL., 1995; REUBER ET AL., 1996b). Dies gilt auch zum Beispiel für Roggenkeimlinge, deren durch einen Hemmstoff des Phenylpropanstoffwechsels verringerte Flavonoidakkumulation ebenfalls zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber UV-B-Strahlung führte (REUBER ET AL., 1993).

Die Flavonoide und Hydroxyzimtsäure-Derivate zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, die sich von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin (Abbildung 1.7, S. 15) ableiten. Der **Phenylpropanoid-Stoffwechsel** (zur Übersicht: FORKMANN UND HELLER, 1999) beginnt mit der Desaminierung der Aminosäure zur *trans*-Zimtsäure durch das Eingangsenzym

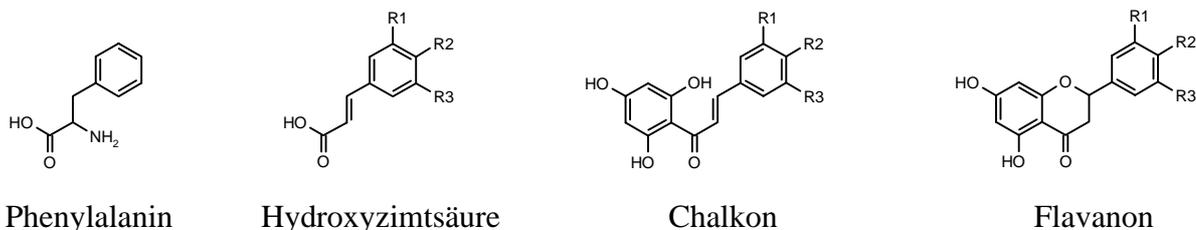


Abbildung 1.7: Intermediate des Phenylpropanoid- und Flavonoid-Stoffwechsels.
R1 - R3: -H, -OH oder -OCH₃.

Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5). Aus der Zimtsäure werden durch mehrere aufeinander folgende Hydroxylierungs- und Methylierungsschritte die verschiedenen Hydroxyzimtsäuren (Abbildung 1.7) gebildet. Aktiviert durch Veresterung mit Coenzym A sind die Hydroxyzimtsäuren, vor allem *trans-p*-Cumarsäure, wichtige Intermediate für die spezifischen Biosynthesewege der verschiedenen Substanzklassen der Phenylpropanoide (z.B. Lignin, Flavonoide, Stilbene). In der Regel liegen die Hydroxyzimtsäuren in konjugierter Form vor. Als wasserlösliche Komponenten sind sie am häufigsten mit Zuckern und Zuckersäuren verestert (IBRAHIM UND BARRON, 1989) und sind dann in der Vakuole gespeichert (STRASBURGER, 1991). Sie können auch mit organischen Säuren, Alkaloiden, oder Terpenen verbunden sein (RHODES, 1994). Hydroxyzimtsäuren sind vermutlich in fast allen höheren Pflanzen auch an Zellwandmaterial gebunden, was besonders für Gramineen zutrifft (WALLACE UND FRY, 1994). Sie sind dabei mit den Wand-Polysacchariden verknüpft und können, falls vorhanden, auch mit dem Lignin verbunden sein (IYAMA ET AL., 1994).

Das Eingangsenzym der **Flavonoid-Biosynthese** (zur Übersicht: FORKMANN UND HELLER, 1999) ist die Chalkonsynthase (CHS, EC 2.3.17.4). Sie muss um ihre Substrate mit anderen Enzymen konkurrieren (z.B. Stilbensynthase, CinnamoylCoA-Reduktasen). Die CHS katalysiert die Kondensation von drei Malonyl-CoA-Estern unter Abspaltung von je einem CO₂ und einem CoA an die Säuregruppe der *p*-Cumarsäure unter Abspaltung des Coenzym A und verknüpft die drei Acetat-Reste zu einem aromatischen Ring. Das freigesetzte Chalkon (Abbildung 1.7) wird durch die Chalkonisomerase (CHI, EC 5.5.1.6) sofort zum entsprechenden Flavanon (Abbildung 1.7) zyklisiert. Aus dieser Struktur werden die verschiedenen Gruppen der Flavonoide, wie z.B. Flavone, Flavonole, Dihydroflavonole, Anthocyanidine etc., gebildet. Durch Hydroxylierungen, Methylierungen von Hydroxylgruppen und besonders Glycosylierungen entsteht die Vielzahl der flavonoiden Verbindungen. Die Flavonoide sind hauptsächlich in der Vakuole oder in der Zellwand lokalisiert (JORDAN, 1996).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung besonders der Flavonoide als UV-Schutzpigmente ist die Strahlungsregulation ihrer Biosynthese, darunter auch durch UV-B-Strahlung (STRID ET AL., 1994; JANSEN ET AL., 1998). Die immer wieder gefundene Korrelation zwischen CHS-Aktivität und Flavonoid-Akkumulation (z.B. CHAPPEL UND HAHLBROCK, 1984; KNOGGE UND WEISSENBÖCK, 1986; JÄHNE ET AL., 1993; JORDAN ET AL., 1994) weist auf eine Schlüsselrolle der CHS bei der Regulation hin. Auch die PAL scheint bei einigen Pflanzen eine Rolle bei der strahlungsregulierten Akkumulation von Flavonoiden zu spielen, und bei PAL und CHS erfolgt die Regulation über die Genexpression (KUBASEK ET AL., 1992; WU UND HAHLBROCK, 1992; HAUSSÜHL ET AL., 1996). Außerdem konnte in Blättern von *Petroselinum crispum* Mill. die lichtinduzierte CHS, ihre mRNA, und flavonoide Endprodukte sogar epidermisspezifisch nachgewiesen werden (SCHMELZER ET AL., 1988).

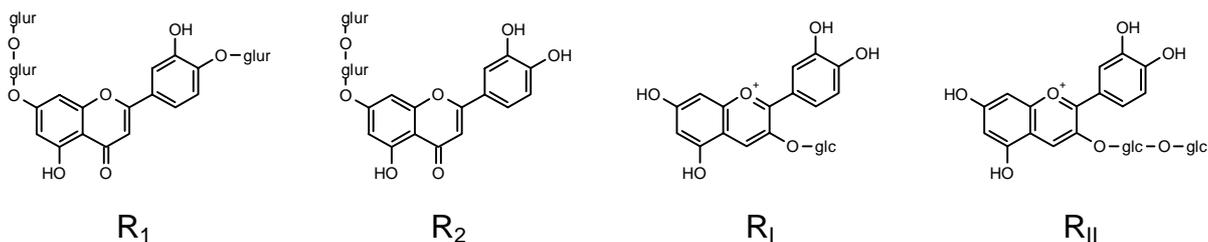
1.2 Flavonoid-Stoffwechsel und UV-Schutz in Roggen und Gerste

1.2.1 Roggen

Roggen-Primärblätter weisen eine spezifische Gewebeverteilung ihrer Phenylpropanoide auf. Im Mesophyll sind die beiden Anthocyane Cyanidin-3-O-glucosid (R_I) und Cyanidin-3-O-gentiobiosid (R_{II}) (BUSCH ET AL., 1986) und die beiden Flavone Luteolin-4'-O-glucuronyl-7-O-diglucuronid (R_1) und Luteolin-7-O-diglucuronid (R_2) (SCHULZ ET AL., 1985) als Hauptkomponenten nachzuweisen. In der Epidermis sind es die Flavone Isovitexin-2"-O-arabinosid (R_3) und Isovitexin-2"-O-galactosid (R_4) (DELLAMONICA ET AL., 1983) und mehr als 20 verschiedene Hydroxyzimtsäure-Derivate (STRACK ET AL., 1987). Bei den Hydroxyzimtsäure-Derivaten handelt es sich hauptsächlich um Ester von *p*-Cumarsäure und Ferulasäure mit verschiedenen Zuckersäuren (STRACK ET AL., 1987). Zellwandgebunden wurden *p*-Cumarsäure und Ferulasäure nachgewiesen (STRACK ET AL., 1987; BRAUN, 1990; SCHMITZ, 1995). Abbildung 1.8 (S. 17) zeigt die Strukturformeln der identifizierten Flavonoide und der Hydroxyzimtsäuren. Die Gewebe-Lokalisation wurde an isolierten Epidermis- und Mesophyll-Protoplasten bestimmt (SCHULZ UND WEISSENBÖCK, 1986), und für das Mesophyll konnte die vakuoläre Speicherung an isolierten Vakuolen nachgewiesen und bestätigt werden (ANHALT UND WEISSENBÖCK, 1992; KLEIN, 1998).

Die Akkumulation der Flavonoide im Primärblatt ist unter Kulturkammer-Bedingungen wie auch im Freiland entwicklungsabhängig: R_I akkumuliert nur vorübergehend, die Menge der

Mesophyll:



Epidermis:

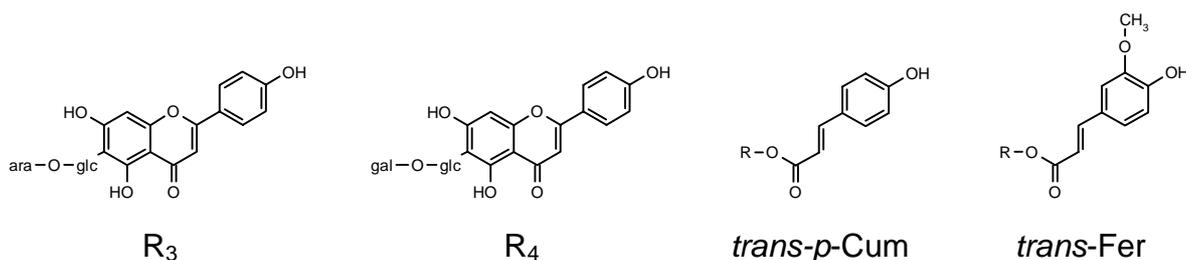


Abbildung 1.8: Die Phenylpropanoide des Roggen-Primärblattes.

Es sind die identifizierten Hauptkomponenten gezeigt. **R₁**: Luteolin-4'-O-glucuronyl-7-O-diglucuronid; **R₂**: Luteolin-7-O-diglucuronid; **R₃**: Isovitexin-2''-O-arabinosid; **R₄**: Isovitexin-2''-O-galactosid; **R₁**: Cyanidin-3-O-glucosid; **R_{II}**: Cyanidin-3-O-gentiobiosid; **trans-p-Cum**: *trans-p*-Cumarsäure; **trans-Fer**: *trans*-Ferulasäure.

anderen Flavonoide erhöht sich kontinuierlich während der Entwicklung bis zu einem bestimmten Niveau (STRACK ET AL., 1982; PETERS, 1986; JÄGER, 1993; MAJER, 1996). Die Akkumulation erfolgt auch im etiolierten Primärblatt und wird durch PAR, UV-A und UV-B stark gesteigert (PETERS, 1986; BRAUN, 1990; JÄGER, 1993; SCHMITZ, 1995; REUBER ET AL., 1996a), wobei vor allem die Akkumulation der epidermalen Flavonoide zunimmt. Die Strahlungs- und Entwicklungsabhängigkeit korreliert stark mit der CHS-Aktivität und der CHS-Proteinmenge (PETERS, 1986; JÄGER, 1993; REUBER ET AL., 1996a). Die Regulation erfolgt sehr wahrscheinlich auf Genexpressionsebene (HAUSSÜHL ET AL., 1996).

REUBER ET AL. (1993) zeigten schließlich durch teilweise Blockierung des Phenylpropanstoffwechsels mit einem PAL-Hemmstoff die deutlich stärkere Schädigung des Photosystems II durch UV-B-Strahlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen, und belegte damit die UV-B-Schutzfunktion der Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren im Roggenprimärblatt für die Photosynthese.

1.2.2 Gerste

In Gersten-Primärblättern akkumulieren hauptsächlich C-Glucosylflavone (FRÖST ET AL., 1977) und bilden den Hauptanteil an den löslichen Phenylpropanoiden. Der Anteil an löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivaten ist deutlich geringer (LIU ET AL., 1995). Saponarin ist mit 80 - 90 % die flavonoide Hauptkomponente, als NebenkompONENTEN fand man unter anderem Lutonarin, Isovitexin und Isoorientin (Abbildung 1.9; JENDE-STRID, 1993; REUBER, 1996). Nach alkalischer Hydrolyse von methanolischen Rohextrakten konnten *p*-Cumarsäure und Ferulasäure nachgewiesen werden (LIU ET AL., 1995, BRÜCKMANN, 1998).

Epidermen wie Mesophyll des Primärblattes weisen das gleiche Flavonoid-Muster auf (PETERS, 1986; REUBER, 1991; LIU ET AL., 1995). Saponarin und Lutonarin akkumulieren während der Primärblattentwicklung bis zu einem bestimmten Niveau, dann bleibt ihre Menge konstant (PETERS, 1986; REUBER, 1991). Wie schon beim Roggen erfolgt die Akkumulation der Flavonoide auch im etiolierten Primärblatt und wird durch PAR, Rotlicht, Blaulicht und UV-B stark gesteigert (REUBER, 1991), was auf eine Regulation des Flavonoid-Stoffwechsels durch Phytochrom, Cryptochrom und einem UV-B-Rezeptor hinweist. Die Strahlungs- und Entwicklungsabhängigkeit der Flavonoid-Akkumulation ist ebenfalls stark mit der CHS-Aktivität korreliert. Die Parallelität zum Roggen lässt auch hier eine Regulation auf Genexpressionsebene vermuten, die aber noch nicht nachgewiesen wurde.

Flavonoiddefiziente Mutanten eignen sich sehr gut zur Untersuchung der UV-Schutzfunktion der Flavonoide. REUBER ET AL., (1997) führte daher ein Screening von proanthocyanidinfreien Mutanten ("*ant*") der Gerste aus der Sammlung des Carlsberg-Research-Laboratoriums in Kopenhagen (Dänemark) durch und fand vier Mutanten-Linien, die einen stark reduzierten Flavonoid-Gehalt im Primärblatt gegenüber den korrespondierenden Muttervarietäten (kurz MV) aufwiesen. Das qualitative Phenylpropanoid-Muster in den Primärblättern dieser Mutanten und den MV war gleich, aber zusätzlich akkumulierte in den

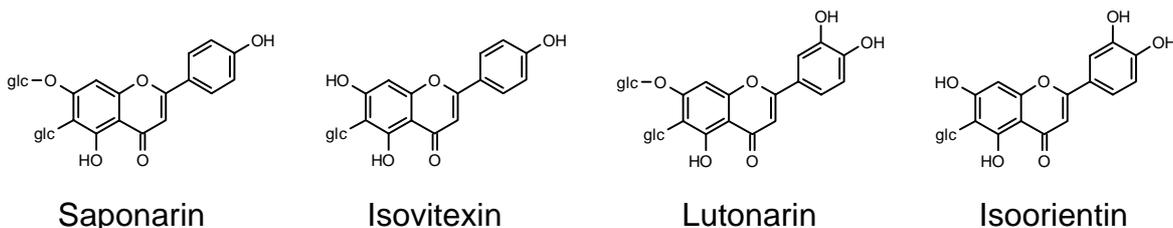
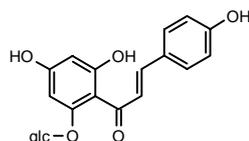


Abbildung 1.9: Flavonoide des Gersten-Primärblattes.

Mutanten-Primärblättern eine neue Substanz, die als Isosalipurposid (2',4,4',6'-Tetrahydroxychalkon-2'-O- β -glucopyranosid) identifiziert wurde (Abbildung 1.10; REUBER ET AL., 1997). Alle vier Mutanten gehören der gleichen Komplementationsgruppe an, die mit *Ant 30* bezeichnet wurde. Die vier Mutanten-Linien werden wie folgt bezeichnet: *ant 30-287* (MV: *Hege 550/75*), *ant 30-310* (MV: *Ca 33787*), *ant 30-272* (MV: *VP 116*), *ant 30-245* (MV: *Gunhild*). Die Mutation betrifft sehr wahrscheinlich die Chalkonisomerase (Zyklisierung des Chalkons zum Flavanon, s.o.; REUBER ET AL., 1997). Die geringen detektierten Flavonoidmengen in den Mutanten-Primärblättern sind vermutlich auf die chemische Autozyklisierung des Chalkons (MOL ET AL., 1985) zurückzuführen.

REUBER ET AL. (1996b) zeigten, dass die Primärblätter der Mutante *ant 30-287* aufgrund des reduzierten Flavonoid-Gehaltes eine höhere UV-B-Transmission der Epidermis aufwies als die Primärblätter der Muttervarietät, was mit einer Schädigung des Photosystems II (Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen: F_v/F_m) korrelierte. BRÜCKMANN (1998) fand durch UV-B allerdings keine Beeinträchtigung der Photosynthese-Leistung (CO_2 -Assimilation, O_2 -Produktion) in dieser Mutante und ihrer Muttervarietät.



Isosalipurposid

Abbildung 1.10: Mutanten-spezifische Substanz.

1.3 Zielsetzung

In der Forschung zur schädigenden Wirkung von UV-B-Strahlung auf Pflanzen steht in den letzten Jahren immer mehr die Forderung nach Experimenten mit naturnahen Strahlungsbedingungen im Vordergrund. Dies betrifft vor allem das Verhältnis der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) zur UV-A- und UV-B-Strahlung, welches in früheren Versuchen in der Regel zu gering und daher recht artifiziell war. Mit steigendem Anteil an PAR und auch an UV-A-Strahlung nimmt die UV-B-Empfindlichkeit in Pflanzen ab (CALDWELL UND FLINT, 1994). Grundvoraussetzung für die vorliegende Arbeit war daher die Etablierung einer Anzuchtammer mit naturnaher hoher photosynthetischer Photonenflussdichte (PPFD) und einer variablen UV-B-Bestrahlung unter kontrollierten Klimabedingungen.

Untersuchungen zum Schutz vor der schädigenden UV-B-Strahlung an Getreiden ist auf Grund ihrer agrarwirtschaftlichen Bedeutung von Interesse. Der junge Keimling hat für die weitere Entwicklung der Pflanze vorbestimmenden Charakter und ist dabei besonders leicht experimentell zugänglich. An 7 Tage alten, unter hoher PPFD ($700 - 720 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$) angezogen Roggen- und Gersten-Primärblätter zeigten REUBER ET AL. (1993, 1996b) den Schutz des Photosystems II durch die Akkumulation von Phenylpropanoiden, insbesondere von Flavonoiden. Doch nicht nur die Photosynthese kann durch UV-B-Strahlung geschädigt werden, sondern auch die DNA. Neben der Vermeidung von DNA-Schäden durch Schutzpigmente kann auch die Reparatur der Schäden vor negativen Folgen schützen. Übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit war daher die Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation im Vergleich zur DNA-Reparatur als UV-Schutzmechanismen für das Erbgut in den Primärblättern von Roggen und Gerste. Für diese Untersuchungen stand bei der Gerste als System zur Beurteilung der generellen Bedeutung der Flavonoide als Schutz-Substanzen eine Mutante mit – im Vergleich zur Muttervarietät – stark reduziertem Flavonoid-Gehalt zur Verfügung. Aufgrund der strikten Gewebelokalisation der Phenylpropanoide im Roggen-Primärblatt stellt dieses ein ideales Modellsystem zur Beurteilung des Beitrages der beiden Gewebe Epidermis und Mesophyll zum UV-Schutz dar. Da die Gerste keine strikt getrennte Gewebelokalisation der Phenylpropanoide aufweist sollte die Gegenüberstellung von Roggen und Gerste Erkenntnisse darüber geben, ob aus der unterschiedlichen Gewebelokalisation beider Arten eine prinzipiell unterschiedliche UV-Schutz-Strategie folgt.

Etablierung der Messung von DNA-Schäden

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, eine Messmethode zur Erfassung von DNA-Schäden an Roggen- und Gersten-Primärblätter zu etablieren. Hier bot sich die Messung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPD) an, da diese den Großteil der UV-B induzierten DNA-Schäden ausmachen. Eine geeignete Methode stellte die Detektion der CPD in einem ELISA dar.

Entwicklung einer UV-B-Spezialbestrahlungseinrichtung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Photoreaktivierung auf die CPD-Akkumulation während der UV-B-Belastung in einem naturnahen Tagesgang untersucht werden. Dieser sollte unter anderem durch eine Kontroll-Bestrahlung mit UV-B unter nahezu vollständigem Ausschluss von photoreaktivierenden Wellenlängen (330 - 450 nm, s. 1.1.3.1) beurteilt werden. Dies setzte die Entwicklung einer UV-B-Spezialbestrahlungseinrichtung mit einem Filter voraus, der den Bereich der oben genannten Wellenlängen herausfiltert.

Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation und der DNA-Reparatur für die Schadensakkumulation in einem frühen Primärblattstadium

Ein frühes Entwicklungsstadium des Primärblattes war deshalb interessant, da das Primärblatt unmittelbar nach Durchstoßen der Koleoptile am 3. Tag nach Aussaat bei Roggen und Gerste (unter den für diese Arbeit gewählten Anzuchtbedingungen) schädigender UV-Strahlung ausgesetzt ist. Schäden, die in einem solch frühen Stadium entstehen, dürften sich am stärksten während der weiteren Entwicklung des Primärblattes auswirken. Experimentell gut zugänglich waren 5 Tage (Roggen) bzw. 6 Tage (Gerste) alte Keimlinge.

Bei der Bestimmung der Phenylpropanoid-Gehalte war in beiden Gramineen die **potenzielle Bedeutung der einzelnen Stoffpools** (Flavonoide und lösliche Hydroxyzimtsäure-Derivate) **für die UV-B-Strahlungsabsorption** wichtig. Beim Roggen mit der bekannten gewebespezifischen Lokalisation seiner löslichen Phenylpropanoide war die potenzielle **UV-B-Strahlungsabsorption auf Gewebe-Ebene** von besonderem Interesse. Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Verteilung der Phenylpropanoide, insbesondere der Flavonoide, innerhalb der Gewebe geben. Epidermale Zellen ohne Flavonoide könnten eine Lücke in der "Strahlungsbarriere Epidermis" darstellen. Vor allem bei der Gerste, deren Primärblätter keine strenge Gewebe-Spezifität der Phenylpropanoid-Lokalisation zeigt,

interessierte die Verteilung der Flavonoide im Mesophyll. Sie sollte Aufschluss über die Beteiligung dieses Gewebes an der UV-Schirmfunktion geben.

Die **Bedeutung der Phenylpropanoide für den UV-Schutz der DNA**, insbesondere der Flavonoide, sollte durch den Vergleich des Phenylpropanoid-Gehaltes sowie der CPD-Akkumulation beurteilt werden. Der Vergleich der flavonoidarmen Gersten-Mutante mit der flavonoidreichen Muttervarietät stellt dafür ein ideales System dar. Es war bekannt, dass zusätzlich zur PAR geschaltete UV-Strahlung in der Anzucht von Roggen- und Gersten-Keimlingen zu einer verstärkten Phenylpropanoid-Akkumulation im Primärblatt führte (REUBER, 1996; MAJER, 1996; BRÜCKMANN, 1998). Es sollte untersucht werden, ob dieser Aklimatisierungsvorgang in dem frühen Stadium in den beiden Gramineen von Bedeutung ist und inwieweit er die CPD-Akkumulation beeinflusst.

Für die Beurteilung der **Bedeutung der Photoreaktivierung** sollte die CPD-Akkumulation während der UV-B-Belastung in einem naturnahen Tagesgang und während einer vergleichbaren UV-B-Belastung ohne photoreaktivierungswirksamen Wellenlängen (UV-B-Spezialbestrahlungseinrichtung) miteinander verglichen werden. Von weiterem Interesse war das **Reparaturpotenzial** nach der UV-B-Belastung im naturnahen Tagesgang, um zu klären, ob das Primärblatt in der Lage war, entstandenen Schaden zu reparieren. Hierbei sollte Photoreaktivierung in den Primärblättern nachgewiesen und ihre Effizienz untersucht werden.

Die Phenylpropanoid- und CPD-Akkumulation während der Primärblattentwicklung.

Es sollte die Frage geklärt werden, wie sich die potenzielle UV-B-Absorption durch Phenylpropanoid-Akkumulation in Primärblättern von Roggen und Gerste während ihrer Entwicklung unter naturnahen Bedingungen änderte und die CPD-Akkumulation beeinflusst. Der Vergleich der Gersten-Mutante mit der Muttervarietät sollte wiederum Aufschluss über die grundsätzliche Bedeutung der Flavonoide als UV-Schutz-Pigmente geben. Weiterhin interessierte hier auch die Frage, inwieweit die CPD-Reparatur-Systeme in der Mutante den Mangel an Flavonoiden und damit an potenzieller UV-B-Absorption zu kompensieren in der Lage waren, um einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Reparatur im Vergleich zur Stressvermeidung für den UV-Schutz zu bekommen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Das Saatgut des Roggens *Secale cereale* L. cv. *Sorom* stammte von der Firma Lochow-Petkus GmbH, Bergen.

Das Saatgut der Gerste *Hordeum vulgare* L. cv. *Ca 33787* und der aus dieser Sorte hergestellten und isolierten flavonoidarmen Mutante *ant 310* stellten Prof. Dr. von Wettstein und Dr. Jende-Strid (Carlsberg-Research-Laboratory, Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung. Da nur wenig Saatgut vorhanden war, hatten wir die Erlaubnis, es zu vermehren. Die Vermehrung fand am MPI für Züchtungsforschung in Köln-Vogelsang statt. Die pflegerische Betreuung erfolgte durch die dortigen Gärtner. Die Bestäubungskontrolle erfolgte im wesentlichen durch Petra Burchard, Arbeitsgruppe Prof. Weißenböck, die auch die Primärblätter des Saatgutes der Mutante auf Flavonoid-Armut überprüfte. Das vermehrte Saatgut lagert im klimatisierten Samenhaus am MPI für Züchtungsforschung.

2.1.2 Geräte

Es sind nur die für die Experimente dieser Dissertation wichtigen, speziellen Geräte aufgelistet. Die Typenbezeichnungen der allgemeinen Laborgeräte wie Heizblöcke, Zentrifugen, Waagen, Schüttler, Inkubationsschränke etc. werden in den Methodenbeschreibungen aufgeführt.

Klimakammern

- **Klimakammer 3** des Botanischen Institutes, Fa. Weiss Technik, Gießen.
- **Lampenrahmen** für 8 Leuchtstoffröhren, Eigenbau der Werkstatt des Botanischen Institutes.
- **UV-B-Leuchtstoffröhren**
 - 8 x TL12 / 20 W, Fa. Philips, Hamburg, zum Einbrennen der Filterfolie URT;
 - 4 UV-B-Leuchtstoffröhren TL 01 / 20 W, Fa. Philips, Hamburg, für die reine UV-B-Bestrahlung.

➤ **Filter**

- Flüssigkeitsfilter aus UV-B durchlässigem Plexiglas (Typ **2458**, 3 mm dick, Fa. Röhm, Darmstadt), Eigenbau der Werkstatt des Botanischen Institutes, gefüllt mit wässriger **Nickel(II)-chlorid-hexahydrat-Lösung** für die reine UV-B-Bestrahlung.

- **Pflanzenanzuchtschrank** Typ VB 0714/S, Fa. Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen.

➤ **UV-A/Weißlichtquellen**

- 8 Halogen-Quecksilberdampflampen **POWERSTAR HQI-T 400 W**, Fa. Osram, München,
- 4 **Krypton**-Glühbirnen **100 W**, Fa. Osram, München.

➤ **UV-B-Strahlungsquellen**

- **Lampenrahmen** für 8 Leuchtstoffröhren, Spezialanfertigung Fa. Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen;
- 4 UV-B-Leuchtstoffröhren **TL 12 / 20 W**, Fa. Philips, Hamburg.

➤ **Filter**

- Filterrahmen, Eigenbau der Werkstatt des Botanischen Institutes;
- Plexiglas **GS 231**, Fa. Röhm, Darmstadt;
- Folie **URT 100µm**, Fa. Digefra, München.

Strahlungsmessgeräte

- Spektroradiometer **DM 150 BC**, Fa. Bentham Instruments, Berkshire (GB);
- Quantum-Sensor **LI 190 SA** mit Datalogger **LI-1000**, beide Fa. Lambda Instruments, Lincoln (USA);
- Quantameter **LI 185 A**, Fa. Lambda Instruments, Lincoln (USA).

Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC: High Performance Liquid Chromatography)

- System Controller **SCL-10A**;
- 2 Pumpen **LC-10AS**;
- Autoinjector **SIL-10A**;
- UV-spektrophotometrischer Detektor **SPD-10A**;
- Integrator Chromatopac **C-R5A** (an SPD-10A), alle von der Fa. Shimadzu, Kyoto (J);
- linearer Potentiometerschreiber **Servogor S** der Fa. BBC Goerz, Baden (CH);

- Vertex-Säule 125 x 4 mm, Fa. Bischoff, Leonberg, mit Nucleosil 100-5 C8 (Porengröße 100 µm, Partikelgröße 5 µm) gefüllt, Fa. CS Chromatographie-Service, Langerwehe;
- Vertex-Säule 125 x 4 mm, Fa. Bischoff, Leonberg, mit Nucleosil 100-5 C18 (Porengröße 100 µm, Partikelgröße 5 µm) gefüllt, Fa. CS Chromatographie-Service, Langerwehe.

ELISA-Reader

- **Tecan Spectrofluor plus**, Fa. Tecan GmbH, Salzburg, Österreich.

Photometer

- Zwei-Strahl-Spektralphotometer **Uvikon 810** mit Drucker **LS 48** und analogem Schreiber **Recorder 21**, Fa. Kontron Hermle, Goßheim.

Mikroskope

- Mikroskop DM RB mit Epifluoreszenzeinrichtung, Fa. Leitz, Wetzlar. Ausgestattet mit Kameraaufsatz und einer Olympus OM-4 Kamera;
- Zeiss Axiovert 100 Laser-Scanning-Mikroskop mit konfokaler Technik, Fa. Zeiss, Oberkochen.

2.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Sofern nicht anders angegeben, stammten alle Chemikalien und Lösungsmittel von den Firmen Roth GmbH + Co (Karlsruhe), Sigma (Saint Louis, USA), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt) und Baker Chemicals B.V. (Deventer, Niederlande). Die Chemikalien hatten die Reinheitsstufe "zur Analyse", die Lösungsmittel waren über 99 % rein.

Wasser wurde nach zweimaliger Reinigung über die Millipore Super-Q-Anlage des Botanischen Institutes verwendet.

2.1.3.1 Phenylpropanoid-Extraktion und HPLC

HPLC-Laufmittel

Die Fa. Schindler (Köln) lieferte technisches Methanol, welches in unserem Labor vor der Verwendung als Extraktionsmittel und HPLC-Laufmittel destilliert wurde.

Acetonitril (HPLC Grade, > 99,8 % rein) stammte von der Fa. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Niederlande). Tetrahydrofuran (HPLC Grade, > 99,8 % rein) lieferte die Fa. Acros Chimica N.V. (Geel, Belgien).

HPLC-Referenzsubstanzen

Die Hydroxycimtsäuren *trans-p*-Cumarsäure und *trans*-Ferulasäure (beide Reinheitsstufe "zur Synthese") stammten von der Fa. Merck Eurolab GmbH (Darmstadt). Das Flavonglucosid Saponarin (Abbildung 1.9; > 99 % rein) lieferte Fa. Roth GmbH + Co (Karlsruhe).

Die Flavonglycoside Lutonarin (Abbildung 1.9; isoliert aus Gersten-Primärblättern) und R₁ - R₄ (Abbildung 1.8; isoliert aus Roggen-Primärblättern) wurden in unserem Labor über eine mehrschrittige Säulenchromatographie gereinigt. Laut HPLC - Analyse beträgt ihre Reinheit bei den Detektionswellenlängen 280, 315 und 340 nm über 98 %.

2.1.3.2 DNA - Isolierung

CTAB (Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid, > 99 % rein) wurde bei der Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz, käuflich erworben. **PVP-40** (Polyvinylpyrrolidon, 40 kDa) stammte von der Fa. Serva (Heidelberg). Das Enzym **RNase A** lieferte die Fa. Roth GmbH + Co (Karlsruhe) und wurde vor Benutzung in Lösung für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt, um eine DNase - Restaktivität zu zerstören. Das verwendete **Ethanol** war unvergällt (> 99,9 % rein) und stammte von der Fa. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Niederlande).

2.1.3.3 ELISA - Test auf Thymin-Dimere

Zum Blocken wurde Magermilchpulver (Fa. Heirler, Radolfzell) aus dem Reformhaus verwendet. Den **Antikörper gegen Thymin-Dimere aus Maus** lieferte Kamiya Biomedical Co., Seattle (USA). Den **biotin-konjugierten Antikörper gegen Mausantikörper aus Ziege** und das **Extravidin®-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat** lieferte die Firma Sigma, Saint Louis (USA).

2.1.3.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Naturstoffreagenz A stammte von der Fa. Roth GmbH + Co (Karlsruhe).

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht und Ernte

2.2.1.1 Aussaat

Die Aussaat erfolgte für alle Anzuchten in Plastik-Töpfen (7 x 7 cm; Höhe 8 cm). Diese wurden mit einem 1:1-Gemisch von Einheitserde (Typ "T") und Torf gefüllt. Nach Andrücken der Erde mittels eines Brettchens wurde weiteres Gemisch darüber gesiebt. Die Karyopsen wurden in einem regelmäßigen räumlichen Abstand voneinander darauf ausgebreitet. Im Falle der Gerste wurde zusätzlich auf die Karyopsen Einheitserde-Torf-Gemisch gesiebt, bis sie gerade bedeckt waren. Nach der Aussaat erfolgte wieder ein leichtes Andrücken und die Töpfe wurden reichlich angegossen. Die Töpfe wurden um kurz vor 10:00 Uhr Kammerzeit (s. Abbildung 2.2, S. 29) in den Anzuchtschrank gestellt.

2.2.1.2 Anzuchtbedingungen

An den ersten 3 Tagen jeder Anzucht waren die Keimlinge mit einer Platte aus Fensterglas abgedeckt. Durch die resultierende hohe Luftfeuchtigkeit über den Karyopsen erfolgte die Keimung gleichmäßiger. Nach Entfernung der Glasplatte wurde täglich kurz vor 10:00 Uhr Kammerzeit (s. Abbildung 2.2, S. 29) mit Leitungswasser gegossen.

Abbildung 2.1 (S. 28) zeigt den Anzuchtraum des Pflanzenanzuchtschranks. Die Pflanzenstellfläche (C; Maße: 94 x 72 cm) war 50 cm von der UV-B-Bestrahlungseinheit (A) und 84 cm vom Beleuchtungsmodul (nicht in der Abbildung zu sehen, es liegt oberhalb der Bestrahlungseinheit) entfernt. Das Pflanzenmaterial wurde im Bereich optimaler Bestrahlung aufgestellt (s.a. 2.2.1.3.4). Die UV-B - Bestrahlungseinheit war mit 4 UV-B-Leuchtstoffröhren (TL12 / 20 W, Fa. Philips) bestückt. Von den 8 Steckplätzen der UV-B-Bestrahlungseinheit war von links aus gerechnet jede 2. Position besetzt. Diese Anordnung wird im weiteren als rechts-alternierend bezeichnet. Der Filterrahmen (B; Eigenbau der Werkstatt des Botanischen Institutes, Universität zu Köln) war an der UV-B-Bestrahlungseinheit befestigt. Die eingesetzten Filter hatten einen Abstand von 10 cm von der Unterkante der UV-B-Leuchtstoffröhren. Die Spezifikationen der UV-B-Leuchtstoffröhren und der verwendeten Filter und die Bestrahlungsbedingungen werden in den folgenden Kapiteln erläutert. Die UV-B-Bestrahlungseinheit und der an ihr befestigte Filterrahmen



Abbildung 2.1: Der Pflanzenanzuchtschrank.

Abgebildet ist der Anzuchttraum mit 6 Tage alten Gerstenkeimlingen (*Ca* und *ant*). **A** = UV-B-Bestrahlungseinheit, **B** = Filtereinheit, **C** = höhenverstellbare Stellfläche; der weiße Winkel zeigt die Höhe des Messkopfes bei den spektroradiometrischen Vermessungen an (s. 2.2.1.3.4).

wurden mittels eines Motors in einem Zeitraum von 3 Minuten und über eine Distanz von ca. 10 cm während der Lichtperiode hin und herbewegt (auf der Abbildung von links nach rechts), um Beschattungen durch die UV-B-Röhren auszugleichen.

Abbildung 2.2 (S. 29) zeigt den Tagesgang der **Klima- und Strahlungsbedingungen** für die Experimente im Anzuchtschrank. Das Beleuchtungsmodul ist in 6 Stufen schaltbar (s.u.), die Bestrahlungsstärke wird in Prozent der Bestrahlungsstärke der höchsten Stufe angegeben. Die höchste Stufe des Beleuchtungsmoduls entspricht einer Photonenflussrate von $650 - 700 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ im Bereich der maximalen Bestrahlungsstärke des Bestrahlungsfeldes. Die Uhrzeit des Anzuchtschranks ist unabhängig von der Ortszeit. Sie wird im weiteren Kammerzeit genannt.

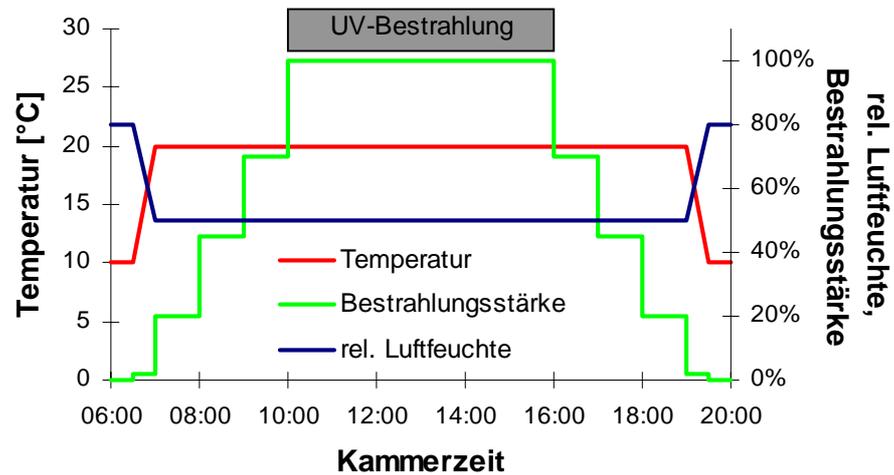


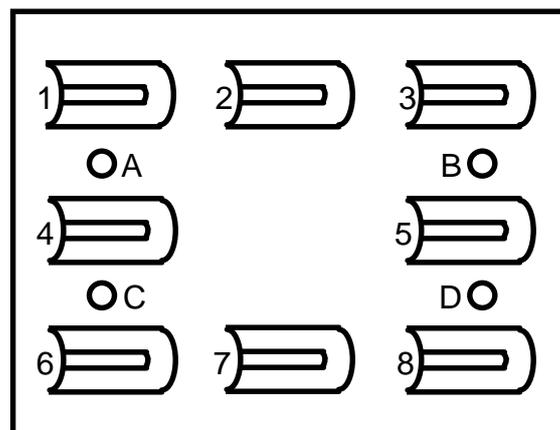
Abbildung 2.2: Tagesgang der Klima- und Strahlungsbedingungen im Anzuchtschrank.

Tagesgang von 6 Uhr bis 20 Uhr. In der Zeit von 20 Uhr bis 6 Uhr blieben die Bedingungen konstant. Die UV-B-Leuchtstoffröhren wurden zur Zeit der maximalen Bestrahlungsstärke von 10 Uhr bis 16 Uhr, also für 6 h, angeschaltet. Die maximale Beleuchtung von 100 % entsprach einer Photonenflussrate von $650 - 700 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ in Pflanzenhöhe, der Tagesgang einem Licht / Dunkelrhythmus von 13 / 11 h. Die Kammerzeit ist unabhängig von der Echtzeit. Der Anzuchtschrank regelte die Klimabedingungen mit einem Fehler von 1°C bzw. 5 % rel. Luftfeuchte (Hersteller-Angaben).

2.2.1.3 Strahlungsbedingungen

2.2.1.3.1 Das Beleuchtungsmodul des Anzuchtschranks

Folgendes Schema gibt die Lampenanordnung des Beleuchtungsmoduls des Anzuchtschranks mit 4 Krypton-Glühlampen 100 W (A-D) und 8 Halogen-Quecksilberdampflampen POWERSTAR HQI-T 400 W (1-8) (beide Fa. Osram, München) wieder:



Dieses Beleuchtungsmodul ist in 6 Stufen schaltbar:

- 1. aus;
- 2. 4 Krypton-Glühbirnen;
- 3. 4 Krypton-Glühbirnen + 2 x HQI-T (4,5);
- 4. 4 Krypton-Glühbirnen + 4 x HQI-T (2,4,5,7);
- 5. 4 Krypton-Glühbirnen + 6 x HQI-T (1-3,6-8);
- 6. 4 Krypton-Glühbirnen + 8 HQI-T.

Diese 6 Stufen entsprechen den Prozentangaben der Bestrahlungsstärke in der Abbildung 2.2 (S. 29).

2.2.1.3.2 UV-B-Bestrahlungseinheit

Das Beleuchtungsmodul des Anzuchtschranks emittiert keine Strahlung unterhalb von 320 nm (eigene Messungen, s. auch Abbildung 2.8 Bedingung PR, S. 39). Daher wurde eine UV-B-Bestrahlungseinheit in den Prüfraum des Anzuchtschranks integriert. Diese besteht aus einem Rahmen, in den maximal 8 UV-B-Leuchtstoffröhren des Typs TL12 / 20 W der Fa. Philips installiert werden können (s. Abbildung 2.1 A). Die Bestrahlungseinheit ist eine Spezialanfertigung der Fa. Vötsch, konstruiert nach Absprache mit P. Burchard (unsere

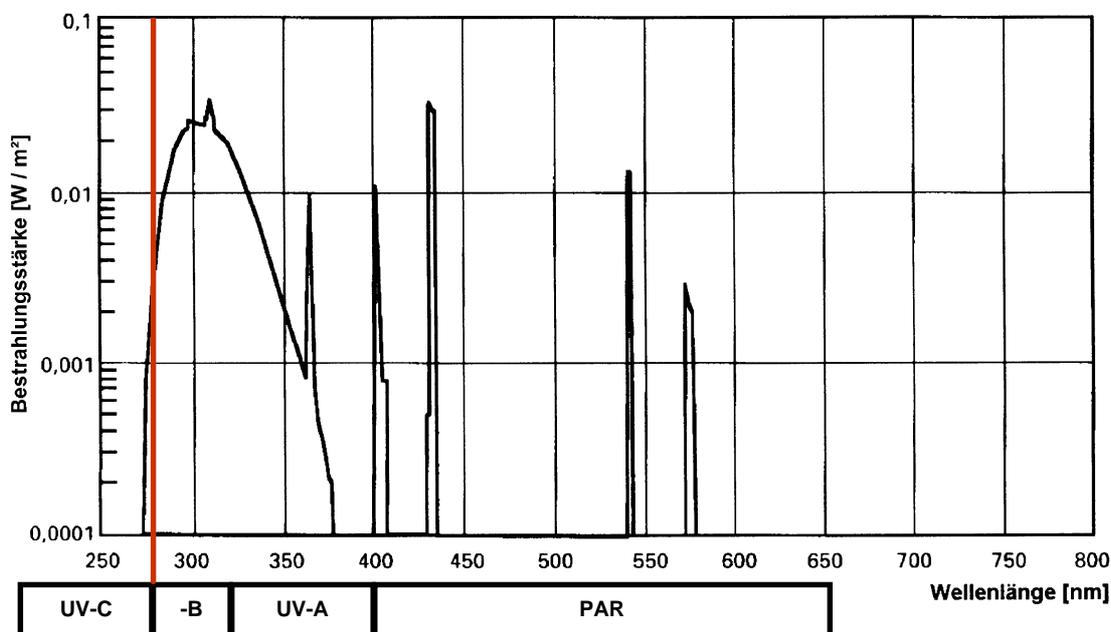


Abbildung 2.3: Spektrale Verteilung der Bestrahlungsstärken der UV-B-Leuchtstoffröhre TL12 / 20 W.

Angaben (W/m^2) in halblogarithmischer Darstellung, gemessen wurde in 2 nm-Schritten in 1 m Abstand zur Leuchtstoffröhre (Hersteller-Angaben). Diese Röhren emittieren auch Strahlung im UV-C-Bereich ($< 280 \text{ nm}$ = rote Linie).

Arbeitsgruppe), Prof. Weißenböck und R. Schmitz (diese Arbeit). Abbildung 2.3 zeigt die Emission der UV-B - Leuchtstoffröhren.

2.2.1.3.3 Die Filtereinheit

Abbildung 2.3 (S. 30) zeigt, dass die UV-B-Leuchtstoffröhren auch Strahlung im UV-C-Bereich (< 280 nm) emittieren. Da im natürlichen Sonnenspektrum kein UV-C vorhanden ist, muß der UV-C-Anteil herausgefiltert werden. Hierfür wurde die Folie Ultraphan URT (Dicke $100 \mu\text{m}$) der Fa. Digrefa, München, verwendet. Die Folien wurden vor ihrem Einsatz in dem Anzuchtschrank 24 h lang unter 8 UV-B-Leuchtstoffröhren (Abstand der Folien zu den Röhren 10 cm) "eingebrennt". Eine eingebrennte Folie wurde 7 Tage im Anzuchtschrank verwendet, was einer UV-B-Bestrahlungsdauer von weiteren 42 h entspricht, insgesamt also 66 h. Abbildung 2.4 zeigt die Veränderung der Transmissionseigenschaften durch das Einbrennen und die Nutzung der Filterfolie.

Für Anzuchten ohne UV-Strahlung wurde als Filter das Plexiglas GS 231 der Firma Röhm, Darmstadt, verwendet. Frühere langjährige Erfahrungen in unserem Labor mit diesem Plexiglas zeigten, dass sich seine Transmissionseigenschaft während der Benutzung nicht änderten.

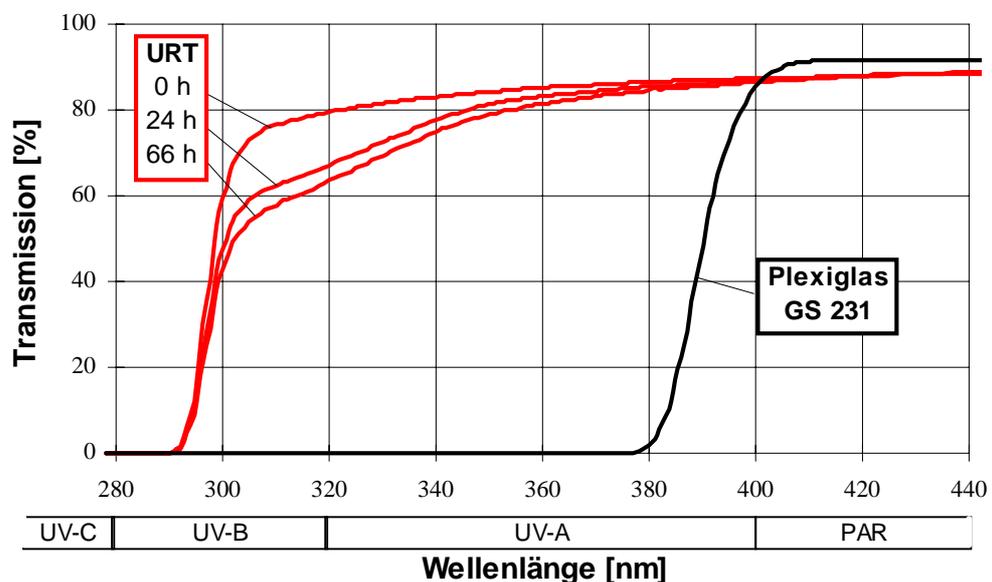


Abbildung 2.4: Transmissionspektren der Folie URT und des Plexiglases GS 231.

Dargestellt ist die Transmission in Prozent von nicht eingebrennter (0 h), eingebrennter (24 h) und eine Woche genutzter (66 h) Folie URT und vom Plexiglas GS 231. Das Einbrennen erfolgte unter 8 UV-B-Leuchtstoffröhren TL 12 / 20 W im Abstand von 10 cm. Während der Nutzung strahlten 4 UV-B-Leuchtstoffröhren in einem Abstand von 10 cm auf die Folie. Die Transmissionsmessungen wurden mit dem Zweistrahl-UV-Spektralphotometer durchgeführt. Im Wellenlängenbereich > 440 nm wiesen beide Filter keine durch Bestrahlung verursachte Veränderung der Transmission auf und sie war gleich der Transmission bei 440 nm.

2.2.1.3.4 Strahlungsbedingungen

Die spektroradiometrische Vermessung der Strahlungsbedingungen des Anzuchtschranks konnten wir mit der freundlichen Unterstützung der Landesanstalt für Arbeitsschutz Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, vornehmen. Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Betreuer des Spektroradiometers Herrn Stockfleth von der Landesanstalt, Frau Burchard und R. Schmitz (diese Arbeit). Das Gerät maß die spektrale Verteilung der Bestrahlungsstärke (mW / m^2) in 1 nm Schritten im Wellenlängenbereich von 250 - 600 nm. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch R. Schmitz (diese Arbeit). In den Auswertungen wurden die Daten für die Wellenlängenbereiche UV-B (280 - 320 nm), UV-A (320 - 400 nm) und PAR* (400 - 600 nm) zusammengefasst. Mit PAR* wird im weiteren der Bereich von 400 - 600 nm bezeichnet, da das verwendete Spektroradiometer (DM 150 BC, Bentham Instruments, Berkshire, GB) nicht den gesamten PAR-Bereich von 400 - 700 nm vermessen kann. Daher erfolgte auch noch eine ausführliche Vermessung der Strahlungsbedingungen mit einem Quantameter (s.u.). Zusätzlich wurde die biologisch effektive UV-B-Strahlungsdosis (UV-B_{BE}) nach BJÖRN UND MURPHY (1985), normiert auf 300 nm, auf eine tägliche Bestrahlungsdauer von 6 Stunden (wie im Standard-Tagesgang vorgesehen, s. Abbildung 2.2, S. 29) berechnet. Diese Berechnung erfolgte nach folgender Formel (aus BJÖRN UND MURPHY, 1985):

$$f(x_\lambda, \lambda) = t * k * \sum_{\lambda=280}^{360} x_\lambda * e^{-((265-\lambda)/21)^2 + a}$$

Der Funktionswert ergibt UV-B_{BE} in $\text{kJ} / \text{m}^2 \cdot \text{d}$ mit:

λ : Wellenlänge in nm

x_λ : Bestrahlungsstärke bei Wellenlänge λ in mW / m^2 (Messwerte)

t : 21600 s = 6 h; Umrechnungsfaktor von Sekunden auf die Bestrahlungsdauer von 6 Stunden

k : 10^{-6} ; Umrechnung von der Dimension milli auf kilo

a : 2,78; Konstante zur Normierung auf 300 nm

Alle Strahlungsmessungen erfolgten bei einer Einstellung des Beleuchtungsmoduls auf 100 % (alle Lampen angeschaltet). Die UV-B-Bestrahlungseinheit war mit der Standardanordnung der UV-B-Leuchtstoffröhren ausgestattet (4 Röhren rechts-alternierend, angeschaltet). Der Rahmen musste aus messtechnischen Gründen in einer Position (maximaler Ausschlag nach rechts) fixiert werden. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine frisch eingebrannte Folie URT als Filter verwendet. Der Messkopf wurde in einer Höhe von 13,5 cm

über der Stellfläche positioniert (s. Abbildung 2.1). Dies entsprach ungefähr der Entfernung der Primärblattspitzen 6 (5) Tage alter Gersten(Roggen)-Keimlinge von der Stellfläche in den Experimenten.

Die Strahlungsverteilung über die Stellfläche (Maße 94 x 72 cm) wurde mit dem Spektroradiometer in einem Raster aus 6 Spalten (Abstand untereinander: 16 cm, von den seitlichen Rändern: 7 cm) und 5 Zeilen (Abstand untereinander und vom vorderen und hinteren Rand: 12 cm) vermessen.

Abbildung 2.5 zeigt die prozentuale Verteilung der drei spektralen Bereiche PAR* (400 - 600 nm), UV-A (320 - 400 nm) und UV-B (280 - 320 nm) im vermessenen Raster. 100 % entsprechen der gemessenen maximalen Bestrahlungsstärke des jeweiligen Spektralbereiches. In den Versuchen dieser Arbeit wurde das Pflanzenmaterial im Bereich der Rasterpositionen 2. - 4. Zeile und 3. - 5. Spalte gestellt (Fläche: ca. 35 x 25 cm, linke obere Ecke der Fläche ca. 40 cm vom linken Rand und 25 cm vom hinteren Rand der Stellfläche entfernt). War dies nicht möglich wird im weiteren darauf hingewiesen.

Jürgen Brückmann vermaß im Rahmen seiner Diplom-Arbeit (1998) unter meiner Anleitung die gleichen Rasterpositionen mit einem Quantameter (Quantum-Sensor LI 190 SA mit Datalogger LI-1000, beide Fa. Lambda Instruments, Lincoln, USA). Hierbei war der UV-B-Bestrahlungsrahmen nicht fixiert, er bewegte sich innerhalb von 3 Minuten hin und her. Die gemessene Verteilung der Photonenflussrate entsprach der Verteilung der PAR*-Bestrahlungsstärke in Abbildung 2.5. Die maximale Photonenflussrate betrug $700 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$.

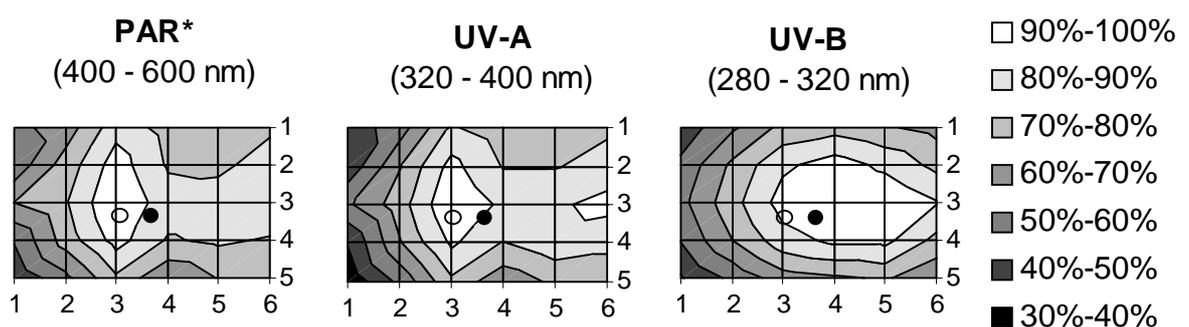


Abbildung 2.5: Strahlungsverteilung dreier Spektralbereiche im Bestrahlungsfeld.

Die Verteilung ist in Prozent angegeben. 100% entsprechen $112 \text{ W} / \text{m}^2$ für PAR*, $8,61 \text{ W} / \text{m}^2$ bei UV-A, $1,51 \text{ W} / \text{m}^2$ für UV-B. Die Vermessung wurde in einem Raster von 6 Spalten (Abstand untereinander 16 cm, von den seitlichen Rändern 7 cm) und 5 Zeilen (Abstand untereinander und vom vorderen und hinteren Rand 12 cm) 13,5 cm oberhalb der Stellfläche durchgeführt. Die Koordinatenschnittpunkte stellen die vermessenen Rasterpositionen dar. Es sind die Messpunkte der weiteren Spektroradiometermessungen (s.u.) eingezeichnet: unbeschatteter (O) und beschatteter (●) Messpunkt.

Weitere spektrometrische Messungen wurden an zwei Messpunkten durchgeführt. Bei fixiertem UV-B-Bestrahlungsrahmen wurde ein Messpunkt durch die UV-B-Leuchtstoffröhren beschattet, der andere nicht. Beide Messpunkte lagen 39 cm vom oberen Rand der Stellfläche entfernt, vom linken Rand betrug die Entfernung 48 cm (unbeschattet) bzw. 59 cm (beschattet). Tabelle 2.1 zeigt die Ergebnisse der Vermessung von frisch eingebrannter (24 h) und einer 7 Tage lang genutzten (66 h) Filterfolie URT an den beiden Messpunkten. Die Beschattung durch die Leuchtstoffröhren führte zu einer ca. 26 % geringeren UV-A- und PAR*-Bestrahlungsstärke. Durch die Bewegung des UV-B-Bestrahlungsrahmens während der Anzucht des Pflanzenmaterials wurde dieser Effekt ausgeglichen, die resultierende Bestrahlungsstärke lag zwischen den gemessenen Werten. Die Schwankungen der UV-B-Bestrahlungsstärken zwischen den beiden Messpunkten lag mit 3 % im Bereich der geschätzten Fehlerschwankung des Messgerätes von 5 % (Angabe von Herrn Stockfleth). Während der Nutzung der Filterfolie URT verringerte sich die UV-B-Bestrahlungsstärke um 6 - 11 %. Die Veränderung der beiden anderen Strahlungsbereiche lagen im Bereich der Fehlerschwankung des Messgerätes.

Folien- alter [h]	Mess- punkt	UV-B (280-320nm) [W/m ²]	UV-BBE [kJ/m ² d]	UV-A (320-400nm) [W/m ²]	PAR* (400-600nm) [W/m ²]
24	U	1,35	11,9	8,54	110
	B	1,39	12,2	6,20	82
66	U	1,28	11,2	8,36	114
	B	1,25	10,8	6,07	83

Tabelle 2.1: Einfluss der Folienalterung und der Beschattung durch die UV-B-Bestrahlungseinheit auf die Bestrahlungsstärke.

Daten der spektrometrischen Vermessung am unbeschatteten (U) und beschatteten (B) Messpunkt mit der Standardanordnung der UV-Röhren, zusammengefasst zu UV-A, UV-B und PAR* für eine frisch eingebrannte (24 h) und eine gealterte Folie (66 h Bestrahlung, entspricht einer Woche Nutzung im Anzuchtschrank). UV-B_{BE} ist die biologisch effektive Strahlungsdosis gewichtet nach BJÖRN UND MURPHY (1985), normiert auf 300 nm, und berechnet auf eine 6stündige Bestrahlung am Tag. Strahlung im UV-C-Bereich (< 280 nm) lag unterhalb der Nachweisgrenze.

Folgende zwei Bestrahlungsbedingungen wurden für die Anzuchten verwendet, denen die oben genannten Standardbedingungen zugrunde lagen:

WL Filter: Plexiglas GS 231; UV-B-Leuchtstoffröhren: aus.

WL+UV Filter: URT; 4 UV-B-Leuchtstoffröhren: über UV-Bestrahlungszeitraum an.

Die beiden Bedingungen WL und WL+UV werden im weiteren als **Anzuchtbedingungen** angesprochen. In der Abbildung 2.6 sind die Spektren der Bestrahlungsstärke beider Anzuchtbedingungen wiedergegeben und Tabelle 2.2 fasst die Strahlungsdaten dieser Bedingungen zusammen.

Folgende Punkte sind bezüglich der Anzuchtbedingungen als wichtig hervorzuheben:

- Beide Bedingungen wiesen im PAR-Bereich gleiche Bestrahlungsstärke bzw. Photonenflussrate auf.
- Unter der WL-Bedingung traf noch ein beträchtlicher Anteil an UV-A auf die Pflanzen. Er macht ca. 24 % der UV-A-Bestrahlungsstärke der WL+UV-Bedingung aus.

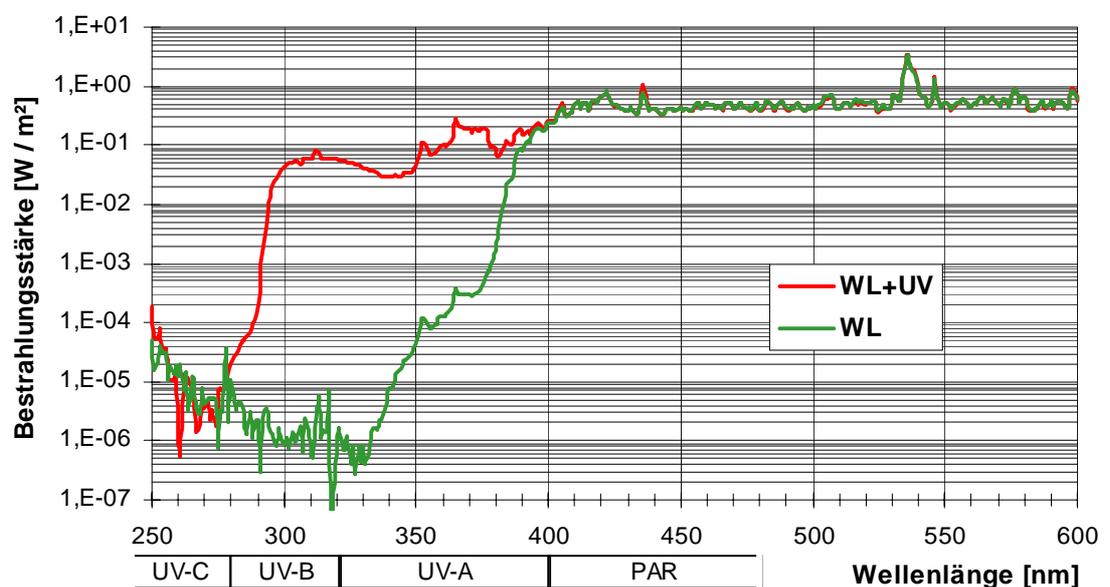


Abbildung 2.6: Bestrahlungsstärken in Abhängigkeit von der Wellenlänge für die Pflanzenanzucht unter WL und WL+UV.

Der Abbildung liegen die Daten der Spektroradiometermessung am unbeschatteten Messpunkt mit Standardeinstellungen und frisch eingebrannter Filterfolie URT (WL+UV) bzw. dem Plexiglas GS 231 zu Grunde. Die Werte unterhalb 280 nm für das WL+UV-Spektrum und unterhalb 335 nm für das WL-Spektrum stellen das Hintergrundrauschen des Messgerätes dar.

Anzucht- bedingung	UV-B (280-320nm) [W/m ²]	UV-BBE [kJ/m ² d]	UV-A (320-400nm) [W/m ²]	PAR* (400-600nm) [W/m ²]	PAR (400-700nm) [μE/m ² s]
WL	-	-	2,04	110	700
WL+UV	1,35	11,9	8,54	110	700

Tabelle 2.2: Strahlungsdaten für die Pflanzenanzuchten unter WL und WL+UV.

Daten der spektroradiometrischen Vermessung am unbeschatteten (U) Messpunkt mit Standardeinstellung und frisch eingebrannter Folie URT, zusammengefasst zu UV-A, UV-B und PAR*. Angegeben sind die Bestrahlungsstärken. UV-B_{BE} ist die biologisch effektive Strahlungsdosis gewichtet nach BJÖRN UND MURPHY (1985), normiert auf 300 nm, und berechnet auf eine 6stündige Bestrahlung am Tag. Strahlung im UV-C-Bereich (< 280 nm) lag unterhalb der Nachweisgrenze. Die Photonenflussrate für die PAR (400 - 700 nm) liegen die Messungen zur Strahlungsverteilung von Jürgen Brückmann zu Grunde (s. o.).

- Unter WL+UV-Bedingung war keine UV-C-Strahlung messbar. Allerdings traf noch Strahlung bis 280 nm auf die Pflanzen, während die natürliche Grenze aufgrund der Ozon-Schicht bei 290 nm liegt. Nur 0,04 % der UV-B-Bestrahlungsstärke bzw. 0,6 % der UV-B_{BE}-Strahlungsdosis liegt unterhalb von 290 nm.
- Auf Grund der Konstruktion der UV-B-Bestrahlungs- und der Filtereinheit war es nicht möglich Pflanzen unter WL und WL+UV parallel anzuziehen.

2.2.1.4 Anzucht und Bestrahlung von Roggen- und Gersten-Keimlingen für die Experimente zur Phenylpropanoid-, Thymin-Dimer-Akkumulation und Thymin-Dimer-Reparatur in einem frühen Entwicklungsstadium

2.2.1.4.1 Anzucht

Wie bei den Anzuchtbedingungen angemerkt, konnte keine parallele Anzucht von Keimlingen unter WL- und WL+UV-Bedingungen erfolgen. Für jeweils eine Sorte (Roggen *Sorom*, Gerste *Ca*, Gerste *ant*) und eine Anzuchtbedingung wurden Keimlinge in 12 Töpfen im optimalen Strahlungsbereich der Stellfläche (s. Abbildung 2.5, und dortige Erläuterungen) angezogen.

2.2.1.4.2 Bestrahlungen und Erntezeitpunkte

Am 5. Tag (Roggen *Sorom*) bzw. 6. Tag (Gerste *Ca* und *ant*) nach Aussaat erfolgte zunächst eine 6stündige **Bestrahlungsphase** innerhalb der Kammerzeit von 10:00 - 16:00 Uhr.

Das Pflanzenmaterial wurde unter 2 Bedingungen bestrahlt (eine genauere Darstellung der Bestrahlungsbedingungen erfolgt im nächsten Kapitel):

BAP gleich der Anzuchtbedingung WL+UV in der Kammerzeit von 10:00 - 16:00 Uhr, die UV-B-Leuchtstoffröhren waren angeschaltet. Die Bestrahlung erfolgte also mit UV-**B**, UV-**A** und **PAR** über 6 h.

B Bestrahlung nur mit UV-**B** über 6 h.

Die Bestrahlung von Pflanzenmaterial einer Anzucht mit diesen beiden Bestrahlungsbedingungen erfolgte parallel. Die BAP-Bestrahlung erfolgte im Anzuchtschrank, die B-Bestrahlung in der Klimakammer 3 des Botanischen Institutes. Pflanzen in jeweils 5 Töpfen wurden bestrahlt. Bei den WL-Anzuchten musste am Tage der Bestrahlung vor Beginn der Bestrahlungsphase der Plexiglas-Filter gegen eine eingebrannte Filterfolie URT ausgetauscht werden.

Nach der Bestrahlungsphase (6 h) folgte eine 3,5stündige **Reparaturphase** in der Kammerzeit von 16:00 - 19:30 Uhr. Sie erfolgte unter zwei **Reparaturbedingungen** (eine genauere Darstellung der Reparaturbedingung **PR** erfolgt im nächsten Kapitel):

PR gleich der Anzuchtbedingung WL+UV in der Kammerzeit von 16:00 - 19:30 Uhr, die UV-B-Leuchtstoffröhren waren gemäß dem Tagesgang ausgeschaltet. Die Bestrahlung erfolgte also mit UV-A und PAR über 3,5 h. Unter diesen Bedingungen ist **Photoreaktivierung** möglich.

dunkel Dunkelkontrolle, keine Bestrahlung des Pflanzenmaterials. Unter diesen Bedingungen ist nur eine lichtunabhängige Reparatur möglich.

Die Reparaturphase unter beiden Bedingungen erfolgte parallel. Aus beiden Bestrahlungsbedingungen BAP und B wurden je 2 Töpfe unter die Reparaturbedingung PR und je 1 Topf unter die Reparaturbedingung dunkel gesetzt. Die Reparaturbedingung PR war im Anzuchtschrank realisiert, die Dunkel-Bedingung in der Klimakammer 3 des Botanischen Institutes.

Die Abbildung 2.7 (S. 38) zeigt den Ablauf des Experimentes im Überblick. Ernten erfolgten zu folgenden Kammerzeiten am Bestrahlungstage:

10:00 Ernte von 2 Töpfen zur Messung des Phenylpropanoid-Gehaltes und der Thymin-Dimer-Konzentration

(Alle weiteren Ernten erfolgten zur Bestimmung der Thymin-Dimer-Konzentration)

13:00 Je 1 Topf aus den beiden Bestrahlungsbedingungen.

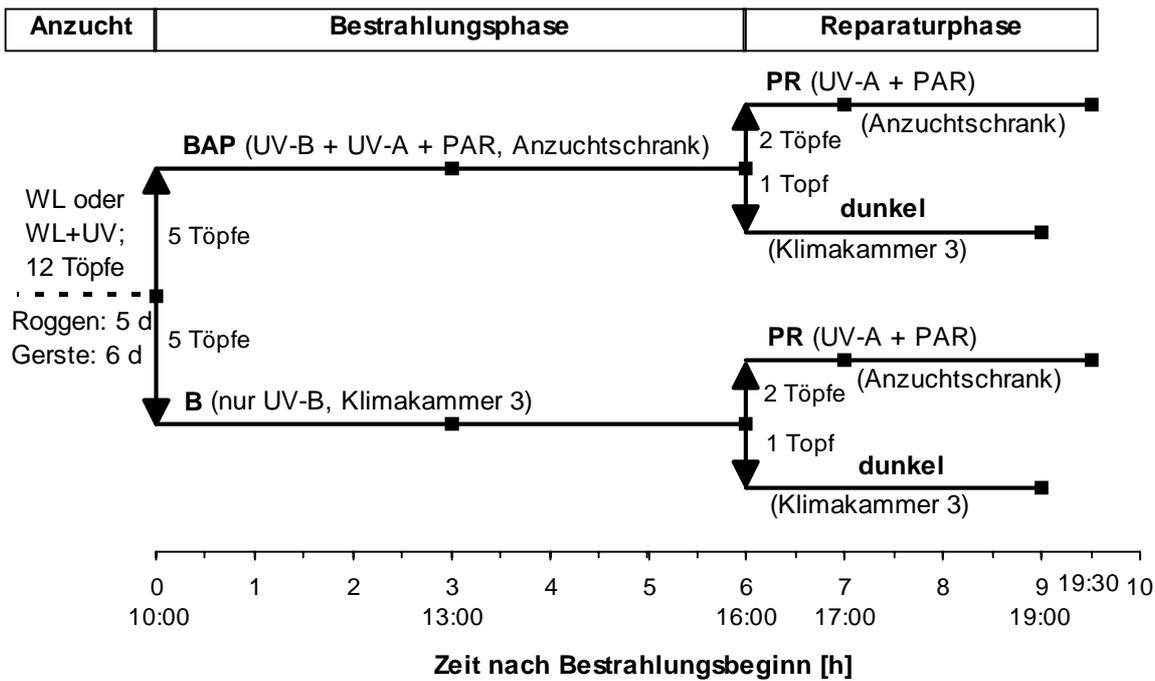


Abbildung 2.7: Bestrahlungen und Erntezeitpunkte der Tagesgang-Experimente.

Das Schema gibt den Ablauf der jeweiligen Bestrahlungsphase und Reparaturphase wieder. Auf der Zeitachse ist die Zeit nach Bestrahlungsbeginn aufgetragen. Zum besseren Verständnis sind an einigen Stellen die zugehörigen Kammerzeiten (10:00 - 19:30) angegeben. Die Pfeile symbolisieren das Umstellen von Pflanzenmaterial unter eine andere Bedingung. An den Pfeilen ist die Anzahl der umgestellten Töpfe angegeben. Die Markierungen auf den Linien stellen die Erntezeitpunkte dar. Eine Markierung bedeutet einen zu erntenden Topf, Ausnahme: zum Zeitpunkt 0 h (10:00 Uhr Kammerzeit) wurden 2 Töpfe geerntet.

- 16:00 Je 1 Topf aus den beiden Bestrahlungsbedingungen.
- 17:00 2 Töpfe aus der Reparaturbedingung PR, einer stand vorher unter BAP, der andere unter B.
- 19:00 2 Töpfe aus der Reparaturbedingung dunkel, einer stand vorher unter BAP, der andere unter B.
- 19:30 2 Töpfe aus der Reparaturbedingung PR, einer stand vorher unter BAP, der andere unter B.

2.2.1.4.3 Bestrahlungs- und Reparaturbedingungen

Die Entwicklung des Aufbaus für die **Bestrahlungsbedingung B** für die vorliegende Dissertation wird im Ergebnis-Kapitel 3.2 genauer beschrieben. Die Spezialbestrahlungsanlage wurde in der Klimakammer 3 des Botanischen Institutes installiert und dort erfolgten auch die Bestrahlungen des Pflanzenmaterials. Die 4 mittleren Steckplätze eines Rahmens für 8 Leuchtstoffröhren (Eigenbau der Werkstatt des Botanischen Institutes) wurden mit 4 UV-B-Schmalband-Leuchtstoffröhren TL01 / 20 W der Fa. Philips bestückt. Die Entfernung der Röhren von der Stellfläche für das Pflanzenmaterial betrug in diesem Aufbau 49 cm. Zwischen

Röhren und Pflanzenmaterial befand sich ein Flüssigkeitsfilter in einem Abstand von 30 cm von der Stellfläche. Der Flüssigkeitsfilter bestand aus UV-durchlässigem Plexiglas 2458 der Fa. Röhm (Darmstadt). Das Plexiglas hatte eine Dicke von 3 mm, der Flüssigkeitsraum des Filters eine Dicke von 1 cm. Er war mit einer wässrigen $\text{NiCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ -Lösung (800 g / ℓ) gefüllt. Die Bestrahlungsbedingung B wurde spektrometrisch vermessen. Der Messkopf stand analog zu der Kammervermessung in der Mitte des Filters in einer Höhe von 13,5 cm über der Stellfläche.

In Abbildung 2.8 sind die Spektren der Bestrahlungsstärken für die drei Bedingungen BAP, B und PR wiedergegeben und Tabelle 2.3 (S. 40) fasst ihre Strahlungsdaten zusammen. Die **Bestrahlungsbedingung BAP** entsprach, wie oben beschrieben, der Anzuchtbedingung WL+UV in der Kammerzeit von 10:00 - 16:00 Uhr. In diesem Zeitraum waren die UV-B-Leuchtstoffröhren an und somit trafen die drei Spektralbereiche UV-A, UV-B und PAR auf das Pflanzenmaterial. Bezüglich der UV-B_{BE}-Dosis waren die Bestrahlungen BAP und B gleich. Im Wellenlängenbereich der Photoreaktivierung von 330 - 450 nm (s. 1.1.3.1) wies B nur 0,21 % der Bestrahlungsstärke unter BAP auf.

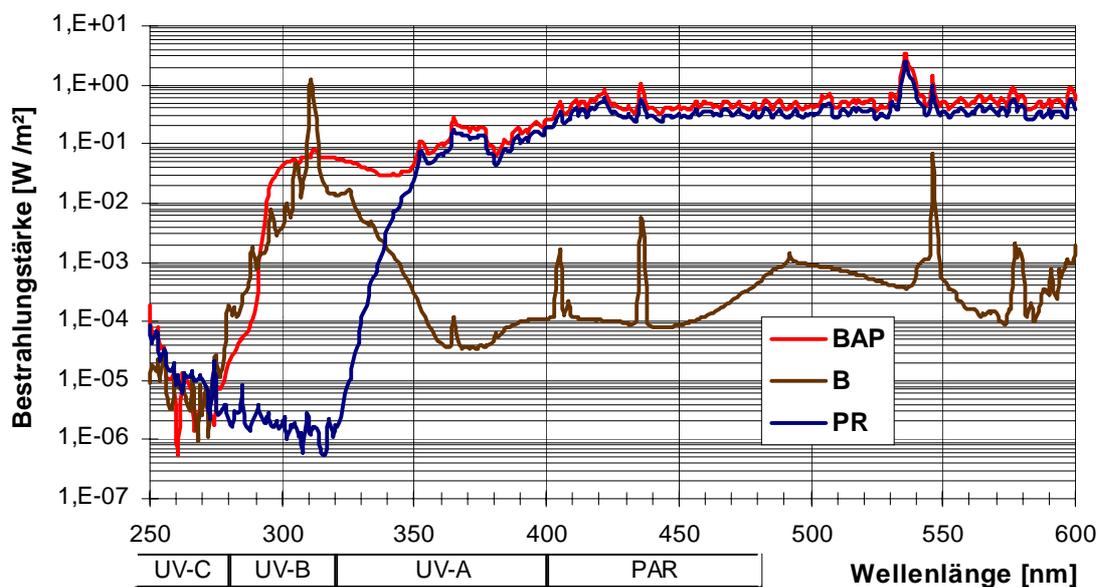


Abbildung 2.8: Bestrahlungsstärken in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Bestrahlungsbedingungen.

Der Abbildung liegen die Daten der Spektrometriermessung der Anzuchtbedingung WL+UV am unbeschatteten Messpunkt (in 13,5 cm Höhe über der Stellfläche) mit Standardeinstellungen und frisch eingetragener Filterfolie URT (entspricht der Bestrahlungsbedingung **BAP**, s. o.) bzw. am selben Punkt mit demselben Filter, ausgeschalteten UV-Röhren und der Schaltung des Beleuchtungsmoduls auf 70 % (**PR**) zu Grunde. Den Daten von **B** liegt die spektrometrische Vermessung der Spezialbestrahlungsanlage in der Mitte unter der Filterküvette in einer Entfernung zur Stellfläche von 13,5 cm zu Grunde. Die Werte unterhalb 280 nm für das BAP- und das B-Spektrum und unterhalb 320 nm für das PR-Spektrum stellen das Hintergrundrauschen des Messgerätes dar.

Bedingung	UV-B (280-320nm) [W/m ²]	UV-BBE [kJ/m ² d]	UV-A (320-400nm) [W/m ²]	PAR* (400-600nm) [W/m ²]	Photoreaktivierung (330-450 nm) [W/m ²]
BAP	1,35	11,9	8,54	110	30,8
B	3,36	11,7	0,165	0,167	0,065
PR	-	-	5,39	77,3	21,7

Tabelle 2.3: Strahlungsdaten der beiden Bestrahlungs- und der Photoreaktivierungsbedingung.

Der Tabelle liegen die Daten der Spektroradiometermessung der Anzuchtbedingung WL+UV am unbeschatteten Messpunkt (in 13,5 cm Höhe über der Stellfläche) mit Standardeinstellungen und frisch eingebannter Filterfolie URT (entspricht der Bestrahlungsbedingung **BAP**, s. o.) bzw. am selben Punkt mit demselben Filter, ausgeschalteten UV-Röhren und der Schaltung des Beleuchtungsmoduls auf 70 % (**PR**) zu Grunde. Den Daten von **B** liegt die spektroradiometrische Vermessung der Spezialbestrahlungsanlage in der Mitte unter der Filterküvette in einer Entfernung zur Stellfläche von 13,5 cm zu Grunde. UV-B_{BE} ist die biologisch effektive Strahlungsdosis gewichtet nach BJÖRN UND MURPHY (1985), normiert auf 300 nm, und berechnet auf eine 6stündige Bestrahlung am Tag. Strahlung im UV-C-Bereich (< 280 nm) lag in allen Fällen unterhalb der Nachweisgrenze.

Die **Reparaturbedingung PR** entsprach zwar ebenfalls der WL+UV-Bedingung, jedoch sind ab 16:00 Uhr Kammerzeit die UV-B-Leuchtstoffröhren ausgeschaltet. So treffen nur die beiden Spektralbereiche UV-A und PAR auf das Pflanzenmaterial, die UV-B-Strahlung lag unterhalb der Nachweisgrenze. Bei PR ist zu beachten, dass zu ihrem Beginn (16:00 Uhr Kammerzeit) das Beleuchtungsmodul nur noch auf 70 % gestellt ist, und danach weiter stufenweise im Tagesgang heruntergefahren wird. In der Abbildung und der Tabelle sind nur die Werte entsprechend 16:00 Uhr Kammerzeit dargestellt.

2.2.1.5 Anzucht zu den Untersuchungen über die Phenylpropanoid- und Thymin-Dimer-Akkumulation im Verlauf der Primärblattentwicklung von Roggen und Gerste.

Die Anzucht erfolgte bei Roggen und Gerste (*Ca* und *ant* zusammen) separat für die jeweilige Anzuchtbedingung. Im Falle der Gerste wurden pro Anzuchtbedingung *Ca* und *ant* parallel angezogen. Die Ernten erfolgten am 5., 6., 8., 11., 14. und 18. Tag nach Aussaat. Am Erntetag wurde um 10:00 Uhr Kammerzeit (unmittelbar vor der UV-Bestrahlung im Tagesgang) das Pflanzenmaterial aus 2 Töpfen zur Thymin-Dimer- und Phenylpropanoid-Bestimmung und um 16:00 Uhr Kammerzeit (unmittelbar nach UV-Bestrahlung im Tagesgang) aus 1 Topf nur zur Thymin-Dimer-Bestimmung geerntet. Bei der WL-Anzucht wurde nur am 5. und 18. Tag auch für die Bestimmung der Thymin-Dimer-Konzentration geerntet. An den anderen Tagen erfolgte nur die Ernte zur Phenylpropanoid-Bestimmung.

Anzucht, Ernte, DNA-Isolierung, Thymin-Dimer-Bestimmung und Phenylpropanoid-Analyse dieser Experiment-Reihe für die Gerste wurden unter meiner Anleitung und ständiger Kontrolle von der biologisch-technischen Assistentin Katja Töttel durchgeführt.

2.2.1.6 Ernte

Alle Ernten fanden unter rotem Sicherheitslicht (Wellenlänge > 550 nm) statt, um eine Photoreaktivierung von Thymin-Dimeren zu vermeiden. Zunächst wurden alle Keimlinge eines zu erntenden Topfes an der Karyopse abgeschnitten und die Gesamtlänge sowie die Länge der Koleoptile bestimmt. Die Koleoptile wurde dann mit dem in ihr befindlichen Teil des Primärblattes abgeschnitten und verworfen. Von dem verbleibenden Primärblattstück (dies war der strahlungsexponierte Teil des Blattes) erfolgte eine Frischgewichtsbestimmung.

Bei den Roggen-Experimenten wurden die Primärblattstücke einzeln in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Aufarbeitung der Proben (Phenylpropanoidextraktion oder DNA-Isolierung) erfolgte in einer Tiefkühltruhe bei -80 °C.

Wegen der Heterogenität des Pflanzenmaterials in den Experimenten zur Primärblatt-Entwicklung des Roggens wurden nur Primärblätter der bei der Ernte ermittelten mittleren Länge \pm Standardabweichung zu den weiteren Analysen verwendet.

Bei 5 und 6 Tage alter Gerste reichte 1 Primärblattstück nicht aus, um genügend DNA daraus zu isolieren. Daher wurden bei der Ernte von Gersten-Primärblättern dieses Alters zur DNA-Analyse jeweils 2 Primärblattstücke zu einer Probe vereinigt. Zunächst wurden sie in der aufsteigenden Reihenfolge ihres Frischgewichtes sortiert. Das jeweils leichteste und schwerste, zweit leichteste und zweitschwerste, etc., Primärblattstück wurden zusammen in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß schockgefroren und bei -80 °C in einer Tiefkühltruhe gelagert.

2.2.2 Extraktion und Analyse der Phenylpropanoide

Im Folgenden wird nur die Prozedur für Roggen ausführlich beschrieben. Die Gersten-Aufarbeitung unterschied sich nur darin, dass für die Extraktion statt 50 % (v/v) Methanol in Wasser 80 % (v/v) Methanol verwendet wurde. Da immer mehrere Proben parallel aufgearbeitet wurden, erfolgten alle Lagerungen zwischen den einzelnen Schritten auf Eis.

Die Standardmethoden unseres Labors zur Extraktion von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäure-Derivaten und der alkalischen Hydrolyse von Hydroxyzimtsäure-Estern aus Rohextrakten und Pellets wurden für 10 - 20 Primärblätter pro Probe entwickelt (SCHMITZ, 1995). Zur Aufarbeitung der Proben aus einzelnen bzw. wenigen Primärblattstücken wurden die Standardmethoden angepasst. Die Anpassung bestand im wesentlichen darin bei gleicher Relation vom Probenfrischgewicht zum Volumen des Extraktionsmittels die Volumina der eingesetzten Lösungen zu verringern und alle Schritte in 1,7 ml Reaktionsgefäßen durchzuführen.

2.2.2.1 Zellaufschluß und Extraktion

In das Reaktionsgefäß mit dem Pflanzenmaterial wurde flüssiger Stickstoff gegeben und mit einem in einen elektrischen Rührer gespannten Pistill pulverisiert, ohne dass die Probe dabei auftaute. Die Extraktion erfolgte unmittelbar anschließend mit 5 µl 50 % (v/v) Methanol in Wasser pro Milligramm Frischgewicht. Allerdings wurden zunächst nur 50, 100 oder 150 µl (bei bis zu 50, 100, 150 mg Frischgewicht) zu der zerkleinerten Pflanzenprobe geben und 1 Minute gemörsert. Die restliche Menge wurde mit einer Pipette am Pistill entlang laufend in das Reaktionsgefäß gegeben, um so noch am Pistill haftendes Pflanzenmaterial abzuspielen. Die Fraktionen wurden gut vermischt (Vortex) und das feste Material des Extraktes 5 min bei 13 000 rpm (20 000 x g) in einer Reaktionsgefäß-Zentrifuge (Biofuge A, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) pelletiert. Der Überstand kam in ein neues, vorgewogenes Reaktionsgefäß und das Pellet wurde noch zweimal mit 50 µl 50 % (v/v) Methanol extrahiert und wie oben zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß mit den vereinigten Überständen wurde erneut gewogen. Die Differenz ist das Gewicht des **Rohextraktes**. Dieser Wert dividiert durch die Dichte von 50 % (v/v) Methanol in Wasser ergab das Extraktvolumen. Die experimentell bestimmte Dichte für 50 % (v/v) Methanol in Wasser beträgt 0,946 g / ml (Gerste: 0,867 g / ml für 80 %).

Durch zusätzliche Spülungen des Pellets und dann vergleichender Analyse über die HPLC wurde die Extraktion überprüft. Wie bei der Standardmethode konnten mehr als 98 % der löslichen Phenylpropanoide extrahiert werden.

2.2.2.2 Hydrolyse löslicher Hydroxyzimtsäure-Derivate

300 µl Rohextrakt wurden mit 150 µl 3 molarer Natronlauge vermischt. Danach erfolgte die Hydrolyse für 1 h bei 80 °C in dem Thermoblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Iowa, USA). Während der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße 2-3mal vorsichtig geöffnet und direkt wieder verschlossen, um einen eventuell entstandenen Überdruck im Reaktionsgefäß

auszugleichen. Das Hydrolyse-Gemisch wurde durch Zugabe von 30 %iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 0 - 1 angesäuert. Damit lagen alle durch die Hydrolyse freigesetzten Hydroxyzimtsäuren protoniert und damit ungeladen vor. Sie wurden dann durch Ausschütteln mit einem Volumen Ethylacetat aus dem Hydrolysat extrahiert. Nach kurzer Zentrifugation (0,5 min bei 13 000 rpm (20 000 x g) in der Reaktionsgefäß-Zentrifuge, s.o.) wurde die Oberphase (Ethylacetatphase) abgenommen und die Unterphase noch zweimal mit einem Volumen Ethylacetat nachextrahiert. Die in einem Reaktionsgefäß vereinigten Oberphasen wurden in einen Vakuumexsikkator gestellt und über Nacht an eine Vakuumpumpe (Membranpumpe MZLC, Fa. Vacuubrand, Wertheim) angeschlossen. Der getrocknete Rückstand wurde in 100 µl destilliertem Methanol aufgenommen. Die so gewonnenen **Hydrolysatextrakte** der Rohextrakte wurden bis zur HPLC-Analyse (höchstens 4 Wochen) bei -27 °C aufbewahrt. In dieser Zeit erfolgte keine messbare Degradation der zu analysierenden Substanzen.

2.2.2.3 Extraktion zellwandgebundener Hydroxyzimtsäuren

Das nach der Extraktion der löslichen Verbindungen verbleibende Pellet wurde in 300 µl 1 molarer Natronlauge 3 h lang bei 80 °C in dem Thermoblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Iowa, USA) inkubiert. Während der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße 3-4mal vorsichtig geöffnet und direkt wieder verschlossen (s.o.). Alle weiteren Schritte erfolgten wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Der getrocknete Rückstand wurde ebenfalls in 100 µl destilliertem Methanol aufgenommen. Die so gewonnenen **Hydrolysatextrakte** der Pellets wurden bis zur HPLC-Analyse (höchstens 4 Wochen) bei -27 °C aufbewahrt. In dieser Zeit erfolgte keine messbare Degradation der zu analysierenden Substanzen.

2.2.2.4 HPLC-Analysen

Die Rohextrakte bzw. Hydrolysatextrakte wurden vor der HPLC-Analyse kurz geschüttelt (Vortex: Paramix II, Fa. Jahnke & Kunkel IKA-Labortechnik KG, Seelbach) und 5 min bei 13 000 rpm (20 000 x g) in der Reaktionsgefäßzentrifuge (s.o.) abzentrifugiert, um eventuelle Schwebeteilchen zu pelletieren. Aliquots des Überstandes kamen in 0,7 ml Reaktionsgefäße, aus denen der Autoinjektor der HPLC-Anlage die Probe zur Analyse entnahm. Die HPLC-Anlage (System LC 10 A, Fa. Shimadzu) ist mit zwei Pumpen, einem Autoinjektor, einer Säule, einem UV-Detektor und einem Integrator ausgestattet. Der UV-Detektor ist ein Photodetektor im Wellenlängenbereich von 190 - 900 nm. Mit diesem ist es auch möglich, während des Durchflusses Spektren aufzunehmen.

Alle durchgeführten chromatographischen Analysen beruhen auf dem "reversed phase" Prinzip. Wird im folgenden von einem exponentiellen Verlauf eines Gradientenabschnittes in einer bestimmten Zeit gesprochen, meint dies den Verlauf der Menge an Laufmittel A in Laufmittel B gemäß der Formel:

$$f(t/T) = \frac{e^{10 \cdot \frac{t}{T} - 1}}{e^{10} - 1}$$

Der Funktionswert ergibt den Anteil des Laufmittels B im Lösungsmittelfluss der HPLC zu einem bestimmten Zeitpunkt t im Zeitraum T des entsprechenden Abschnittes des Gradienten.

Das Spritzvolumen ist das injizierte Volumen der zu analysierenden Probe.

2.2.2.4.1 Gradienten

Gradient 1 zur Trennung der Flavonoide aus Rohextrakten von Roggen-Primärblättern (nach REUBER, 1996):

- Säule: Vertex-Säule 125 x 4 mm
- Trennmaterial: Nucleosil 100-5 C8
- Laufmittel:
 - A: 6 % MeOH und 10 % THF in 1 % aq. H₃PO₄
 - B: 16 % MeOH und 18 % THF in 1 % aq. H₃PO₄
- Gradient:

Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A	Gradienten- verlauf	Zweck
0 - 15	0 % - 100 %	linear	Trennung
15 - 16	100 % - 0 %	linear	Spülung
16 - 21	0 %	konstant	Äquilibrierung

- Flussgeschwindigkeit: 1 ml / min
- Detektionswellenlänge: 340 nm
- Spritzvolumen: 10 µl

Gradient 2 zur Trennung der Flavonoide und der Hydroxymizsäure-Derivate aus Rohextrakten von Roggen-Primärblättern (neu entwickelt, diese Arbeit):

- Säule: Vertex-Säule 125 x 4 mm
- Trennmaterial: Nucleosil 100-5 C18
- Laufmittel:
 - A: 1 % aq. H₃PO₄
 - B: Acetonitril

➤ Gradient:

Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A	Gradienten- verlauf	Zweck
0 - 28	5 % - 7 %	exponentiell	Trennung
28 - 32	7 % - 15 %	exponentiell	
32 - 54	15 %	konstant	
54 - 60	15 % - 30 %	linear	Spülung
60 - 61	30 % - 100 %	linear	
61 - 62	100 % - 5 %	linear	
62 - 65	5 %	konstant	Äquilibrierung

- Flussgeschwindigkeit: 1 ml / min
- Detektionswellenlänge: 315 nm
- Spritzvolumen: 10 µl

Gradient 3 zur Trennung der Flavonoide **und** der Hydroxyzimtsäure-Derivate aus Rohextrakten von Gersten-Primärblättern (neu entwickelt, diese Arbeit):

- Säule: Vertex-Säule 125 x 4 mm
- Trennmaterial: Nucleosil 100-5 C18
- Laufmittel:
 - A: 1 % aq. H₃PO₄
 - B: Acetonitril
- Gradient:

Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A	Gradienten- verlauf	Zweck
0 - 16	10 % - 14 %	linear	Trennung
16 - 26	14 %	konstant	
26 - 41	14 % - 22 %	linear	
41 - 42	22 % - 100 %	linear	Spülung
42 - 43	100 % - 10 %	linear	
43 - 48	10 %	konstant	
			Äquilibrierung

- Flussgeschwindigkeit: 1 ml / min
- Detektionswellenlänge: 315 nm
- Spritzvolumen: 10 µl

Gradient 4 zur Trennung freier Hydroxyzimtsäuren aus Hydrolysatextrakten von Rohextrakten oder Pellets (Roggen und Gerste; nach SCHMITZ, 1995):

- Säule: Vertex-Säule 125 x 4 mm
- Trennmateriale: Nucleosil 100-5 C18
- Laufmittel: A: 1 % aq. H₃PO₄
B: Methanol
- Gradient:

Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A	Gradienten- verlauf	Zweck
0 - 23	25 %	konstant	Trennung
23 - 24	25 % - 100 %	linear	Spülung
24 - 27	100%	konstant	
27 - 28	100 % - 25 %	linear	
28 - 33	25 %	konstant	Äquilibrierung

- Flussgeschwindigkeit: 1 ml / min
- Detektionswellenlänge: 300 nm
- Spritzvolumen: 5 - 15 µl

Qualitativ typische Chromatogramme der Gradienten 1 und 4 sind in Abbildung 2.9 (S. 47) wiedergegeben. Einige Peaks sind dort größer als der maximale Schreiberausschlag des Integrators und daher nicht "spitz". Dies beeinflusste die Integration jedoch nicht. Das Chromatogramm zu Gradient 4 stammte von einem Hydrolysatextrakt eines Pellets aus einem Roggen-Primärblatt. Chromatogramme von Hydrolysatextrakten aus Rohextrakten entsprachen dem abgebildeten, dies galt auch für die Hydrolysatextrakte aus Gersten-Primärblättern. Beispiel-Chromatogramme für die Gradienten 2 und 3 werden bei den Ergebnissen vorgestellt.

2.2.2.4.2 Berechnung der Stoffmengen

Der Integrator gibt das Integral der Signaländerungen des Detektors von einem Peak (die "Peakfläche") in dimensionslosen Einheiten ("area") an, welche proportional zu der jeweils detektierten Stoffmenge ist. Die Eichfaktoren (Tabelle 2.4, S. 48) für die ermittelten "areas" wurden über die HPLC-Analyse von Referenzsubstanzlösungen bekannter Konzentrationen bestimmt. Als käufliche Referenzsubstanzen dienten *trans-p*-Cumarsäure, *trans*-Ferulasäure

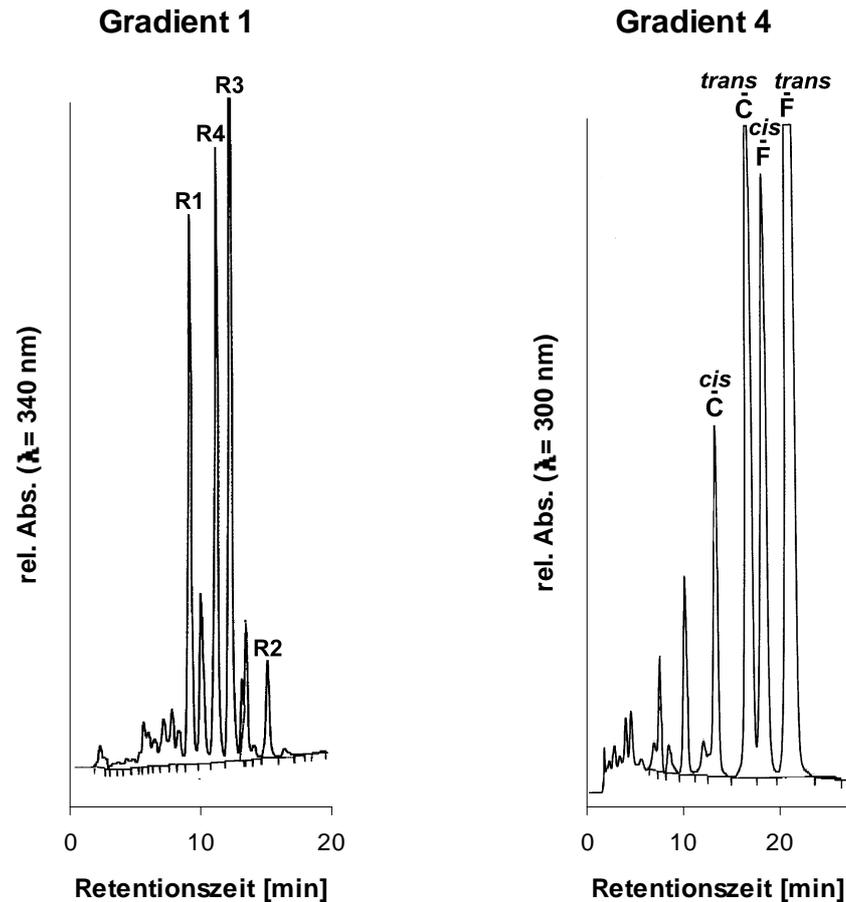


Abbildung 2.9: Charakteristische Chromatogramme zu den Gradienten 1 und 4.

Das Chromatogramm zu Gradient 1 stammte von einem Rohextrakt aus einem 5 Tage alten unter WL+UV angezogenen Roggen-Primärblatt, beschriftet sind die den Roggen-Flavonen **R₁ - R₄** (s. Abbildung 1.8) entsprechenden Peaks. Das Chromatogramm zu Gradient 4 stammt von einem Hydrolysatextrakt eines Pellets von einem 6 Tage alten unter WL+UV angezogenen Roggen-Primärblatt, beschriftet sind die *cis/trans*-Isomere der Hydroxyzimtsäuren *p*-Cumarsäure (**C**) und Ferulasäure (**F**). Die Linien unter den Chromatogrammen sind die Basislinien der Signal-Integration, die Marker zeigen die Integrationsgrenzen an (s.a. nächster Abschnitt).

und das Flavon Saponarin. Die Eichfaktoren für die Roggenflavone **R₁ - R₄** und das Gerstenflavon Lutonarin wurden mit in unserem Labor gereinigten Substanzen bestimmt. Für die Flavonoide wurden die molaren Extinktionskoeffizienten der Aglyka (Weast, 1974) zur photometrischen Bestimmung der Konzentration der Lösungen verwendet ($\epsilon_{\text{Luteolin, 355 nm}} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Apigenin, 340 nm}} = 20800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Aus Weast (1974) stammten auch die molaren Extinktionskoeffizienten der Hydroxyzimtsäuren ($\epsilon_{\text{trans-}p\text{-Cumars.}, 310 \text{ nm}} = 22900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{trans-Ferulas.}, 322 \text{ nm}} = 16600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Gradient 1					
R1	R2	R3	R4		
2,01	2,75	1,77	1,73		
Gradient 2					
R1	R2	R3	R4	<i>p</i> -Cumarsäure	Ferulasäure
2,65	4,67	2,21	2,37	1,61	1,99
Gradient 3					
Saponarin		Lutonarin		<i>p</i> -Cumarsäure	Ferulasäure
3,05		2,39		1,89	1,78
Gradient 4					
<i>p</i> -Cumarsäure		Ferulasäure			
<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -		
1,55	3,03	2,49	3,86		

Tabelle 2.4: HPLC-Eichfaktoren für die Phenylpropanoide.

Die Eichfaktoren sind angegeben in $\text{nmol} / 10^6 \text{ area}$. Die Eichfaktoren wurden durch die Analyse von Lösungen der Substanzen bekannter Konzentration bestimmt. Saponarin, *trans-p*-Cumarsäure und *trans*-Ferulasäure sind käufliche Substanzen. R₁ - R₄ und Lutonarin sind in unserem Labor gereinigt worden. Die *cis*-Formen der Hydroxyzimtsäuren entstehen durch UV-Bestrahlung. Die Eichfaktoren dieser Isomere wurden durch Analyse der Lösung bekannter Konzentration der *trans*-Isomeren vor und nach einer UV-Bestrahlung bestimmt (s.a. Text).

Die *cis*-Isomere der Hydroxyzimtsäuren sind nicht käuflich zu erwerben. Sie wurden daher bei Bedarf selbst hergestellt. Durch UV-Strahlung kommt es zu einer Isomerisierung der Verbindungen von der *trans*- in die *cis*-Form, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat (Kahnt, 1967). Dazu wurde eine Lösung des *trans*-Isomers in einer Quarzküvette 30 min mit einer Universal UV-Lampe (354 nm, Typ TL-900, Fa. Camag, Berlin) bestrahlt. In allen Fällen tauchte nach der Bestrahlung im HPLC-Chromatogramm (Hydroxyzimtsäure-Gradient) ein zweiter Peak mit kürzerer Retentionszeit auf, der das *cis*-Isomer darstellte. Zur Ermittlung der Eichfaktoren für die *cis*-Isomeren wurde eine Lösung bekannter Konzentration der *trans*-Form vor und nach einer halbstündigen Bestrahlung mit der Universal UV-Lampe in der HPLC analysiert. Die Differenz der Menge an der *trans*-Form zwischen der unbestrahlten und bestrahlten Lösung stellte die Menge der *cis*-Form in der bestrahlten Lösung dar.

Die Peakflächen der einzelnen Substanzen bei den Gradienten 2 und 3 (Detektionswellenlänge 315 nm) stellten ein Maß für die UV-B-Absorptionskapazität der einzelnen Substanzen dar. Das Emissionsmaximum der UV-B-Röhren lag bei 312 nm (s. Abbildung 2.3). Die UV-B-Absorptionskapazität wurde auf das Frischgewicht bezogen (Peakfläche pro mg Frischgewicht) und dann in relativen Einheiten dargestellt (s. Ergebnisse).

Der über die Gradienten 1 und 4 (Detektionswellenlänge 340 nm bzw. 300 nm) bestimmte Gehalt (in nmol) an Flavonen und Hydroxyzimtsäuren (Versuche an 5 Tage altem Roggen) wurde durch den substanzspezifischen Eichfaktor des Gradienten 2 (in nmol / 10⁶ area) dividiert, um die Peakfläche bei 315 nm zu erhalten und damit die UV-B-Absorptionskapazität berechnen zu können.

2.2.2.4.3 Identifikation der Phenylpropanoide

Für die etablierten Gradienten (Roggen-Flavonoid-Gradient und Hydroxyzimtsäure-Gradient) wurde durch Cochromatographie mit den Referenzsubstanzen die Identifikation der Peaks als die entsprechenden Substanzen bestätigt.

Die Zuordnung der Flavonoid-Peaks in den Chromatogrammen der neu entwickelten Gradienten erfolgte ebenfalls durch Cochromatographie mit Referenzen. Zusätzlich wurden während des HPLC-Laufs UV-Absorptionsspektren der eluierenden Substanzen aufgenommen. Durch Umschalten eines 4-Wege-Ventils zwischen Trennsäule und Detektor bleibt in der Messküvette des Detektors das gerade befindliche Eluat stehen, von der ein Spektrum aufgenommen werden kann. Das Eluat der während dieser Zeit weiterlaufenden Chromatographie wird am Detektor vorbeigeleitet. Durch Rückstellung des Ventils fließt die Elution wieder durch den Detektor. Auf diese Weise kann man ca. alle 1 bis 2 Minuten Spektren aufnehmen. Es wurden UV-Spektren im Bereich von 230 - 370 nm (in 1 nm Schritten) aufgenommen. Zur Identifikation eines "Peaks" wurde in seinem Maximum auf die oben beschriebene Weise ein Spektrum aufgenommen. Zum Vergleich wurden mit derselben Methode Spektren der Referenzsubstanzen aufgenommen.

2.2.3 Nachweis von Thymin-Dimeren

2.2.3.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung basierte auf einer Methode nach ROGERS UND BENDICH (1994). Die Blattstück-Probe wurde in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Bevor das Pulver auftaute, wurde pro mg Frischgewicht ca. 2,5 µl 60 °C warmer CTAB-Puffer (2 % CTAB, 2 % PVP-40, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8 in Wasser) zugegeben. Nach weiterer Zugabe von 10 µl RNase-Lösung (10 mg / ml RNase A, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,4 in Wasser) erfolgte die Inkubation 30 min bei 60 °C in einem Thermoblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Iowa, USA). Das Extraktionsgemisch wurde alle 10 min kurz geschüttelt. Danach wurde mit

1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch 24:1 ausgeschüttelt und 5 min in einer Reaktionsgefäß-Zentrifuge bei 20 000 x g zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 1/5 Volumen 5 % CTAB (5 % CTAB, 0,7 M NaCl in Wasser) versetzt und wieder mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch 24:1 ausgeschüttelt und 5 min wie oben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Der so erhaltene Überstand wurde ohne Zugabe von 5 % CTAB mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch 24:1 ausgeschüttelt und wieder zentrifugiert. Der letzte Überstand enthielt die gereinigte DNA, welche mit 2/3 Volumen Isopropanol (-27 °C kalt) in einem Gefrierschrank bei -27 °C für 10 min gefällt wurde. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation über 5 min bei 20 000 x g. Das DNA-Pellet wurde hintereinander mit 1 ml Waschlösung (10 mM Ammoniumacetat, 76 % Ethanol in Wasser) und 1 ml Ethanol gespült. Die Aufnahme der DNA erfolgte in 200 µl PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ pH 7,4 in Wasser).

Konzentration und Reinheit der DNA-Lösungen wurden photometrisch bestimmt. Es wurden die Extinktionen bei 280 (Protein-Maximum), 260 (DNA-Maximum) und 230 nm (Kohlenhydrat-Absorption) gemessen (E_{280} , E_{260} , E_{230}). Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml. Die Roggen-DNA-Lösungen hatten ein E_{260} / E_{280} - Verhältnis von über 1,8 und ein E_{260} / E_{230} - Verhältnis von über 2,1, Gersten-DNA-Lösungen eines von über 1,9 und 2,1.

Im Original-Protokoll von ROGERS UND BENDICH (1994) zur DNA-Isolierung erfolgte der Verdau der RNA durch RNase nicht im Extraktionsansatz, sondern erst durch Zugabe von RNase zur gereinigten Nukleinsäure-Lösung. Da RNasen sehr stabile Enzyme sind und einen hohen Toleranzbereich bezüglich der Reaktionsbedingungen besitzen, wurde in dieser Arbeit der Zusatz der RNase direkt zum Extraktionspuffer etabliert. Zur Überprüfung des Verdau der RNA wurden je zwei DNA-Isolierungen aus Blattstück-Proben von unter WL+UV angezogenem Roggen (Alter 5d) und Gerste (Alter 6d, *Ca* und *ant*) durchgeführt. Eine DNA-Isolierung je einer Sorte erfolgte mit RNase A im Extraktionsansatz, die andere DNA-Isolierung ohne RNase A im Ansatz. Mit den erhaltenen DNA-Lösungen wurde eine Gelelektrophorese auf einem Agarose-Gel (1 % Agarose, 40 mM Tris-Acetat pH 8, 1 mM EDTA in Wasser, 1 µl Ethidium-Bromid pro Gel) durchgeführt. Dafür wurden zu 4 - 5 µg DNA in 30 µl Wasser 3 µl Auftragspuffer (50% Glycerin, 75 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau) gegeben. Das Gemisch wurde auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer (40 mM Tris-Acetat pH 8, 1 mM EDTA in Wasser) zunächst für 20 min

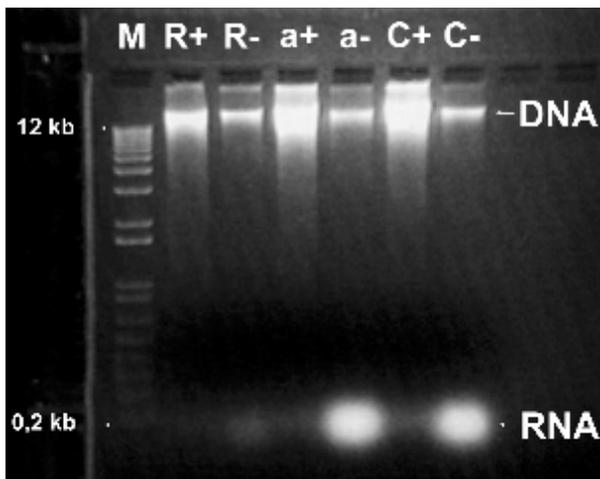


Abbildung 2.10: Überprüfung des RNA-Verbaus.

Aufgetragene DNA-Lösungen: DNA-Längenmarker von 0,2 bis 12 kb (**M**); DNA aus Roggen *Sorom* mit RNase (**R+**) im Extraktionsansatz und ohne RNase (**R-**); DNA aus Gerste *ant* mit RNase (**a+**) im Extraktionsansatz und ohne RNase (**a-**); DNA aus Gerste *Ca* mit RNase (**C+**) im Extraktionsansatz und ohne RNase (**C-**);

bei 50 mA und danach für 1,5 h bei 80 mA. Das Gel ist in Abbildung 2.10 dargestellt. In den Spuren der DNA-Lösungen ohne RNase A im Extraktionsansatz (**R-**, **a-**, **C-**) sind auf der Höhe der 0,2 kb-Bande (Längenbereich der RNA) des Markers (**M**) deutliche helle Flecken zusehen, die in den anderen Spuren (**R+**, **a+**, **C+**, alle mit RNase A im Extraktionsansatz) nicht vorhanden sind. Demzufolge wird also durch Zugabe der RNase A zum Extraktionsansatz die RNA abgebaut. Weiterhin zeigt das Gel, dass die gereinigte DNA eine Länge von weit über 12 kb (oberste Bande des Markers) aufweist.

2.2.3.2 ELISA zur Messung der Thymin-Dimer-Menge in DNA

Die Methode zur Messung der Thymin-Dimer-Menge in der DNA wurde in vorliegender Dissertation ausgehend von einem bei Dr. Günther Buchholz, damals Universität Freiburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wellmann, erlernten ELISA-Test entwickelt. Die Methoden-Entwicklung und -Optimierung wird in Kapitel 3.1 ausführlich dargestellt. Hier wird die optimierte und später angewandte Methode beschrieben.

Für den ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wurden sterile Zellkulturplatten (Fa. TPP, Schweiz) mit 96 flachbodigen Kavitäten verwendet. Die Kavitäten der ersten Spalte und der ersten Reihe einer Platte wurden nicht für den ELISA genutzt, da hier die Signale bei gleichen Proben oft höher waren als in den weiter innen liegenden Kavitäten. Pro Kavität wurde 500 ng DNA der Proben in 50 μ l PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ pH 7.4 in Wasser) eingefüllt. Nach jedem im folgenden aufgelisteten Inkubationsschritt wurden die Kavitäten fünfmal mit T-PBS (0.05 % Tween 20 in PBS) gewaschen und auf einem saugfähigen Papier ausgeklopft.

Inkubationsschritte:

- 1) 1 h bei 100 °C in einem Trockenschrank (Typ T6030 Fa. Heraeus, Hanau), ohne Deckel;
- 2) 200 µl 1 %iger Magermilchpulver-Lösung in PBS pro Kavität, mit Deckel, 1 h bei 37 °C (Trockenschrank Typ B6200, Fa. Heraeus, Hanau);
- 3) 50 µl einer 1:1000-Verdünnung des 1. Antikörpers (Antikörper gegen Thymin-Dimere aus Maus), mit Deckel, 30 min bei 37 °C;
- 4) 50 µl einer 1:1000-Verdünnung des 2. Antikörpers (biotin-konjugierten Antikörper gegen Mausantikörper aus Ziege), mit Deckel, 30 min bei 37 °C;
- 5) 50 µl einer 1:500-Verdünnung des Streptavidins (Extravidin®-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat), mit Deckel, 30 min bei 37 °C.

Nach dem letzten Inkubationsschritt erfolgten zusätzlich zu den Waschungen mit T-PBS noch 2 Waschungen mit einem Citrat-Phosphat-Puffer (50 mM Na_2HPO_4 , 24 mM Citronensäure, pH 5 in Wasser). Dann wurde mit 100 µl einer OPD- H_2O_2 -Lösung (0,04 % (w/v) *o*-Phenylendiamin, 0,007 % (v/v) H_2O_2 in Citrat-Phosphat-Puffer; H_2O_2 immer erst kurz vor der Reaktion zugegeben) pro Kavität die Farbreaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37 °C. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 2 molarer, wässriger H_2SO_4 pro Kavität abgestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 492 nm in einem ELISA-Reader (SpektraFluor Plus, Fa. Tecan, Salzburg, Österreich).

Folgende Kontroll-Lösungen wurden auf jeder Platte zur Überprüfung des ELISA eingesetzt: jeweils 50 µl PBS-Lösung in 2 od. 3 Kavitäten (**PBS**), jeweils 50 µl PBS-Lösung mit 500 ng unbestrahlter DNA in 6 Kavitäten (**Nullprobe**) und jeweils 50 µl PBS-Lösung mit 100 ng bestrahlter DNA in 2 od. 3 Kavitäten (**Kontrollprobe**). Zur Herstellung der DNA-haltigen Kontroll-Lösungen wurde zunächst aus etiolierten Roggenkeimlingen (*Sorom*) DNA isoliert, da diese keinerlei Thymin-Dimere enthalten kann. Ein Teil hiervon wurde unmittelbar als Nullprobe eingesetzt. Ein anderer Teil wurde als Lösung in PBS 30 Minuten lang unter BAP-Bedingungen in dem Pflanzenanzuchtschrank in Pflanzenhöhe bestrahlt. Diese Lösung diente als Lösung mit bestrahlter DNA.

2.2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie zur Lokalisation der Flavone in Roggen- und Gersten-Primärblättern wurde an dem konventionellen Mikroskop DM RB mit Epifluoreszenz-Einrichtung (Fa. Leitz, Wetzlar) durchgeführt. Dafür wurde von 6 Tage alten Roggen- bzw.

Gersten-Primärblättern Quer-, Längs- und Flächenschnitte von den oberen 2 cm des Blattes angefertigt. Die frischen Handschnitte (Rasierklinge) wurden sofort in einen Tropfen Puffer (100 mM K_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 5,8, 1 mM $CaCl_2$) auf einen Objektträger übertragen. Bei Roggen war dem Puffer 0,5 M Sorbitol zur Plasmolyse zugesetzt, damit besser zwischen Apo- und Symplasten unterschieden werden konnte (SCHMITZ, 1995). Sie wurden mit einem Deckgläschen versehen und in dem Mikroskop im Durchlicht kontrolliert.

Für die Autofluoreszenz-Aufnahmen wurden die Schnitte in dem Puffer belassen. Vor der Analyse der Sekundärfluoreszenz wurden mehrere Tropfen Puffer (bei Roggen wieder mit 0,5 M Sorbitol) mit 0,1 % (w/v) Naturstoffreagenz A (Diphenyl-borsäure-2-amino-ethylester) unter das Deckgläschen durch die Schnitte gezogen.

Auto- und Sekundärfluoreszenz-Aufnahmen erfolgten mit der gleichen Filter-Kombination (Anregung: Bandpassfilter 340 - 380 nm, Teilerspiegel: RKP 400 nm, Emission: Langpassfilter 425 nm). Die Photographien wurden auf Kodak Ektachrom EPL 135 Film (400 ASA) mit einer Olympus OM-4 Kamera aufgenommen. Die Diapositive wurden digitalisiert und mittels der Bildverarbeitungsprogramme Adobe Photoshop (Adobe, USA) und iPhoto Plus (Ulead Systems GmbH, Braunschweig) für den Ausdruck vorbereitet. Dabei wurde auf eine möglichst getreue Farbwiedergabe geachtet.

Die Aufnahmen der Flächenschnitte der abaxialen Epidermis des Roggens erfolgte mit einem Laser-Scanning Mikroskop mit konfokaler Technik (Zeiss Axiovert 100, Fa. Zeiss, Oberkochen). Die Anregung erfolgte bei 364 nm. Das Fluoreszenzsignal wurde simultan in drei Kanälen detektiert. Die drei Kanäle wurden den primären Bildschirmfarben zugeordnet: blau: Bandpassfilter 400 - 430 nm, grün: Bandpassfilter 515 - 565 nm, rot: Langpassfilter 590 nm. (Zur weiteren Methodik s. HUTZLER ET AL., 1998.)

2.2.5 Statistik

Alle Signifikanz-Tests (STUDENTS t-Test) wurden mit SPSS 6.1.3 (Fa. SPSS Inc., USA) durchgeführt. In der Arbeit werden zur besseren Übersicht nur drei Signifikanz-Niveaus mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten angegeben: $p \leq 5\%$ (*), $p \leq 1\%$ (**) und $p \leq 0,5\%$ (***). Hier sei darauf hingewiesen, dass die mit *** markierten Werte oft eine wesentlich geringere Irrtumswahrscheinlichkeit als 0,5 % aufwiesen.

3 ERGEBNISSE

Zunächst werden die Ergebnisse der für diese Arbeit wichtigen methodischen Entwicklungen dargestellt. Darauf folgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen an Roggen und Gerste getrennt vorgestellt.

3.1 Die Nachweismethode von Thymin-Dimeren

Zur Beurteilung der Schutzfunktion von Phenylpropanoiden, insbesondere Flavonoiden, hinsichtlich schädigender UV-Strahlung ist es wichtig, geeignete UV-Stressparameter zu messen. Hier bietet sich die Analyse von DNA-Photoprodukten an, die unmittelbar durch Absorption von Photonen entstehen und damit Primärschäden darstellen (wie CPD, 6-4PP, etc., vgl. Abbildung 1.3). Sie entstehen hauptsächlich durch den UV-B-Anteil der Strahlung (vgl. Abbildung 1.5).

Für die Erfassung von DNA-Photoprodukten findet man in der Literatur eine Reihe von Methoden. Sie lassen sich in vier Typen der Detektion des Schadens zusammenfassen:

- Totalhydrolyse der DNA und Detektion der Photoprodukte mit HPLC (z. B. DOUKI ET AL., 1995);
- quantitative Polymerase-Kettenreaktion (QPCR; die taq-Polymerase liest eine Matrize mit DNA-Photoprodukten nicht vollständig ab, z.B. CANNON ET AL., 1995);
- UV-Endonukleasen (sie erkennen Cyclobutan-Dimere und schneiden dann die DNA; z.B. QUAITE ET AL., 1994; vgl. 1.1.3.1 Abschnitt BER);
- Antikörper gegen die verschiedenen DNA-Photoprodukte.

Eine Analyse mittels der HPLC erfasst zwar alle möglichen Photoprodukte, doch benötigt man große Mengen an DNA (und damit Pflanzenmaterial). Desweiteren sind Detektion und Identifizierung der aufgetrennten Substanzen mit einem hohen Aufwand verbunden. Die QPCR erkennt zwar viele verschiedene Photoprodukte, erlaubt aber nicht die Diskriminierung zwischen verschiedenen Schäden. Es werden daher auch DNA-Schäden mitgemessen, die nicht durch UV verursacht wurden. Im Falle der UV-Endonukleasen sind nur solche bekannt und nutzbar, die Cyclobutan-Dimere erkennen. Antikörper hingegen gibt es mittlerweile gegen verschiedene DNA-Photoprodukte (Cyclobutan-Dimere, 6-4-Photoprodukte und deren Dewar-Isomere). Antikörper haben zusätzlich den Vorteil, dass sie auch zu weiteren Analysen, wie immunohistochemischen Untersuchungen, verwendet werden können.

Es gibt zwei verschiedene, für Pflanzenmaterial etablierte Tests, die Antikörper verwenden. Hierbei handelt es sich um einen Radioimmuno-Assay (RIA, BUCHHOLZ ET AL., 1995) und einen ELISA (MORI ET AL., 1991). Der RIA erlaubt eine genaue quantitative Aussage über die Menge an Photoprodukten, hat aber den Nachteil, dass man für ihn eine größere Menge an radioaktiven Photoprodukten benötigt, die nur recht aufwendig herzustellen sind. Der ELISA hingegen ist einfach zu handhaben und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz. Allerdings ermöglicht er nur Aussagen über relative Mengen an Photoprodukten. Geeignete Kontrollen und unmittelbare Vergleichsmessungen von Proben führen zu aussagekräftigen Ergebnissen, wie dies in der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

Ausgangspunkt der hier vorgenommenen Methodenetablierung und -optimierung war der nach MORI ET AL. (1991) veränderte ELISA von Dr. G. Buchholz von der Arbeitsgruppe Prof. E. Wellmann, Freiburg, mit dem Thymin-Dimere nachgewiesen werden. Thymin-Dimere sind die häufigsten DNA-Photoprodukte (DAVIES, 1995). Während eines Arbeitsaufenthaltes in Freiburg wies mich Dr. Buchholz in diese Methode ein. Folgende Inkubationsschritte wurden bei diesem ELISA, der im weiteren **2-Schritt-ELISA** genannt wird, durchgeführt (PBS: phosphate buffered saline; 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ pH 7,4 in Wasser):

1. Durch Erhitzen der Zellkulturplatten mit den DNA-Lösungen (50 bis 100 ng DNA in 50 µl PBS) 100 °C (1 h) denaturiert die DNA und bindet an die Adsorptionsfläche der Kavitäten während das Lösungsmittel Wasser verdampft. Die Zellkulturplatten bleiben bis ca. 105 °C stabil, bei höheren Temperaturen verformen sie sich.
2. Blockierung der noch freien Bindungsstellen der Kavitäten mit 0,5 %iger BSA-Lösung (Rinderserumalbumin in PBS; 200 µl / Kavität; 1 h bei 37 °C).
3. Erkennung der Thymin-Dimere mit dem primären Antikörper (Antikörper gegen Thymin-Dimer aus Maus, 1:1000 Verdünnung in PBS, 50 µl / Kavität, 0,5 h bei 37 °C).
4. Bindung eines sekundären Antikörpers (Antikörper gegen Mausantikörper aus Kaninchen, 1:2000 Verdünnung in PBS, 50 µl / Kavität, 0,5 h bei 37 °C) an den primären. Der sekundäre Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert.
5. Peroxidase-katalysierte Farbreaktion von *o*-Phenylendiamin (0,04 % (w/v)) und Wasserstoffperoxid (0,007 % (v/v)) in Citrat-Phosphat-Puffer (s.u.; 100 µl / Kavität, 15 Minuten bei 37 °C). Die Reaktion wurde mit Schwefelsäure (2 molar in Wasser, 50 µl / Kavität) abgestoppt.

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Kavitäten dreimal mit T-PBS (0,05 % Tween-20 in PBS) und zweimal mit PBS gespült. Zusätzlich vor der Farbreaktion

wurde zweimal mit einem Citrat-Phosphat-Puffer pH 5 (50 mM Na_2HPO_4 , 24 mM Citronensäure in Wasser) gespült. Die Farbreaktion lief in dem Citrat-Phosphat-Puffer ab. Die Messung der optischen Dichte der Farblösung in den Kavitäten erfolgte bei 492 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

Als primären Antikörper hatte Dr. Buchholz den Antikörper TDM-1 gegen Thymin-Dimere verwendet, der ihm von T. Mizuno (Charakterisierung des Antikörpers in MIZUNO ET AL., 1991) zur Verfügung gestellt worden war. Es gab auch einen käuflichen Antikörper gegen Thymin-Dimere, der nach Aussage von Dr. Buchholz in ersten Tests gute Ergebnisse geliefert hatte. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich dieser käufliche Antikörper aus der Maus von Kamiya Biomedical Company (Seattle, USA) verwendet. Nach Hersteller-Angaben bindet dieser Antikörper spezifisch an Thymin-Dimere.

3.1.1 Optimierung des Absorptionshintergrundes

Ein Problem der oben beschriebenen Methode war anfangs ein hoher Absorptionshintergrund bei der Messwellenlänge 492 nm, also eine starke Farbreaktion in Kavitäten mit Proben ohne Antigen (z.B. unbestrahlte DNA oder eine Lösung ohne jegliche DNA). Daher wurde diese Methode im Rahmen der vorliegenden Dissertation weiter optimiert. Hierfür wurde aus Primärblättern etiolierter Roggenkeimlinge DNA extrahiert. Diese wurde, in PBS gelöst, 6 h lang unter der Bestrahlungsbedingung BAP in der Anzuchtammer in Pflanzenhöhe bestrahlt. Jeweils ein Aliquot wurde vorher (0 h) und nach 0,5, 1, 2, 4, 6 h Bestrahlung abgenommen. Diese **Standard-DNA-Lösungen** wurden zur Optimierung des Testes eingesetzt.

Zunächst erfolgte eine Optimierung der **Waschungen** der Kavitäten zwischen den Inkubationsschritten. Hierzu wurden auf zwei verschiedenen ELISA-Platten jeweils 4 Parallelen zu je 100 ng der Standard-DNA-Lösungen (0, 0,5, 1, 2, 4, 6 h Bestrahlung) und 4 Parallelen PBS ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Die Platten wurden nach dem 2-Schritt-ELISA behandelt, jedoch wurde eine Platte statt mit 3 x T-PBS und 2 x PBS mit 5 x T-PBS zwischen den Inkubationen gespült. Die Waschungen mit 5 x T-PBS führten zu einer Verringerung des Hintergrundes um die Hälfte (Vergleich der 0 h - Werte in Abbildung 3.1 A, S. 57). Die Signalstärke wird dabei mehr als verdoppelt (Vergleich der Steigungen der linearen Regressionen). Falls nicht anders erwähnt, erfolgten bei den folgenden ELISAs die Waschungen mit 5 x T-PBS.

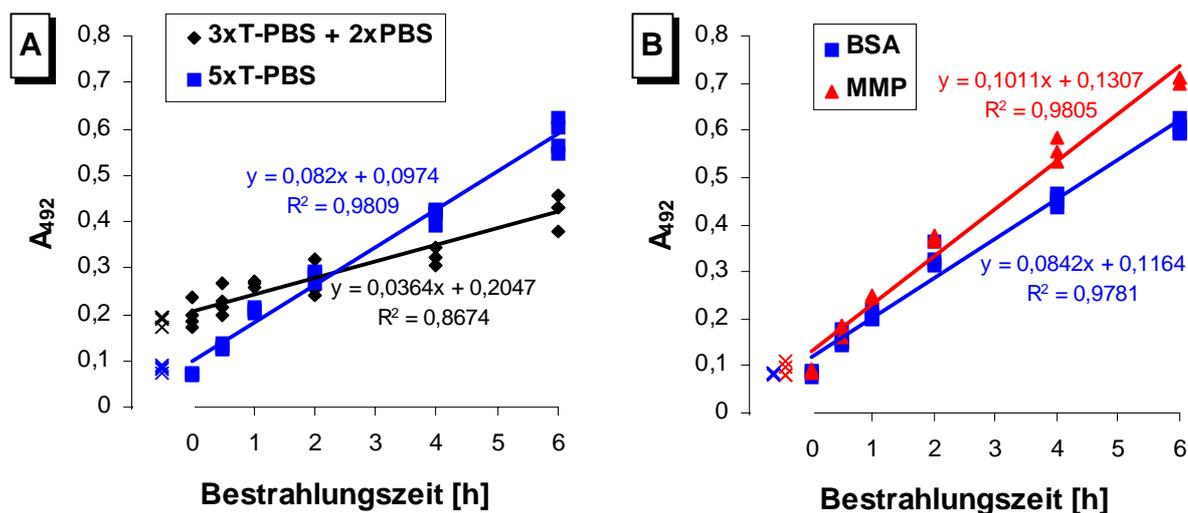


Abbildung 3.1: Optimierung der Waschungen und der Blockung des 2-Schritt-ELISAs.

Aufgetragen wurden pro Messreihe 4 Parallelen mit je 100 ng der Standard-DNA-Lösungen 0, 0,5, 1, 2, 4 und 6 h bestrahlt. Zur Kontrolle wurden bei allen Ansätzen 4 Parallelen mit reiner PBS-Lösung ohne DNA mitgemessen (Punkte x vor den 0 h - Messwerten). Die Inkubation erfolgte nach dem 2-Schritt-ELISA. Jeweils 4 unbehandelte Kavitäten jeder Platte wurden bei der Farbreaktion als Blindwerte mit inkubiert. In allen Fällen lagen die Absorptionen dieser Kavitäten zwischen 0,045 und 0,051. Alle Messwerte sind als Absorption bei 492 nm (A_{492}) der jeweils 4 Parallelen dargestellt. Die Geraden stellen die lineare Regression der Messwerte dar. Die zugehörigen Geradengleichungen und Quadrate der Korrelationskoeffizienten (R^2) sind angegeben.

A: Vergleich unterschiedlicher Waschungen. Die beiden Messreihen wurden auf getrennten ELISA-Platten durchgeführt. Die 0 h - Werte liegen im Bereich der PBS - Kontrollen (x).

B: Vergleich von BSA und MMP als Blockreagenzien. Beide Messreihen wurden auf der gleichen ELISA-Platte durchgeführt. Die 0 h - Werte liegen im Bereich der PBS - Kontrollen (x).

Als weiteres wurde Magermilchpulver (MMP, Fa. Heirler, Radolfzell) zum Blocken der noch freien Bindungsstellen nach Bindung der DNA getestet. Zwei Messreihen wurden wie oben beschrieben mit den Standard-DNA-Lösungen auf einer ELISA-Platte durchgeführt (je 4 Parallelen mit je 100 ng DNA). Eine davon wurde nach der oben beschriebenen Methode mit BSA (0,5 % in PBS) geblockt, die andere mit einer MMP-Lösung (1 % in PBS). Bei gleichem Hintergrund erhöhte sich die Signalstärke um 20 % (Vergleich der Steigungen der Geraden in Abbildung 3.1 B). Eine weitere Erhöhung der Konzentration der Blockreagenzien (MMP wie auch BSA) ergab keine Verbesserung bezüglich Signalstärke und Hintergrund.

3.1.2 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit des Tests

Nach ersten Tests mit DNA aus UV-bestrahlten Primärblättern (5 Tage alter Roggen unter WL-Bedingungen angezogen und 6 h unter B-Bedingungen (nur UV-B) bestrahlt) zeigte sich jedoch, dass die resultierenden Signalstärken zu gering waren, um unterschiedlich bestrahlte Proben eindeutig voneinander unterscheiden zu können. Eine übliche Methode in ELISA-

Tests zur Verstärkung des Signals ist die Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems. Hierbei sind an den sekundären Antikörper statt eines Enzyms mehrere Moleküle Biotin gekoppelt. Nun folgt eine Inkubation mit Streptavidin, einem spezifisch Biotin-bindenden Protein. Streptavidin kann genauso mit Enzymen wie der Meerrettich-Peroxidase konjugiert werden. Durch die Verwendung dieses Systems sind letztendlich pro Antigen mehr Peroxidase-Enzymmoleküle gebunden als mit der direkten Methode der Kopplung des Enzyms an den sekundären Antikörper. Diese Methode verwendeten auch MORI ET AL. (1991) zum Nachweis von Thymin-Dimeren.

Dementsprechend wurde nun der ELISA verändert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Biotin-gekoppelter Antikörper gegen Mausantikörper aus Ziege (1 : 1000 Verdünnung in PBS, 50 μ l / Kavität, 0,5 h bei 37 °C) verwendet. Nach der Inkubation mit diesem sekundären Antikörper erfolgte eine Inkubation mit einem Extravidin®-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Extravidin ist eine Weiterentwicklung von Streptavidin der Fa. Sigma, Saint Louis, USA; 1 : 500 Verdünnung in PBS, 50 μ l / Kavität, 0,5 h bei 37 °C). Die Färbereaktion folgte wie oben beschrieben. Diese Form wird im weiteren als **3-Schritt-ELISA** bezeichnet.

Zum Vergleich des 3-Schritt-ELISAs mit dem 2-Schritt-ELISA wurden die 0, 2 und 6 h bestrahlten Standard-DNA-Lösungen und zur Kontrolle reine PBS-Lösung ohne DNA vermessen. Beide ELISAs erfolgten nach den obigen Ergebnissen mit 5 x T-PBS - Waschungen und MMP-Blockierung. Die Linearität im 3-Schritt-ELISA war über 2 h hinaus war in diesem Test nicht mehr gegeben (Abbildung 3.2 A, S. 59). Dies ließ sich immer dann beobachten, wenn die gemessene Absorption weit über 1 lag. Daher wurden die 6 h - Messwerte des 3-Schritt-ELISAs nicht in die linearen Regression eingerechnet. Der Vergleich der Steigungen der linearen Regressionen der beiden Messreihen ergibt, dass sich durch die Verwendung des Biotin-Extravidin®-Systems die Signalstärke vervierfachte, ohne dass sich das Hintergrund-Signal erhöhte (Abbildung 3.2).

Nun wurde noch die Linearität des 3-Schritt-ELISAs bezüglich der aufgetragenen DNA-Menge überprüft. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an DNA (jeweils in 50 μ l PBS) dreier verschiedener DNA-Lösungen auf eine ELISA-Platte aufgetragen. Es handelte sich um die 0,5 h bestrahlte Standard-DNA-Lösung, um die DNA-Lösung aus Primärblättern von Roggenkeimlingen, die nach 5 Tagen WL-Anzucht 6 h unter B-Bedingungen bestrahlt wurden und als Kontrolle die unbestrahlte Standard-DNA-Lösung. Der ELISA-Test ist bis 1000 ng für DNA aus UV-bestrahltem Pflanzenmaterial ("Probe") linear ist (Abbildung 3.2 B). Für die DNA-Standard-Lösung zeigte sich schon in Vorversuchen, dass Mengen über 200 ng eine

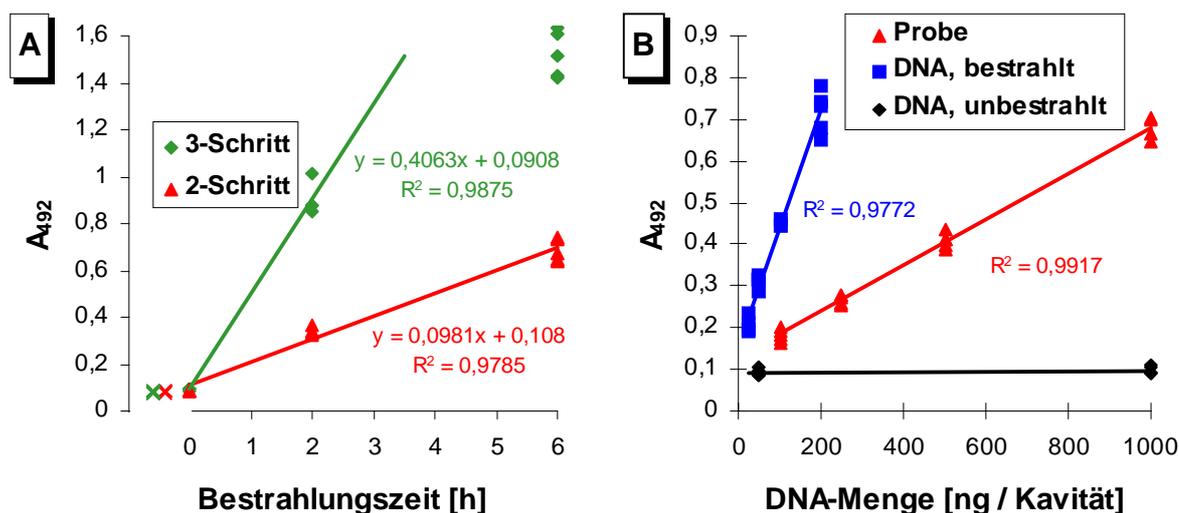


Abbildung 3.2: Signalverstärkung des ELISAs.

A: Vergleich des 2-Schritt- mit dem 3-Schritt-ELISA.

Beide Messreihen (eine pro Platte) bestanden aus 3 Standard-DNA-Lösungen (0, 2 und 6 h bestrahlt mit Bedingung BAP; je 5 Parallelen; 100 ng DNA / Kavität), einer Kontrolle aus PBS-Lösung ohne DNA (5 Parallelen; Punkte **x** vor den 0 h - Messwerten) und Blindwerten (nur Farbreaktion, 5 Parallelen). Es sind alle Einzelmesswerte dargestellt (A_{492} = Absorption bei 492 nm). Die Blindwerte lagen zwischen 0,048 und 0,061. Die Geraden stellen jeweils die lineare Regression der Messwerte dar (bei der Messreihe 3-Schritt-ELISA ohne die 6 h - Messwerte). Die zugehörigen Geradengleichungen und Quadrate der Korrelationskoeffizienten (R^2) sind angegeben.

B: 3-Schritt-ELISA bei erhöhter DNA-Menge.

Beide Messreihen wurden zusammen auf einer Platte inkubiert. **Probe:** DNA aus Primärblättern von Roggenkeimlingen, die nach 5 Tagen WL-Anzucht 6 h unter BAP-Bedingungen bestrahlt wurden. **DNA, bestrahlt:** Standard-DNA-Lösung 0,5 h bestrahlt. **DNA, unbestrahlt:** unbestrahlte Standard-DNA-Lösung. In einer Messreihe wurden verschiedene DNA-Mengen aufgetragen (5 Parallelen pro DNA-Menge). Es sind alle Einzelmesswerte dargestellt (A_{492} = Absorption bei 492 nm). Kontrollwerte (PBS-Lösung ohne DNA, 5 Parallelen) lagen zwischen 0,084 und 0,106. Die Geraden stellen jeweils die lineare Regression der Messwerte dar. Die zugehörigen Quadrate der Korrelationskoeffizienten (R^2) sind angegeben.

optische Dichte von 1 in der Färbereaktion erzeugten und daher kein lineares Signal ergaben. Die Kontrolle mit unbestrahlter Standard-DNA-Lösung demonstriert, dass es zu keiner unspezifischen Bindung des 1. Antikörpers an die DNA kommt. Die Erhöhung der DNA-Menge im ELISA stellt also eine weitere Möglichkeit zur Signalverstärkung dar. Die bisher eingesetzte Menge von 100 ng DNA der Probe erzeugte eine Absorption nach der Farbreaktion von 0,181. Subtrahiert man den Hintergrund von 0,094 ergibt sich eine OD von 0,087. 500 ng DNA der Probe führten zu einem entsprechend korrigierten Signal von 0,314. Es lag also eine Verstärkung des Signales um den Faktor 3,5 vor. Zusammen mit der Signalverstärkung durch das Biotin-Extravidin®-System (Faktor 4) ergibt sich eine Zunahme der Sensitivität des ELISAs um den Faktor 14. Diese Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit ermöglichte die folgenden Experimente dieser Dissertation.

3.1.3 Auswertung der ELISA-Messwerte

Der Nachweis der Thymin-Dimere wurde für alle Experimente dieser Arbeit nach dem 3-Schritt-ELISA mit 500 ng DNA durchgeführt. Bei allen ELISAs wurden folgende Kontrollproben mitgemessen:

PBS: 50 µl PBS ohne DNA (2 od. 3 Parallelen pro Platte);

Nullprobe: 50 µl der unbestrahlten Standard-DNA-Lösung (500 ng DNA / 50 µl, 6 Parallelen pro Platte);

Kontrolle: 50 µl der 0,5 h bestrahlten Standard-DNA-Lösung (100 ng DNA / 50 µl, 2 od. 3 Parallelen pro Platte).

Die Mittelwerte der Absorptionen der Nullproben schwankten im Bereich von 0,058 bis 0,129 von Platte zu Platte (insgesamt 43 ELISA-Platten ausgewertet). Die Standardabweichungen dieser Mittelwerte betragen zwischen 2 und 8 % (durchschnittlich 4 %), der maximale Fehler überstieg nie 11 % und lag im Mittel bei 6 %. Die Mittelwerte der PBS-Messwerte waren immer um 0,010 bis 0,012 geringer als die der Nullproben-Werte.

Die Mittelwerte der Kontrolle schwankten im Bereich von 0,450 bis 0,890 von Platte zu Platte. Die Standardabweichungen dieser Mittelwerte betragen zwischen 1 und 13 % (durchschnittlich 5 %), der maximale Fehler betrug in Einzelfällen bis zu 25 % und lag im Mittel bei 9 %.

Bei der Auswertung der einzelnen ELISAs wurde vor allen weiteren statistischen Analysen von den Einzelmesswerten der Mittelwert der Nullproben abgezogen. Von den so korrigierten Daten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Sie dienten auch als Grundlage für die durchgeführten t-Tests. Um Messwerte von unterschiedlichen ELISA-Platten miteinander vergleichen zu können, wurde darauf geachtet gleiche Proben auf den zu vergleichenden Platten mit aufzutragen. Über diese Vergleichswerte erfolgte dann eine Normierung.

3.2 Entwicklung der UV-B Spezialbestrahlungsanlage

Der für Photoreaktivierung benötigte Wellenlängenbereich liegt zwischen 330 nm und 450 nm (1.1.3.1 Abschnitt PR). Außerdem ist Photoreaktivierung ein schnell ablaufender Prozess; innerhalb einer oder weniger Stunden kann fast der gesamte Schaden repariert werden (PANG UND HAYS, 1991; CHEN ET AL., 1994; CANNON ET AL., 1995). Bei der UV-B-

Belastung der Versuchs-Pflanzen in einem normalen Tagesgang unter WL+UV-Bedingungen treffen auch Photoreaktivierungswellenlängen auf die Pflanzen und ein Teil des Schadens könnte unmittelbar nach der Entstehung wieder repariert werden. Bei den Messungen von Schäden erfasst man also nur einen Netto-Wert. Die Beurteilung der Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation für den UV-Schutz ist dadurch erschwert. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit Bedingungen mit einer gleichen UV-B_{BE}-Belastung wie unter WL+UV zu wählen, aber ohne Photoreaktivierungswellenlängen.

Unsere Standardquelle für UV-B-Strahlung waren die UV-B-Leuchtstoffröhren TL12 / 20 W der Fa. Philips. Sie sind UV-Breitband-Strahler und emittieren, abgesehen von den Emissionsbändern bei 404, 438, 544 und 575 nm, Strahlung der Wellenlängen von 274 - 366 nm (s. Abbildung 2.3). Die UV-B-Leuchtstoffröhre TL01 / 20 W der gleichen Firma ist jedoch nur ein Schmalbandstrahler und emittiert Strahlung von 295 - 336 nm (s. Abbildung 3.4, S. 63). Diese Schmalbandstrahler dienen daher als Strahlungsquelle für die UV-B-Spezialbestrahlungseinrichtung. Doch auch diese Leuchtstoffröhren zeigen noch Emissionsbänder bei 334, 364, 404 und 438 nm, die herausgefiltert werden mussten. Die Emissionsbänder bei 544 und 575 nm wurden nicht berücksichtigt, da sie außerhalb des Bereiches der Photoreaktivierungswellenlängen lagen.

3.2.1 Entwicklung eines UV-B-Bandpassfilters

Der Anspruch an den Filter war sehr hoch, da er sowohl eine hohe optische Dichte im Wellenlängenbereich von 330 - 440 nm wie andererseits eine hohe Transmission im UV-B-Bereich des Spektrums (280 - 320 nm) aufweisen sollte. Bandpassfilter für den UV-B-Bereich, wie sie z.B. in Fluoreszenzmikroskopen oder für fotografische Zwecke eingesetzt werden, weisen nur eine geringe Transmission auf. Zudem werden sie nicht in den für die Experimente dieser Arbeit nötigen Dimensionen (ca. 40 x 40 cm) hergestellt, bzw. sind dann extrem teuer. Eine Alternative stellen Flüssigkeitsfilter dar. Geeignete Absorptionsspektren weisen hier Komplex-Verbindungen der Nebengruppen-Elemente auf (HOLLEMAN UND WIBERG, 1995).

Für hohe Transmission im kurzwelligen UV-Bereich und starker Absorption im langwelligen UV-Bereich und sichtbaren Licht sind Komplexe von Ni²⁺ und Co²⁺ gute Beispiele (WLADIMIROFF, 1966). Wladimiroff arbeitete vor allem mit Lösungen von Kobalt(II)chlorid-Hexahydrat in Gemischen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Dimethylformamid und Aceton. Die Konzentration von CoCl₂·6H₂O betrug 200 g / ℓ

In einem Gemisch mit 70 % (v/v) Ethanol und 30 % (v/v) 1molarer Salzsäure zeigte diese Konzentration bei einer Schichtdicke von 1 cm eine Transmission von 260 - 460 nm. Durch Hinzumischen von Nickel(II)chlorid-Hexahydrat (100 g / ℓ) erreichte er eine Verengung des Transmissionsbereiches auf 260 - 390 nm bei gleicher Schichtdicke.

Auf Grund dieser Arbeit von Wladimiroff wurde in der vorliegenden Arbeit $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ getestet. Alle hier aufgeführten Transmissionsmessungen erfolgten in einem Zweistrahl-UV-Spektrophotometer (Uvikon 810, Fa. Kontron Hermle, Goßheim) in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm). Gemessen wurde gegen eine leere Quarzküvette, also gegen Luft. Transmissionen unter 0,1 % sind mit diesem Photometer nicht mehr messbar also gleich Null.

Bei einer Konzentration von 200 g / ℓ reichte der Transmissionsbereich ($\geq 0,1\%$) von 220 - 378 nm und ab 412 nm setzte die Transmission wieder ein. Da hiermit die Emissionsbänder der Leuchstoffröhre TL01 / 20 W zwischen 360 und 440 nm nicht herausgefiltert werden, wurden höhere Konzentrationen (400 - 1000 g / ℓ) an $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ vermessen (Abbildung 3.3). Der Bereich mit einer Transmission unter 0,1 % verbreitert sich mit steigender Konzentration. Bei einer $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration von 800 g / ℓ reicht er von 360 - 440 nm. Bei dieser Konzentration betrug die Transmission im UV-B-Bereich (280 - 320 nm) etwas über 80 %.

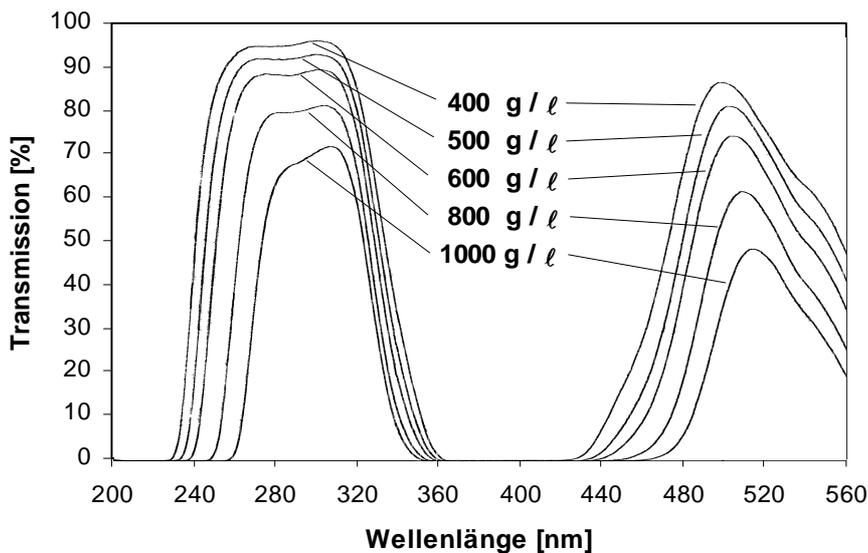


Abbildung 3.3: Konzentrationsabhängigkeit des Transmissionspektrums von wässriger $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Lösung.

Die Vermessung erfolgte in einem Zweistrahl-UV-Spektrophotometer gegen Luft. Transmissionen unter 0,1 % sind nicht mehr messbar.

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von organischen Lösungsmitteln, Salzsäure und Ammoniak auf die Transmissionskanten unterhalb von 360 nm und oberhalb von 440 nm einer Nickel(II)chlorid-Hexahydrat-Lösung (600 g / ℓ) untersucht. In allen Fällen blieb die kurzwellige Transmissionskante unterhalb 360 nm unverändert. Lösungen mit 20 % bzw. 40 % (v/v) Methanol führten zu einer geringen Verschiebung der langwelligen Transmissionskante um +4 nm bzw. +8 nm, wobei sich die UV-B-Transmission nur geringfügig senkte (um 3 bzw. 6 %). Ethanol (40 % (v/v)) verschob sogar die langwellige Transmissionskante um +10 nm, jedoch reduzierte sich die UV-B-Transmission auf unter 40 %. Ähnliches galt für Dimethylsulfoxid (40 % (v/v)). Die Auswirkungen von Salzsäure (1 u. 2 M) entsprechen denen von Methanol. 2,5 % (v/v) NH₃ beeinflusst die Transmissionskanten nicht, bei 10 % (v/v) NH₃ fällt die UV-B-Transmission unter 0,1 %. Zusammenfassend ergab sich, dass keine der getesteten Substanzen nennenswerten Einfluss auf die Transmissionskanten, vor allem auf die kurzwellige, haben, ohne dann gleichzeitig die UV-B-Transmission drastisch zu verringern. Daher wurde für den Filter eine rein wässrige Nickel(II)chlorid-Hexahydrat-Lösung der Konzentration 800 g / ℓ verwendet.

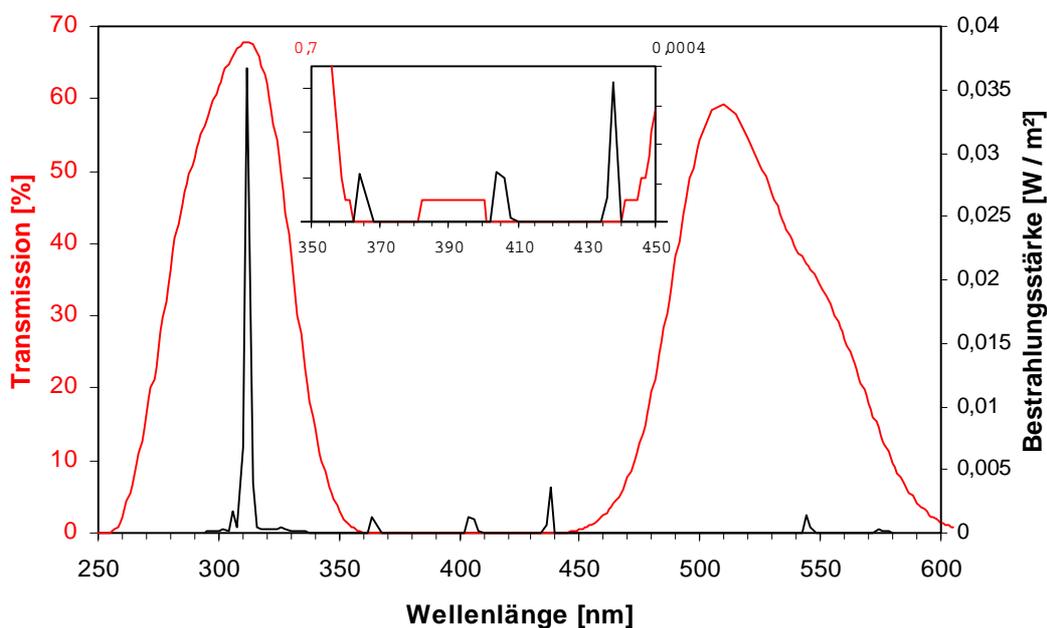


Abbildung 3.4: Vergleich des Transmissionsspektrums des Flüssigkeitsfilters mit dem Emissionsspektrum der UV-B-Leuchtstoffröhre TL01 / 20 W.

Das Transmissionsspektrum des Flüssigkeitsfilters wurde im Zweistrahl-UV-Spektrophotometer gemessen. Im Strahlengang des Messstrahles befanden sich neben der mit der Filterlösung gefüllten Quarzküvette auch zwei 3 mm dicke Scheibchen des UV-durchlässigen Plexiglasses 2458. Im Referenzstrahl stand eine leere Quarzküvette. Das Emissionsspektrum der UV-B-Leuchtstoffröhre entspricht Hersteller-Angaben. Die kleine Graphik stellt eine Vergrößerung des Bereiches von 350 - 450 nm dar.

Die **Filterküvette** wurde aus UV-durchlässigem Plexiglas 2458 der Fa. Röhm von der Werkstatt des Botanischen Institutes gebaut. Der Füllraum für die Filterlösung hatte eine Grundfläche von 40 x 40 cm und eine Höhe von 1 cm. Die Plexiglasscheiben, die die Grundflächen darstellten, hatten eine Dicke von 3 mm. Die Küvette war an einer schmalen Seite mit zwei Einfüllstutzen versehen. An zwei gegenüberliegenden schmalen Seiten waren je zwei Vorrichtungen zur Befestigung von Stativstangen angebracht. Die Füllung der Küvette bestand aus einer wässrigen $\text{NiCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ -Lösung (800 g / ℓ) und war blasenfrei. Dieser Konstruktionsaufbau filterte die Emissionsbanden der UV-B-Leuchtstoffröhre TL01 / 20 W bei 364, 404 und 438 nm allerdings nicht ganz heraus, wie Abbildung 3.4 vermuten lässt.

3.2.2 Aufbau und Vermessung der UV-B-Spezialbestrahlungseinrichtung

Der in Abbildung 3.5 dargestellte Aufbau der UV-B Spezialbestrahlungsanlage in der Klimakammer 3 des Botanischen Institutes entspricht der Konstellation dieser Anlage für die damit durchgeführten Experimente dieser Arbeit. Für die Einstellung der UV-B-Leuchtstoffröhrenzahl und der Höhe mussten zunächst Spektroradiometer-Vermessungen durchgeführt werden. Die nach BJÖRN UND MURPHY (1985) gewichtete biologisch-effektive UV-B-Bestrahlungsdosis der Einrichtung über einen Zeitraum von 6 h sollte $11,9 \text{ kJ} / \text{m}^2$ betragen. Dies ist die UV-B_{BE}-Bestrahlungsdosis in der Anzuchtammer unter WL+UV- bzw. BAP-Bedingungen (s. Tabelle 2.2).

Die spektroradiometrischen Messungen erfolgten, wie in Kapitel 2.2.1.4.3 beschrieben, in einem Abstand von 13,5 cm über der Stellfläche ("Pflanzenhöhe"). Zunächst wurden Messungen mit nur 2 angeschalteten Leuchtstoffröhren durchgeführt. Die so erzeugten Bestrahlungsstärken erwiesen sich aber schnell als zu gering. Daraufhin wurden Messungen mit 4 Leuchtstoffröhren bei verschiedenen Abständen der Röhren von der Stellfläche durchgeführt. Bei einem Abstand von 49 cm wurde eine UV-B_{BE}-Bestrahlungsstärke von $0,54 \text{ W} / \text{m}^2\text{s}$ erreicht, was einer Dosis über 6 h von $11,7 \text{ kJ} / \text{m}^2$ ergab (vgl. Tabelle 2.3). Die spektrale Verteilung der Bestrahlungsstärke ist in Abbildung 2.8 dargestellt.

Vor den einzelnen Versuchen wurde ein kleines Aliquot der Filterlösung abgenommen und im Photometer das Transmissionsspektrum gemessen. Die Transmissionseigenschaften der Filterlösung blieben stabil. Dies galt auch für das Plexiglasmaterial, das ebenfalls photometrisch vermessen wurde.

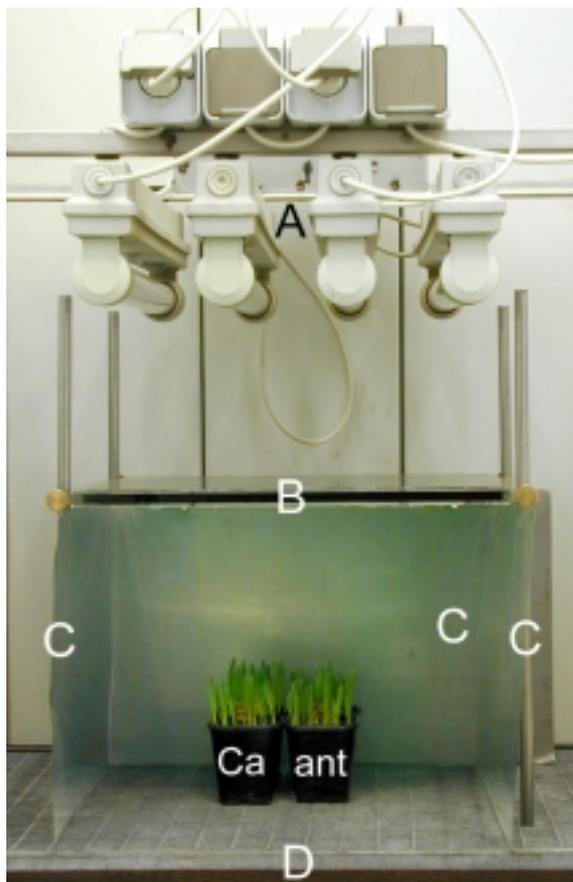


Abbildung 3.5: Aufbau der UV-B Spezialbestrahlungsanlage

Der Aufbau stand in der Klimakammer 3 des Botanischen Institutes. Die Unterkante der 4 UV-B-Leuchtstoffröhren TL01 / 20 W des Lampenrechs (A) hatte einen Abstand von 49 cm von der Stellfläche (D). Der an Stativstangen befestigte Flüssigkeitfilter (B) befand sich 30 cm über der Stellfläche. Das Pflanzenmaterial sind 6 Tage alte Gerstekeimlinge (Ca und ant). Die Seiten und die Rückwand waren mit Aluminiumblechen abgeschirmt (C). Die Abschirmung nach vorne erfolgte mit Aluminium-Papier und ist für die Fotografie abgenommen worden.

3.3 Roggen

In dieser Arbeit interessierte vor allem der Zusammenhang zwischen der Phenylpropanoid-Akkumulation, insbesondere auch deren Stimulation durch zusätzliche UV-Strahlung während der Anzucht, und der Schädigung des Erbgutes. Doch auch die Photoreaktivierung wie die lichtunabhängige Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden beeinflusst die Schadensakkumulation. Daher wurde auch dieser Einfluss untersucht.

Aufgrund der klaren Gewebelokalisation der Phenylpropanoide im Roggen-Primärblatt (Mesophyll: R₁, R₂; Epidermis: R₃, R₄, Hydroxyzimtsäure-Derivate; vgl. Abbildung 1.8), stellt es ein ideales System zur Beurteilung des Beitrages beider Gewebe zum UV-Schutz dar.

3.3.1 Die Phenylpropanoide im Primärblatt

3.3.1.1 Analyse der Phenylpropanoide

Die Charakterisierung der **löslichen phenylpropanoiden Inhaltsstoffe** erfolgte durch die HPLC der methanolischen Rohextrakte (s. 2.2.2.4). Die Flavonoide wurden mittels Cochromatographie mit Reinsubstanzen und dem Vergleich der während des HPLC-Laufes aufgenommenen UV-Spektren (230 - 370 nm, s. 2.2.2.4.3) der einzelnen eluierenden Substanzen mit denen in der HPLC bestimmten Spektren der Reinsubstanzen identifiziert. Für die Versuche an 5 Tage alten Roggen-Primärblättern (s. 3.3.2) wurden die Flavone mit dem Gradienten 1 (s. 2.2.2.4.1; nach PETERS, 1986) analysiert, während die löslichen Hydroxyzimtsäuren nach Freisetzung durch alkalische Hydrolyse des Rohextraktes (s. 2.2.2.2) mit dem Gradienten 4 (s. 2.2.2.4.1; nach SCHMITZ, 1995) gemessen wurden.

Für die Versuche zur Primärblattentwicklung (s. 2.2.1.5) wurde ein neuer Gradient entwickelt, der es ermöglichte, die Derivate der löslichen Hydroxyzimtsäuren schon im Rohextrakt zu analysieren, um die alkalische Hydrolyse der Rohextrakte zu vermeiden. Die Detektion erfolgte bei dem neuen Gradienten (Gradient 2, s. 2.2.2.4.1) bei 315 nm, dem Bereich der Maxima der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate (s.u.), um die teils geringen Mengen dieser Substanzen besser erfassen zu können. Weiterhin erlaubte die Detektion bei 315 nm auch einen unmittelbaren Vergleich der Absorptionskapazitäten der einzelnen Substanzen bei dieser Wellenlänge. Sie wird im weiteren als **UV-B-Absorptionskapazität** bezeichnet (s.a. 2.2.2.4.2).

Die Abbildung 3.6 (S. 67) zeigt ein für alle Rohextrakte aus Roggen-Primärblättern qualitativ charakteristisches Chromatogramm unter Verwendung des neuen Gradienten und die Spektren der wichtigsten eluierenden Substanzen. Neben den bekannten wichtigsten Flavonoiden R₁ - R₄ (vgl. Abbildung 1.8) kamen noch Flavonoid-Nebenkomponenten vor. Sie eluierten alle mit längeren Retentionszeiten als R₁. Durch Cochromatographie und Spektren-Vergleich wurde Isovitexin (IV, Struktur in Abbildung 1.9) identifiziert. Das R₃ und R₄ gleichende Spektrum der Substanz Rx wies daraufhin, dass es sich ebenfalls um ein Flavon handelte. Seine Menge betrug aber in allen untersuchten Primärblatt-Stadien höchstens 5 % am gesamten Flavonoid-Gehalt (Summe der identifizierten Flavonoide). Da auch ihre Gewebelokalisation unbekannt war, wurde diese Substanz im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

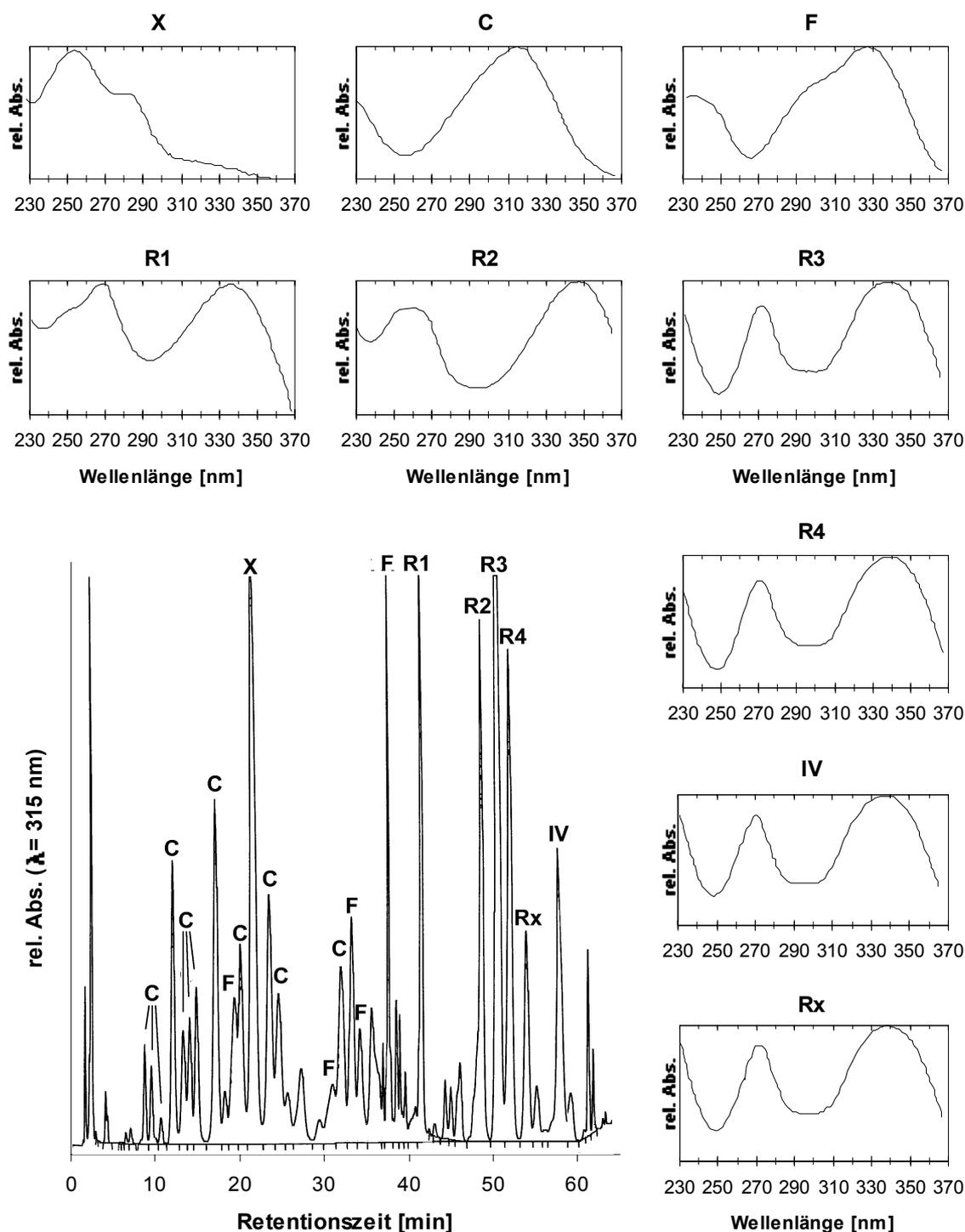


Abbildung 3.6: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Rohextraktes eines Roggen-Primärblattes mit Spektren der wichtigsten eluierenden Substanzen.

Das Primärblatt wurde im Alter von 6 d nach einer Anzucht unter WL+UV extrahiert (s. 2.2.1.4). Die HPLC erfolgte mit dem neuen Gradienten (Gradient 2, s. 2.2.2.4.1) bei einer Detektionswellenlänge von 315 nm. **C**: *p*-Cumarsäure-Derivate, **F**: Ferulasäure-Derivate, **R1** - **R4**: bekannte Roggenflavonoide (vgl. Abbildung 1.8), **IV**: Isovitexin (vgl. Abbildung 1.9), **Rx**: unbekanntes Roggenflavonoid, **X**: Substanz unbekannter Stoffklasse. Die dargestellten Absorptionsspektren von 230 - 370 nm der im Chromatogramm beschrifteten eluierenden Substanzen wurden während eines HPLC-Laufs dieses Rohextraktes aufgenommen (s. 2.2.2.4.3). Für die Derivate der beiden Hydroxycimtsäuren *p*-Cumarsäure und Ferulasäure ist nur jeweils ein Spektrum dargestellt, die Spektren sind für alle Derivate jeweils sehr ähnlich.

Der Gradient 2 lieferte auch eine gute Auflösung der vielen Hydroxyzimtsäure-Derivate, die vor R_1 eluieren. Nach STRACK ET AL. (1987) sind es über 20 verschiedene Ester von *p*-Cumarsäure, Ferulasäure (vgl. Abbildung 1.8) und Sinapinsäure mit verschiedenen Zuckersäuren und anderen organischen Säuren. Der Großteil der Spektren von den vor R_1 eluierenden Substanzen ließen sich in zwei Gruppen, C und F genannt, unterteilen. Die Substanzen der Gruppe C hatten ihr im HPLC-System bestimmtes Absorptionsmaximum zwischen 312 und 315 nm und eine schwach ausgeprägte Schulter zwischen 295 und 300 nm. Diese Charakteristika wies auch das in der HPLC gemessene Spektrum freier *p*-Cumarsäure auf (Maximum: 310 nm, schwache Schulter bei 300 nm). Ein charakteristisches Spektrum dieser Gruppe ist in der Abbildung 3.6 dargestellt. Wird in dieser Arbeit im folgenden eine Menge an löslichen *p*-Cumarsäure-Derivate angegeben, stellt diese die Summe der mit C bezeichneten Substanzen dar. Die Menge wurde mit einem einheitlichen mittels freier *p*-Cumarsäure bestimmten Eichfaktor (s. Tabelle 2.4) berechnet. Bei den Substanzen der Gruppe F lag das Absorptionsmaximum zwischen 321 und 328 nm, die stärker ausgeprägte Schulter lag auch hier um 300 nm. Dies entsprach dem Spektrum von freier Ferulasäure (Maximum: 322 nm, stark ausgeprägte Schulter bei 300 nm). Das Spektrum der Kaffeesäure ist von dem der Ferulasäure im HPLC-System nicht unterscheidbar. Kaffeesäure ist Alkali-labil (SCHROEDER, 1967) und kann deshalb nach Hydrolyse nicht mehr nachgewiesen werden. Trotzdem wurden alle Substanzen der Gruppe F der Ferulasäure zugeordnet, da bis jetzt keine Kaffeesäure-Derivate in Roggen identifiziert wurden. Die Summe der mit F bezeichneten Substanzen wird im weiteren als lösliche Ferulasäure-Derivate angegeben, deren Menge ebenfalls mit einem einheitlichen mittels freier Ferulasäure bestimmten Eichfaktor (s. Tabelle 2.4) berechnet wurde.

Der Anteil an Sinapinsäure-Derivaten ist sehr gering (STRACK ET AL., 1987; SCHMITZ ET AL., 1995). Das Sinapinsäure-Spektrum hat bei 323 nm ein Maximum, allerdings keine Schulter. Ein solches Spektrum wurde bei der Analyse der Rohextrakte in der HPLC nicht aufgefunden. Nach alkalischer Hydrolyse waren auch nur Spuren von Sinapinsäure zu detektieren.

Eine genaue Identifizierung der einzelnen Hydroxyzimtsäure-Derivate war für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht erforderlich, da für die UV-B-Absorption der jeweilige Chromophor – *p*-Cumarsäure, Ferulasäure – maßgeblich ist.

Die unbekannte Substanz X war aufgrund ihres Spektrums weder den Flavonoiden noch den Hydroxyzimtsäure-Derivaten zuzuordnen. Auch die Gewebelokalisation ist unbekannt.

Während der Primärblattentwicklung blieb ihre Menge konstant und war unabhängig von den Anzuchtbedingungen. Der Vergleich der UV-B-Absorptionskapazitäten ergab, dass diese Substanz durchschnittlich einen Anteil von 6,5 % daran stellte. Sie wird im weiteren nicht besprochen.

Alle nicht bezeichneten Peaks sind Substanzen, die nur in geringen Mengen vorkamen oder eine sehr geringer Absorption im Wellenlängenbereich über 280 nm (UV-B = 280 - 320 nm) zeigten. Diese wurden bei den Auswertungen nicht berücksichtigt.

3.3.1.2 *In situ* - Lokalisation der Roggen-Flavone im Primärblatt mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Aufgrund ihrer Sekundärfluoreszenz nach Komplexierung mit Naturstoffreagenz A (Diphenyl-borsäure-2-amino-ethylester, Nachweisreagenz für Flavone aus der Dünnschichtchromatographie nach NEU, 1957) lassen sich Flavone mittels Fluoreszenz-Mikroskopie *in situ* visualisieren (VOGT ET AL., 1994; SCHNITZLER ET AL., 1995; REINOLD UND HAHLBROCK 1997). Die Komplexe mit Roggen-Flavonen weisen nach UV-Anregung – z.B. im Bereich von 340 - 380 nm – eine gelbe Fluoreszenz auf (REUBER, 1996). Mit Hilfe dieses Nachweisreagenzes bestätigte REUBER an Quer- und Flächenschnitten von frischem Primärblattmaterial 5 Tage alter Roggenkeimlinge der Sorte *Kustro* (Anzucht unter Schwachlicht: ca. 80 $\mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$) die Anwesenheit von Flavonen in Mesophyll und Epidermis. Er zeigte weiterhin, dass im Mesophyll die Flavone gleichmäßig verteilt sind.

Die Abbildung 3.7 (S. 70) bestätigt diese Ergebnisse für 6 Tage alte, unter WL+UV (Starklicht: 700 $\mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$) angezogene Roggenkeimlinge der Sorte *Sorom*. Es wurden Quer- (A, C), Längs- (B, D) und Flächenschnitte (E, F) von Primärblättern angefertigt und in Puffer (100 mM NaKPi pH 5,8, 1 mM CaCl₂, 0,5 M Sorbitol) ohne (A, B, E) und mit 0,1 % (w/v) Naturstoffreagenz A inkubiert (s. 2.2.4).

Die Blaufluoreszenz in den Kontrollen ohne Naturstoffreagenz A ist auf Ferulasäure bzw. im Xylem auf Lignin zurückzuführen. Der Nachweis der Ferulasäure erfolgte durch Inkubation mit einer NH₄-Lösung (0,1 % v/v in Puffer), wodurch sich ein Teil der Blaufluoreszenz nach grün verschob, was auf Ferulasäure zurückzuführen ist (HARRIS UND HARTLEY, 1976). Nur die Zellwände des Xylems und der Mestomscheide bleiben blau (= Lignin, vgl. HUTZLER ET AL., 1998). Der Nachweis von zellwandgebundener Ferulasäure erfolgte durch alkalische Hydrolyse des nach Extraktion der löslichen Phenylpropanoide verbleibenden Pellets (s. 2.2.2.3 u. 3.3.3.1.1). Die Blaufluoreszenz war in den Epidermiszellaußenwänden und den Zellwänden des

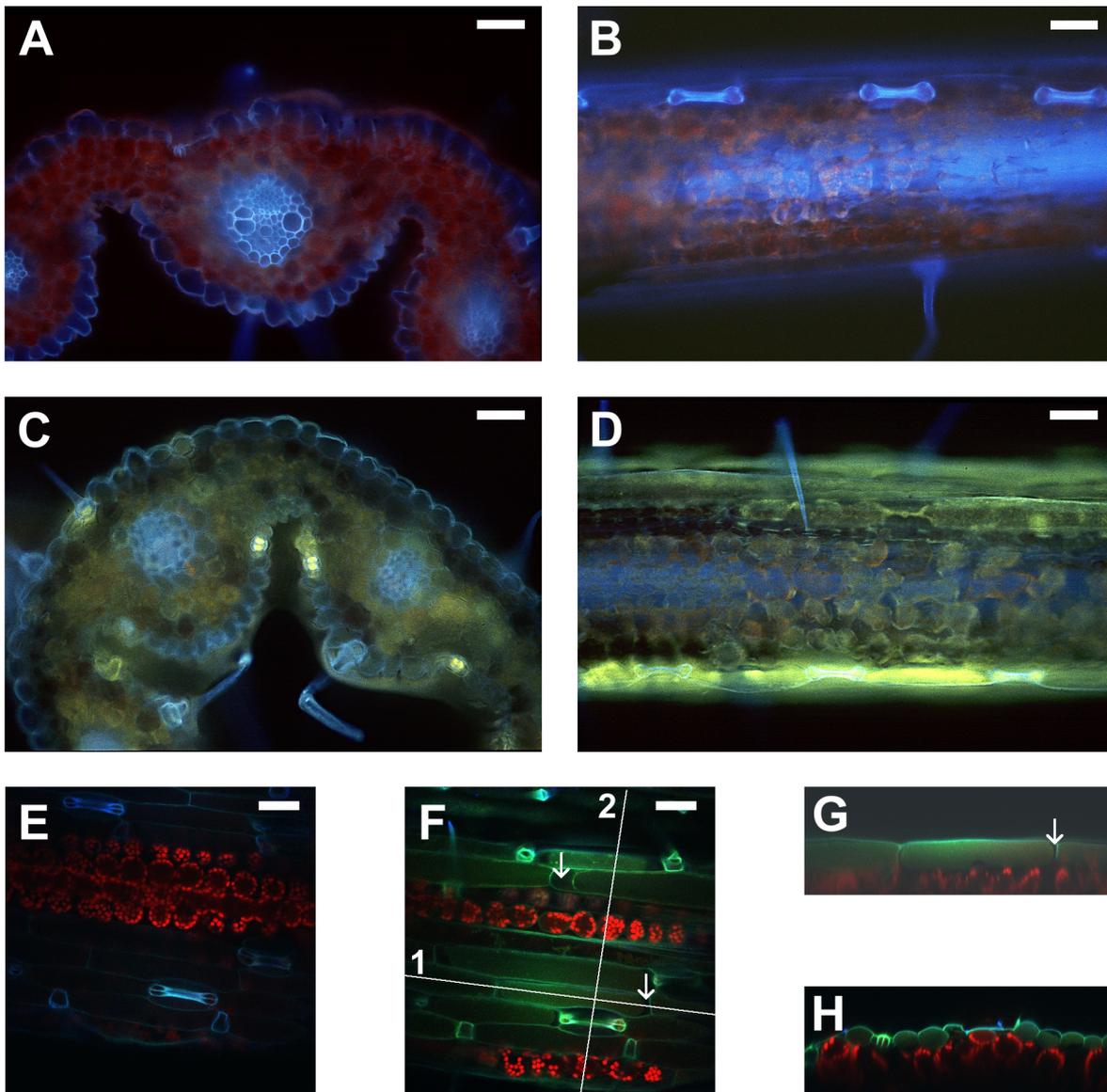


Abbildung 3.7: Histochemischer Nachweis von Flavonen im Roggen-Primärblatt.

Abgebildet sind Querschnitte (A, C), Längsschnitte (B, D) und Flächenschnitte (E, F) von Primärblättern 6 Tage alter, unter WL+UV angezogener Roggen-Keimlinge. Die Schnitte wurden auf Objektträgern in Puffer (100 mM NaKP_i pH 5,8, 1 mM CaCl₂, 0,5 M Sorbitol) ohne (A, B, E) bzw. mit (C, D, F) 0,1 % Naturstoffreagenz A inkubiert (s. 2.2.4). Die Mikroskopie erfolgte an einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop (A - D, Anregung: 340 - 380 nm) bzw. an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (E - H; Anregung: 364 nm; s. 2.2.4). G ist ein optischer Längsschnitt entlang der Linie 1 in F. H ist ein optischer Querschnitt entlang der Linie 2 in F. Die Balken repräsentieren 50 µm.

Anmerkung: Durch die Reproduktion der am konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommenen Bilder kann es zu geringen Farbverschiebungen kommen. Für die Darstellung der Aufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop als farbige Bilder wurden die drei Detektionskanäle den primären Bildschirmfarben blau, grün und rot zugeordnet. Der Farbeindruck stimmte dadurch nicht zwangsläufig mit dem am Mikroskop beobachteten überein. So erschien ein gelbes Signal, welches vom "grünen" Kanal detektiert wird, grün.

Leitbündels besonders intensiv, aber sie trat auch in den Mesophyll-Zellwänden auf. Der blaue Fluoreszenzschleier in der Mitte des Längsschnittes weist auf ein nicht in der Fokussierebene gelegenes Leitbündel hin. Alle Mesophyllzellen zeigten wandständig rote Fluoreszenz. Besonders deutlich ist dies im Flächenschnitt der adaxialen Epidermis zu sehen. Hier erkennt man die Chloroplasten als Ursprung des Signals. Es handelt sich also erwartungsgemäß um Chlorophyll-Fluoreszenz.

Durch Inkubation mit Naturstoffreagenz A (0,1 % (w/v) in Puffer) trat zusätzlich ein gelbes Fluoreszenzsignal auf. Quer- und Längsschnitt zeigten eine gleichmäßige Verteilung der gelben Fluoreszenz im Mesophyll, wobei im Querschnitt subepidermal unter der abaxialen Epidermis keine Fluoreszenz zu sehen ist. Dies trat allerdings nicht in allen beobachteten Schnitten auf. Es war vor allem in den Schnitten zu beobachten, die subepidermal durch Anthocyane rotgefärbte Zellen im Durchlicht aufwiesen. Daher ist eine Löschung der Anregung oder der Fluoreszenz-Emission zu vermuten.

Auch weist der Querschnitt keine Gelbfluoreszenz in der Epidermis – Schließzellen ausgenommen – auf. Die Epidermiszellen waren so lang, dass sie durch den Schnitt zerstört wurden. In einem Längsschnitt blieben die Epidermiszellen intakt. Hier wird nun auch das Signal in den beiden Epidermen sichtbar. Die stärkere Fluoreszenz vor allem in der adaxialen Epidermis könnte auf eine höhere Flavon-Konzentration hinweisen (s. Diskussion 4.3.2).

Abgesehen von dem Flächenschnitt (F) war nach Behandlung mit Naturstoffreagenz A keine rote Chlorophyll-Fluoreszenz zu sehen. Dies war zum Teil auf ein Verblässen der Chlorophyll-Fluoreszenz über den Beobachtungszeitraum zurückzuführen, das auch an unbehandelten Schnitten zu beobachten war. Doch dieser "Fading-Effekt" lief nach Behandlung mit Naturstoffreagenz A schneller ab. Daher ist davon auszugehen, dass das Reagenz in einer nicht geklärten Art und Weise zur Fluoreszenzlöschung beitrug. Zu einem anderen Teil spielte auch die Überlagerung durch die Fluoreszenz des Flavon-Naturstoffreagenz A-Komplexes eine Rolle, denn in dem hier abgebildeten Flächenschnitt ist die Chlorophyll-Fluoreszenz noch vorhanden. Diese Aufnahmen erfolgten mit dem Laser-Scanning-Mikroskop und durch die geringe optische Dicke des Schnittes und der Detektion der Emission in drei getrennten Kanälen war die Wiedergabe der Rot-Fluoreszenz möglich.

Der mit einem Laser-Scanning Mikroskop aufgenommene Flächenschnitt der abaxialen Epidermis führt ebenfalls den Nachweis von Flavonen. Das Fluoreszenzsignal erscheint hier allerdings grünlich (s. Anmerkung Abbildung 3.7). Auch die Schließzellen und ihre

Nebenzellen weisen Flavone auf, was bei der Betrachtung von Flächenschnitten mit konventioneller Technik immer deutlich zu sehen war. Vor allem die Schließzellen wiesen ein starkes Signal auf. Dies ist auch an Längs- und Querschnitt zu erkennen. Aufgrund der konfokalen Technik des Laser-Scanning-Mikroskopes stammen die Fluoreszenzsignale des Flächenschnittes aus einer eng fokussierten optischen Ebene. Dadurch lassen sich sehr genau Details erkennen, zum Beispiel die Chloroplasten (da die abaxiale Epidermis nicht in einer Ebene lag, verläuft die optische Ebene z.T. durch die Epidermis und z.T. durch das Mesophyll). Außerdem tritt deutlich zu Tage, dass sich die Protoplasten aufgrund des hypertonen Puffers von den Zellwänden abgelöst hatten (s. Pfeile in F). Das Fluoreszenzsignal war nur im Bereich des Protoplasten sichtbar, der fluoreszierende Komplex mit den Flavonolen lag also nur im Protoplasten vor. Die gleichmäßige Verteilung des Signals auf den gesamten Bereich der Protoplasten macht die Lokalisation in der Zentralvakuole wahrscheinlich. Aufgrund der eng begrenzten optischen Ebene konnte dieses gleichmäßige Signal nicht von darüber oder darunter liegenden Zellwänden stammen. Weiter unterstützt wird dies durch den optischen Längsschnitt entlang der Linie 1 in Bild F (dargestellt in G) bzw. den optischen Querschnitt entlang der Linie 2 (dargestellt in H). Sie entstanden durch sukzessive in die Schnitttiefe gehende Laseranregung des Flächenschnittes entlang der markierten Linien. Vor allem im optischen Längsschnitt war eine allmähliche Abschwächung des Fluoreszenzsignals im Lumen der langgestreckten Epidermiszelle zu sehen. Sie war auf die mit der Eindringtiefe zunehmende Absorption der Laseranregung zurückzuführen. Bei einer cytoplasmatischen Lokalisation würde man eine scharfe, helle Linie des Fluoreszenz-Signals um den Protoplasten herum erwarten.

3.3.2 Einfluss von UV-Strahlung auf Phenylpropanoid-, Thymin-Dimer-Akkumulation und Thymin-Dimer-Reparatur in einem frühen Entwicklungsstadium der Roggen-Primärblätter

Während seiner Entwicklung ist das Primärblatt zunächst in der Koeoptile eingeschlossen und vor UV-Strahlung geschützt (BRAUN, 1990). Mit dem Durchstoßen der Koeoptile ist es dann allerdings der schädlichen Strahlung ausgesetzt. Unter den hier gewählten Anzuchtbedingungen durchstieß das Primärblatt am 4. Tag die Koeoptile. In 7 Tagen alten Primärblättern konnte REUBER (1993) einen Zusammenhang zwischen Flavonoid-Akkumulation und Schutz der Photosynthese, speziell des Photosystems II, feststellen.

	WL		WL+UV	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Längen [cm]:				
Primärblatt	5,2	0,9	4,5	0,9
Koleoptile	2,1	0,3	1,6	0,3
Blattstück	3,1	0,8	2,9	0,7
Frischgewichte [mg]:				
Blattstück	20	6	19	6

Tabelle 3.1: Wachstumsparameter von Roggen-Primärblättern im Alter von 5 Tagen unter WL und WL+UV.

Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) mit n = 106 (WL) bzw. 87 (WL+UV) aus jeweils zwei unabhängigen Anzuchten.

Aufgrund der verfügbaren Messtechnik (PAM-Messungen) war in seiner Arbeit ein früheres Entwicklungsstadium nicht zugänglich.

Da der untere Teil des Primärblattes auch nach dem Durchstoßen der Koleoptile am 4. Tag von dieser umgeben und damit geschützt war, sollten sich die Untersuchungen auf den aus der Koleoptile herausragenden, also strahlungsexponierten Teil des Primärblattes konzentrieren. Die Experimente wurden dann im Alter von 5 Tagen durchgeführt.

Die Tabelle 3.1 fasst die gemessenen Wachstumsparameter für 5 Tage alte, unter den beiden Anzuchtbedingungen WL und WL+UV angezogenen Primärblätter zusammen. Die unter WL+UV herangewachsenen Keimlinge hatten verglichen mit denen, die unter WL-Bedingungen angezogen wurden, ein um knapp 14 % kürzer ($p \leq 0,5 \%$) kürzeres Primärblatt, die Koleoptile sogar um 24 % ($p \leq 0,5 \%$) kürzer. Die geernteten strahlungsexponierten Blattstücke aus beiden Anzuchtbedingungen wiesen jedoch die gleiche Länge und das gleiche Frischgewicht auf.

3.3.2.1 Der Phenylpropanoidgehalt 5 Tage alter Primärblätter

Zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht führte zu einem gut 30 % höheren Flavon-Gehalt im Mesophyll der strahlungsexponierten Primärblattstücke (Abbildung 3.8 A, S. 74). Der R₁-Gehalt war dabei unbeeinflusst und betrug 26,9 nmol / Primärblattstück(Pbst) bzw. 29,6 nmol / Pbst. Der R₂-Gehalt hingegen war unter WL+UV (16,5 nmol / Pbst) doppelt so hoch wie unter WL (8,6 nmol / Pbst).

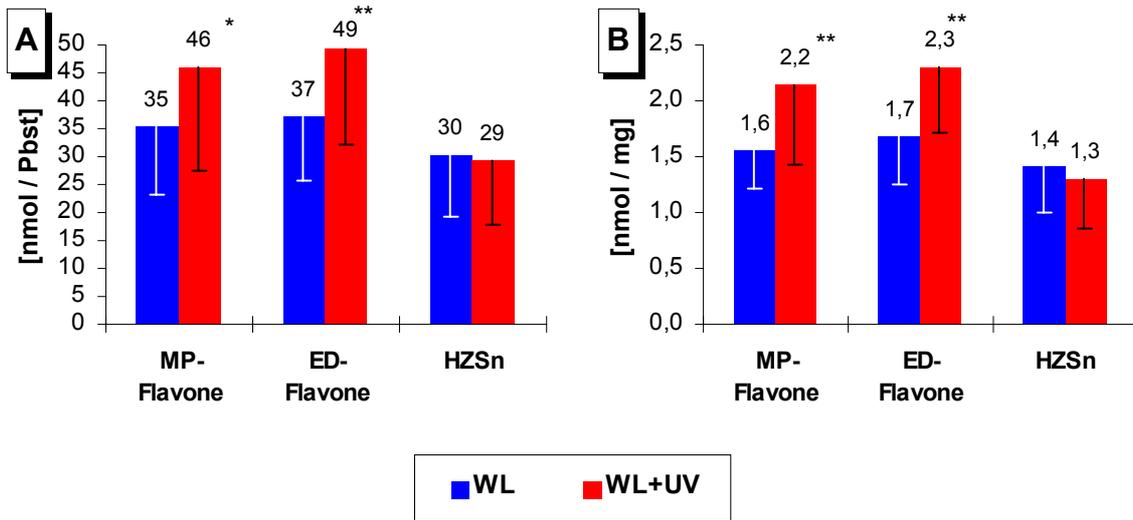


Abbildung 3.8: Der Phenylpropanoidgehalt 5 Tage alter Roggen-Primärblattstücke in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingung WL und WL+UV.

Der Phenylpropanoidgehalt wurde in die Gruppen **Mesophyll(MP)-Flavone** ($R_1 + R_2$), **Epidermis(ED)-Flavone** ($R_3 + R_4$) und **lösliche Hydroxyzimtsäure-Derivate (HZSn, *p*-Cumarsäure- + Ferulasäure-Derivate)** aufgegliedert und pro Primärblattstück (Pbst, **A**) und pro Frischgewichtseinheit des Primärblattstückes (**B**) dargestellt. Die Zahlen geben die Mittelwerte an, die Fehlerbalken die Standardabweichungen ($n = 26$ (WL) bzw. 16 (WL+UV) aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen). Signifikanz: * $p \leq 5 \%$, ** $p \leq 1 \%$.

Auch der epidermale Flavon-Gehalt war unter WL+UV um 30 % höher als unter WL. Hier war der Gehalt beider Flavone erhöht. Unter den beiden Anzuchtbedingungen akkumulierten R_3 und R_4 zu gleichen Teilen in den Epidermen. Die ebenfalls epidermal lokalisierten löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate waren offensichtlich in ihrer Akkumulation unbeeinflusst von der Anzuchtbedingung. Der Anteil der *p*-Cumarsäure-Derivate war unter beiden Bedingungen etwas geringer als der Anteil der Ferulasäure-Derivate. Dieses Bild veränderte sich auch nicht durch den Bezug der Stoffmengen auf das Frischgewicht (Abbildung 3.8 B).

Die Auswirkungen der verstärkten Flavon-Akkumulation unter WL+UV auf die UV-B-Absorptionskapazität bei 315 nm verdeutlicht Abbildung 3.9 (S. 75). Sie war unter WL+UV nur um 17 % höher als unter WL obwohl der Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden um gut 20% stieg. Den Hauptanteil der UV-B-Absorptionskapazität machten unter beiden Anzuchtbedingungen mit 75 % die epidermalen Komponenten aus. Ihre UV-B-Absorptionskapazität erhöhte sich aber nur um 15 % unter WL+UV, diejenige der Mesophyll-Komponenten jedoch um 25 %.

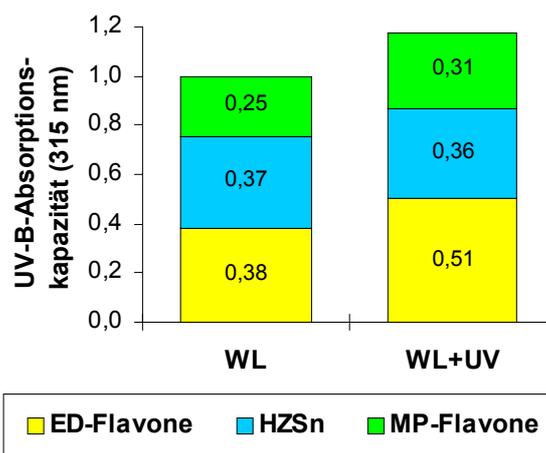


Abbildung 3.9: UV-B-Absorptionskapazität bei 315 nm in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen WL und WL+UV.

Die UV-B-Absorptionskapazität (s. 2.2.2.4.2) des Primärblattstückes ist unterteilt in die Phenylpropanoid-Gruppen **Mesophyll(MP)-Flavone** ($R_1 + R_2$), **Epidermis(ED)-Flavone** ($R_3 + R_4$) und **lösliche Hydroxyzimtsäure-Derivate (HZSn, *p*-Cumarsäure- + Ferulasäure-Derivate)** dargestellt. Die UV-B-Absorptionskapazität wurde auf das Frischgewicht bezogen und in relative Einheiten umgerechnet (Gesamt-Absorptionskapazität unter WL = 1).

3.3.2.2 Akkumulation von Thymin-Dimeren durch UV-Bestrahlung

Zur Untersuchung des Einflusses der oben beschriebenen Flavonoid-Akkumulation, und der daraus resultierenden UV-B-Absorptionskapazität, auf die Entstehung von UV-induzierten DNA-Schäden wurden die 5 Tage alten Keimlinge beider Anzuchtbedingungen einer 6stündigen Bestrahlungsphase unter der Bedingung BAP (UV-**B** + UV-**A** + **PAR**, s. 2.2.1.4.2) ausgesetzt. Dies entsprach dem normalen Tagesgang unter der Anzuchtbedingung WL+UV. Gemessen wurde die relative Thymin-Dimer-Konzentration in der DNA während dieser Bestahlung. Um den Einfluss der Photoreaktivierung auf die Akkumulation von Thymin-Dimeren zu beurteilen, wurde parallel eine Bestrahlung mit der Bedingung B (nur UV-**B**), die im Wellenlängenbereich der Photoreaktivierung von 330 - 450 nm nur 0,21 % der Bestrahlungsstärke unter BAP aufwies, durchgeführt.

Abbildung 3.10 (S. 76) zeigt die Thymin-Dimer-Konzentrationen in Primärblattstücken von unter WL bzw. WL+UV angezogenen Keimlingen (zukünftig kurz WL- bzw. WL+UV-Primärblattstücke genannt) vor, während und nach den oben beschriebenen Bestrahlungen. Schon zu Beginn der Bestrahlung konnte in den WL+UV-Primärblattstücken Thymin-Dimere nachgewiesen werden ($p \leq 0,5 \%$), bei den unter WL angezogenen Pflanzen dagegen (innerhalb der Fehlergrenzen) nicht. Während der 6stündigen Bestrahlung mit Bedingung B erhöhte sich die Thymin-Dimer-Konzentration in den WL-Primärblattstücken um 3,5 relative

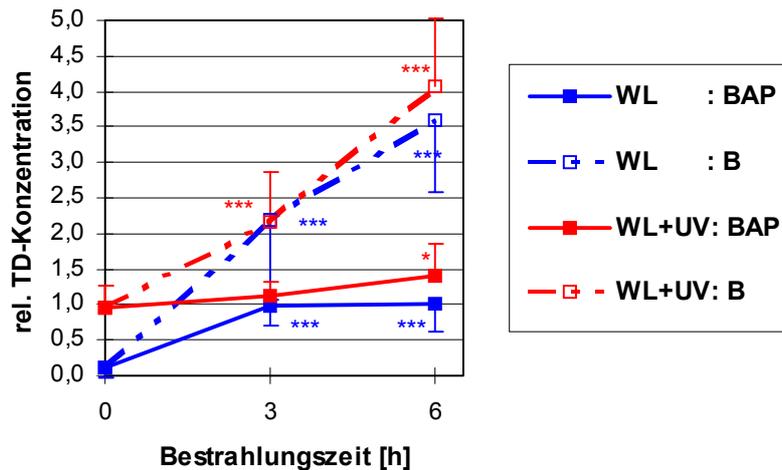


Abbildung 3.10: Akkumulation von Thymin-Dimeren in Abhängigkeit von der Anzucht- und der Bestrahlungsbedingung.

5 Tage alte unter WL oder WL+UV angezogene Keimlinge wurden jeweils 6 h mit BAP oder B bestrahlt (s. 2.2.1.4.2). Die Thymin-Dimer-Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (6h BAP-Bestrahlung von unter WL-angezogenen Primärblättern = 1) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA aus den strahlungsexponierten Blattstücken. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 9 - 16$ aus jeweils einer Anzucht. Signifikanz der Mittelwerte zum 0h-Mittelwert der gleichen Anzucht: * $p \leq 5\%$; *** $p \leq 0,5\%$.

Einheiten und in den WL+UV- Primärblättern um 3,0 relative Einheiten. Da aufgrund der Bestrahlungsbedingung B (nur UV-B ohne Photoreaktivierungswellenlängen) der Einfluss der Photoreaktivierung auf die Thymin-Dimer-Akkumulation weitestgehend ausgeschaltet war, kann dieser Unterschied von 15 % auf die unterschiedliche UV-B-Absorptionskapazität der WL- und WL+UV-Primärblattstücke (s. Abbildung 3.9) zurückgeführt werden.

Durch die Bestrahlung mit UV-B ohne Photoreaktivierungswellenlänge (Bedingung B) war die Thymin-Dimer-Konzentration um das 2,5 - 3,5fache höher ($p \leq 0,5\%$) als mit Photoreaktivierungswellenlängen (Bedingung BAP). Photoreaktivierung scheint also eine enorme Bedeutung im UV-B-Schutzsystem des Roggen-Primärblattes zu haben. Das Schutzsystem aus Reparatur und Flavonoid-Akkumulation reicht aber offensichtlich nicht aus, um eine Schadensanhäufung während einer Bestrahlung mit schädigender UV-Strahlung zu verhindern.

3.3.2.3 Photoreaktivierung von Thymin-Dimeren

Nach der Bestrahlungsphase wurde die UV-B-Bestrahlung abgeschaltet (= Bedingung PR, s. 2.2.1.4.2) und die Reparatur durch Messung der Thymin-Dimer-Konzentrationen über einen Zeitraum von 3,5 Stunden beobachtet. Nach 3,5 Stunden endete unter den

Standardbedingungen im Tagesgang die Lichtphase und damit die Bedingungen für eine Photoreaktivierung (s. Abbildung 2.2). Parallel dazu wurden Keimlinge im dunkeln inkubiert, um die lichtunabhängige Reparatur zu messen. Diese Messungen in der Reparaturphase dienten dazu 1. überhaupt Photoreaktivierung nachzuweisen, 2. eventuellen Einfluß der Anzuchtbedingungen auf die Reparaturraten festzustellen und 3. zu überprüfen, ob der in der Bestrahlungsphase entstandenen Schaden vollständig repariert werden kann.

WL-Primärblattstücke wiesen unter der Bedingung PR unabhängig von der erfolgten Bestrahlung Thymin-Dimer-Reparatur auf (Abbildung 3.11). Sie stellte reine Photoreaktivierung dar, denn ohne Licht (Dunkelkontrollen) blieb die Konzentration an Thymin-Dimeren gleich. Interessanterweise fand eine signifikante Dimer-Reparatur in den Dunkelkontrollen der WL+UV-Primärblattstücken statt (Abbildung 3.11). UV-Strahlung in der Anzucht scheint die lichtunabhängige Reparatur von Thymin-Dimeren zu induzieren. Die unter der Bestrahlungsbedingung B inkubierten WL+UV-Primärblattstücke wiesen aber unter PR-Bedingungen eine stärkere Reparatur auf als die Dunkelkontrolle, somit fand auch hier Photoreaktivierung statt. Dies ließ sich nicht eindeutig für die BAP-bestrahlten WL+UV-Primärblattstücke feststellen, der Unterschied in der Thymin-Dimer-Konzentration in den

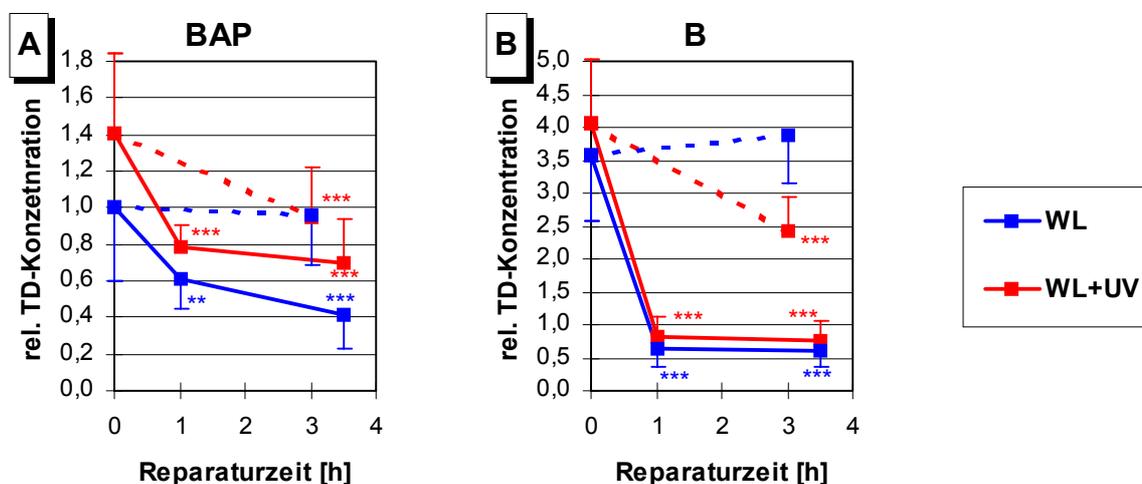


Abbildung 3.11: Reparatur von Thymin-Dimeren in Abhängigkeit von der Anzucht- und der Bestrahlungsbedingung.

Die im Alter von 5 Tagen 6h lang bestrahlten Keimlinge (s. Abbildung 3.10) wurden 3,5 h mit der Photoreaktivierungsbedingung PR (WL+UV ohne UV-B, s. 2.2.1.4.2; durchgezogene Linien) bestrahlt oder im dunkeln inkubiert (**Dunkelkontrolle** nach **BAP**- oder **B**-Bestrahlung; gestrichelte Linien). Die Thymin-Dimer(TD)-Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (6h BAP-Bestrahlung (= 0 h Reparaturzeit) von unter WL-angezogenen Primärblättern = 1) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA aus den strahlungsexponierten Blattstücken. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit n = 9 - 16 aus einer Anzucht. Signifikanz der Mittelwerte zum 0h-Mittelwert der gleichen Kurve: ** p ≤ 1 %; *** p ≤ 0,5 %.

Primärblattstücken der Dunkelkontroll-Keimlinge und der 3,5 h unter Photoreaktivierungsbedingungen inkubierten Keimlinge ist nur schwach signifikant ($p \leq 5 \%$).

Die Photoreaktivierung der Thymin-Dimere erfolgte unter allen Bedingungen sehr schnell, schon nach 1 h wurde ein konstantes Konzentrations-Niveau erreicht, wobei in B-bestrahlten Primärblattstücken eine größere Menge an Thymin-Dimeren repariert wurde (Abbildung 3.11).

Der direkte Vergleich der Thymin-Dimer-Konzentrationen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen am Ende der Reparaturphase mit den Konzentrationen zum Bestrahlungsbeginn verdeutlicht, dass das Primärblatt des Roggens nicht in der Lage war, einmal entstandenen Schaden vollständig zu reparieren (Abbildung 3.12). Durch Photoreaktivierung wurde unabhängig von den unterschiedlich hohen Thymin-Dimer-Konzentrationen, die durch die beiden Bestrahlungsbedingungen BAP und B verursacht wurden, das gleiche Konzentrationsniveau erreicht. Offensichtlich kann ein gewisser Rest-Schaden nicht repariert werden. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass dieses Niveau unter PR-Bedingung schon nach 1 Stunde Reparaturzeit erreicht wurde (Abbildung 3.11). Die Werte PR: B beider Anzuchten und der Wert PR: BAP der WL+UV-Anzucht waren zueinander nicht signifikant unterschiedlich ($p > 10 \%$) und der PR: BAP - Wert der WL-Anzucht war verglichen dazu

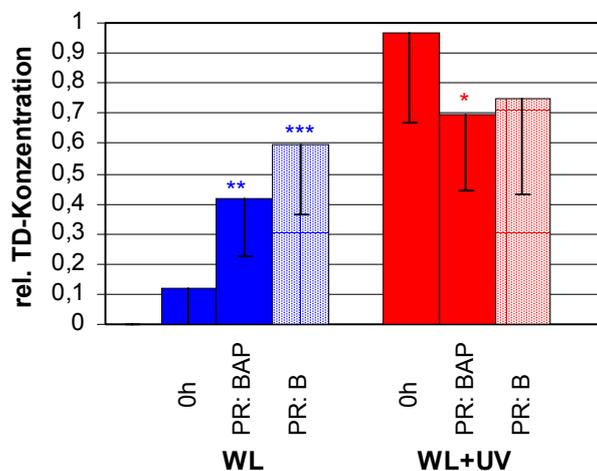


Abbildung 3.12: Reparaturvermögen in Abhängigkeit von der Anzuchtbedingung und einer unterdrückten Photoreaktivierung.

Darstellung der Thymin-Dimer(TD)-Konzentrationen am Ende der Reparaturphase (s. Abbildung 3.11; 3,5 h unter Photoreaktivierungsbedingung PR) im Vergleich zu den Thymin-Dimer-Konzentrationen zu Beginn der Bestrahlungsphase (0h; s. Abbildung 3.10). Die Thymin-Dimer-Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (Normierung wie in Abbildung 3.10) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA aus den strahlungsexponierten Blattstücken. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 9 - 16$. Signifikanz der Mittelwerte zum Mittelwert der jeweiligen Anzucht vor Bestrahlungsbeginn (0h): * $p \leq 5 \%$, ** $p \leq 1 \%$, *** $p \leq 0,5 \%$.

auch nur schwach signifikant ($p \leq 5\%$) niedriger. Es ist daher anzunehmen, dass das durch Photoreaktivierung erreichte Konzentrationsniveau unabhängig von der Anzucht der Keimlinge war.

3.3.3 Phenylpropanoid- und Thymin-Dimer-Akkumulation während der Primärblattentwicklung

5 Tage alte Primärblätter beider Anzuchten waren weder in der Lage während der UV-B-Belastung im Tagesgang eine Schädigung des Erbgutes zu verhindern, noch während der Lichtphase die entstandenen Thymin-Dimere vollständig zu reparieren. Es stellten sich nun die Fragen: Reichte die Dunkelphase ("Nacht") des Tagesganges zur Reparatur aus oder häuften sich immer mehr Thymin-Dimere während der Primärblattentwicklung an? Führt eine weitere Akkumulation von Phenylpropanoiden auch zu einer daraus vielleicht resultierenden Erhöhung der UV-B-Absorptionskapazität und damit zu einer Verringerung der Schadensakkumulation während der täglichen UV-B-Bestrahlungsphase (von 10:00 bis 16:00 Kammerzeit) oder nicht.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Phenylpropanoid-Akkumulation und die Thymin-Dimer-Konzentration unter der WL+UV-Anzuchtbedingung über einen Zeitraum von 18 Tagen beobachtet. Die Bestimmung der Wachstumsparameter Primärblattlänge, Koleoptillänge und Frischgewicht des strahlungsexponierten Primärblattstückes erfolgte am 5., 6., 8., 11., 14. und 18. Tag nach der Aussaat um 10:00 Uhr Kammerzeit (Aussaat-Zeitpunkt und Beginn der täglichen UV-B-Bestrahlung). Die Phenylpropanoid-Gehalte und Thymin-Dimer-Konzentrationen wurden wieder vom strahlungsexponierten Primärblattstück analysiert. Die Ernte hierfür erfolgte ebenfalls um 10:00 Uhr Kammerzeit an den oben angegebenen Tagen. Zusätzlich wurde an denselben Tagen um 16:00 Uhr (Ende der UV-B-Bestrahlung) weitere Blattstücke zur Messung der Thymin-Dimer-Konzentration geerntet. Es wurden auch Anzuchten unter WL-Bedingungen durchgeführt. Die Wachstumsparameter und Phenylpropanoid-Gehalte wurden zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt, wie unter WL+UV-Bedingungen. Die Thymin-Dimer-Konzentrationen wurden aber nur an den Tagen 5 und 18 gemessen. Die Anzuchten unter WL- und WL+UV-Bedingungen erfolgten unabhängig voneinander, d.h. nacheinander im Pflanzenanzuchtschrank.

Im Alter von 11 d waren die Primärblätter unter beiden Anzuchtbedingungen ausgewachsen (Abbildung 3.13, S. 80). Im Vergleich zu WL war unter WL+UV das Wachstum reduziert. Das ausgewachsene Primärblatt hatte unter WL eine Länge von 14,9 cm (Mittelwerte der Messwerte vom 11., 14. und 18. Tag) und unter WL+UV von 11,6 cm (-22 %). Die Koleoptile

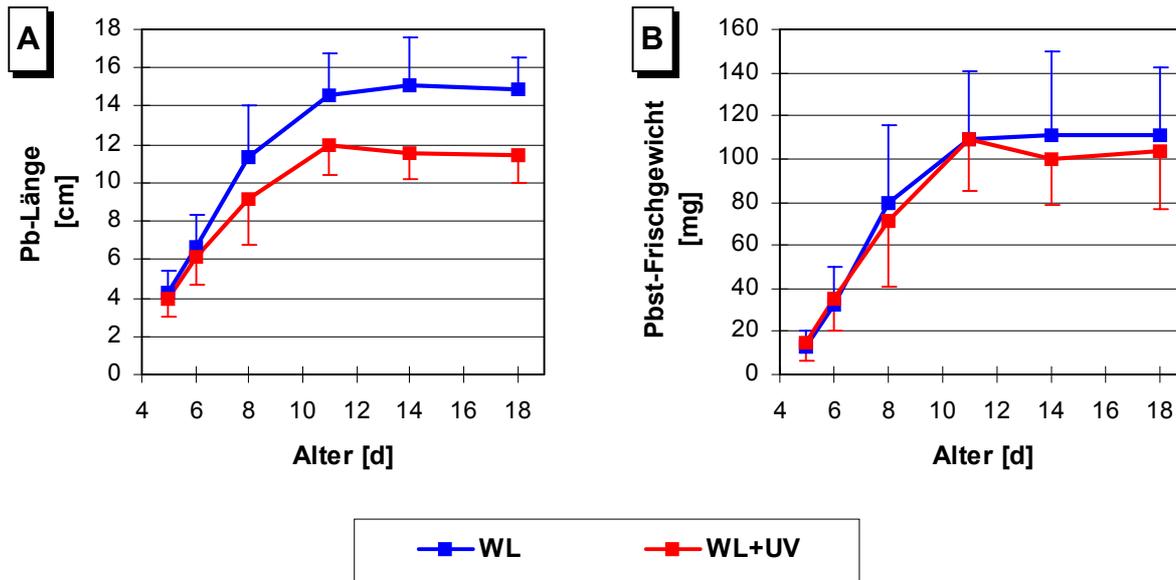


Abbildung 3.13: Wachstumparameter der Primärblattentwicklung unter WL und WL+UV.
A: Primärblatt(Pb)-Länge; **B:** Primärblattstück(Pbst)-Frischgewicht. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 30-45$ aus 2 unabhängigen Anzuchten.

war unter beiden Bedingungen schon am 4. Tag ausgewachsen. Daher lassen sich die Messwerte zusammenfassen. Die Koleoptile wuchs unter WL+UV nur bis zu einer Länge von 1,8 cm, ebenfalls 22 % weniger als unter WL (2,3 cm). Die geernteten Primärblattstücke der beiden Anzuchtbedingungen wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihrem Frischgewicht zueinander auf (Abbildung 3.13 B). Fasst man jedoch auch hier die Messwerte vom 11. bis zum 18. Tag zusammen, ergibt sich eine signifikante ($p \leq 0,5 \%$) Reduktion des Frischgewichtes um 9 % unter WL+UV auf 103 mg (WL: 113 mg).

3.3.3.1 Die Phenylpropanoid-Akkumulation während der Primärblattentwicklung

3.3.3.1.1 Phenylpropanoid-Akkumulation

In der Epidermis sind die löslichen Derivate der beiden Hydroxyzimtsäuren *p*-Cumarsäure und Ferulasäure und die Flavone R_3 und R_4 lokalisiert (s. Abbildung 1.8). Die Isovitexin-Galaktosyltransferase, das Endenzym der R_4 -Synthese, ist sehr wahrscheinlich ein epidermal lokalisiertes Enzym (PETERS, 1986; MAJER, 1996). Bei den Untersuchungen zur Gewebelokalisation der Flavonoide im Roggen-Primärblatt fanden SCHULZ UND WEISSENBÖCK (1986) ausschließlich in der Epidermis Flavonoide mit C-glucosidischen Bindungen, wie das

Isovitexin sie hat. Daher ist anzunehmen, dass Isovitexin ebenfalls in der Epidermis lokalisiert ist. Diese Substanz wurde bei der Auswertung der Epidermis zugeordnet.

Das Mengenverhältnis der drei **Epidermis-Flavone**, ca. 35 % R₃, 55 % R₄ und 10 % Isovitexin verschob sich während der Primärblattentwicklung nicht wesentlich und war auch unabhängig von der Anzuchsbedingung. In der Wachstumsphase des Primärblattes (bis 11 d) stieg der epidermale Flavon-Gehalt im strahlungsexponierten Primärblattstück (Pbst) stark an (Abbildung 3.14 A). Unter WL+UV blieb er ab dem 11. Tag auf einem Wert von 450 nmol / Pbst konstant (Mittelwerte der Messwerte aus den Alterstadien 11 - 18 Tage).

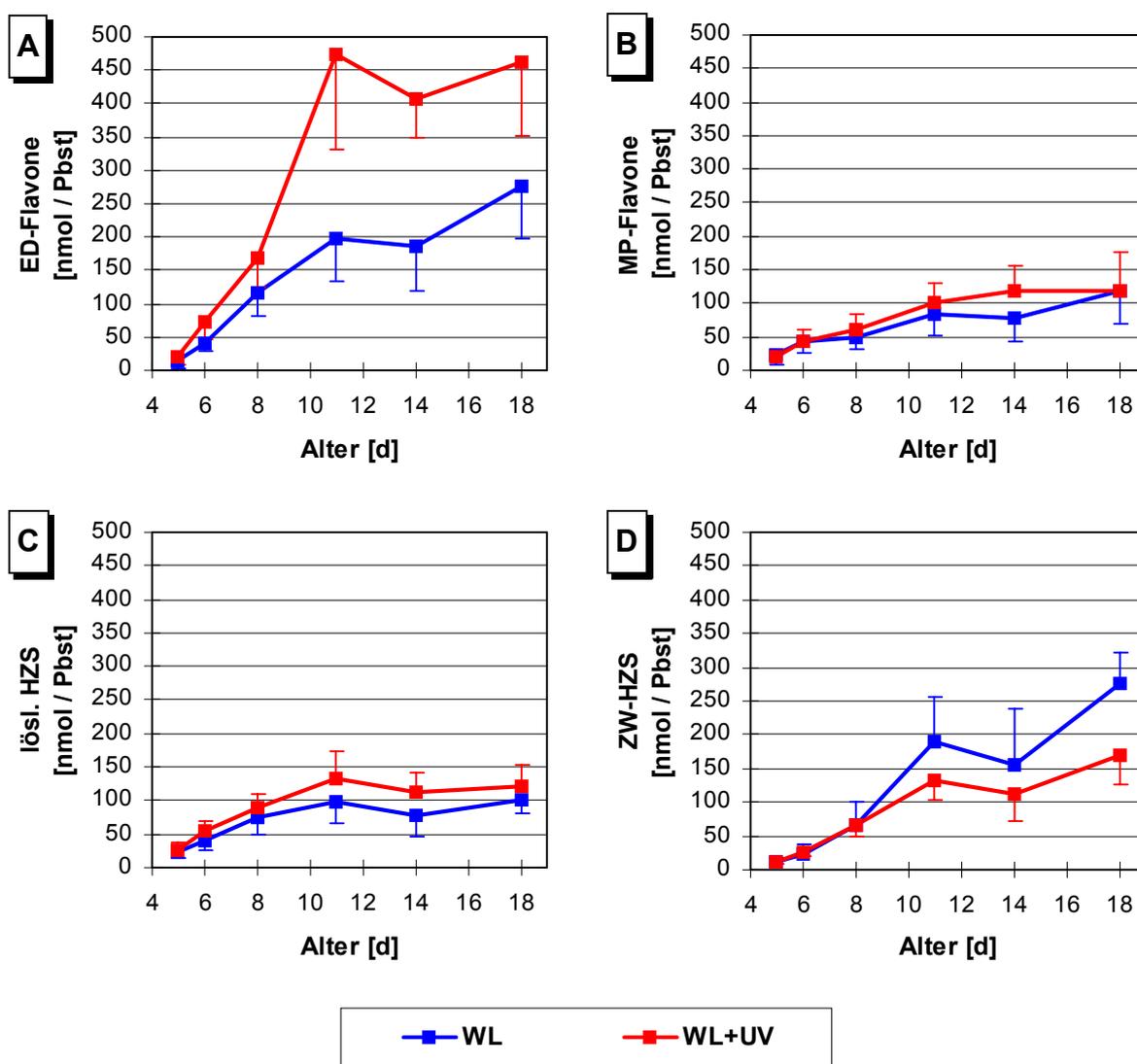


Abbildung 3.14: Akkumulation der Phenylpropanoide während der Primärblattentwicklung unter WL und WL+UV.

Darstellung der Menge an Phenylpropanoiden pro Primärblattstück (Pbst). **ED-Flavone** = R₃ + R₄ + Isovitexin (A); **MP-FLavone** = R₁ + R₂ (B); **lös. HZS** = lösliche *p*-Cumar- + Ferulasäure-Derivate (C); **ZW-HZS** = zellwandgebundene *p*-Cumar- + Ferulasäure (D). Mittelwerte +/- Standardabweichung mit n = 8-14 aus 2 unabhängigen Anzuchten.

Ebenso ist es sehr wahrscheinlich, dass unter WL ein konstanter Wert der Epidermis-Flavon-Menge erreicht wurde (hier 215 nmol / Pbst; Mittelwerte der Messwerte aus den Alterstadien 11 - 18 Tage), auch wenn der Gehalt am 18. Tag deutlich höher lag als vorher. Frühere Versuche unter Starklicht-Bedingungen (Majer, 1996) oder gefiltertem natürlichen Sonnenlicht (Jäger 1993) wie auch eigene Vorversuche hatten gezeigt, dass auch unter Bestrahlungsbedingungen ohne UV-B mit Ende des Wachstums des Primärblattes auch die Akkumulation der Epidermisflavone stoppte. Die verstärkte Akkumulation der Epidermis-Flavone unter WL+UV ist ab dem 6. Tag signifikant ($p \leq 0,5 \%$) und wächst bis auf 210 % des Gehaltes unter WL in der konstanten Phase an. Der Bezug der Gehalte auf das Frischgewicht ergibt eine Konzentrationsabschätzung. Die Konzentration stieg von 1,0 nmol / mg (WL) bzw. 1,5 nmol / mg (WL+UV) auf 2,0 nmol / mg (WL) respektive 4,4 nmol / mg (WL+UV, 220 % des WL-Gehaltes). Dies bedeutet eine Konzentrationserhöhung der Flavone in der Epidermis unter WL+UV über die Wachstumsphase um den Faktor 3.

Die Akkumulation der **löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate** der Ferulasäure und *p*-Cumarsäure verlief ähnlich wie die der Epidermis-Flavone (Abbildung 3.14 C): auch hier stieg der Gehalt in der Wachstumsphase kontinuierlich an (bis 11 d) und blieb danach konstant (WL: von 24 auf 93 nmol / Pbst; WL+UV: von 25 auf 123 nmol / Pbst). In der konstanten Phase waren unter WL+UV gut 30 % mehr Hydroxyzimtsäuren im Primärblattstück nachzuweisen als unter WL ($p \leq 0,5 \%$). Die zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht stimulierte die Ferulasäure-Akkumulation stärker als die *p*-Cumarsäure-Akkumulation: in der konstanten Phase war der Ferulasäure-Gehalt unter WL+UV um 45% gegenüber WL erhöht, der *p*-Cumarsäure-Gehalt nur um knapp 20 %. Damit verschob sich der Anteil der Ferulasäure von 40-50 % auf 50-60 % unter WL+UV. Der Bezug der Daten auf das Frischgewicht ergab, dass das Wachstum des Primärblattes schneller als die Akkumulation verlief. Die Konzentration der löslichen Hydroxyzimtsäuren nahm ab: unter WL halbierte sie sich von 1,8 auf 0,9 nmol / mg, unter WL+UV von 2,1 auf 1,2 nmol / mg.

Der **Flavon-Gehalt im Mesophyll** der Primärblattstücke war deutlich geringer als der Phenylpropanoid-Gehalt in der Epidermis (Abbildung 3.14 B). Er stieg von gut 20 (5. Tag) auf 120 nmol / Pbst (18. Tag) an. Einen signifikanten Unterschied wiesen die beiden Anzuchten, mit Ausnahme der 14 Tage alten Primärblattstücke ($p \leq 1 \%$), nicht auf. Die Akkumulationsverläufe der beiden Mesophyll-Flavone R_1 und R_2 wiesen jedoch den – schon aus Anzuchten unter Schwachlicht (ANHALT UND WEISSENBOCK, 1992) bekannten – charakteristischen Unterschied auf. Der R_1 -Gehalt erreichte am 8. Tag mit 35-40 nmol / Pbst

ein Maximum und fiel danach stark ab. Ab dem 14. Tag war R_1 nicht mehr in allen Proben eindeutig nachweisbar. Hingegen akkumulierte R_2 über die ganze Primärblattentwicklung hinweg, selbst in der Phase ohne Wachstum (ab Tag 11). Der Gehalt stieg von 3 auf ca. 115 nmol / Pbst so stark an, dass es auch zu einer Steigerung der Konzentration bezogen aufs Frischgewicht von 0,23 auf 1,1 nmol / mg kam. Betrachtet man die Summe der Mesophyll-Flavone ($R_1 + R_2$), so lag eine maximale Konzentration am 5. Tag (2,0 nmol / mg).

Nach SCHMITZ (1995) sind die **zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren** mit Ferulasäure als Hauptkomponente zwar in allen Zellwänden des Primärblattes zu finden, besonders viel scheint jedoch in den Leitbündel-Zellwänden und eben auch in den Außenwänden der Epidermen zu sein (vergleiche auch Fluoreszenz-Mikroskopie, 3.3.1.2). Daher wurden sie auch für diese Untersuchungen analysiert. Die Hauptkomponente mit 80 - 85 % stellte die Ferulasäure dar, der Rest war *p*-Cumarsäure. Die Menge an Zellwand-Hydroxyzimtsäuren nahm stetig über die Primärblattentwicklung zu und stoppte auch nicht mit dem Ende des Primärblattwachstums (Abbildung 3.14 D).

3.3.3.1.2 UV-B-Absorptionskapazität der Gewebe

Wie wirkte sich die in den einzelnen Phenylpropanoidpools (epidermale Flavone, epidermale Hydroxyzimtsäure-Derivate, Mesophyll-Flavone, zellwandgebundene Hydroxyzimtsäuren) doch sehr unterschiedliche Akkumulationsdynamik während der Primärblattentwicklung auf die UV-B-Absorptionskapazität (315 nm) des strahlungsexponierten Primärblattstückes aus? Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die UV-B-Absorptionskapazität dieser Pools auf das Frischgewicht bezogen, um direkte Vergleiche zwischen verschiedenen Altersstadien und Anzuchtbedingungen zu ermöglichen.

Der Hauptanteil an der UV-B-Absorptionskapazität der Primärblattstücke stammte von den epidermal lokalisierten löslichen Phenylpropanoiden. Ihr Anteil betrug unter WL 50 - 65 % und lag unter WL+UV mit 60 - 75 % deutlich höher. Doch trotz steigender Gehalte besonders an den dort lokalisierten Flavonen, blieb die epidermale UV-B-Absorptionskapazität während der Primärblattentwicklung unter WL mehr oder weniger konstant (Abbildung 3.15 A, S. 84). Unter WL+UV (Abbildung 3.15 B) lag die epidermale UV-B-Absorptionskapazität in den Primärblattstücken um 25 % (5. Tag; $p \leq 5\%$) bis 100 % (14. Tag; $p \leq 0,5\%$) höher. Diese Steigerung ist hauptsächlich auf die stärkere Akkumulation der epidermalen Flavone zurückzuführen. Sie führte sogar zu einem Anstieg der epidermalen UV-B-Absorptionskapazität auf 154 % von derjenigen am 5. Tag ($p \leq 0,5\%$ ab 11. Tag).

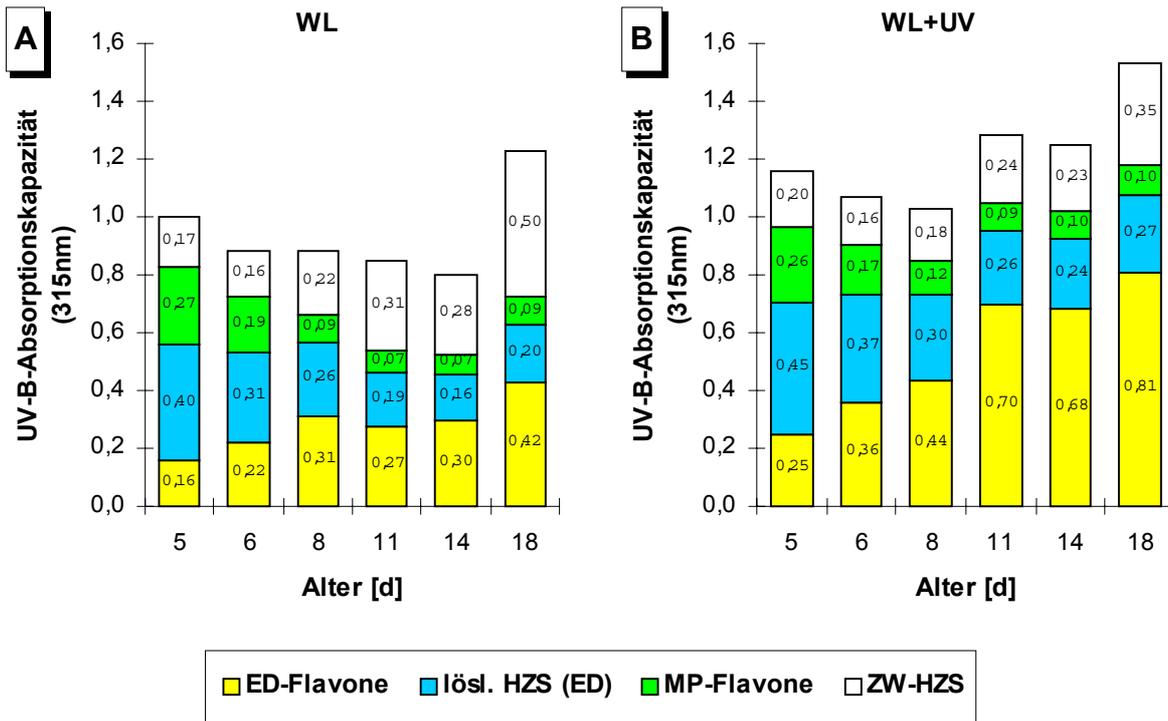


Abbildung 3.15: UV-B-Absorptionskapazität der gewebespezifischen Phenylpropanoid-Pools während der Primärblattentwicklung unter WL und WL+UV.

Die UV-B-Absorptionskapazität ist bezogen auf das Frischgewicht dargestellt. **ED-Flavone**: R₃, R₄ und Isovitexin; **lösl. HZS (ED)**: *p*-Cumarsäure und Ferulasäure (epidermal lokalisiert); **MP-Flavone**: R₁ und R₂. Normierung: Summe der UV-B-Absorptionskapazitäten aller drei Pools von 5 Tage alten unter WL angezogene Primärblattstücken = 1. Mittelwerte mit n = 8-14 aus 2 unabhängigen Anzuchten.

Aber nicht nur die Flavone R₃ und R₄ hatten eine große Bedeutung für die epidermale Strahlungsabsorption, auch die löslichen Hydroxyzimtsäuren leisteten einen wichtigen Beitrag, besonders für die frühen Altersstadien. Ihr Anteil an der epidermalen UV-B-Absorptionskapazität betrug im Alter von 5 Tagen 70 % (WL) bzw. 65 % (WL+UV). Selbst am 18. Tag betrug der Anteil noch 32 % (WL) bzw. 25 % (WL+UV). Aufgrund der Daten zu den Gehalten der beiden epidermalen Pools (s.o.) könnte man die löslichen Hydroxyzimtsäuren als konstitutive (geringe Akkumulation während des Wachstums, geringe Reaktion auf UV-Strahlung) und die Flavone R₃ und R₄ als dynamische Komponente (hohe Akkumulation während des Wachstums, deutliche Reaktion auf UV-Strahlung) in der Strahlungsabsorption der Epidermis bezeichnen.

Der Anteil der Mesophyll-Flavone an der gesamten UV-B-Absorptionskapazität des Primärblattstückes fiel von 27 % (WL) bzw. 23 % (WL+UV) während der Entwicklung schnell auf 10 % (8. Tag) und weniger. REUBER (1996a) zeigte jedoch, dass trotz der hohen Mengen an Phenylpropanoiden in der Epidermis unter Starklichtbedingungen (mit UV-B) ein geringer Teil

schädigende UV-B-Strahlung (ca. 5 %) bis in das Mesophyll eindrang. Daher haben auch die geringen Mengen an Mesophyll-Flavonen noch eine Bedeutung in der UV-B-Attenuation und könnten Schäden verhindern. Die UV-B-Absorptionskapazität von Mesophyll und Epidermis zusammen verringerte sich zunächst um ca. 15 % ($p \leq 5 \%$), stieg dann aber wieder und war am 18. Tag um 20 % höher als in 5 Tage alten Primärblattstücken ($p \leq 5 \%$).

Der Anteil der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren an der UV-B-Absorptionskapazität betrug unter WL+UV um die 20 %. Welcher Anteil dieser Substanzen aber nun epidermal lokalisiert war (3.3.1.2) läßt sich nicht sagen und erschwert damit die Beurteilung ihrer Bedeutung für den UV-Schutz.

3.3.3.2 Thymin-Dimer-Akkumulation

Während der Keimlingsentwicklung häuften sich kontinuierlich Thymin-Dimere in den strahlungsexponierten Primärblattstücken an (Abbildung 3.16, S. 85). Die während der täglichen UV-B-Belastung entstandenen Thymin-Dimere konnten nicht wieder bis zur nächsten

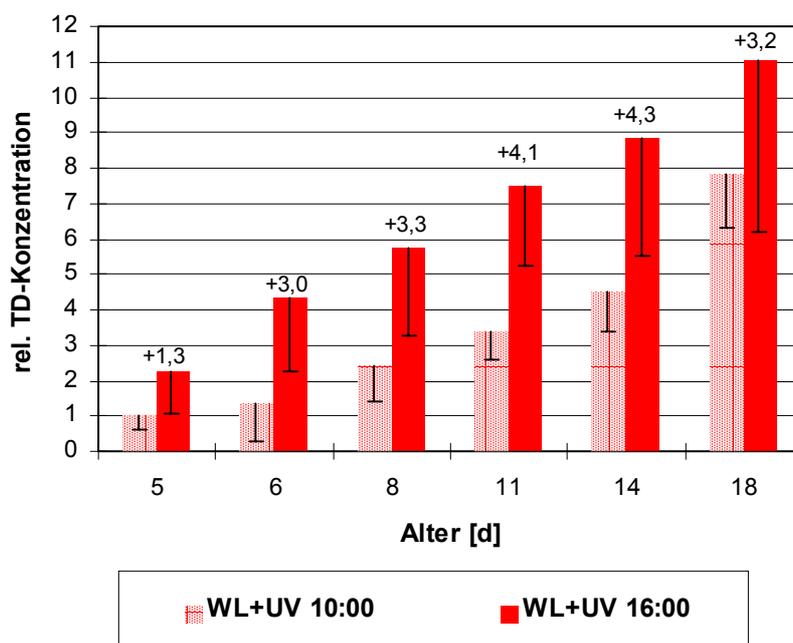


Abbildung 3.16: Anhäufung von Thymin-Dimeren während der Primärblattentwicklung unter WL+UV.

Die Thymin-Dimer-Konzentration wurde in den verschiedenen Altersstadien um 10:00 Uhr Kammerzeit (Beginn der täglichen UV-B-Belastung) und 16:00 Uhr Kammerzeit (Ende der UV-B-Belastung) bestimmt. Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (Thymin-Dimer-Konzentration um 10:00 Uhr am 5. Tag = 1) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA. Die Zahlen an den Säulen geben die Differenz zwischen den 16:00 Uhr - und den 10:00 Uhr - Messwerten an. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 7-10$ aus 2 unabhängigen Anzuchten.

UV-B-Belastung repariert werden. So stieg die Thymin-Dimer-Konzentration, die um 10:00 Uhr Kammerzeit (Beginn der UV-B-Belastung) noch vorhanden war, bis zum 18. Tag auf das 8fache der Konzentration vom 5. Tag an ($p \leq 0,5 \%$). Die Thymin-Dimer-Konzentration erhöhte sich während der 6stündigen UV-B-Belastung in den untersuchten Altersstadien immer um den annähernd gleichen Betrag (s. Zahlen an den Säulen in Abbildung 3.16).

Die Kontrollen aus der WL-Anzucht vom 5. und 18. Tag nach Aussaat ergaben keine im Bereich der Fehlergrenzen messbare Thymin-Dimer-Entstehung.

3.4 Gerste

Als ein weiteres Gramineen-System wurde die Gerste untersucht. Durch den Vergleich der flavonoidarmen Mutante *ant 30-310*, im weiteren kurz als *ant* oder Mutante bezeichnet, mit ihrer korrespondierenden Muttervarietät *Ca 33787*, im weiteren kurz *Ca* oder Muttervarietät genannt, konnte hier vor allem die grundsätzliche Bedeutung der Flavonoid-Akkumulation für den Schutz vor Erbgut-schädigender UV-Strahlung untersucht werden.

3.4.1 Die Phenylpropanoide im Primärblatt von *Ca* und *ant*

3.4.1.1 Analyse der Phenylpropanoide

Die Charakterisierung der **löslichen phenylpropanoiden Inhaltsstoffe** erfolgte wie schon beim Roggen durch HPLC der methanolischen Rohextrakte (s. 2.2.2.4) und die Identifizierung der Flavonoide analog mittels Cochromatographie mit Reinsubstanzen und dem Vergleich der während des HPLC-Laufes aufgenommenen UV-Spektren (230 - 370 nm, s. 2.2.2.4.3). Der Gradient für die Versuche an Gerste wurde neu entwickelt (Gradient 3, s. 2.2.2.4.1) und ermöglichte es, die Derivate der löslichen Hydroxyzimtsäuren schon aus dem Rohextrakt zu analysieren. Wie bei dem neuen Roggen-Gradienten erfolgte die Detektion bei 315 nm um die Hydroxyzimtsäuren besser detektieren und die UV-B-Absorptionskapazität der einzelnen Substanzen bestimmen zu können.

In größeren Mengen kamen nur 2 Flavonoide in der Muttervarietät *Ca* (Abbildung 3.17, S. 87, oberes Chromatogramm) vor: als Hauptkomponente das Flavon Saponarin und als Nebenkomponeute Lutonarin (vgl. Abbildung 1.9). Isoorientin und Isovitexin (vgl. Abbildung 1.9), vermutliche Vorstufen von Lutonarin bzw. Saponarin, kamen nur in Spuren vor. Sie machten in der Summe etwa 3 % vom Gesamtflavonoid-Gehalt aus. Sie wurden daher in dieser

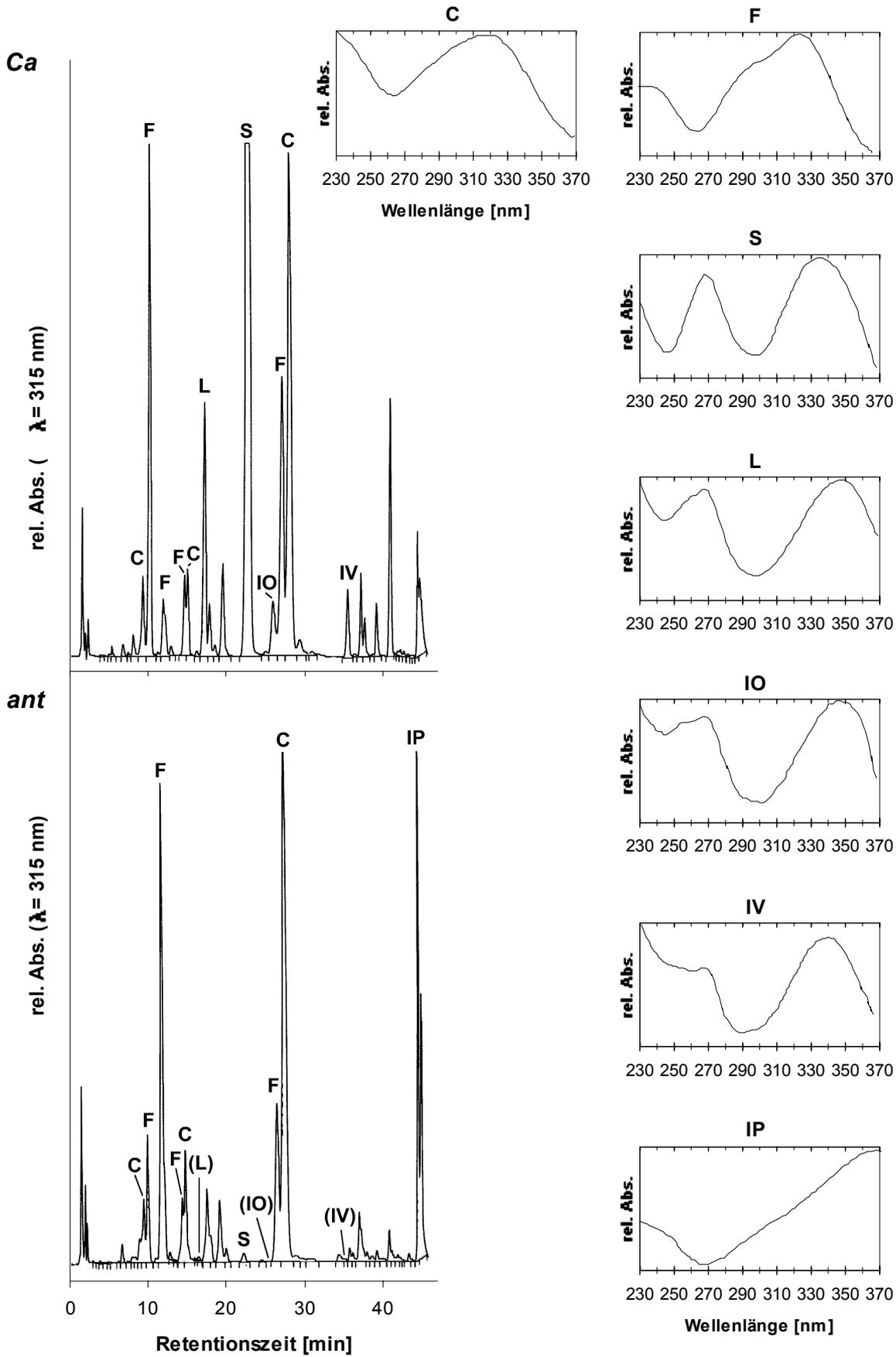
Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Hinter Isovitexin eluierten noch weitere Substanzen mit Saponarin-ähnlichem Spektrum, wurden aber nicht weiter identifiziert. Auch diese kamen nur in Spuren vor.

In der Muttervarietät konnten im Vergleich zum Roggen weniger verschiedene Hydroxycimtsäure-Derivate festgestellt werden. Wie schon bei dem neuen Roggen-Gradienten wurden die Substanzen anhand ihrer Absorptionscharakteristika den beiden Hydroxycimtsäuren als ihrem jeweiligen Chromophor zugeordnet. Die drei mit C gekennzeichneten Substanzen wiesen ein Maximum im Bereich von 310 - 318 nm eine schwach ausgeprägte Schulter bei 300 - 303 nm auf und wurden der *p*-Cumarsäure zugeordnet (Maximum: 310 nm, schwache Schulter bei 300 nm). Wird in dieser Arbeit im folgenden eine Menge an löslichen *p*-Cumarsäure-Derivate angegeben, stellt diese die Summe dieser drei Substanzen dar. Die Menge wurde mit einem einheitlichen mittels freier *p*-Cumarsäure bestimmten Eichfaktor (s. Tabelle 2.4) berechnet. Der Ferulasäure (Maximum: 322 nm, stark ausgeprägte Schulter bei 300 nm) wurden die 4 mit F bezeichneten Peaks zugeordnet. Sie hatten Absorptionsmaxima zwischen 321 und 326 nm, die stark ausgeprägte Schulter lag bei ca. 305 nm. Sinapinsäure-ähnliche Spektren (Maximum: 323 nm, keine Schulter) wurden nicht gefunden. Nach alkalischer Hydrolyse wurden *p*-Cumarsäure und Ferulasäure, jedoch nicht Sinapinsäure nachgewiesen. Wie schon beim Roggen erklärt, könnte sich wegen der nicht unterscheidbaren Spektren von Ferula- und Kaffeesäure unter den mit F bezeichneten Substanzen auch Kaffeesäure-Derivate verbergen. Da es in dieser Arbeit im wesentlichen um die Absorptionseigenschaften der Substanzen ging, sollte diese Einteilung der Substanzen in *p*-Cumarsäure- und Ferulasäure-Derivate ausreichen.

Die Mutante *ant* wies nur sehr geringe Flavonoidmengen auf (unteres Chromatogramm). Eindeutig zu identifizieren und auch zu quantifizieren war nur Saponarin. Lutonarin war, wenn

Abbildung 3.17 (nächste Seite): HPLC-Chromatogramme methanolischer Rohextrakte aus Primärblättern von *Ca* und *ant* mit Spektren der wichtigsten eluierenden Substanzen.

Die Primärblätter von *Ca* (oberes Chromatogramm) und *ant* (unteres Chromatogramm) wurden im Alter von 6 d nach einer Anzucht unter WL+UV extrahiert (s. 2.2.1.4). Die HPLC erfolgte mit Gradient 3 (s. 2.2.2.4.3) bei einer Detektionswellenlänge von 315 nm. **Lut**: Lutonarin; **Sap**: Saponarin; **IO**: Isoorientin; **IV**: Isovitexin; **C**: *p*-Cumarsäure-Derivate; **F**: Ferulasäure-Derivate; **IP**: Isosalipurposid. Die dargestellten Absorptionsspektren von 230 - 370 nm der im Chromatogramm beschrifteten eluierenden Substanzen wurden während eines HPLC-Laufs dieses Rohextraktes aufgenommen (s. 2.2.2.4.3). Aus technischen Gründen konnten mit dem Detektor keine Spektren bei Wellenlängen > 370 nm aufgenommen werden. Für die Derivate der beiden Hydroxycimtsäuren *p*-Cumarsäure und Ferulasäure ist nur jeweils ein charakteristisches Spektrum dargestellt.



es überhaupt detektiert wurde, von benachbarten Peaks überlagert. Isoorientin und Isovitexin konnten nicht detektiert werden. Zur Verdeutlichung sind in dem charakteristischen Chromatogramm eines Rohextraktes aus einem *ant*-Primärblatt zwar die Positionen dieser drei Substanzen markiert, aber deren Beschriftung wurde in Klammern gesetzt. Dafür trat bei der Mutante das Chalkonglucosid Isosalipurposid (s. 1.2.2 und Abbildung 1.10) auf.

Im wesentlichen waren in der Mutante die gleichen Hydroxyzimtsäure-Derivate wie in der Muttervarietät vorhanden. Durch Chromatographie von Mischproben aus *Ca* und *ant* konnte gezeigt werden, dass bis auf das Isosalipurposid, keine neuen Substanzen in auffälligen Mengen in der Mutante akkumulierten. Allerdings verschob sich z.T. der Anteil der einzelnen Substanzen innerhalb der beiden Gruppen der *p*-Cumarsäure und Ferulasäure-Derivate.

Da kein reines Isosalipurposid zur Eichung der HPLC zur Verfügung stand, war eine Berechnung der Stoffmenge in nmol nicht möglich. Ein Vergleich mit den anderen Substanzen war nur sinnvoll auf der Ebene der UV-B-Absorptionskapazität, die sich unmittelbar aus den Peakflächen in den Chromatogrammen berechnete (s. 2.2.2.4.2). Daher erfolgte eine Berücksichtigung dieser Substanz nur in den entsprechenden Abbildungen zur UV-B-Absorptionskapazität.

3.4.1.2 *In situ*-Lokalisation der Flavone im Primärblatt mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Im Gegensatz zum Roggen weisen Epidermen und Mesophyll des Gersten-Primärblattes das gleiche Flavonoid-Muster auf (s. 1.2.2). Über die Verteilung der Gersten-Flavone innerhalb der einzelnen Gewebe ist nichts bekannt. Mit Hilfe der durch Naturstoffreagenz A induzierten Fluoreszenz der Flavone (vgl. Roggen, 3.3.1.2) sollte hier die Gewebe-interne Flavon-Verteilung untersucht werden. Auf der Dünnschicht-Platte zeigt der Saponarin-Naturstoffreagenz A-Komplex nach UV-Anregung ($\lambda_{\max} = 364 \text{ nm}$) der Fluoreszenz die gleiche gelbe Farbqualität wie die Roggen-Epidermisflavone, während der Naturstoffreagenz A-Komplex mit Lutonarin gelborange fluoresziert.

Die verschiedenen Handschnitte – quer, längs, flächig – von Primärblättern der Muttervarietät und der Mutante wurden in Puffer (100 mM NaKP_i pH 5,8, 1 mM CaCl₂) ohne und mit 0,1 % (w/v) Naturstoffreagenz A inkubiert (Abbildung 3.18, S. 90 u. Abbildung 3.19, S. 92). Plasmolyse mit 0,5 % Sorbitol, wie sie an Schnitten von Roggen-Primärblättern durchgeführt wurde, führte zu Artefakten bei der Behandlung mit Naturstoffreagenz A. Daher wurde hier darauf verzichtet.

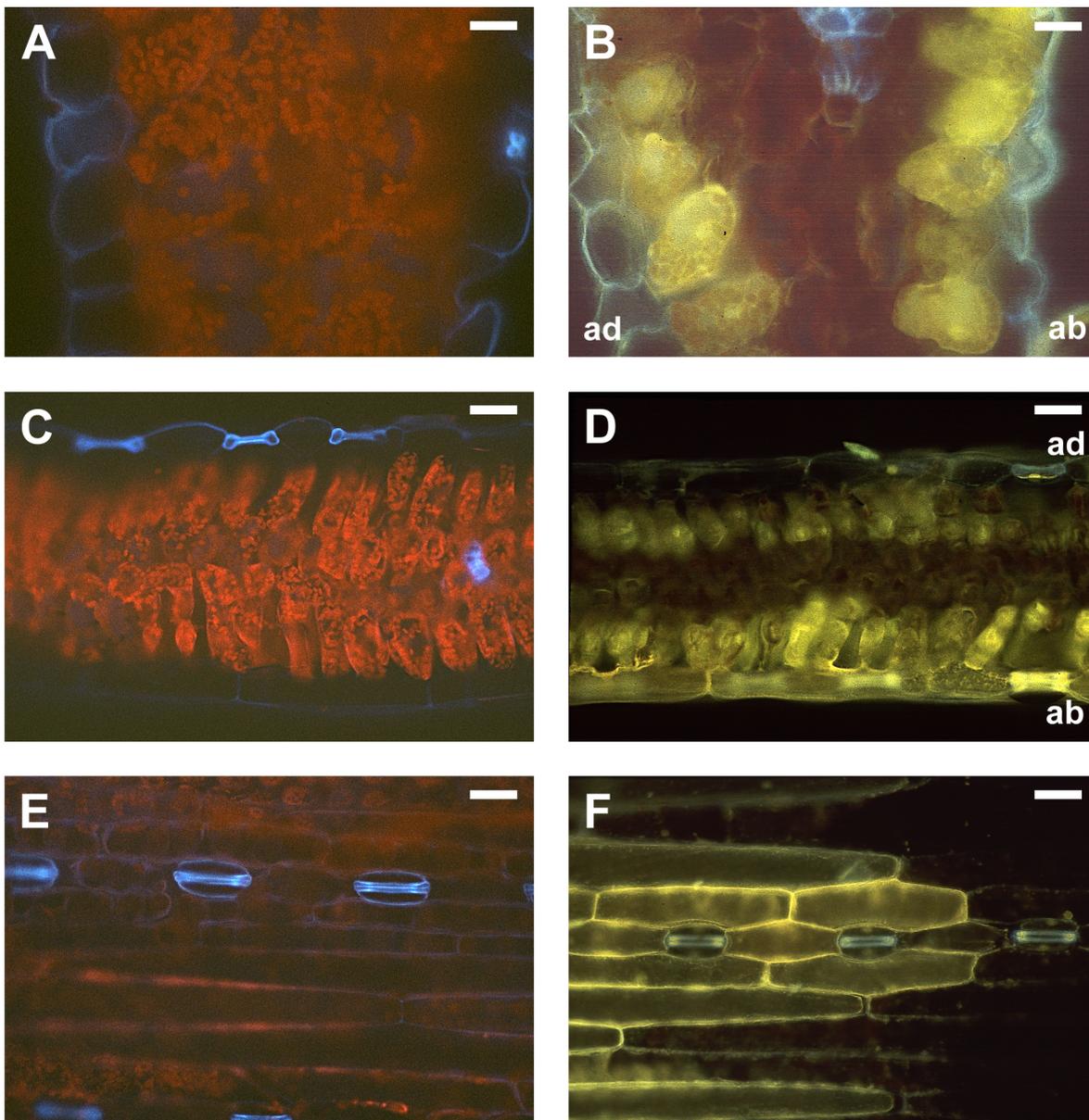


Abbildung 3.18: Histochemischer Nachweis von Flavonen im Primärblatt der Gerste *Ca*.

Abgebildet sind Querschnitte (**A**, **B**), Längsschnitte (**C**, **D**) und Flächenschnitte (**E**, **F**) von Primärblättern 6 Tage alter, unter WL+UV angezogener Gersten-Keimlinge der Muttervarietät *Ca*. Die Schnitte wurden auf Objektträgern in Puffer (100 mM NaKPi pH 5,8, 1 mM CaCl₂) ohne (**A**, **C**, **E**) bzw. mit (**B**, **D**, **F**) 0,1 % Naturstoffreagenz A inkubiert (s. 2.2.4). **ad**: adaxiale Seite; **ab**: abaxiale Seite. Aufnahmen an einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop (Anregungsfilter: 340-380 nm). Die Balken repräsentieren 25 μ m (**A**, **B**) bzw. 50 μ m (**C** - **F**).

Anmerkung: Durch die Reproduktion der am konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommenen Bilder kann es zu geringen Farbverschiebungen kommen.

Quer-, Längs- und Flächenschnitte 6 Tage alter Primärblätter der Gerste *Ca* zeigten ohne Naturstoffreagenz A (Abbildung 3.18 A, C, E) neben der roten Chlorophyll-Fluoreszenz die blaue Autofluoreszenz in den Zellwänden. Sie war wie im Roggen hauptsächlich in den Epidermis-Außen- und -Antiklinalwänden, sowie in den Leitbündel-Zellwänden zu finden und repräsentiert die Verteilung von zellwandgebundener Ferulasäure bzw. im Xylem und der Mestomscheide von Lignin. Der Hinweis auf Ferulasäure wurde an den Schnitten mittels Ammonium-induzierten bathochromen Shift erhalten. Der Nachweis zellwandgebundener Ferulasäure erfolgte durch alkalische Hydrolyse des nach methanolischen Extraktion der löslichen Phenylpropanoide von Primärblättern verbleibenden Pellets (vgl. 3.3.1.2).

Die mit Naturstoffreagenz A (0,1 % (w/v) in Puffer) inkubierten Schnitte (Abbildung 3.18 B, D, F) zeigten die für Flavone typische Gelbfluoreszenz. Dieses Signal war eindeutig subepidermal lokalisiert (Abbildung 3.18 B, D). Zusätzlich war immer wieder eine ungleiche Verteilung der Fluoreszenz zwischen ad- und abaxialer Seite des Primärblattes zu beobachten. Auf der abaxialen Seite (z.B. Abbildung 3.18 D) war oft ein stärkeres Signal als auf der adaxialen Seite zu sehen. Dies ließ sich nicht immer eindeutig an allen Schnitten beobachten. Wenn aber Unterschiede auftraten, war das stärkere Fluoreszenzsignal immer auf der abaxialen Seite.

Auch die Epidermis zeigte ein gelbliches Fluoreszenzsignal nach Inkubation der Schnitte mit Naturstoffreagenz A. In der abaxialen Epidermis war das Signal jedoch stärker als in der adaxialen (Abbildung 3.18 D). Der Flächenschnitt der abaxialen Epidermis (F) belegte die Verteilung der Sekundärfluoreszenz auf Epidermiszellen, Schließ- und Nebenzellen. Wie schon im Roggen wiesen die Schließzellen eine sehr starke Fluoreszenz auf. Interessant war, dass im Gegensatz zum Roggen die Nebenzellen nie Fluoreszenz im Zelllumen aufwiesen, also frei von Flavonen zu sein schienen. Nur im Bereich des Zellkerns war ein Fluoreszenz-Signal zu beobachten. HUTZLER ET AL. (1998) fanden eine solche Kern-assoziierte Fluoreszenz auch an Kiefernadeln. Jedoch konnte nicht geklärt werden, ob es sich tatsächlich um die Detektion Kern-assoziiertes Flavonoide, um Artefakte oder um andere Substanzen im Kern, die ebenfalls mit Naturstoffreagenz A komplexieren, handelte.

Die Zellen rechts im Flächenschnitt wiesen keine Fluoreszenz auf, da sie zerschnitten waren und damit deren Protoplasten zerstört und ausgelaufen waren. Dies belegt, dass die Signale der intakten Zellen aus dem Protoplasten stammten und nicht auf zellwandgebundene Verbindungen zurückzuführen waren.

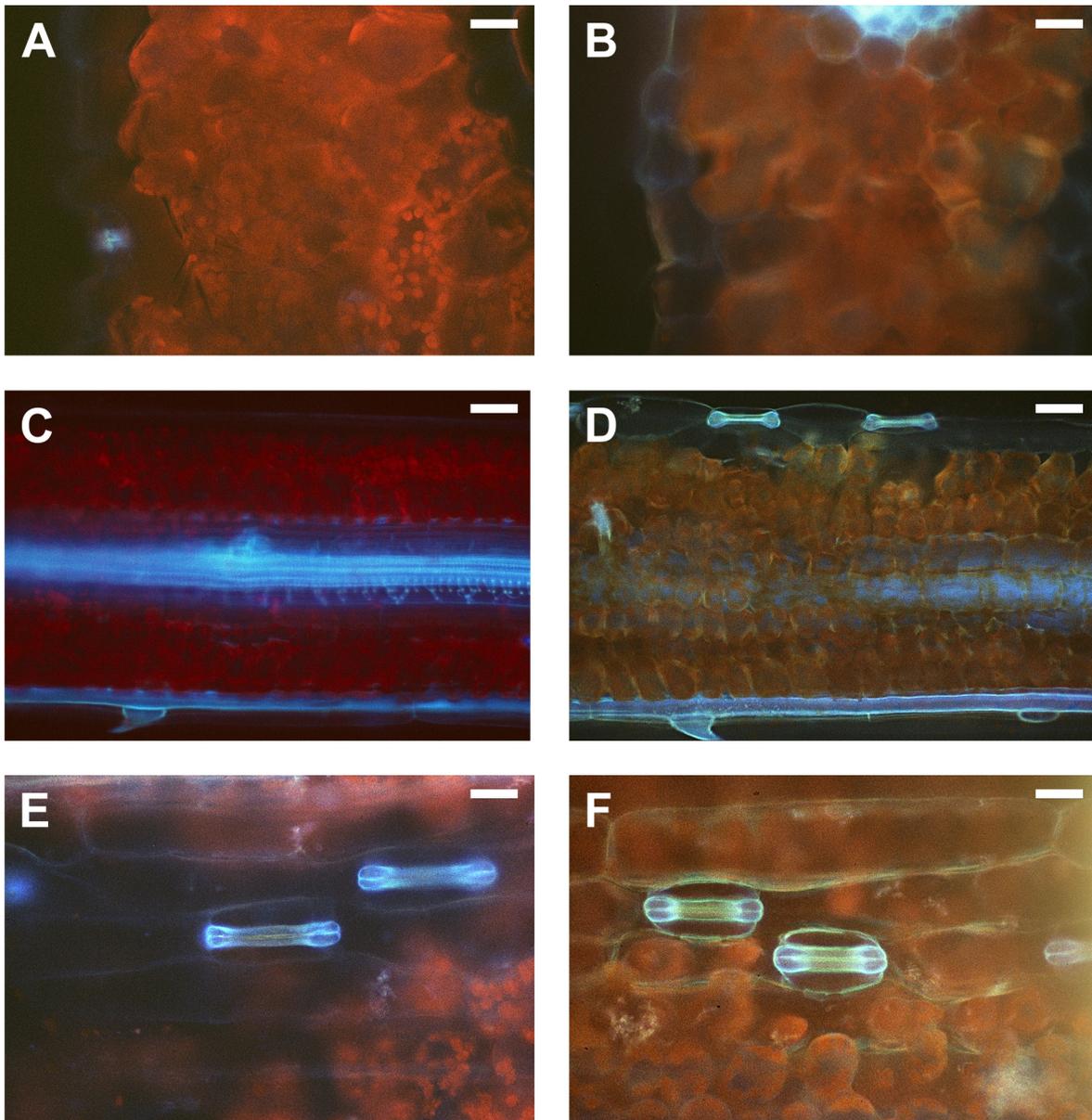


Abbildung 3.19: Histochemische Lokalisation von Flavonen im Primärblatt der Gersten-Mutante *ant*.

Abgebildet sind Querschnitte (**A**, **B**), Längsschnitte (**C**, **D**) und Flächenschnitte (**E**, **F**) von Primärblättern 6 Tage alter, unter WL+UV angezogener Gersten-Keimlinge der Mutante *ant*. Die Schnitte wurden auf Objektträgern in Puffer (100 mM NaKPi pH 6,8, 1 mM CaCl₂) ohne (**A**, **C**, **E**) bzw. mit (**B**, **D**, **F**) 0,1% Naturstoffreagenz A inkubiert (s. 2.2.4). Aufnahmen an einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop (Anregungsfilter: 340-380 nm). Die Balken repräsentieren 25 µm (**A**, **B**, **E**, **F**) bzw. 50 µm (**C**, **D**).

Anmerkung: Durch die Reproduktion der am konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommenen Bilder kann es zu geringen Farbverschiebungen kommen.

Wie schon bei den Aufnahmen am Primärblatt des Roggens erläutert, verblasste die rote Chlorophyll-Fluoreszenz nach Naturstoffreagenz A-Behandlung sehr schnell und ist dadurch und durch Überlagerung mit dem gelben Fluoreszenz-Signal, auf den entsprechenden Aufnahmen kaum oder gar nicht zu sehen.

Die beobachteten gelben Fluoreszenzsignale sind wahrscheinlich ausschließlich auf Saponarin und nicht auf Lutonarin zurückzuführen. Hierfür spricht einmal die Farbqualität: auf einer Dünnschicht-Platte weist Saponarin mit Naturstoffreagenz A eine gelbe Fluoreszenz auf, während Lutonarin eine deutlich davon unterscheidbare gelb-orange Fluoreszenz emittiert. Außerdem war der Lutonarin-Gehalt in den untersuchten 6 Tage alten Primärblattstücken mit 7 % des Saponarin-Gehaltes so gering, dass ein auftretendes Fluoreszenz-Signal des Lutonarin-Naturstoffreagenz A-Komplexes vermutlich im Vergleich zum Signal des entsprechenden Saponarin-Komplexes zu gering war, um detektiert zu werden, bzw. es wurde von diesem überlagert.

Die gleiche Schnittserie ohne und mit Naturstoffreagenz A an der Gerste *ant* demonstriert klar die kaum vorhandene Flavon-Akkumulation in der Mutante (Abbildung 3.19). Die blaue Autofluoreszenz und die rote Chlorophyll-Fluoreszenz waren genauso wie in der Muttervarietät verteilt (A, C, E). Nach Behandlung mit Naturstoffreagenz A wirkte die rote Chlorophyllfluoreszenz leicht zum orange hin verschoben und war blasser. Ob dies auf eine Vermischung einer in geringem Maße vorhandenen Gelb-Fluoreszenz mit der roten Chlorophyll-Fluoreszenz oder auf die schon beim Roggen beschriebene Beeinflussung der Chlorophyll-Fluoreszenz zurückzuführen war, ließ sich nicht klären. Das Fehlen jeglicher klarer Gelb-Fluoreszenz demonstriert beeindruckend die (fast völlige) Abwesenheit der Flavone und deckt sich mit den Ergebnissen der HPLC (s. Abbildung 3.17).

3.4.2 Einfluss von UV-Strahlung auf Phenylpropanoid-, Thymin-Dimer-Akkumulation und Thymin-Dimer-Reparatur in einem frühen Entwicklungsstadium der Gersten-Primärblätter

Die zu 5 Tage alten Roggen analogen Experimente in einem Frühstadium der Keimlingsentwicklung wurden an der Gerste im Alter von 6 Tagen durchgeführt, da die Gerste um einen Tag verzögert auskeimt. Auch hier wurden die Untersuchungen am strahlungsexponierten Teil des Primärblattes durchgeführt.

	<i>Ca</i>				<i>ant</i>			
	WL		WL+UV		WL		WL+UV	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Längen [cm]:								
Primärblatt	6,4	0,6	5,6	0,5	6,0	0,7	5,5	0,7
Koleoptile	1,9	0,2	1,7	0,3	1,8	0,2	1,7	0,2
Blattstück	4,6	0,6	3,8	0,5	4,0	0,6	3,7	0,7
Frischgewichte [mg]:								
Blattstück	56	13	46	10	43	11	45	13

Tabelle 3.2: Wachstumsparameter von Gersten-Primärblättern der Sorte *Ca* und *ant* im Alter von 6 Tagen unter WL und WL+UV.

Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) mit $n = 98 - 138$ aus jeweils zwei unabhängigen Anzuchten.

Die Tabelle 3.2 fasst die gemessenen Wachstumsparameter für 6 Tage alte, unter den beiden Anzuchtbedingungen WL und WL+UV angezogenen Primärblätter der Muttervarietät und der Mutante zusammen. Wie beim Roggen waren die Primärblätter der Muttervarietät unter WL+UV um knapp 13 % kürzer ($p \leq 0,5 \%$), die Koleoptile jedoch nur um ca. 8 % ($p \leq 0,5 \%$). Daher waren auch die strahlungsexponierten Blattstücke unter den beiden Anzuchtbedingungen unterschiedlich lang (-16 % unter WL+UV, $p \leq 0,5 \%$) und die auch Frischgewicht waren verschieden (-17 % unter WL+UV, $p \leq 0,5 \%$).

Schon unter WL wuchs die Mutante langsamer als die Muttervarietät. Die verschiedenen Längenparameter waren um 5 - 10 % reduziert ($p \leq 0,5 \%$), das Frischgewicht sogar um knapp 24 %. Die im Vergleich zu den anderen Parametern wesentlich stärkere Reduktion des Frischgewichtes war vermutlich auf eine geringere Dicke der *ant*-Primärblätter zurückzuführen. REUBER ET AL. (1996b) fand, dass die Mutante *ant 287* um ca. 20 % dünnere Blätter als die korrespondierende Muttervarietät *Hege 550/75* hatte. Erstaunlicherweise fiel die Reduktion des Längenwachstums unter WL+UV in der Mutante nicht so stark aus wie bei der Muttervarietät *Ca*, sie betrug nur 7 - 8 % ($p \leq 0,5 \%$). Das Frischgewicht des Primärblattstückes war hingegen gleich.

3.4.2.1 Der Phenylpropanoidgehalt 6 Tage alter Primärblätter

Im Gegensatz zum Roggen wiesen die Primärblätter der Gersten-Muttervarietät mit dem Flavon Saponarin eine klare Hauptkomponente auf (Abbildung 3.20, S. 95). Ihr Anteil an der

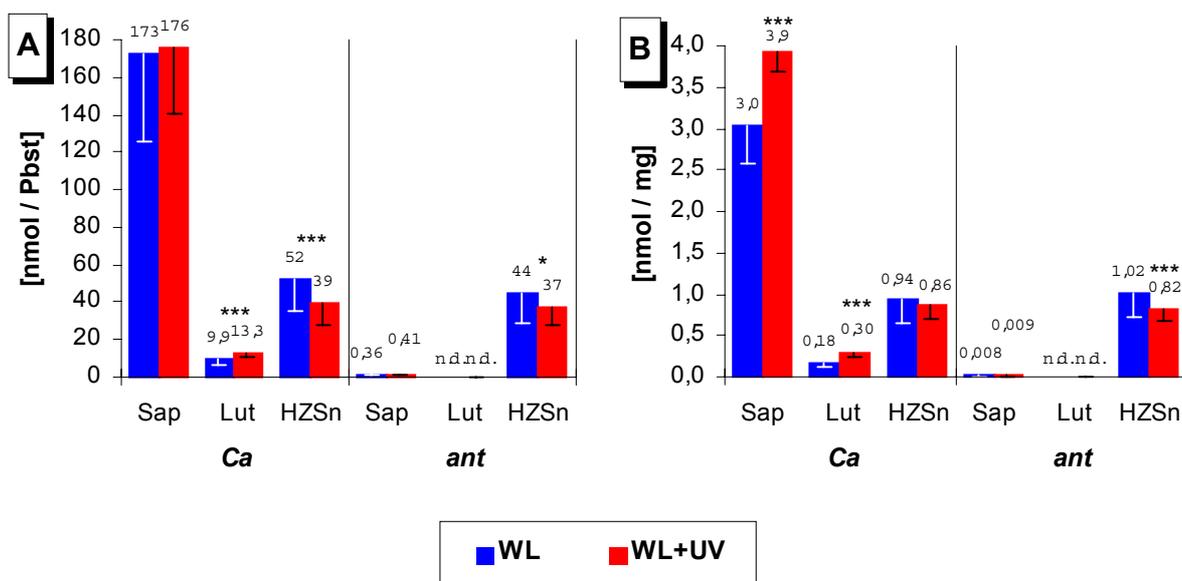


Abbildung 3.20: Die Phenylpropanoid-Gehalte 6 Tage alter Primärblattstücke von *Ca* und *ant* in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen WL und WL+UV.

Die Gehalte sind pro Primärblattstück (Pbst; A) und pro mg Frischgewicht (B) dargestellt. **Sap**: Saponarin; **Lut**: Lutonarin; **HZSn**: Summe der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 39 - 44$ aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen der WL+UV-Werte zu den WL-Werten: * $p \leq 5 \%$, *** $p \leq 0,5 \%$.

Phenylpropanoid-Menge betrug 75 %, die Flavon-Nebenkomponente Lutonarin hatte nur einen Anteil von 5 %, 20 % entfielen auf die löslichen Hydroxyzimtsäuren. Bezogen auf das Primärblattstück (Abbildung 3.20 A) akkumulierte unter beiden Anzuchtbedingungen gleich viel Saponarin. Da jedoch die Primärblattstücke unter WL+UV im Wachstum reduziert waren, zeigt der Bezug auf das Frischgewicht (Abbildung 3.20 B), dass es zu einer Konzentrationserhöhung des Saponarins gekommen war, sie hatte sich um knapp 30 % erhöht. Auch Lutonarin akkumulierte stärker unter WL+UV, was sich schon beim Bezug auf das Primärblattstück bemerkbar machte. Die Konzentration erhöhte sich hier um gute 70 %. Die Verringerung der Akkumulation an löslichen Hydroxyzimtsäuren im Primärblattstück (A), folgte nur der Wachstumsreduktion (B).

In der Mutante waren, wie schon oben erwähnt, nur noch Spuren an Saponarin nachzuweisen, Lutonarin gar nicht mehr. Der Saponarin-Gehalt der Mutante lag im Vergleich zur Muttervarietät bei 0,2 %. Dabei blieb der Gehalt an löslichen Hydroxyzimtsäuren unverändert. Unter WL+UV hatte die Mutante sogar eine um 16 % geringere Konzentration an diesen Substanzen. Abbildung 3.21 (S. 96) zeigt, dass damit die auf das Frischgewicht bezogene UV-B-Absorptionskapazität gegenüber der Muttervarietät stark reduziert ist. Selbst

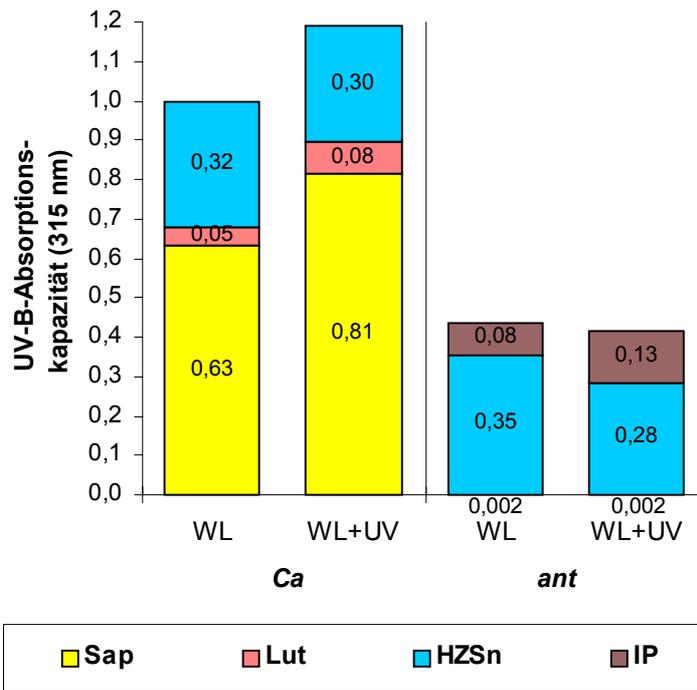


Abbildung 3.21: UV-B-Absorptionskapazität bei 315 nm in der Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen WL und WL+UV in *Ca* und *ant*.

Die auf das Frischgewicht bezogene UV-B-Absorptionskapazität (s. 2.2.2.4.2) der einzelnen Substanzen des Primärblattstückes ist normiert dargestellt (Gesamt-Absorptionskapazität unter WL = 1). **Sap**: Saponarin; **Lut**: Lutonarin; **HZSn**: Summe der löslichen Hydroxyzimtsäuren; **IP**: Isosalipurposid. Mittelwerte mit $n = 39 - 44$ aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen.

die Akkumulation des Isosalipurposids, die sogar unter WL+UV um knapp 60 % gesteigert war, kompensierte nicht den Verlust an Flavonon. Die UV-B-Absorptionskapazität betrug nur knapp 45 % im Vergleich zu unter WL angezogenen Muttervarietät, bzw. nur 35 % im Vergleich zu WL+UV. Die UV-B-Absorptionskapazität der Gerste *Ca* war unter WL+UV um 20 % gesteigert, was hauptsächlich auf die höhere Konzentration an Saponarin zurückzuführen war.

3.4.2.2 Akkumulation von Thymin-Dimeren durch UV-Bestrahlung

Analog zu den Experimenten an 5 Tage altem Roggen, wurden die 6 Tage alten, unter WL bzw. WL+UV angezogenen Keimlinge in der 6stündigen Bestrahlungsphase den Bedingungen BAP (UV-**B** + UV-**A** + **PAR**) bzw. B (nur UV-**B**) ausgesetzt (s. 2.2.1.4.2). Die Primärblattstücke der unter WL bzw. WL+UV angezogenen Keimlinge werden auch hier kurz WL- bzw. WL+UV-Primärblattstücke genannt.

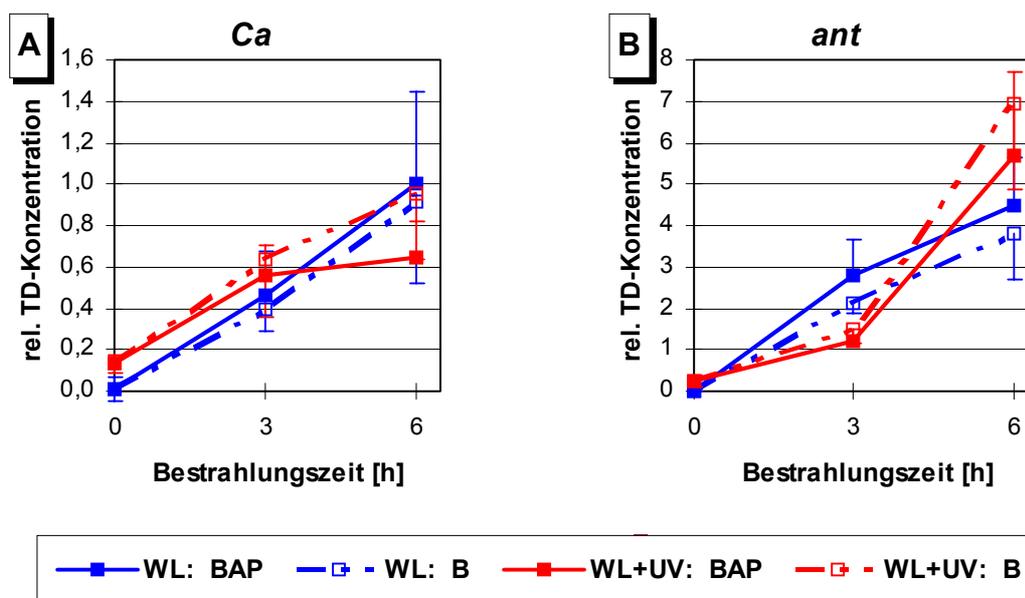


Abbildung 3.22: Akkumulation von Thymin-Dimeren in Abhängigkeit von der Anzucht- und der Bestrahlungsbedingung und einer unterdrückten Photoreaktivierung.

6 Tage alte unter WL oder WL+UV angezogene Keimlinge wurden jeweils 6 h mit BAP oder B bestrahlt (s. 2.2.1.4.2). Die Thymin-Dimer-Messwerte (Nullproben korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (6h BAP-Bestrahlung von unter WL-angezogenen Primärblättern der Muttervarietät = 1) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA aus den strahlungsexponierten Blattstücken. Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 7 - 12$ aus jeweils einer Anzucht). Alle 3h- und 6h-Mittelwerte sind signifikant vom 0h-Mittelwert der gleichen Anzucht verschieden ($p \leq 0,5 \%$).

Wie beim Roggen wiesen auch hier die WL+UV-Primärblattstücke der Muttervarietät im Gegensatz zu den WL-Primärblattstücken schon zu Bestrahlungsbeginn Thymin-Dimere auf ($p \leq 0,5 \%$; Abbildung 3.22 A, S. 97). Nach BAP-Bestrahlung schienen die WL+UV-Primärblattstücke eine geringere Thymin-Dimer-Konzentration aufzuweisen als die WL-Primärblattstücke (-35 %). Allerdings ist der Unterschied nur schwach signifikant ($p \leq 5 \%$). Dieser Unterschied ist vermutlich nicht auf die höhere UV-B-Absorptionskapazität (+20 %) in den WL+UV-Primärblattstücken zurückzuführen, denn dann wäre unter B-Bestrahlung (Unterdrückung der Photoreaktivierung) ebenfalls ein Unterschied in der Thymin-Dimer-Konzentration zwischen den Primärblattstücken aus den beiden Anzuchtbedingungen zu erwarten. Dies war jedoch nicht der Fall.

Auch die Mutante wies innerhalb der Fehlergrenzen keinen Schaden in den WL-Primärblattstücken vor Bestrahlungsbeginn auf, wohl aber die WL+UV-Primärblattstücke ($p \leq 0,5 \%$, Abbildung 3.22 B). Obwohl die Thymin-Dimer-Konzentration in den letzteren knapp doppelt so hoch war wie in der Muttervarietät, war dieser Unterschied noch nicht signifikant ($p > 5 \%$). Doch die wesentlich höhere UV-B-Empfindlichkeit der Mutante zeigte

sich in der Bestrahlungsphase. Nach der 6stündigen BAP-Bestrahlung war die Thymin-Dimer-Konzentration in den WL-Primärblattstücken um den Faktor 4,5, in den WL+UV-Primärblattstücken sogar um den Faktor 9 höher ($p \leq 0,5 \%$) als bei der Muttervarietät.

Interessanterweise führte die Unterdrückung der Photoreaktivierung (B-Bestrahlung) weder in der Muttervarietät noch in der Mutante zu einer signifikanten Erhöhung der Thymin-Dimer-Konzentration, wie dies beim Roggen der Fall gewesen war. Selbst der Unterschied zwischen BAP und B in den WL+UV-Primärblättern von der Sorte *Ca* am Ende der Bestrahlungsphase war nur schwach signifikant ($p \leq 5 \%$). Hierauf wird noch in der Diskussion ausführlich eingegangen. Da anscheinend die Photoreaktivierung keinen deutlichen Einfluss auf die Anhäufung von Thymin-Dimeren hat, kann man die wesentlich stärkere Akkumulation dieser Schäden in der Mutante auf die um mehr als die Hälfte reduzierte UV-B-Absorptionskapazität zurückführen.

3.4.2.3 Photoreaktivierung von Thymin-Dimeren

Der Bestrahlungsphase schloss sich die 3,5stündige Reparaturphase an, in der die UV-B-Röhren ausgeschaltet waren (= Bedingung PR, s. 2.2.1.4.2). Es wurde analog zum Roggen durch parallele Dunkelinkubation die lichtunabhängige Reparatur gemessen.

In der Muttervarietät fand unabhängig von Anzucht- und Bestrahlungsbedingungen Photoreaktivierung statt, da in der Dunkelinkubation keine signifikante Reparatur zu messen war, wohl aber unter PR-Bedingung (Abbildung 3.23, S. 99). Die unter WL angezogenen Mutanten-Keimlinge wiesen ebenfalls keine signifikante Reparatur im Dunkeln auf (Abbildung 3.23), womit die unter PR-Bedingung beobachtete Reparatur Photoreaktivierung darstellt. In den WL+UV-Primärblattstücken der Mutante war eine starke lichtunabhängige Reparatur zu beobachten ($p \leq 0,5 \%$; Abbildung 3.23). Es scheint also auch hier, wie schon bei Roggen, eine Induktion dieser Reparatur durch zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht zu erfolgen.

Die Photoreaktivierung erfolgte sehr schnell. Nach einer Stunde wurde nur noch wenig Schaden repariert. Innerhalb dieser Stunde wurde in der Mutante, ausgehend von einer höheren Thymin-Dimer-Konzentration, mehr Schaden repariert als in der Muttervarietät.

Der direkte Vergleich der Thymin-Dimer-Konzentration unter den unterschiedlichen Bedingungen am Ende der Reparaturphase mit den Konzentrationen zum Bestrahlungsbeginn (Abbildung 3.24, S. 100) verdeutlicht, dass die Gerste-Primärblätter nicht in der Lage waren einmal entstandenen Schaden vollständig zu reparieren. WL+UV-Primärblattstücke der

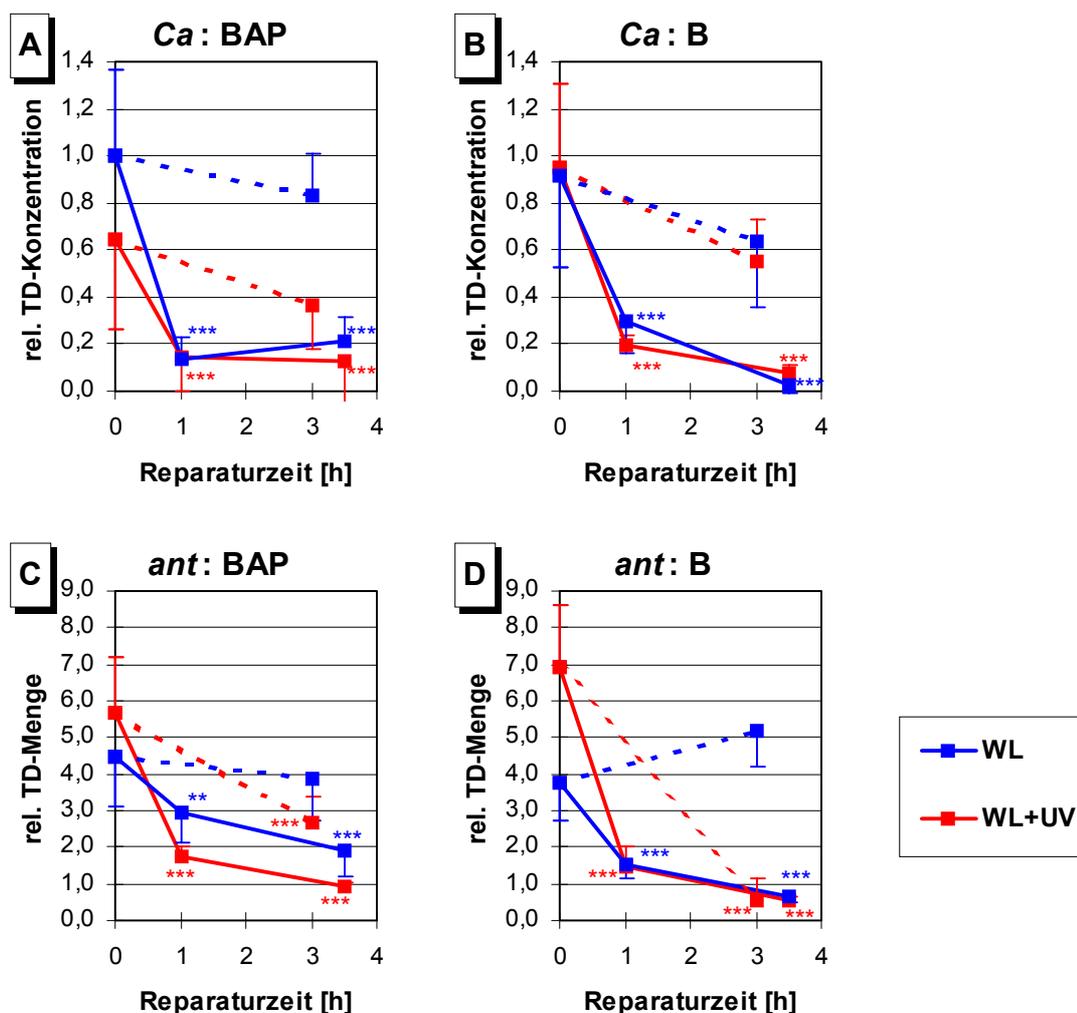


Abbildung 3.23: Reparatur von Thymin-Dimeren in Abhängigkeit von der Anzucht- und Bestrahlungsbedingung in *Ca* und *ant*.

Die im Alter von 6 Tagen bestrahlten Keimlinge (s. Abbildung 3.22) wurden 3,5 h mit der Photoreaktivierungsbedingung PR (WL+UV ohne UV-B, s. 2.2.1.4.2; durchgezogene Linien) oder gar nicht (**Dunkelkontrolle** nach **BAP**- oder **B**-Bestrahlung; gestrichelte Linien) bestrahlt. Die Thymin-Dimer(TD)-Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (6h BAP-Bestrahlung (= 0h Reparaturzeit) von unter WL-angezogenen Primärblättern = 1, s. Abbildung 3.22) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA aus den strahlungsexponierten Blattstücken. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 7 - 12$ aus jeweils einer Anzucht. Signifikanz der Mittelwerte zum 0h-Mittelwert der gleichen Kurve: ** $p \leq 1\%$; *** $p \leq 0,5\%$.

Muttervarietät erreichten wieder das Konzentrationsniveau wie zu Bestrahlungsbeginn, die der Mutante jedoch nicht. Diese Rest-Menge an Thymin-Dimeren war in der Mutante um den Faktor 7 höher als in der Muttervarietät ($p \leq 0,5\%$). In den WL-Primärblattstücken verbleibt ebenfalls eine Restmenge an Thymin-Dimeren. Unabhängig von Anzuchtbedingungen und Sorte schienen die mit B-bestrahlten Primärblattstücke ein geringeres Rest-Niveau an Thymin-Dimeren zu erreichen.

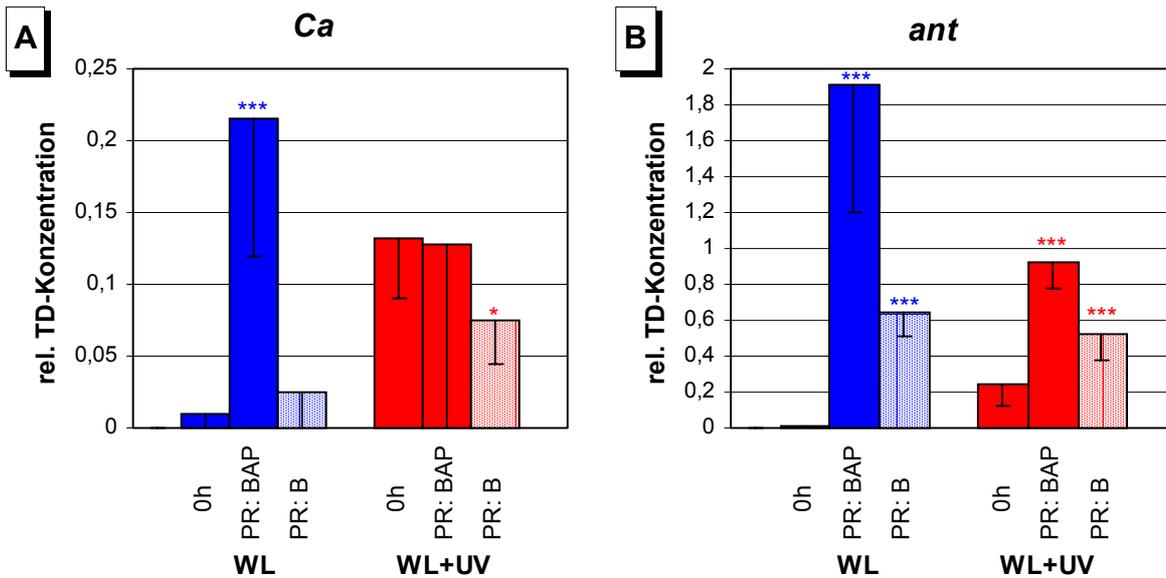


Abbildung 3.24: Reparaturvermögen in Abhängigkeit von der Anzucht- und Bestrahlungsbedingung in *Ca* und *ant*.

Darstellung der Thymin-Dimer(TD)-Konzentrationen am Ende der Reparaturphase (s. Abbildung 3.23, S: 99; 3,5 h unter Photoreaktivierungsbedingung **PR** nach Bestrahlung mit der Bedingung **BAP** oder **B**) im Vergleich zu den Thymin-Dimer-Konzentrationen zu Beginn der Bestrahlungsphase (**0h**; s. Abbildung 3.22, S. 97). Die Thymin-Dimer-Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (Normierung wie in Abbildung 3.22) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA aus den strahlungsexponierten Blattstücken. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 7 - 12$. Signifikanz der Mittelwerte zum Mittelwert der jeweiligen Anzucht vor Bestrahlungsbeginn (0h): * $p \leq 5 \%$, ** $p \leq 1 \%$, *** $p \leq 0,5 \%$.

3.4.3 Phenylpropanoid- und Thymin-Dimer-Akkumulation während der Primärblattentwicklung

Die Fragen nach dem Verlauf des Schadensniveaus während der Keimlingsentwicklung bzw. nach der Verbesserung des Schutzes durch verstärkte Akkumulation von Phenylpropanoiden wurde wieder mit der Messung der Phenylpropanoid-Gehalte vor dem täglichen Einsetzen der UV-B-Bestrahlung und der Konzentration an Thymin-Dimeren vor und nach der täglichen UV-B-Bestrahlung untersucht (vgl. 3.3.3).

Im Alter von 11 Tagen waren die Primärblätter beider Sorten *Ca* und *ant* unabhängig von Sorte und Anzuchtbedingung ausgewachsen (Abbildung 3.25, S. 101). Muttervarietät und Mutante unterschieden sich unter WL-Bedingungen nicht in der Primärblattlänge voneinander. Durch zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht war die Länge des Primärblattes der Muttervarietät erst im ausgewachsenen Stadium reduziert (-12 %; $p \leq 0,5 \%$), während die Mutanten-Primärblätter schon im Alter von 6 Tagen signifikant kürzer waren. Die

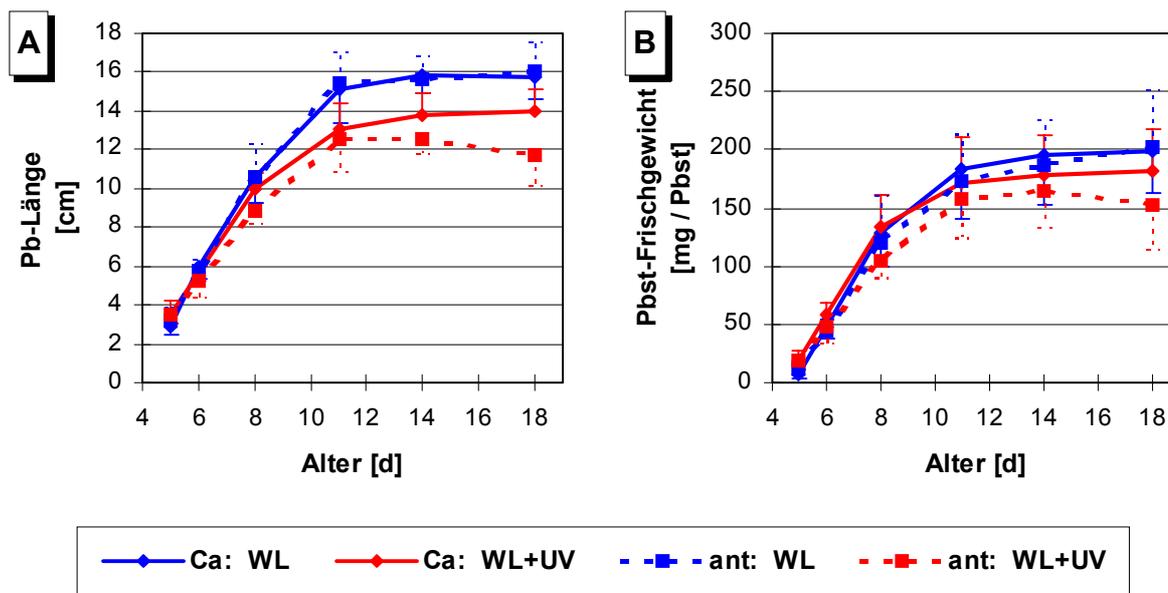


Abbildung 3.25: Wachstumsparmeter der Primärblattentwicklung von *Ca* und *ant* unter WL und WL+UV.

A: Primärblatt(Pb)-Länge; **B:** Primärblattstück(Pbst)-Frischgewicht. Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 20-40$ aus jeweils einer Anzucht.

ausgewachsenen *ant*-Primärblätter wiesen eine Längenreduktion unter WL+UV von 22 % auf und waren damit auch kürzer als die Primärblätter der Muttervarietät der gleichen Anzuchtbedingung.

Die Koleoptile war zu Beginn der Messungen schon ausgewachsen und bei beiden Sorten unter WL+UV um 20 % kürzer als unter WL ($p \leq 0,5 \%$). Die Längen der Koleoptilen betragen bei *Ca* 2,0 cm (WL) bzw. 1,6 cm (WL+UV) und bei *ant* 1,8 cm (WL) bzw. 1,45 cm (WL+UV). Das Frischgewicht des geernteten, strahlungsexponierten Primärblattstückes war im ausgewachsenen Zustand in der Muttervarietät nur um 8 % unter WL+UV reduziert ($p \leq 5\%$). Diese Reduktion fiel auch wieder in der Mutante mit 15 % stärker aus ($p \leq 0,5 \%$).

3.4.3.3 Phenylpropanoid-Akkumulation während der Primärblattentwicklung von *Ca* und *ant*

3.4.3.3.1 Phenylpropanoid-Akkumulation

Während der gesamten Primärblatt-Entwicklung stellte **Saponarin** die Hauptkomponente der Phenylpropanoide in der Muttervarietät dar (Abbildung 3.26 A, S. 102). Während der Primärblattentwicklung stieg der Gehalt pro Primärblattstück und erreichte unter WL mit 300 nmol / Pbst ab dem 11. Tag ein konstantes Niveau, welches unter WL+UV mit

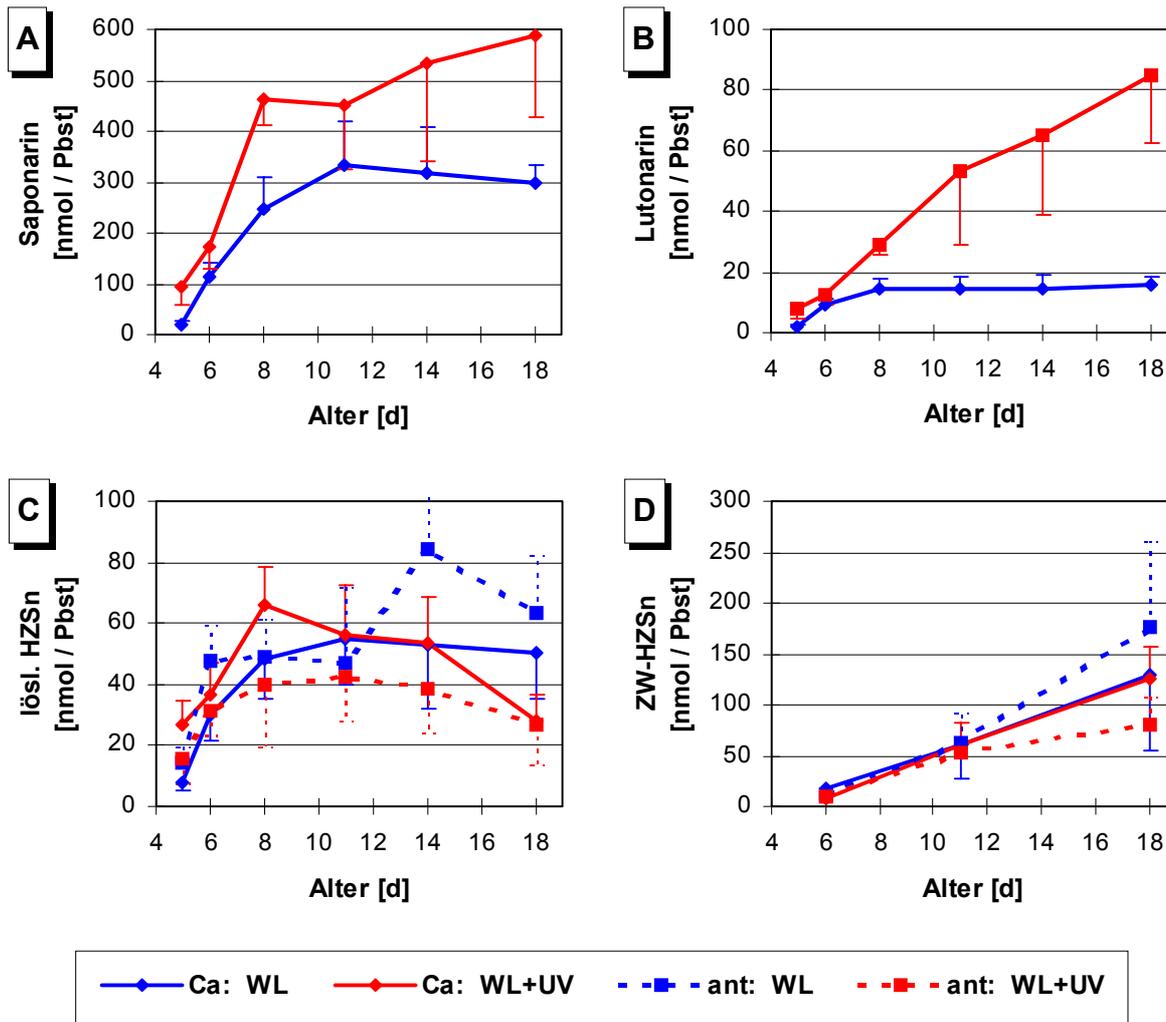


Abbildung 3.26: Akkumulation der Phenylpropanoide in der Primärblatt-Entwicklung von *Ca* und *ant* unter WL und WL+UV.

Darstellung der Menge an Phenylpropanoide pro Primärblattstück (Pbst). **Sap** = Saponarin (A); **Lut** = Lutonarin (B); **lös. HZS** = lösliche *p*-Cumar- + Ferulasäure-Derivate (C); **ZW-HZS** = zellwandgebundene *p*-Cumar- + Ferulasäure (D). Mittelwerte +/- Standardabweichung mit $n = 8-15$ aus jeweils einer Anzucht.

500 nmol / Pbst um 66 % höher lag ($p \leq 0,5 \%$). Der Bezug auf das Frischgewicht ergab, dass unter WL die Konzentration von ca. 2,5 nmol / mg auf 1,5 nmol / mg sank. Sie war unter WL+UV mit Werten um 3,0 nmol / mg mehr oder weniger konstant. Die Gehalte an Saponarin in der Mutante wurden nicht dargestellt, da sie sehr gering waren. Sie schwankten stark und der Primärblatt-Gehalt überstieg nie 1,5 nmol (WL) bzw. 2 nmol (WL+UV). Er lag damit immer unter 1 % des Gehaltes der Muttervarietät.

Die Akkumulation der Flavon-Nebenkomponente **Lutonarin** war am stärksten durch UV-Strahlung während der Anzucht zu stimulieren. Während unter WL schon ab einem Alter von 8 Tagen der Gehalt im Primärblattstück auf einem Wert von knapp 15 nmol konstant bleibt, stieg

er unter WL+UV selbst noch im ausgewachsenen Stadium der Entwicklung kontinuierlich auf 85 nmol an. Dies entsprach einer Steigerung im Maximum um das 5,5fache. Demnach betrug der Gehalt an Lutonarin am 18. Tag nur 15 % des Gehaltes an Saponarin. In der Mutante war Lutonarin nicht messbar.

Die Gehalte an **löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivaten** schwankten recht stark. In der Tendenz kann man jedoch festhalten, dass in der Muttervarietät der Gehalt im Primärblattstück bis zum 11. Tag auf ca. 55 nmol anstieg. Die Unterschiede zwischen WL und WL+UV sind nicht immer eindeutig signifikant. In der Mutante stiegen die Werte unter WL bis auf über 60 nmol an und waren unter WL+UV geringer. Beim Bezug auf das Frischgewicht fielen die Schwankungen geringer aus und es zeigte sich, dass keine Unterschiede zwischen den Sorten und den Anzuchten bestand. Die Konzentrationen dieser Substanzen nahmen von anfänglich 0,8 - 1 nmol / mg auf 0,2 - 0,3 nmol / mg ab. Der Anteil der Ferulasäure an den löslichen Hydroxyzimtsäuren lag in der Muttervarietät zwischen 50 % und 70 % und war unter beiden Anzuchtbedingungen mehr oder weniger gleich. In den Primärblattstücken der Mutante lag dieser Anteil unter WL zwischen 40 % und 50 % und war unter WL+UV mit 50 % bis 60 % höher.

In der Muttervarietät war der Gehalt an **zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren** im Primärblattstück unabhängig von der Anzuchtbedingung und stieg während der Primärblattentwicklung kontinuierlich bis zu einem Wert von knapp 130 nmol an. Auch auf das Frischgewicht bezogen ergab sich das gleiche Bild mit einem Endwert von knapp 0,65 nmol / mg. In der Mutante hingegen war im Alter von 18 Tagen der Gehalt unter WL+UV im Primärblattstück mit 80 zu 177 nmol deutlich reduziert ($p \leq 0,5 \%$). Bezogen auf das Frischgewicht war die Verringerung mit 0,52 zu 0,81 nmol / mg geringer und weniger signifikant ($p \leq 5 \%$).

3.4.3.1.2 UV-B-Absorptionskapazität

Abbildung 3.27 (S. 104) zeigt die Veränderung der auf das Frischgewicht bezogenen UV-B-Absorptionskapazitäten der untersuchten Primärblattstücke während der Primärblattentwicklung. Unter WL sank die UV-B-Absorptionskapazität nach einem Maximum am 6. Tag stetig mit zunehmenden Keimlingsalter auf 60 % der anfänglichen Kapazität ab. In der WL+UV-Anzucht war die UV-B-Absorptionskapazität mit Ausnahme des 6. Tages um 40 % bis 80 % gegenüber den WL-Pflanzen höher. Doch auch in dieser Anzucht sank sie mit zunehmenden Alter der Keimlinge auf 65 % des Anfangswertes ab. Wie aus den Daten zu den

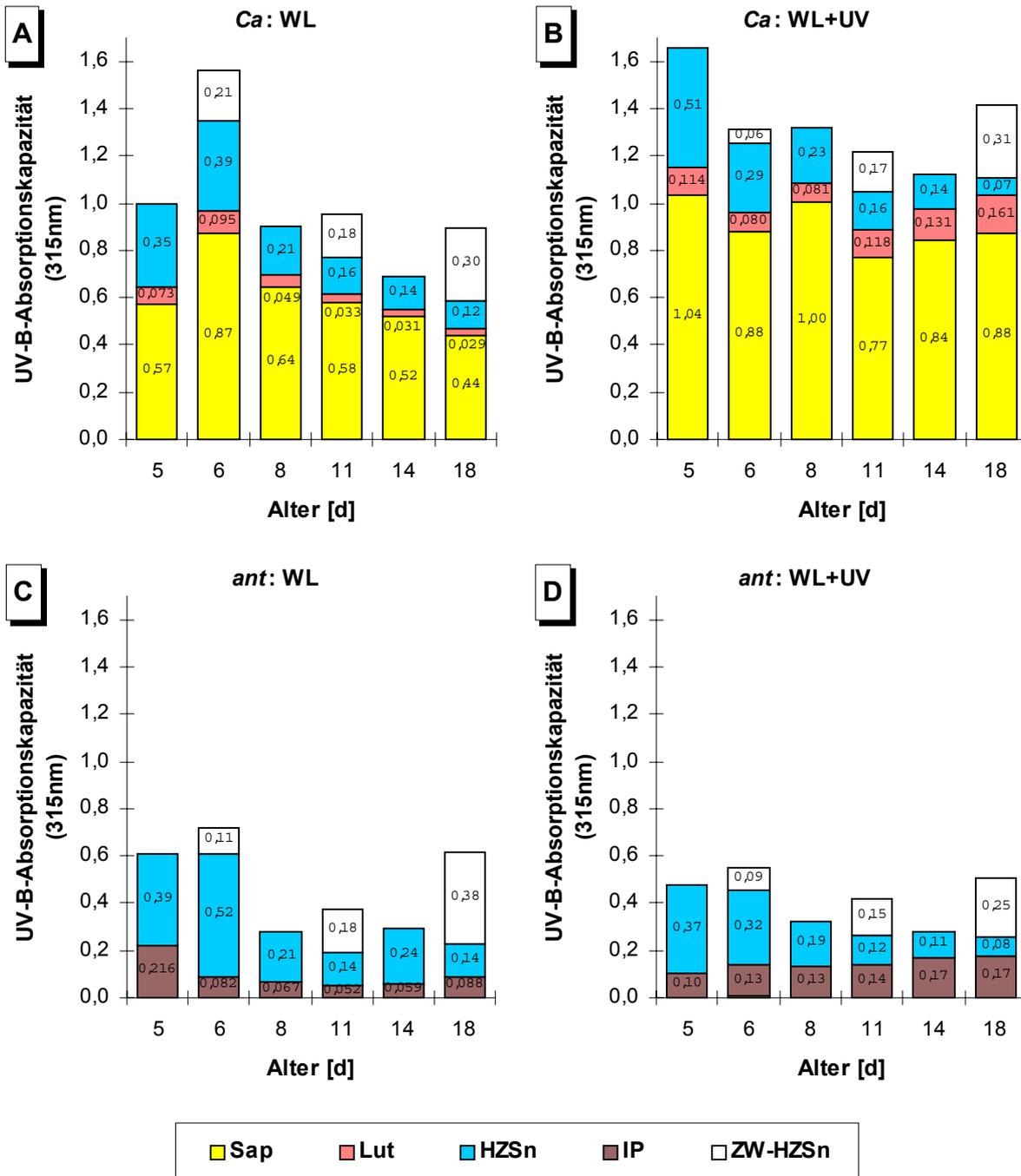


Abbildung 3.27: UV-B-Absorptionskapazität der löslichen Phenylpropanoide in der Primärblattentwicklung von *Ca* und *ant* unter WL und WL+UV.

Die UV-B-Absorptionskapazität ist bezogen auf das Frischgewicht dargestellt. **Sap** = Saponarin; **Lut** = Lutonarin; **lösl. HZS** = lösliche *p*-Cumar- + Ferulasäure-Derivate; **IP** = Isosalipurposid; **ZW-HZSn** = zellwandgebundene Hydroxyzimtsäuren. Normierung: Summe der UV-B-Absorptionskapazitäten von Saponarin, Lutonarin und den lösl. Hydroxyzimtsäuren von 5 Tage alten unter WL angezogene Primärblattstücken = 1. Mittelwerte mit n = 8-12 aus jeweils einer Anzucht.

Stoffmengen im Primärblattstück zu erwarten war, ging der Hauptanteil der UV-B-Absorption auf Saponarin zurück. Unter WL betrug der Anteil 55 - 75 %, unter WL+UV sogar 60 - 80 %.

Die verstärkte Saponarin-Akkumulation unter WL+UV verursachte die Steigerung der UV-B-Absorptionskapazität. Doch war die Akkumulation während der Entwicklung nicht so stark, dass die ihr zuzuschreibende UV-B-Absorptionskapazität anstieg, sie blieb mehr oder weniger konstant.

Die schwache bis gar nicht zunehmende Akkumulation der löslichen Hydroxyzimtsäuren (bezogen auf das Primärblattstück) während der Entwicklung unter WL+UV bedeutete eine Abnahme der aufs Frischgewicht bezogenen UV-B-Absorptionskapazität. Dies konnte auch nicht durch die sehr stark zunehmende Akkumulation des Lutonarins kompensiert werden. Der Beitrag dieser Komponente zur UV-B-Absorptionskapazität war gering, weshalb sich die Frage stellt, warum gerade die Akkumulation dieser Substanz so enorm durch zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht stimuliert wird (s. Diskussion). Ähnlich wie beim Roggen, nur nicht so ausgeprägt, hatten die löslichen Hydroxyzimtsäuren vor allem zum Anfang der Primärblattentwicklung einen wichtigen Anteil an der UV-B-Absorption (35 % (WL) bzw. 30 % (WL+UV)).

In der WL+UV-Anzucht stieg die UV-B-Absorptionskapazität der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren von 5 % auf 23 % der UV-B-Absorptionskapazität der löslichen Komponenten. Wie schon beim Roggen erläutert, erschwert die Unkenntnis über die Verteilung dieses Pools auf die Hauptakkumulationsorte Epidermis und Leitbündel die Interpretation der tatsächliche Bedeutung an der UV-B-Attenuation im Primärblatt.

Durch die extrem geringen Gehalte an Saponarin (daher in Abbildung 3.27 C, D nicht zu erkennen) in der Mutante war dort die UV-B-Absorption drastisch reduziert. Das statt dessen akkumulierende Isosalipurposid konnte nur einen Bruchteil der ausgefallenen Absorption kompensieren. Unter WL+UV betrug die UV-B-Absorptionskapazität der löslichen Komponenten der Mutante verglichen mit der Muttervarietät nur 25 % bis 35 %. Zieht man aber die zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren hinzu, erreichte die Mutante bis zu 42 % der UV-B-Absorptionskapazität der Muttervarietät. Die Kapazität der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren war am 18. Tag genauso hoch wie die der löslichen Substanzen und hatte damit in der Mutante wahrscheinlich eine hohe Bedeutung für die UV-B-Attenuation im Primärblatt.

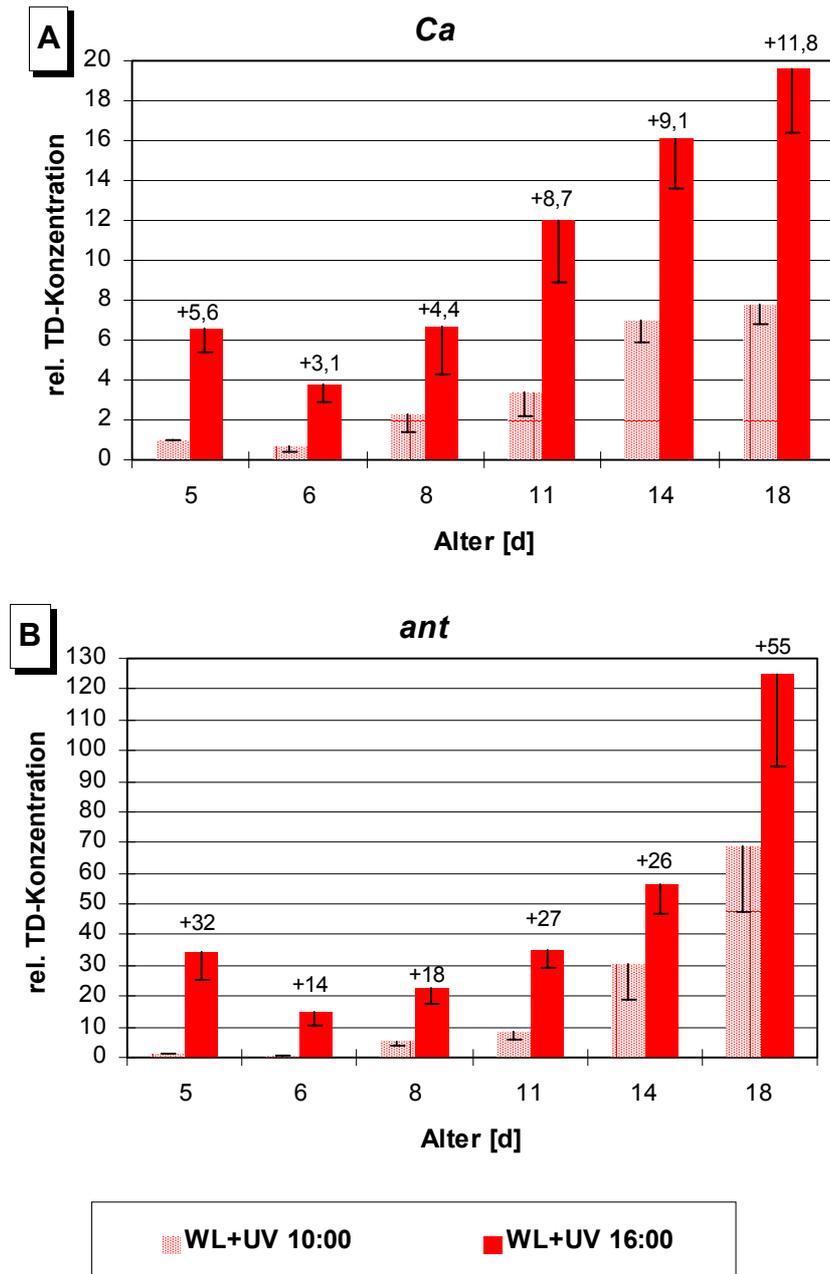


Abbildung 3.28: Anhäufung von Thymin-Dimere in der Primärblattentwicklung von *Ca* und *ant* unter WL+UV.

Die Thymin-Dimer-Konzentration wurde in den verschiedenen Altersstadien um **10:00** Uhr Kammerzeit (Beginn der täglichen UV-B-Belastung) und **16:00** Uhr Kammerzeit (Ende der UV-B-Belastung) bestimmt. Messwerte (Nullprobe korrigierte Absorption bei 492 nm) sind normiert dargestellt (Thymin-Dimer-Konzentration in *Ca* um 10:00 Uhr am 5. Tag = 1) und sind relative Konzentrationsangaben pro 500 ng DNA Mittelwerte +/- Standardabweichung mit n = 6-12 aus jeweils 1 Anzucht.

3.4.3.2 Thymin-Dimer-Akkumulation während der Primärblattentwicklung

Wie schon im Roggen häuften sich in der Gerste *Ca* kontinuierlich Thymin-Dimere in den strahlungsexponierten Primärblattstücken an (Abbildung 3.28, S. 106). Die entstandenen

Schäden konnten also bis zur nächsten UV-B-Belastung nicht vollständig repariert werden. Die Thymin-Dimere hatten im Keimlingsalter von 18 Tagen um 10:00 Uhr Kammerzeit (Beginn der UV-B-Belastung) eine 8fach höhere Konzentration als die Primärblattstücke 5 Tage alter Keimlinge zum entsprechenden Zeitpunkt ($p \leq 0,5 \%$). Die Zunahme der Thymin-Dimer-Konzentration während der 6stündigen UV-B-Belastung stieg mit der parallel sich verringernden UV-B-Absorptionskapazität mit zunehmenden Keimlingsalter an.

In den Primärblattstücken der Mutante war die Thymin-Dimer-Konzentration am 5. und 6. Tag vor Bestrahlungsbeginn (10:00 Uhr) noch in der Größenordnung der Thymin-Dimer-Konzentration der Muttervarietät. Die Kapazität der Reparatursysteme reichte aus, die wesentlich größere Menge an während der UV-B-Bestrahlung entstandenen Schäden in der Mutante zu beseitigen. Nach dem 6. Tag reichte dann die Reparatur-Kapazität nicht mehr aus. Die Thymin-Dimer-Konzentration um 10:00 Uhr war am 8. Tag um den Faktor 2,5 und dann hin zum 18. Tag um den Faktor 9 höher als in der Muttervarietät. Die Zunahme der Thymin-Dimer-Konzentration während der 6stündigen täglichen UV-Belastung war erwartungsgemäß viel größer.

Wie schon beim Roggen, akkumulierten weder in der Muttervarietät noch in der Mutante Thymin-Dimere während der WL-Anzucht.

4 DISKUSSION

4.1 ELISA zum Nachweis von Thymin-Dimeren

Der in der Arbeitsgruppe von Prof. Wellmann, Freiburg, erlernte ELISA zum Nachweis von Thymin-Dimeren konnte für die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation optimiert und sensitiviert werden. Durch die Veränderung der Waschungen zwischen den Inkubationsschritten und dem Wechsel des Blockreagenz von 0,5 % Rinder-Serum-Albumin auf 1 % Magermilch-Pulver konnte der Hintergrund des Assays um die Hälfte reduziert werden (Abbildung 3.1). Die Nutzung des Biotin-Extravidin®-Systems und die Erhöhung der DNA-Menge von 100 ng auf 500 ng erhöhte die Nachweisempfindlichkeit des Assays um den Faktor 14. Die Linearität des ELISAs bezüglich der eingesetzten DNA-Menge war im Bereich von 50 bis 1000 ng gegeben. Mit dieser Methode konnte die Entstehung von Thymin-Dimeren durch die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten UV-Bestrahlungsbedingungen wie auch die Reparatur entstandener Schäden eindeutig nachgewiesen werden.

Die Standardabweichungen der Nullproben- (ohne Thymin-Dimere) und der Kontroll-Messwerte (mit Thymin-Dimere) bei den einzelnen Tests lagen durchschnittlich bei 4 - 5 % vom Mittelwert (s. 3.1.3). Die starken Schwankungen der Messwerte in den Experimenten (Standardabweichung durchschnittlich ca. 30 % des Mittelwertes) kennzeichnen demnach die hohe Variabilität des Pflanzenmaterials.

Die mittels des ELISA erhaltenen relativen Messwerte für die Thymin-Dimer-Konzentration der Proben wurden in dieser Arbeit normiert dargestellt. Durch geeignete Kontrollen und Vergleichsproben konnten zudem Messwerte verschiedener ELISA-Tests miteinander verglichen werden (s. 3.1.3). Relative Bestimmung und Darstellung von Thymin-Dimeren bzw. Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) ist auch in anderen Arbeitsgruppen üblich (z. B. STAPLETON ET AL., 1997; HADA ET AL., 1998; ROUSSEAU ET AL., 1999; MAZZA ET AL., 1999), und reichte dort zur Beantwortung der Fragestellungen aus. In dieser Arbeit ging es hauptsächlich um den Vergleich von Schadensakkumulationen bzw. um die Reparatur der entstandenen Schäden unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen. Hierfür reichte die relative Messung und Darstellung der Thymin-Dimer-Konzentration völlig aus.

4.2 Die Anzucht- und Bestrahlungsbedingungen

4.2.1 Anzuchtbedingungen

Viele Arbeiten zum Einfluss von UV-B-Strahlung auf Pflanzen wurden noch bis in die 90er Jahre hinein in Klimakammern mit sehr niedriger photosynthetischer Photonenflussdichte (PPFD) durchgeführt (CALDWELL UND FLINT, 1994). Doch mit steigender PPFD nimmt die UV-B-Empfindlichkeit der Pflanzen ab (CALDWELL UND FLINT, 1994). Der Forderung nach naturnahen Strahlungsbedingungen kann am besten in Freiland-Experimenten nachgekommen werden. Doch hierbei ist der Einfluss der schwankenden Umweltbedingungen auf die Messergebnisse schwierig abzuschätzen und zu interpretieren. Bei den häufig unbeständigen Wetterbedingungen in unserer Klimazone sind gerade Experimente mit solarer Strahlung schwierig. Außerdem werden Wachstumsparameter oder die Akkumulation von Flavonoiden von vielen Umweltfaktoren, wie Temperatur, Pathogen-Druck, etc., beeinflusst (FORKMANN UND HELLER, 1999). Experimente in Klimakammern mit **kontrollierten**, naturnahen Bedingungen sind daher essenziell für klare Aussagen bezüglich des Faktors UV.

Sommergetreide werden Anfang April ausgesät und innerhalb von 2-3 Wochen erscheint das Primärblatt (KOLBE, 1987). Im April dehnt sich die Tageszeit von 12 auf 14 Stunden aus. Zur Simulation naturnaher Bedingungen wurde daher ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 13/11 h in der Anzuchtkammer eingestellt. Die programmierte Tages- bzw. Nachttemperatur von 20 bzw. 10 °C und die relative Luftfeuchtigkeit von 50 % am Tag und 80 % in der Nacht (s. Abbildung 2.2) entsprachen nach Daten des Wetteramtes Essen und eigenen Messungen aus dem Jahr 1998 im Versuchsgarten des Botanischen Institutes (Universität zu Köln) einem warmen, sonnigen Tag mit folgender milder Nacht Ende April. Die Tages-Temperatur wurde konstant gehalten, um Auswirkungen von Temperaturänderungen auf die zu untersuchenden Parameter – zum Beispiel auf die Reparatur von DNA-Schäden – zu vermeiden.

In der neu eingerichteten Anzuchtkammer wurde eine PPFD von 700 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ erreicht (Tabelle 2.2). Dieser Wert steht bei dem momentanen Stand der Literatur im oberen Bereich erreichbarer PPFD in Klimakammern. Eine Ausnahme bilden hier die Expositionskammern (1500 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$) und die Sonnensimulatoren (2500 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$) der Gesellschaft für Strahlenforschung in Oberschleißheim bei München. Nach eigenen Freiland-Messungen (1996, Versuchsgarten des Botanischen Institutes) entsprechen 700 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ einem sonnigen aber dunstigen Tag Mitte April bei Sonnenhöchststand in unseren Breiten. Es wurden aber auch

Spitzenwerte von über $1500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ gemessen. Bei starker Bewölkung sanken die Messwerte z.T. bis auf $200 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ ab. Somit lag die PPF in den in dieser Dissertation durchgeführten Experimenten in einem günstigen, naturrelevanten Bereich. Da in der Diskussion die Ergebnisse mit Daten aus der Literatur verglichen werden, die mit stark unterschiedlichen Photonenflussraten gewonnen wurden, wird eine grobe Einteilung in Schwachlicht- und Starklicht-Versuche vorgenommen. Schwachlicht meint hier Flussraten von $100 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ und weniger, Starklicht von $350 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ und mehr (meistens um die $700 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$). Es handelt sich in diesen Fällen immer um Kammer-Experimente.

Je nach Dicke der Ozonschicht trifft keine Strahlung mit Wellenlängen unterhalb von 290 - 295 nm auf die Biosphäre (s. Abbildung 1.5). Durch die Verwendung der Filterfolie URT (100 μm) konnte zwar der gesamte UV-C-Anteil der Strahlungsemission der in der Anzuchtammer verwendeten UV-B-Strahlungsquellen (TL 12 / 20 W) herausgefiltert werden, jedoch traf noch Strahlung im Bereich von 280 - 290 nm auf die Pflanzen. Bei Kammer-Experimenten ist der Einsatz von UV-B-Breitbandstrahlern, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden (s. Abbildung 2.3), üblich. Der am häufigsten angewendete Filter zur Attenuation der UV-C-Emission ist Zellulose-Acetat-Folie. Auch bei der Verwendung dieser Folie kann die Strahlung im Bereich von 280 - 290 nm nicht vollständig herausgefiltert werden (Emissionspektren von Breitbandstrahlern mit Zellulose-Acetat-Folie als Filter in STAPLETON UND WALBOT, 1994; REUBER, 1996). Der Anteil der Emission von 280 - 290 nm betrug unter den hier verwendeten Bedingungen nur 0,04 % der gesamten UV-B-Bestrahlungsstärke bzw. 0,6 % der UV-B_{BE}-Bestrahlungsstärke. Der Einfluss der Strahlungsemissionen unter 290 nm dürfte somit keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Die tägliche biologisch-effektive UV-B-Bestrahlungsdosis (UV-B_{BE}; gewichtet und normiert auf 300 nm nach BJÖRN UND MURPHY, 1985; vgl. 1.1.2.4) betrug unter der naturnahen Anzuchtbedingung WL+UV $12 \text{ kJ} / \text{m}^2 \cdot \text{d}$ (Tabelle 2.2) und war damit vergleichsweise hoch. Allerdings ermittelten BRAUN (1990) UV-B_{BE}-Werte in dieser Größenordnung im Sommer für Portugal und BACHELET ET AL. (1991) für Gebiete in Asien.

4.2.2 Spezialbestrahlungsanlage

Die Spezialbestrahlungsanlage diente dem Zweck der Belastung von Versuchspflanzen mit Thymin-Dimer-induzierender UV-Strahlung und gleichzeitige Photoreaktivierung möglichst zu vermeiden (Bestrahlungsbedingung B, 2.2.1.4.3 und 3.2). Der Vergleich mit einer Bestrahlung mit UV-B, UV-A und PAR (Bestrahlungsbedingung BAP, 2.2.1.4.3 und 3.2), während derer

Photoreaktivierung möglich war, gab Aufschluss über die Bedeutung dieses Reparaturweges für den UV-Schutz.

In Experimenten anderer Arbeitsgruppen wurden hierfür als UV-B-Quelle Breitband-Strahler des Typs TL 12 verwendet (z.B. TAYLOR ET AL., 1996; HADA ET AL., 1998; HIDEWA UND KAMAGAI, 1998), aus deren Emission nur die UV-C-Strahlung herausgefiltert wurde. Wie die Abbildung 2.3 zeigt, emittieren diese UV-B-Röhren aber Strahlung im Bereich der photoreaktivierungswirksamen Wellenlängen (330 - 450 nm): 33 % Prozent der emittierten Strahlung von 280 - 450 nm hat eine Wellenlänge von über 330 nm (berechnet aus Spektroradiometermessungen, nicht gezeigt). Bei dem in der Spezialbestrahlungsanlage verwendeten Schmalband-Strahler TL 01 / 20 W betrug dieser Anteil nur noch 14 % (berechnet aus den Emissionsangaben des Herstellers, s. Abbildung 3.4). Durch den hier neu entwickelten Filter konnte dieser Anteil auf 1,8 % gesenkt werden (berechnet aus der Spektroradiometermessung von Bedingung B in Abbildung 2.8). Im Wellenlängenbereich der Photoreaktivierung von 330 - 450 nm wies die Bestrahlungsbedingung B nur noch 0,21 % der Bestrahlungsstärke dieses Wellenlängenbereiches der Bedingung BAP auf (Tabelle 2.3). Dieser Wellenlängenbereich konnte also nicht vollständig eliminiert jedoch drastisch gesenkt werden. Es verblieb eine Bestrahlungsdosis im Bereich von 330 - 450 nm während der 6stündigen Bestrahlung mit Bedingung B von $1,4 \text{ kJ} / \text{m}^2 \cdot 6\text{h}$. IKENAGA ET AL. (1974) konnten bei dieser geringen Dosis eine geringfügige Reparatur in einer mit Photoreaktivierungsaktivität angereicherten Protein-Fraktion aus Maiskörnern *in vitro* feststellen. Eine Rest-Aktivität an Photoreaktivierung war somit unter der Bestrahlungsbedingung B in den Experimenten dieser Arbeit nicht auszuschließen. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass sie im Vergleich zur Bedingung BAP (mit $665 \text{ kJ} / \text{m}^2 \cdot 6\text{h}$) sehr gering war.

4.3 Die UV-Schutzpigmente in Roggen und Gerste

4.3.1 Die Phenylpropanoide

Roggen

Die Sommerroggensorte *Sorom* wies die gleichen Hauptflavonoide R₁ (Luteolin-7-O-diglucuronyl-4'-O-glucuronid), R₂ (Luteolin-7-O-diglucuronid), R₃ (Isovitexin-2"-O-arabinosid) und R₄ (Isovitexin-2"-O-galactosid) wie die Winterroggensorte *Kustro* auf (3.3.1.1). Durch die bessere Auflösung der Substanzen im neuentwickelten Gradienten konnte als weiteres akkumulierendes Flavon Isovitexin nachgewiesen werden. Isovitexin wurde

aufgrund seiner Strukturverwandtschaft mit den beiden epidermal lokalisierten Flavonen R₃ und R₄ und seiner Rolle als Vorstufe in deren Biosynthese als epidermale Komponente angesehen (3.3.3.1.1).

Die gute Auftrennung der Hydroxyzimtsäure-Derivate und ihre aufgrund der Absorptionsspektren vorgenommene Zuordnung zu den Chromophoren Ferulasäure und *p*-Cumarsäure ermöglichte eine gegenüber früheren Arbeiten (REUBER ET AL., 1993, 1996a) deutlich verbesserte Bestimmung ihres Beitrages zur potenziellen UV-B-Absorptionskapazität. LANDRY ET AL. (1995) zeigten an *Arabidopsis thaliana* L. durch den Vergleich der UV-B-Empfindlichkeiten einer Flavonoid-defizienten (*tt5*) mit einer Sinapinsäure-Ester-defizienten Mutante (*fah1*) eindrucksvoll die Bedeutung der Hydroxyzimtsäuren als UV-Schutzpigmente. SHEAHAN (1996) zeigte an diesen beiden Mutanten, dass die Sinapinsäure-Ester *in vivo* eine höhere UV-B-Attenuation in den Blättern verursachten als die Flavonoide. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass in *Arabidopsis* die Sinapinsäure-Ester in größeren Mengen als die Flavonoide vorkommen. Bei Roggen und Gerste überwiegen dagegen mit zunehmendem Primärblattalter die Flavonoide im Verhältnis zu den Hydroxyzimtsäure-Derivaten (s. Abbildungen 3.14 und 3.26).

Gerste

In der Gerste (*Ca*) konnte das Flavon Saponarin als die Hauptkomponente der Phenylpropanoide bestätigt werden (Abbildung 3.17). Ebenfalls identifiziert wurden die Flavone Lutonarin, Isovitexin und Isoorientin, wobei die letzteren beiden nur in Spuren vorkamen und daher nicht weiter als UV-Absorber ins Gewicht fallen. Auch für die Gerste gelang eine gute Auftrennung der Hydroxyzimtsäure-Derivate. Ihr Beitrag zur potenziellen UV-B-Absorptionskapazität konnte ebenfalls durch die Zuordnung der einzelnen Derivate anhand ihrer Spektren zu ihren jeweiligen Chromophoren Ferulasäure bzw. *p*-Cumarsäure beurteilt werden.

4.3.2 Gewebelokalisation der UV-Schutzpigmente

Im Roggen ist die strikte Verteilung der Flavonoide und Hydroxyzimtsäure-Derivate auf die Gewebe seit langem bekannt (R₁, R₂: Mesophyll; R₃, R₄, Hydroxyzimtsäure-Derivate: Epidermis; SCHULZ UND WEISSENBOCK, 1986). Die Gerste weist keine strikte Gewebeverteilung ihrer Flavonoide auf (PETERS, 1986; LIU ET AL., 1995). Die Verteilung der Flavonoide bzw. Hydroxyzimtsäure-Derivate innerhalb der Gewebe und auf deren einzelne Zelltypen ist jedoch wenig untersucht worden. Für die Beurteilung der Funktion dieser

Inhaltsstoffe als UV-Schutzpigmente ist deren Verteilung auf Gewebe und Zelltypen jedoch von hoher Bedeutung. Besonders in den letzten Jahren wurde die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie und die Laser-Scanning-Mikroskopie verstärkt zur Klärung dieser Fragen eingesetzt, wobei bei den nicht autofluoreszierenden Flavonen Naturstoffreagenz A zur Erzeugung von Sekundärfluoreszenz eingesetzt wurde (VOGT ET AL., 1994; SCHNITZLER ET AL., 1995; REINOLD UND HAHLBROCK, 1997; HUTZLER ET AL., 1998).

Von den Hydroxyzimtsäure-Derivaten zeigen vor allem die Derivate der Ferulasäure Autofluoreszenz. Die Autofluoreszenz läßt sich durch Behandlung mit einer Ammoniumhydroxid-Lösung verstärken und die Emission wird dabei bathochrom von blau nach grün hin verschoben und unterscheidet sich damit von der ebenfalls blauen Fluoreszenz des Lignins, die keine bathochrome Verschiebung aufweist (HARRIS UND HARTLEY, 1976; IBRAHIM UND BARRON, 1989). Über diese bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz läßt sich die zellwandgebundene Ferulasäure in frischen Handschnitten gut lokalisieren (HARRIS UND HARTLEY, 1976; REUBER, 1996; HUTZLER ET AL., 1998). Es gelang jedoch weder in Roggen- noch in Gersten-Primärblättern die blaue Autofluoreszenz der löslichen Ferulasäure-Derivate an den Handschnitten im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten, obwohl im beobachteten Stadium zumindest der Roggen-Primärblätter annähernd gleiche Mengen an löslichen wie zellwandgebundenen Ferulasäure-Derivaten im Primärblatt vorhanden waren. Auch die Inkubation mit Ammonium-Lösung (0,1 % NH_4OH in Puffer) erzeugte keine sichtbaren Signale löslicher Ferulasäure-Derivate (nicht gezeigt). Letzteres kann allerdings daran liegen, dass der pH-Wert der Vakuole nicht genügend zum basischen hin verschoben wurde und die bathochrome Verschiebung und die Signal-Verstärkung ausblieben. Höhere Ammonium-Konzentrationen wurden nicht ausprobiert. Bei höheren Konzentrationen von Ammonium ist eine Schädigung und damit eine erhöhte Durchlässigkeit der Biomembranen zu erwarten.

Roggen

REUBER (1996) wies für den Winterroggen *Kustro* anhand von Handquerschnitten 5 Tage alter unter Schwachlicht ($85 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$) angezogener Primärblätter eine gleichmäßige Verteilung der Flavone im Mesophyll nach. Außerdem zeigte er die Verteilung zellwandgebundener Ferulasäure auf alle Zellwände des Primärblattes, wobei die epidermalen Außenwände, die epidermalen Antiklinalwände, die Zellwände der Schließzellen und die Zellwände im Leitbündel die stärksten Signale aufwiesen. In den Leitbündeln waren die Fluoreszenzsignale besonders in den Xylem-Elementen vom blauen Fluoreszenz-Signal des

Lignins überlagert. Flächenschnitte von der abaxialen Epidermis belegten die Lokalisation von Flavonen in der Epidermis, wobei das Signal in den Schließzellen am stärksten war.

Diese Ergebnisse konnten an 6 Tage alten Primärblättern der Sommerroggensorte *Sorom*, unter Starklicht angezogen, bestätigt werden (Abbildung 3.7). Der für die frischen Handschnitte verwendete Puffer (100 mM K_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 5,8, 1 mM $CaCl_2$) war auf die Stabilität der Protoplasten hin optimiert worden. Ursprünglich war allerdings das für den pH-Wert besser geeignete Puffersystem MES / HCl (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) in einer Konzentration von 10 mM verwendet worden (SCHULZ UND WEISSENBÖCK, 1986; SCHMITZ, 1995; REUBER, 1996). Es stellte sich jedoch heraus, dass MES eine geringe Gelb-Fluoreszenz bei UV-Anregung (366 nm) emittierte. Daher wurde auf das für diesen pH-Bereich ungünstigere $NaKP_i$ -Puffersystem ($pK = 6,8$) gewechselt, welches jedoch keine Fluoreszenz vor und nach Zugabe von Naturstoffreagenz A aufwies. Die schlechtere Pufferwirkung wurde durch die höhere Konzentration von 100 mM ausgeglichen. Mit Neutralrot wurde die Intaktheit der Vakuolen in den Schnitten kontrolliert (nicht abgebildet). Die Plasmolyse der Protoplasten, besonders gut in den Flächenschnitten der abaxialen Epidermis des Roggenprimärblattes zu sehen, belegte die Intaktheit der Protoplasten (Abbildung 3.7).

Die Mengenverteilung der epidermalen Flavone auf ab- und adaxiale Epidermis ist für die Betrachtung ihrer Rolle als UV-Schutzpigmente ebenfalls von Bedeutung. In Querschnitten sind die sehr langen Epidermiszellen in der Regel zerstört und der Zellinhalt ausgelaufen. Dementsprechend waren keine Fluoreszenzsignale in den Epidermen in Querschnitten zu sehen (Abbildung 3.7). Daher sollte an Längsschnitten versucht werden, Hinweise auf die Verteilung der Flavone auf die beiden Epidermen zu bekommen. Dies stellte sich allerdings als recht schwierig heraus. Die Gleichverteilung der Flavone im Mesophyll war an allen Längsschnitten gut zu erkennen. Ebenfalls war in beiden Epidermen auch immer das gelbe Fluoreszenzsignal gut sichtbar (Abbildung 3.7). Das Signal in den Epidermen variierte aber stark. Dies war sehr von der Position des Schnittes abhängig. So liegt die Schnittebene der abaxiale Epidermis im abgebildeten Längsschnitt (Abbildung 3.7 D, nach unten liegend) in einer Zellreihe mit Schließzellen senkrecht zur Ebene der Epidermis, während die Schnittebene der adaxialen Epidermis (oben) die langgestreckten Epidermiszellen zeigt und, vermutlich wegen der Einsenkungen der adaxialen Epidermis (vgl. Querschnitte in Abbildung 3.7), nicht senkrecht zur Epidermis-Ebene liegt. Dies kann eventuell das unterschiedliche Fluoreszenzsignal in den beiden Epidermen erklären. Ein weiteres Problem mit den Längsschnitten besteht darin, dass

man die Ebene der Längsachse der Epidermiszellen genau treffen muss, um sinnvolle Aussagen über Fluoreszenzsignal-Unterschiede in den beiden Epidermen machen zu können. Die Betrachtung mehrerer Längsschnitte verschiedener Primärblätter hinterließ jedoch eher den Eindruck einer Gleichverteilung der Flavone auf die Epidermen. Frühere Untersuchungen an *Kustro* (Schwachlicht) wiesen ebenfalls auf eine Gleichverteilung hin (STRACK ET AL., 1982; PETERS, 1986). Neuere Untersuchungen zur Absorption von UV-B- und UV-A-Strahlung in den Epidermen von unter Starklicht angezogenen Roggenprimärblättern (BURCHARD ET AL., 2000; Messungen erfolgten über Chlorophyll-Fluoreszenz-Anregungen im UV-B bzw. UV-A mit einer Xenon-PAM nach BILGER ET AL., 1997) ergaben eine geringfügig stärkere Absorption in der abaxialen Epidermis. Dieser Unterschied bestand aber nur in 5 Tage alten Primärblättern und glich sich mit zunehmendem Alter aus (P. Burchard, persönliche Mitteilung).

Gerste

Die blaue Autofluoreszenz in den Zellwänden war in den verschiedenen Schnitten der Gerste (*Ca*) genauso auf die Zellwände verteilt wie beim Roggen und nach Behandlung der Schnitte mit 0,1 % NH_4OH in Puffer wiesen die gleichen Zellwände die Farbverschiebung der Emission von blau nach grün auf (nicht gezeigt). Die Verteilung der zellwandgebundenen Ferulasäure unterschied sich bei den beiden Gramineen nicht.

Bisher lagen keine mikroskopischen Untersuchungen zur Verteilung der Flavone im Primärblatt der Gerste vor. Aufgrund des hohen Anteils (> 90 %, Abbildung 3.21) des Saponarins am Gesamtflavon-Gehalt des Primärblattes und der Farbqualität wurde das Fluoreszenzsignal nach Inkubation mit Naturstoffreagenz A auf Saponarin zurückgeführt (s. 3.4.1.2). Das gelbe Fluoreszenzsignal war sowohl im Mesophyll wie in der Epidermis zu finden (Abbildung 3.18), was die früher schon beschriebene Verteilung des Saponarins auf beide Gewebe bestätigte (PETERS, 1986; LIU ET AL., 1995). Quer- und Flächenschnitte belegten allerdings klar, dass – im Gegensatz zum Roggen-Primärblatt – im Mesophyll des Gersten-Primärblattes die Flavone in der subepidermalen Schicht stark angereichert waren. Die Aufnahmen lassen sogar eine ausschließliche subepidermale Lokalisation im Mesophyll vermuten. Jedoch ist über die Nachweisempfindlichkeit des Naturstoffreagenz A in handgeschnittenem Frischmaterial nichts bekannt, so dass eine geringe Menge an Saponarin in den anderen Mesophyll-Zellschichten nicht auszuschließen ist. Die subepidermale starke Anreicherung oder vielleicht sogar ausschließliche subepidermale Lokalisation ist von großer Bedeutung für den UV-Schutz, denn es kann davon ausgegangen werden, dass fast der gesamte

Saponarin-Gehalt des Primärblattes zur UV-B-Attenuation beiträgt. In diesem Zusammenhang ist die Epidermis und die subepidermale Zellschicht als funktionale Einheit zu betrachten.

Flächenschnitte sollten, wie schon beim Roggen, Aufschluß über die Verteilung der Flavone bezüglich der ad- und abaxialen Seite des Blattes geben. Doch auch hier treten die gleichen Schwierigkeiten wie oben beschrieben auf. Das im Flächenschnitt zu erkennende höhere Fluoreszenzsignal auf der abaxialen Seite wird durch die Querschnitt-Aufnahme nicht bestätigt. Im Querschnitt muss aufgrund des Fluoreszenzsignales auf eine Gleichverteilung auf die Epidermen geschlossen werden. In den mehreren untersuchten Schnitten verschiedener Primärblätter traten immer wieder beide Fälle auf. Wenn allerdings eine unterschiedliche Signalstärke der Fluoreszenz in den beiden Epidermen zu beobachten war, war stets das Fluoreszenzsignal der abaxialen Seite stärker. PETERS (1986) fand eher eine Gleichverteilung der Flavone auf beide Epidermen, LIU ET AL. (1995) hingegen schätzte mit der gleichen Methode (mechanische Separation der Gewebe) für Saponarin ein Verhältnis von 4:1 (abaxiale Epidermis zu adaxiale Epidermis). In beiden Fällen handelte es sich um Primärblätter der Sorte *Atlas* und die Untersuchungen erfolgten durch HPLC-Analyse mechanisch separierter Gewebe. Bei der mechanischen Separation wird nach geeigneten Einschnitten mit einer Rasierklinge in das Blatt die Epidermis mit einer Pinzette abgezogen. Hierbei wird neben den Epidermiszellen aber besonders die subepidermale Zellschicht mechanisch belastet und zum Teil zerstört. Bei einer subepidermalen Lokalisation des im Mesophyll befindlichen Anteils des Saponarins dürften bei diesem Vorgehen allerdings unkalkulierbare Kontaminationen und Verluste auftreten. Zusätzlich ist die adaxiale Epidermis wegen der Einbuchtungen besonders schwer mechanisch zu separieren. Bei der Penetrationsmessung von UV-B-Strahlung am intakten Blatt mit einer Glasfaser-Optik (zur Methode: CEN UND BORNMAN, 1993) fand REUBER (1996) in der Sorte *Hege* jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen ad- und abaxialer Seite. Die nicht-invasive Methode der Messung der epidermalen Transmission mit einer Xenon-PAM (s.o.) ergab an der Gerste *Hege* ein Verhältnis der Transmission zwischen ab- und adaxialer Seite von 1,4 : 1 in 5 Tage alten Primärblättern, das dann mit zunehmenden Alter auf ein Verhältnis von 1:1 ausgeglichen wurde (P. Burchard, persönliche Mitteilung). Was nun für die Gersten-Sorte *Ca* zutrifft, lässt sich nicht eindeutig sagen. Im weiteren wird von einer Gleichverteilung der UV-absorbierenden Substanzen ausgegangen.

Das starke Fluoreszenzsignal in den Schließzellen der abaxialen Epidermis von Roggen (*Sorom*) und Gerste (*Ca*) wies auf eine hohe Konzentration an Flavonen in diesem Zelltyp hin.

Flavonoide in Schließzellen wurden z.B. auch in *Vicia faba* (SCHNABL ET AL., 1986), *Pisum sativum* (WEISSENBÖCK ET AL., 1986), *Allium cepa* (WEISSENBÖCK ET AL., 1987), *Tradescantia spec.* (TAKAHAMA, 1988) und *Zea mays* (SCHNABL ET AL., 1989) gefunden. Die Funktion der Flavonoide in den Schließzellen ist bisher unbekannt. Die chloroplastenhaltigen Schließzellen sind auf der einen Seite von hoher funktioneller Bedeutung für das Blatt, auf der anderen Seite sind sie in der Epidermis stark strahlungsexponiert. Daher lässt sich als eine Funktion der Flavone in den Schließzellen der UV-Schutz vermuten.

Interessanterweise waren, im Gegensatz zum Roggen (*Sorom*), in der Gerste (*Ca*) keine Flavone in den Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates mittels Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren. Wenn in den Nebenzellen der Gerste-Epidermis keine anderen UV-B absorbierenden Substanzen akkumulieren, könnte an diesen Stellen UV-B-Strahlung fast ungehindert ins Mesophyll eindringen. Da sich unter dem Spaltöffnungsapparat noch der oft sehr ausgedehnte substomatäre Raum befindet, würde die Strahlung trotz der subepidermalen Lokalisation der Flavone weit ins Mesophyll vordringen können. In Primärblättern von Mais wurden ebenfalls Hinweise auf Flavonoide in den Schließzellen, nicht aber in den Nebenzellen erhalten. In den Nebenzellen fand man Hinweise auf die Lokalisation von Hydroxyzimtsäure-Derivaten (SCHNABL ET AL., 1989). Da auch in der Gerste lösliche Hydroxyzimtsäure-Derivate vorhanden sind (3.4.1.1), könnten diese hier in den Nebenzellen dafür sorgen, dass ein "UV-Absorptionsloch" in der Epidermis nicht auftritt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an den Primärblättern der Mutante demonstrieren visuell beeindruckend den Mangel an Flavonen. Ansonsten unterschieden sich Mutante und Muttervarietät nicht voneinander.

4.3.3 Akkumulation und potenzielle UV-B-Absorptionskapazität der UV-Schutzpigmente

Die Komplexität der Dynamik der einzelnen Komponenten der potenziellen UV-B-Schutzpigmente zeigt auf (Abbildung 3.14, 3.26), wie notwendig eine genaue Analyse zur Bedeutung dieser verschiedenen Komponenten für den UV-Schutz ist. In der Literatur wird oft nur die Absorption methanolischer Extrakte im Photometer bestimmt (z.B. STAPLETON UND WALBOT, 1994; KANG ET AL., 1998; MAZZA ET AL., 1999) und auch die Gewebelokalisation wichtiger Komponenten vernachlässigt.

Roggen

Der Gehalt der epidermalen Flavone R₃ und R₄ stieg während der Primärblatt-Entwicklung von allen untersuchten Phenylpropanoiden am stärksten an (Abbildung 3.14), sodass sich auch die Konzentration (pro mg Frischgewicht) erhöhte. Zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht führte sogar zu einer frischgewichtsbezogenen Akkumulationssteigerung um den Faktor 2. Die Akkumulation der Mesophyll-Flavone R₁, R₂ und der epidermalen löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate war hingegen weitestgehend unbeeinflusst von der Anzuchtbedingung (Abbildung 3.14). Dies bestätigte frühere Untersuchungen zur Strahlungsregulation der Phenylpropanoide im Schwach- und Starklicht (JÄGER, 1993; REUBER, 1996; MAJER, 1996) an der Roggen-Sorte *Kustro*.

Der Vergleich der UV-B-Absorptionskapazitäten auf Gewebe-Ebene wies die Epidermis als potenziellen Hauptabsorber der UV-B-Strahlung aus (Abbildungen 3.9, 3.15). In der Tat fanden REUBER ET AL. (1996a) durch Penetrationsmessungen von UV-B-Strahlung mit einer Glasfaser-Optik eine epidermale Transmission bei 310 nm von nur 7 % in 7 d alten Roggen-Primärblättern der Sorte *Kustro* (Anzucht unter Starklicht mit UV-B). Dies sind typische Werte für Gräser und sie stehen mit den epidermalen Transmissionen von Laubbaumblättern zwischen denen der Blätter dicotyler Kräuter (59 - 82 %) und denen der Nadeln von Gymnospermen (bis annähernd 0 %; DAY ET AL., 1993). Nach BURCHARD ET AL. (2000; Xenon-PAM s.o.) sind für die epidermale UV-B-Strahlungsabsorption im Roggen-Primärblatt (*Kustro*) alleine die beiden löslichen epidermalen Flavone und die löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate verantwortlich. Die löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate leisteten besonders in jungen Primärblattstadien mit zum Teil über 50 % einen wichtigen Beitrag zur epidermalen UV-B-Absorptionskapazität (Abbildungen 3.9, 3.15). Ihr Anteil nahm jedoch mit dem Alter des Primärblattes ab (Abbildung 3.15), entsprechend verdoppelte sich derjenige der epidermalen Flavone. Während der Primärblattentwicklung unter WL+UV erhöhte sich die potenzielle epidermale UV-B-Absorptionskapazität um ca. die Hälfte (Abbildung 3.15). Aufgrund der geringen, von der Anzuchtbedingung unbeeinflussten Akkumulation der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate während des Wachstums kann man diesen Stoffpool als die konstitutive Komponente der UV-Schutzpigmente bezeichnen, während die epidermalen Flavone die adaptive Komponente darstellen.

Der Beitrag der Mesophyll-Flavone zur UV-B-Absorptionskapazität des Blattes war zwar gering (Abbildung 3.15), jedoch zeigte REUBER (1996) auch eine deutliche Attenuation von

UV-B-Strahlung im Mesophyll. Vor allem in jungen Blattstadien, wo ihr Anteil am Gesamtgehalt der Phenylpropanoide höher war, könnten sie einen wichtigen Beitrag zur UV-B-Attenuation geleistet haben. Im UV-Schutz liegt aber sicher nicht die Hauptbedeutung dieser Flavone. Die bekannte Akkumulationskinetik von R_1 während der Primärblatt-Entwicklung (Akkumulation bis zum 8. Tag mit dann folgender Verringerung der Menge, s. S. 82) legt eine andere Hauptfunktion nahe. In Konzentrationen, die in den Blättern vorkommen, scheint R_1 antifungal zu wirken (Prof. Weissenböck, persönliche Mitteilung). R_2 könnte eine Bedeutung als Antioxidans haben. Dieser Aspekt wird noch weiter unten zusammen mit der möglichen Bedeutung des Lutonarinins für die Gersten-Primärblätter diskutiert.

Wie schon bei den Ergebnissen gesagt, ist der Beitrag zellwandgebundener Hydroxyzimtsäuren zum UV-Schutz schwer zu beurteilen (s. 3.3.3.1.2). Allerdings fanden BURCHARD ET AL. (2000; Xenon-PAM s.o.) neben den löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivaten und den Flavonen keinen Hinweis auf einen weiteren UV-B-Absorber in der Epidermis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass schon das junge Primärblatt in der Epidermis eine hohe potenzielle UV-B-Absorptionskapazität durch lösliche Pigmente aufwies, die sich nur wenig während der weiteren Entwicklung steigerte. Sie führte wahrscheinlich zu einer starken UV-B-Attenuation in der Epidermis des Primärblattes. Mesophyll-Flavone und zellwandgebundene Hydroxyzimtsäuren spielen für den UV-Schutz eine untergeordnete oder keine Rolle.

Gerste

Die frischgewichtsbezogenen Gehalte der beiden Flavone Saponarin und Lutonarin in den Primärblättern der Gerste (*Ca*) waren unter WL+UV höher als unter WL (3.4.2.1., 3.4.3.1.1). Wie schon im Roggen, waren die löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate weitestgehend unbeeinflusst von der Menge an UV-Strahlung in der Anzucht (Abbildungen 3.20, 3.26). Dies stimmte mit den Ergebnissen von Gewächshaus-Experimenten unter Starklicht von REUBER (1996) und Kammer-Experimenten unter Starklicht von BRÜCKMANN (1998) überein und traf auch auf Primärblätter von im Gewächshaus angezogener Gerste zu (LIU ET AL., 1995). Bezogen auf das Frischgewicht erhöhte sich nur die Konzentration des Lutonarinins unter WL+UV während der Primärblatt-Entwicklung, die Saponarin-Konzentration blieb gleich, die der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate sank (3.4.3.1.1). LIU ET AL. (1995) fanden in ihren Gewächshausexperimenten an Gerste unabhängig von der UV-B_{BE}-Dosis (9 und 14 kJ / m², gewichtet nach CALDWELL, 1971, und normiert auf 300 nm) sogar eine Verringerung des

Gehaltes an löslichen Ferulasäure-Derivaten in apikalen Primärblattsegmenten. So kann auch für das Gersten-Primärblatt, wie schon beim Roggen (s.o.), der Pool der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate als eine konstitutive Komponente und der Flavon-Pool als eine adaptive Komponente der UV-Schutzpigmente angesehen werden.

Die Betrachtung der UV-B-Absorptionskapazität auf Gewebe-Ebene war wegen der fehlenden strikten Gewebelokalisation der Inhaltsstoffe (s.o.) nur eingeschränkt möglich. Nimmt man jedoch die beiden Zellschichten, Epidermis und subepidermale Zellschicht, in denen der Hauptabsorber im UV-B-Bereich, das Saponarin, anscheinend hauptsächlich oder sogar ausschließlich lokalisiert war (s.o.), als funktionale Einheit zusammen, so war dort schon in frühen Primärblattstadien unter beiden Anzuchtbedingungen mindestens 60 - 70 % (= Anteil des Saponarins) der UV-B-Absorptionskapazität des Blattes zu finden. Dieser Anteil lag aber vermutlich höher, da davon auszugehen ist, dass zumindest ein Teil der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate ebenfalls in diesen beiden Zellschichten lokalisiert war. In späteren Primärblattstadien stieg dieser Anteil sogar auf 80 % an. Der Beitrag der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate war hier, wie beim Roggen schon, in jungen Primärblattstadien höher als in älteren, jedoch lag ihr Anteil in den jungen Stadien mit ca 35 % unter dem Anteil dieses Stoffpools im Roggen (s.o.). REUBER ET AL. (1996b) zeigte mit seinen Glasfaseroptik-Messungen an 7 Tage alten Primärblättern dem Roggen entsprechende Werte epidermaler UV-B-Transmission von 10 % (Starklichtanzucht mit UV-B). Die Messung der epidermalen Absorption an Gerste mit der Xenon-PAM-Methode nach BILGER ET AL. (1997) ergab, dass diese sehr gut mit den Gehalten an Flavonen und löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate korrelierte (P. Burchard, persönliche Mitteilung), wobei davon auszugehen ist, dass zwischen einer rein epidermalen und einer subepidermalen Lokalisation mit dieser Methode nicht eindeutig unterschieden werden kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass die löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate ähnlich lokalisiert waren wie das Saponarin. Fasst man die UV-B-Absorptionskapazitäten beider Stoffpools zusammen, so verringert sich während der Primärblatt-Entwicklung, selbst unter WL+UV, die potenzielle UV-B-Absorptionskapazität des Primärblattes (Abbildung 3.27).

Lutonarin lag, obwohl sich sein Gehalt durch zusätzliche UV-Strahlung bis 5,5fach steigerte, im Vergleich zum Saponarin und den löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivaten, nur in geringen Mengen vor. Es lieferte somit nur einen geringen Beitrag zur UV-B-Absorptionskapazität (Abbildung 3.27). Auch im Roggen lag mit dem Mesophyllflavon R₂ eine Komponente mit starker Akkumulation während der Primärblattentwicklung vor (wenn auch

unbeeinflusst von UV-Strahlung), deren Bedeutung für die potenzielle UV-B-Absorptionskapazität eher gering war. Beiden Flavonen ist gemeinsam, dass sie 2 freie Hydroxyl-Gruppen am B-Ring in ortho-Stellung tragen (s. Abbildungen 1.8, 1.9; der B-Ring ist der in den Strukturformeln rechts liegende, aus der Biosynthese der Hydroxyzimtsäure stammende, aromatische Ring). Die UV-beeinflusste Verschiebung des Verhältnisses zwischen Monohydroxy-Flavonoiden (1 freie Hydroxylgruppe am B-Ring) und Dihydroxy-Flavonoiden (2 freie Hydroxylgruppen in ortho-Stellung am B-Ring) zu Gunsten der letzteren wurde auch schon in Blättern anderer Pflanzenarten beobachtet (*Brassica napus*: OLSEN ET AL. 1998; *Marchantia polymorpha*: MARKHAM ET AL., 1998a; *Oryza sativa*: MARKHAM ET AL., 1998b; *Petunia spec.*: RYAN ET AL., 1998). Es wird vermutet, dass sie eine Rolle als Antioxidantien spielen, da Dihydroxy-Flavonoide eine höhere Radikalfänger-Aktivität als die Monohydroxy-Flavonoide aufweisen (TOURNAIRE ET AL., 1993, HU ET AL., 1995; RICE-EVANS ET AL., 1995, MARKHAM ET AL., 1998b).

In der Gersten-Mutante *ant* waren die löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate aufgrund der geringen Flavonmenge Hauptabsorber der UV-Strahlung (Abbildungen 3.21, 3.27). Der Gehalt an Hydroxyzimtsäure-Derivaten in der Mutante entsprach bei dem Bezug auf das Frischgewicht durchschnittlich dem der Muttervarietät und war auch unabhängig von der Anzucht. Dies unterstreicht nochmals den konstitutiven Charakter dieses Substanz-Pools, der nicht zur Kompensation des Verlustes der Flavone als UV-Absorber verstärkt akkumuliert wurde. Außerdem akkumulierte in Primärblättern der Gersten-Mutante (*ant*) das nicht in der Muttervarietät vorkommende Chalkon-Glucosid Isosalipurposid (s. 3.4.1.1). Seine Akkumulation war sogar unter zusätzlicher UV-Strahlung verstärkt (Abbildungen 3.21, 3.27). Die Akkumulation reichte aber auch nicht zur Kompensation des Verlustes der potenziellen UV-B-Absorptionskapazität durch die Flavonoid-Defizienz aus. Glasfaseroptik-Messungen zur Strahlungspenetration an der *ant 310* vergleichbaren Mutante *ant 287* wiesen eine 4fach höhere Transmission durch die Epidermis auf als deren korrespondierende Muttervarietät *Hege* (REUBER ET AL., 1996b).

Für den Beitrag der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren zum UV-Schutz im Primärblatt der Muttervarietät galt das gleiche wie beim Roggen (s.o.). In der Gerste *Hege*, mit entsprechenden Inhaltsstoff-Mengen wie bei der Sorte *Ca*, fand sich kein Hinweis auf einen weiteren UV-B-Absorber neben den löslichen Komponenten (P. Burchard, persönliche Mitteilung, Xenon-PAM-Messungen s.o.). Dies traf auch auf die von der Sorte *Hege* abstammende Flavonoid-defiziente Mutante *ant 287* zu (s.o.).

Zusammenfassend lässt sich für die Gerste sagen, dass die jungen Primärblattstadien einen höheren potenziellen UV-Schutz im Vergleich zu den älteren aufwiesen. Die Absorption erfolgte hier in der funktionalen Einheit von Epidermis und subepidermalen Zellschicht. Die Mutante war nicht in der Lage ihren Verlust an Flavonoiden zu kompensieren und wies nur eine 25 - 35 % UV-B-Absorptionskapazität verglichen mit der Muttervarietät auf. Die Mutante stellt damit ein geeignetes System zur Beurteilung der Bedeutung der Flavonoide im Schutz des Erbgutes vor biochemischen Veränderungen durch UV-Strahlung dar. Zellwandgebundene Hydroxyzimtsäuren hatten vermutlich keine Bedeutung für die Strahlungsabsorption.

Roggen und Gerste vergleichend lässt sich feststellen, dass in beiden Systemen die Hydroxyzimtsäure-Derivate die konstitutive und die Flavone die adaptive Komponente der UV-Schutzpigmente darstellen. Während im Roggen hauptsächlich in der Epidermis die UV-B-Strahlung attenuiert wird, geschieht dies bei der Gerste durch die Epidermis und die subepidermale Zellschicht.

4.4 Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation und der DNA-Reparatur für die DNA-Schadensakkumulation in einem frühen Primärblattstadium

Die Schädigung der DNA stellt eine der wichtigsten Auswirkungen von UV-Strahlung auf der molekularen Ebene für Pflanzen dar. Die Schädigungen entstehen durch den UV-B-Bereich (280 - 320 nm) des Spektrums aufgrund direkter Photonenabsorption. Als Hauptprodukte in Pflanzen entstehen Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD, ca. 75 %) und Pyrimidin(6-4)pyrimidin-Dimere (6-4PP) bzw. ihre Dewarisonomere. Von den möglichen CPD entstehen hauptsächlich Thymin-Dimere (s. 1.1.2.1). Die Messung dieses DNA-Schadens als UV-B-Stressparameter zur Beurteilung von UV-Schutzfunktionen, z.B. von Flavonoiden, ist daher weit verbreitet. Hierbei gilt aber zu beachten, dass UV-induzierte DNA-Schäden von den Zellen wieder repariert werden können. In Pflanzen dürfte die Photoreaktivierung der wichtigste und schnellste Reparatur-Prozess der CPD sein und ist auf das für CPD spezifische Enzym Photolyase zurückzuführen (s. 1.1.3.1). Daher war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit parallel zu dem Einfluss der Phenylpropanoid-Akkumulation oder ihres Fehlens, auf die CPD-Bildung und die DNA-Reparatur einzugehen. Insbesondere der Photoreaktivierung untersuchen.

Anmerkung: In der Literatur ist es üblich von CPD zu sprechen, auch wenn der Nachweis über den häufig verwendeten, Thymin-Dimer-spezifischen Antikörper TDM-1 von MIZUNO ET AL. (1991) erfolgte. TDM-1 erkennt keine anderen CPD. Auch der in der vorliegenden Arbeit verwendete, käufliche Antikörper (Kamiya Biomedical Co., Seattle, USA) ist nach Herstellerangaben spezifisch für Thymin-Dimere. Der Nachweis von CPD mittels der UV-Endonuklease aus dem Bakteriophagen T4 ist eine weitere häufig verwendete Methode. Die UV-Endonuklease erkennt neben den Thymin-Dimeren auch andere CPD. Die Thymin-Dimere stellen aber die häufigste Form der CPD dar (s. 1.1.2.1). Um die Diskussion zu vereinfachen, wird im weiteren, der Literatur folgend, nur noch allgemein von CPD gesprochen.

4.4.1 Photoreaktivierung

Dass junge Primärblätter von Roggen und Gerste (Muttervarietät und Mutante) tatsächlich CPD photoreaktiveren können, konnte in der Reparaturphase der Experimente nachgewiesen werden (Abbildungen 3.11, 3.23). Für Roggen war dies der erste Beleg von Photoreaktivierung von CPD, für Gerste (MAZZA ET AL., 1999) und andere Gramineen wie Mohrenhirse, Weizen, Reis und Mais (HADA ET AL., 1996; TAYLOR ET AL., 1996; HIDEWA ET AL., 1997; STAPLETON ET AL., 1997) konnte Photoreaktivierung schon gezeigt werden. In höheren Pflanzen ist Photoreaktivierung weit verbreitet (z.B. *Arabidopsis thaliana* L., Pang und Hays, 1991; *Medicago sativa*, TAKAYANAGI ET AL., 1994; *Glycine max*, CANNON ET AL., 1995; *Cucumis sativus*, TAKEUCHI ET AL., 1996; *Spinacia oleracea*, HADA ET AL., 1998).

Die Photoreaktivierung erfolgte in Blättern beider Gramineen schnell, sodass schon nach einer Stunde Reparaturphase zum Teil ein konstantes Niveau an CPD erreicht wurde (Abbildung 3.11, 3.23). Eine schnelle Reparatur wurde in der Regel auch bei den bisher untersuchten Pflanzenarten gefunden (Literatur s.o.), wobei in *Arabidopsis thaliana* die Reparatur am langsamsten abzulaufen scheint (80 % des anfänglichen Schadens nach 3-6 h repariert, PANG UND HAYS, 1991; BRITT ET AL., 1993; LANDRY ET AL., 1997). Allerdings ist der Vergleich der Daten sehr schwierig, da unterschiedliche Anzuchtbedingungen (Dunkelheit, Schwach- und Starklicht), Bestrahlungsbedingungen (UV-C, UV-B/C, UV-B, unterschiedliche Dosen) und Photoreaktivierungsbedingungen (nur Blaulicht, Schwach-, Starklicht) in den Untersuchungen verwendet worden sind, denn die Reparaturrate ist unter anderem von der Bestrahlungsstärke während der Photoreaktivierung (TAYLOR ET AL., 1996) und der Schadensmenge zu Beginn der Photoreaktivierungsphase (QUAITE ET AL., 1994; SUTHERLAND ET AL., 1996) abhängig. Letzteres wurde auch in dieser Arbeit festgestellt. Die Gersten-Mutante wies nach Bestrahlung sehr viel mehr CPD auf als die Muttervarietät und reparierte in der gleichen Zeit (1 h) mehr (Abbildung 3.23). Beim Roggen entstand durch die B-Bestrahlung (nur UV-B) mehr CPD als nach der BAP-Bestrahlung, und die nach 1 h reparierte Thymin-

Dimer-Menge war nach der B-Bestrahlung höher als nach der BAP-Bestrahlung (Abbildung 3.11). In beiden Fällen (Gerste und Roggen) ist jedoch der Verlauf der Reparatur innerhalb der ersten Stunde der Reparaturphase unbekannt, da in diesem Zeitraum keine Messungen erfolgten. So könnte beispielsweise in der ersten halben Stunde die Reparaturrate in Mutante und Muttervarietät (Gerste) bzw. B- und BAP-bestrahlten Primärblättern (Roggen) auch durchaus gleich gewesen sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die Beobachtung, dass keine vollständige Reparatur der entstandenen CPD erfolgte (Literatur s.o.). Die Abhängigkeit der Reparaturrate von der zu Beginn vorliegenden Schadensmenge wird von QUAITE ET AL. (1994) mit der höheren CPD-Konzentration und der dadurch schnelleren Bildung des DNA-Photolyase-Komplexes, welcher der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist, erklärt. Daraus folgt, dass mit sinkender CPD-Konzentration die Reparatur immer langsamer abläuft. Bei geringen CPD-Konzentrationen könnte die Reparatur so fast ganz zum Erliegen kommen. Der immer wieder verbliebene Restschaden könnte demnach eine solche geringe CPD-Konzentration darstellen. Vermutlich ist der Grund für diesen Restschaden aber sehr viel komplexer, denn die Reparaturrate ist nicht in der gesamten Kern-DNA gleich. Sie hängt z.B. von der Chromatin-Struktur ab. In Hefe wurde festgestellt, dass die Photoreaktivierung von CPD in Nukleosomen gehemmt aber in aktiven Genen und deren Promotorregionen sehr hoch war (SUTER ET AL., 1997). Dies konnte auch in Experimenten mit gereinigter CPD-Photolyase (*E. coli*) *in vitro* belegt werden (SCHIEFERSTEIN UND THOMA, 1998). Damit wäre eine Anhäufung von DNA-Schäden in den inaktiven, in Nukleosomen verpackten Bereichen denkbar. Auch muss man die Zellorganellen mit einbeziehen. So konnte in Chloroplasten und Mitochondrien von *Arabidopsis*-Keimlingen keine Photoreaktivierung von CPD festgestellt werden (CHEN ET AL., 1996). Auf der anderen Seite wiesen STAPLETON ET AL. (1997) in beiden Organellen und HADA ET AL. (1998) in Spinat-Chloroplasten Photoreaktivierung von CPD nach. In Sojabohnen-Zellkulturen wurde eine plastidäre Photoreaktivierung erst nach einer Verzögerung von 4 h nach Beginn der Reparaturphase festgestellt (CANNON ET AL., 1995). Über die Reparatur von Schäden in den Organellen von Roggen und Gerste ist nichts bekannt, wenn aber keine vorhanden wäre, könnten sich auch hier Schäden anhäufen.

Bei den Kontrollmessungen der lichtunabhängigen Reparatur war bei allen drei Sorten (Roggen *Sorum*, Gerste *Ca* und *ant*) eine Tendenz zur Induktion dieses Reparatursystems durch zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht zu beobachten (Abbildungen 3.11, 3.23). Diese Tendenz wurde zwar in dieser Arbeit nicht signifikant abgesichert, jedoch ist es schon auffällig,

dass sie zumindest in zwei Sorten (Roggen *Sorom*, Gerste *ant*) und dort bei jeweils beiden Bestrahlungsbedingungen zu beobachten war. Über lichtunabhängige Reparatur existieren recht widersprüchliche Ergebnisse. Selbst in ein und demselben Pflanzensystem (*Arabidopsis thaliana*) konnte man sie im Wildtyp teils nachweisen (PANG UND HAYS, 1991) und teils keine beobachten (LANDRY ET AL., 1997). Aber in der Luzerne (*Medicago sativa*: QUAITE ET AL., 1994) und in der Sojabohne (*Glycine max*: SUTHERLAND ET AL., 1996) fand man erst eine Dunkelreparatur, wenn eine bestimmte Schadenskonzentration vorhanden war. Hiermit wären nach Meinung der Autoren die Widersprüche in anderen Systemen eventuell zu erklären. In diesem Zusammenhang ist auch zu bedenken, dass die lichtunabhängige Reparatur von CPD über verschiedene Wege erfolgen kann (s. 1.1.3.1 u. Abbildung 1.6): BER (base excision repair), NER (nucleotide excision repair) und UVER (UV damage excision repair). Im allgemeinen wird aber nur eine lichtunabhängige Reparatur *in vivo* durch Messung der CPD-Menge nachgewiesen, was keine Unterscheidung dieser drei Reparaturwege zulässt. Eine Unterscheidung ist nur durch Nachweis und Aktivitätsmessungen der unterschiedlichen Enzyme dieser drei Reparaturwege möglich.

Eine lichtunabhängige Reparatur fand man bisher in allen daraufhin untersuchten Gramineen-Arten (*Triticum aestivum* L.: TAYLOR ET AL., 1996; *Oryza sativa* L.: HIDEMA ET AL., 1997; *Zea mays* L.: STAPLETON ET AL., 1997). Wenn eine lichtunabhängige Reparatur in Pflanzen (Gramineen und andere; Literatur s.o.) nachgewiesen wurde, verlief sie allerdings wesentlich langsamer als die Photoreaktivierung, somit hat die Photoreaktivierung für die Pflanze im UV-Schutz sicherlich eine höhere Bedeutung.

4.4.2 Beeinflussung der CPD-Bildung durch Phenylpropanoid-Akkumulation und Photoreaktivierung

Der Schutz der DNA vor schädigender UV-B-Strahlung durch Flavonoide in der intakten Pflanze konnte hier deutlich durch den Vergleich der flavonoidarmen Gerste-Mutante mit der flavonoidführenden Muttervarietät gezeigt werden. So wiesen die Primärblätter im frühen Entwicklungsstadium der Mutante im Vergleich zur Muttervarietät mit einer ihr gegenüber um 65 - 75 % reduzierten UV-B-Absorptionskapazität am Ende der Bestrahlungsphase eine 4,5 bis 9fach höhere CPD-Konzentration auf (Abbildung 3.22 und S. 77). STAPLETON UND WALBOT (1994) wiesen in einer flavonoidarmen Mutante von *Zea mays* nach einer UV-B-Bestrahlung eine doppelt so hohe CPD-Konzentration als in der korrespondierenden flavonoid-reichen Sorte auf. Der unterschiedliche Gehalt an Flavonoiden und anderen Phenylpropanoiden wurde hier

allerdings nicht quantifiziert, ebenfalls fehlen genaue Angaben zur UV-B-Dosis. An den vielen Flavonoid-defizienten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* L. (zur Übersicht der Mutanten: BHARTI UND KHURANA, 1997) wurden bisher keine Untersuchungen zur Schädigung der DNA durch UV-B-Strahlung durchgeführt.

In Roggen und Gerste (*Ca*) zeigten die jungen 5 bzw. 6 d alten Primärblätter nur eine geringe Erhöhung der UV-B-Absorptionskapazität von 20 % durch zusätzliche UV-Strahlung in der Anzucht (Abbildungen 3.9, 3.21), die auf die Erhöhung des Flavon-Gehaltes zurückzuführen war. Dies führte zu keiner Verringerung der CPD-Akkumulation in den Blättern. Dies verdeutlicht besonders die Bestrahlung mit der Bedingung B (UV-B und keine Photoreaktivierung; vgl. Abbildungen 3.10, 3.22, und erläuternder Text). Solche geringfügigen Änderungen haben anscheinend keinen Einfluss auf die CPD-Bildung. KANG ET AL. (1998) fanden in Blättern von Reis eine klare negative, lineare Korrelation zwischen UV-B-induzierter CPD-Konzentration und der Absorption von Rohextrakten bei 330 nm (entspricht dem Gesamtgehalt an löslichen UV-absorbierenden Komponenten), die auf das Frischgewicht bezogen wurde. Dabei unterschieden sich die Proben mit der höchsten Absorption bei 330 nm um den Faktor 13 von den Proben mit der geringsten Absorption. Geringe Änderungen der UV-B-Absorptionskapazität haben also vermutlich keine signifikanten messbaren Unterschiede zur Folge.

An den Roggen-Primärblättern konnte die Bedeutung der Photoreaktivierung auf die CPD-Akkumulation durch den Vergleich der beiden Bestrahlungsbedingungen BAP (mit Photoreaktivierung) und B (ohne Photoreaktivierung) demonstriert werden. Ohne Photoreaktivierung akkumulierte der 2,5 - 3,5fache Schaden in den jungen Primärblättern. Anders formuliert: mit Photoreaktivierung konnte 60 - 70 % des entstandenen Schadens unmittelbar wieder repariert werden. Ähnliche vergleichende Messungen fanden sich nur bei TAYLOR ET AL. (1996) an Primärblättern des Weizens. Hier war der Effekt sogar noch drastischer: Die Autoren fanden unter simultaner Bestrahlung mit UV-B + UV-A/PAR (knapp $700 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$, entspricht BAP dieser Arbeit) eine kaum messbare CPD-Menge nach einer 8stündigen Bestrahlung (entsprach einer UV-B_{BE} von $10 \text{ kJ} / \text{m}^2$). Nach UV-B-Bestrahlung mit einem Breitbandstrahler (eine gewisse Menge UV-A war vorhanden aber keine PAR, zu Problematik siehe Diskussion in 4.2.2) fanden sie eine deutliche Schadensakkumulation.

Um so erstaunlicher war das Ergebnis in den Gerste-Primärblättern. Hier traten keine Unterschiede in der CPD-Akkumulation zwischen den beiden Bestrahlungsbedingungen auf (Abbildung 3.22). Dieser Befund gewinnt dadurch an Bedeutung, dass er bei beiden Gerste-

Sorten (*Ca* und *ant*) für jede Anzuchtbedingung erhalten wurde. Selbst der Unterschied zwischen BAP und B nach der Bestrahlung in den WL+UV-Primärblättern der Sorte *Ca* war mit $p \leq 5\%$ nur schwach signifikant. Fehlende Photoreaktivierung in der Gerste kann nicht der Grund für das beobachtete Ergebnis sein, da eine Photoreaktivierung eindeutig in der Reparaturphase nachgewiesen wurde (Abbildung 3.23). Ebenfalls aufgrund der Ergebnisse aus der Reparaturphase kann eine vollständige Kompensation der fehlenden Photoreaktivierung durch lichtunabhängige Reparatur ausgeschlossen werden, da diese eindeutig langsamer als die Photoreaktivierung ablief. Auch eine Induktion der für die Photoreaktivierung benötigten Photolyase durch die 6stündige UV-B-Strahlung sollte auszuschließen sein, da auch bei WL+UV-Primärblättern kein Unterschied zwischen den Bestrahlungsbedingungen besteht und hier eine Induktion schon stattgefunden haben müsste. Möglich wäre eine voll aktive Photoreaktivierung unter beiden Bestrahlungsbedingungen. Dies würde entweder eine von anderen Photolyasen stark abweichendes Wirkungsspektrum, welches sein Maximum im UV-B-Bereich aufweisen müsste, bedeuten, oder aber das Gersten-Enzym müsste so effizient die Quanten ausnützen, dass die geringe noch verbliebene Bestrahlungsstärke im Bereich der Photoreaktivierungswellenlängen (s. Tabelle 2.3) schon im Sättigungsbereich der Enzymaktivität lag. Eine solch extreme Abweichung von anderen Photolyasen ist aber sehr unwahrscheinlich, da die bisher untersuchten pflanzlichen Photolyasen große Ähnlichkeiten in ihren Charakteristika aufweisen (s. 1.1.3.1). Letztendliche Aufklärung kann nur durch eine genauere Untersuchung der Photoreaktivierung und der lichtunabhängigen Reparatur in der Gerste erfolgen. Hier wären zunächst sicherlich Enzymaktivitätsmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Bestrahlung durchzuführen. Es könnte sich aber auch eine Reinigung und Charakterisierung der Photolyase als nötig herausstellen. Dies war aber nicht Ziel dieser Arbeit.

Dennoch hatte die Photoreaktivierung eine große Bedeutung in der Gerste. Dies zeigte die anschließende Reparaturphase, die schon weiter oben diskutiert wurde. Selbst die enorm hohe CPD-Konzentration in der Mutante nach der UV-B-Belastung wurde drastisch durch das Reparatur-System reduziert (Abbildung 3.23). Betrachtet man die Menge an verbliebenem Schaden am Ende der Reparatur-Phase (Abbildung 3.24) war diese um den Faktor 7 in der Mutante höher als in der Muttervarietät. Zusätzlich fällt auf, dass nach der Bestrahlung B (nur UV-B) eine effizientere Reparatur vorhanden war: Der Restschaden war deutlich geringer verglichen mit der Bestrahlungsbedingung BAP; ein Befund der im Roggen nicht zu beobachten war (Abbildung 3.12). Ob dies mit dem oben beschriebenen fehlenden Unterschied zwischen beiden Bestrahlungsbedingungen in der CPD-Akkumulation nur zufällig korreliert

oder kausal zusammenhängt, kann mit vorliegenden Ergebnissen nicht geklärt werden. Deutlich aber zeigen diese Darstellungen (Abbildungen 3.12, 3.24), dass offensichtlich nicht jeder entstandene Schaden repariert werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: In jungen Primärblattstadien von Roggen und Gerste reduziert die vorhandene UV-B-Absorptionskapazität der Phenylpropanoide, besonders der Flavonoide, zusammen mit der Photoreaktivierung die durch die hier verwendete UV-B-Belastung ($12 \text{ kJ} / \text{m}^2 \text{ UV-B}_{\text{BE}}$) maximal mögliche Schadensmenge stark. Auf der anderen Seite reicht ihre Effizienz nicht aus, um eine Schädigung ganz zu verhindern oder diese dann nachfolgend zu reparieren. Daher war die Betrachtung des Verlaufs der Schädigung während der weiteren Primärblatt-Entwicklung bis zum 18. Tag unter WL+UV, also der naturnahen Bedingung, verglichen mit der Aukkumulation potenzieller UV-Schutzpigmente von Interesse.

4.5 Die CPD-Akkumulation während der Primärblattentwicklung

Der schon oben beschriebene Restschaden konnte auch in der Dunkelphase und den folgenden ersten Stunden der Lichtphase ohne UV-B-Belastung (s. Abbildung 2.2.) nicht vollständig repariert werden. Der Restschaden stieg vielmehr während der Primärblattentwicklung von Roggen und Gerste beständig an (Abbildungen 3.16, 3.28). Phenylpropanoid-Akkumulation und DNA-Reparatur reichten also noch nicht einmal aus, um die Schädigung auf einem konstanten Niveau zu halten. Im Roggen war während der Primärblattentwicklung eine Steigerung der epidermalen UV-B-Absorptionskapazität um 50 % zu beobachten (Abbildung 3.15). Jedoch blieb der tägliche Anstieg der CPD-Konzentration während der UV-B-Bestrahlung annähernd konstant bestehen (Abbildung 3.16). Bei der Gerste (*Ca*) sank sogar die potenzielle UV-B-Absorptionskapazität der löslichen Phenylpropanoide während der Primärblattentwicklung um 33 % (Abbildung 3.27 B), was den Anstieg des täglichen Zuwachses der CPD-Konzentration erklären kann (Abbildung 3.28).

Die Ergebnisse vorliegender Experimente an der Mutante belegen eindrucksvoll die Bedeutung der Flavonoide und auch der DNA-Reparatur. Der 3 - 4,5fach (am 5. Tag sogar knapp 6fach) stärkere tägliche Zuwachs der CPD-Konzentration während der UV-B-Bestrahlung demonstriert deutlich die Bedeutung der Flavonoide, da die potenzielle UV-B-Absorptionskapazität der löslichen Phenylpropanoide durch den Mangel an Flavonoiden auf

25 - 35 % der UV-B-Absorptionskapazität der Muttervarietät reduziert war. Die enorme DNA-Reparatur-Kapazität wird vor allem in den jungen Stadien deutlich. So wurde die 5fach höhere CPD-Konzentration in der Mutante nach der UV-B-Bestrahlung am 5. Tag durch Reparatur auf fast die gleiche Konzentration der Muttervarietät um 10:00 Uhr Kammerzeit des nächsten Tages gebracht (Abbildung 3.28). Doch dann zeigte sich, dass die Reparatursysteme der Mutante nicht mehr die enorme Schadensbelastung durch den Wegfall der Flavonoide bewältigen zu können. Am 8. Tag lag der Schaden um 10:00 Uhr Kammerzeit schon bei dem 2,5fachen der Muttervarietät und steigerte sich auf das knapp 9fache am 18. Tag.

Die Folgen des akkumulierenden DNA-Schadens für das Primärblatt und die weitere Entwicklung des Keimlings bleiben allerdings unklar. Ob das reduzierte Primärblattwachstum unter UV-B-Belastung (WL+UV) im Vergleich zu unbelasteten (WL) Roggen- wie Gersten-Keimlingen (WL) auf die DNA-Schäden zurückzuführen war, konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Für Gersten-Primärblätter (Muttervarietät *Hege* und *ant 30-287*, vgl. 1.2.2) konnte unter den gleichen Anzuchtbedingungen, wie sie in dieser Arbeit Anwendung fanden, im Pflanzenanzuchtschrank gezeigt werden, dass die Photosyntheserate unbeeinflusst von der UV-B-Belastung war (BRÜCKMANN, 1998; P. Burchard, persönliche Mitteilung). Dies galt sogar für die Mutante, die bezüglich der DNA nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sicherlich wesentlich stärker geschädigt war als die Muttervarietät. Weiterhin ist anzumerken, dass im Keimlingsalter von 10 - 12 Tagen bei Roggen, Gersten-Muttervarietät und Gersten-Mutante das Folgeblatt größer als das Primärblatt war. Potenziell könnte das Folgeblatt in der Lage sein, die durch die Schädigung des Primärblattes eventuellen negativen Folgen für den Keimling zu kompensieren. Inwieweit das Folgeblatt schon geschädigte DNA aufweist ist jedoch unbekannt.

Es ist durchaus möglich, dass der verbleibende DNA-Schaden keine negativen Folgen hat, also toleriert werden kann. In diesem Zusammenhang ist die Lokalisation des Schadens im Genom zu betrachten. Wie schon weiter oben erläutert (s. 4.4.1) ist die Photoreaktivierungsrate unterschiedlich im Genom verteilt. Gerade in aktiven Genen ist sie sehr hoch (SUTER ET AL., 1997; SCHIEFERSTEIN UND THOMA, 1998). Die UV-induzierten DNA-Schäden könnten also in aktiven Genen eventuell vollständig entfernt worden sein und akkumulierten nur in inaktiven Genen. Negative Folgen von Schäden in inaktiven Genen sind in den ausdifferenzierten Zellen des Blattes nicht zu erwarten. Dies gilt sicherlich auch für Schäden in DNA-Bereichen, die weder eine codierende, noch eine regulierende Funktion haben, wie Pseudogene, repetitive Sequenzen etc. Wichtig ist auch die Verteilung der UV-induzierten Schäden in den

verschiedenen Geweben des Blattes. Es ist anzunehmen, dass in den äußeren Zellschichten mehr Schaden entsteht als in den Zellen im Blattinneren. So fanden STAPLETON ET AL. (1997) an Blättern von im Gewächshaus unter künstlicher Bestrahlung angezogenen Mais-Pflanzen (keine genauen Angaben zu den Bedingungen) Hinweise, dass bei Bestrahlung mit UV-B (0,9 bzw. 1,8 kJ/m², ungewichtete Angabe) von Blättern CPD hauptsächlich in der abaxialen Epidermis entstanden.

Die DNA-Schadensakkumulation ist auch unter natürlichen Bedingungen ein häufig zu beobachtendes Phänomen. MAZZA ET AL. (1999) beobachteten im Freiland unter ambienter UV-B-Strahlung in Gersten-Blättern CPD-Akkumulation, die höher war als unter UV-B-reduzierten (95 % bei 290 nm) Bedingungen. Auch hier war das Wachstum der Blätter reduziert. Sie fanden auch unter ambienter UV-B-Belastung, dass das Trockengewicht, die Ährenzahl und die Gesamtmasse an Karyopsen im Vergleich zu den UV-B-reduzierten Kontrollen verringert war. Erhöhte UV-B-Strahlung im Vergleich zu ambienter führte jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden bei den Ernte-Ertrag der Gerste (STEPHEN ET AL., 1999; hier erfolgte keine Messung von DNA-Schäden).

Auch in anderen untersuchten Pflanzenarten wurden in Freiland-Experimenten DNA-Schäden durch eine UV-B-Belastung festgestellt. So wiesen z.B. Keimblätter von *Medicago sativa* L. (TAKAYANAGI ET AL., 1994) und Blätter von *Glycine max* Merrill (MAZZA ET AL., 2000) unter ambienter UV-B-Strahlung DNA-Schäden auf (kein Vergleich mit Kontrollpflanzen, keine weiteren Parameter gemessen). 50 % mehr CPD akkumulierten in Blättern von *Oryza sativa* L. unter erhöhter UV-B-Strahlung als unter ambienter UV-B-Belastung (andere Parameter wurden nicht gemessen, HIDEMA ET AL., 1999). Bei *Datura ferox* L. führte im Freiland ambiente UV-B-Strahlung zu verringerter Hypocotylstreckung und reduzierter Blattfläche pro Individuum verglichen mit einer UV-B-reduzierten Anzucht (96 % bei 300 nm; BALLARÉ ET AL., 1996). Auch war das Trockengewicht unter ambientem UV-B reduziert. Parallel dazu maßen die Autoren in jungen Blättern unter ambienter UV-B-Strahlung eine höhere CPD-Konzentration verglichen mit Kontrollen unter UV-B-reduzierten Bedingungen.

4.6 Ausblick

In beiden Gramineen stellen die äußeren Zellschichten die Strahlungsbarriere dar. Aufgrund des relativ aufrechten Wuchses der Primärblätter ist die Klärung der Verteilung der UV-Schutzpigmente auf die ab- und axiale Seite des Blattes bei beiden Gramineen von Interesse.

Eine enzymatische Gewebeseparierung (nach PETERS, 1986) könnte hier Aufschluss geben. An der Gerste wäre noch die Lokalisation der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate zu klären. Hinsichtlich der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren sollte der epidermal lokalisierte Anteil bestimmt werden, um ihren Beitrag zur Strahlungsattenuation abschließend klären zu können.

Die Bedeutung der durch UV-Strahlung verstärkten Flavonoid-Akkumulation kann durch die Untersuchung des Flavonoid-Gehaltes und der Thymin-Dimer-Konzentration nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UV-B-Dosen untersucht werden. Eine tatsächliche Akklimatisierung läge dann vor, wenn sich bei einer Erhöhung der UV-B_{BE}-Dosis der Flavonoid-Gehalt und damit die UV-B-Absorptionskapazität erhöht soweit, dass trotz der höheren Strahlungsdosis die Thymin-Dimer-Konzentration nicht ansteigt.

Die Hinweise auf eine Induktion der lichtunabhängigen Reparatur durch UV-Strahlung waren nicht eindeutig und bedürfen der weiteren Klärung. Die doch recht hohe Rate der lichtunabhängigen Reparatur in den jungen unter WL+UV angezogenen Keimlingen der Gersten-Mutante lässt auf eine nicht unbedeutende Rolle im UV-Schutz schließen. Die lichtunabhängige Reparatur könnte vor allem in der Dunkelphase (Nacht) eine wichtige Rolle spielen. Daher wäre eine genaue Messung der Reparaturrate während der Dunkelphase interessant.

Besonders interessant ist die Frage nach den Folgen der trotz der Schutzmechanismen akkumulierenden DNA-Schäden für den Keimling. Hier sollte geklärt werden, wo die Schäden akkumulieren. Die Gewebelokalisation könnte über mechanische Gewebeseparation erfolgen (enzymatische Separation bietet sich nicht an, da in der Inkubationszeit in der Enzymlyse Reparatur erfolgen könnte). Mit Hilfe des Antikörper gegen Thymin-Dimere könnte die Gewebelokalisation immunohistochemisch erfolgen. Auf diese Weise ließe sich vielleicht auch die Verteilung der Schäden auf Zellkern, Plastiden und Mitochondrien erfassen. Letzterer Aspekt lässt sich eventuell auch über Isolierung von Zellkernen, Plastiden und Mitochondrien und dann anschließender DNA-Extraktion untersuchen. Eine elegantere Methode wäre die Verwendung von der T₄-UV-Endonuklease, die CPD erkennt und einen Einzelstrangbruch in die DNA einführt (zur Methode: z.B. QUATE ET AL., 1994). Zunächst wird die DNA aus bestrahltem Pflanzenmaterial isoliert. Dann erfolgt eine Inkubation mit und ohne T₄-UV-Endonuklease. Durch einen Northern-Blot mit geeigneten Sonden (je eine für je ein Gen aus Kern-, Plastiden, Mitochondrien-Genom) könnte überprüft werden welche Genome betroffen sind. Durch die geeignete Wahl von Sonden könnte man auch die Verteilung der Schäden auf

aktive und nicht-aktive Gene untersuchen. Auch ließe sich so mit Hilfe von Sonden feststellen welche aktiven Gene betroffen sind und könnte dann vielleicht eher die Folgen der DNA-Schädigung abschätzen.

Ob die Schädigung des Primärblattes tatsächlich negative Folgen für den Keimling und die adulte Pflanze hat, setzt die Untersuchung der Folgeorgane bis hin zu Fruchtreife hinsichtlich ihrer Schädigung voraus. Aus agrarökonomischer Sicht ist hier der Einfluss der UV-Belastung auf den Ertrag von Bedeutung. Der Vergleich von in dem Anzuchtschrank unter naturnahen Bedingungen herangezogenen Pflanzen mit Freiland-Pflanzen ermöglicht die Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse für die natürlichen Bedingungen im Freiland.

Auch die Ausdehnung der Untersuchung auf andere DNA-Schäden ist wichtig. Vor allem die Messung von 6-4-Photoprodukten und ihre Reparatur sind von Bedeutung, da sie den zweithäufigsten UV-induzierten DNA-Schaden darstellen. Auch die Untersuchung weiterer Photoprodukte, die in bedeutend geringerem Maße entstehen, sind von Interesse, denn eine spezifische Reparatur wurde bisher nur für CPD und 6-4PP in Pflanzen nachgewiesen. Das Fehlen einer effizienten Reparatur dieser "minderen" DNA-Schäden könnte unter einer ständigen UV-B-Belastung, wie sie unter natürlichen Bedingungen gegeben ist, zu schweren Folgen führen.

Als ein weiteres System zur Untersuchung des Zusammenspiels von Phenylpropanoid-Akkumulation und DNA-Reparatur bietet sich *Arabidopsis thaliana* L. an. Hier stehen eine Unzahl an Mutanten zur Verfügung. So gibt es Mutanten, die in der Akkumulation von Flavonoiden oder löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivaten oder in beider Substanzgruppen defizient sind (zur Übersicht: BHARTI UND KHURANA, 1997). Ebenfalls gibt es DNA-Reparatur-Mutanten bezüglich der Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren oder 6-4-Photoprodukten; auch existieren Mutanten, die defizient in der lichtunabhängigen Reparatur sind (BRITT ET AL., 1993; HARLOW ET AL., 1994; LANDRY ET AL., 1997).

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde bei Roggen und Gerste die Bedeutung der Phenylpropanoid-Akkumulation im Vergleich zur DNA-Reparatur für den Schutz der DNA vor schädigender UV-Strahlung in Primärblättern untersucht.

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte unter hoher PPFD ($700 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$) mit (WL+UV, $12 \text{ kJ} / \text{m}^2 \cdot \text{d}$ UV-B_{BE}) und ohne schädigende UV-Strahlung (WL). Die Akkumulation der unterschiedlichen Phenylpropanoide unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen wurde mittels HPLC-Analyse gemessen. Durch eine verbesserte Auftrennung der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate konnte deren Beitrag zur UV-B-Absorptionskapazität der Primärblätter genauer als bisher bestimmt werden. Als Parameter für die Schädigung der DNA wurde die Bildung von Thymin-Dimeren verwendet. Mit einem in dieser Arbeit optimierten ELISA-Test wurde die Thymin-Dimer-Konzentration in DNA-Proben aus den Primärblättern gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die UV-B-Absorptionskapazität aus einer konstitutiven und einer dynamischen Komponente zusammensetzt. Dynamisch sind beim Roggen die epidermalen Flavone, deren Akkumulation sich unter WL+UV gegenüber der WL-Anzucht steigerte. Sie stellten die Hauptabsorber von UV-B-Strahlung dar. Die Akkumulation der ebenfalls epidermal lokalisierten löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate war von UV-Bestrahlung während der Anzucht unbeeinflusst. Sie stellten die konstitutive Komponente dar, deren Bedeutung als UV-Absorber während der Primärblattentwicklung abnahm. Im Roggen spielten die Mesophyllflavone und die zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren eine untergeordnete Rolle für die UV-B-Absorptionskapazität.

Bei der Gerste ist das Saponarin der Hauptabsorber von UV-B-Strahlung und die dynamische Komponente. Fluoreszenzmikroskopisch konnte ihre fast ausschließliche Lokalisation in der Epidermis und der subepidermalen Zellschicht nachgewiesen werden. In der Gerste stellten diese beiden Zelllagen eine funktionale Einheit bezüglich der UV-B-Attenuation im Primärblatt dar. Auch in der Gerste stellten die Hydroxyzimtsäure-Derivate die konstitutive Komponente dar. Ihr Beitrag zur UV-B-Absorptionskapazität war geringer als bei Roggen-Primärblättern und nahm mit zunehmenden Primärblattalter ab. In der Gerste spielten das Lutonarin und die zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren eine untergeordnete Rolle. Für die flavonoiddefiziente Gersten-Mutante konnte nachgewiesen werden, dass weder die Akkumulation der löslichen Hydroxyzimtsäure-Derivate noch die des nur in der Mutante

vorkommenden Chalkon-Glucosides Isosalipurposid den durch die stark reduzierte Flavon-Akkumulation verursachten Verlust an UV-B-Absorptionskapazität kompensieren konnte.

Im jungen Primärblattstadium der Gerste zeigte der Vergleich der flavonoiddefizienten Mutante mit der Muttervarietät die hohe Bedeutung der Flavonoide: Die UV-B-Absorptionskapazität der Mutante war aufgrund der fehlenden Flavone 25-35 % reduziert gegenüber der Muttervarietät, die Thymin-Dimer-Akkumulation nach einer 6stündigen UV-B-Bestrahlung dagegen um den Faktor 4,5-9fach höher.

Die UV-B-Absorptionskapazität junger Primärblätter von Roggen und Gerste (Muttervarietät) war unter WL+UV verglichen mit WL um 20 % erhöht. Die Thymin-Dimer-Akkumulation während einer 6stündigen UV-B-Bestrahlung war bei beiden Anzuchten gleich.

Photoreaktivierung von Thymin-Dimeren wurde in Roggen, Gerste und der Gersten-Mutante nachgewiesen. Sie verlief schnell: innerhalb einer Stunde wurde der Großteil des entstandenen Schadens repariert. Lichtunabhängige Reparatur wurde im Roggen nur nach Anzucht unter WL+UV nachgewiesen. Dies galt ebenfalls für die Gersten-Mutante. Für die Muttervarietät waren die Ergebnisse nicht eindeutig.

Im jungen Primärblattstadium des Roggens konnte durch den Vergleich einer UV-B-Bestrahlung mit und ohne photoreaktivierungswirksamen Wellenlängen gezeigt werden, dass mindestens 60-70 % des entstandenen Schadens unmittelbar durch Photoreaktivierung repariert wurde. In der Gersten-Mutante und der Muttervarietät konnte kein Unterschied zwischen den beiden Bestrahlungen in der Thymin-Dimer-Akkumulation festgestellt werden.

Entstandene Thymin-Dimere konnten in Roggen und Gerste nicht vollständig repariert werden. Daher stieg während der Primärblattentwicklung unter WL+UV in beiden Gramineen die Thymin-Dimer-Konzentration um das 8fache an, in der Gersten-Mutante sogar um das 40-50fache.

6 LITERATUR

- Ahmad M, Jarillo JA, Klimeczak LJ, Landry LG, Peng T, Last RL, and Cashmore AR. 1997. An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. **Plant Cell** **9**: 199-207.
- Al-Oudat M, Baydoun SA, and Mohammed A. 1998. Effects of enhanced UV-B on growth and yield of two Syrian crops wheat (*Triticum durum* var. *Horani*) and broad beans (*Vicia faba*) under field conditions. **Environm.Exp.Bot.** **40**: 11-16.
- Allen DJ, Nogués S, and Baker NR. 1998. Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis. **J.Exp.Bot.** **49**: 1775-1788.
- Anhalt S and Weissenböck G. 1992. Subcellular localization of luteolin glucuronides and related enzymes in rye mesophyll. **Planta** **187**: 83-88.
- Bachelet D, Barnes PW, Brown D, and Brown M. 1991. Latitudinal and seasonal variation in calculated ultraviolet-B irradiance for rice-growing regions of asia. **Photochem.Photobiol.** **54**: 411-422.
- Ballaré CL, Scopel AL, Stapleton AE, and Yanovsky MJ. 1996. Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. **Plant Physiol.** **112**: 161-170.
- Batschauer A. 1998. Photoreceptors of higher plants. **Planta** **206**: 479-492.
- Baumbusch LO, Eiblmeier M, Schnitzler JP, Heller W, Sandermann H, Jr., and Polle A. 1998. Interactive effects of ozone and low UV-B radiation on antioxidants in spruce (*Picea abies*) and pine (*Pinus sylvestris*) needles. **Physiol.Plant.** **104**: 248-254.
- Bharti AK and Khurana JP. 1997. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochem.Photobiol.** **65**: 765-776.
- Bilger W, Veit M, Schreiber L, and Schreiber U. 1997. Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. **Physiol.Plant.** **101**: 754-763.
- Björn LO and Murphy TM. 1985. Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. **Physiol.Veg.** **23**: 555-561.
- Boldt R and Scandalios JG. 1997. Influence of UV-light on the expression of the *Cat2* and *Cat3* catalase genes in maize. **Free Radic.Biol.Med.** **23**: 505-514.
- Bornman JF and Teramura AH. 1993. Effects of UV-B-radiation on terrestrial plants. 427-462. *In: Environmental UV photobiology* (eds: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W). Plenum Press, New York.
- Bornman JF, Reuber S, Cen YP, and Weissenböck G. 1997. Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. 157-168. *In: Plants and UV-B: Responses to environmental change* (ed: Lumsden PJ). Cambridge University Press, Cambridge.
- Braun J. 1990. UV-Schutzfunktion von phenolischen Inhaltsstoffen und deren Regulation in Roggen- und Haferkeimlingen. **Karlsru.Beitr. Entw.Ökophysiol.** **9**: 1-237.
- Breen AP and Murphy JA. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radic.Biol.Med.** **18**: 1033-1077.
- Britt AB, Chen J-J, Wykoff D, and Mitchell D. 1993. A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidone(6-4)dimers. **Science** **261**: 1571-1574.

- Britt AB. 1996. DNA damage and repair in plants. **Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.** **47**: 75-100.
- Brückmann J. 1998. Untersuchungen zur Bedeutung der Phenylpropane als UV-B-Schutzsubstanzen im Gersten-Primärblatt (*Hordeum vulgare* L.) durch Vergleich der UV-B-Sensitivität einer flavoniddefizientern Gersten-Mutante mit der korrespondierenden Muttervarietät hinsichtlich Wachstum, Photosyntheseleistung und Transpiration. **Diplomarbeit**, Universität zu Köln.
- Buchholz G, Ehmann B, and Wellmann E. 1995. Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.). **Plant Physiol.** **108**: 227-234.
- Burchard P, Bilger W, and Weissenböck G. 2000. Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. **Plant Cell and Environment** **23**: in press-
- Busch E, Strack D, and Weissenböck G. 1986. Cyanidin 3-gentiobioside from primary leaves of rye (*Secale cereale* L.). **Z.Naturforsch.** **41c**: 485-486.
- Caasi-Lit M, Whitecross MI, Nayudu M, and Tanner GJ. 1997. UV-B irradiation induces differential leaf damage, ultrastructural changes and accumulation of specific phenolic compounds in rice cultivars. **Aust.J.Plant Physiol.** **24**: 261-274.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Morin B, Raoul S, Ravanat JL, and Spinelli S. 1997. Effects of UV and visible radiation on DNA - Final base damage. **Biol.Chem.** **378**: 1275-1286.
- Caldwell MM. 1971. Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. 131-177. *In: Photophysiology, Vol. 6* (ed: Giese AC). Academic Press, Inc., New York, London.
- Caldwell MM and Flint SD. 1994. Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. **Climatic Change** **28**: 375-394.
- Caldwell MM, Teramura AH, Tevini M, Bornman JF, Björn LO, and Kulandaivelu G. 1994. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. 49-64. *In: Environmental effects of ozone depletion* UNEP report.
- Caldwell MM, Björn LO, Bornman JF, Flint SD, Kulandaivelu G, Teramura AH, and Tevini M. 1998. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology** **46**: 40-52.
- Cannon GC, Hedrick LA, and Heinhorst S. 1995. Repair mechanisms of UV-induced DNA damage in soybean chloroplasts. **Plant Mol.Biol.** **29**: 1267-1277.
- Cen YP and Bornman JF. 1993. The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. **Physiol.Plant.** **87**: 249-255.
- Chappell J and Hahlbrock K. 1984. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitors. **Nature** **331**: 76-78.
- Chen J-J, Mitchell DL, and Britt AB. 1994. A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced Pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in Arabidopsis. **Plant Cell** **6** : 1311-1317.

- Chen JJ, Jiang CZ, and Britt AB. 1996. Little or no repair of cyclobutyl pyrimidine dimers is observed in the organellar genomes of the young *Arabidopsis* seedling. **Plant Physiol.** **111**: 19-25.
- Conklin PL, Williams EH, and Last RL. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** **93**: 9970-9974.
- Corlett JE, Stephen J, Jones HG, Woodfin R, Mepsted R, and Paul ND. 1997. Assessing the impact of UV-B radiation on the growth and yield of field crops. 195-212. *In: Plants and UV-B: Responses to environmental change* (ed: Lumsden PJ). Cambridge University Press, Cambridge.
- Correia CM, Areal ELV, Torres-Pereira MS, and Torres-Pereira JMG. 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 QJ, Yan B, Huang SB, Liu XZ, Peng SB, Miranda MLL, Chavez AQ, Vergara BS, and Olszyk DM. 1997. Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. **Physiol.Plant.** **101**: 301-308.
- Davies RJH. 1995. Ultraviolet radiation damage in DNA. **Biochem.Soc.Trans.** **23**: 407-418.
- Davies RJH. 1997. Purines as targets for DNA photodamage. **Biochem.Soc.Trans.** **25**: 323-326.
- Day TA, Vogelmann TC, and DeLucia EH. 1992. Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? **Oecologia** **92**: 513-519.
- Day TA. 1993. Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in diverse group of plants. **Oecologia** **95**: 542-550.
- Day TA, Howells BW, and Rice WJ. 1994. Ultraviolet absorption and epidermal-transmittance spectra in foliage. **Physiol.Plant.** **92**: 207-218.
- Dellamonica G, Meurer B, Strack D, Weissenböck G, and Chopin J. 1983. Two isovitexin-2"-O-glycosides from primary leaves of *Secale cereale*. **Phytochemistry** **22**: 2627-2628.
- Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, and Hanawalt PC. 1994. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** **91**: 8502-8506.
- Dostrovsky I. 1992. Chemische Speicherung von Sonnenenergie. **Spektrum Der Wissenschaft** **1992-2** : 30-36.
- Douki T, Voituriez L, and Cadet J. 1995. Measurement of pyrimidine (6-4) photoproducts in DNA by a mild acidic hydrolysis-HPLC fluorescence detection assay. **Chem.Res.Toxicol.** **8**: 244-253.
- Fiscus EL and Booker FL. 1995. Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity. **Photosynth.Res.** **43**: 81-92.
- Forkmann G and Heller W. 1999. Biosynthesis of flavonoids. 713-748. *In: Comprehensive natural products chemistry, Volume 1: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives* (eds: Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohn O, Sankawa U). Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- Foukal PV. 1990. Die veränderliche Sonne. **Spektrum der Wissenschaft** **1990-4**: 66-75.

- Fröhlich M, Hodick D, and Kutschera U. 1994. Thickness and structure of the cell walls in developing rye coleoptiles. **J.Plant Physiol.** **144**: 714-719.
- Fröst S, Harborne JB, and King L. 1977. Identification of the flavonoids in five chemical races of cultivated barley. **Hereditas** **85**: 163-168.
- González R, Wellburn AR, and Paul ND. 1998. Dose responses of two pea lines to ultraviolet-B radiation (280- 315 nm). **Physiol.Plant.** **104**: 373-378.
- Graedel TE and Crutzen PJ. 1989. Veränderungen der Atmosphäre. **Spektrum der Wissenschaft 1989-11**: 58-68.
- Green R and Fluhr R. 1995. UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. **Plant Cell** **6**: 227-235.
- Hada M, Tsurumi S, Suzuki M, Wellmann E, and Hashimoto T. 1996. Involvement and non-involvement of pyrimidine dimer formation in UV-B effects on *Sorghum bicolor* Moench seedlings. **J.Plant Physiol.** **148**: 92-99.
- Hada M, Hashimoto T, Nikaido O, and Shin M. 1998. UVB-induced DNA damage and its photorepair in nuclei and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. **Photochem.Photobiol.** **68**: 319-322.
- Harlow GR, Jenkins ME, Pittalwala TS, and Mount DW. 1994. Isolation of *uvh1*, an Arabidopsis mutant hypersensitive to ultraviolet light and ionizing radiation. **Plant Cell** **6**: 227-235.
- Harris PJ and Hartley R. 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Graminae by ultraviolet fluorescence microscopy. **Nature** **259**: 508-510.
- Haussühl K, Rohde W, and 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.
- Hidema J, Kumagai T, Sutherland JC, and Sutherland BM. 1997. Ultraviolet B-sensitive rice cultivar deficient in cyclobutyl pyrimidine dimer repair. **Plant Physiol.** **113**: 39-44.
- Hidema J and Kumagai T. 1998. UVB-induced cyclobutyl pyrimidine dimer and photorepair with progress of growth and leaf age in rice. **J.Photochem.Photobiol.B-Biol.** **43**: 121-127.
- Hidema J, Kang HS, and Kumagai T. 1999. Changes in cyclobutyl pyrimidine dimer levels in rice (*Oryza sativa* L.) growing indoors and outdoors with or without supplemental UV-B radiation. **J.Photochem.Photobiol.B-Biol.** **52**: 7-13.
- Holleman AF and Wiberg E. 1995. **Lehrbuch der Anorganischen Chemie**, 101. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Horsfall MJ, Borden A, and Lawrence CW. 1997. Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer. **J.Bacteriol.** **179**: 2835-2839.
- Hu JP, Calomme M, Lasure A, de Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, and vanden Berghe DA. 1995. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxid scavenging activity. **Biological Trace Element Research** **47**: 327-331.
- Huang S, Dai Q, Peng S, Chavez AQ, Miranda MLL, Visperas RM, and Vergara BS. 1997. Influence of supplemental ultraviolet-B on indoleacetic acid and calmodulin in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regulation** **21**: 59-64.

- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, and Schnitzler JP. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **J.Exp.Bot.** **49**: 953-965.
- Ibrahim R and Barron D. 1989. Phenylpropanoids. 75-111. *In: Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant phenolics* (eds: Dey PM, Harborne JB). Academic Press, New York.
- Iiyama K, Lam TB, and Stone BA. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant Physiol.** **104**: 315-320.
- Ikenaga M, Kondo N, and Fujii T. 1974. Action spectrum for enzymatic photoreactivation in maize. **Photochem.Photobiol.** **19**: 109-113.
- Jansen MAK, Gaba V, and Greenberg BM. 1998. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. **Trends Plant Sci.** **3**: 131-135.
- Jäger H. 1993. Untersuchungen zum Einfluß von UV und sichtbarem Licht auf den Flavonoidstoffwechsel im Primärblatt von Roggen (*Secale cereale* L.). **Diplomarbeit**, Universität zu Köln.
- Jähne A, Fritzen C, and Weissenböck G. 1993. Chalcone synthase and flavonoid products in primary-leaf tissues of rye and maize. **Planta** **189**: 39-46.
- Jende-Strid B. 1993. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. **Hereditas** **119**: 187-204.
- Jenkins GI, Fuglevand G, and Christie JM. 1997. UV-B perception and signal transduction. 135-156. *In: Plants and UV-B: Responses to environmental change* (ed: Lumsden PJ). Cambridge University Press, Cambridge.
- Johnson CB, Kirby J, Naxakis G, and Pearson S. 1999. Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Phytochemistry** **51**: 507-510.
- Jordan BR, James PE, Strid A, and Anthony RG. 1994. The effect of ultraviolet-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissues: UV-B-induced changes are gene-specific and dependent upon the developmental stage. **Plant Cell Environ.** **17**: 45-54.
- Jordan BR. 1996. The effects of ultraviolet-B radiation on plants: A molecular perspective. **Adv.Bot.Res.**, Vol **22**: 97-162.
- Kahnt G. 1967. Trans-cis equilibrium of hydroxycinnamic acids during irradiation of aqueous solutions at different pH. **Phytochemistry** **6**: 755-758.
- Kang HS, Hidema J, and Kumagai T. 1998. Effects of light environment during culture on UV-induced cyclobutyl pyrimidine dimers and their photorepair in rice (*Oryza sativa* L.). **Photochem.Photobiol.** **68**: 71-77.
- Klein M. 1998. Charakterisierung der Aufnahme species-spezifischer flavonoider und abiotischer Konjugate in die pflanzliche Vakuole. **Dissertation**, Universität zu Köln.
- Knogge W and Weissenböck G. 1986. Tissue-distribution of secondary phenolic biosynthesis in developing primary leaves of *Avena sativa* L. **Planta** **167**: 196-205.
- Kolbe W. 1987. Untersuchungen über den Entwicklungsverlauf der Getreidearten. *In: Pflanzenbau - Pflanzenschutz Heft 20* Rheinischer Landwirtschafts-Verlag GmbH, Bonn.

- Kubasek WL, Shirley BW, McKillop A, Goodman HM, Briggs W, and Ausubel FM. 1992. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. **Plant Cell** 4 : 1229-1236.
- Landry LG, Chapple CCS, and Last RL. 1995. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. **Plant Physiol.** 109: 1159-1166.
- Landry LG, Stapleton AE, Lim J, Hoffman P, Hays JB, Walbot V, and Last RL. 1997. An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet- B radiation. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 94: 328-332.
- Lehmann AR. 1995. Nucleotide excision repair and the link with transcription. **TIBS** 20: 402-405.
- Li J, Ou-Lee T-M, Raba R, Amundson RG, and Last RL. 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. **Plant Cell** 5: 171-179.
- Liu L, Gitz DC, III, and McClure JW. 1995. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. **Physiol.Plant.** 93: 725-733.
- Liu ZR, Hossain GH, Islas-Osuna MA, Mitchell DL, and Moustacchi E. 2000. Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis* UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. **Plant Journal** 21: 519-528.
- Mackerness SAH, Jordan BR, and Thomas B. 1997. UV-B effects on the expression of genes encoding proteins involved in photosynthesis. 113-134. *In: Plants and UV-B: Responses to environmental change* (ed: Lumsden PJ). Cambridge University Press, Cambridge.
- Mackerness SAH, Surplus SL, Jordan BR, and Thomas B. 1998. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. **Photochem.Photobiol.** 68: 88-96.
- Mackerness SAH, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, and Thomas B. 1999. Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. **Plant Cell and Environment** 22: 1413-1423.
- Madronich S. 1993. The atmosphere and UV-B-radiation at ground level. 1-39. *In: Environmental UV photobiology* (eds: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W). Plenum Press, New York.
- Madronich S, McKenzie RL, Björn LO, and Caldwell MM. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. **J.Photochem.Photobiol.B-Biol.** 46: 5-19.
- Majer A. 1996. Die Isovitexin-Galactosyltransferase im Primärblatt von Roggen (*Secale cereale* L.) - Strahlungsregulation und Gewebelokalisation eines Endenzym des Flavonoidstoffwechsels. **Diplomarbeit**, Universität zu Köln.
- Markham KR, Ryan KG, Bloor SJ, and Mitchell KA. 1998a. An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. **Phytochemistry** 48: 791-794.
- Markham KR, Tanner GJ, Caasi-Lit M, Whitecross MI, Nayudu M, and Mitchell KA. 1998b. Possible protective role for 3',4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. **Phytochemistry** 49: 1913-1919.

- Mazza CA, Battista D, Zima IM, Szwarcberg-Bracchitta M, Giordano CV, Acevedo A, Scapel AL, and Ballaré CL. 1999. The effects of solar UV-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. **Plant Cell and Environment** **22**: 61-70.
- Mazza CA, Baccalandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, and Ballaré CL. 2000. Functional significance and induction by solar radiation of UV absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiol.** **122**: 117-125.
- McLennan AG and Eastwood AC. 1986. An endonuclease activity from suspension cultures of *Daucus carota* which acts upon pyrimidine dimers. **Plant Science** **46**: 151-157.
- Mitchell DL, Vaughan JE, and Nairn RS. 1989. Inhibition of transient gene expression in Chinese hamster ovary cells by cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts in transfected ultraviolet-irradiated plasmid DNA. **Plasmid** **21**: 21-30.
- Mitchell DL, Jen J, and Cleaver JE. 1992. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. **Nucleic Acids Res.** **20**: 225-229.
- Mizuno T, Matsunaga T, Ihara M, and Nikaido O. 1991. Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane- type thymine dimers in DNA: a comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4)photoproducts. **Mutat.Res.DNA Rep.** **254**: 175-184.
- Mol JNM, Robbins MP, Dixon RA, and Veltkamp E. 1985. Spontaneous and enzymatic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. **Phytochemistry** **24**: 2267-2269.
- Mori T, Matsunaga T, Hirose T, and Nikaido O. 1988. Establishment of a monoclonal antibody recognizing ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. **Mutat.Res.DNA Rep.** **194**: 263-270.
- Murphy TM, Martin CP, and Kami J. 1993. Endonuclease activity from tobacco nuclei specific for ultraviolet radiation-damaged DNA. **Physiol.Plant.** **87**: 417-425.
- Neu R. 1957. Chelate von Diarylborsäuren mit Aliphatischen Oxyalkylaminen als Nachweisreagenz für den Nachweis von Oxyphenyl-benz-o-pyrenen. **Naturwiss.Rundsch.** **44**: 181
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G, and Bornman JF. 1998. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. **Phytochemistry** **49**: 1021-1028.
- Ormrod DP, Landry LG, and Conklin PL. 1995. Short-term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation and shoot growth of flavonoid- deficient *Arabidopsis* mutants. **Physiol.Plant.** **93**: 602-610.
- Pang Q and Hays JB. 1991. UV-B-inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** **95**: 536-543.
- Peters A. 1986. Differenzierung und Dynamik des Flavonoidstoffwechsels während der Primärblattentwicklung von *Secale cereale* L. und *Hordeum vulgare* L. **Dissertation**, Universität zu Köln.
- Pilon JJ, Lambers H, Baas W, Tosserams M, Rozema J, and Atkin OK. 1999. Leaf waxes of slow-growing alpine and fast-growing lowland Poa species: inherent differences and responses to UV-B radiation. **Phytochemistry** **50**: 571-580.

- Protic-Sabljić M and Kramer KH. 1986. One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** **82**: 6622-6626.
- Quaite FE, Sutherland JC, Sutherland BM, Takayanagi S, and Ruffini J. 1994. DNA damage levels determine cyclobutyl pyrimidine dimer repair mechanisms in Alfalfa seedlings. **Plant Cell** **6**: 1635-1641.
- Rao MV, Paliyath C, and Ormrod DP. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** **110**: 125-136.
- Reinold S and Hahlbrock K. 1997. In situ localisation of phenylpropanoid biosynthetic mRNAs and proteins in parsley (*Petroselinum crispum*). **Botanica Acta** **110**: 431-443.
- 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, Leitsch J, Krause GH, and Weissenböck G. 1993. Metabolic reduction of phenylpropanoid compounds in primary leaves of rye (*Secale cereale* L.) leads to increased UV-B sensitivity of Photosynthesis. **Z.Naturforsch.** **48c**: 749-756.
- 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 JF, and Weissenböck G. 1996a. Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. **Physiol.Plant.** **97**: 160-168.
- Reuber S, Bornman JF, and Weissenböck G. 1996b. A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. **Plant Cell Environ.** **19**: 593-601.
- Reuber S, Jende-Strid B, Wray V, and Weissenböck G. 1997. Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase. **Physiol.Plant.** **101**: 827-832.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, and Pridham JB. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived poly-phenolic flavonoids. **Free Radic.Res.** **22(4)**: 375-383.
- Rogers SO and Bendich AJ. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. 1-8. *In: Plant molecular biology manual, 3rd edition, D1* (eds: Gelrin SB, Schilperoort RA). Kluwer Academic Press, Dordrecht (Niederlande).
- Ros J and Tevini M. 1995. Interaction of UV-radiation and IAA during growth of seedlings and hypocotyl segments of sunflower. **J.Plant Physiol.** **146**: 295-302.
- Rousseaux MC, Ballare CL, Scopel AL, Searles PS, and Caldwell MM. 1998. Solar ultraviolet-B radiation affects plant-insect interactions in a natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). **Oecologia** **116**: 528-535.
- Rousseaux MC, Ballare CL, Giordano CV, Scopel AL, Zima AM, Szwarcberg-Bracchitta M, Searles PS, Caldwell MM, and Diaz SB. 1999. Ozone depletion and UVB radiation: Impact on plant DNA damage in southern South America. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** **96**: 15310-15315.

- Rozema J, Van de Staaij J, Björn LO, and Caldwell M. 1997a. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. **Tree** **12**: 22-28.
- Rozema J, Van de Staaij J, and Tosserams M. 1997b. Effects of solar UV-B radiation on plants from agro- and natural ecosystems. 213-232. *In: Plants and UV-B: Responses to environmental change* (ed: Lumsden PJ). Cambridge University Press, Cambridge.
- Ryan KG, Markham KR, Bloor SJ, Bradley JM, Mitchell KA, and Jordan BR. 1998. UVB radiation induced increase in quercetin: Kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. **Photochem.Photobiol.** **68**: 323-330.
- Saile-Mark M and Tevini M. 1997. Effects of solar UVB radiation on growth, flowering and yield of central and southern European bush bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Ecology** **128**: 114-125.
- Sancar A. 1994. Structure and function of DNA Photolyase. **Biochemistry** **33**: 2-9.
- Schieferstein U and Thoma F. 1998. Site-specific repair of cyclobutane pyrimidine dimers in a positioned nucleosome by photolyase and T4 endonuclease V *in vitro*. **EMBO J.** **17**: 306-316.
- Schmelzer E, Jahnen W, and Hahlbrock K. 1988. In situ localisation of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. **Proc.Natl.Acad.Sci.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.
- Schnabl H, Weissenböck G, and Scharf H. 1986. In vivo-microspectrophotometric characterization of flavonol glycosides in *Vicia faba* guard and epidermal cells. **J.Exp.Bot.** **37**: 61-72.
- Schnabl H, Weissenböck G, Sachs G, and Scharf H. 1989. Cellular distribution of UV-absorbing compounds in guard and subsidiary cells of *Zea mays* L. **J.Plant Physiol.** **135**: 249-252.
- Schnitzler J-P, Jungblut TP, Heller W, Köfferlein M, Hutzler P, Heinzmann U, Schmelzer E, Ernst D, Langebartels C, and Sandermann Jr. H. 1995. Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of scots pine seedlings. **New Phytol.** **132**: 247-258.
- Schroeder HA. 1967. Stabilization of caffeoyl compounds in alkaline media. **Phytochemistry** **6**: 1589-1592.
- Schulz M, Strack D, Weissenböck G, Markham KR, Dellamonica G, and Chopin J. 1985. Two luteolin O-glucuronides from primary leaves of *Secale cereale*. **Phytochemistry** **24**: 343-345.
- Schulz M and Weissenböck G. 1986. Isolation and separation of epidermal and mesophyll protoplasts from rye primary leaves - tissue-specific characteristics of secondary phenolic product accumulation. **Z.Naturforsch.** **41c**: 22-27.
- Schulze R. 1977. UV-Strahlenklima. *In: Ultraviolette Strahlen* (ed: Kiefer J). Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Setlow RB. 1974. The wavelength in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** **71**: 3363-3366.

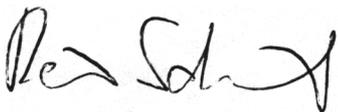
- Sheahan JJ. 1996. Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Am.J.Bot.** **83**: 679-686.
- Stapleton AE and Walbot V. 1994. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. **Plant Physiol.** **105**: 881-889.
- Stapleton AE, Thornber CS, and Walbot V. 1997. UV-B component of sunlight causes measurable damage in field-grown maize (*Zea mays* L): Developmental and cellular heterogeneity of damage and repair. **Plant Cell Environ.** **20**: 279-290.
- Stephen J, Woodfin R, Corlett JE, Paul ND, Jones HG, and Ayres PG. 1999. Response of barley and pea crops to supplementary UV-B radiation. **J.Agric.Sci.** **132**: 253-261.
- Strack D, Meurer B, and Weissenböck G. 1982. Tissue-specific kinetics of flavonoid accumulation in primary leaves of rye (*Secale cereale* L.). **Z.Pflanzenphysiol.** **108**: 131-141.
- Strack D, Keller H, and Weissenböck G. 1987. Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of sugar acids and hydroaromatic acids by protein preparations from rye (*Secale cereale*) primary leaves. **J.Plant Physiol.** **131**: 61-73.
- Straßburger EB. 1991. **Lehrbuch der Botanik**, 33. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Strickland JA, Marzilli LG, Puckett JM, and Doetsch PW. 1991. Purification and properties of Nuclease SP. **Biochemistry** **30**: 9749-9756.
- Strid A, Chow WS, and Anderson JM. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. **Photosynth.Res.** **39**: 475-489.
- Suter B, Livingstone-Zatchej M, and Thoma F. 1997. Chromatin structure modulates DNA repair by photolyase *in vivo*. **EMBO J.** **16**: 2150-2160.
- Sutherland BM, Takayanagi S, Sullivan JH, and Sutherland JC. 1996. Plant responses to changing environmental stress: Cyclobutyl pyrimidine dimer repair in soybean leaves. **Photochem.Photobiol.** **64**: 464-468.
- Takayanagi S, Trunk JG, Sutherland JC, and Sutherland BM. 1994. alfalfa seedlings grown outdoors are more resistant to UV-induced DNA damage than plants grown in a UV-free environmental chamber. **Photochem.Photobiol.** **60(4)**: 363-367.
- Takeuchi Y, Murakami M, Nakajima N, Kondo N, and Nikaido O. 1996. Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. **Plant Cell Physiol.** **37**: 181-187.
- Takeuchi Y, Murakami M, Nakajima N, Kondo N, and Nikaido O. 1998. The photorepair and photoisomerization of DNA lesions in etiolated cucumber cotyledons after irradiation by UV-B depends on wavelength. **Plant Cell Physiol.** **39**: 745-750.
- Taylor RM, Nikaido O, Jordan BR, Rosamond J, Bray CM, and Tobin AK. 1996. Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum aestivum* L) leaves. **Plant Cell Environ.** **19**: 171-181.
- Taylor RM, Tobin AK, and Bray CM. 1997. DNA damage and repair in plants. 53-76. *In: Plants and UV-B: Responses to environmental change* (ed: Lumsden PJ). Cambridge University Press, Cambridge.
- Teramura AH, Sullivan JH, and Lydon L. 1990. Effects of UVB radiation on soybean yield and seed quality: a six-year field study. **Physiol.Plant.** **80**: 5-11.

- Teramura AH and Sullivan JH. 1994. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. **Photosynth.Res.** **39**: 463-473.
- Teramura AH. 1996. How plants respond to a changing UV-B radiation environment. 164-170. *In: Regulation of plant growth and development by light* (eds: Briggs WR, Heath RL, Tobin EM). American Society of Plant Physiology.
- Tevini M and Häder DP. 1985. **Allgemeine Photobiologie**. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Tevini M, Braun J, Fieser G, Mark U, Ros J, and Saile M. 1990. Effekte solarer und künstlicher UV-B-Strahlung auf Wachstum, Funktion und Zusammensetzung von Nutzpflanzen. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Forschungsbericht 5/90.
- Thimijan RW, Carns HR, and Campbell LE. 1978. Radiation sources and related environmental control for biological and climatic effects UV research. *In: BACER Program, Final report* Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Todo T, Kim ST, Hitomi K, Otsushi E, Inui T, Morioka H, Kobayashi H, Ohtsuka E, Toh H, and Ikenaga M. 1997. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase. **Nucleic Acids Res.** **25**: 764-768.
- Tournaire C, Croux S, Maurette M-T, Beck I, Hocquaux M, Braun AM, and Oliveros E. 1993. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. **J.Photochem.Photobiol. B-Biol.** **19**: 205-215.
- Trebst A. 1999. Linearer und zyklischer Elektronentransport. *In: Photosynthese* (ed: Häder DP). Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Veleminsky J, Svachulova J, and Satava J. 1980. Endonucleases for UV-irradiated and depurinated DNA in barley chloroplasts. **Nucleic Acids Res.** **8**: 1373-1381.
- Vogt T, Pollak P, Tarlyn N, and Taylor LP. 1994. Pollination- or wound-induced kaempferol accumulation in *petunia* stigmas enhances seed production. **Plant Cell** **6**: 11-23.
- von Willert DJ, Matyssek R, and Herpich W. 1995. **Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen**. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Walbot V. 1999. UV-B damage amplified by transposons in maize. **Nature** **397**: 398-399.
- Wallace G and Fry SC. 1994. Phenolic components of the plant cell wall. **Int.Rev.Cyt.** **151**: 229-267.
- Weast RC. 1974. **Handbook of Chemistry and Physics** 55th Edition. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- Weissenböck G, Hedrich R, and Sachs G. 1986. Secondary phenolic products in isolated guard cell, epidermal cell and mesophyll cell protoplasts from pea (*Pisum sativum* L.) leaves: distribution and determination. **Protoplasma** **134**: 141-148.
- Weissenböck G, Schnabl H, Scharf H, and Sachs G. 1987. On the properties of fluorescing compounds in guard and epidermal cells of *Allium cepa* L. **Planta** **171**: 88-95.
- Wellmann E. 1993. UV-B-Wirkungsspektren bei Pflanzen. *In: Arbeitsgespräch Terrestrisches solares UV-Monitoring am 02.06.1992 im Institut für Strahlenhygiene des Bundesamtes für Strahlenschutz* Bundesamt für Strahlenschutz ISH-Bericht, Neuherberg.
- Winston GW. 1990. Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defence. 57-86. *In: Stress Responses in Plants: Adaption and Acclimation Mechanisms* (eds: Alscher RG, Cumming JR). Wiley-Liss, New York.

-
- Wladimiroff WW. 1966. Some new stable ultraviolet transmitting solution filters. **Photochem.Photobiol.** **5**: 243-250.
- Wu SC and Hahlbrock K. 1992. In situ localisation of phenylpropanoid-related gene expression in different tissues of light-grown and dark-grown parsley seedlings. **Z.Naturforsch.** **47c**: 207-219.
- Yajima H, Takao M, Yasuhira S, Zhao JH, Inoue H, and Yasui A. 1995. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. **EMBO J.** **14**: 2393-2399.
- Yasui A, Eker APM, Yasuhira S, Yajima H, Kobayashi T, Takao M, and Oikawa A. 1994. A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. **EMBO J.** **13**: 6143-6151.
- Yasui A and McCready SJ. 1998. Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. **BioEssays** **20**: 291-297.
- Zhao XD, Liu JQ, Hsu DS, Zhao SY, Taylor JS, and Sancar A. 1997. Reaction mechanism of (6-4) photolyase. **J.Biol.Chem.** **272**: 32580-32590.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. G. Weissenböck betreut worden.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Peter Schütz', written in a cursive style.

Köln, den 23.10.2000

Ein Teil der Arbeit wurde veröffentlicht:

Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, and Schnitzler JP. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany** 49: 953-965.

Lebenslauf

Anschrift

Name: Schmitz
Vorname: Rainer
Adresse: Curtiusstr. 5
50935 Köln
Telefon: (0221) 4680642
email: rainer_schmitz@gmx.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 13.07.1966
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08 / 1972 - 04 / 1974 Städt. Kath. Grundschule Vogelsangerstraße, Köln
04 / 1974 - 07 / 1976 Städt. Kath. Grundschule Freiliggrathstraße, Köln
08 / 1976 - 07 / 1985 Gymnasium Kreuzgasse, Köln

Studium

10 / 1985 - 09 / 1995 Biologie , Math.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln, Abschluß Diplom Juni 1995
10 / 1990 - 04 / 1992 Urlaubsemester wegen Zivildienst
10 / 1996 - 06 / 2000 Experimentelle Arbeiten an der Disseration

Zivildienst

12 / 1990 - 02 / 1992 Arbeiterwohlfahrt, Köln, individuelle Schwerstbehinderten-Betreuung und mobiler sozialer Hilfsdienst

Praktische Tätigkeiten

01 / 1994 - 03 / 1994 stud. Hilfskraft am Botanischen Institut der Universität zu Köln
04 / 1994 - 12 / 1994 stud. Hilfskraft im SFB 243 der Universität zu Köln
04 / 1996 - 03 / 2000 wiss. Hilfskraft am Botanischen Institut der Universität zu Köln