Die Funktion von UV-Schutzpigmenten bei Kühle in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Matthias Schultze

Kiel
2011
Referent: Prof. Dr. Wolfgang Bilger
Korreferent: Prof. Dr. Karin Krupinska

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2011
Zum Druck genehmigt: 08.03.2011

gez. (Prof. Dr. Lutz Kipp), Dekan
## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
   1.1. UV-Strahlung .............................................. 1
   1.2. Biologische Wirksamkeit von UV-B-Strahlung ................. 3
       1.2.1. Schädigung durch UV-B ............................ 4
       1.2.2. Anpassungsstrategien an UV-Stress ................. 7
   1.3. Polyphenole in Pflanzen .................................... 9
   1.4. Chlorophyllfluoreszenz in Pflanzen .......................... 14
       1.4.1. Bestimmung des PS II-Status ....................... 15
       1.4.2. Bestimmung der epidermalen UV-Abschirmung ....... 17
   1.5. Arabidopsis thaliana ....................................... 18
   1.6. Fragestellung ............................................. 20

2. Material und Methoden ........................................... 23
   2.1. Pflanzenmaterial ....................................... 23
   2.2. Allgemeine Pflanzenkultivierung .......................... 24
   2.3. Bestimmung und Gewichtung der UV-B-Strahlung .......... 24
   2.4. Bestimmung der PS II-Schädigung durch UV ............ 26
   2.5. Chlorophyllbestimmung .................................. 27
   2.6. Isolierung intakter Chloroplasten ......................... 27
   2.7. Bestimmung der epidermalen UV-Transmission ............. 28
       2.7.1. Xenon-PAM-Methode ................................ 29
       2.7.2. Chlorophyll-Anregungs- und UV-Transmissionsspektren .... 32
   2.8. Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffe .................. 34
       2.8.1. Extraktion ........................................ 34
       2.8.2. Qualitative Analyse von Polyphenolen ............ 34
       2.8.3. Quantitative Analyse von Polyphenolen .......... 35
       2.8.4. Rekonstruktion von Extinktionsspektren ....... 37
   2.9. Beschreibung der Experimente ................................ 38
       2.9.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle .... 38
       2.9.2. UV-B-Akklimatisation von A. thaliana ............ 40
       2.9.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole ........ 40
Inhaltsverzeichnis

2.10. Statistische Auswertung .................................. 41

3. Ergebnisse .................................................. 43

3.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle .............. 43

3.2. UV-B-Akklimatisation von A. thaliana ........................ 47
    3.2.1. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von Columbia ... 47
    3.2.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von verschiedenen Akzessionen von A. thaliana ......................... 49

3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole ...................... 54
    3.3.1. Schädigung durch UV-B .................................. 55
    3.3.2. Von der Temperatur abhängige Anpassung des UV-Bef .................. 55
    3.3.3. Spektrale Auflösung der epidermalen UV-Transmission ............ 59
    3.3.4. Polyphenole in A. thaliana .............................. 65

4. Diskussion .................................................. 79

4.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle .............. 79
    4.1.1. Niedrige Temperatur verstärkt UV-B-induzierte Schäden am PS II 79
    4.1.2. Schädigung und Reparatur bestimmen Maß der Photoinhibition .... 81
    4.1.3. Kultivierung bei Kühle bewirkt hohe UV-B-Resistenz ............. 83
    4.1.4. UV-Bef - Die effektive UV-B-Strahlung .................... 85

4.2. UV-B-Akklimatisation von A. thaliana ....................... 87
    4.2.1. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von Columbia ... 87
    4.2.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von verschiedenen Akzessionen von A. thaliana ......................... 88

4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole ...................... 92
    4.3.1. Polyphenole in A. thaliana .............................. 93
    4.3.2. Der spezifische Beitrag von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen zur Abschirmung .......................... 102
    4.3.3. Die Funktion der Flavonole in A. thaliana .................. 108

5. Zusammenfassung ........................................... 113

6. Summary .................................................. 115

7. Literaturverzeichnis ......................................... 123

A. Anhang .................................................. 143
1. Einleitung

1.1. UV-Strahlung


Auf der Erde existieren zwei verschiedene räumliche Gradienten für UV-B-Strahlung. Zum einen steigt die UV-B-Belastung mit zunehmender Altitude aufgrund der abnehmenden Ozonsäule in der Atmosphäre an. Dass dieser Anstieg beträchtlich sein kann, zeigten BLUMTHALER et al. (1992, 1997) für die Schweizer Alpen. Durch simultan erfolgende Messreihen in 577 m und 3576 m konnten je nach Jahreszeit pro 1000 m eine Zunahme der UV-B-Belastung zwischen 18 % und 23 % nachgewiesen werden. Zum anderen ist die
Abbildung 1.1.: Unterschied zwischen terrestrischer (UV\textsubscript{t}) und extraterrestrischer (UV\textsubscript{et}) spektraler UV-Bestrahlungsstärke am 2. Juli 1980 um 12:00 Uhr mittags. Die Abbildung zeigt UV-Strahlungsspektren mit Strahlungsintensitäten, wie sie für geografische Breitengrade zwischen N 30° und N 50° typischerweise im Sommer auftreten (Daten aus Newman et al. (2009)).

UV-B-Strahlungsstärke an jedem Standort auf der Erde abhängig von dessen jeweiliger geografischen Breite (Caldwell et al. 1980, Madronich et al. 1995). Da am Äquator die Strahlung senkrecht und deshalb auf kürzestem Weg durch die Ozonschicht dringen kann, ist die UV-B absorbierende Wirkung der Ozonschicht hier relativ gering. Die Intensität der UV-B-Strahlung bleibt deshalb auch nach Durchtritt durch die Ozonschicht sehr hoch. Mit zunehmender geografischen Breite trifft die Sonnenstrahlung aufgrund der Erдkrümmung in immer spitzer werdendem Winkel auf die Ozonschicht und diese wird nicht mehr senkrecht sondern zunehmend schräg von der Strahlung durchdrungen. Der Weg, den die Strahlung hierbei durch die Ozonschicht zurück legt, wird länger, die effektive Schichtdicke des Ozons also dicker. Besitzt eine Substanz die Fähigkeit, eine Strahlung bestimmter Wellenlänge zu absorbieren, so besagt das Lamberts-Beersche Gesetz, dass die Absorptionsfähigkeit dieser Substanz mit seiner Konzentration und seiner Schichtdicke zunimmt. In Richtung der Polkappen nimmt die UV-B-Absorption der Ozonschicht deshalb zu und die, die Erde erreichende UV-B-Strahlungsintensität ab.


1.2. Biologische Wirksamkeit von UV-B-Strahlung


1.2.1. Schädigung durch UV-B


Reaktive-Sauerstoff-Spezies (ROS) werden bei UV-B-Stress ebenfalls vermehrt in pflanzlichen Zellen gebildet (KRAMER et al. 1991). In erster Linie handelt es sich hierbei um Hydroxylradikale (*OH), welche sowohl indirekt, als Folge von UV-B-Schäden innerhalb
1.2. Biologische Wirksamkeit von UV-B-Strahlung


1. Einleitung


1.2. Biologische Wirksamkeit von UV-B-Strahlung


1.2.2. Anpassungsstrategien an UV-Stress

Pflanzen haben hauptsächlich zwei verschiedene Anpassungsstrategien an UV-Stress entwickelt, die gemeinsam den jeweiligen Resistenzgrad einer Pflanze gegen UV bestimmen. Zum einen haben sich Reparaturmechanismen etabliert, die die Toleranz von Pflanzen gegenüber UV erhöhen. Hierzu gehören beispielsweise die lichtabhängige Photolyase-assoziierte- bzw. die lichtunabhängige Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) von UV-B-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) in der DNA (VONARX et al. 1998, BJORN et al. 2002). Ferner sind die zügige Reparatur der durch UV-B geschädigten
1. Einleitung

D1/D2-Proteine in PS II-Zentren (JANSEN et al. 1998) und die bei UV-Stress verstärkte Expression antioxidativ wirksamer Enzyme zu nennen (RAO et al. 1996).


### 1.3. Polyphenole in Pflanzen

Pflanzen enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher Polyphenole mit jeweils verschiedenen Funktionen. Sie sind wichtige Bestandteile in Zellwänden (Lignine), dienen in Blüten als Lockfarbstoffe (Anthocyane) und bilden in polymerer Verbindung mit langkettigen Kohlenstoffketten wasser- und gasundurchlässige Isolierschichten auf Blättern (Cutin), in Sprossen und in Wurzeln (Suberin). Das Phenolmolekül (Abbildung 1.3 A), ein Benzolring mit einer Hydroxy-Gruppe, ist unter diesen Komponenten die einfachste und deshalb namensgebende chemische Struktur. Polyphenole sind keine Ketten einzelner Phenolmoleküle, sondern Substanzen, die mehr als eine Hydroxy-Gruppe an einem oder mehreren Benzolringen tragen. Die aufgrund der delokalisierten $\pi$-Elektronensysteme mesomeren Zustände von Benzolringen führen zu energetisch sehr stabilen und wenig reaktiven Moleküllringstrukturen, welche mit anderen Molekülen normalerweise über ihre Substituenten in Wechselwirkung treten.

![Strukturformeln Polyphenole](image)

**A)** Strukturformel des Phenols. Beginnend mit dem die Hydroxylgruppe tragenden Kohlenstoffatom werden diese Atome am Benzolring im Uhrzeigersinn durc durchnumeriert ($C_1$ bis $C_6$).


In Gegenwart von Anionen kann die Hydroxy-Gruppe eines Phenolmoleküls deprotoniert werden. Durch die Deprotonierung einer Hydroxy-Gruppe entsteht am Sauerstoffatom eine negative Ladung, die beim Phenol jedoch Teil des delokalisierten $\pi$-Elektronensystems wird und deshalb innerhalb des gesamten Moleküls wandern kann. Aufgrund der Delokalisation wird die Ladung dem Zugriff durch andere Moleküle entzogen und das Phenolmolekül bleibt auch im deprotonierten Zustand stabil. Je größer das delokalisierte $\pi$-
1. Einleitung


Für die Biosynthese der Flavonoide (Winkel-Shirley 2002) wird aus p-Cumarsäure zunächst p-Cumaroyl-S-CoA gebildet. An p-Cumaroyl-S-CoA werden anschließend unter Abspaltung der S-CoA-Gruppe drei zyklisch verknüpfte Acetatreste dreier Malonyl-CoA-Moleküle gehängt. Das aus dieser enzymatischen Reaktion hervorgegangene Chalcon (siehe Abbildung 1.3 D) bildet das Grundgerüst aller Flavonoidmoleküle. Das für diesen Syntheseschritt verantwortliche Enzym ist die Chalconsynthase (CHS). Die Chalcon-Flavanon-Isomerase (CHI) katalysiert schließlich den Reaktionsschritt vom Chalcon zum Naringenin (siehe Abbildung 1.4 B), indem die Doppelbindung zwischen den Benzolringen (A und B) geöffnet wird und die frei gewordenen Elektronen für die Bildung eines weiteren Molekülringes (C) genutzt werden.
1.3 Polyphenole in Pflanzen

Abbildung 1.4.: Wichtige Flavonoidstrukturen. A) Grundgerüst der Flavonoide mit möglichen Positionen der Substituenten an Ring A und C (Position 1 bis 8) bzw. an Ring B (Position 2′ bis 6′). B) Naringenin (Flavanon). C) Grundstruktur der Flavonole: Quercetin: \( R_1 = \text{OH}, \) Kämpferol: \( R_1 = \text{H}. \)


1. Einleitung


1.3. Polyphenole in Pflanzen


Einerseits zeigten Flavonoid-freie Mutanten von Arabidopsis thaliana eine deutlich höhere Widerstandskraft gegenüber UV-Strahlung als Mutanten, die nicht zur Synthese
Abbildung 1.6.: Molare Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_\lambda$) für die Hydroxyzimtsäuren Ferulasäure (F) und Sinapinsäure (S), sowie für die Flavonole Kämpferol (K) und Quercetin (Q) in einem Wellenlängenbereich zwischen 280 und 420 nm. Die Substanzen wurden für die Untersuchung jeweils als Aglykon in 50 % Methanol gelöst.


1.4. Chlorophyllfluoreszenz in Pflanzen

Untersuchungen zur Chlorophyllfluoreszenz an Pflanzen werden seit Ende des 19. Jahrhunderts durchgeführt. MÜLLER (1874) erkannte, dass die Intensität der emittierten roten Fluoreszenz eines photosynthetisch aktiven Organismus in direkter Beziehung zu dessen Bildung von Assimilaten steht. Außerdem beobachtete er bei photosynthetisch aktiven Zellen, dass diese im dunkeladaptierten Zustand nach Einschalten von Anregungslicht für etwa eine Sekunde einen schnellen, starken Anstieg ihrer Fluoreszenz zeigen, welche dann jedoch innerhalb einer Minute wieder auf ein niedrigeres und nahezu konstant

Abbildung 1.7.: Wichtige Parameter der in vivo Chlorophyllfluoreszenz (Abbildung nach Schreiber (2001)). A) Bestimmung der maximalen Quantenausbeute von PS II. Bei Verwendung einer, alle dunkeladaptierten PS II-Zentren absättigenden Lichtquelle (SP) wird die Fluoreszenz maximal groß bzw. zum Fluoreszenzmaximum (Fm). Die Differenz zwischen Grundfluoreszenz (Fo) und Fm entspricht dabei der maximal variablen Fluoreszenz (Fv). Der Quotient Fv/Fm entspricht der maximalen PS II-Quantenausbeute. B) Langsame Fluoreszenzkinetik. Analyse des Fluoreszenzquenchings mittels repetitiver Sättigungsblistze (SP). Fm und Fo sind gegenüber Fm und Fo nichtphotosynthetisch gequencht. AL: Aktinisches Licht, F’: Fluoreszenz unter gegebener aktinischer Lichteinstrahlung, Fm: Fluoreszenzmaximum von dunkeladaptierten Blättern, Fm’: Fluoreszenzmaximum von Blättern im Dauерlicht, Fo: Grundfluoreszenz dunkeladaptierter Blätter, Fo’: Grundfluoreszenz bei dunkelroter Lichteinstrahlung, Fv: Variable Fluoreszenz von dunkeladaptierten Blättern, ML: Messlicht.

1.4.1. Bestimmung des PS II-Status

1. Einleitung

In den Reaktionszentren wird die Anregungsenergie zur Durchführung von Ladungstrennungen verwendet, in deren Folge Elektronen aus Wassermolekülen freigesetzt und zur Synthese energiereicher, chemischer Verbindungen genutzt werden. Allerdings fließt die Anregungsenergie nicht vollständig in diese sogenannten photochemischen Reaktionen (=P) ein. Die Effizienz der Energieumwandlung wird dadurch abgeschwächt, dass die absorbierte Anregungsenergie (=1) teilweise in Form von strahlungsloser Dissipation bzw. Wärme (=D) und als Fluoreszenz (=F) verloren geht. Bei konstanter Lichtintensität sind die Raten dieser drei Reaktionswege komplementär, d.h. die Intensität der Fluoreszenz wird durch photochemische Arbeit und durch strahlungslose Dissipation erniedrigt, so dass gilt:

\[ F = 1 - P - D \]

Empirische Ergebnisse zeigen, dass unter natürlichen Bedingungen die gemessene Fluoreszenz vorwiegend vom Chlorophyll a des PS II und dessen Antennensystem emittiert wird (KRAUSE & WEIS 1991) und deshalb in direkter Beziehung zur photochemischen Arbeit und strahlungslosen Dissipation am PS II steht. Im dunkeladaptierten Zustand liegt die Akceptorseite des PS II weitestgehend im oxidierten Zustand vor. Die Wahrscheinlichkeit, dass Anregungsenergie im PS II erfolgreich für Ladungstrennungen verwendet wird, ist maximal. Die Fluoreszenzausbeute ist in diesem Fall minimal (=Fo). Mit zunehmender Bestrahlungsstärke steigt die Rate photochemischer Reaktionen im PS II an. Diese führen zu einem Anstieg der akceptorzeitigen Reduktion von PS II. Erfolgreiche Ladungstrennungen (=P) werden unwahrscheinlicher und die Anregungsenergie geht zunehmend als Fluoreszenz verloren. Ab einer bestimmten Bestrahlungsstärke sind aufgrund der vollständigen Reduktion der Akceptorseite keine weiteren Ladungstrennungen im PS II mehr möglich und die gesamte Anregungsenergie wird in Fluoreszenz umgewandelt. Die Fluoreszenz wird maximal (=Fm), die Photochemie sinkt auf ein Minimum ab.

Der Anstieg der Fluoreszenz zwischen Fo und Fm wird als variable Fluoreszenz (=Fv) bezeichnet (Abbildung 1.7 A) und spiegelt den Redoxzustand der PS II-Akceptorseite und damit das Auftreten erfolgreicher Ladungstrennungen am PS II wider. Nach BUTLER & KITAJIMA (1975) ist das Verhältnis Fv/Fm deshalb ein Maß für die Effizienz, mit der die Anregungsenergie aus den Antennenkomplexen von offenen PS II-Reaktionszentren übernommen und für photochemische Reaktionen genutzt wird. Im ungestressten Zustand liegen die Maximalwerte von Fv/Fm bei vielen Pflanzen bei etwa 0,83. Unter photoinhibierenden Bedingungen korreliert der Wert von Fv/Fm mit der Quantenausbeute der Sauerstoffproduktion am PS II (DEMMIG & BJÖRKMAN 1987). Dies macht das Verhältnis Fv/Fm zu einem nützlichen Messparameter, mit dessen Hilfe die Folgen von Strahlungstress an einem photoautotrophen Organismus quantifiziert werden können.
1.4.2. Bestimmung der epidermalen UV-Abschirmung


Das Verhältnis von UV-induzierter zu lichtinduzierter Fluoreszenzausbeute (F(UV)/F(BG)) beschreibt die Transmissionseigenschaft der Epidermis für UV-Strahlung im Vergleich zu sichtbarem Licht. Deshalb wird das Verhältnis F(UV)/F(BG) als relative epidermale UV-Transmission bezeichnet. Wird diese Art der Fluoreszenzmessung an Blättern ohne Epidermis bzw. an isolierten Chloroplasten durchgeführt, so entspricht das Verhältnis der Ausbeuten von UV- zu lichtinduzierter Fluoreszenz einer UV-Transmission von 100%. Das Dividieren von relativen epidermalen UV-Transmission durch diesen 100%-Wert ergibt die absolute epidermale UV-Transmission (T(UV)). Ist neben der epidermalen UV-Abschirmung auch die extern eingestrahlte UV-B-Bestrahlungsstärke (UV-B_ir) bekannt, so kann die im Chloroplasten effektiv wirksame UV-B-Belastung (UV-B_ef) durch einfache Multiplikation beider Faktoren berechnet werden (Abbildung 1.8).

Abbildung 1.8.: UV-Strahlungsintensitäten innerhalb und außerhalb eines Blattes. Die von einer UV-B-Quelle (UV-B) ausgehende UV-B-Strahlung (UV-B_ir) wird innerhalb der Epidermis entsprechend der epidermalen UV-Transmission abgeschwächt. Nur die die Epidermis durchdringende UV-B-Strahlung wirkt schädigend. Daher wird dieser Strahlungsanteil als effektives UV-B (UV-B_ef) bezeichnet.
1. Einleitung

Der Vorteil zur Bestimmung der epidermalen Transmission von Blättern ein PAM-Fluorometer zu verwenden, besteht in dem schwachen Anregungslicht von solchen Fluorometern. Das schwache Anregungslicht gewährleistet, dass sowohl bei der Fluoreszenzanregung durch UV- als auch durch sichtbares Licht die PS II-Zentren während des Messvorgangs ständig im offenen Zustand bleiben und die Fluoreszenz somit kontinuierlich auf konstantem Niveau der Grundfluoreszenz (Fo) bestimmt werden kann. Intensitätsflukuationen der Chlorophyllfluoreszenz wie sie z.B. durch nichtphotochemisches Quenching bei der Fluoreszenzinduktion verursacht werden (Abbildung 1.7 B), treten nicht auf und führen daher zu keinem Verlust an Messgenauigkeit.

1.5. Arabidopsis thaliana


Aufgrund der hohen Fertilität, der relativ kurzen Generationsabfolge sowie der Anspruchlosigkeit bei der Kultivierung unter Laborbedingungen war A. thaliana ursprünglich für Pflanzengenetiker ein interessanter Modellorganismus, weshalb dessen Genom unter den Höheren Pflanzen auch als erstes vollständig sequenziert wurde (Kaul et al. 2000). Das große Wissen über das Genom und die Physiologie dieser Pflanzen, die relativ nahe Verwandtschaft zu den Kulturpflanzen der Gattungen Brássica (Kohl) und Sinapis (Senf), sowie die sehr erfolgreiche, geografisch beinahe weltweite Verbreitung (RÉDEI 1970) lassen A. thaliana auch innerhalb anderer botanischer Teildisziplinen eine große Bedeutung zukommen.

Für die Wahl von A. thaliana als Versuchspflanze in dieser Arbeit war ausschlaggebend, dass aufgrund der umfangreichen molekularbiologischen Arbeiten, die in der Vergangenheit an dieser Art durchgeführt wurden, für beinahe jedes Gen Deletionsmutanten erhältlich sind (ALONSO et al. 2003). Diese werden von zentral organisierten Samenbanken für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung gestellt. So sind über diese Samenbanken auch Mutanten erhältlich, welche nicht über die Fähigkeit zur Synthese des vollständigen, Arabidopsis-typischen Spektrums an Polyphenolen verfügen.

In der fahl-Mutante, einer Mutante des Columbia-Wildtyps von A. thaliana (COL), ist die Ferulat-5-Hydroxylase (F5H) nicht funktionsfähig (CHAPPLE et al. 1992). F5H ist bei der enzymatischen Umsetzung von Ferulat zu Sinapinsäure beteiligt und die Dele-
Arabidopsis thaliana


![Abbildung 1.9: Verschiedene Akzessions- bzw. Ökotypen von A. thaliana gleichen Alters nach gleichartiger Kultivierung. Herkunftsländer dieser Akzessionen sind: COL - Polen, CVI - Capverdische Inseln, LER - Polen, SHA - Tadschikistan, TRI - Deutschland, ORN - Mittelnorwegen. Weitere Informationen zu den Ökotypen sind in Abschnitt 2.1 angegeben.](image-url)
1. Einleitung

1.6. Fragestellung

Aus dem bisher Dargestellten ergeben sich einige zentrale Fragen, welche in der vorliegenden Arbeit innerhalb drei verschiedener Teile thematisiert und beantwortet werden. Der erste Teil beschäftigt sich mit der **Funktion einer erhöhten UV-Abschirmung bei Kühle**. In der Einleitung wurde beschrieben, dass neben Licht und UV-B auch niedrige Temperatur eine Induktion der epidermalen UV-B-Abschirmung bewirkt. Es soll daher geklärt werden, welchen Nutzen Pflanzen von der durch Kühle induzierbaren Verstärkung der epidermalen UV-B-Abschirmung haben? Weshalb bedürfen Pflanzen bei Kühle einer solchen Verstärkung? Bewirkt die Abkühlung der Umgebungstemperatur bei Pflanzen eine erhöhte Sensibilität gegenüber UV-B-Strahlung? Findet die Reparatur von UV-B-Schäden bei Kühle verlangsamt statt und kann eine Erhöhung der epidermalen UV-Abschirmung eine bei Kühle möglicherweise verringerte UV-Toleranz kompensieren?

Im zweiten Teil wird untersucht, wie eine in Abhängigkeit zu Temperatur und UV-B-Bestrahlungsstärke aufgebaute UV-B-Abschirmung zur **UV-B-Akklimatisation von A. thaliana** beiträgt. Hierzu wird zunächst der Ökotyp Columbia bei unterschiedlichen Temperaturen und UV-B-Bestrahlungsstärken kultiviert und anschließend die epidermale UV-B-Abschirmung und der jeweilige UV-B-Akklimatisationserfolg bestimmt. Im Anschluss soll geklärt werden, ob das Untersuchungsergebnis zum Ökotyp Columbia auch auf andere Akzessionen von A. thaliana zu übertragen ist oder ob zwischen verschiedenen Akzessionen Unterschiede in der Fähigkeit zur Bildung der UV-B-Abschirmung bestehen. Wenn Unterschiede existieren, sind diese auf verschieden hohe UV-Strahlungsbelastungen an den ursprünglichen Herkunftsorten der verschiedenen Akzessionen zurückzuführen?

Spektralbereichen der UV-Strahlung absorbieren Flavonole und Hydroxyzimtsäuren? Wenn Flavonole bei Kühle in Pflanzen verstärkt gebildet werden, sind sie überhaupt in der Lage, die Pflanze gegen UV-B-Strahlung abzuschirmen?
1. Einleitung
2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial


| Tabelle 2.1.: Auflistung der verwendeten Akzessionen und Mutanten von *A. thaliana*. Angegeben sind die offiziellen Bezeichnungen, wie sie vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, University of Nottingham, Loughborough, UK) verwendet werden. Dahinter sind in Klammern die Bezeichnungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet werden. Als Bezugsquelle wird entweder die Bestellnummer, unter welcher die Samen bei NASC geordert werden können, oder aber die Person angegeben, von welcher die Samen bezogen wurden. |
|---|---|---|---|
| Bezeichnung | Betroffenes Gen/Enzym | Ökotyp | Bezugsquelle |
| *Columbia* (COL) | unveränderter Wildtyp | (COL.-0) | - |
| *fah1-2* (fah1) | AT4G36220/ Ferulat 5-Hydroxylase | (COL.-0) | CS6172 |
| *Landsberg erecta* (LER) | unveränderter Wildtyp | (LER.-0) | CS20 |
| *tt4-1* (tt4) | AT5G13930/ Chalcon-Synthase | (LER.-0) | CS85 |
| *tt5-1* (tt5) | AT3G55120/ Chalcon-Flavanon-Isomerase | (LER.-0) | CS86 |
| *tt7-1* (tt7) | AT5G07990/ Flavonoid 3’-Hydroxylase | (LER.-0) | CS88 |
| *CVI* (CVI) | unveränderter Wildtyp | (CVI) | M. Koornneef |
| *ORN* (ORN) | unveränderter Wildtyp | (ORN) | M. Koornneef |
| *SHA* (SHA) | unveränderter Wildtyp | (SHA) | M. Koornneef |
| *TRI* (TRI) | unveränderter Wildtyp | (TRI) | Eigenfund |
2. Material und Methoden

**Tabelle 2.2.:** Ursprüngliche Fundorte der verwendeten Akzessionen von *A. thaliana*. Die Daten wurden von Marten Koornneef und Monika Dorsch zur Verfügung gestellt.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bezeichnung</th>
<th>Herkunftsland (-ort)</th>
<th>geogr. Breite/Länge</th>
<th>Höhenangabe</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>COL</td>
<td>Polen</td>
<td>N 51° / O 15°</td>
<td>19 m ü. NN</td>
</tr>
<tr>
<td>CVI</td>
<td>Capverdische Inseln</td>
<td>N 15° / W 24°</td>
<td>1052 m ü. NN</td>
</tr>
<tr>
<td>LER</td>
<td>Polen (Landsberg)</td>
<td>N 52° / O 15°</td>
<td>600 m ü. NN</td>
</tr>
<tr>
<td>ORN</td>
<td>Norwegen</td>
<td>N 66° / O 13°</td>
<td>0 m ü. NN</td>
</tr>
<tr>
<td>SHA</td>
<td>Tadschikistan (Pamiro-Alay)</td>
<td>N 38° / O 70°</td>
<td>3063 m ü. NN</td>
</tr>
<tr>
<td>TRI</td>
<td>Deutschland (Trischen)</td>
<td>N 54° / O 08°</td>
<td>0 m ü. NN</td>
</tr>
</tbody>
</table>

2.2. Allgemeine Pflanzenkultivierung

Für die Aussaat der Pflanzen wurde stets TKS-2 Kultursubstrat (Floragard-Vertriebs GmbH für Gartenbau, Oldenburg, Deutschland) verwendet. Zur Keimung standen die Aussaaten in einer Klimakammer bei 21 °C. Hierbei wurden sie bei Langtagbedingungen (16 h Licht - 8 h Dunkelheit) mit 50 \( \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \) photosynthetischer Photonenflußdichte (PPFD) bestrahlt. Nach dem Keimen wurde die Kultivierung der Pflanzen bei der dem jeweiligen Experiment entsprechenden Temperatur (9 °C oder 21 °C) in Klimakammern fortgesetzt. Zwei bis drei Wochen danach, spätestens jedoch nach Erscheinen des vierten Blattes, wurden die Keimlinge vereinzelt. Im Anschluss daran wurden die Versuchspflanzen entsprechend der Art der sich anschließenden Experimente weiter kultiviert. Die spezifischen Anzuchtsbedingungen der Versuchspflanzen werden bei der Beschreibung der Experimente genauer erläutert (Abschnitt 2.9).

2.3. Bestimmung und biologische Gewichtung der UV-B-Bestrahlungsstärke

2.3. Bestimmung und Gewichtung der UV-B-Strahlung


In Abbildung 2.2 sind aus beiden genannten UV-Aktionsspektren resultierende Kalibrierfunktionen vergleichend dargestellt. Für die in dieser Arbeit verwendeten UV-Strahlungsquellen (Spektrum siehe eingebundene Grafik in Abbildung 2.1) sind die Unterschiede zwischen beiden Kalibrierfunktionen unbedeutend (nicht signifikant, p = 0,6893). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die verwendeten Strahlungsquellen hauptsächlich UV-B emittieren, die UV-Aktionsspektren in diesem spektralen Bereich jedoch nahezu identisch sind. Für diese Arbeit wurde das Aktionsspektrum von Thimijan et al. (1978) verwendet.
2. Material und Methoden

Kalibrierfaktor | UV-Aktionsspektrum
--- | ---
5,271 ± 0,1859 mW m⁻²/mV | Thimijan et al. (1978))
5,105 ± 0,1915 mW m⁻²/mV | Flint & Caldwell (2003)


2.4. Bestimmung des durch UV-Strahlung induzierten Schadens im Photosystem II

2.5. Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung von Blättern und isolierten Chloroplasten wurde nach Porra et al. (1989) durchgeführt. Bei isolierten Chloroplasten wurde der Chlorophyllgehalt auf das Gesamtvolumen der hergestellten Chloroplastensuspension, bei intakten Blättern auf deren Blattflächen bezogen. Nach der Flächenbestimmung wurden die Blätter zunächst im tiefgekühlten Zustand mit einer Schwingmühle (Typ: MM 2, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) in 2 ml Reaktionsgefäßen pulverisiert. Anschließend wurde das zerstoßene Blattmaterial in 200 µl 80 %igem Aceton (pH 7,8) für 5 min auf Eis extrahiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation (Biofuge fresco, Heraeus Kendro Lab. Products, Osterode, Deutschland) bei 4 °C und 15.700 g wurde der Überstand abgenommen und in einem weiteren Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt und die Überstände anschließend vereinigt. Von fertigen Chloroplastensuspensionen wurden 50 µl abgenommen und ebenfalls auf die oben beschriebene Weise extrahiert. Die Extrakte wurden bis zur photometrischen Messung der Absorption bei 646,6 nm, 663,6 nm und 750,0 nm (Uvikon-Spektrophotometer, Kontron Instruments, Mailand, Italien) auf Eis gelagert. Die Mengen an Chlorophyll a in den Extrakten wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

\[
\text{chl} \ a \ [\mu g \ ml^{-1}] = 12,25 (\text{Abs}_{663,6\ nm} - \text{Abs}_{750\ nm}) - 2,55 (\text{Abs}_{646,6\ nm} - \text{Abs}_{750\ nm})
\]

2.6. Isolierung intakter Chloroplasten aus A. thaliana

Die Isolierung intakter Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Aronsson & Jarvis (2002). Alle Schritte der Aufarbeitung fanden bei 4 °C statt. Je Aufbereitung wurden etwa 5 g Blattmaterial von A. thaliana verwendet. Zunächst wurde das Blattmaterial in einem Mörser mit 20 ml Isolationspuffer (0,3 M Sorbitol, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 20 mM HEPES/KOH [pH 8,0] und 10 mM NaHCO₃) homogenisiert und anschließend durch eine doppelt gelegte Gaze (10 µm Maschenweite) gefiltert. Die Rückstände in der Gaze wurden ein zweites Mal homogenisiert und abgefiltert. Die filtrierten Suspensionen wurden vereinigt und zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

Im Anschluss wurde die gesammelte Suspension bei 4600 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Isolationspuffer resuspendiert. Danach wurde ein zweistufiger Percoll-Gradient in einem 20 ml Zentrifugenröhrchen mit der Suspension beladen. Die untere Phase des Percollgradienten (Gesamtvolumen: 3 ml) bestand aus 2,55 ml Percollösung (95 % [w/v] Percoll, 3 % [w/v] PEG 6000, 1 % [w/v] Ficoll, 1 % [w/v] BSA) und
2. Material und Methoden

0,45 ml einer Gradientenmischung folgender Zusammensetzung: 25 mM HEPES-NaOH (pH 8,0), 10 mM EDTA, 5 % (w/v) Sorbitol. Die obere Phase (Gesamtvolumen: 7 ml) bestand aus 2,94 ml Percollösung und 4,06 ml Gradientenmischung. Nach dem Beladen des Dichtegradienten wurde dieser bei 4 °C und 2500 g in einem Ausschwingrotor für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde mit der Entnahme der Proben gewartet, bis der Rotor ungebremst zum Stillstand gekommen war.


2.7. Nichtinvasive Bestimmung der epidermalen UV-Transmission an Blättern

Die epidermalen UV-Transmissionen von Blättern wurden für diese Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt. Beide Methoden stützen sich hierbei auf die durch Anregungsslicht induzierte Chlorophyllfluoreszenz.

2.7. Bestimmung der epidermalen UV-Transmission

Wellenlängenbereiche im UV-Spektrum Anregungssstrahlen existieren. Vollständige Transmissionsspektren können mit dieser Methode daher nicht aufgezeichnet werden.


2.7.1. Xenon-PAM-Methode


2. Material und Methoden

Abbildung 2.3.: Relative Unterschiede zwischen den verschiedenen Chlorophyll-Anregungsstrahlen der Xenon-PAM. Die Strahlungsintensität des UV-B-Messstrahls wurde gleich 100 % gesetzt. Die Intensitäten des UV-A-Messstrahls und des blau-grünen Referenzstrahls (BG) betragen im Vergleich dazu 74 % bzw. 10 %.


2.7. Bestimmung der epidermalen UV-Transmission


**Abbildung 2.4.**: Die Fluoreszenzverhältnisse F(UV) zu F(BG) von auf Filterpapier aufgetragenen Chloroplasten sind vom aufgetragenen Chlorophyll a-Gehalt abhängig. Der Chlorophyll a-Gehalt in Blättern von *A. thaliana* liegt zwischen 12 µg und 31 µg. Dieser Bereich wird durch die senkrechten, gestrichelten Linien markiert. Innerhalb dieser Markierung liegt das gemittelte Fluoreszenzverhältnis (waagerechte, gestrichelte Linien) von F(UV) zu F(BG) (schwarze Symbole) bei 2,112. Das gemittelte Fluoreszenzverhältnis von F(UV) zu F(BG) (weiße Symbole) liegt bei 2,440.

Aus der epidermalen UV-Transmission (T(UV)) lässt sich die epidermale UV-Absorption (Abs UV) berechnen. Hierzu wird der negativ dekadische Logarithmus von T(UV) gebildet:

\[
\text{Abs UV} = -\log(T(\text{UV}))
\]

2. Material und Methoden

2.7.2. Aufnahme von Anregungsspektren der Chlorophyllfluoreszenz zur Berechnung von UV-Transmissionsspektren

Epidermale Transmissionen intakter Blätter im Wellenlängenbereich von 270 bis 500 nm wurden mit Hilfe von Anregungsspektren der Chlorophyllfluoreszenz bestimmt. Die verschiedenen Spektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer des Typs Fl4500-Fluorescence-Spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan), ausgerüstet mit einem R 3788-Photomultiplier (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), aufgezeichnet.

Zum Erstellen der Spektren wurde die Anregungswellenlänge von 270 nm nach 500 nm in 1 nm-Schritten aufsteigend verändert und die Intensität der Chlorophyllfluoreszenz bei 720 nm detektiert. Die Gitterspaltweite betrug 5 nm auf der Anregungsseite und 10 nm auf der Detektorseite. Die bei einem optischen Gitter typischerweise auftretenden Nebenmaxima wurden durch die Verwendung eines anregungsseitigen UV 290-Filters (Hitachi, Tokyo, Japan) sowie eines detektorseitigen RG 715-Filters (Schott AG, Mainz, Deutschland) eliminiert (CEROVIC et al. 2002). Die optischen Transmissionseigenschaften der verwendeten Filter, die wellenlängenabhängige Quantenausbeute des Photomultipliers, sowie der Anregungs- und der Detektions-Wellenlängen-Bereich des Fluoreszenzspektrometers sind in Abbildung 2.5 dargestellt.

2.7. Bestimmung der epidermalen UV-Transmission

Die Intensität des Anregungsstrahls ist nicht regulierbar und verursacht in intakten, dunkeladaptierten Blättern eine Induktion der Chlorophyllfluoreszenz und nichtphotochemisches Quenching. Um diese störenden Effekte während der Messungen weitestgehend zu vermeiden, wurden zum einen die Blätter vor den Messungen jeweils für 30 min mit 100 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD (Weißelicht) bestrahlt. Zum anderen wurden die Messungen so oft wiederholt, bis zwischen zeitlich aufeinanderfolgenden Anregungsspektren keinerlei Unterschiede mehr erkennbar waren. In der Regel waren hierfür zehn bis 15 Messwiederholungen notwendig. Zur Vergleichbarkeit der Chlorophyll-Anregungsspektren wurden die Spektren auf das jeweilige Signal zwischen 470 und 487 nm normalisiert.


Abbildung 2.6.: Chlorophyll-Anregungsspektren von isolierten Chloroplasten (durchgezogene Linie) und einem intakten Blatt von *A. thaliana* (COL-Wildtyp). Beide Spektren wurden auf die jeweiligen Signalstärken zwischen 470 nm und 487 nm normiert.
2. Material und Methoden

2.8. Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffe in Blättern


2.8.1. Extraktion

Das Blattmaterial wurde nach Lagerung bei -80°C im gefrorenen Zustand mittels einer Schwingmühle (Typ: MM 2, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) in 2 ml Reaktionsgefäßen pulverisiert. Im Anschluss wurde das zerstoßene Material bei 0°C extrahiert. Als Extraktionsmittel diente hierzu 50%iges (v/v) Methanol in wässriger Lösung. Das Extraktionsmedium war mit Salzsäure angesäuert (0,32% v/v). Vor der Injektion wurde jeder Extrakt bei 15.700 g zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Kendro Lab. Products, Osteroode, Deutschland) und der Überstand anschließend durch einen Nylon-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm gepresst.

2.8.2. Qualitative Analyse mittels HPLC und ESI-Massenspektrometrie


2.8. Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffe


2.8.3. Quantitative Analyse mittels HPLC mit Diodenarray-Detektor


Um Hydroxyzimtsäuren und Flavonole in den Blattextrakten aus den aufgezeichneten Chromatogrammen quantitativ abschätzen zu können, wurden vor und nach den
2. Material und Methoden

Tabelle 2.3.: Laufmittelzusammensetzung während der chromatografischen Auftrennung von Polyphenolen durch die HPLC. Zwischen den in der Tabelle genannten Zeitpunkten wurde die Laufmittelzusammensetzung entsprechend den angegebenen Mischungsverhältnissen entlang eines linearen Gradienten verändert.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Zeit [min.]</th>
<th>Methanol im Eluenten [% v./v.]</th>
<th>Fluss [ml min.(^{-1})]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0</td>
<td>20</td>
<td>0,750</td>
</tr>
<tr>
<td>12</td>
<td>45</td>
<td>0,750</td>
</tr>
<tr>
<td>25</td>
<td>45</td>
<td>0,750</td>
</tr>
<tr>
<td>40</td>
<td>75</td>
<td>0,750</td>
</tr>
<tr>
<td>42</td>
<td>100</td>
<td>0,750</td>
</tr>
<tr>
<td>50</td>
<td>100</td>
<td>0,750</td>
</tr>
<tr>
<td>52</td>
<td>20</td>
<td>0,750</td>
</tr>
</tbody>
</table>


Tabelle 2.4.: Kalibrierfunktion des DA-Detektors auf Kämpferol, Quercetin und Sinapin.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Substanz</th>
<th>Kalibrierfunktion</th>
<th>(R^2)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Kämpferol</td>
<td>(m = OD_{360nm}) 0,9595 nmol/AUs + 0,01633 nmol</td>
<td>0,9988</td>
</tr>
<tr>
<td>Quercetin</td>
<td>(m = OD_{360nm}) 0,7929 nmol/AUs + 0,03055 nmol</td>
<td>0,9985</td>
</tr>
<tr>
<td>Sinapin</td>
<td>(m = OD_{314nm}) 0,8842 nmol/AUs + 0,05272 nmol</td>
<td>0,9963</td>
</tr>
</tbody>
</table>

2.8. Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffe

Abbildung 2.7.: Kontrolle des DA-Detektors auf Signalstabilität während der Messreihe durch Kalibration vor (weiße Symbole, $R^2 = 0,9982$) und nach der HPLC-Analyse (dunkle Symbole, $R^2 = 0,9995$) auf Kämpferol. Das Ergebnis (p-Wert) des statistischen Tests auf unterschiedliche Steigung (AnCoVa) ist im Diagramm angegeben. Entsprechende Kalibrationskurven für Sinapin und Quercetin sind Abbildung A.1 zu entnehmen.

2.8.4. Rekonstruktion von Extinktionsspektren


2. Material und Methoden

In Blättern liegen Flavonole und Hydroxyzimtsäuren in glykosidierter Form vor. Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten HPLC-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Glykosidierung der Polyphenole eine Verschiebung der Absorptionsspektren um mehrere Wellenlängen bewirkt. So waren die Spektren von Kämpferol- und Quercetinglykosiden im Vergleich zu denen der Aglyka um 21 nm und 23 nm in den kürzerwelligen Spektralbereich verschoben (vgl. KOLB & PFÜNDL (2005)), während sich die Spektren glykosidierter Sinapin- und Ferulasäurederivate um 6 nm und 11 nm in den längerwelligen Strahlungsbereich verlagerten. Unter der Annahme, dass die molaren Extinktionskoeffizienten dieser Polyphenole ansonsten durch die Glykosidierung unverändert blieben, wurden die für die Aglyka ermittelten Extinktionskoeffizienten für die Anwendung auf Glykoside entsprechend der jeweiligen spektralen Verschiebung angepasst. Im Anschluss wurden mittels dieser abgewandelten Extinktionskoeffizienten und den Daten der quantitativen Polyphenolbestimmungen die fraglichen Extinktionsspektren rekonstruiert.

2.9. Beschreibung der Experimente


2.9.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle

Pflanzenkultivierung

Die Versuchspflanzen wurden nach dem Vereinzeln für weitere zwei bis drei Wochen bei 9 bzw. 21 °C und 50 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD unter Langtagbedingungen kultiviert. Um Pflanzen mit verschiedener epidermaler UV-Transmission zu erhalten, wurden diese sieben Tage vor Versuchsbeginn in vier Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde weiterhin mit 50 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD bestrahlt. Die Betrachtungsstärken der restlichen drei Gruppen betrugen 80, 180 und 220 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD. Verwendet wurden für diese Experimente lediglich Pflanzen des Ökotyps Columbia.
Pflanzenbehandlung

1. Bei 21°C kultivierte Pflanzen mit gleicher epidermaler UV-B-Transmission (T(UV-B) = 0,328) wurden in Klimaschränken (CLF-Plant-Climatics, CLF Laborgeräte GmbH, Emersacker, Deutschland) bei 9°C und 21°C und einer PPFD von 150 µmol m⁻² s⁻¹ für 2,5 h mit UV-B behandelt. Die UV-B-Bestrahlungsstärke (UV-B_ir) lag hierbei zwischen 0 und etwa 0,45 W m⁻². Vor und nach der Behandlung wurde für jede Pflanze die maximale Quantenausbeute von PS II bestimmt.

2. Vier Gruppen (jeweils n = 10) von bei 21°C kultivierten Pflanzen mit unterschiedlichen mittleren epidermalen UV-B-Transmissionen (Gruppe A: 0,097, Gruppe B: 0,146, Gruppe C: 0,203, Gruppe D: 0,325) wurden je zur Hälfte bei 9°C und bei 21°C für 2,5 h mit UV-B behandelt. Die UV-B-Bestrahlungsstärke (UV-B_ir) war konstant auf 0,52 W m⁻² eingestellt. Zusätzlich wurden die Pflanzen mit einer PPFD von 150 µmol m⁻² s⁻¹ bestrahlt. Vor und nach der Behandlung wurde für jede Pflanze die maximale Quantenausbeute von PS II bestimmt.

3. Zehn an 9°C akklimatisierte und zehn an 21°C akklimatisierte Pflanzen mit verschiedenen UV-B-Transmissionen wurden bei 9°C für 3 h mit gleichem UV-B ef von 0,21 W m⁻² und einer PPFD von 150 µmol m⁻² s⁻¹ bestrahlt. Vor und direkt nach der Behandlung wurde für jede Pflanze die maximale Quantenausbeute von PS II gemessen. Es folgte eine neun-stündige Regenerationsphase. In diesem Zeitraum wurden zur Dokumentation der Erholung alle 3 h Messungen der maximalen PS II-Quantenausbeute durchgeführt. Während dieser Phase wurden fünf Pflanzen von jeder Pflanzengruppe bei 9°C belassen. Die anderen fünf Pflanzen standen zur Regeneration bei 21°C. Die PPFD betrug in den Klimaschränken während der Regenerationsphase 50 µmol m⁻² s⁻¹.

4. Zunächst wurden die epidermalen UV-B-Transmissionen der bei 21°C und 9°C kultivierten Pflanzen bestimmt (T(UV-B) bei 21°C: 0,328 ± 0,0678, T(UV-B) bei 9°C: 0,187 ± 0,0426). Anschließend wurden die Pflanzen für 2,5 h mit UV-B und einer PPFD von 150 µmol m⁻² s⁻¹ bestrahlt. UV-B_ir betrug hierbei zwischen 0 und 0,62 W m⁻². Vor und nach der Behandlung wurde für jede Pflanze die maximale Quantenausbeute von PS II gemessen.
2. Material und Methoden

2.9.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von A. thaliana durch Abschirmung

**Pflanzenkultivierung**

25 bis 30 Tage alte Pflanzen wurden bei 9 °C bzw. 21 °C für 14 Tage in Klimaschränken kultiviert. Der Tag-Nacht-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden sowie die Bestrahlungsstärke von 50 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD blieb unverändert. Als Versuchspflanzen fanden die fünf Akzessionen COL, CVI, ORN, SHA und TRI Verwendung.

**Pflanzenbehandlung**

Täglich um 12 Uhr mittags wurde die Bestrahlungsstärke für 2,5 h auf 150 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD erhöht. Zusätzlich wurde für diesen Zeitraum eine UV-B-Strahlungsquelle eingeschaltet. Die biologisch effektiv gewichtete Strahlungsintensität (THIMIJAN et al. 1978) betrug während dieser Zeit zwischen 0 und 0,6 W m⁻². Nach 14 Tagen Anzucht bei UV-B-Bestrahlung wurde die epidermale UV-Transmission sowie die Quantenausbeute von PS II für alle Versuchspflanzen an jeweils drei Blättern bestimmt.

2.9.3. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

**Pflanzenkultivierung**

Die Pflanzenkultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben. Als Versuchspflanzen gewählt wurden die Ökotypen Columbia und Landsberg erecta sowie die Deletionsmutante fahl mit Columbia als genetischem Hintergrund sowie die Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 mit Landsberg erecta als genetischem Hintergrund.

**Pflanzenbehandlung**

Täglich um 12 Uhr mittags wurde die Bestrahlungsstärke für 2,5 h auf 150 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD erhöht. Zusätzlich wurde für diesen Zeitraum eine UV-B-Strahlungsquelle eingeschaltet. Die biologisch gewichtete Strahlungsintensität (THIMIJAN et al. 1978) betrug in dieser Zeit zwischen 0 und 0,45 W m⁻². 14 Tage nach Beginn der Kultivierung mit UV-B-Bestrahlung wurde die epidermale UV-Transmission sowie die Quantenausbeute von PS II für alle Versuchspflanzen an jeweils drei Blättern bestimmt. Die selben Blätter wurden im Anschluss geerntet, deren Flächen erfasst und deren Polyphenol-Zusammensetzung über HPLC-Analysen qualitativ wie auch quantitativ bestimmt.

40
2.10. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit der Software GraphPad Prism Version 5.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Soweit durch die Angabe von sich überschneidenden Standardfehlern bzw. sich nicht überschneidenden 95%-igen Konfidenzintervallen als Fehlerbereiche weitere statistische Auswertungen unnötig waren, wurde auf diese verzichtet. Bei parametrischen Testverfahren wurden die Datensätze zunächst auf Normalverteilung und homogene Varianzen überprüft.
2. Material und Methoden
3. Ergebnisse

3.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle

Pflanzen, die bei kühler Temperatur wachsen, bilden im Vergleich zu Pflanzen aus warmer Anzucht eine größere Menge an UV-B-absorbierenden Substanzen und entwickeln daher eine deutlich verbesserte epidermale UV-Abschirmung (LEYVA et al. 1995, BILGER et al. 2007). Dies führt zu der Annahme, dass die verstärkte UV-B-Vermeidung eine bei Kühle geringer werdende UV-B-Toleranz zu kompensieren hilft. Um zu zeigen, dass die UV-B-Empfindlichkeit von Pflanzen bei abnehmender Temperatur größer wird, wurde zunächst untersucht, ob die Schädigung von PS II durch UV-B-Strahlung bei 9 °C sich quantitativ von der bei 21 °C unterscheidet. Unterschiede in der Resistenz aufgrund von ungleichen Anzuchtsbedingungen zwischen den Versuchspflanzen sollten dabei vermieden werden. Daher wurden die Pflanzen zunächst gemeinsam bei 21 °C kultiviert und vor dem Experiment auf homogene UV-Abschirmungen überprüft. Vor und nach Behandlung der Pflanzen in einem UV-B-Strahlungsgradienten wurde die jeweilige maximale Quantenausbeute von PS II festgestellt. Die Differenz zwischen beiden Messungen wurde, prozentual zum Ausgangswert, als Schädigung von PS II bewertet.

In Abbildung 3.1.A ist die von der eingestrahlten UV-B-Intensität abhängige PS II-Schädigung der Pflanzen dargestellt. Es wird gezeigt, dass bei 21 °C die PS II-Schädigung mit der von 0 auf 0,4 W m⁻² zunehmenden UV-B-Einstrahlung auf bis zu 15 % ansteigt. Wird die UV-B-Behandlung der Pflanzen jedoch bei Kühle durchgeführt, erreicht die PS II-Schädigung bei höchster UV-B-Bestrahlungsstärke etwa 30 %. Durch niedrigere Temperatur wird die schädigende Wirkung der UV-B-Strahlung also verdoppelt.

3. Ergebnisse

Abbildung 3.1.: A) Von der UV-B-Strahlung abhängige Schädigung von PS II nach 2,5 h bei 21°C (weiße Symbole) und 9°C (schwarze Symbole) bei gleicher epidermaler UV-B-Transmission. n = 3, ±SEM. B) Von der epidermalen UV-B-Transmission abhängige Schädigung von PS II nach 2,5 h bei 21°C (weiße Symbole) und 9°C (schwarze Symbole) bei konstanter UV-B-Bestrahlung. n = 15, ±SEM, p < 0,0001.

und 3.1.B dargestellten Ergebnisse zeigen auf unterschiedliche Weise, dass die Toleranz von Pflanzen gegenüber UV-B-Strahlung bei sinkender Temperatur abnimmt.

Durch die Berechnung des effektiven UV-B (UV-B_{ef}) ist es möglich, die Ergebnisse der bisherigen beiden Experimente in Abbildung 3.2 zusammenzufassen. Das UV-B_{ef} beschreibt jenen Teil der UV-B-Strahlung, welcher den UV-Schutzschild der Epidermis durchdringen und, unabhängig von UV-B-Vermeidungsstrategien der Pflanze, in tiefer liegenden Zellschichten Schädigungen hervorrufen kann. Auch hier deutet das Ergebnis darauf hin, dass die Empfindlichkeit von PS II gegenüber UV-B-Strahlung mit sinkender Temperatur größer wird.

Die Unterschiede in der UV-B-Empfindlichkeit zwischen den Behandlungsgruppen lassen eine temperaturabhängige Effizienz von Reparatureaktionen vermuten. Mit einem weiteren Experiment sollte dieser mögliche Einfluss der Temperatur auf die Reparatur von UV-B-induzierten Schäden im PS II untersucht werden. Hierzu wurden zuvor gleichartig bei 9°C und 21°C kultivierte Pflanzen für 3 h bei 9°C mit 0,21 W m^{-2} UV-B_{ef} behandelt. Zur Regeneration wurde von jeder Anzuchtsguppe eine Hälfte bei 21°C und die andere Hälfte bei 9°C und einer PPFD von jeweils 50 µmol m^{-2} s^{-1} aufbewahrt. Im Anschluss daran wurde alle 3 h die maximale Quantenausbeute von PS II und damit die Regeneration von PS II bestimmt (Abbildung 3.3).
3.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle

Abbildung 3.2.: Schädigung von PS II in Abhängigkeit von der effektiven UV-B-Bestrahlungsstärke nach 2,5 h bei 21°C (weiße Symbole) und 9°C (schwarze Symbole). Datenpunkte ohne Markierung wurden aus in Abbildung 3.1.A gezeigten Messwerten und Datenpunkte mit roter Markierung aus in Abbildung 3.1.B dargestellten Messwerten berechnet. Korrelationskoeffizienten nach Spearman (1904) für 21°C $r_S = 0,8769$ und für 9°C $r_S = 0,9588$. $n \geq 3$, ± SEM.

Abbildung 3.3.: Regenerationsverlauf von PS II nach 3 h Bestrahlung mit 0,21 W m$^{-2}$ UV-B$_{ef}$ bei 9°C. Die Regeneration erfolgte bei 21°C (weiße Symbole) und 9°C (schwarze Symbole). Die Kultivierung erfolgte bei 9°C (Dreiecke) und bei 21°C (Kreise). $n \geq 15$, ±CI 95%, p < 0,0001.
3. Ergebnisse

Die Regeneration erfolgte bei 21 °C stets rascher, unabhängig davon, ob die Versuchspflanzen vor der UV-B-Behandlung bei 9 °C oder bei 21 °C kultiviert worden waren. Bei 9 °C zeigten jedoch an diese Temperatur akklimatisierte Pflanzen eine deutlich schnellere Erholung als nicht akklimatisierte Pflanzen. Doch auch wenn eine vorherige Kühle-Akklimatisierung der Pflanzen eine raschere Regeneration bei 9 °C bewirkte, so konnte die Kühle-bedingte Verlangsamung der Reparatur nicht vollständig kompensiert werden. Niedrige Temperatur bewirkt somit generell eine Verlangsamung der Reparatur von UV-B-Schäden im PS II.

Um abzuschätzen, inwieweit Pflanzen sich an eine Kühle bedingte Effizienzabnahme der Reparatur von UV-B-Schäden anpassen, wurden zwei Pflanzengruppen zunächst bei 9 °C bzw. 21 °C kultiviert. Im Anschluss erfolgte für 2,5 h eine UV-B-Behandlung aller Pflanzen bei 9 °C. Die UV-B-Bestrahlungsstärke während der Behandlung variierte zwischen 0 und 0,6 W m⁻². Es zeigte sich, dass die von der UV-B-Bestrahlungsstärke abhängige PS II-Schädigung der bei 21 °C kultivierten Pflanzen deutlich höher war als die der bei 9 °C kultivierten Pflanzen (Abbildung 3.4.A). Die Anzucht bei Kühle verstärkte die Resistenz von Pflanzen gegenüber der UV-B-Strahlung erheblich.

Abbildung 3.4.: A) Von UV-Bₑₚ abhängige Schädigung von PSII zweier verschiedener Versuchsgruppen nach 2,5 h bei 9 °C. Die Kultivierung erfolgte bei 9 °C (Dreiecke mit roter Markierung) und bei 21 °C (Kreise). n = 3, ±SEM. B) Schädigung von PSII in Abhängigkeit zum effektiven UV-B (UV-Bₑₑ) nach 2,5 h bei 9 °C. Die Kultivierung erfolgte bei 9 °C (Dreiecke mit roter Markierung) und bei 21 °C (Kreise). n = 3, ±SEM. C) Ausschnittsvergrößerung von Grafik B) zwischen 0 und 0,15 W m⁻² UV-Bₑₑ.

Auf welche Weise die bei Kühle kultivierten Pflanzen eine Erhöhung der Resistenz gegenüber UV-B erreichten, wird deutlich, wenn der UV-B-induzierte PS II-Schaden wie in Abbildung 3.4.B gegen UV-Bₑₑ aufgetragen wird. In dieser Darstellungsweise ist die je-

3.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von A. thaliana durch Abschirmung

3.2.1. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation des Columbia-Ökotyps von A. thaliana


In Abbildung 3.5 ist die UV-B-abhängige PS II-Schädigung von COL-Pflanzen nach der UV-B-Behandlung an Tag 14 dargestellt. Während die Pflanzen, die zur UV-B-Akklimatisation bei 21°C kultiviert worden waren, keine UV-B-bedingten Schäden aufwiesen, zeigten bei 9°C kultivierte Pflanzen signifikante Schädigungen von PS II. Diese Schäden weisen Werte zwischen etwa 3% und 7% auf und korrelieren nicht mit der eingestrahlten UV-B-Bestrahlungsstärke ($R^2 = 0.3473$ bei 21°C und $R^2 = 0.0029$ bei 9°C). Sie scheinen daher unabhängig von UV-B$_{ir}$ zu sein.
3. Ergebnisse

Abbildung 3.5.: Schädigung von Photosystem II in Blättern des Ökotyps COL nach 14-tägiger Kultivierung bei 9°C (schwarze Symbole) und 21°C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten. \( R^2 = 0,3473 \) bei 21°C und \( R^2 = 0,0029 \) bei 9°C, \( n = 6, \pm CI95\% \).

Nach Abschnitt 3.1 handelt es sich bei UV-B_{ef} um eine für Pflanzen physiologisch bedeutende Kenngröße. Zur Vermeidung von UV-B-bedingten Schäden sollte sich das UV-B_{ef} in Pflanzen nach Akklimatisation an UV-B-Stress auf ein möglichst niedriges Niveau einregeln. Zur Überprüfung dieser These wurde nach der UV-B-Akklimatisation der Pflanzen zunächst die epidermale UV-B-Transmission (T(UV-B)) bestimmt. Anschließend wurde aus UV-Bir und T(UV-B) das in den Versuchspflanzen jeweils wirksame UV-B_{ef} berechnet. Die Ergebnisse der Transmissionsbestimmungen (Grafik A) und der Berechnung des in den Pflanzen wirksamen UV-B_{ef} (Grafik B) sind in Abbildung 3.6 gegen die jeweils während der Kultivierung eingestrahlten UV-B-Bestrahlungsstärken aufgetragen worden.

In Abbildung 3.6.A ist zu erkennen, dass bei Blättern, die bei 21°C gewachsen sind, die epidermale UV-B-Transmission mit steigender eingestrahlten UV-B-Bestrahlungsstärke von 0,6 bis auf einen minimalen Wert von etwa 0,1 absinkt. Findet die Kultivierung der Pflanzen bei 9°C statt, so nimmt die epidermale UV-B-Transmission ebenfalls mit steigender UV-B-Bestrahlungsstärke ab. Jedoch bewirkt bereits allein die kühlere Kultivierungstemperatur eine zusätzliche Abnahme der epidermalen UV-B-Transmissionen von etwa 50%.

Abbildung 3.6.B stellt die berechneten Werte des UV-B_{ef} dar. Zur einfachen Beurteilung der Wirksamkeit der epidermalen UV-B-Abschirmung aus diesen Werten ist in diesem Diagramm zusätzlich das UV-B_{ef} eingetragen, welches bei vollständig UV-B-transparenten Epidermen in den Blättern entstünde. Bei 21°C wie auch bei 9°C steigt UV-B_{ef} mit zunehmendem UV-Bir an. In beiden Fällen jedoch scheint die effektiv wirksame UV-B-Strahlung gegen einen niedrigen, maximalen Grenzwert zu streben. So erreicht
3.2. UV-B-Akklimatisation von *A. thaliana*

Abbildung 3.6.: Anpassung der UV-B-Abschirmung in Blättern des Ökotyps COL an Temperatur und UV-B-Einstrahlung. A) Anpassung von T(UV-B) in Blättern des COL-Ökotyps von *A. thaliana* nach 14-tägiger Kultivierung bei 9°C (schwarze Symbole) und 21°C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten und B) daraus berechnetes UV-B_{eff} in selbigen Blättern. n = 6, ±SEM. Bestimmtheitsmaße für in Grafik B) dargestellte Regressionskurven: R² = 0,9948 bei 21°C, R² = 0,9833 bei 9°C. Durchgezogene Linien stellen den Verlauf der Regressionskurven dar, die gestrichelten Linien beschreiben jeweils die 99%igen Vertrauensbereiche (±CI99%) dieser Regressionskurven.

bei 21°C und der höchsten eingestrahlten UV-B-Intensität von etwa 0,39 W m⁻² das UV-B_{eff} lediglich einen maximalen Wert von etwa 0,045 W m⁻², bei 9°C und ähnlichen UV-B-Bestrahlungsstärken (max. etwa 0,38 W m⁻²) liegt der maximale Wert für UV-B_{eff} bei etwa 0,025 W m⁻². Die Regressionsanalyse an den Messreihen beider Temperaturgruppen ergibt einen jeweils nicht-linearen Zusammenhang zwischen UV-B_{eff} und UV-B_{ir}, mit jeweils sehr hohen Regressionskoeffizienten (R² = 0,9948 bei 21°C und R² = 0,9833 bei 9°C). Da die 99%igen Vertrauensbereiche (Konfidenzintervalle) der Regressionskurven sehr eng verlaufen und sich nicht gegenseitig überschneiden, sind die Unterschiede zwischen beiden Messreihen als hoch signifikant einzuschätzen.

3.2.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von verschiedenen Akzessionen von *A. thaliana*

Weltweit existieren neben COL noch viele weitere Akzessionen von *A. thaliana* mit jeweils eigenen Phänotypen. Daher wurden mit den Wildtypen ORN, TRI, SHA und CVI (Abbildung 1.9) weitere Akzessionen in die Untersuchung einbezogen. Die Auswahl dieser Akzessionen erfolgte nach der geografischen Breite ihres natürlichen Wuchsstandortes (Abbildung 3.7).
3. Ergebnisse


Ziel war es, mit diesen Akzessionen die nördliche Hemisphäre vom Polarkreis bis zum Äquator möglichst vollständig abzudecken, um zu klären, ob unterschiedliche, von der geografischen Breite abhängige UV-B-Expositionen an den Wuchsstandorten zu verschiedenen maximalen UV-B-Abschirmleistungen in den Akzessionen geführt haben, oder ob die UV-B-Abschirmung in allen Akzessionen in gleicher Weise und mit gleicher Intensität erfolgt. Die vier verschiedenen Akzessionen wurden hierzu in gleicher Weise bei 9° C und 21° C kultiviert und behandelt wie der zuvor untersuchte Ökotyp COL (Abbildungen 3.5 und 3.6 in Abschnitt 3.2.1).

In Abbildung 3.8 sind für die untersuchten Ökotypen die durch UV-B-Stress induzierten PS II-Schädigungen dargestellt, wie sie nach einer 14-tägigen Akklimatisationsphase zu detektieren waren. Während bei 21° C bei keinem Ökotyp PS II-Schäden zu erkennen waren, lagen bei 9° C die PS II-Schäden im Mittel zwischen 3% und 7%. Nur der CVI-Ökotyp zeigte bei dieser Temperatur im Schnitt um 2% höhere Schädigungen. Insgesamt zeigten die verschiedenen Akzessionen von *A. thaliana* jedoch eine relativ einheitliche Empfindlichkeit gegenüber UV-B-Strahlung. Da jedoch wie bei COL die PS II-Schäden in den verschiedenen Akzessionen nicht mit der eingestrahlten UV-B-Bestrahlungsstärke korrelierten (Abbildung 3.8), könnte die PS II-Schädigung auch unabhängig von UV-B_{ir} sein.
3.2. UV-B-Aklimatisation von A. thaliana

Abbildung 3.8.: Schädigung von PS II in Blättern verschiedener Akzessionen von A. thaliana (ORN - Mittelnorwegen, TRI - Deutschland (Trischen), SHA - Tadschikistan (Pamiro-Alay), CVI - Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 9 °C (schwarze Symbole) und 21 °C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten. \( R^2 \) bei 21 °C = 0,0211 (ORN), 0,0721 (CVI), 0,0118 (TRI), 0,0873 (SHA). \( R^2 \) bei 9 °C = 0,0721 (ORN), 0,1371 (CVI), 0,0095 (TRI), 0,0011 (SHA). n = 6, ± CI 95%.

Wie bereits beschrieben wurden neben der Schädigung von PS II auch die epidermalen UV-B-Transmissionen (T(UV-B)) der Rosettenblätter an den verschiedenen Versuchs- pflanzen bestimmt und daraus schließlich die in den verschiedenen Akzessionen effektiv wirksame UV-B-Strahlung berechnet. In Abbildung 3.9 sind die epidermalen UV-B-Transmission für alle untersuchten Versuchs pflanzen jeweils in Abhängigkeit zur eingestrahlten UV-B-Bestrahlungsstärke dargestellt. Zu erkennen ist, dass die epidermale UV-B-Transmission in den Blättern bei allen Akzessionen in Abhängigkeit zur UV-B-Belastung und zur Anzuchtstemperatur eingeregt wird. Bei 21 °C ohne UV-B-Bestrahlung liegt die T(UV-B) bei allen Akzessionen bei einem Wert von 0,8 und fällt bei dieser Temperatur und maximaler UV-B-Bestrahlungsstärke bis auf Werte von etwa 0,1 ab. Bei 9 °C werden diese Transmissionswerte zumeist um etwa 50 % unterschritten. Dieses Muster ist für alle untersuchten Akzessionen sehr einheitlich. Bemerkenswert ist jedoch, dass, wenn bei 9 °C keine UV-B-Bestrahlung erfolgt, in den verschiedenen Akzessionen unterschiedliche UV-B-Abschirmungsgrade erzielt werden. So wurde nach Kultivierung bei dieser Temperatur in den Blättern des aus Norwegen stammenden...
3. Ergebnisse

Ökotyp ORN eine mittlere UV-B-Transmission von lediglich 0,3 festgestellt, während bei den aus deutlich südlicher gelegenen Regionen stammenden Akzessionen TRI und SHA deutlich höhere UV-B-Transmissionen von etwa 0,5 und in Versuchspflanzen des Ökotyps CVI mittlere Transmissionswerte von über 0,6 gemessen wurden.

Abbildung 3.9.: Akklimatisation von T(UV-B) bei Blättern verschiedener Arabidopsis-Akkzessionen (ORN: Mittelnorwegen, TRI: Deutschland (Trischen), SHA: Tadschikistan (Pamiro-Alaj), CVI: Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 9°C (schwarze Symbole) und 21°C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten. n = 6, ±SEM.

Die aus den epidermalen Transmissionen berechneten Werte des UV-B_{ef} für die untersuchten Akzessionen sind in Abbildung 3.10 gezeigt. Es wird deutlich, dass sich bei allen Akzessionen bei 21°C ein um 35 bis 50% höheres UV-B_{ef} einstellte als bei 9°C. Die sich nicht überschneidenen 99%igen Vertrauensbereiche der eingetragenen Regressionskurven zeigen, dass diese Unterschiede bei allen Akzessionen hoch signifikant waren. Auch schienen bei allen Wildtypen das UV-B_{ef} so moduliert zu werden, dass ein bestimmtes Maximum nicht überschritten wurde.

In Abbildung 3.11 ist ebenfalls für die Blätter der verschossenen Akzessionen die effektiv wirksame UV-B-Strahlung in Abhängigkeit zu UV-B_{ir} dargestellt. In diesem Fall ermöglicht die geänderte Anordnung der verschiedenen Datensätze einen direkten visuellen Vergleich zwischen den verschiedenen Ökotypen. Zusätzlich sind die entsprechenden Datensätze des COL-Ökotyps aus Kapitel 3.2.1 in die Abbildung eingefügt. Die eingetragene
Abbildung 3.10.: Anpassung des UV-\(B_{ef}\) in Blättern verschiedener Arabidopsis-Akzessionen (ORN - Mittelnorwegen, TRI - Deutschland (Trischen), SHA - Tadschikistan (Pamiro-Alay), CVI - Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 9\(^\circ\)C (schwarze Symbole) und 21\(^\circ\)C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten. \(R^2\) bei 21\(^\circ\)C = 0,9835 (ORN), 0,9852 (CVI), 0,9733 (TRI), 0,9882 (SHA). \(R^2\) bei 9\(^\circ\)C = 0,9904 (ORN), 0,9881 (CVI), 0,9803 (TRI), 0,9891 (SHA). \(n = 6, \pm CI99\%\).

Regressionskurve zum COL-Ökotyp ist im Gegensatz zu den berechneten Regressionen der anderen Akzessionen farblich (rot) hervorgehoben.

Anhand der 99\%igen Vertrauensbereiche ist deutlich zu erkennen, dass sich bei beiden Kultivierungstemperaturen die Datensätze des COL-Ökotyps hoch signifikant von den restlichen Datensätzen unterscheiden. Zwischen den Datensätzen der restlichen Akzessionen sind keine derartig signifikanten Unterschiede erkennbar. Trotz der statistisch signifikanten Abweichungen bei COL scheint bei allen Akzessionen ein in Abhängigkeit zu UV-\(B_{ef}\) einheitlicher Verlauf des UV-\(B_{ef}\) zu existieren.
3. Ergebnisse

Abbildung 3.11.: Anpassung des UV-Beff in Blättern verschiedener Arabidopsiskonzessionen (COL - Columbia, ORN - Mittelnorwegen, TRI - Deutschland (Trischen), SHA- Tadschikistan, CVI- Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 21 °C (linke Grafik) und 9 °C (rechte Grafik) im UV-B-Gradienten. Ebenfalls eingetragen sind die aus den Messdaten berechneten Regressionskurven. Die Regressionskurve zum COL-Wildtyp ist farblich (rot) abgesetzt. R² bei 21 °C = 0,9948 (COL), 0,9835 (ORN), 0,9852 (CVI), 0,9733 (TRI), 0,9882 (SHA). R² bei 9 °C = 0,9833 (COL), 0,9904 (ORN), 0,9881 (CVI), 0,9803 (TRI), 0,9891 (SHA). n = 6, ± CI 99%.

3.3. Temperaturabhängige UV-B-Aklimatisation durch Polyphenole

Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse beschreiben, wie die polyphenolischen Substanzgruppen der Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide in Blättern des Columbia-Wildtyps von A. thaliana (COL) jeweils zur Etablierung der epidermalen UV-B-Abschirmung beitragen. Ferner soll anhand verschiedener Deletionsmutanten gezeigt werden, wie sich in Pflanzen das Fehlen einer solchen polyphenolischen Substanzgruppe auf die Akklimatisation der UV-B-Abschirmung an Kühle und UV-B auswirkt. Da die hierbei verwendeten *tt*-Mutanten (*tt4*, *tt5*, *tt7*) nicht wie die *fahl*-Mutante aus dem COL-Wildtyp sondern aus dem Landsberg erecta-Wildtyp (LER) entstanden sind, war es notwendig, auch Pflanzen des LER-Ökotyps in die Untersuchung einzubeziehen.

Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde für die Experimente über 14 Tage in Klimaschränken bei 9 °C und 21 °C und UV-B-Intensitäten zwischen 0 und 0,55 W m⁻² kultiviert. Nach der Akklimatisierung wurde für jede Pflanze die Schädigung durch UV-B sowie die UV-Abschirmung festgestellt. Die Bestimmung der Abschirmung erfolgte zum einen auf herkömmliche Weise mit einem Xenon-PAM-Fluorometer, zum anderen wurden, um einen besseren Eindruck über die epidermale UV-Abschirmung im gesamten UV-B- und UV-A-Wellenlängenbereich zwischen 280 und 400 nm zu bekommen, Chlorophyll-Anregungsspektren aufgezeichnet und daraus UV-Transmissionsspektren berech-
3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


3.3.1. Schädigung durch UV-B

Die Schädigung von PS II durch UV-B nach der letzten UV-B-Bestrahlung an Tag 14 (Abbildung 3.12) variierte zwischen den verschiedenen Pflanzentypen sehr stark. Während der Wildtyp COL keine Schäden aufwies, zeigte der Wildtyp LER bei hohen UV-B-Intensitäten eine deutliche UV-B-Empfindlichkeit. Bei 21 °C und einer UV-B-Bestrahlungsstärke ab etwa 0,3 W m\(^{-2}\) sowie bei 9 °C ab etwa 0,5 W m\(^{-2}\) wird bei diesen Pflanzen die maximale Quantenausbeute von PS II um 10-20 % erniedrigt. Eine kaum von LER abweichende UV-B-Empfindlichkeit zeigte die tt7-Mutante. Diese nicht zur Quercetinsynthese befähigte Mutante scheint lediglich bei 21 °C etwas empfindlicher als der zugehörige LER-Wildtyp zu sein. Bei 9 °C ist hingegen kein Unterschied zwischen diesen beiden Pflanzentypen zu erkennen.

In starkem Kontrast zu diesen Pflanzen stehen die fah1-, tt5- und die tt4-Mutante. Diese Mutanten zeigten alle eine deutlich höhere, von der UV-B-Einstrahlung abhängige Schädigung von PS II. Die PS II-Schädigung der nicht zur Synthese von Sinapoylmalat befähigten fah1-Mutante nimmt bei 9 °C wie bei 21 °C oberhalb einer UV-B-Bestrahlungsstärke von etwa 0,2 W m\(^{-2}\) langsam aber stetig zu. Die Flavonol-freie tt5-Mutante zeigt im Vergleich dazu eine sogar noch etwas höhere Empfindlichkeit gegenüber UV-B. Eine temperaturabhängige Steigerung des Schadens ist bei beiden Mutanten jedoch nicht erkennbar.

Die höchste UV-B-Empfindlichkeit zeigte die tt4-Mutante, die aufgrund eines genetischen Defekts der Chalconsynthase zu keiner Flavonoidsynthese befähigt ist. Bereits sehr geringe UV-B-Intensitäten von unter 0,05 W m\(^{-2}\) führten zu Schäden im PS II, wie sie für den genotypisch zugehörigen LER-Wildtyp erst bei der zehnfachen Strahlungsintensität zu beobachten waren. Außerdem war für diese Mutante bei 21 °C eine sehr viel größere UV-B-Empfindlichkeit zu beobachten als bei 9 °C.

3.3.2. Von der Temperatur abhängige Anpassung des UV-Bef

Wie in Abschnitt 3.1 bereits gezeigt wurde, wirkt UV-B bei niedriger Temperatur schädigender als bei moderater Temperatur. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Pflanzen in der Lage sind, dies durch eine erhöhte epidermale UV-Abschirmung zu kompensieren. Diese
Abbildung 3.12.: Schädigung von PS II in Blättern der Wildtypen Columbia (COL) und Landsberg erecta (LER) sowie der Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 und fah1 von A. thaliana nach Kultivierung bei 9°C (schwarze Dreiecke) und 21°C (weiße Kreise) im UV-B-Gradienten. n = 3, ±SEM.
3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

Kompensationsreaktion bei an niedrige Temperaturen akklimatisierten Pflanzen führt zu einer deutlichen Verminderung von UV-B_{ef}. In Abbildung 3.13 wird die Fähigkeit der Versuchs pflanzen gezeigt, sich bei verschiedenen Temperaturen an unterschiedliche UV-B-Einstrahlung durch Absenkung des UV-B_{ef} anzupassen. Der experimentelle Vergleich der Wildtypen mit den Deletionsmutanten soll deutlich machen, welche Polyphenole hierbei von Bedeutung sind. Zur einfacheren Beurteilung der Wirksamkeit der epidermalen UV-B-Abschirmung ist in jedem Diagramm zusätzlich das UV-B_{ef} eingetragen, welches abhängig vom eingestrahlten UV-B (UV-B_{ir}) bei einer epider malen UV-B-Transmission von 100 % entstünde.

Wie die UV-B-induzierte Schädigung von PS II, so unterschied sich auch die UV-Abschirmung zwischen den Pflanzentypen nach 14 Tagen deutlich. Innerhalb eines Pflanzentyps verlief die Anpassungsreaktion allerdings in der Regel sehr einheitlich. Die niedrigsten UV-B_{ef}-Werte konnten bei den untersuchten Wildtypen von _A. thaliana_ festgestellt werden. Während der Kultivierung des _COL_-Wildtyps bei 21 °C stieg das UV-B_{ef} trotz der bis auf 0,5 W m⁻² ansteigenden UV-B-Bestrahlungsstärke nur bis auf einen gemittelten Maximalwert von etwa 0,03 W m⁻² an. Dieser Maximalwert für das UV-B_{ef} wurde bereits in Blättern von Pflanzen erreicht, die mit einer UV-Bestrahlungsstärke von nur 0,12 W m⁻² behandelt wurden. Bei 9 °C stieg das maximale UV-B_{ef} in den Wildtyp-Pflanzen hingegen nur bis auf einen gemittelten Wert von 0,02 W m⁻² an und blieb dann unabhängig von einer weiteren Erhöhung des eingestrahlten UV-B auf diesem Niveau.

Der _LER_-Wildtyp zeigte einen ähnlichen Verlauf des effektiven UV-B. Allerdings wurden bei 21 °C in diesen Pflanzen insgesamt etwas höhere maximale UV-B_{ef}-Werte von etwa 0,04 W m⁻² gemessen. Bei 9 °C lagen diese Werte jedoch ebenfalls bei 0,02 W m⁻². Bei sehr hohen UV-B-Einstrahlungen war dieser Ökotyp jedoch nicht mehr in der Lage, durch eine Erhöhung der Abschirmung UV-B_{ef} auf einem niedrigen Niveau zu halten. Ab einer Bestrahlungssstärke von 0,4 W m⁻² nahm das UV-B_{ef} wieder deutlich zu und erreichte im Maximum beinahe 0,1 W m⁻².

Unter den Deletionsmutanten zeigte lediglich die _tt7_ -Mutante eine den Wildtypen vergleichbare Anpassung des UV-B_{ef} an verschieden hohe UV-B-Bestrahlungsstärken. Auch eine kühleabhängige Absenkung des UV-B_{ef} war bei dieser Mutante zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigen die anderen drei Deletionsmutanten keine derartige Absenkung des UV-B_{ef}. Die _fah1_-Mutante zeigte sowohl bei 9 °C wie auch bei 21 °C mit zunehmenden UV-B_{ir} einen kontinuierlichen Anstieg von UV-B_{ef}. Bei 21 °C stieg mit der maximal eingestrahlten UV-B-Intensität das UV-B_{ef} bis auf etwa 0,17 W m⁻² an. Damit war unter diesen Bedingungen bei der _fah1_-Mutante das UV-B_{ef} etwa fünfmal so hoch wie beim _COL_-Wildtyp. Bei 9 °C betrug das maximale UV-B_{ef} bei einer UV-B-Einstrahlung von 0,4 W m⁻² etwa 0,12 W m⁻² und war damit sogar um das sechsfache größer als das UV-B_{ef}, welches sich im _COL_-Wildtyp eingestellt hatte.
Abbildung 3.13.: Langfristige Anpassung des UV-B$_{ef}$ durch Abschirmung in Blättern der Wildtypen Columbia (COL) und Landsberg erecta (LER) sowie der Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 und fah1 von A. thaliana nach Kultivierung bei 9°C (schwarze Dreiecke) und 21°C (weiße Kreise) im UV-B-Gradienten. Die berechneten Funktionsverläufe der Regressions (durchgezogene Linien) und zugehörige ±CI95% (gestrichelte Linien) sind eingetragen. 

n = 3, ±SEM. Zugehörige epidermale UV-B-Transmissionen sind auf Seite 148 in Abbildung A.3 dargestellt.
Einen dem der *fahl1*-Mutante sehr ähnlichen Verlauf des UV-B<sub>ef</sub> zeigte die nicht zur Flavonolsynthese befähigte *tt5*-Mutante. Jedoch war in ihrem Fall keine durch Kühle induzierbare Absenkung von UV-B<sub>ef</sub> zu beobachten. Während die Blattepidermen der *fahl1*- und der *tt5*-Mutanten jeweils noch eingeschränkt zur Absenkung von UV-B<sub>ef</sub> in der Lage waren, war an den Epidermen der vollständig Flavonoid-freien *tt4*-Mutanten nahezu keine epidermale UV-B-Abschirmung mehr zu detektieren. Auch keine von der Temperatur abhängige Veränderung der epidermalen UV-Abschirmung war hier nachzuweisen.

Um die Abhängigkeit der effektiven UV-B-Strahlung von UV-B<sub>ir</sub> besser beurteilen zu können, wurde für jeden Datensatz eine Regressionsanalyse durchgeführt. In Abbildung 3.13 ist für jeden Datensatz das ihn am besten beschreibende Funktionsmodell der Regressionsanalyse eingetragen (schwarze durchgezogene Linien). Zusätzlich sind die 95%igen Vertrauensbereich (CI 95%) der Regressionsfunktionen eingezeichnet (schwarze gestrichelte Linien). Für die meisten Datensätzen der verschiedenen Versuchsgruppen werden die Abhängigkeiten von UV-B<sub>ef</sub> zu UV-B<sub>ir</sub> am besten durch Hyperbelfunktionen beschrieben. Die jeweils angegebenen, sehr engen Vertrauensbereiche deuten für diese Versuchsgruppen auf signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Temperatur-Behandlungsgruppen eines Genotyps hin. Nur die Datensätze der bei Kühle behandelten *tt4*- und *tt5*-Versuchspflanzen unterscheiden sich hiervon deutlich. Zum einen wird die Lage ihrer Datenpunkte nicht mehr am besten durch Hyperbelfunktionen sondern durch lineare Funktionsmodelle beschrieben. Zum anderen sind die Vertrauensbereiche (CI 95%) dieser linearen Funktionsmodelle so groß, dass zwischen den jeweiligen Temperaturgruppen dieser beiden Pflanzengruppen keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden können.

### 3.3.3. Spektrale Auflösung der epidermalen UV-Transmission

3. Ergebnisse

terschiedliche UV-Wellenlängenbereiche abdecken. Deshalb wurden die bereits genannten Deletionsmutanten auf Unterschiede in ihrer epidermalen UV-Abschirrmung zwischen 300 nm und 400 nm untersucht. Hierzu wurden die Versuchspflanzen bei 9°C und 21°C sowie einer UV-B-Bestrahlungsstärke von 0 W m⁻², 0,1 W m⁻² und 0,2 W m⁻² angezo- gen. Anschließend wurden Chlorophyllanregungsspektren der Blätter aufgezeichnet, um UV-Transmissionsspektren berechnen zu können.


Die spektralen Verläufe der UV-Transmission für die Wildtypen COL und LER zeigen große Ähnlichkeiten. Bei Kultivierung ohne UV-B-Einstrahlung stellte sich in ihren Blättern zwischen 400 nm und etwa 380 nm eine gleichbleibende UV-Transmission von rund 0,8 ein. Von 380 nm nach 340 nm sank die Transmission bei COL bis auf einen Wert von etwa 0,4 bzw. bei LER auf 0,5 ab und blieb dann bis 300 nm nahezu konstant. Bei einer UV-Einstrahlung von 0,1 W m⁻² sanken die UV-Transmissionen von 380 nm nach 340 nm in beiden Fällen von etwa 0,8 auf Werte von 0,2, blieben dann aber bis 300 nm nahezu unverändert. Bei Blättern, welche einer Bestrahlungsstärke von 0,2 W m⁻² ausgesetzt waren, zeigte sich ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf, jedoch nahm die UV-Durchlässigkeit unterhalb von etwa 380 nm nochmals um einen Wert von ca. 0,05 ab.

Die Transmissionsspektren der n5- und n7-Mutanten zeigen dem LER-Wildtyp entsprechenende Verläufe. Auch bei diesen nahm die UV-Transmission zwischen 380 nm und 340 nm jeweils von etwa 0,8 auf einen deutlich geringeren Wert ab, blieb dann jedoch bis 300 nm konstant. Zudem wurde auch bei diesen Mutanten durch die Erhöhung der UV-Einstrahlung während der Kultivierung eine zusätzliche Erniedrigung der UV-Transmissionen zwischen 360 nm und 300 nm induziert.

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen UV-Transmissionsspektren treten in den Spektren der auf identische Weise kultivierten fahl- und tt4-Deletionsmutanten deutliche Unterschiede auf. In Blättern der fahl-Mutante stieg bei 0 W m⁻² UV-Einstrahlung die UV-Transmission zwischen 380 nm und 360 nm von 0,8 auf etwa 1 an, blieb dann bis etwa 310 nm konstant und fiel anschließend wieder auf etwa 0,8 zurück. Bei 0,1 W m⁻² und
Abbildung 3.14.: Spektrale UV-Transmission in Blättern der Wildtypen Columbia (COL) und Landsberg erecta (LER) sowie der Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 und fah1 von Arabidopsis thaliana nach Kultivierung bei 21 °C und einer UV-B-Bestrahlungsstärke von 0 W m⁻² (gestrichelte Linie / weißes Symbol), 0,1 W m⁻² (dünn durchgezogene Linie / graues Symbol) und 0,2 W m⁻² (dick durchgezogene Linie / schwarzes Symbol). An denselben Blättern wurden ebenfalls UV-Transmissionsmessungen mit der Xenon-PAM-Methode durchgeführt. Diese Ergebnisse sind durch die eingefügten Symbole bei 314 nm und 365 nm dargestellt. n ≥ 3, ±SEM.
3. Ergebnisse

0,2 W m\(^{-2}\) UV-B\(_{ir}\) nahm die UV-Transmission zwischen 380 nm und 340 nm von 0,8 auf 0,65 ab. Unterhalb von 310 nm sank sie erneut bis auf 0,6. Die \textit{tt}4-Mutante zeigte ähnliche Kurvenverläufe. In ihrem Fall entsprachen sich die beiden UV-Transmissionsspektren der Blätter, die bei 0 W m\(^{-2}\) und 0,1 W m\(^{-2}\) gewachsen waren, einander. Zwischen 400 nm und 300 nm blieben sie konstant bei etwa 0,8. In Blättern, die bei einer Einstrahlung von 0,2 W m\(^{-2}\) gewachsen waren, lag die Transmission zwischen 400 und 320 nm etwas über 0,8. Unterhalb davon, bis zu einer Wellenlänge von 300 nm, sank sie lediglich bis auf etwa 0,6 ab.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass bei 21°C und parallel erfolgender UV-Bestrahlung die Durchlässigkeit von Blattepidermen für UV besonders unterhalb von 370 nm, also im kurzwelligen UV-A- und UV-B-Wellenlängenbereich, stark abnimmt. Bei der \textit{fahl}-Mutante ist diese Fähigkeit zur UV-Transmissionserniedrigung stark eingeschränkt und die \textit{tt}4-Mutante ist überhaupt nicht in der Lage, einen wirksamen Schutz vor UV-Strahlung durch Abschirmung aufzubauen.

In Abbildung 3.15 sind die UV-Transmissionsspektren der Pflanzentypen dargestellt, welche bei 9°C kultiviert wurden. Auch in diesem Fall wurden sie jeweils bei 0 W m\(^{-2}\), 0,1 W m\(^{-2}\) und 0,2 W m\(^{-2}\) UV-B\(_{ir}\) angezogen. Wie bei 21 °C zeigten die Versuchs pflanzen auch bei 9°C durch die Verminderung der epidermalen UV-Durchlässigkeit eine deutliche Reaktion auf erhöhte UV-Einstrahlungen. Lediglich bei der \textit{tt}5-Mutante konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Die Transmissionsspektren der beiden Wildtypen sowie der \textit{tt}7-Mutante zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Bei einer UV-B-Bestrahlungsstärke von 0 W m\(^{-2}\) während der Anzuchtsphase fielen die UV-Transmissionen zwischen 400 nm und 340 nm von etwa 0,8 auf etwa 0,2 und stiegen dann bis 300 nm wieder etwas auf etwa 0,3 an. Bei 0,1 bzw. 0,2 W m\(^{-2}\) UV-B\(_{ir}\) sanken die Transmissionen zwischen 400 nm und 360 nm von etwa 0,6 bis auf unter 0,1 und blieben dann bis 300 nm beinahe konstant auf diesem Niveau. Es zeigte sich also, dass durch die UV-B-Behandlungen bei 9 °C in diesen Pflanzen nicht nur die epidermale Durchlässigkeit für UV-Strahlung, sondern zusätzlich auch die für kurzwelliges, sichtbares Licht zwischen 400 und 380 nm herabgesetzt wurde.

Die \textit{fahl}-Mutante reagierte bei 9 °C ähnlich auf UV-B wie die bereits besprochenen Pflanzentypen. Auch in diesen Blättern nahm mit zunehmender UV-B-Belastung die epidermale UV-Abschirmung im gesamten untersuchten spektralen Bereich zu. Die Spektren verlaufen jedoch insgesamt deutlich flacher. So wurden bei der höchsten UV-B-Bestrahlungsstärke lediglich Transmissionswerte von 0,2 erreicht. Allerdings reagierte die \textit{fahl}-Mutante auf UV-B-Strahlung ebenfalls mit einer erhöhten Abschirmung sichtbaren Strahlung.
3.3. UV-B-Aklimatisation durch Polyphenole

Abbildung 3.15.: Spektrale UV-Transmission in Blättern der Wildtypen Columbia (COL) und Landsberg erecta (LER) sowie der Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 und fah1 von A. thaliana nach Kultivierung bei 9°C und einer UV-B-Bestrahlung von 0 W m⁻² (gestrichelte Linie/weißes Symbol), 0,1 W m⁻² (dünn durchgezogene Linie/graues Symbol) und 0,2 W m⁻² (dick durchgezogene Linie/schwarzes Symbol). Da für die tt4-Mutante eine UV-B-Bestrahlungsstärke von 0,2 W m⁻² letal war, gibt es für diese Behandlung keine Daten. An denselben Blättern wurden ebenfalls UV-Transmissionsmessungen mit der Xenon-PAM-Methode durchgeführt. Diese Ergebnisse sind durch die bei 314 nm und 365 nm eingefügten Symbole dargestellt. n ≥ 3, ± SEM.
Besonders deutlich verschieden von den restlichen Transmissionsspektren sind die Spektren der tt4- und der tt5-Mutante. Im Gegensatz zu den anderen Pflanzen entwickelte sich beispielsweise bei der tt4-Mutante ohne UV-B-Bestrahlung überhaupt keine epidermale UV-Abschirmung. Die Durchlässigkeit für Strahlung zwischen 400 nm und 300 nm lag hier konstant bei etwa 1. Eine geringe UV-B-Belastung von 0,1 W m⁻² induzierte zumindest zwischen 350 nm und 300 nm eine Abnahme der UV-Transmission bis auf 0,6. Oberhalb von 350 nm blieb die Epidermis jedoch vollständig UV-transparent. Eine UV-B-Belastung von 0,2 W m⁻² führte in den zu untersuchenden Blättern zu derartig großen Schäden, dass keine Aufnahmen von Anregungsspektren möglich waren. Aus diesem Grund fehlt in Abbildung 3.15 ein solches Transmissionsspektrum.

Ähnlich wie die tt4-Mutante zeigte auch die tt5-Mutante eine stark verminderte Fähigkeit zum Aufbau eines epidermalen UV-Schutzschirms. Nach Kultivierung ohne UV-B-Strahlung zeigten die Blattepidermen zwischen 400 nm und 380 nm eine gleichbleibende Strahlungstransmission von knapp über 0,8. Unterhalb von 380 nm bis 340 nm verringerte sich die Durchlässigkeit bis auf 0,4 und blieb dann bis 300 nm konstant. Stieg die UV-B-Belastung in der Kultur auf 0,1 W m⁻² bzw. 0,2 W m⁻² an, so veränderten sich die Transmissionseigenschaften der Blätter kaum. Diese Blätter konnten bei 9 °C nicht mehr durch ein Absenken der epidermalen UV-Transmissionen auf steigende UV-Belastungen reagieren.


3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

3.3.4. UV-absorbierende Polyphenole in Blättern von A. thaliana


Qualitative Bestimmung polyphenolischer Komponenten in A. thaliana


<table>
<thead>
<tr>
<th>Signal</th>
<th>( t_R ) [min]</th>
<th>( m/z )</th>
<th>polyphenol. Substanz</th>
<th>Restgruppen</th>
<th>Auftreten in COL</th>
<th>LER</th>
<th>fah1</th>
<th>tt4</th>
<th>tt5</th>
<th>tt7</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>13,3</td>
<td>385</td>
<td>223</td>
<td>Sinapoyl Glukose (162)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>A</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>15,7</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>HCA</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>16,5</td>
<td>755</td>
<td>609</td>
<td>Quercetin 2×Rhamnose (146), Glukose (162)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>17,4</td>
<td>739</td>
<td>593</td>
<td>Kämpferol 2×Rhamnose (146), Glukose (162)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>19,6</td>
<td>339</td>
<td>223</td>
<td>Sinapoyl Malat (116)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>22,0</td>
<td>609</td>
<td>447</td>
<td>Quercetin Glukose (162), Rhamnose (146)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>24,5</td>
<td>591</td>
<td>−</td>
<td>HCA</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>25,1</td>
<td>755</td>
<td>609</td>
<td>Kämpferol Rhamnose (146), 2×Glukose (162)</td>
<td>−</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>9</td>
<td>28,2</td>
<td>593</td>
<td>447</td>
<td>Kämpferol Glukose (162), Rhamnose (146)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td>29,5</td>
<td>593</td>
<td>447</td>
<td>Quercetin 2×Rhamnose (146)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>11</td>
<td>35,2</td>
<td>577</td>
<td>431</td>
<td>Kämpferol 2×Rhamnose (146)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
<tr>
<td>12</td>
<td>38,1</td>
<td>271</td>
<td>−</td>
<td>Naringenin</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
<td>−</td>
</tr>
</tbody>
</table>

\( MS^1 \): Vollständiges Molekül
\( MS^2 \): Nach 1. Fragmentierung
\( MS^3 \): Nach 2. Fragmentierung

A: \( m/z \): \( MS^1 [M-H]^− = 355, MS^2 [M-H]^− = 193 \), nicht näher bestimmmbares Feruloylglucosid
B: \( m/z \): \( MS^1 [M-H]^− = 309, MS^2 [M-H]^− = 193 \), vermutlich Feruloylmalat
C: Unbekannte Hydroxyzimtsäure, nach UV/VIS-DAD aber eindeutiges HCA-Spektrum
Bei Signal 1 mit einer Retentionszeit von etwa 13,3 min (Tabelle 3.1) handelt es sich nach der Masse-Ladungs-Zahl von m/z = 223 um ein Sinapoylmolekül, welches mit einer unbekannten Hexose verbunden ist. Bei den Retentionzeiten von etwa 15,7 und 16,7 min erscheinen zwei sehr eng beieinander liegende Signale, welche in einigen Proben mittels Chromatografie nur sehr schlecht voneinander getrennt werden können. Für Signal 2 konnte keine charakteristische Masse-Ladungszahl ermittelt werden. Jedoch weist das vom UV/VIS-DAD ausgebene Spektrum für dieses Signal eindeutig auf eine Hydroxyzimtsäure hin. Das dritte Signal wird durch ein Quercetinderivat hervorgerufen. Das Quercetin, mit der üblichen Masse-Ladung von m/z = 301 ist in diesem Fall mit einem Glukose- sowie zwei Rhamnosemolekülen verestert. Ebenfalls mit einem Glukose- und zwei Rhamnosemolekülen verestert liegt das bei einer mittleren Retentionszeit von 17,4 min detektierte Kämpferol (m/z = 284) vor. Bei Signal 5, mit einer Retentionszeit von etwa 19,6 min, handelt es sich bei allen Versuchspflanzen, ungeachtet der jeweiligen Kultivierungsbedingungen, um das prägnanteste Signal. Die Masse-Ladungszahl von m/z = 223 weist wiederum auf ein Sinapoylderivat hin, welches in diesem Fall jedoch mit einem Malatrest glykosidisch verbunden ist. Bei Signal 6, mit einer Retentionszeit von 22,0 min, handelt es sich der Masse-Ladungs-Zahl nach (m/z = 301) um ein mit Rhamnose und Glukose verestertes Derivat des Quercetins.

3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


Etwas überraschend waren die HPLC-Ergebnisse für die tt4-Mutante. Pflanzen dieses Typs sind aufgrund des Fehlens einer funktionellen Chalcon synthase nicht zur Synthese von Chalcon, der Ausgangssubstanz aller Flavonoide befähigt. Von diesem Gendefekt schien jedoch nicht ausschließlich die Synthese der Flavonoide betroffen zu sein, sondern ebenfalls die Synthese der Sinapoylderivate (Signal 1 und 5) und der für Signal 2 verantwortlichen Hydroxyzimtsäure. Während diese Hydroxyzimtsäure in den Pflanzen nicht mehr nachgewiesen wurde, waren von den Sinapinsäurederivaten lediglich Vorstufen, d.h. mit Zuckern veresterte Feruloylverbindungen zu bestimmen (Tabelle 3.1).

**Quantitative Gehalte der Polyphenole in Blättern**

3. Ergebnisse


Anhand der Wildtypen wird deutlich, dass die Synthese dieser drei Phenolgruppen unterschiedlich von den Umweltfaktoren UV-B-Strahlung und Temperatur beeinflusst wird. Während die Gesamtheit der Hydroxyzimtsäuren bei 21 °C in beiden Wildtypen stark in Abhängigkeit zur eingestrahlten UV-B-Intensität synthetisiert wurde, wurden von den Flavonolen bei dieser Temperatur lediglich im COL-Wildtyp mäßig stark Kämpferolderivate gebildet (Abbildung 3.17). Bei 9 °C hingegen wurden sowohl Hydroxyzimtsäuren als auch Kämpferolderivate sehr stark in Abhängigkeit zur UV-B-Strahlung synthetisiert (Abbildung 3.18). Jedoch waren die Mengen beider Substanzgruppen in Blättern nur bis zu einer eingestrahlten UV-B-Intensität von etwa 0,1 W m⁻² steigerbar. Die Synthese von Quercetinderivaten wurde dagegen bei 9 °C mit zunehmender UV-B-Bestrahlung bis 0,5 W m⁻² in der Kultur kontinuierlich erhöht. Insgesamt wurden vom Quercetin aber nur etwa 20 % der Mengen gebildet, wie es für Hydroxyzimtsäuren und Kämpferolderivate der Fall war.


3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

Abbildung 3.17.: Polyphenolgehalte in Blättern der Wildtypen *Columbia* (COL) und *Landsberg erecta* (LER) sowie der Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 und fah1 von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 21 °C im UV-B-Gradienten. Gezeigt sind die Blattgehalte für Kämpferolderivate (Kreise), Quercetinderivate (Quadrate) und der Gesamtgehalt an Hydroxyzimtsäuren (Sinapoylderivate und Feruloylderivate, Dreiecke). In der fah1-Mutante wurden ausschließlich Ferulatverbindungen nachgewiesen. n = 6, ± CI 95%.
Abbildung 3.18.: Polyphenolgehalte in Blättern der Wildtypen Columbia (COL) und Landsberg erecta (LER) sowie der Deletionsmutanten tt4, tt5, tt7 und fah1 von A. thaliana nach Kultivierung bei 9 °C im UV-B-Gradienten. Gezeigt sind die Blattgehalte für Kämpferolderivate (Kreise), Quercetinderivate (Quadrate) und der Gesamtgehalt an Hydroxyzimtsäuren (Sinapoyl- und Feruloylderivate, Dreiecke). In der fah1-Mutante wurden ausschließlich Ferulatverbindungen nachgewiesen. n = 6, ± CI95%.
3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


UV-abschirmender Effekt durch Polyphenole


3. Ergebnisse


3.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

Abbildung 3.20.: Die epidermalen Absorptionsspektren wurden an Blattoberseiten bestimmt (schwarze Linien). Die untersuchten Blätter entwickelten sich bei 9°C ohne zusätzliche UV-B-Einstrahlung. Ebenfalls eingetragen sind Extinktionsspektren (rote Linien), welche sich für die in den Blättern enthaltenen Polyphenole in wässrigen Methanolösungen (50%; v/v) ergeben würden. Die Extinktionsspektren wurden auf Grundlage der in Abbildung 1.6 gezeigten molaren Extinktionskoeffizienten sowie aus den Resultaten der quantitativen Polyphenolbestimmung (Abbildung 3.18) berechnet und beziehen sich jeweils auf eine Blattfläche von 1 cm². S: Extinktion durch Sinapoylglykoside, K: Extinktion durch Kämpferolglykoside, n ≥ 3, ±SEM.

Hierbei zeigt sich, dass bei 21 °C mit zunehmender UV-B-Einstrahlung von 0,0 W m⁻² bis 0,4 W m⁻² UV-B, die epidermale Absorption von UV-A und UV-B zwar kontinuierlich, jedoch langsam gesteigert wurde. Während sich die epidermale UV-A-Absorption von 0,1 auf nur etwa 0,45 erhöhte, nahm die UV-B-Absorption von einem anfänglichen Wert von ungefähr 0,5 auf knapp über 1,0 zu. Bei 9 °C jedoch, reagierten die Versuchs pflanzen bereits ohne eingestrahlte UV-B-Strahlung mit einer deutlichen Steigerung der epidermalen Abschirmung und erreichten Absorptionswerte von etwa 0,4 für UV-A und 0,95 für UV-B. Zusätzlich eingestrahltes UV-B ließ die Absorptionen zügig auf Werte von über 0,8 für UV-A und 1,2 für UV-B ansteigen, bei maximaler UV-B-Einstrahlung wurden sogar Werte von 1,0 und 1,5 erreicht.

Ebenfalls wird deutlich, wie abhängig die UV-Gesamtabsorptionen der Blattextrakte von der Kultivierungstemperatur der Pflanzen ist. So bewirkte allein die Absenkung dieser Temperatur auf 9 °C, dass die UV-Absorptionen der Extrakte von solch kultivierten Pflan zen erheblich gesteigert wurde. So erreichten Extrakte von Blättern, die zuvor ohne UV B-Bestrahlung jedoch bei 9°C gewachsen waren, UV-Absorptionen, welche von Extrak ten, die aus bei 21°C gewachsenen Blättern stammten, nur erreicht wurden, wenn die Blätter zuvor einer zusätzlichen UV-B-Belastung von 0,4 W m⁻² ausgesetzt waren. Die Kombination von Kühle und UV-B-Bestrahlung steigerte die Gesamt-UV-Absorption sogar um weitere 60 bis 100 %. Nach den in Abbildung 3.21 dargestellten Daten ist diese
gesteigerte UV-Absorption bei Kühle auf eine verstärkte UV-Absorption durch Flavonole zurückzuführen. Während die durch Hydroxyzimtsäuren verursachten absoluten UV-A- und UV-B-Absorptionswerte für beide Temperaturen nahezu identisch waren, stiegen die auf Flavonole zurückzuführenden Absorptionen bei Kühle um das fünffache an.

4. Diskussion

4.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle

4.1.1. Niedrige Temperatur verstärkt UV-B-induzierte Schäden am PS II

In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, welche Funktion die durch Kühle induzierbare Verstärkung der epidermalen UV-B-Abschirmung in Pflanzen haben kann. Der Nachweis einer bei niedriger Temperatur gesteigerten UV-B-Empfindlichkeit von Pflanzen würde die Hypothese stützen, dass es sich bei der verstärkten UV-B-Abschirmung um eine notwendige Akklimatisationsreaktion an kühlebedingt gesteigerten UV-B-Stress handelt. Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob die Pflanzen-schädigende Wirkung von UV-B bei niedriger Temperatur ansteigt.


**Abbildung 4.1.:** Von der Wellenlänge des Anregungslichts abhängige relative Quantenausbeute der Photosynthese. Die Quantenausbeute der Photosynthese ($\phi_\lambda$, gestrichelte Linie) eines Blattes (*Brassica oleracea* L.) ohne Epidermis ist stark abhängig von der Wellenlänge der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR). Im Vergleich zu sichtbarer Strahlung beträgt die Quantenausbeute im Spektralbereich der UV-Strahlung nur 0 bis 50 %. Die Abbildung wurde nach Daten von MCCREE (1981) erstellt. Zusätzlich eingetragen ist die im diskutierten Experiment bei 9 °C maximal verwendete UV-B-Bestrahlungsstärke (durchgezogene, violette Linie). Das maximal eingestrahlte UV entsprach einer Bestrahlungsstärke von 6 µmol m⁻² s⁻¹.
4.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle


4.1.2. Schädigung und Reparatur bestimmen Maß der Photoinhibition


4.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle

4.1.3. Kultivierung bei Kühle bewirkt hohe UV-B-Resistenz


Dessen ungeachtet, führt eine Kultivierung bei Kühle in Pflanzen jedoch auch zu einer höheren Toleranz gegenüber UV-B-Strahlung. Bereits in Abbildung 3.3 wurde gezeigt, dass mit gleicher effektiverer UV-B-Bestrahlungsstärke behandelte Pflanzen sich etwas schneller


Es stellt sich die Frage, ob an Kühle akklimatisierte Pflanzen mittels ihrer verbesserten UV-B-Toleranz und verstärkten epidermalen Abschirmung in der Lage sind, die bei niedriger Temperatur grundsätzlich verlangsamte Reparatur von UV-B-geschädigten PS II-Zentren kompensieren zu können. Ein Vergleich zeigt (Abbildung A.2 im Anhang) dass die UV-B-Resistenz zwischen Arabidopsis-Pflanzen aus unterschiedlicher Anzuchttemperatur kaum variiert, wenn diese bei ihrer jeweiligen Anzuchttemperatur mit UV-B relativ geringer Bestrahlungsstärke (bis 0,2 W m^{-2}) behandelt werden. Bei höheren UV-B-Bestrahlungsstärken zeigen die an Kühle akklimatisierten und UV-B-behandelten Pflanzen sogar deutlich weniger UV-B-bedingte Schäden als die Pflanzen, die bei moderateren Temperaturen mit UV-B bestrahlt wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass unter Laborbedingungen Pflanzen der Art A. thaliana durch eine verbesserte epidermale UV-B-Abschirmung und eine effizientere Reparatur von UV-B-bedingten Schäden mehr als nur zu einer Kompensation des durch Kühle gesteigerten UV-B-Stresses

4.1.4. UV-B<sub>ef</sub> - Die effektive UV-B-Strahlung

Zur Bearbeitung der in diesem Abschnitt zentralen Fragestellung wurde die in einer Pflanze jeweils wirksame UV-B-Strahlung aus epidermaler UV-B-Transmission (T(UV-B)) und eingestrahlter UV-B-Bestrahlungsstärke (UV-B<sub>ir</sub>) berechnet und als die effektive UV-B-Strahlung (UV-B<sub>ef</sub>) definiert. War diese Vorgehensweise sinnvoll und mit der verwendeten Methode überhaupt technisch durchführbar?

Basis dieser Herangehensweise war die Tatsache, dass Schädigungen durch Umwelteinflüsse in Pflanzen nur auftreten können, wenn diese Umwelteinflüsse potenzielle Schädigungsorte in Pflanzen auch tatsächlich erreichen. So ist z.B. bei Hitzestress nicht die Temperatur des eine Pflanze umgebenden Luftkörpers für die Höhe der Schädigung entscheidend, sondern die Blatttemperatur, da diese abhängig von Einstrahlung, Konvektion, Transpiration, Blattgröße und -form um einige Grad Celsius von der Lufttemperatur abweichen kann (Gates 1980, von Willert et al. 1995). In allen bisherigen Untersuchungen zu UV-Effekten an Pflanzen wurde jedoch niemals zwischen der eingestrahlten UV-B-Strahlung und der am möglichen Schädigungsort wirklich eintreffenden UV-B-Strahlung unterschieden. Deshalb konnte bisher auch nicht zwischen positiven Effekten reiner zellulärer UV-Toleranz und denen der UV-Vermeidung bzw. der UV-Abschirmung unterschieden werden. Die Ergebnisse in Abbildung 3.1.A und 3.1.B zeigen, dass nicht allein die Bestrahlungsstärke des eingestrahlten UV-B (UV-B<sub>ir</sub>) für die Schädigung von PS II entscheidend ist, sondern auch die Höhe der epidermalen UV-B-Transmission. Letztendlich bestimmt diese Größe, welcher Anteil der eingestrahlten Strahlung z.B. im PS II wirksam und schädigend werden kann. Die effektive UV-B-Strahlung (UV-B<sub>ef</sub>) ermöglicht also, da um die UV-Abschirmung korrigiert, eine bessere Beurteilung der UV-B-Toleranz einer Pflanze und wird daher in dieser Arbeit angewendet.

Die Auftragung des UV-B-induzierten Schadens von PS II gegen UV-B<sub>ef</sub> als unabhängige Messgröße ermöglicht die Zusammenfassung von Abbildung 3.1.A und 3.1.B zu
4. Diskussion

Abbildung 3.2. Aus den ehemals vier Datenreihen ergeben sich auf diese Weise zwei Schadenskurven mit temperaturbedingten Unterschieden in ihren Abhängigkeiten zu UV-B$_{ef}$. Innerhalb der jeweiligen Datensätze streuen die Datenpunkte nur sehr wenig um die berechneten Regressionskurven. Aus diesem Grund ergeben sich die hohen Korrelationskoeffizienten für beide Datenreihen, welche die Belastbarkeit der Interpretation des eingeführten UV-B$_{ef}$ aufzeigen.

Vorteilhaft bei der Verwendung von UV-B$_{ef}$ ist der Umstand, dass sowohl für die Bestimmung des vom UV-B verursachten Schadens, als auch für die Bestimmung der epidermalen UV-B-Abschirmung die von PS II emittierte Chlorophyllfluoreszenz genutzt wird. Der Sensor für beide Messgrößen ist somit jeweils an identischer Stelle im Blatt lokalisiert, weshalb eine relativ exakte Gegenüberstellung beider Messgrößen möglich ist. Die UV-B-Bestrahlungsstärken an anderen UV-B-empfindlichen Zellbestandteilen mögen von der am Chloroplasten eintreffenden UV-B-Strahlung abweichen. Trotzdem kann angenommen werden, dass das UV-B$_{ef}$ auch für diese Bestandteile der pflanzlichen Zelle die lokale UV-B-Belastung realistischer wiedergibt, als es mit UV-B$_{ir}$ möglich wäre.

4.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von *A. thaliana* durch Abschirmung

4.2.1. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation des *Columbia*-Ökotyps von *A. thaliana*

Bislang wurde hier ausschließlich der Einfluss der Temperatur auf den UV-B-Schutz von *A. thaliana* diskutiert. So wurde etwa gezeigt, dass niedrige Temperaturen während der Kultivierung allein - ohne zusätzliche Behandlung mit UV-B - bereits eine Erhöhung der UV-B-Resistenz in Pflanzen induzieren kann. Im Folgenden wird nun diskutiert, wie Umgebungstemperatur und UV-B zusammen auf die epidermale UV-B-Abschirmung einwirken und den UV-B-Akklimatisationsgrad von Pflanzen gemeinsam beeinflussen.

Die im Ergebnisteil 3.1 gezeigten Daten belegen das hohe Schadensrisiko, welches von UV-B-Strahlung für Pflanzen ausgeht. In Wildtyppflanzen von *A. thaliana* des *Columbia*-Ökotyps (*COL*) nimmt die Aktivität der PS II-Zentren um bis zu 40 % ab, wenn diese Pflanzen erstmalig für 2,5 h hohen UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt werden (Abbildung 3.1). Andererseits zeigen Pflanzen, die 14 Tage lang täglich für 2,5 h UV-B-Stress ausgesetzt waren, kaum UV-B-bedingte Schädigungen (Abbildung 3.5 und 3.12), auch wenn die maximale UV-B-Bestrahlungsstärke der Sonne um das zwei- bis dreifache über Schritten wurde (THIMIJAN et al. 1978). Das während der UV-B-Akklimatisation aufgebaute System aus effektiven UV-B-Schutz- und Reparaturmechanismen ermöglicht es Pflanzen, dauerhaft UV-B-Stress zu überstehen, ohne nachhaltige Schäden davonzutragen (JENKINS 2009b).

Wie bereits diskutiert, spielt die epidermale Abschirmung bei der UV-B-Akklimatisation von Pflanzen eine entscheidende Rolle. Durch sie wird die innerhalb der Pflanze wirksame UV-B-Strahlung (UV-B$_{ef}$) auf ein tolerierbares Maß herabgesetzt. Irreversible Schädigungen der Pflanze durch UV-B werden auf diese Weise vermieden. In *COL* wird die Intensität der UV-B-Abschirmung der einfallenden UV-B-Strahlung (UV-B$_{ir}$) entsprechend angepasst. Auf diese Weise erreichen auch Pflanzen, die sehr hohen UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt sind, dass das in ihnen wirksame UV-B$_{ef}$ auf sehr niedrigem Niveau bleibt (Abbildung 3.5). Doch der epidermale Abschirmungsgrad wird nicht allein durch die Bestrahlungsstärke von UV-B$_{ir}$ bestimmt. Wie in Abschnitt 4.1 besprochen, beeinflusst die Kultivierungstemperatur ebenfalls die Stärke der UV-Abschirmung. So induziert Kühle während der Anzucht neben UV-B eine erhebliche Verstärkung der Abschirmung und damit eine weitere Absenkung des UV-B$_{ef}$ um etwa 50 %. Nach Abschnitt 4.1 bewirkt diese zusätzliche Absenkung des UV-B$_{ef}$ eine Kompensation der bei Kühle verlangsamt stattfindenden Reparatur von UV-B-bedingten Schäden.
4. Diskussion


4.2.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von verschiedenen Akzessionen von A. thaliana

lichen Wuchsstandorts und der Ausprägung von UV-B-Schutzreaktionen in einem Ökotyp ist denkbar, da die UV-B-Belastung auf der Erde u.a. von der jeweiligen geografischen Breite abhängig ist. Während die durchschnittliche UV-B-Belastung in Richtung der Pole stetig abnimmt, steigt sie mit geringer werdendem Abstand zum Äquator deutlich an (Abschnitt 1.1). Akzessionen von *A. thaliana* mit Herkunftsorten unterschiedlicher geografischer Breite könnten sich daher im Laufe vieler Generationen an verschiedenen starke UV-B-Bestrahlungen adaptiert haben.

In Abbildung 4.2 ist die von der geografischen Breite eines Standorts abhängige tägliche UV-B-Strahlungsbelastung als Jahreslauf (siehe Abszisse) dargestellt. Für die nördliche Hemisphäre zwischen 0° und 70°N (siehe linke Ordinate) sind in dieser Darstellung Punkte mit gleicher Strahlungsbelastung ähnlich wie in einem Höhenlinienmodell durch Isolinien miteinander verbunden. Auf der rechten Ordinate sind die geografischen Breitengrade von Herkunftsorten fünf verschiedener *Arabidopsis*-Akzessionen eingetragen (*ORN*, *TRI*, *COL*, *SHA*, *CVI*), von denen im Vorfeld der Untersuchung angenommen wurde, dass sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft unter UV-B-Stressbedingungen unterschiedlich starke UV-B-Schutzreaktionen entwickeln würden.

Die Untersuchung ergab jedoch, dass sich unter UV-B-Stress in den fünf Akzessionen keine unterschiedlichen Ausprägungen von UV-B-Schutzreaktionen entwickelten. Wie bereits für den Ökotyp *COL* beschrieben, senkten auch alle anderen Akzessionen relativ einheitlich durch eine temperatur- und strahlungsabhängige Steigerung der UV-B-Abschirmung die interne Strahlungsbelastung (UV-B$_{ef}$) auf ein niedriges und jeweils tolerierbares Niveau. Auch aus den PS II-Schadensbestimmungen (Abbildung 3.8), welche nach der letzten UV-B-Behandlung der Pflanzen an Tag 14 durchgeführt worden waren, konnte zwischen diesen Akzessionen auf keine wesentlichen Unterschiede bezüglich ihrer UV-B-Resistenzgrade geschlossen werden. Ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit eines Ökotyps zur UV-B-Akklimatisation und der geografischen Position seines ursprünglichen Standorts konnte daher mit dieser Untersuchung nicht hergestellt werden.

Es stellt sich die Frage, weshalb mögliche Unterschiede in den UV-B-Belastungen an den natürlichen Wuchsstandorten in den verschiedenen Akzessionen nicht zu verschieden stark ausgeprägten UV-B-Resistenzen geführt haben. Eine Möglichkeit wäre, dass *A. thaliana* in verschiedenen Regionen der Erde sich zu unterschiedlichen Jahreszeiten entwickelt und auf diese Weise UV-B-intensive Zeiträume an Wuchsstandorten mit niedriger geografischer Breite meidet. Nach BÄSSLER et al. (1996) blüht *A. thaliana* in Mitteleuropa zwischen April und Mai. Die winterannuellen Akzessionen *TRI*, *COL* und *LER* wären daher bis zur Blüte einer täglichen UV-B-Bestrahlungsstärke von 500 bis 1500 J m$^{-2}$ d$^{-1}$ ausgesetzt (Abbildung 4.2). Wird für den nordeuropäischen und ebenfalls winterannuellen Ökotyp *ORN* eine etwa um 3 Wochen spätere Blühphase angenommen, so ergeben
4. Diskussion


sich für diesen Ökotyp tägliche UV-B-Belastungen, welche mit Werten zwischen 0 und 1000 \( \text{J m}^{-2} \text{d}^{-1} \) etwas unter denen der mitteleuropäischen Akzessionen liegen dürften.

Der aus Tadjikistan stammende Ökotyp SHA müsste dagegen deutlich höheren UV-B-Intensitäten ausgesetzt sein. Im Gegensatz zu den winteranuellen europäischen Akzessionen von \textit{A. thaliana}, keimt dieser Ökotyp im Juni und hat bereits gegen Ende Juli seinen Entwicklungszyklus vollständig abgeschlossen (Khumatov 1982). Die während dieser Zeit an diesem Standort herrschende tägliche UV-B-Bestrahlungsstärke beträgt etwa 3000 bis 3500 \( \text{J m}^{-2} \text{d}^{-1} \) (Madronich 1993). Ebenfalls sehr hohen UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt ist wahrscheinlich der Ökotyp CVI. In dessen Heimat auf den Capverdischen Inseln liegt das ganze Jahr über die UV-B-Bestrahlungsstärke oberhalb von 2000 \( \text{J m}^{-2} \text{d}^{-1} \). Ende Juli jedoch, der einzige Zeitpunkt im Jahr, an dem eine für die Pflanzenentwicklung ausreichende Niederschlagsmenge zur Verfügung steht, muss an Wuchsstandorten dieses Ökotyps mit einer täglichen UV-B-Belastung von 3500 bis 4500 \( \text{J m}^{-2} \text{d}^{-1} \) gerechnet werden.


Aufgrund dieser Ergebnisse muss also Abstand von der Hypothese genommen werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Resistenz eines Ökotyps gegenüber UV-B-Stress und seiner geografischen Herkunft besteht. Auch JANSEN et al. (2010) konnten für A. thaliana in einer ähnlich angelegten Studie eine nur schwache Abhängigkeit der UV-Resistenz eines Ökotyps von dessen Herkunft ableiten. Sie beschreiben sogar, dass unterschiedliche Akzessionen von A. thaliana, welche am selben Standort gesammelt wurden, höchst variabel auf UV-B-Stress reagieren können.

Diese Untersuchung verschiedener Akzessionen von A. thaliana hat leider keine eindeutigen Erkenntnisse zu einer möglichen herkunftsabhängigen Fähigkeit zur UV-B-Akklimatisation erbracht. Trotzdem war es wichtig die am Ökotyp COL gemachten

### 4.3. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


Jedoch wird die potenzielle UV-Abschirmfunktion von Flavonoiden auch in Frage gestellt. *Landry et al. (1995)* verglichen z.B. *fahI*- mit *tt5*-Mutanten von *A. tha-
4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


4.3.1. Polyphenole in A. thaliana

Identifikation UV-absorbierender Polyphenole in Blättern von A. thaliana


Für die vorliegende Arbeit konnte die massenspektrometrische Untersuchung für neun der elf detektierten, UV-absorbierenden Substanzen Aufschluss über deren molekulare Zusammensetzung geben (vgl. Abbildung 3.16 und Tabelle 3.1). Unter den neun qualitativ bestimmmbaren Substanzen waren vier verschiedene Kämpferol- (Signal 4, 8, 9 und 11), drei verschiedene Quercetin- (Signal 3, 6 und 10) sowie zwei verschiedene Sinapoylderivate (Signal 1 und 5). Die Zusammensetzung von zwei weiteren Substanzen
4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

Abbildung 4.4.: Anbindungsstellen der Substituenten von Flavonolen in *A. thaliana*. In *A. thaliana* werden Flavonole (rot) an Position 7 ( = R 3) mit einem einzelnen Rhamnosemolekül (schwarz) und an Position 3 ( = R 2) entweder ebenfalls mit einem einzelnen Rhamnosemolekül (schwarz) oder einem Di-Hexosid glykosidiert. Das Di-Hexosid ist über ein Glukosemolekül (blau) (3→1)-glykosidisch mit dem Flavonol verbunden. Zwischen dem Glukose- und einem weiteren Hexosemolekül (Rhamnose: R 4 = CH₃ oder Glukose: R 4 = CH₂OH) besteht eine (1→2)-glykosidische Bindung. Quercetin: R 1 = OH, Kämpferol: R 1 = H.

(Signal 2 und 7) konnte massenspektrometrisch nicht geklärt werden. Aufgrund der UV-Absorptionseigenschaften handelt es sich bei diesen beiden Substanzen jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit um Hydroxyzimtsäuren.

**Tabelle 4.1.:** Kritische Auflistung der in Blättern von *A. thaliana* vermuteten löslichen Polyphenole nach Abgleich der in Tabelle 3.1 aufgeführten Daten mit Ergebnissen anderer Autoren. Angegeben sind für jedes Signal die zugehörige Retentionszeit, die detektierten Einzelkomponenten sowie der Name der vermuteten Substanz. Zudem sind als Referenzen jeweils existierende Veröffentlichungen angegeben, in denen die vermutete Substanz für *A. thaliana* bereits beschrieben wurde.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Signal</th>
<th>t&lt;sub&gt;R&lt;/sub&gt; [min]</th>
<th>Einzelkomponenten</th>
<th>Vermutete Substanz (Referenz)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>13,3</td>
<td>Sinapoyl, Hexose</td>
<td>Sinapoylglukose (<em>LORENZEN</em> et al. 1996)</td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>15,7</td>
<td>HCA</td>
<td>5-Hydroxy-Feruloylglukose (<em>HOFFMANN-WÜLFING</em> 2007)</td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>16,5</td>
<td>Quercetin, 2 × Rhamnose, Glukose</td>
<td>Quercetin-3-O-Rhamnoglukosid-7-O-Rhamnosid (<em>GRAHAM</em> 1998, <em>JONES</em> et al. 2003)</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>17,4</td>
<td>Kämpferol, 2 × Rhamnose, Glukose</td>
<td>Kämpferol-3-O-Rhamnoglukosid-7-O-Rhamnosid (<em>GRAHAM</em> 1998, <em>JONES</em> et al. 2003)</td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>19,6</td>
<td>Sinapoyl, Malat</td>
<td>Sinapoylmalat (<em>LORENZEN</em> et al. 1996)</td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>22,0</td>
<td>Quercetin, Glukose, Rhamnose</td>
<td>Quercetin-3-O-Glukosid-7-O-Rhamnosid (<em>GRAHAM</em> 1998, <em>KERHOAS</em> et al. 2006)</td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>24,5</td>
<td>HCA</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>25,1</td>
<td>Kämpferol, Cumaroyl, 2 × Glukose</td>
<td>Kämpferol-3-O-di-Glukosid-7-O-Rhamnosid (<em>VEIT &amp; PAULI</em> 1999)</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td>29,5</td>
<td>Quercetin, 2 × Rhamnose</td>
<td>Quercetin-3-O-Rhamnosid-7-O-Rhamnosid (<em>GRAHAM</em> 1998, <em>KERHOAS</em> et al. 2006)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Einfluss der Umweltbedingungen auf die Gehalte von Polyphenolen

In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass die Umweltfaktoren UV-B und Kühle eine Verstärkung der epidermalen UV-B-Abschirmung von A. thaliana induzieren. Um beurteilen zu können, welche der massenspektrometrisch identifizierten Polyphenole für diese Verstärkung verantwortlich sein könnten, wurde der Einfluss der Umweltfaktoren UV-B und Kühle auf den jeweiligen Gehalt dieser Substanzen in den Blättern untersucht. Den Resultaten dieser quantitativen Gehaltsanalyse (Abbildungen 3.17 und 3.18) ist zu entnehmen, dass Polyphenole in spezifischer Abhängigkeit zur UV-B-Bestrahlungsstärke und Temperatur gebildet werden. So stiegen die Gehalte der Hydroxyzimtsäuren in Blättern des COL-Wildtyps temperaturunabhängig bei zunehmender UV-B-Bestrahlung von 250 µmol m⁻² auf etwa 700 µmol m⁻² an. Niedrige Temperatur während der Kultivierung bewirkte keine Erhöhung der Maximalmenge an Hydroxyzimtsäuren, jedoch wurde
4. Diskussion
diese bei 9 °C schon bei geringeren UV-B-Bestrahlungsstärken erreicht. Im Gegensatz
dazu beschreiben NEUSCHAEFER-RUBE et al. (2009) und REUBER et al. (1996b) keine
durch Kühle oder UV-B gesteigerte Akkumulation von Hydroxyzimtsäuren. Ihrem Pflanzenmaterial standen mit 25,2 und 31,1 mol m⁻² d⁻¹ jedoch 8- bis 10 mal höhere tägliche PAR-Bestrahlungsstärken zur Verfügung als den Versuchspflanzen des hier diskutierten Experiments. Da die Synthese von Hydroxyzimtsäuren von der PAR-Bestrahlungsstärke abhängig ist (KOLB et al. 2001), ist zu vermuten, dass die Synthesekapazitäten dieser Polyphenole bei solch hohen Lichtintensitäten bereits ihr Maximum erreichen und daher nicht durch UV-B und Kühle weiter zu steigern sind.

Im Vergleich zu der grundsätzlich durch UV-B steigerbaren Synthese der Hydroxyzimtsäuren, war die Akkumulation der Flavonole unter den gegebenen Lichtbedingungen nur bei niedriger Temperatur durch UV-B erheblich zu steigern (Abbildung 3.18). Zwar enthielten Blätter des COL-Wildtyps, die bei 21 °C und maximaler UV-B-Belastung gewachsen waren, etwa 190 µmol m⁻² Kämpferol, bei 9 °C gewachsene Blätter akkumulierten jedoch bei gleicher UV-B-Bestrahlung mit etwa 700 µmol m⁻² Kämpferol und 250 µmol m⁻² Quercetin erheblich mehr Flavonole. Auch OLSEN et al. (2008) und ALBERT et al. (2009) konnten eine solche, durch Kühle steigerbare, UV-B-abhängige Synthese von Flavonolen in Pflanzen beobachten.


Die Gegenüberstellung der Polyphenolgehalte lässt wesentliche Unterschiede zwischen den Klimakammer- und den Freiland-Pflanzen erkennen. Während die Hydroxyzimtsäuregehalte in Freiland-Pflanzen unverändert, je nach Bestrahlungsqualität aber auch bis zu 50 % geringer als in Klimakammer-Pflanzen waren, wurde die Synthese der Flavonole durch die natürlicheren Wachstumsbedingungen erheblich induziert. Etwa 10mal mehr Quercetin (2100 µmol m⁻² bis 2400 µmol m⁻²) und bis zu 3mal mehr Kämpferol (600 µmol m⁻² bis 2050 µmol m⁻²) wurde in den Blättern der aus dem Freiland stammenden Pflanzen detektiert.
4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

**Tabelle 4.2.** Kämpferol-, Quercetin- und Hydroxyzimtsäuregehalte in Blättern von *A. thaliana* und *Vitis vinifera*. Die Substanzmengen sind jeweils in μmol m⁻² mit Standardabweichungen angegeben. Der Hydroxyzimtsäuregehalt bezieht sich bei *A. thaliana* auf Sinapoyl- und Feruloylderivate und bei *V. vinifera* auf Kaffeoyl- und Cumaroxylderivate. WL: Künstliches Weißlicht (ca. 4 mol m⁻² d⁻¹ PPFD), + UV-B: Künstliches Weißlicht mit UV-B-Strahlung (ca. 4 mol m⁻² d⁻¹ PPFD + ca. 3,6 kJ m⁻² d⁻¹ UV-B), März: Sonnenlicht (ca. 16 mol m⁻² d⁻¹ PPFD + ca. 8 kJ m⁻² d⁻¹ UV-B), Mai: Sonnenlicht (ca. 33 mol m⁻² d⁻¹ PPFD + ca. 16 kJ m⁻² d⁻¹ UV-B), - UV: Sonnenlicht ohne UV-Strahlung (ca. 40 mol m⁻² d⁻¹ PPFD), SL: Sonnenlicht (ca. 40 mol m⁻² d⁻¹ PPFD + 0,9 mJ m⁻² d⁻¹ UV-A + 24 kJ m⁻² d⁻¹ UV-B).

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>21 °C</th>
<th>9 °C</th>
<th>21 °C</th>
<th>9 °C</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>WL</td>
<td>UV-B</td>
<td>WL</td>
<td>UV-B</td>
</tr>
<tr>
<td>HCA</td>
<td>201</td>
<td>696</td>
<td>436</td>
<td>728</td>
</tr>
<tr>
<td>±79</td>
<td>±45</td>
<td>±41</td>
<td>±84</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Kämpf.</td>
<td>9</td>
<td>185</td>
<td>290</td>
<td>725</td>
</tr>
<tr>
<td>±8</td>
<td>±29</td>
<td>±62</td>
<td>±86</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Querc.</td>
<td>0</td>
<td>7</td>
<td>0</td>
<td>247</td>
</tr>
<tr>
<td>±3</td>
<td>±45</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>


Zusammengefasst lassen die in dieser Arbeit vorgestellten Polyphenolgehalte darauf schließen, dass die Synthese von Hydroxyzimtsäuren in Blättern zwar in direkter Abhängigkeit zur eingestrahlten UV-B- und PAR-Bestrahlungsstärke geschieht, jedoch relativ frühzeitig von Pflanzen nicht mehr steigerbare Maximalmengen dieser Substanzen erreicht werden. Zudem werden in Blättern Hydroxyzimtsäuren auch dann gebildet, wenn

---

1 TISCHLER (2010)  2 KOLB et al. (2001)
nur wenig Strahlung auf Pflanzen einwirkt. Flavonole hingegen werden bei geringem Strahlungsstress kaum synthetisiert. Erst wenn die Lebensbedingungen für diese Pflanzen, wie im Freiland, aufgrund einer höheren Strahlungsbelastung oder einer niedrigeren Umgebungstemperatur anspruchsvoller werden, beginnen Blätter, Flavonole und insbesondere Quercetin in vollem Umfang zu akkumulieren. Da in Klimakammer-Kulturen sehr viel weniger Flavonole als in Freilandkulturen akkumuliert werden, sind auch die Intensitäten der durch diese Flavonole hervorgerufenen Effekte in diesen Pflanzen deutlich geringer als in Freiland-Pflanzen einzuschätzen. Der Einfluss von Flavonolen auf die epidermale UV-B-Abschirmung wird daher in dieser hier vorliegenden Untersuchung möglicherweise unter-, der von Hydroxyzimtsäuren hingegen etwas überschätzt dargestellt.

Quantitative Gehalte der Polyphenole in Mutanten

Neben den Akzessionen LER und COL wurden auch die erwähnten Polyphenol-Mangel-Mutanten in diese Untersuchung einbezogen. An ihnen sollte bestimmt werden, wie sich das Fehlen einer polyphenolischen Substanzgruppe in einer Pflanze auf die Akklimatisation der UV-B-Abschirmung an Kühle und UV-B auswirkt. Aus den zu beobachtenden Effekten der Mutationen sollte auf die jeweilige Bedeutung der verschiedenen Polyphenole für die Abschirmung geschlossen werden. Doch vor der eigentlichen Untersuchung der Effekte war es zunächst notwendig, die Mutanten auf ihre jeweilige Funktionalität zu überprüfen. Fehlten in diesen Mutanten wirklich die Substanzgruppen, deren Synthesewege von den entsprechenden Gendefekten betroffen waren? Was war mit den jeweils anderen Polyphenolen? Wurde das Fehlen einer Stoffgruppe in den Pflanzen möglicherweise durch die verstärkte Synthese eines anderen Polyphenols kompensiert?


So werden in der fah1-Mutante, in welcher die Sinapinsäuresynthese inhibiert ist, bei Kühle auch etwa 50% weniger Flavonole als im Wildtyp gebildet. HUANG et al.


4. Diskussion

4.3.2. Der spezifische Beitrag von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen zur epidermalen UV-Abschirmung


4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

zwischen den Gehalten und den entsprechenden epidermalen Blattabsorptionen ausgegangen werden kann. Die in vivo erstellten Absorptionsspektren werden hier mit Extinktionsspektren verglichen, die aus den jeweiligen Gesamtpolyphenolgehalten der zugehörigen Blätter und den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten für Sinapin- und Ferulasäure sowie Quercetin und Kämpferol (Abbildung 1.6) berechnet wurden. Trotz geringer Unterschiede können die paarweise zusammengestellten Spektren als nahezu deckungsgleich betrachtet werden. Dies gilt sowohl für die spektralen Absorptionsverteilungen als auch für die absoluten Absorptionswerte in diesen Spektren.


4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


4. Diskussion


den maximalen Epidermalabsorptionen von Klimakammer-Pflanzen entspricht dies einer Steigerung von 80 %. Außerdem hatte die Gesamtmenge an Polyphenolen in den Extrakten dieser im Freiland gewachsenen Blätter um etwa 150 % zugenommen. Der Gehalt an Hydroxyzimtsäuren war in diesen Blättern jedoch im Vergleich zu den maximalen Hydroxyzimtsäure-Gehalten der Blätter von Klimakammer-Pflanzen um mindestens 30 % vermindert. Die erhebliche Steigerung der epidermalen UV-B-Abschirmung, welche mit einer Kultivierung im Freiland einhergeht, kann daher nicht auf Hydroxyzimtsäuren, sondern muss auf Flavonole zurückgeführt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass unter natürlichen Bedingungen im Freiland erheblich mehr als 40 % der UV-B-Abschirmung durch Flavonole verursacht werden, und dieser Stoffgruppe eine größere Bedeutung für die UV-B-Abschirmung zukommt als den Hydroxyzimtsäuren.

Wenn Flavonole die bedeutenderen UV-B-Abschirmpigmente sind, so bedürfen die in LANDRY et al. (1995) und SHEAHEAN (1996) vorgestellten Resultate, nach denen Flavonolen eine wesentlich geringere UV-B-abschirmende Wirkung als Hydroxyzimtsäuren zukäme, einer neuen Interpretation. Die von LANDRY et al. (1995) gemachten Angaben zur Kultivierungstemperatur (21 bis 23 °C) und zum täglichen Lichtgenuss (\( \approx 8 \text{ mol m}^{-2} \text{d}^{-1} \)) des von ihnen untersuchten Pflanzenmaterials lassen auf einen

4. Diskussion

in ihrer Biomasse zeigten, wurden n5-Mutanten im Freiland durch den erhöhten Strahlungsstress nachhaltig geschädigt.


4.3.3. Die Funktion der Flavonole in A. thaliana


Auch wenn die hohe Bedeutung von Flavonolen für die epidermale UV-B-Abschirmung nachgewiesen ist, bleibt offen, ob alle Substanzen innerhalb dieser Stoffgruppe in glei-
4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole


4. Diskussion

5. Zusammenfassung


Die Bestimmung der für die UV-B-Abschirmung relevanten Substanzen ergab, dass ausschließlich Hydroxyzimtsäuren und Flavonole in Arabidopsis thaliana zum epidermalen UV-B-Schutz beitragen. Während Hydroxyzimtsäuren konstitutiv einen relativ gleichbleibenden epidermalen UV-B-Schutz bewirken, akkumulieren Flavonole in der Epidermis in Abhängigkeit zur UV-B-Bestrahlungsstärke und Temperatur und führen somit zu einer Verstärkung des epidermalen UV-B-Schildes. Unter natürlichen Wuchsbedingungen, wenn die Flavonol-Akkumulation maximal ist, entspricht der relative Beitrag, den Flavonole zur epidermalen UV-B-Gesamtabschirmung leisten, weit mehr als 50 %. Aus diesem Grund müssen Flavonole in Arabidopsis thaliana als die bedeutendsten epidermalen UV-B-Abschirmsubstanzen angesehen werden.
5. Zusammenfassung
6. Summary

UV-B radiation is short in wavelength and therefore rich in energy. As part of solar radiation it can be harmful to organisms. Since sunlight is essential for most plants, constant and intense exposure to UV-B is inevitable. To protect themselves against harmful effects of this exposure, plants store UV-B-absorbing substances in their epidermal vacuoles. Not only light and UV-B but also low temperature induces an increase of this epidermal UV-B-shield. This thesis examines the sense of the increased UV-B-shield at low temperature. Another focus lies on the characterisation of UV-absorbing substances in the model organism *Arabidopsis thaliana*. To achieve these goals, different Chlorophyll-fluorometric methods and HPLC-techniques were applied.

The conducted experiments showed that the recovery of photosystem II damaged by UV-B is generally slowed down at low temperature and therefore enhances UV-B-stress in plants. The increased epidermal UV-B-shielding at low temperature has to be understood as a compensation for the slowed-down recovery of photosystem II.

The determination of UV-B-shielding substances revealed that solely hydroxycinnamic acids and flavonoles contribute to epidermal UV-B-protection. While hydroxycinnamic acids deliver constitutive UV-B-protection on a relatively stable level, flavonoles accumulate in the epidermal cells depending on temperature and radiation, resulting in an improved epidermal UV-B-shield. Under natural conditions, when the flavonol concentration is at its peak, flavonoles are responsible for more than 50% of the UV-B-shield. Therefore flavonoles provide for most of the epidermal UV-B-screening in *Arabidopsis thaliana*. 
Abbildungsverzeichnis

1.1. Einleitung: Unterschied zwischen terrestrischer und extraterrestrischer spektraler UV-Bestrahlungsstärke. ......................................................... 2
1.2. Einleitung: Elektronentransport im PS II. ........................................ 6
1.3. Einleitung: Strukturformeln von Phenol und wichtigen Polyphenolen in Pflanzen. .......................................................... 9
1.4. Einleitung: Wichtige Flavonoidstrukturen. ...................................... 11
1.5. Einleitung: Biosyntheseweg von Hydroxycumarinsäuren und Flavonoiden. .......................................................... 12
1.6. Einleitung: Molare Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_\lambda$) für ausgesuchte Hydroxycumarinsäuren und Flavonole. .......... 14
1.7. Einleitung: In vivo Chlorophyllfluoreszenz. .................................... 15
1.8. Einleitung: UV-Strahlungsintensitäten innerhalb und außerhalb eines Blattes. .......................................................... 17
1.9. Einleitung: Verschiedene Akzessions- bzw. Ökotypen von A. thaliana. . 19
2.1. Material und Methoden: Biologische Gewichtung von UV-Strahlung. . 25
2.2. Material und Methoden: Kalibrierfunktion des UV-Breitbandsensors. 26
2.3. Material und Methoden: Unterschiede zwischen den Chlorophyll Anregungsstrahlen der Xenon-PAM. .......................... 30
2.4. Material und Methoden: Abhängigkeit von F(UV)/F(BG) vom Chlorophyll $a$-Gehalt. ......................................................... 31
2.5. Material und Methoden: Spektrale Eigenschaften verwendeter Bauteile bei der Erstellung von Chlorophyll-Anregungsspektren. ......... 32
2.6. Material und Methoden: Chlorophyll-Anregungsspektren von isolierten Chloroplasten und einem intakten Blatt. ......................... 33
2.7. Material und Methoden: Kontrolle des DA-Detektors auf Signalstabilität. 37
3.1. Ergebnisse 1: UV-B$_{ir}$- und T(UV-B)-abhängige Schädigung von PS II. .. 44
3.2. Ergebnisse 1: UV-B$_{ef}$-abhängige Schädigung von PS II. .................. 45
3.3. Ergebnisse 1: Regenerationsverlauf von PS II ............................... 45
3.4. Ergebnisse 1: Kultivierungstemperatur- und UV-B-abhängige Schädigung von PS II. ......................................................... 46
Abbildungsverzeichnis

3.5. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige PS II-Schädigung durch UV-B bei Columbia. ................................................................. 48
3.6. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige Anpassung der UV-B-Abschirmung bei Columbia. ....................................................... 49
3.7. Ergebnisse 2: Karte mit Fundorten der untersuchten Akzessionen. ................................................................. 50
3.8. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige PS II-Schädigung durch UV-B in verschiedenen Akzessionen. ........................................... 51
3.9. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige Akklimatisation von T(UV-B) bei verschiedenen Akzessionen. ..................................... 52
3.10. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige Anpassung des UV-B eff bei verschiedenen Akzessionen I. .......................................... 53
3.11. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige Anpassung des UV-B eff bei verschiedenen Akzessionen II. ....................................... 54
3.12. Ergebnisse 3: Temperaturabhängige PS II-Schädigung nach Kultivierung im UV-B-Gradienten. .............................................. 56
3.13. Ergebnisse 3: Langfristige Anpassung des UV-B eff durch epidermale UV-Abschirmung. ............................................. 58
3.15. Ergebnisse 3: Spektrale UV-Transmission in Blättern nach Kultivierung bei 9 °C. ......................................................... 63
3.16. Ergebnisse 3: Chromatogramme von Blattextrakten. ................. 66
3.17. Ergebnisse 3: Polyphenole in A. thaliana nach Kultivierung bei 21 °C im UV-B-Gradienten. ........................................... 71
3.18. Ergebnisse 3: Polyphenole in A. thaliana nach Kultivierung bei 9 °C im UV-B-Gradienten. ........................................... 72
3.19. Ergebnisse 3: Korrelation von epidermaler UV-Absorption und Polyphenolgehalt in Blättern. ........................................ 74
3.20. Ergebnisse 3: Epidermale UV-Absorptionsspektren. ............... 75
3.21. Ergebnisse 3: Anteile verschiedener Polyphenole an der Gesamt-UV-Absorption. ................................................................. 77

4.1. Diskussion 1: Relative Quantenausbeute der Photosynthese. ........ 80
4.2. Diskussion 2: Jahreslauf der globalen UV-B-Einstrahlung. ............ 90
4.3. Diskussion 2: A. thaliana am natürlichen Standort. ...................... 91
4.4. Diskussion 3: Flavonole in A. thaliana ...................................... 95
4.5. Diskussion 3: Anteile der Polyphenole an der UV-Absorption in Extrakten. .................................................. 106
4.6. Diskussion 3: Lichtabhängigkeit der Kämpferolsynthese .................. 107
4.7. Diskussion 3: Sonnenspektrum, aufgezeichnet im April 2009. . . . . . . . 111

A.1. Anhang: HPLC-Kalibration. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 147
A.2. Anhang: PS II-Schädigungen. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 147
A.3. Anhang: UV-B-Transmissonen für Abschnitt 3.3. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 148
Tabellenverzeichnis

2.1. Material und Methoden: Verwendete Akzessionen und Mutanten von *A. thaliana* .................................................. 23

2.2. Material und Methoden: Fundorte der verwendeten Akzessionen von *A. thaliana* .................................................. 24

2.3. Material und Methoden: Laufmittelzusammensetzung in der HPLC. ................................................................. 36

2.4. Material und Methoden: Kalibrierfunktion des DA-Detektors. ............................................................. 36


4.1. Diskussuion 3: Auflistung der in *A. thaliana* vermuteten Polyphenole. .................................................. 96

4.2. Diskussion: Polyphenolgehalte in Blättern. .................................................. 99

A.1. Anhang: Abkürzungsverzeichnis. ............................................................. 143

A.2. Anhang: Abkürzungsverzeichnis. ............................................................. 144

A.3. Anhang: Abkürzungsverzeichnis. ............................................................. 145

A.4. Anhang: Verwendete Chemikalien. ............................................................. 146
7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


DUYSSENS, L. (1956): The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. Biochimica et Biophysica Acta 19: 1–12.


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll\textsubscript{a} and chlorophyll\textsubscript{b} extracted with 4 different solvents - Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 975 (3): 384–394.


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


7. Literaturverzeichnis


### A. Anhang

#### Abkürzungsverzeichnis

<table>
<thead>
<tr>
<th>Abkürzung</th>
<th>Bedeutung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>*</td>
<td>statistische Interaktion zwischen Faktoren (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>Abs UV</td>
<td>epidermale UV-Absorption</td>
</tr>
<tr>
<td>Abs$_\lambda$</td>
<td>Absorption bei der Wellenlänge $\lambda$</td>
</tr>
<tr>
<td>A. thaliana</td>
<td><em>Arabidopsis thaliana</em></td>
</tr>
<tr>
<td>AUs</td>
<td>Flächeneinheiten in Chromatogrammen, englisch: Area Units</td>
</tr>
<tr>
<td>bzw.</td>
<td>beziehungsweise</td>
</tr>
<tr>
<td>BG</td>
<td>blau-grünes Licht</td>
</tr>
<tr>
<td>$^\circ$C</td>
<td>Grad Celsius</td>
</tr>
<tr>
<td>CHI</td>
<td>Chalconisomerase</td>
</tr>
<tr>
<td>CHS</td>
<td>Chalcon synthase</td>
</tr>
<tr>
<td>COL</td>
<td><em>Columbia</em>, Ökotyp von <em>A. thaliana</em></td>
</tr>
<tr>
<td>CVI</td>
<td>Ökotyp von <em>A. thaliana</em></td>
</tr>
<tr>
<td>CI95%</td>
<td>95% Konfidenzintervall / Vertrauensbereich (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>d</td>
<td>Tag</td>
</tr>
<tr>
<td>D</td>
<td>strahlungslose Dissipation bzw. Wärme</td>
</tr>
<tr>
<td>D$_1$</td>
<td>Protein im Photosystem II</td>
</tr>
<tr>
<td>D$_2$</td>
<td>Protein im Photosystem II</td>
</tr>
<tr>
<td>DAD</td>
<td>Dioden-Array-Detektor</td>
</tr>
<tr>
<td>ESI-MS</td>
<td>Elektro-Spray-Ionisations-Massenspektrometrie</td>
</tr>
<tr>
<td>epid.</td>
<td>epidermale</td>
</tr>
<tr>
<td>fah1</td>
<td>Mutante von <em>A. thaliana</em> (Tabelle 2.1)</td>
</tr>
<tr>
<td>F (m/o/v)</td>
<td>Fluoreszenz von PS II (maximale / Grund- / variable-)</td>
</tr>
<tr>
<td>F(BG)</td>
<td>Mit blau-grünem Licht angeregte Chlorophyllfluoreszenz</td>
</tr>
<tr>
<td>F(UV)</td>
<td>Mit UV-Strahlung angeregte Chlorophyllfluoreszenz</td>
</tr>
<tr>
<td>F3H</td>
<td>Flavonol-3-Hydroxylase</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Tabelle A.2.: Abkürzungsverzeichnis, Fortsetzung I.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Abk.</th>
<th>Definition</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>F3′H</td>
<td>Flavonol-3′-Hydroxylase</td>
</tr>
<tr>
<td>F5H</td>
<td>Ferulat-5-Hydroxylase</td>
</tr>
<tr>
<td>g</td>
<td>Gramm oder Gravitation (= 9,81 m s^{-2}/N kg^{-1})</td>
</tr>
<tr>
<td>h</td>
<td>Stunde(n)</td>
</tr>
<tr>
<td>HCA</td>
<td>Hydroxyzimtsäuren, englisch: Hydroxycinnamic acids</td>
</tr>
<tr>
<td>HPLC</td>
<td>Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie</td>
</tr>
<tr>
<td>Hz</td>
<td>Hertz</td>
</tr>
<tr>
<td>J</td>
<td>Joule</td>
</tr>
<tr>
<td>LER</td>
<td><em>Landsberg erecta</em>, Ökotyp von <em>A. thaliana</em></td>
</tr>
<tr>
<td>m</td>
<td>Meter</td>
</tr>
<tr>
<td>Mio.</td>
<td>Million(en)</td>
</tr>
<tr>
<td>mg</td>
<td>Milligramm (10^{-3} g)</td>
</tr>
<tr>
<td>min</td>
<td>Minute</td>
</tr>
<tr>
<td>ml</td>
<td>Milliliter (10^{-3} l)</td>
</tr>
<tr>
<td>mW</td>
<td>Milliwatt (10^{-3} W)</td>
</tr>
<tr>
<td>µl</td>
<td>Mikroliter (10^{-6} l)</td>
</tr>
<tr>
<td>µmol</td>
<td>Mikromol (10^{-6} mol)</td>
</tr>
<tr>
<td>m/z</td>
<td>Masse-Ladungs-Zahl</td>
</tr>
<tr>
<td>N</td>
<td>Norden</td>
</tr>
<tr>
<td>n</td>
<td>Stichprobenumfang (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>nm</td>
<td>Nanometer (10^{-9} m)</td>
</tr>
<tr>
<td>nmol</td>
<td>Nanomol (10^{-9} mol)</td>
</tr>
<tr>
<td>ü. NN</td>
<td>über Normalnull</td>
</tr>
<tr>
<td>n. s.</td>
<td>nicht signifikant (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>^{1}O_{2}</td>
<td>Singulett-Sauerstoff</td>
</tr>
<tr>
<td>^{3}O_{2}</td>
<td>Triplett-Sauerstoff</td>
</tr>
<tr>
<td>•OH</td>
<td>Hydroxylradikal</td>
</tr>
<tr>
<td>O</td>
<td>Osten</td>
</tr>
<tr>
<td>OD</td>
<td>optische Dichte</td>
</tr>
<tr>
<td>ORN</td>
<td>Ökotyp von <em>A. thaliana</em></td>
</tr>
<tr>
<td>Abkürzung</td>
<td>Definition</td>
</tr>
<tr>
<td>-----------</td>
<td>------------</td>
</tr>
<tr>
<td>p</td>
<td>p-Wert (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>P</td>
<td>Photochemie</td>
</tr>
<tr>
<td>PAM</td>
<td>Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer</td>
</tr>
<tr>
<td>P680⁺</td>
<td>oxidiertes Reaktionszentrum im PS II</td>
</tr>
<tr>
<td>PAL</td>
<td>Phenylalanin-Ammoniak-Lyase</td>
</tr>
<tr>
<td>PAR</td>
<td>Photosynthetisch aktive Strahlung</td>
</tr>
<tr>
<td>Pheo⁻</td>
<td>reduziertes Phäophytin</td>
</tr>
<tr>
<td>PPFD</td>
<td>Photosynthetisch aktive Photonen-Flux-Dichte</td>
</tr>
<tr>
<td>QA⁻</td>
<td>Quinon A</td>
</tr>
<tr>
<td>QA⁻²⁻</td>
<td>2fach reduziertes Quinon A</td>
</tr>
<tr>
<td>r²/R²</td>
<td>Bestimmtheitsmaße (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>rₛ</td>
<td>Spearman-Korrelationskoeffizient (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>rel.</td>
<td>relative /-r</td>
</tr>
<tr>
<td>s</td>
<td>Sekunde</td>
</tr>
<tr>
<td>SEM</td>
<td>Standardfehler vom Mittelwert (Statistik)</td>
</tr>
<tr>
<td>SHA</td>
<td>Ökotyp von A. thaliana</td>
</tr>
<tr>
<td>tᵣ</td>
<td>Retentionszeit</td>
</tr>
<tr>
<td>TRI</td>
<td>Ökotyp von A. thaliana</td>
</tr>
<tr>
<td>tt4, tt5, tt7</td>
<td>Mutanten von A. thaliana (Tabelle 2.1)</td>
</tr>
<tr>
<td>T(λ)</td>
<td>Transmission für Strahlung der Wellenlänge λ</td>
</tr>
<tr>
<td>T(UV/A/B)</td>
<td>epidermale UV /-A /-B-Transmission</td>
</tr>
<tr>
<td>UV-A/B/C</td>
<td>biologisch gewichtete Ultraviolett-A /-B /-C Strahlung</td>
</tr>
<tr>
<td>UV-Bₑf</td>
<td>effektive Ultraviolett-B Strahlung, ef für effektiv</td>
</tr>
<tr>
<td>UV-Bᵢᵣ</td>
<td>eingestrahlte Ultraviolett-B Strahlung, ir für irradiated</td>
</tr>
<tr>
<td>VE-Wasser</td>
<td>vollentsalztes (demineralisiertes) Wasser</td>
</tr>
<tr>
<td>V</td>
<td>Volt</td>
</tr>
<tr>
<td>W</td>
<td>Watt / Westen</td>
</tr>
<tr>
<td>w/v</td>
<td>Anteiliges Gewicht von Substanz A im Gesamtvolumen</td>
</tr>
<tr>
<td>v/v</td>
<td>Anteiliges Volumen von Lösung A am Gesamtvolumen</td>
</tr>
<tr>
<td>Xe-PAM</td>
<td>Xenon-Puls-Amplituden-Modulations-Fluorimeter</td>
</tr>
<tr>
<td>z.B.</td>
<td>zum Beispiel</td>
</tr>
</tbody>
</table>
## Chemikalienliste

Tabelle A.4.: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nr.</th>
<th>Chemikalie</th>
<th>Bezugsquelle</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1.</td>
<td>Aceton</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>2.</td>
<td>Bovine-Serum-Albumin (BSA)</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>3.</td>
<td>EDTA</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>4.</td>
<td>EGTA</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>5.</td>
<td>Ficoll</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>6.</td>
<td>Ferulasäure</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>7.</td>
<td>HEPES</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>8.</td>
<td>Heptan, HPLC-Quality</td>
<td>Diagonal, Münster</td>
</tr>
<tr>
<td>9.</td>
<td>Kämpferol, Aglykon</td>
<td>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</td>
</tr>
<tr>
<td>10.</td>
<td>KOH</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>11.</td>
<td>Methanol, HPLC-Quality</td>
<td>Diagonal, Münster</td>
</tr>
<tr>
<td>12.</td>
<td>NaHCO₃</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>13.</td>
<td>Naringinin, Aglykon</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>14.</td>
<td>PEG</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>15.</td>
<td>Percoll</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>16.</td>
<td>o-Phosphorsäure, 85 % v./v.</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>17.</td>
<td>Quercetin, Aglykon</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>18.</td>
<td>Salzsäure, 32 % v./v.</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>19.</td>
<td>Sinapin</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>20.</td>
<td>Sorbitol</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>21.</td>
<td>Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
</tbody>
</table>
HPLC-Kalibration

Abbildung A.1.: HPLC-Kalibrationskurven für Sinapin und Quercetin. Zugehörige Funktionsgleichungen und Bestimmtheitsmaße sind Tabelle 2.4 zu entnehmen.

UV-B-induzierte PS II-Schädigungen

Abbildung A.2.: UV-B-induzierte PSII-Schädigungen kühl (9°C, schwarze Symbole) und warm (21°C, weiße Symbole) akklimatisierter Pflanzen, die bei ihrer jeweiligen Anzuchtstemperatur mit UV-B-behandelt worden waren. n = 6, ±SEM.
Abbildung A.3.: UV-B-Transmissionen der in Abschnitt 3.3 untersuchten Wildtypen von *A. thaliana* COL und LER sowie der Deletionsmutanten *fah1*, *tt4*, *tt5* und *tt7*. n = 3, ± SEM.
Danksagung

Für die Unterstützung und das Verständnis, welche ich während meiner Zeit als Doktorand von verschiedenen Seiten erfahren habe, möchte ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt hierbei Herrn PROF. DR. W. BILGER für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Von ihm wurden mir im Laufe der letzten Jahre immer großes Interesse, Vertrauen und eine große Offenheit für neue Ideen entgegengebracht. Dafür ein großes Dankeschön!


Bei Frau PROF. DR. K. SCHWARZ möchte ich mich für ihren freundlichen Rat, ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Frau DR. B. HARBAUM vom Institut für Lebensmitteltechnologie danke ich ausdrücklich für ihre große Hilfe bei der Identifizierung der löslichen Polyphenole in *A. thaliana* mittels HPLC-MS.

Großer Dank gilt meinen Kollegen in der AG Bilger. Die freundschaftliche Atmosphäre und die große gegenseitige Hilfsbereitschaft in unserer Abteilung waren für mich immer etwas ganz Besonderes. Ich bin froh, ein Teil dieser Gemeinschaft zu sein.

Für die Unterstützung während der Erstellung dieses Manuskriptes möchte ich mich bei Sven, Steffi, Lars, Christian und Sigrid, ganz besonders aber bei meiner lieben Freundin Monika bedanken.

Meinen Eltern möchte ich ausdrücklich dafür danken, dass sie stets an meiner Seite standen, mich unterstützten und mir so vieles ermöglicht haben. Dafür werde ich Euch immer dankbar sein!
# Lebenslauf

Name und Vorname: Schultze, Matthias  
Geburtsdatum: 29.12.1977  
Geburtsort: Wilhelmshaven  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  

<table>
<thead>
<tr>
<th>Datum</th>
<th>Ereignis</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>07/1997</td>
<td>Abitur am Gymnasium am Treckfahrtstief, Emden</td>
</tr>
<tr>
<td>08/1997 bis 07/1998</td>
<td>Zivildienst in den Beschützenden Werkstätten Ostfiesland, Emden</td>
</tr>
<tr>
<td>09/1998 bis 02/2005</td>
<td>Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</td>
</tr>
<tr>
<td>Seit 12/2005</td>
<td>Promotionsstudium am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen


Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die hier vorliegende Dissertationsschrift, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Begutachtung vorgelegt wurde. Entstanden ist diese Arbeit nach den Regeln der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur guten wissenschaftlichen Praxis.

Kiel, im Januar 2011

(Matthias Schultze)