

**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
1.1. 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. <i>Arabidopsis thaliana</i>	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 <i>A. thaliana</i>	40
2.9.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole	40

2.10. Statistische Auswertung	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Funktion erhöhter UV-B-Abschirmung bei Kühle	43
3.2. UV-B-Akklimatisation von <i>A. thaliana</i>	47
3.2.1. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von <i>Columbia</i>	47
3.2.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von verschiedenen Akzessionen von <i>A. thaliana</i>	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-B _{ef}	55
3.3.3. Spektrale Auflösung der epidermalen UV-Transmission	59
3.3.4. Polyphenole in <i>A. thaliana</i>	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-B _{ef} - Die effektive UV-B-Strahlung	85
4.2. UV-B-Akklimatisation von <i>A. thaliana</i>	87
4.2.1. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von <i>Columbia</i>	87
4.2.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation von verschiedenen Akzessionen von <i>A. thaliana</i>	88
4.3. UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole	92
4.3.1. Polyphenole in <i>A. thaliana</i>	93
4.3.2. Der spezifische Beitrag von Hydroxycimtsäuren und Flavonolen zur Abschirmung	102
4.3.3. Die Funktion der Flavonole in <i>A. thaliana</i>	108
5. Zusammenfassung	113
6. Summary	115
7. Literaturverzeichnis	123
A. Anhang	143

1. Einleitung

1.1. UV-Strahlung

Bei Höheren Pflanzen handelt es sich in der Regel um photoautotrophe Organismen. Als solche beziehen sie ihre zum Leben benötigte Energie aus der Sonnenstrahlung. Ein Großteil der sichtbaren Strahlungsenergie wird hierbei durch die Photosynthese in chemische Energie umgewandelt und in Form von Kohlenstoffverbindungen gespeichert. Ein nicht unerheblicher und für Pflanzen kaum vermeidbarer Teil des Sonnenspektrums entfällt jedoch auf die ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung). Solare UV-Strahlung ist eine elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge zwischen 380 und etwa 240 nm (HORLER & BARBER 1981). Abhängig von der jeweiligen Wellenlänge wird UV-Strahlung in drei verschieden breite Bänder mit jeweils unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit eingeteilt: UV-A, UV-B und UV-C.

Der Wellenlängenbereich der UV-A-Strahlung (UV-A) liegt zwischen 380 und 315 nm (MADRONICH et al. 1998) und besitzt im Vergleich zu kurzwelligerer UV-Strahlung eine nur geringe biologische Wirksamkeit. Unterhalb von 315 bis 280 nm schließt sich der Wellenlängenbereich der UV-B-Strahlung (UV-B) an. Die biologische Wirksamkeit beginnt im UV-B-Bereich ab etwa 315 nm mit kleiner werdender Wellenlänge exponentiell anzusteigen (FLINT & CALDWELL 2003). Ebenfalls stark biologisch wirksam ist solare UV-C-Strahlung (UV-C). Ihr Wellenlängenbereich liegt zwischen 280 und etwa 240 nm. Da das Ozon in der Stratosphäre sowie der atmosphärische Sauerstoff UV-Strahlung unterhalb einer Wellenlänge von 315 nm zunehmend absorbieren (INN & TANAKA 1953, GRIGGS 1968), wird die Intensität terrestrischer UV-B-Strahlung deutlich herabgesetzt und UV-C sogar vollständig ausgelöscht (siehe Abbildung 1.1). Unter natürlichen Bedingungen hat UV-C für Lebewesen aus diesem Grund keine Relevanz.

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

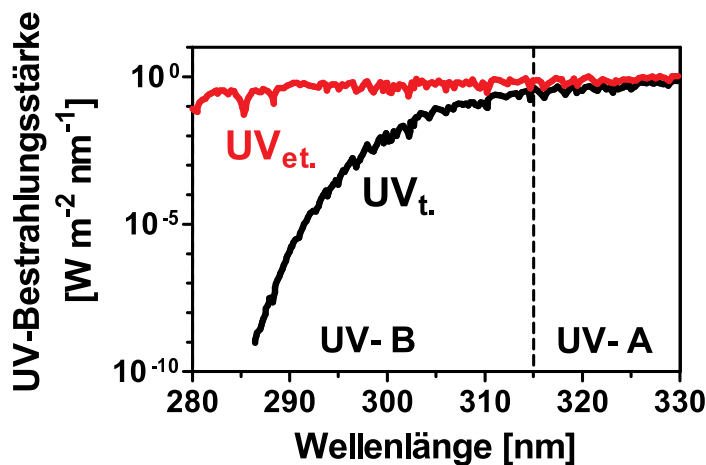


Abbildung 1.1.: Unterschied zwischen terrestrischer (UV_t) und extraterrestrischer (UV_{et}) spektraler UV-Bestrahlungsstärke am 2. Juli 1980 um 12:00 Uhr mittags. Die Abbildung zeigt UV-Strahlungsspektren mit Strahlungsintensitäten, wie sie für geografische Breitengrade zwischen N 30° und N 50° typischerweise 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 Erdkrümmung 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 Lambert-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.

Die Beschreibung des stratosphärischen Ozonabbaus, hervorgerufen durch Stickoxideinträge aus der Luftfahrt (CRUTZEN 1970, JOHNSTON 1971) bzw. Emissionen von Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffen (FCKWs) durch Industrie und Privathaushalte (MOLINA & ROWLAND 1974) rückte die Gefahr einer möglichen globalen Schädigung bzw. Zerstörung der Ozonschicht und einer damit verbundenen drastischen Zunahme an natürlicher UV-Strahlung auf der Erde in das Bewusstsein der Öffentlichkeit. Diese meteorologischen

Erkenntnisse führten auch innerhalb der Medizin und nahe verwandter Wissenschaftszweige innerhalb der Biologie zu einem ansteigenden Interesse für UV-bedingte Schädigungen, Anpassungsreaktionen sowie Schutz- und Reparatursysteme in Lebewesen. Aber erst der konkrete Nachweis eines vom Menschen verursachten, periodisch während der Wintermonate auftretenden Ozonlochs über der Antarktis (FARMAN et al. 1985) bewirkte schließlich im Jahr 1987 die Verabschiedung des Protokolls von Montreal durch die internationale Gemeinschaft, welches ein weltweites Produktionsverbot von Ozon zerstörenden Substanzen vorsieht.

Berücksichtigt man lediglich den durch FCKW und ähnlich wirkende Substanzen hervorgerufenen Rückgang des Ozons in der Stratosphäre, so wird sich die Ozonschicht innerhalb der nächsten 40 bis 60 Jahre wieder stabilisieren (NEWMAN et al. 2009). Jedoch wurde hierbei die Wirkung des Konzentrationsanstiegs von Kohlenstoffdioxid, Methan und anderer Treibhausgase in der Troposphäre vernachlässigt. Die Absorption thermischer Strahlung durch diese Moleküle bewirkt nicht nur eine globale Klimaerwärmung auf der Erdoberfläche, sondern zusätzlich eine verminderte Abstrahlung dieser Energie in den Weltraum. Die Wärme wird zurück gehalten. Dies führt schließlich zu einer deutlichen Abkühlung der in der Stratosphäre lokalisierten Ozonschicht (REX et al. 2004). Niedrige Temperaturen in der Stratosphäre sind jedoch für einen dortigen Ozonabbau stark förderlich (FARMAN et al. 1985). In welchem Ausmaß der globale Klimawandel die Ozonschicht zusätzlich gefährdet, ist kaum abzuschätzen. HEGGLIN & SHEPHERD (2009) gehen jedoch nach einer Modellberechnung für den Zeitraum von 1965 bis 2095 davon aus, dass durch den Klimawandel vermehrt stratosphärische Zirkulationen auftreten, wodurch Ozon der südlichen Hemisphäre in Richtung Norden verdriftet wird. Dies würde bedeuten, dass die UV-B-Belastung in diesem Zeitraum, unabhängig vom FCKW-bedingten Ozonabbau, auf der nördlichen Halbkugel zwar um etwa 9 % verringert würde, auf der Südhalbkugel jedoch um bis zu 20 % zunähme. Vor diesem Hintergrund bleibt die UV-B-Frage von großem Interesse und weitere Analysen möglicher Interaktionspunkte von biologischen Systemen mit UV-B und anderen abiotischen Faktoren sind notwendig.

1.2. Biologische Wirksamkeit von UV-B-Strahlung

UV-B führt in Pflanzen zu einer ganzen Reihe von Veränderungen (CALDWELL 1971, JANSEN et al. 1998, HOLLOSY 2002). So sind verkürzte Internodien, geringe Wuchshöhen sowie ein verstärktes Austreiben von Seitenknospen bei Pflanzen typische Entwicklungsreaktionen auf hohe UV-B-Strahlungsintensitäten (BALLARÉ et al. 2001, FLINT et al. 2003, FROHNMEYER & STAIGER 2003, CALDWELL et al. 2007). Blätter bleiben

oft kleinwüchsig (SULLIVAN et al. 1996) und eingerollt, entwickeln häufig eine stärkere, UV-B-reflektierende Blattbehaarung und stark pigmentierte Epidermen (BALLARÉ et al. 1996). Neben diesen morphologischen Veränderungen, welche teilweise auch als Anpassungsreaktionen an UV-B-Stress interpretiert werden können (BORNMAN & TERAMURA 1993), zeigen Pflanzen bei UV-B-Bestrahlung auch eindeutige, äußerlich deutlich sichtbare Strahlungsschäden. Chlorosen und Nekrosen aufgrund erheblich verminderter Chlorophyllgehalte in den Blättern sowie geringere Fertilitäten gehören hierzu (STRID & PORRA 1992, SMITH et al. 2000, KAKANI et al. 2003).

1.2.1. Schädigung durch UV-B

Die durch UV-B ursächlich hervorgerufenen Schädigungen liegen auf Zell- bzw. Molekülebene. Sie beruhen auf den Eigenschaften von konjugierten Doppelbindungen in organischen Molekülen (COCKELL 1998). In solchen Doppelbindungen bedürfen die Elektronen der π -Orbitale zum Verlassen ihrer Schalen relativ wenig Energie. Bei Molekülen mit mehreren konjugierten Doppelbindungen kann UV-B diese aufbrechen (COCKELL & KNOWLAND 1999) und das Molekül dadurch für nachfolgende chemische Reaktionen aktivieren. Für funktionelle Biomoleküle bedeuten diese Reaktionen meist einen Funktionsverlust. Auch die Entstehung reaktiver Radikale, welche wiederum andere funktionelle Biomoleküle zerstören können, ist möglich.

Besonders anfällig für diese UV-B-induzierte Ionisierung sind lange ungesättigte Kohlenstoffketten und aromatische Verbindungen wie etwa die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystein und aus diesen Aminosäuren zusammengesetzte Proteine. Aus diesem Grund sind z.B. innerhalb der Photosynthese die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (RubisCo) (JORDAN et al. 1992, TERAMURA & SULLIVAN 1994, ALLEN et al. 1997) sowie der ATP-Synthase-Komplex (ZHANG et al. 1994) besonders UV-B-empfindlich. Auch Doppelbindungen in Purinen und Pyrimidinen der DNA werden durch UV-B-Strahlung unterhalb von 310 nm aufgebrochen. Bei Neuverknüpfungen dieser offenen Bindungen entstehen häufig aus benachbarten Thyminen Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Photoprodukte (SETLOW 1966, SETLOW & CARRIER 1966, STRID et al. 1994), die eine erfolgreiche Replikation (BRITT 1996) und Transkription (DONAHUE et al. 1994, PROTIC-SABLJIC & KRAEMER 1985, MITCHELL et al. 1989) verhindern. Zudem wurden DNA-Einzelstrang- und vollständige Chromosomenbrüche beobachtet (SMITH 1977).

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 (\bullet OH), welche sowohl indirekt, als Folge von UV-B-Schäden innerhalb

der Photosynthesereaktionen (HIDEG & VASS 1996, VASS et al. 1996), als auch direkt durch Photooxidation von ungesättigten Fettsäuren gebildet werden (SNYRYCHOVA et al. 2007). •OH-Radikale initiieren schließlich eine als Lipidperoxidation bezeichnete Kettenreaktion, wodurch Lipide in Membranen schrittweise ihre Struktur und Funktion verlieren (MISHRA & SINGHAL 1992) und die Membranen letztendlich ihre Integrität einbüßen können (HOLLOSY 2002).

Nach der klassischen Sichtweise bewirkt sichtbare Strahlung die Photoinhibition von Photosystem II, wenn aufgrund von Starklichtstress eine vollständige Reduzierung des Plastochinonpools schließlich zu einer doppelten Reduzierung und Protonierung von Q_A führt. Q_A^{2-} bricht aus der Bindungstasche im D2-Protein aus und der primäre Akzeptor im PS II, das reduzierte Phäophytin ($Pheo^-$), kann nicht weiter oxidiert werden (VASS et al. 1992). Unter solchen Umständen kommt es in PS II-Reaktionszentren zu Ladungsrekombinationen zwischen $Pheo^-$ und $P680^+$, bei denen häufig durch eine unter normalen Umständen selten auftretende Spinumkehr von angeregten Elektronen Triplettchlorophyll entsteht (DURRANT et al. 1990). Dieser Anregungszustand des Chlorophylls ist mit einer Halbwertszeit von etwa 10^{-2} s relativ stabil. In seinen Grundzustand kann Triplettchlorophyll nur durch Emission von Phosphoreszenz oder durch Übertragung seiner Anregungsenergie auf andere Moleküle zurück gelangen. Bevorzugt wird die Energie dabei auf molekularen Sauerstoff im Triplettzustand (3O_2) übertragen, welcher dadurch, ebenfalls durch eine Spinumkehr von zwei seiner Valenzelektronen, zu hoch reaktivem Singulett-Sauerstoff (1O_2) wird (DURRANT et al. 1990). 1O_2 gehört wie auch •OH zu den besonders reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche große zelluläre Schäden verursachen. Im PS II zerstört 1O_2 das Reaktionszentrum bzw. das D1-Protein und bewirkt auf diese Weise die Inhibition von PS II (ARO et al. 1993, KRIEGER-LISZKAY 2005).

Eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von Photoinhibition spielen Carotinoide (NIYOGI et al. 1997). Im Xanthophyllzyklus wird bei ausreichend niedrigem pH-Wert ($pH \approx 5$) im Thylakoidlumen Violaxanthin über eine Deepoxidase zu Zeaxanthin umgewandelt (DEMMIG et al. 1987, DEMMIG-ADAMS & ADAMS 1992). Zeaxanthin ist in der Lage, über Vermittlung durch das PsbS-Protein (ASPINALL-O'DEA et al. 2002) Anregungsenergie von Chlorophyllmolekülen zu übernehmen und in Wärme umzuwandeln, bevor 1O_2 entsteht (DEMMIG et al. 1987). Jedoch scheint die Deepoxidase des Violaxanthins UV-B-empfindlich zu sein (PFÜNDEL et al. 1992, BISCHOF et al. 2002), so dass mit einer geringeren Wirksamkeit des Xanthophyllzyklus bei UV-B-Stress gerechnet werden muss. Zusätzlich bewirkt UV-B auch direkt große Schädigungen im PS II (STRID et al. 1990, BORNMAN & SUNDBY-EMANUELSSON 1995). Der Schädigungsmechanismus unterscheidet sich jedoch von der lichtinduzierten Photoinhibition deutlich (HIDEG & VASS 1996).

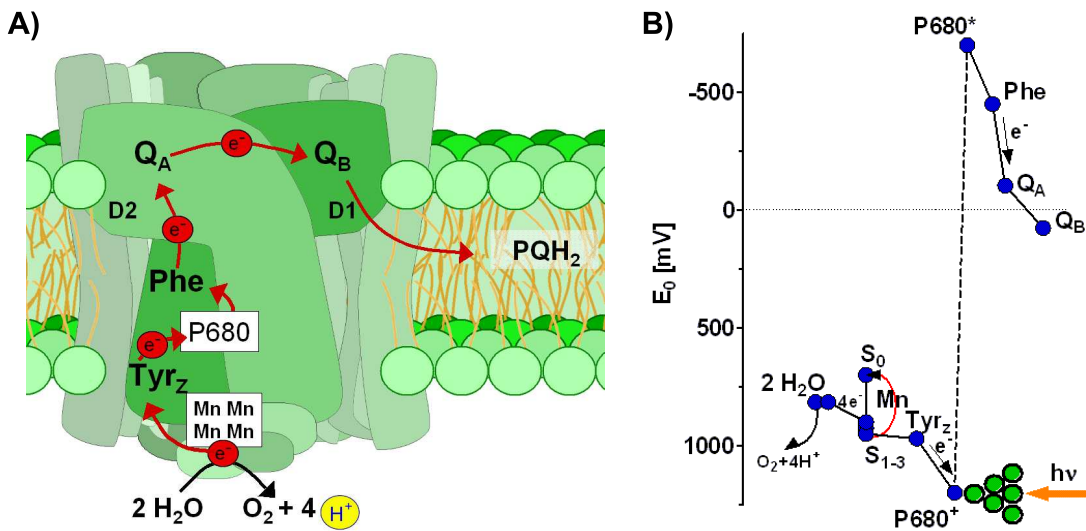


Abbildung 1.2.: Lichtinduzierter Elektronentransport im Photosystem II. **A)** Organisation der verschiedenen Redoxeinheiten im PS II-Proteinkomplex. Die verschiedenen Redoxeinheiten werden durch das D1- und D2-Protein im Photosystem funktionell gebunden. Während das D1-Protein die meisten Redoxeinheiten beherbergt, ist nur das Quinon_A (Q_A) im D2-Protein lokalisiert. Das Reaktionszentrum (P680) wird gemeinsam vom D1- und D2-Protein stabilisiert. Ebenfalls von diesen beiden sowie weiteren Proteinen des Photosystems stabilisiert wird der Mangan-Cluster bzw. Wasserspaltapparat. **B)** Lichtinduzierter Elektronentransport im Photosystem II erfolgt entlang eines Redoxpotenzialgefälles. Das Reaktionszentrum von PS II (P680) gelangt durch Absorption von Anregungsenergie in den angeregten Zustand P680*, überträgt hierbei ein Elektron auf den primären Akzeptor Phäophytin (Phe⁻) und wird dadurch zum Radikal P680⁺. Von Phe⁻ wird das Elektron auf Q_A und anschließend weiter auf Q_B übertragen. Die positive Ladung von P680⁺ wird für die Übertragung eines Elektrons von Tyr_Z auf P680⁺ genutzt. Tyr_Z⁺ wird im Anschluss durch ein Elektron des im Wasserspaltapparat (Mn) oxidierten Wassers wieder reduziert. Nach zweimaliger Reduzierung löst sich Q_B aus seiner Bindungstasche im D1-Protein und fließt in den Plastochinonpool ein. Abbildungen erstellt nach HANKAMER et al. (1997) und RAPPAPORT et al. (2002).

Während die lichtinduzierte Photoinhibition nach der klassischen Lehrmeinung akzeptorseitig, in der vollständigen Reduzierung des Plastochinonpools ihren Ausgangspunkt hat, tritt bei der Photoinhibition des PS II durch UV-B-Strahlung zunächst ein Schaden auf der Donorseite des Reaktionszentrums auf (HAKALA et al. 2005, VASS et al. 1996, RENGER et al. 1989). Nach HAKALA et al. (2005) wird der Mangancluster des Wasserspaltapparates durch UV-B direkt oder aber durch Reaktionsprodukte des Wasserspaltapparats mit UV-B-Strahlung (SZILARD et al. 2007) empfindlich gestört, wodurch die O₂-Produktion zum Erliegen kommt und im Reaktionszentrum vorliegendes P680⁺ nicht weiter durch Elektronen der Wasserspaltung reduziert werden kann (RENGER et al. 1989, TYYSTJÄR-

VI 2008). Der weitere mechanistische Verlauf der Schädigung ist bisher unklar. P680⁺ gilt jedoch als sehr starkes Oxidationsmittel. Dessen Präsenz im Reaktionszentrum führt wahrscheinlich zu großen oxidativen Schäden (HAKALA et al. 2005), die schließlich die vollständige Degradierung des D1- und des D2-Proteins bewirken (JANSEN et al. 1998). Im weiteren Verlauf der UV-B-Bestrahlung von PS II treten zusätzliche donor- und akzeptorseitige Schäden auf. Donorseitig gilt Tyr_z, der primäre Elektronendonator des Reaktionszentrums (VASS et al. 1996), aufgrund seiner Aromatenstruktur als UV-B-empfindlich. Auf der Akzeptorseite scheint Q_A⁻ UV-B-sensibel zu sein, da Mutanten von *Chenopodium album* mit höherem Q_A⁻-Gehalt eine deutlich stärkere UV-B-Empfindlichkeit als vergleichbare Wildtyp-Pflanzen zeigen (RODRIGUES et al. 2006). Aufgrund seiner UV-B-absorbierenden Eigenschaft (BENSASSO & LAND 1973) könnte Q_A⁻ ein Photosensitizer sein und durch UV-B seine Funktion als PS II-akzeptorseitige Oxido-Reduktase verlieren (VAN RENSEN et al. 2007). Dies würde neben P680⁺ zusätzlich zu reduziertem Phäophytin führen. Bei einer Ladungsrekombination zwischen diesen Molekülen würden wie bei der lichtinduzierten Photoinhibition ebenfalls zunächst Tripletchlorophyll und dann reaktiver Singulett-Sauerstoff entstehen (HAKALA et al. 2005).

Neuere Arbeiten zeigen inzwischen, dass auch die Photoinhibition von PS II durch sichtbare Strahlung durch eine Schädigung des donorseitigen Manganclusters verursacht werden kann (OHNISHI et al. 2005, HAKALA et al. 2005, TAKAHASHI & MURATA 2008). HAKALA et al. (2005) konnten dies mit Hilfe eines Aktionsspektrum belegen, nachdem neben UV-B auch UV-A und sogar blaues Licht zu einer signifikanten Schädigung von synthetisch hergestellten und Sauerstoff-produzierenden Mangankomplexen führen. Nach der Schädigung des Manganclusters kommt es wahrscheinlich in einem zweiten Schritt, aufgrund der weiteren Anregung von P680 durch sichtbares Licht, zu einer Ladungsrekombination zwischen P680⁺ und reduziertem Phäophytin und dabei zu der Bildung von Singulett-Sauerstoff (siehe oben). Die Arbeit von TYYSTJÄRVI (2008) bietet eine gute Zusammenfassung zu diesem Thema.

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

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).

Zum anderen entwickelten Pflanzen Mechanismen, die bereits vorab Schädigungen durch UV sowie deren Folgen zu vermeiden helfen. Hierzu gehören beispielsweise UV reflektierende Blattbehaarungen und -oberflächen (KARABOURNIOTIS & BORNMAN 1999) oder die Akkumulation von UV-abschirmenden Substanzen in der Blattepidermis (CALDWELL et al. 1983), welche die epidermale UV-Transmission absenken. Diese morphologischen Anpassungen verhindern, dass hohe Intensitäten zellschädigender UV-Strahlung tief in das Blatt eindringen und Schäden verursachen können. Es ist allgemein akzeptiert, dass für die UV-Abschirmung hauptsächlich in der Epidermis akkumulierte Polyphenole verantwortlich sind, die UV-Strahlung sehr effektiv absorbieren und in Abhängigkeit zum eingestrahlt UV bzw. sichtbaren Licht synthetisiert werden (Abschnitt 1.3). Neben der Einstrahlung von UV-Strahlung und sichtbarem Licht bewirkt auch niedrige Temperatur oberhalb des Gefrierpunkts ein deutliches Absinken der epidermalen UV-Transmission in Blättern (HOFFMANN-WÜLFING 2007, BILGER et al. 2007). Die Bedeutung dieser durch Kühle induzierten UV-Stressvermeidung ist bisher unklar.

Während photochemische Reaktionen, wie etwa die Zerstörung von konjugierten Doppelbindungen durch UV nur in geringem Maße temperaturabhängig sind, liegt der Q_{10} enzymatischer Reaktionen bei einem Wert von 2. Dies gilt auch für enzymatische Reparaturreaktionen von zellulären Strahlungsschäden. So ist beispielsweise bekannt, dass die Aktivität der Photolyase bei geringer Temperatur deutlich erniedrigt ist (TAKEUCHI et al. 1996, LI et al. 2004) und dass bei Kühle durch Starklicht hervorgerufene Schäden am PS II aufgrund geringerer Reparaturleistungen verstärkt auftreten (POWLES 1984, GREER et al. 1986, 1991, GOMBOS et al. 1994, NISHIYAMA et al. 2006a).

Die Reparatur von photoinhibierten PS II-Zentren beinhaltet sehr komplexe Vorgänge (YOKTHONGWATTANA & MELIS 2006, CHEREGI et al. 2007). Das beschädigte D1-Protein wird aus dem PS II-Proteinkomplex herausgelöst, innerhalb der Thylakoidmembran in die stromaexponierten Bereiche transferiert und dort von Proteasen abgebaut. Simultan dazu wird ein neu synthetisiertes D1-Protein in das Photosystem eingebaut. Im Gegensatz zu Starklicht zerstört UV-B neben dem D1- zusätzlich auch das D2-Protein (SASS et al. 1997). Es ist folglich anzunehmen, dass die Reparatur UV-B-induzierter Schäden im PS II mindestens ähnlich umfangreich und temperaturabhängig ist, wie die von Starklicht. Eine verstärkte Vermeidung von UV-Strahlung bei niedrigen Temperaturen könnte die Funktion haben, die temperaturbedingten geringeren UV-Toleranzen zu kompensieren.

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 π -Elektronensysteme mesomeren Zustände von Benzolringen führen zu energetisch sehr stabilen und wenig reaktiven Molekülringstrukturen, welche mit anderen Molekülen normalerweise über ihre Substituenten in Wechselwirkung treten.

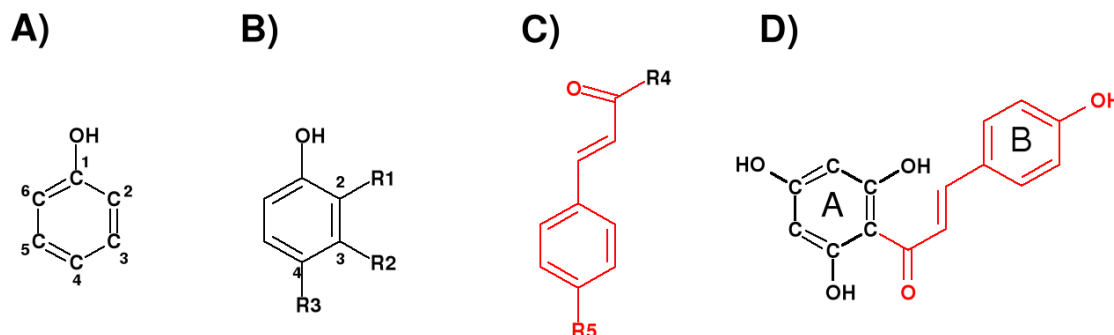


Abbildung 1.3.: Strukturformeln von Phenol und wichtigen Polyphenolen in Pflanzen. **A)** Strukturformel des Phenols. Beginnend mit dem die Hydroxylgruppe tragenden Kohlenstoffatom werden diese Atome am Benzolring im Uhrzeigersinn durchnummeriert (C¹ bis C⁶). **B)** Nomenklatur einfacher Phenole mit zusätzlichen Substituenten. Substituent (R1) an C²: Substituent in *ortho*-Stellung. Substituent (R2) an C³: Substituent in *meta*-Stellung. Substituent (R3) an C⁴: Substituent in *para*-Stellung. **C)** Zimt- und einfache Hydroxyzimtsäuren. *trans*-Zimtsäure: R4 = OH, R5 = H, *p*-Cumarsäure: R4 = OH, R5 = OH, *p*-Cumaroyl-CoA: R4 = S-CoA, R5 = OH, Chalcon: R4 = Trihydroxyphenol, R5 = OH. **D)** Das Chalconmolekül mit zwei Benzolringsystemen (A und B). Es ist zusammengesetzt aus *p*-Cumaroyl (rot) und drei zu *meta*-Trihydroxyphenol zyklisch verbundenen Acetatresten (schwarz).

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 π -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 π -

Elektronensystem des Moleküls dabei ist, desto stabiler bleibt es nach einer Deprotonierung. Daher sind derartige Verbindungen in der Lage, reaktive Anion-Verbindungen durch Protonierung unschädlich zu machen, ohne selbst dabei reaktiv zu werden und wirken u.a. deshalb antioxidativ (RICE-EVANS et al. 1997, BLOKHINA et al. 2003, VERMERRIS & NICHOLSON 2008). Trotz Delokalisation tritt nach Deprotonierung die negative Ladung vorzugsweise in *ortho*- und *para*-Stellung des Benzolrings (siehe Abbildung 1.3 B) in Erscheinung. Elektrophile Kationen werden deshalb als mögliche Substituenten vorzugsweise in diese Ringpositionen delegiert.

Ausgangssubstanz für die Synthese von Polyphenolen in Pflanzen ist die Aminosäure Phenylalanin, welche ein Produkt des Shikimatwegs ist. Durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) wird die Aminogruppe vom restlichen Molekül abgespalten und *trans*-Zimtsäure gebildet (siehe Abbildung 1.3 C). Durch das Einfügen einer Hydroxy-Gruppe in *para*-Stellung entsteht schließlich *p*-Cumarsäure (siehe Abbildung 1.3 C). *p*-Cumarsäure ist sowohl für die Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren als auch gemeinsam mit drei Malonyl-CoA-Molekülen für die Flavonoid-Biosynthese die Ausgangssubstanz (HAHLBROCK & SCHEEL 1989, HARBORNE & WILLIAMS 2000, DIXON 2001). Die verschiedenen Enzyme der Flavonoid- und Hydroxyzimtsäuresynthese liegen in einem modulartig zusammengesetzten Enzymkomplex des Endoplasmatischen Retikulums vor (STAFFORD 1974, SASLOWSKY & WINKEL-SHIRLEY 2001), dessen Module je nach Syntheseweg variiert oder vollständig ausgetauscht werden können.

Bei der Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren wird aus *p*-Cumarsäure durch zweifache, sukzessiv erfolgende Hydroxylierung und Methylierung zunächst Ferulasäure und schließlich Sinapinsäure gebildet. Die Hydroxylierung der Ferulasäure geschieht durch die Ferulat-5-Hydroxylase (F5H). Ferula- und Sinapinsäure sind gemeinsam mit *p*-Cumarsäure als Ligninbausteine wichtige Bestandteile der Zellwand. Als lösliche Hydroxyzimtsäuren in den Zellvakuolen der Epidermiszellen dienen sie als UV-B-Schutzpigmente.

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 Chalonsynthase (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 Molekülrings (C) genutzt werden.

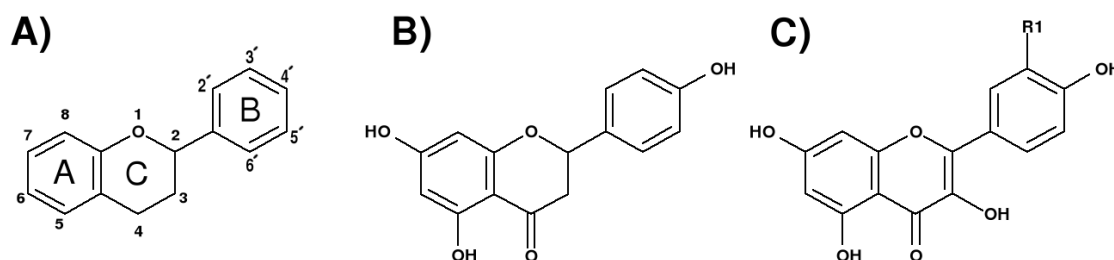


Abbildung 1.4.: Wichtige Flavonoidstrukturen. **A)** Grundgerüst der Flavonoide mit möglichen Positionen der Substituenten an Ring A und C (Position 1 bis 8) bzw. an Ring B (Position 2' bis 6'). **B)** Naringenin (Flavanon). **C)** Grundstruktur der Flavonole: Quercetin: R1 = OH, Kämpferol: R1 = H.

Im weiteren Verlauf des Synthesewegs entstehen aus Naringenin durch Anhängen neuer Substituenten bzw. durch Modifizierung des π -Elektronensystems in Ring C die weiteren Flavonoidgruppen. Eine wichtige Rolle bei der epidermalen UV-Abschirmung spielen die Flavonole Quercetin und Kämpferol (Abbildung 1.4 C). Beide Substanzen werden häufig durch verschiedene Flavonol-Glykosyltransferasen an Position 3 und 7 mit Glukose bzw. Rhamnose glykosidisch verknüpft (GRAHAM 1998, JONES et al. 2003, ROUTABOUL et al. 2006), wodurch sich deren Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln erhöht. Einen Überblick über den Syntheseweg der Flavonoide und der Hydroxyzimtsäuren mit den jeweils beteiligten Enzymen bietet Abbildung 1.5. Nach der Synthese im Cytosol werden Flavonoide in der Regel über verschiedene Transportmechanismen (RAUSHER 2006) in die Zellvakuole transportiert und dort gespeichert (GRAHAM 1998, MARINOVA et al. 2007).

Die Synthese von Hydroxyzimtsäuren und Flavonoiden ist in unterschiedlichem Maße durch Umwelteinflüsse wie Strahlung und Temperatur beeinflussbar. Blaues Licht, UV-A- und UV-B-Strahlung führen zu einer gesteigerten Expression bzw. Aktivität von PAL und CHS (REUBER et al. 1996b, WADE et al. 2001, JENKINS et al. 2001) und fördern so die Synthese von Flavonoiden (KOLB et al. 2001, TATTINI et al. 2004). Kühle unter Lichteinfluss bewirkt gleichfalls eine erhöhte Expression dieser Enzyme (LEYVA et al. 1995, OLSEN et al. 2008) und führt auf diese Weise zu einem Anstieg der Konzentration von Flavonoiden (CHRISTIE et al. 1994, ALBERT et al. 2009, OLSEN et al. 2009). Im Vergleich mit Strahlung scheint Kühle sogar der bedeutsamere Induktor für die Flavonoidbiosynthese zu sein (NYBAKKEN et al. 2004b, ALBERT et al. 2009). Die Menge an Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen scheint hingegen weniger von Umwelteinflüssen abhängig zu sein. Lediglich nach Behandlung mit hohen Lichtintensitäten sind höhere Mengen an Hydroxyzimtsäuren in Blättern detektierbar (REUBER et al. 1996b, KOLB et al. 2001).

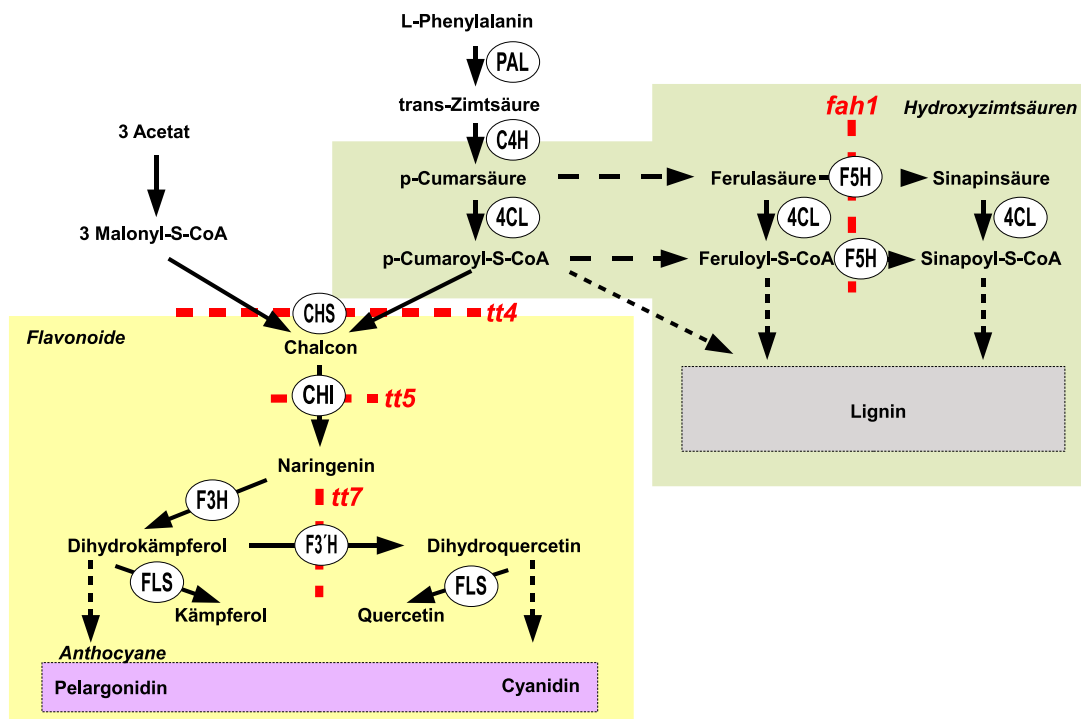


Abbildung 1.5.: Biosyntheseweg von Hydroxyzimtsäuren und Flavonoiden. Wichtige Syntheseenzyme sind weiß unterlegt: PAL = Phenylalaninammoniaklyase, C4H = Zimtsäure-4-Hydroxylase, 4CL = 4-Cumarat-CoA-Ligase, CHS = Chalconsynthase, CHI = Chalconisomerase, F3H = Flavonoid-3-Hydroxylase, F3'H = Flavonol-3'-Hydroxylase, FLS = Flavonolsynthase, F5H = Ferulat-5-Hydroxylase. Die Namen von Mutanten mit Defekten in den Synthesewegen sind in roter Schrift angegeben. Die jeweiligen Stellen, an denen der Syntheseweg durch die Defekte unterbrochen wird, ist mit rot-gestrichelten Linien markiert. Abbildung nach WINKEL-SHIRLEY (2002)).

Eine endgültige und umfassende molekulare Entschlüsselung der Signalwege, ausgehend von den verschiedenen Umwelteinflüssen bis hin zur Synthese der verschiedenen polyphenolischen Substanzen, ist bisher nicht erfolgt. Sicher scheint jedoch, dass die Induktion der Flavonoidbiosynthese weitestgehend auf Ebene der Transkription erfolgt (QUATTROCCHIO et al. 2006). So besitzen zentrale Synthesegene (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*, *DFR*) Regulationssequenzen innerhalb ihrer Promotorregionen für verschiedene R2R3 MYB- sowie bHLH-Transkriptionsfaktoren (bHLH: basic region helix loop helix) (WEISSHAAR & JENKINS 1998, MEHRTENS et al. 2005, STRACKE et al. 2007). Ein solcher Transkriptionsfaktor, MYB 12, scheint beispielsweise für die UV-B- und Licht-abhängige Flavonolsynthese verantwortlich zu sein (MEHRTENS et al. 2005, STRACKE et al. 2007). Die Expression von MYB 12 wird durch den bZIP-Transkriptionsfaktor (bZIP: basic Region Leucine Zipper) HY 5 (Elongated Hypocotyl5) positiv reguliert

(STRACKE et al. 2010). Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle während der Pflanzenentwicklung (HUDSON 2000, CLUIS et al. 2004) und steht über das einer E3-Ubiquitin-Ligase ähnliche Protein COP 1 (Constitutive Photomorphogenic 1) indirekt in Kontakt mit den, über die Blau- und Rotlichtrezeptoren CRY 1 und PHY a vermittelten Licht- und UV-B-Signaltransduktionswegen (YANG et al. 2001, WANG et al. 2001, WADE et al. 2001, VANDENBUSSCHE et al. 2007). Direkt wird die Expression von HY 5 jedoch durch den vermeintlichen UV-B-Rezeptor UVR 8 (UV Resistance Locus 8) beeinflusst (BROWN et al. 2009, JENKINS 2009a), indem UVR 8 bereits bei niedriger UV-B-Bestrahlungstärke in Nähe der Promotorregion von HY 5 an das Chromatin bindet. Durch die Anbindung von UVR 8 scheint das Chromatin in dieser Region aufgelockert zu werden, so dass die Promotorregion von HY 5 für zugehörige Transkriptionsfaktoren zugänglich wird und die Expression von HY 5 gestartet werden kann (BROWN et al. 2005, BROWN & JENKINS 2008, JENKINS 2009a). Ebenfalls in Verbindung mit der UV- und Licht-assoziierten, aber auch mit der kühleabhängigen Induktion der Flavonoidsynthese steht ICX 1. Dieses Protein scheint bei *A. thaliana* in der Epidermis von Blättern lokalisiert und ein negativer Regulator der CHS zu sein (WADE et al. 2003). Zudem treten sogenannte WDR/WD40-Proteine, diese enthalten charakteristische Sequenzwiederholungen der Aminosäuren Tryptophan und Asparagin, in Wechselwirkung mit den bereits genannten R2R3 MYB -Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise können auch sie die Expression der für die Flavonoidbiosynthese relevanten Gene positiv wie auch negativ modulieren und damit den Gehalt der als UV-Schutzpigmente geltenden Flavonoiden in den Pflanzen maßgeblich beeinflussen (QUATTROCCHIO et al. 2006).

UV-Schutzpigmente, wie beispielsweise das Melanin bei Säugern, schützen durch Abschirmung. Sie absorbieren die hoch energetische Strahlung bereits in den äußeren Grenzschichten eines Organismus und vermeiden das Eindringen der Strahlung in tiefere Regionen. Auch in Pflanzen wird schädigende UV-Strahlung zum größten Teil bereits in der Epidermis absorbiert und auf diese Weise das Innere des Organismus gegen UV-Strahlung abgeschirmt (SCHNITZLER et al. 1996, BORNMAN et al. 1997). Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide, vor allem Kämpferol und Quercetin, absorbieren UV-Strahlung (siehe Abbildung 1.6) und sind hauptsächlich in den Zellen der Epidermis lokalisiert (ROBBERECHT & CALDWELL 1978, BORNMAN et al. 1997). Zudem korrelieren die in Blättern synthetisierten Mengen dieser Polyphenole mit dem jeweiligen Grad der epidermalen UV-Abschirmung (BURCHARD et al. 2000) und werden deshalb als UV-Schutzpigmente angesehen (CALDWELL et al. 1983, LI et al. 1993). Die jeweilige Bedeutung von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren für die epidermale UV-Abschirmung in Pflanzen wird jedoch kontrovers diskutiert.

Einerseits zeigten Flavonoid-freie Mutanten von *Arabidopsis thaliana* eine deutlich höhere Widerstandskraft gegenüber UV-Strahlung als Mutanten, die nicht zur Synthese

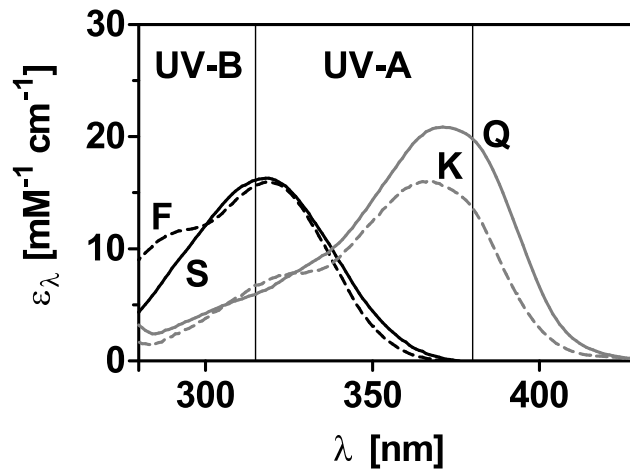


Abbildung 1.6.: Molare Extinktionskoeffizienten (ϵ_λ) für die Hydroxyzimtsäuren Ferulasäure (F) und Sinapinsäure (S), sowie für die Flavonole Kämpferol (K) und Quercetin (Q) in einem Wellenlängenbereich zwischen 280 und 420 nm. Die Substanzen wurden für die Untersuchung jeweils als Aglykon in 50 % Methanol gelöst.

von Sinapaten befähigt sind (LANDRY et al. 1995, BOOIJ-JAMES et al. 2000). Die daraus abgeleitete Schlussfolgerung, dass für eine erfolgreiche epidermale UV-Abschirmung Hydroxyzimtsäuren von größerer Bedeutung sind als Flavonoide (SHEAHAN 1996), wird durch das vergleichsweise geringe Absorptionsvermögen von Flavonoiden im UV-B-Strahlungsbereich (siehe Abbildung 1.6) gestützt (TATTINI et al. 2004, AGATI et al. 2009). Andererseits jedoch lassen gerade die im Vergleich zu Wildtyppflanzen hohen UV-Empfindlichkeiten von Flavonoid-Mangel-Mutanten (LI et al. 1993, REUBER et al. 1996a), sowie die Induktion der Flavonoidbiosynthese durch UV-B-Strahlung auf eine besonders wichtige Rolle dieser Phenolgruppe bei der Akklimatisation an UV-B-Stress schließen.

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

bleibendes Niveau absinkt (Abbildung 1.7 B). Diese Erkenntnis wurde etwa 60 Jahre später von KAUTSKY & HIRSCH (1931, 1934) wieder aufgegriffen und wird seitdem in der Literatur als Kautsky-Effekt bezeichnet.

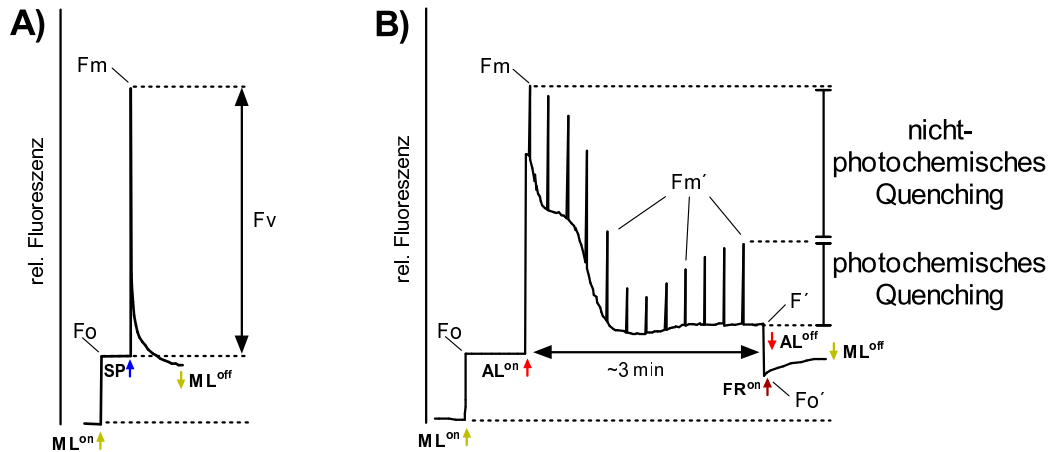


Abbildung 1.7.: Wichtige Parameter der *in vivo* Chlorophyllfluoreszenz (Abbildung nach SCHREIBER (2001)). **A)** Bestimmung der maximalen Quantenausbeute von PS II. Bei Verwendung einer, alle dunkeladaptierten PS II-Zentren absättigenden Lichtquelle (SP) wird die Fluoreszenz maximal groß bzw. zum Fluoreszenzmaximum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

1.4.1. Bestimmung des PS II-Status

In höheren Pflanzen wird die dunkelrote Fluoreszenz vom Chlorophyll *a* emittiert. Organisiert in den Antennenkomplexen sowie den zwei hintereinander geschalteten Photosystemen (PS I und PS II) absorbiert Chlorophyll *a* sichtbares sowie ultraviolettes Licht und wird dadurch in den angeregten Singulettzustand überführt. Um aus diesem angeregten Zustand wieder in den Grundzustand zurückkehren zu können, muss es seine Anregungsenergie wieder abgeben. Innerhalb der Antennenkomplexe kann die Anregungsenergie eines Chlorophyllmoleküls beispielsweise auf ein anderes übertragen werden und das die Energie abgebende Chlorophyllmolekül somit in den Grundzustand zurückkehren. Auf diese Weise wird die Energie nahezu verlustfrei von den Antennen bis in die Reaktionszentren der Photosysteme geleitet. Dieser Energietransfer wird als Excitonentransport bezeichnet.

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 Akzeptorseite 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 (= F_0). Mit zunehmender Bestrahlungsstärke steigt die Rate photochemischer Reaktionen im PS II an. Diese führen zu einem Anstieg der akzeptorseitigen 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 Akzeptorseite keine weiteren Ladungstrennungen im PS II mehr möglich und die gesamte Anregungsenergie wird in Fluoreszenz umgewandelt. Die Fluoreszenz wird maximal (= F_m), die Photochemie sinkt auf ein Minimum ab.

Der Anstieg der Fluoreszenz zwischen F_0 und F_m wird als variable Fluoreszenz (= F_v) bezeichnet (Abbildung 1.7 A) und spiegelt den Redoxzustand der PS II-Akzeptorseite und damit das Auftreten erfolgreicher Ladungstrennungen am PS II wider. Nach BUTLER & KITAJIMA (1975) ist das Verhältnis F_v/F_m 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 F_v/F_m bei vielen Pflanzen bei etwa 0,83. Unter photoinhibierenden Bedingungen korreliert der Wert von F_v/F_m mit der Quantenausbeute der Sauerstoffproduktion am PS II (DEMMIG & BJÖRKMAN 1987). Dies macht das Verhältnis F_v/F_m zu einem nützlichen Messparameter, mit dessen Hilfe die Folgen von Strahlungsstress an einem photoautotrophen Organismus quantifiziert werden können.

1.4.2. Bestimmung der epidermalen UV-Abschirmung

Zur Bestimmung der epidermalen UV-Absorption entwickelten BILGER et al. (1997) eine auf der PAM-Fluorometrie basierende, nicht-invasive Messmethode. Die Chlorophyllfluoreszenz eines Blatts lässt sich sowohl durch sichtbares Licht als auch durch UV-Strahlung anregen. Während sichtbares Licht in grünen Blättern jedoch ungehindert durch die Epidermis bis in die chlorophyllhaltigen Gewebsschichten vordringen kann und Chlorophyll zur Fluoreszenz anregt, wird die Intensität der UV-Strahlung in Abhängigkeit zum Gehalt an epidermalen UV-Abschirmpigmenten abgeschwächt. Umso höher die Gehalte der UV-Abschirmpigmente in der Epidermis sind, desto stärker wird die Intensität des UV-Strahls abgeschwächt und desto geringer wird die UV-induzierte Fluoreszenz. Die lichtinduzierte Fluoreszenz bleibt jedoch konstant.

Das Verhältnis von UV-induzierter zu lichtinduzierter Fluoreszenzausbeute ($F(\text{UV})/F(\text{BG})$) beschreibt die Transmissionseigenschaft der Epidermis für UV-Strahlung im Vergleich zu sichtbarem Licht. Deshalb wird das Verhältnis $F(\text{UV})/F(\text{BG})$ 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 ($T(\text{UV})$). 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).

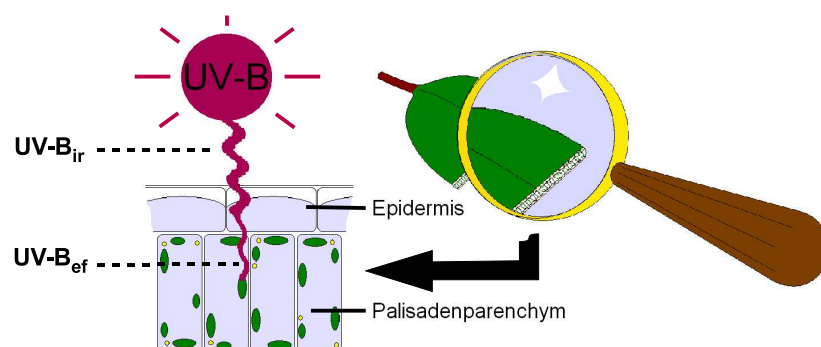


Abbildung 1.8.: UV-Strahlungsintensitäten innerhalb und außerhalb eines Blattes. Die von einer UV-B-Quelle (UV-B) ausgehende UV-B-Strahlung (UV-B_{ir}) wird innerhalb der Epidermis entsprechend der epidermalen UV-Transmission abgeschwächt. Nur die die Epidermis durchdringende UV-B-Strahlung wirkt schädigend.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

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 (F_0) bestimmt werden kann. Intensitätsfluktuationen 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*

Arabidopsis thaliana (*A. thaliana*), die Acker-Schmalwand, gehört zur Familie der Brassicaceae. Typische Habitate dieser Art sind nährstoffarme Äcker und sandige Ruderalstellen an Wegesrändern. Kalkhaltige Standorte werden meist gemieden (BÄSSLER et al. 1996). *A. thaliana* ist eine winterannuelle Rosettenpflanze und gilt als selbstbestäubend, auch wenn Insektenbestäubung nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund der hohen Fertilität, der relativ kurzen Generationsabfolge sowie der anspruchslosigkeit 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 *Brassica* (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 *fah1*-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-

tionsmutante deshalb nicht mehr zur Synthese von Sinapinsäure und davon ableitbaren Hydroxyzimtsäuren befähigt (Syntheseweg der Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide siehe Abbildung 1.5). Im Gegensatz zu dieser nur eingeschränkt zur Hydroxyzimtsäuresynthese befähigten Mutante zeigen einige Mutanten des *Landsberg erecta*-Wildtyps (*LER*) enzymatische Ausfälle innerhalb der Flavonoidbiosynthese. So ist in der *tt4*-Mutante die Chalconsynthase (CHS) und in der *tt5*-Mutante die Chalconisomerase (CHI) genetisch inaktiviert (SHIRLEY et al. 1992, LI et al. 1993). Während die *tt4*-Mutante keinerlei Flavonoide mehr synthetisieren kann, können in Blättern der *tt5*-Mutante noch geringe Mengen an Naringenin enthalten sein. In der *tt7*-Mutante kommt ein genetischer Ausfall der Flavonol-3'-Hydroxylase (F3'H) zum Tragen. Diese Hydroxylase katalysiert die Reaktion von Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin. Durch den genetischen Ausfall kann in den Blättern der Mutante folglich kein Dihydroquercetin bzw. Quercetin mehr synthetisiert werden. Allen drei Mutanten ist gemein, weder zur Synthese von Anthocyanen noch von Tanninen befähigt zu sein. Aus diesem Grund sind die Samenschalen (Testa) dieser Mutanten nicht wie sonst üblich rot-braun gefärbt. Sie erscheinen vielmehr farblos bzw. transparent, weshalb die Mutanten auch als Transparent-Testa-Mutanten (*tt*-Mutanten) bezeichnet werden.

Weiterhin spricht für die Verwendung von *A. thaliana* als Versuchspflanze, dass aufgrund der weltweiten Verbreitung für diese Art viele verschiedene Akzessionen bzw. Ökotypen mit unterschiedlichem Erscheinungsbild (Abbildung 1.9) und verschiedenartigen physiologischen Eigenschaften existieren (ALONSO-BLANCO & KOORNNEEF 2000). Die Herkunft dieser Akzessionen umfasst ein breites Spektrum von Standorten verschiedener geografischer Breite und Höhenlage, aufgrund derer für die verschiedenen Pflanzen auf unterschiedliche UV-B-Resistenzen geschlossen werden kann.



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.

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 verschiedene hohe UV-Strahlungsbelastungen an den ursprünglichen Herkunftsorten der verschiedenen Akzessionen zurückzuführen?

Während in den ersten beiden Teilen die Temperatur- und UV-B-abhängig gebildete UV-B-Abschirmung im Fokus der Experimente steht, soll im dritten Teil - aufgrund der kontroversen Diskussion um die Bedeutung von Flavonolen und Hydroxyzimtsäuren für die UV-B-Abschirmung - untersucht werden, welche löslichen Polyphenole für die Abschirmung in *A. thaliana* verantwortlich sind. Hierzu werden wie im zweiten Teil der Arbeit zunächst Pflanzen von *A. thaliana* während der Kultivierungsphase bei unterschiedlichen Temperaturen verschiedenen UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt. Anschließend wird die Zusammensetzung der in den Pflanzen synthetisierten löslichen Polyphenole bestimmt. Zur Beurteilung der Bedeutungen der verschiedenen Polyphenole für die Abschirmung wird hier auch die **UV-B-Akklimatisation von Polyphenol-Mangel-Mutanten** untersucht. Zentrale Fragen sind: Gibt es unterschiedliche Funktionen für Hydroxyzimtsäuren und Flavonole bei der UV-B-Abschirmung? Welche dieser Schutzpigmente werden bei Kühle vermehrt synthetisiert? In welchen

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?

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Pflanzen der Art *A. thaliana* (C. Linnaeus) G. Heynhold durchgeführt. Im Regelfall wurde hierbei der Ökotyp *Columbia* verwendet. Da einige der untersuchten Mutanten lediglich für den Ökotyp *Landsberg erecta* erhältlich waren, wurde in solchen Fällen auch dieser Ökotyp in die jeweiligen Untersuchungen mit einbezogen. Für alle in den Experimenten verwendete Pflanzen wurden zunächst bei 21 °C frische Samen generiert. Dieses Saatgut wurde im Anschluss in den jeweiligen Experimente eingesetzt. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass alle verwendete Samen gleichen Alters waren. Epigenetisch bedingte Unterschiede zwischen den Samen sollten so weitestgehend ausgeschlossen werden können. Weitere Informationen zu den Pflanzen und Samen sind in Tabelle 2.1 und 2.2 angegeben.

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 aufgeführt, 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
<i>Columbia</i> (<i>COL</i>)	unveränderter Wildtyp	(<i>COL</i> .-0)	-
<i>fah1-2</i> (<i>fah1</i>)	AT4G36220/ Ferulat 5-Hydroxylase	(<i>COL</i> .-0)	CS6172
<i>Landsberg erecta</i> (<i>LER</i>)	unveränderter Wildtyp	(<i>LER</i> .-0)	CS20
<i>tt4-1</i> (<i>tt4</i>)	AT5G13930/ Chalcon-Synthase	(<i>LER</i> .-0)	CS85
<i>tt5-1</i> (<i>tt5</i>)	AT3G55120/ Chalcon-Flavanon-Isomerase	(<i>LER</i> .-0)	CS86
<i>tt7-1</i> (<i>tt7</i>)	AT5G07990/ Flavonoid 3'-Hydroxylase	(<i>LER</i> .-0)	CS88
<i>CVI</i> (<i>CVI</i>)	unveränderter Wildtyp	(<i>CVI</i>)	M. Koornneef
<i>ORN</i> (<i>ORN</i>)	unveränderter Wildtyp	(<i>ORN</i>)	M. Koornneef
<i>SHA</i> (<i>SHA</i>)	unveränderter Wildtyp	(<i>SHA</i>)	M. Koornneef
<i>TRI</i> (<i>TRI</i>)	unveränderter Wildtyp	(<i>TRI</i>)	Eigenfund

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

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

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 Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen werden bei der Beschreibung der Experimente genauer erläutert (Abschnitt 2.9).

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

Als UV-B-Strahlungsquellen wurden für alle Experimente TL 12 UV-B Leuchtstoffröhren (Philips International B.V., Amsterdam, Niederlande) verwendet. Da diese Leuchtstoffröhren neben UV- A und - B auch UV- C emittieren, wurden sie mit UV- C-Sperrfilterfolie aus Zellulose-Acetat (0,1 mm, Jürgen Rachow Kunststoff-Folien-Vertrieb GmbH, Hamburg, Deutschland) umwickelt. Zur Bestimmung der UV-B-Bestrahlungsstärken wurden die Strahlungsquellen vor den Experimenten mit einem Spektroradiometer (Bentham DM-105 Doppelmonochromator, Bentham Instruments Ltd., Reading, England) auf ihre spektralen Intensitätsverteilungen überprüft. Ein Emissionsspektrum einer solchen Strahlungsquelle ist in Abbildung 2.1 (kleine Grafik) dargestellt.

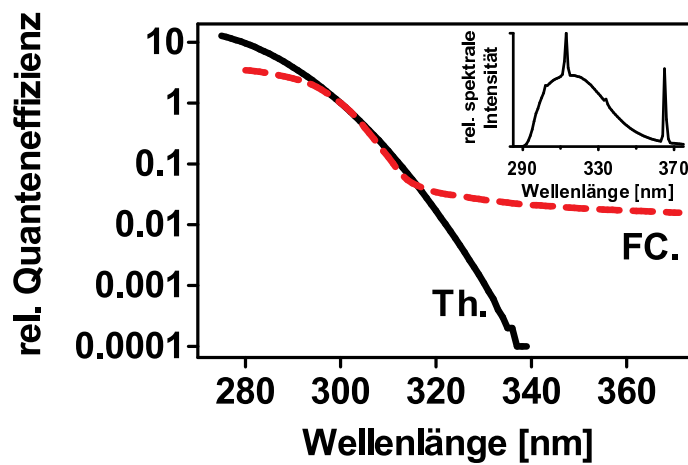
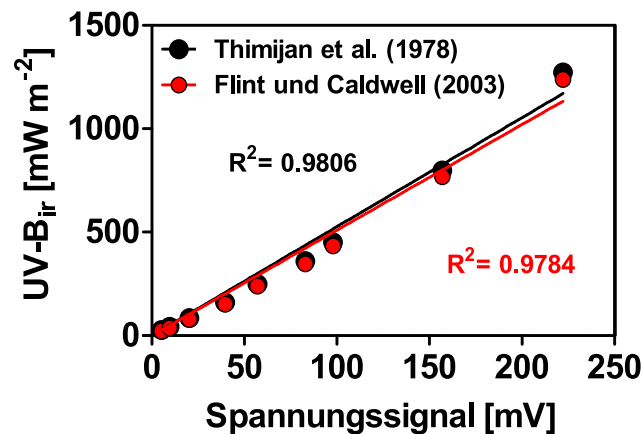


Abbildung 2.1.: Aktionsspektren zur spektralen biologischen Gewichtung von UV-Strahlungsquellen. Die durchgezogene schwarze Kurve (Th.) zeigt das UV-Aktionsspektrum, wie es von THIMIJAAN et al. (1978) veröffentlicht wurde. Die gestrichelte rote Kurve (FC.) zeigt das um den langwelligen UV-A-Bereich erweiterte UV-Aktionsspektrum von FLINT & CALDWELL (2003). Zur Abschätzung der biologischen Wirksamkeit der als UV-Quellen verwendeten TL-12 UV-B-Röhren ist ein Strahlungsspektrum einer solchen Strahlungsquelle oben rechts in die Abbildung eingefügt.

Zur raschen Bestimmung der UV-B-Strahlungsstärke während der Experimente wurde ein UV-B-Breitbandsensor (VEIT et al. 1996) verwendet. Die von diesem Sensor angegebenen Spannungssignale wurden durch vergleichende Messungen mit dem Spektroradiometer auf die UV-Strahlungsquellen kalibriert. Die in die Kalibration eingegangenen UV-Spektren wurden sowohl mit dem Aktionsspektrum von THIMIJAAN et al. (1978) als auch mit dem von FLINT & CALDWELL (2003) biologisch gewichtet. Durch die Kalibration wurden die Spannungssignale des Sensors in die eingestrahelte, biologisch gewichtete UV-B-Bestrahlungsstärke ($UV-B_{ir}$) umgeformt.

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 THIMIJAAN et al. (1978) verwendet.



Kalibrierfaktor	UV-Aktionsspektrum
$5,271 \pm 0,1859 \text{ mW m}^{-2} / \text{mV}$	THIMIJJAN et al. (1978))
$5,105 \pm 0,1915 \text{ mW m}^{-2} / \text{mV}$	FLINT & CALDWELL (2003)

Abbildung 2.2.: Kalibrierfunktionen des verwendeten UV-Breitbandsensors. Die rote Geradengleichung zeigt die Kalibrierfunktion, welche nach FLINT & CALDWELL (2003) berechnet wurde. Die schwarze Geradengleichung zeigt die nach THIMIJJAN et al. (1978) berechnete Kalibrierfunktion. Die Unterschiede zwischen den Kalibrierfaktoren sind nicht signifikant ($p = 0,6893$).

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

Zur Quantifizierung des durch UV herbeigeführten Schadens in Blättern von *A. thaliana* wurde die Abnahme der maximalen Quantenausbeute von PS II (BUTLER & KITAJIMA 1975, KITAJIMA & BUTLER 1975) nach erfolgter UV-Behandlung ermittelt. Zur Messung wurde eine Maxi-Imaging-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) (SCHREIBER 1986, BILGER & SCHREIBER 1986, BILGER et al. 1995, RALPH et al. 2005) verwendet. Diese schnelle, nicht-invasive Methode der Schadensbestimmung ermöglichte die Bearbeitung großer Stichprobenumfänge sowie die Begutachtung der Schädigung an der gesamten Pflanze. Zur Schadensbestimmung wurde das Pflanzenmaterial vor der UV-Behandlung für 30 Minuten verdunkelt. Im Anschluss daran wurde die maximale Quantenausbeute mit der Maxi-Imaging-PAM durch Gabe eines Sättigungsblitzes bestimmt. Nach der jeweiligen UV-Behandlung sowie einer weiteren sich anschließenden 30-minütigen Verdunkelungsphase wiederholte sich dieser Messvorgang. Die Abnahme der PS II-Quantenausbeute wurde in Bezug zum Ausgangsmesswert gesetzt, in Prozent angegeben und als Schädigung von PS II definiert.

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 μ l 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 μ l 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-Spectrophotometer, Kontron Instruments, Mailand, Italien) auf Eis gelagert. Die Mengen an Chlorophyll *a* in den Extrakten wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

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

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 μ m 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 Percoll-lösung (95 % [w/v] Percoll, 3 % [w/v] PEG 6000, 1 % [w/v] Ficoll, 1 % [w/v] BSA) und

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 Percolllösung 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.

Die intakten Chloroplasten hatten sich in der Grenzschicht zwischen beiden Percollphasen gesammelt und bildeten eine deutliche, grüne Bande. Bei der zweiten, etwas über der ersten liegenden Bande handelte es sich um bei der Präparation beschädigte, nicht mehr intakte Chloroplasten. Diese Bande wurde verworfen. Die Chloroplasten der unteren Bande wurden gesammelt und zur Aufreinigung mit 2 ml Isolationsmedium in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt. Es schloss sich ein letzter Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 4600 g an. Danach wurde die Qualität der isolierten Chloroplasten am Mikroskop überprüft. Die Chloroplasten waren größtenteils voll turgeszent und frei von Zellbruchstücken. Nach Messung des Chlorophyllgehalts wurden die Chloroplasten auf Whatman-Filterpapier aufgetragen und sofort für die Bestimmung der UV-Transmission verwendet.

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 Anregungslicht induzierte Chlorophyllfluoreszenz.

Bei der ersten Methode wurde eine Xenon-PAM-Fluorometer (Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) verwendet. Mit diesem Gerät ist es möglich, für zwei fest eingestellte Wellenlängenbereiche (Abschnitt 2.7.1) die mittleren epidermalen UV-Transmissionen zu ermitteln. Der Vorteil dieser Methode ist, dass aufgrund eines sehr leistungsfähigen Photodetektors mit sehr intensitätsschwachen, modulierten Anregungslichtblitzen gearbeitet werden kann. Die Lichtblitze sind in ihrer Intensität so gering, dass diese zu keiner bedeutenden Reduzierung des Plastochinonpools beitragen und die Akzeptorseiten der PS II-Reaktionszentren deshalb im offenen Zustand verbleiben. Regulierende Mechanismen der Lichtreaktion, wie z. B. das nichtphotochemische Quenching werden nicht induziert. Dadurch wird ermöglicht, dass die Chlorophyllfluoreszenz kontinuierlich auf dem konstant bleibendem Niveau der Grundfluoreszenz (F_0) bestimmt wird (Abbildung 1.7 B). Dies begünstigt auch bei Blättern mit geringen epidermalen UV-Transmissionen sehr hoch aufgelöste Messergebnisse. Der Nachteil an diesem Messgerät ist, dass lediglich für zwei

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

Für die zweite Methode wurde ein Fluoreszenzspektrometer verwendet. Mit diesem Gerät können Chlorophyll-Anregungsspektren im UV-Bereich gemessen werden, aus denen schließlich vollständige UV-Transmissionsspektren berechnet werden. Nachteilig hierbei ist die relativ geringe Empfindlichkeit des verwendeten Photodetektors im Wellenlängenbereich oberhalb von 700 nm (Abschnitt 2.7.2). Dies bedeutet, dass zur Chlorophyllanregung durch UV-Licht relativ hohe Intensitäten notwendig sind, damit überhaupt Chlorophyllfluoreszenz detektierbar wird. Im sichtbaren Wellenlängenbereich ist das Anregungslicht dagegen bereits aktinisch wirksam und führt zu einer Induktion der Fluoreszenz, wie es von KAUTSKY & HIRSCH (1931, 1934) beschrieben wurde. Aus diesem Grund ist eine relativ hohe Anzahl von Messwiederholungen pro untersuchtem Blatt notwendig. Außerdem werden mit dieser Methode wesentliche Unterschiede zwischen Blättern mit jeweils geringer UV-Transmission aufgrund des schwachen Photodetektors nur unzureichend dargestellt. Deshalb wurden für diese Methode ausschließlich Blätter ausgewählt, für die aufgrund der Kultivierungsart nur mittlere bis hohe UV-Transmissionen zu erwarten waren.

2.7.1. Xenon-PAM-Methode

Die Bestimmung der epidermalen UV-Transmission ($T(UV)$) bei Blättern erfolgte nach BILGER et al. (1997). Hierbei wird mittels zweier verschieden monochromatischer Lichtstrahlen nacheinander die Chlorophyllfluoreszenz in Blättern angeregt. Bei einem Lichtstrahl handelt es sich um den eigentlichen UV-Messstrahl. Dieser Lichtstrahl induziert, abhängig von der UV-Abschirmung sowie der Chlorophyllmenge eines Blattes, verschieden intensive Chlorophyllfluoreszenzen. Ein weiterer, blau-grüner Lichtstrahl ist der Referenzstrahl. Dieser Lichtstrahl induziert Chlorophyllfluoreszenz, deren Intensität lediglich von der Chlorophyllmenge eines Blattes abhängt. Das Verhältnis von UV-induzierter ($F(UV)$) und Blau-Grün-Licht-induzierter Chlorophyllfluoreszenz ($F(BG)$) ist variabel und allein abhängig von der UV-Abschirmung eines photosynthetisch aktiven Organismus. Bei der Xenon-PAM-Methode (Xe-PAM-Methode) werden zwei UV-Messstrahlen verschiedener Wellenlängen (314 nm für UV-B, 366 für UV-A) sowie ein blau-grüner Referenzstrahl verwendet. In Abbildung 2.3 sind die spektralen Intensitäten dieser Lichtstrahlen untereinander vergleichend dargestellt.

Die UV-Messstrahlen haben relativ hohe Intensitäten, da sowohl UV-B- wie auch UV-A-Strahlung im Vergleich zu blau-grünem Licht Chlorophyll nur schwach zur Fluoreszenz anregen. Der blau-grüne Referenzstrahl hingegen ist nur von schwacher Intensität, da Licht dieser Wellenlänge eine deutlich höhere aktinische Wirksamkeit besitzt.

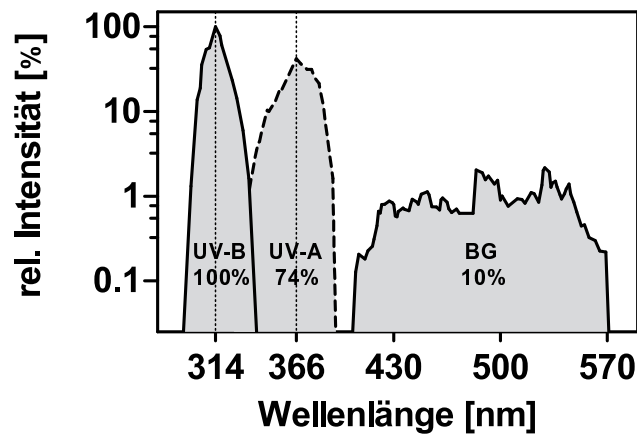


Abbildung 2.3.: Relative Unterschiede zwischen den verschiedenen Chlorophyll-Anregungsstrahlen der Xenon-PAM. Die Strahlungsintensität des UV-B-Messstrahls wurde gleich 100 % gesetzt. Die Intensitäten des UV-A-Messstrahls und des blau-grünen Referenzstrahls (BG) betragen im Vergleich dazu 74 % bzw. 10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

Das einfache Verhältnis von $F(\text{UV})$ zu $F(\text{BG})$ ist jedoch nur ein relatives Maß der epidermalen UV-Transmission von Blättern. Ein absolutes Maß ergibt sich, wenn das einfache Verhältnis von $F(\text{UV})$ zu $F(\text{BG})$ in Relation zu einem an isolierten Chloroplasten gemessenen Fluoreszenzverhältnis gesetzt wird, da isolierte und somit von der Epidermis entblößte Chloroplasten nahezu keine wirksame UV-Abschirmung mehr besitzen. Ein an ihnen gemessenes Verhältnis von $F(\text{UV})$ zu $F(\text{BG})$ darf daher als ein Fluoreszenzverhältnis betrachtet werden, welches sich bei Blättern mit einer 100%igen epidermalen UV-Transmission ergeben würde. Es wird daher als maximaler Bezugspunkt für die Berechnung der absoluten UV-Transmission betrachtet.

Für die Bestimmung dieses maximalen Bezugspunktes wurden zuvor isolierte Chloroplasten in unterschiedlicher Dichte auf Filterpapier (Nr. 1, Whatman International Ltd, Maidstone, England) aufgetragen und anschließend die jeweiligen Verhältnisse von $F(\text{UV})$ zu $F(\text{BG})$ bestimmt. Als Dichteparameter diente der auf dem Filterpapier jeweils aufgetragene Chlorophyll *a*-Gehalt. Abbildung 2.4 zeigt, dass das Verhältnis von UV-induzierter zu blau-grün-induzierter Chlorophyllfluoreszenz bei in geringer Dichte auf Filterpapier aufgetragenen Chloroplasten von dem auf dem Papier aufgetragenen Chlorophyll *a*-Gehalt abhängig ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Blätter von *A. thaliana* hatten Chlorophyll *a*-Gehalte zwischen 15 und $25 \mu\text{g cm}^{-2}$. Bei Chloroplasten,

die in dieser Dichte auf Filterpapier aufgetragen wurden, waren die Verhältnisse von UV-induzierter zu blau-grün-induzierter Chlorophyllfluoreszenz nahezu konstant. Das mittlere Verhältnis von UV-A- zu blau-grün-induzierter Chlorophyllfluoreszenz betrug hier 2,440 und das entsprechende mittlere Verhältnis für UV-B 2,112. Diese Werte dienten der vorliegenden Arbeit als maximale Bezugspunkte für die Berechnung der absoluten epidermalen UV-Transmission für Blätter von *A. thaliana*.

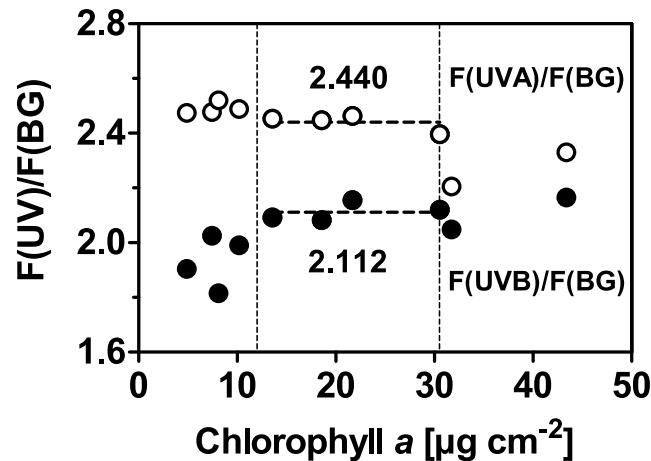


Abbildung 2.4.: Die Fluoreszenzverhältnisse $F(\text{UV})$ zu $F(\text{BG})$ von auf Filterpapier aufgetragenen Chloroplasten sind vom aufgetragenen Chlorophyll a -Gehalt abhängig. Der Chlorophyll a -Gehalt in Blättern von *A. thaliana* liegt zwischen $12 \mu\text{g}$ und $31 \mu\text{g}$. Dieser Bereich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

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

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

Für eine korrekte Gegenüberstellung der UV-Gesamtabsorption polyphenolischer Blattextrakte einerseits sowie epidermalen UV-Absorptionen andererseits (Abbildung 3.19) müssen die Werte der epidermalen UV-Absorptionen von Blattober- und -unterseite summiert werden, da in Blattextrakten die Polyphenole vollständiger Blätter enthalten sind.

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.

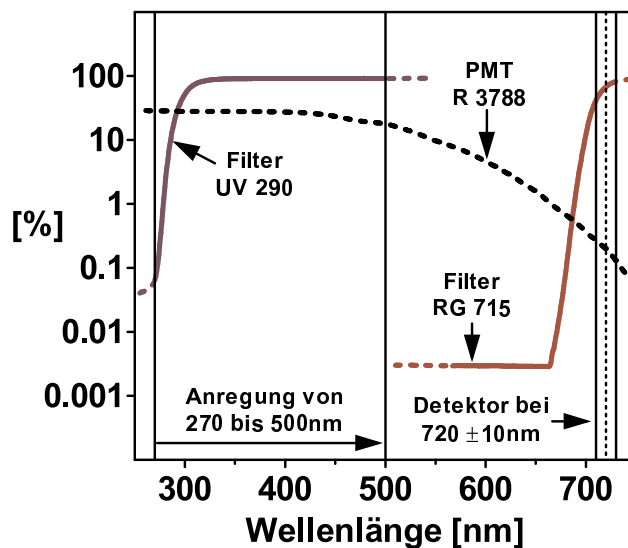


Abbildung 2.5.: Spektrale Eigenschaften verwendeter Bauteile bei der Erstellung von Chlorophyll-Anregungsspektren intakter Blätter. Für die optischen Spektralfilter UV 290 und RG 715 sind in Prozent die jeweiligen Transmissionen angegeben (farbige Kurvenverläufe). Ebenfalls in Prozent ist die spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers R 3788 als wellenlängenabhängige Quantenausbeute angegeben (schwarz-gestrichelter Kurvenverlauf). Außerdem werden die Wellenlängenbereiche für Anregung und Detektion gezeigt.

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 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD (Weißlicht) 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.

Um die epidermalen Transmissionen der gemessenen Blätter darstellen zu können, wurden die genormten Spektren in Relation zu einem normierten Anregungsspektrum aufgereinigter Chloroplasten (Abbildung 2.6) gesetzt. Für jedes in dieser Arbeit gezeigte Transmissionsspektrum wurden Spektren von drei bis vier Blättern gleicher Behandlung gemittelt. Der Standardfehler ist in den entsprechenden Abbildungen jeweils angegeben. Zur Qualitätsabschätzung der Spektren sind zusätzlich Ergebnisse von UV-Transmissionmessungen eingefügt, welche mit der Xenon-PAM-Methode für die Wellenlängen 314 nm und 365 nm gemessen wurden. Aus den Transmissionsspektren ließen sich auch epidermale UV-Absorptionsspektren berechnen. Hierzu wurde aus jedem Transmissionswert für Strahlung der Wellenlänge λ der negative, dekadische Logarithmus gebildet: $\text{Abs } \lambda = -\log(T\lambda)$

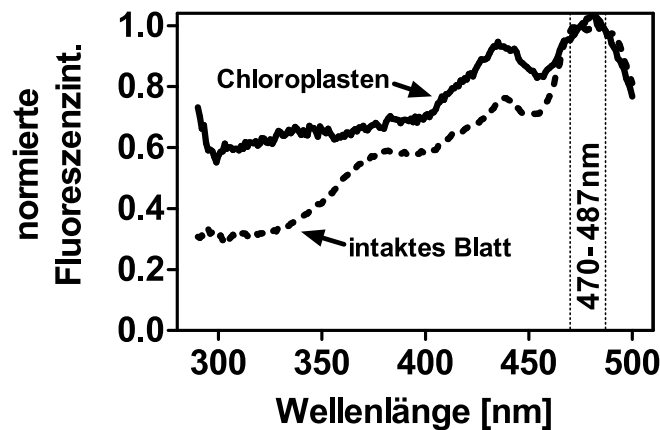


Abbildung 2.6.: Chlorophyll-Anregungsspektren von isolierten Chloroplasten (durchgezogene Linie) und einem intakten Blatt von *A. thaliana* (COL-Wildtyp). Beide Spektren wurden auf die jeweiligen Signalstärken zwischen 470 nm und 487 nm normiert.

2.8. Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffe in Blättern

Die Phenolgehalte in Blättern von *A. thaliana* wurden mittels HPLC-Analyse bestimmt. Hierzu wurden die Blätter nach der Methode von KOLB et al. (2001) und NYBAKKEN et al. (2004a) in methanolisch-wässrigen Lösungen extrahiert und die Extrakte anschließend mittels HPLC-Technik analysiert. Zur qualitativen Bestimmung der verschiedenen phenolischen Substanzen wurde eine HPLC mit angegliedertem ESI-Massenspektrometer als Detektoreinheit verwendet. Mit einem UV/VIS-Diodenarray-Detektor wurden die quantitativen Polyphenolgehalte bestimmt. Der Gehalt an Polyphenolen in einem Blatt wurde jeweils auf die zugehörige Blattfläche bezogen.

2.8.1. Extraktion

Das Blattmaterial wurde nach Lagerung bei -80°C im gefrorenen Zustand mittels einer Schwingmühle (Typ: MM2, 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, Osterode, Deutschland) und der Überstand anschließend durch einen Nylon-Filter mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ gepresst.

2.8.2. Qualitative Analyse mittels HPLC und ESI-Massenspektrometrie

Die qualitative Bestimmung der UV-absorbierenden Polyphenole in *A. thaliana* geschah mittels Massenspektrometrie. Hierzu wurden Blattextrakte von Pflanzen untersucht, bei denen aufgrund der starken UV-B-Belastung während der Pflanzenkultivierung mit besonders hohen Polyphenolgehalten zu rechnen war. Für die Bestimmung wurden die verschiedenen in den Extrakten enthaltenen polyphenolischen Substanzen zunächst mittels HPLC-Technik aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Bestimmung ihrer Molekülmassen bzw. die ihrer Fragmente über Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS).

Im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden können die Substanzen bei der ESI-Massenspektrometrie nach der chromatografischen Auftrennung zur Ionisierung im Eluenten verbleiben und sofort analysiert werden. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Vorgänge während der Elektrospray-Ionisierung ist bei IRIBARNE & THOMSON (1976) und KEBARLE & PESCHKE (2000) angegeben. Als eigentlicher Analysator

der molekularen Massen der jeweils ionisierten Substanzen wurde eine sogenannte Ionenfalle eingesetzt. Eine genaue Beschreibung ihrer Funktionsweise ist RUNGE (2003) und REHM (2006) zu entnehmen.

Durchgeführt wurden die massenspektrometrischen Untersuchungen am Institut für Lebensmitteltechnologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Wie bei der quantitativen Analyse wurde hierbei eine HPLC von Agilent der 1100 Serie verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Bei dem zusätzlich zum UV/VIS-DA-Detektor verwendeten ESI-Massenspektrometer handelte es sich ebenfalls um ein Agilent-Gerät dieser Serie (1100 LC/MSD Trap mit Elektrospray Ionisierung, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Chromatografiebedingungen blieben im Vergleich zur quantitativen Analyse unverändert. Lediglich die Ansäuerung des Eluenten geschah aufgrund der Unverträglichkeit von Salzsäure (HCl) mit dem ESI-Massenspektrometer mit Ameisensäure (0,1 %). Die ESI-MS-Geräteeinstellungen wurden unverändert von HARBAUM et al. (2007) übernommen.

Die Massenspektrometrie liefert lediglich die molekularen Massen der untersuchten Substanzen bzw. die ihrer charakteristischen Fragmente. Auf die chemische Struktur kann anhand der molekularen Massen nicht geschlossen werden. Hierzu wären z.B. NMR-spektroskopische Untersuchungen notwendig. Durch Abgleich der experimentell erhaltenen molekularen Massen der Substanzen bzw. ihrer Fragmente mit einer existierenden Datenbank (HARBAUM et al. 2007) konnten die sehr wahrscheinlichen Strukturen der phenolischen Substanzen jedoch ermittelt werden.

2.8.3. Quantitative Analyse mittels HPLC mit Diodenarray-Detektor

Zur quantitativen Analyse der phenolischen Substanzen in Blättern wurde eine HPLC mit einer kühlbaren Probenhalterung und einem UV/VIS-Diodenarray-Detektor verwendet. Hierbei handelte es sich um ein Gerät der Serie 1100 von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Das Injektionsvolumen variierte bei den verschiedenen Messreihen zwischen 10 und 40 μ l. Die Proben der verschiedenen Messreihen wurden vor der Injektion jeweils in einem Probenhalter gekühlt bei 4 °C aufbewahrt. Bei der festen Phase handelte es sich um eine Lichrosphere-RP-18-Säule von Agilent mit der Länge von 250 mm und einem Durchmesser von 4 mm. Bei der mobilen Phase handelte es sich um angesäuertes (0,01 % [v/v], o-Phosphorsäure) Methanol in wässriger Lösung. Die genaue prozentuale Zusammensetzung des Eluenten über die Zeit ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

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

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.

Zeit [min.]	Methanol im Eluenten [% v./v.]	Fluss [ml min. ⁻¹]
0	20	0,750
12	45	0,750
25	45	0,750
40	75	0,750
42	100	0,750
50	100	0,750
52	20	0,750

Messreihen die molaren Empfindlichkeiten des DA-Detektors für diese Substanzen ermittelt. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Reinsubstanzen als Kalibrationsstandards verwendet. Zur Kalibration des Detektors auf Hydroxyzimtsäuren wurde dessen molare Empfindlichkeit für reines Sinapin ermittelt. Zur Kalibration des DA-Detektors auf Flavonole wurden Konzentrationsreihen mit Aglyka von Kämpferol und Quercetin verwendet. Für Sinapin wurde die Absorptionserniedrigung bei 314 nm, für Flavonole die Absorptionserniedrigung bei 360 nm, mit einer jeweiligen Spaltweite von 16 nm, gemessen. Die ermittelten Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

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

Substanz	Kalibrierfunktion	R ²
Kämpferol	$m = OD_{360nm} \cdot 0,9595 \text{ nmol/AUs} + 0,01633 \text{ nmol}$	0,9988
Quercetin	$m = OD_{360nm} \cdot 0,7929 \text{ nmol/AUs} + 0,03055 \text{ nmol}$	0,9985
Sinapin	$m = OD_{314nm} \cdot 0,8842 \text{ nmol/AUs} + 0,05272 \text{ nmol}$	0,9963

Zur Überwachung der Stabilität des Systems wurden diese Kalibrationen regelmäßig wiederholt und miteinander verglichen. Als Nachweis für die Signalstabilität des DA-Detektors während der Messreihen sind in Abbildung 2.7 zwei Kalibrationskurven für Kämpferol dargestellt. Das Ergebnis der AnCoVa mit einem p-Wert von $p = 0,0744$ ergibt keine statistisch abgesicherten Unterschiede zwischen beiden Kalibrationskurven. Die Kalibrationskurven für Quercetin und Sinapin sind im Anhang aufgeführt.

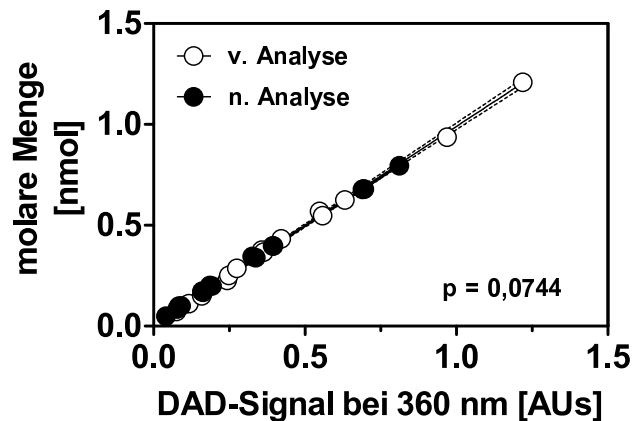


Abbildung 2.7.: Kontrolle des DA-Detektors auf Signalstabilität während der Messreihe durch Kalibration vor (weiße Symbole, $R^2 = 0,9982$) und nach der HPLC-Analyse (dunkle Symbole, $R^2 = 0,9995$) auf Kämpferol. Das Ergebnis (p-Wert) des statistischen Tests auf unterschiedliche Steigung (AnCoVa) ist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

2.8.4. Rekonstruktion von Extinktionsspektren

Zur Qualitätsabschätzung der epidermalen Absorptionsspektren von Blättern wurden Extinktionsspektren rekonstruiert, welche sich bei Extraktion der in diesen Blättern enthaltenen Polyphenole in wässrigen Methanollösungen ergeben hätten. Berechnet wurden diese Spektren aus den Daten der quantitativen Polyphenolbestimmung sowie entsprechenden spektral aufgelösten, molaren Extinktionskoeffizienten.

Zur Erstellung solcher Extinktionskoeffizienten wurden zunächst definierte Mengen an Kämpferol, Quercetin, Sinapin- und Ferulasäure als Aglyka eingewogen und anschließend in 50 %igem Methanol gelöst (vgl. Extraktionsmedium in Kapitel 2.8.1). Von den Stammlösungen dieser Aglyka wurden jeweils Verdünnungsreihen angefertigt (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500). Die Absorptionsspektren dieser Verdünnungsreihen wurden anschließend photometrisch bestimmt. Absorptionsspektren mit Optischen Dichten (OD) über 0,8 wurden verworfen. Die Absorptionen der anderen Spektren wurden jeweils auf die in den Küvetten vorliegenden molaren Aglykon-Konzentrationen bezogen. Auf diese Weise wurden spektral aufgelöste, molare Extinktionskoeffizienten für die verschiedenen Polyphenol-Aglyka generiert. Für die in Abbildung 1.6 dargestellten Extinktionskoeffizienten wurden jeweils drei solcher Spektren gemittelt.

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 & PFÜNDEL (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

Im Folgenden wird für alle Experimente die jeweilige Art der Kultivierung bzw. der experimentellen Behandlung der Pflanzen erläutert. Neben der Art der Bestrahlung und Temperaturbehandlung werden die jeweils verwendeten Akzessionen bzw. Deletionsmutanten genannt. Die genauere Beschreibung dieser Pflanzen kann in Abschnitt 2.1 eingesehen werden.

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 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD bestrahlt. Die Bestrahlungsstärken der restlichen drei Gruppen betragen 80, 180 und $220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD. Verwendet wurden für diese Experimente lediglich Pflanzen des Ökotyps *Columbia*.

Pflanzenbehandlung

1. Bei 21 °C kultivierte Pflanzen mit gleicher epidermaler UV-B-Transmission ($T(\text{UV-B}) = 0,328$) wurden in Klimaschränken (CLF-Plant-Climatics, CLF Laborgeräte GmbH, Emersacker, Deutschland) bei 9 °C und 21 °C und einer PPFD von $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ für 2,5 h mit UV-B behandelt. Die UV-B-Bestrahlungsstärke (UV-B_{ir}) lag hierbei zwischen 0 und etwa $0,45 \text{ W m}^{-2}$. 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 $0,52 \text{ W m}^{-2}$ eingestellt. Zusätzlich wurden die Pflanzen mit einer PPFD von $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 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 $0,21 \text{ W m}^{-2}$ und einer PPFD von $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 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 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.
4. Zunächst wurden die epidermalen UV-B-Transmissionen der bei 21 °C und 9 °C kultivierten Pflanzen bestimmt ($T(\text{UV-B})$ bei 21 °C: $0,328 \pm 0,0678$, $T(\text{UV-B})$ bei 9 °C: $0,187 \pm 0,0426$). Anschließend wurden die Pflanzen für 2,5 h mit UV-B und einer PPFD von $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bestrahlt. UV-B_{ir} betrug hierbei zwischen 0 und $0,62 \text{ W m}^{-2}$. Vor und nach der Behandlung wurde für jede Pflanze die maximale Quantenausbeute von PS II gemessen.

2.9.2. Temperaturabhängige UV-B-Akklimation 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 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD erhöht. Zusätzlich wurde für diesen Zeitraum eine UV-B-Strahlungsquelle eingeschaltet. Die biologisch effektiv gewichtete Strahlungsintensität (THIMIJAAN 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-Akklimation 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 *fah1* 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 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD erhöht. Zusätzlich wurde für diesen Zeitraum eine UV-B-Strahlungsquelle eingeschaltet. Die biologisch gewichtete Strahlungsintensität (THIMIJAAN 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.

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.

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 eingestrahnten 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 $0,4 \text{ W m}^{-2}$ 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.

In einem weiteren Experiment wurde nicht die eingestrahlte UV-B-Intensität, sondern die epidermale UV-B-Abschirmung der Versuchspflanzen variiert (Abbildung 3.1.B). Dies geschah, indem zur Kultivierung bei 21 °C verschiedene PAR-Bestrahlungsstärken verwendet wurden, während des Experiments jedoch alle Pflanzen bei einheitlicher PPFD und gleicher UV-B-Intensität behandelt wurden. Auch hier zeigte sich, dass im Vergleich zu 21 °C eine UV-B-Behandlung bei 9 °C zu einer deutlich größeren Schädigung von PS II führte. Zudem war ein scheinbar linearer Zusammenhang zwischen epidermaler UV-B-Transmission und der Schädigung von PS II zu erkennen. Die in den Abbildungen 3.1.A

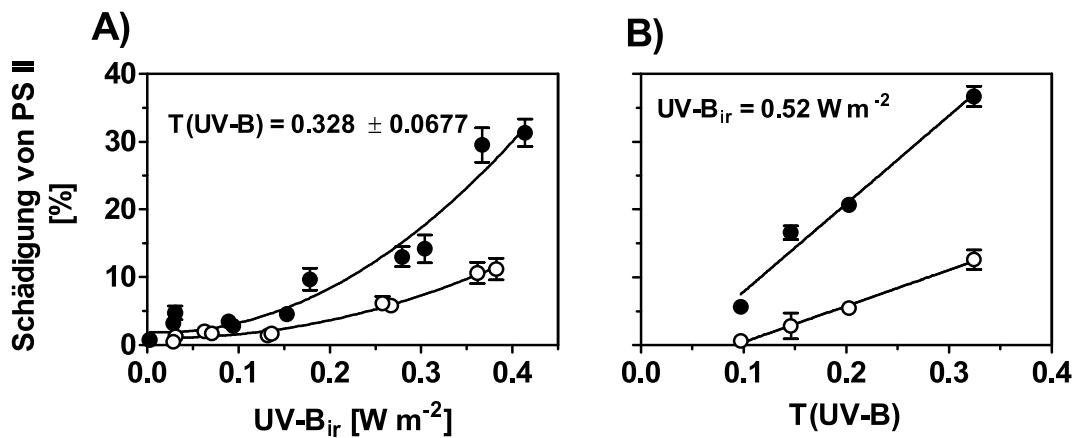


Abbildung 3.1.: **A)** Von der UV-B-Strahlung abhängige Schädigung von PS II nach 2,5 h bei 21 °C (weiße Symbole) und 9 °C (schwarze Symbole) bei gleicher epidermaler UV-B-Transmission. $n = 3$, $\pm SEM$. **B)** Von der epidermalen UV-B-Transmission abhängige Schädigung von PS II nach 2,5 h bei 21 °C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

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 Reparaturreaktionen 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 $0,21 \text{ W m}^{-2}$ $UV-B_{ef}$ behandelt. Zur Regeneration wurde von jeder Anzuchtgruppe eine Hälfte bei 21 °C und die andere Hälfte bei 9 °C und einer PPFd von jeweils $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 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).

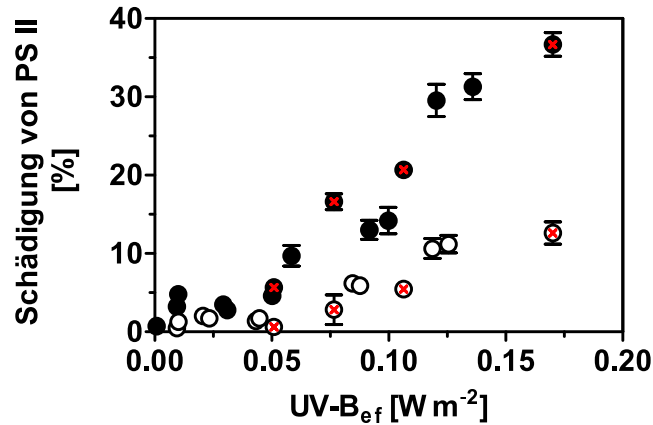


Abbildung 3.2.: Schädigung von PS II in Abhängigkeit von der effektiven UV-B-Bestrahlungsstärke nach 2,5 h bei 21 °C (weiße Symbole) und 9 °C (schwarze Symbole). Datenpunkte ohne Markierung wurden aus in Abbildung 3.1.A gezeigten Messwerten und Datenpunkte mit roter Markierung aus in Abbildung 3.1.B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

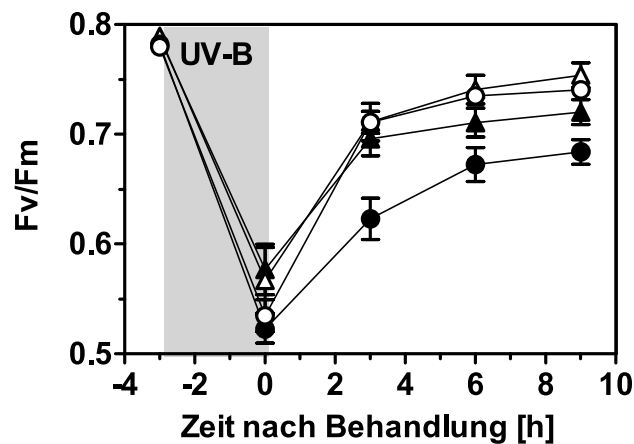


Abbildung 3.3.: Regenerationsverlauf von PS II nach 3 h Bestrahlung mit $0,21 \text{ W m}^{-2}$ UV-B_{ef} bei 9 °C. Die Regeneration erfolgte bei 21 °C (weiße Symbole) und 9 °C (schwarze Symbole). Die Kultivierung erfolgte bei 9 °C (Dreiecke) und bei 21 °C (Kreise). $n \geq 15$, $\pm CI 95\%$, $p < 0,0001$.

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.

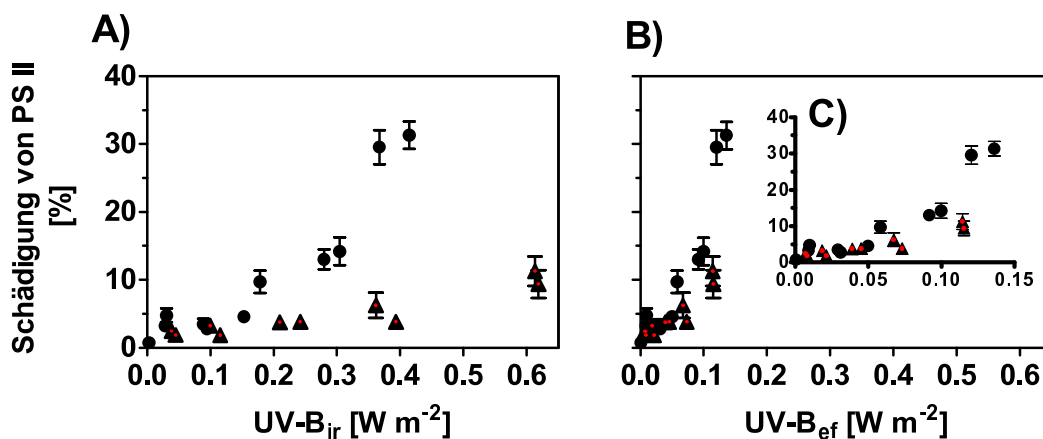


Abbildung 3.4.: **A)** Von UV-B_{ir} abhängige Schädigung von PS II zweier verschiedener Versuchsgruppen nach 2,5 h bei 9 °C. Die Kultivierung erfolgte bei 9 °C (Dreiecke mit roter Markierung) und bei 21 °C (Kreise). n = 3, ±SEM. **B)** Schädigung von PS II in Abhängigkeit zum effektiven UV-B (UV-B_{ef}) 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-B_{ef}.

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-B_{ef} aufgetragen wird. In dieser Darstellungsweise ist die je-

weils verwendete UV-B-Bestrahlungsstärke um die epidermale UV-B-Abschirmung korrigiert und die PS II-Schädigung steht somit in direkter Abhängigkeit zu der die Chloroplasten tatsächlich erreichenden UV-B-Strahlung. Die zuvor in Abbildung 3.4.A noch sehr großen Abstände zwischen den Kurvenverläufen beider Kultivierungsgruppen werden in 3.4.B wesentlich kleiner. Dies deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen UV-B-Resistenzen zwischen beiden Pflanzengruppen größtenteils durch unterschiedliche epidermale UV-Abschirmungen verursacht wurden. Die zwischen den Kurvenverläufen in Abbildung 3.4.C dennoch verbleibenden Unterschiede weisen auf zusätzlich vorhandene unterschiedliche UV-B-Toleranzen zwischen beiden Kultivierungsgruppen hin, deren Ursache sehr wahrscheinlich in den in Abbildung 3.3 gezeigten, verschieden schnellen PS II-Reparaturraten der Anzuchtgruppen begründet liegt.

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

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

Mit den bisherigen Experimenten wurde die Funktion der in *A. thaliana* von der Anzuchtstemperatur abhängig gebildeten UV-B-Abschirmung untersucht. Für diese Funktionsanalyse erwies sich die Berechnung der in den Versuchspflanzen jeweils effektiv wirksamen UV-B-Bestrahlungsstärke ($UV-B_{ef}$) als äußerst hilfreich. Mit dem folgenden Experiment sollte die temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation des *Columbia*-Ökotyps von *A. thaliana* (*COL*) untersucht werden. Hierzu wurden solche Pflanzen über mehrere Tage in Klimaschränken bei 9 °C und 21 °C kultiviert und dabei verschiedenen, aber jeweils konstant bleibenden UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt. Nach einer 14-tägigen Phase der UV-B-Akklimatisation wurde für jede Pflanze die epidermale UV-B-Abschirmung sowie die Schädigung von PS II bestimmt.

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.

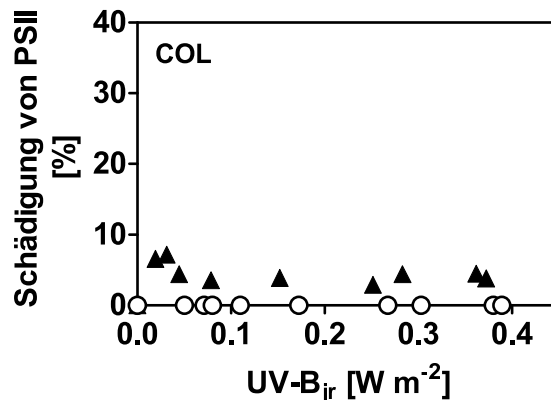


Abbildung 3.5.: Schädigung von Photosystem II in Blättern des Ökotyps *COL* nach 14-tägiger Kultivierung bei 9 °C (schwarze Symbole) und 21 °C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten. $R^2 = 0,3473$ bei 21 °C und $R^2 = 0,0029$ bei 9 °C, $n = 6$, $\pm CI95\%$.

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 $UV-B_{ir}$ 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 eingestrahlt 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 eingestrahlt 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 einfacheren 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 $UV-B_{ir}$ an. In beiden Fällen jedoch scheint die effektiv wirksame UV-B-Strahlung gegen einen niedrigen, maximalen Grenzwert zu streben. So erreicht

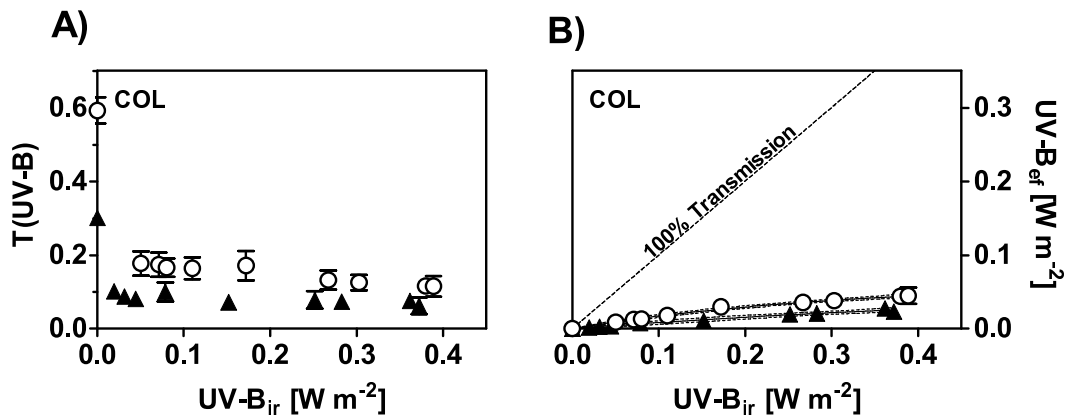


Abbildung 3.6.: Anpassung der UV-B-Abschirmung in Blättern des Ökotyps *COL* an Temperatur und UV-B-Einstrahlung. **A)** Anpassung von $T(\text{UV-B})$ in Blättern des *COL*-Ökotyps von *A. thaliana* nach 14-tägiger Kultivierung bei 9°C (schwarze Symbole) und 21°C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten und **B)** daraus berechnetes UV-B_{ef} in selbigen Blättern. $n = 6$, $\pm SEM$. Bestimmtheitsmaße für in Grafik B) dargestellte Regressionskurven: $R^2 = 0,9948$ bei 21°C , $R^2 = 0,9833$ bei 9°C . Durchgezogene Linien stellen den Verlauf der Regressionskurven dar, die gestrichelten Linien beschreiben jeweils die 99% igen Vertrauensbereiche ($\pm CI_{99\%}$) dieser Regressionskurven.

bei 21°C und der höchsten eingestrahelten UV-B-Intensität von etwa $0,39 \text{ W m}^{-2}$ das UV-B_{ef} lediglich einen maximalen Wert von etwa $0,045 \text{ W m}^{-2}$, bei 9°C und ähnlichen UV-B-Bestrahlungsstärken (max. etwa $0,38 \text{ W m}^{-2}$) liegt der maximale Wert für UV-B_{ef} bei etwa $0,025 \text{ W m}^{-2}$. Die Regressionsanalyse an den Messreihen beider Temperaturgruppen ergibt einen jeweils nicht-linearen Zusammenhang zwischen UV-B_{ef} und UV-B_{ir} mit jeweils sehr hohen Regressionskoeffizienten ($R^2 = 0,9948$ bei 21°C und $R^2 = 0,9833$ 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).

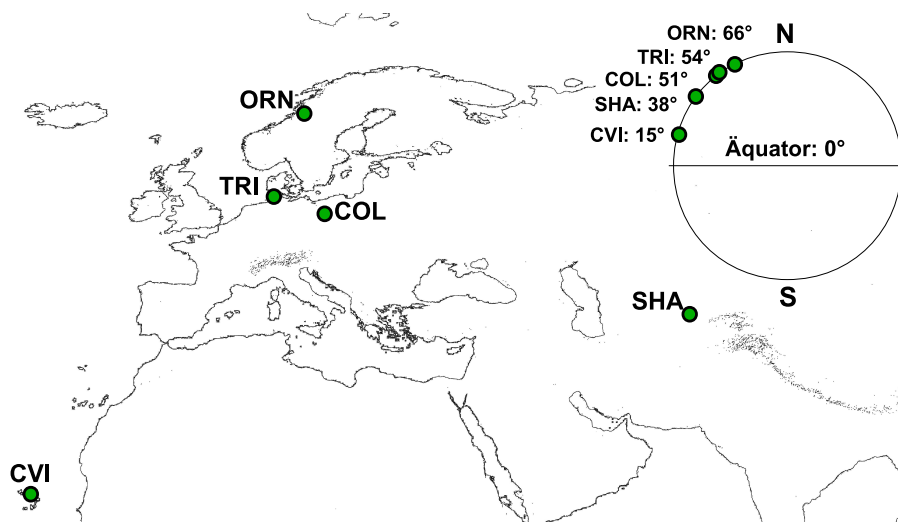


Abbildung 3.7.: Karte mit Fundorten der untersuchten Akzessionen von *A. thaliana*: *ORN* - Mittelnorwegen, *TRI* - Deutschland (Trischen), *COL* - Polen, *SHA* - Tadschikistan (Pamiro-Alay), *CVI* - Capverdische Inseln. Die jeweiligen Breitengrade der Fundorte sind in der kleinen Grafik dargestellt.

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 eingestrahelten UV-B-Bestrahlungsstärke korrelierten (Abbildung 3.8), könnte die PS II-Schädigung auch unabhängig von $UV-B_{ir}$ sein.

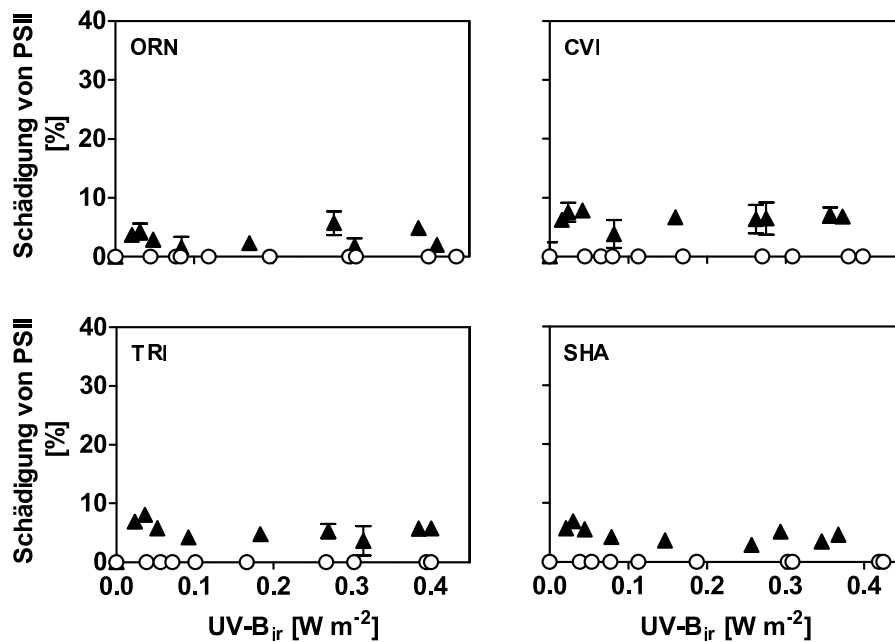


Abbildung 3.8.: Schädigung von PS II in Blättern verschiedener Akzessionen von *A. thaliana* (*ORN* - Mittelnorwegen, *TRI* - Deutschland (Trischen), *SHA* - Tadschikistan (Pamiro-Alay), *CVI* - Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 9 °C (schwarze Symbole) und 21 °C (weiße Symbole) im 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*). $n = 6$, $\pm CI95\%$.

Wie bereits beschrieben wurden neben der Schädigung von PS II auch die epidermalen UV-B-Transmissionen (T(UV-B)) der Rosettenblätter an den verschiedenen Versuchspflanzen 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 Versuchspflanzen jeweils in Abhängigkeit zur eingestrahlt 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 eingeregelt 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

Ökotyps *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.

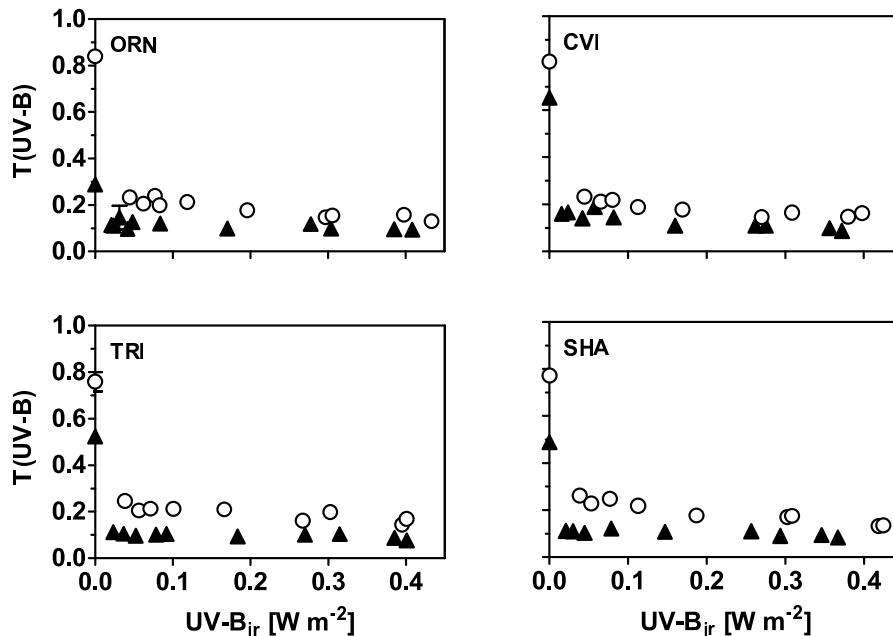


Abbildung 3.9.: Akklimation von $T(\text{UV-B})$ bei Blättern verschiedener *Arabidopsis*-Akzessionen (*ORN*-Mittelnorwegen, *TRI*-Deutschland (Trischen), *SHA*-Tadschikistan (Pamiro-Alay), *CVI*-Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 9°C (schwarze Symbole) und 21°C (weiße Symbole) im UV-B-Gradienten. $n = 6$, $\pm \text{SEM}$.

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 überschneidenden 99 %igen Vertrauensbereiche der eingetragenen Regressionskurven zeigen, dass diese Unterschiede bei allen Akzessionen hoch signifikant waren. Auch schien 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 verschiedenen 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

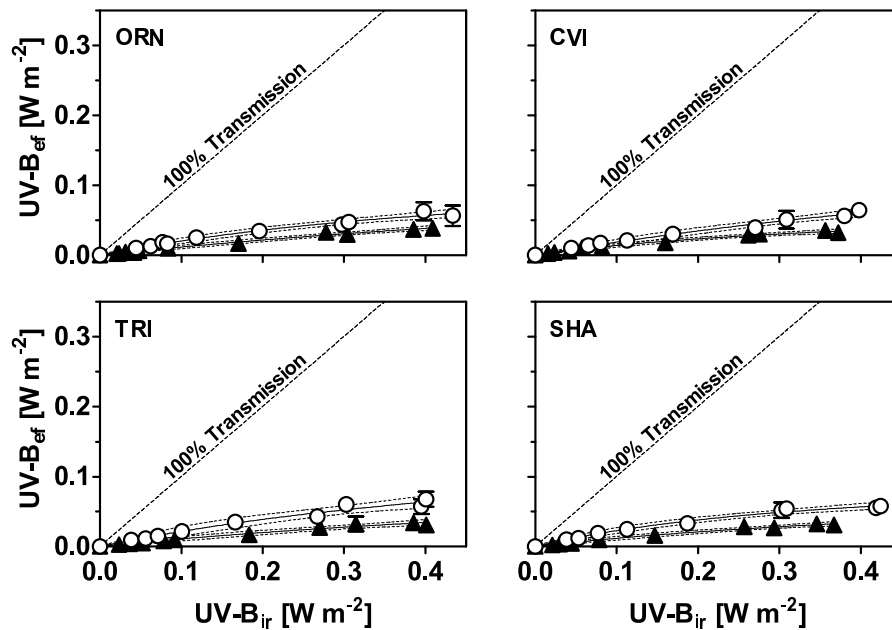


Abbildung 3.10.: Anpassung des $UV-B_{ef}$ in Blättern verschiedener *Arabidopsis*-Akzessionen (*ORN* - Mittelnorwegen, *TRI* - Deutschland (Trischen), *SHA* - Tadschikistan (Pamiro-Alay), *CVI* - Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei $9^{\circ}C$ (schwarze Symbole) und $21^{\circ}C$ (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 $UV-B_{ir}$ einheitlicher Verlauf des $UV-B_{ef}$ zu existieren.

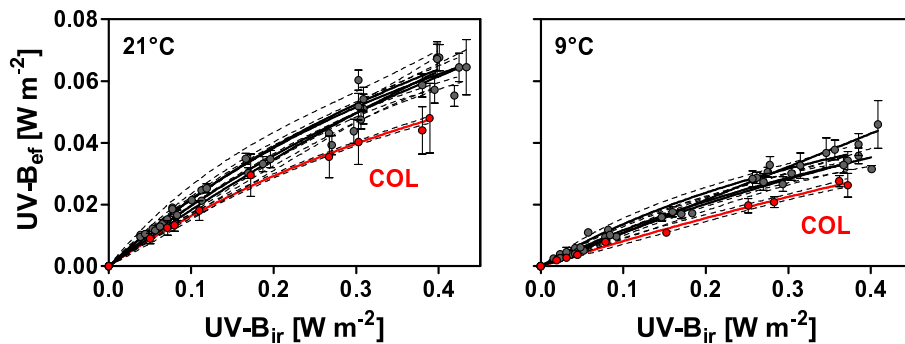


Abbildung 3.11.: Anpassung des $UV-B_{ef}$ in Blättern verschiedener *Arabidopsis*-Akzessionen (*COL*-Columbia, *ORN*-Mittelnorwegen, *TRI*-Deutschland (Trischen), *SHA*-Tadschikistan, *CVI*-Capverdische Inseln) nach 14-tägiger Kultivierung bei 21 °C (linke Grafik) und 9 °C (rechte Grafik) im UV-B-Gradienten. Ebenfalls eingetragen sind die aus den Messdaten berechneten Regressionskurven. Die Regressionskurve zum *COL*-Wildtyp ist farblich (rot) abgesetzt. R^2 bei 21 °C = 0,9948 (*COL*), 0,9835 (*ORN*), 0,9852 (*CVI*), 0,9733 (*TRI*), 0,9882 (*SHA*). R^2 bei 9 °C = 0,9833 (*COL*), 0,9904 (*ORN*), 0,9881 (*CVI*), 0,9803 (*TRI*), 0,9891 (*SHA*). $n = 6$, $\pm CI99\%$.

3.3. Temperaturabhängige UV-B-Akklimatisation durch Polyphenole

Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse beschreiben, wie die polyphenolischen Substanzgruppen der Hydroxycimtsäuren 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 *fah1*-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 $0,55 \text{ W m}^{-2}$ kultiviert. Nach der Akklimatisation 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-

net. Neben diesen nicht-invasiven Methoden wurden für alle Versuchspflanzen über ESI-MS- und DAD-HPLC-Analysen der spezifische Blattgehalt an abschirmungsrelevanten Polyphenolen bestimmt.

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 Schädigungen 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 $0,3 \text{ W m}^{-2}$ sowie bei 9 °C ab etwa $0,5 \text{ W m}^{-2}$ 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 $0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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 $0,05 \text{ W m}^{-2}$ 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-B_{ef}

Wie in Abschnitt 3.1 bereits gezeigt wurde, wirkt UV-B bei niedriger Temperatur schädiger als bei moderater Temperatur. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Pflanzen in der Lage sind, dies durch eine erhöhte epidermale UV-Abschirmung zu kompensieren. Diese

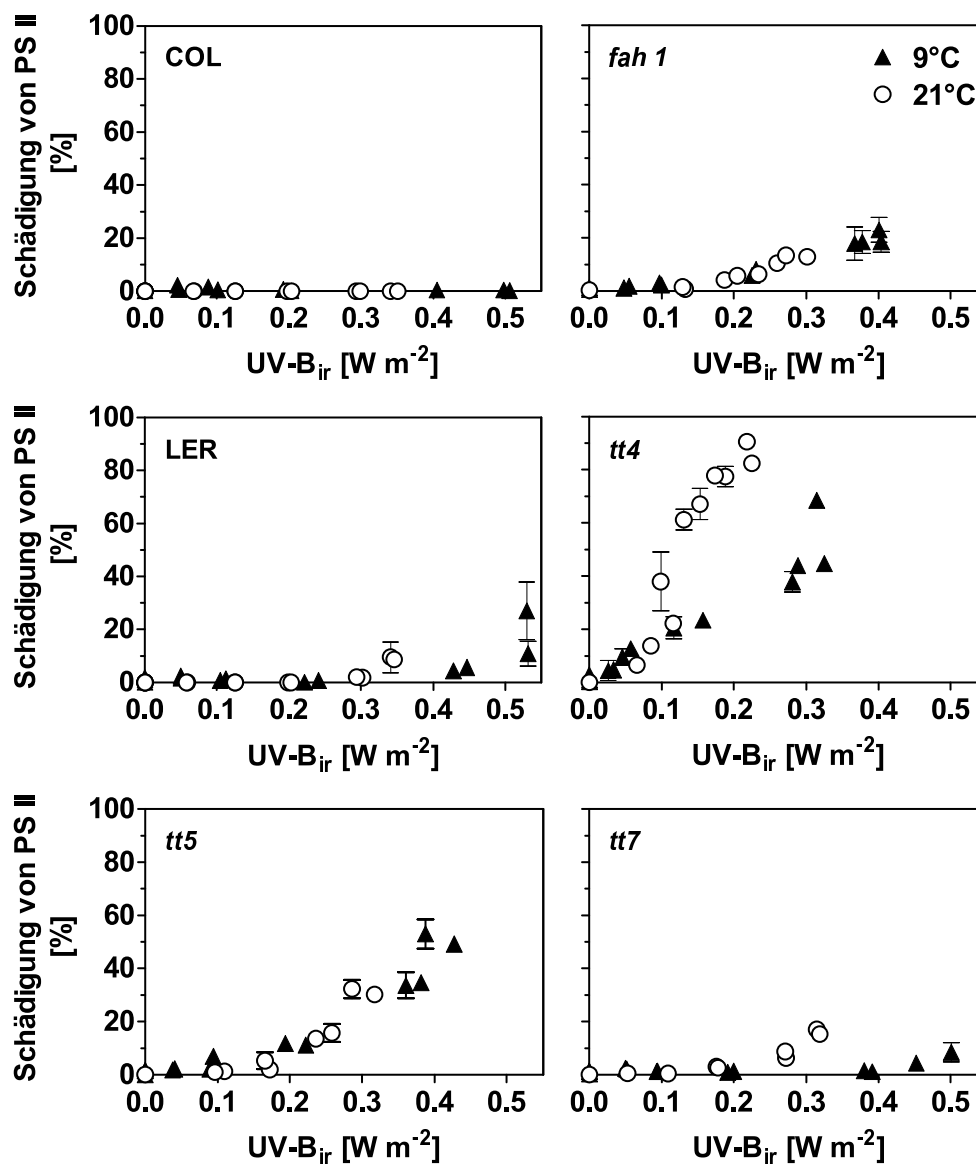


Abbildung 3.12.: Schädigung von PS II in Blättern der Wildtypen *Columbia* (*COL*) und *Landsberg erecta* (*LER*) sowie der Deletionsmutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 9°C (schwarze Dreiecke) und 21°C (weiße Kreise) im UV-B-Gradienten. $n = 3$, $\pm SEM$.

Kompensationsreaktion bei an niedrige Temperaturen akklimatisierten Pflanzen führt zu einer deutlichen Verminderung von $UV-B_{ef}$. In Abbildung 3.13 wird die Fähigkeit der Versuchspflanzen 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 eingestahlten UV-B ($UV-B_{ir}$) bei einer epidermalen 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 $0,5 \text{ W m}^{-2}$ ansteigenden UV-B-Bestrahlungsstärke nur bis auf einen gemittelten Maximalwert von etwa $0,03 \text{ W m}^{-2}$ an. Dieser Maximalwert für das $UV-B_{ef}$ wurde bereits in Blättern von Pflanzen erreicht, die mit einer UV-Bestrahlungsstärke von nur $0,12 \text{ W m}^{-2}$ behandelt wurden. Bei 9 °C stieg das maximale $UV-B_{ef}$ in den Wildtyp-Pflanzen hingegen nur bis auf einen gemittelten Wert von $0,02 \text{ W m}^{-2}$ an und blieb dann unabhängig von einer weiteren Erhöhung des eingestrahnten 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 $0,04 \text{ W m}^{-2}$ gemessen. Bei 9 °C lagen diese Werte jedoch ebenfalls bei $0,02 \text{ W m}^{-2}$. 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 Bestrahlungsstärke von $0,4 \text{ W m}^{-2}$ nahm das $UV-B_{ef}$ wieder deutlich zu und erreichte im Maximum beinahe $0,1 \text{ W m}^{-2}$.

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 eingestrahnten UV-B-Intensität das $UV-B_{ef}$ bis auf etwa $0,17 \text{ W m}^{-2}$ 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 $0,4 \text{ W m}^{-2}$ etwa $0,12 \text{ W m}^{-2}$ und war damit sogar um das sechsfache größer als das $UV-B_{ef}$, welches sich im *COL*-Wildtyp eingestellt hatte.

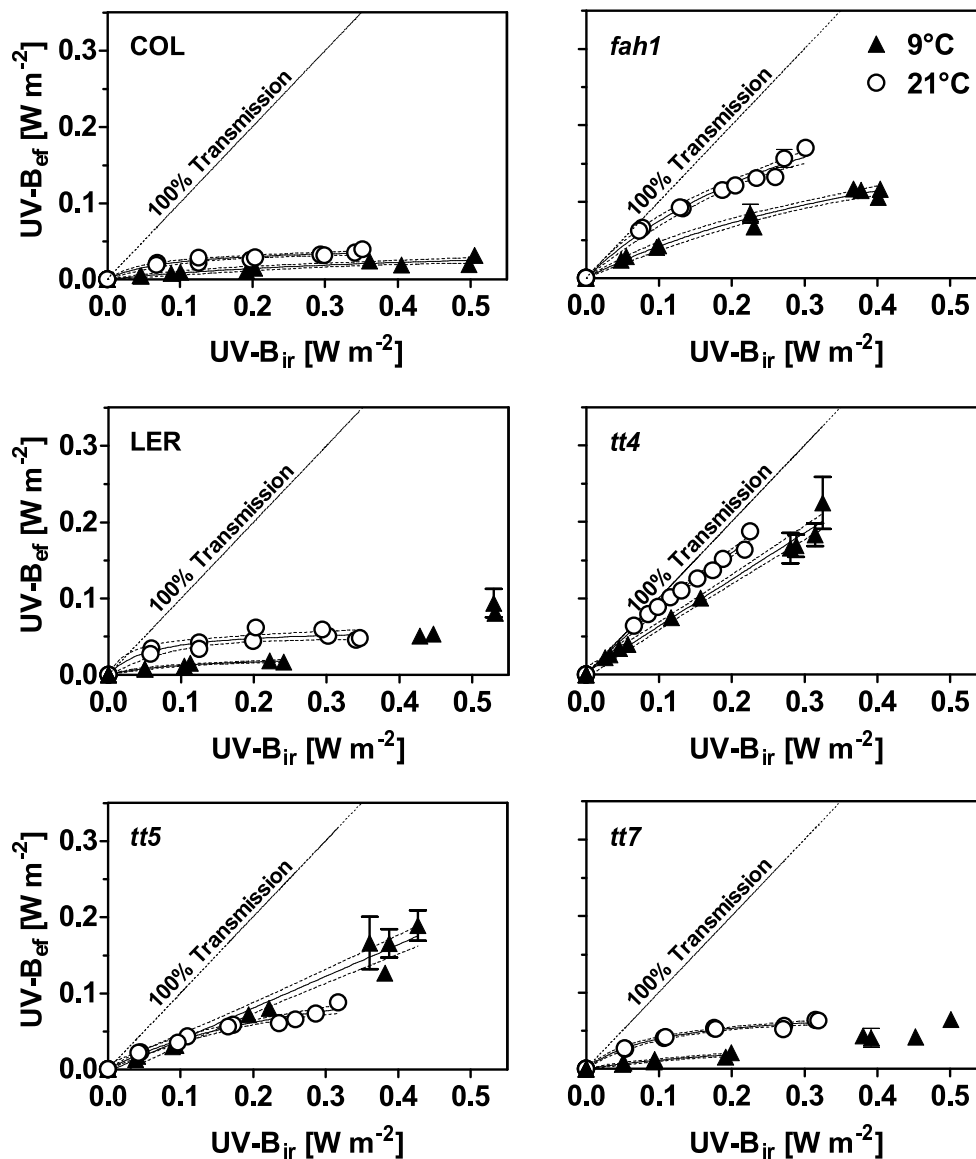


Abbildung 3.13.: Langfristige Anpassung des $UV-B_{ef}$ durch Abschirmung in Blättern der Wildtypen *Columbia* (COL) und *Landsberg erecta* (LER) sowie der Deletionsmutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 9 °C (schwarze Dreiecke) und 21 °C (weiße Kreise) im UV-B-Gradienten. Die berechneten Funktionsverläufe der Regressionen (durchgezogene Linien) und zugehörige $\pm CI_{95\%}$ (gestrichelte Linien) sind eingetragen. $n=3$, $\pm SEM$. Zugehörige epidermale UV-B-Transmissionen sind auf Seite 148 in Abbildung A.3 dargestellt.

Einen dem der *fah1*-Mutante sehr ähnlichen Verlauf des $UV-B_{ef}$ zeigte die nicht zur Flavonolsynthese befähigte *tt5*-Mutante. Jedoch war in ihrem Fall keine durch Kühle induzierbare Absenkung von $UV-B_{ef}$ zu beobachten. Während die Blattepidermen der *fah1*- und der *tt5*-Mutanten jeweils noch eingeschränkt zur Absenkung von $UV-B_{ef}$ 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 $UV-B_{ir}$ 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 $UV-B_{ef}$ zu $UV-B_{ir}$ 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 Datensätzen 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

Flavonole und Hydroxyzimtsäuren haben unterschiedliche spektrale Absorptionseigenschaften im UV-Wellenlängenbereich. Während Flavonole von 300 nm bis etwa 390 nm ein relativ breites Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei etwa 360 nm besitzen, reicht das Absorptionsspektrum von Hydroxyzimtsäuren nur bis etwa 370 nm. Das Absorptionsmaximum von Hydroxyzimtsäuren liegt bei etwa 330 nm und damit im erheblich kurzwelligeren Wellenlängenbereich als das der Flavonole. Zudem sind die Extinktionskoeffizienten deutlich verschieden. Bereits geringe Mengen an Hydroxyzimtsäuren führen zu einer starken Absorption von UV-B-Strahlung. Bei Flavonolen muss für eine entsprechende UV-B-Absorption etwa die doppelte Menge eingesetzt werden. Aufgrund der unterschiedlichen optischen Eigenschaften dieser phenolischen Substanzen ist anzunehmen, dass Flavonole und Hydroxyzimtsäuren bei der epidermalen UV-Abschirmung un-

terschiedliche UV-Wellenlängenbereiche abdecken. Deshalb wurden die bereits genannten Deletionsmutanten auf Unterschiede in ihrer epidermalen UV-Abschirmung 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} , $0,1 \text{ W m}^{-2}$ und $0,2 \text{ W m}^{-2}$ angezogen. Anschließend wurden Chlorophyllanregungsspektren der Blätter aufgezeichnet, um UV-Transmissionsspektren berechnen zu können.

In den Abbildungen 3.14 und 3.15 sind die Ergebnisse nach jeweiliger Anzuchtstemperatur getrennt dargestellt. Die Bereiche der Standardfehler sind gestrichelt angegeben. Zum qualitativen Vergleich sind die UV-Transmissionswerte für die Wellenlängen 314 nm und 365 nm eingefügt, welche an denselben Blättern mittels der Xenon-PAM-Methode gemessen wurden. Aus Abbildung 3.14 wird deutlich, dass die untersuchten Pflanzentypen bei 21 °C auf steigende UV-Belastungen mit einer abnehmenden Durchlässigkeit der Epidermis für UV-Strahlung unterhalb von 380 nm reagieren. Lediglich die *tt4*-Mutante zeigt erst unterhalb von 340 nm eine derartige Reaktion. Im längerwelligen UV-Strahlungsbereich ist bei dieser Mutante keine derartige Reaktion erkennbar.

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 $0,1 \text{ W m}^{-2}$ 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 $0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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 *tt5*- und *tt7*-Mutanten zeigen dem *LER*-Wildtyp entsprechende 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 *fah1*- und *tt4*-Deletionsmutanten deutliche Unterschiede auf. In Blättern der *fah1*-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 $0,1 \text{ W m}^{-2}$ und

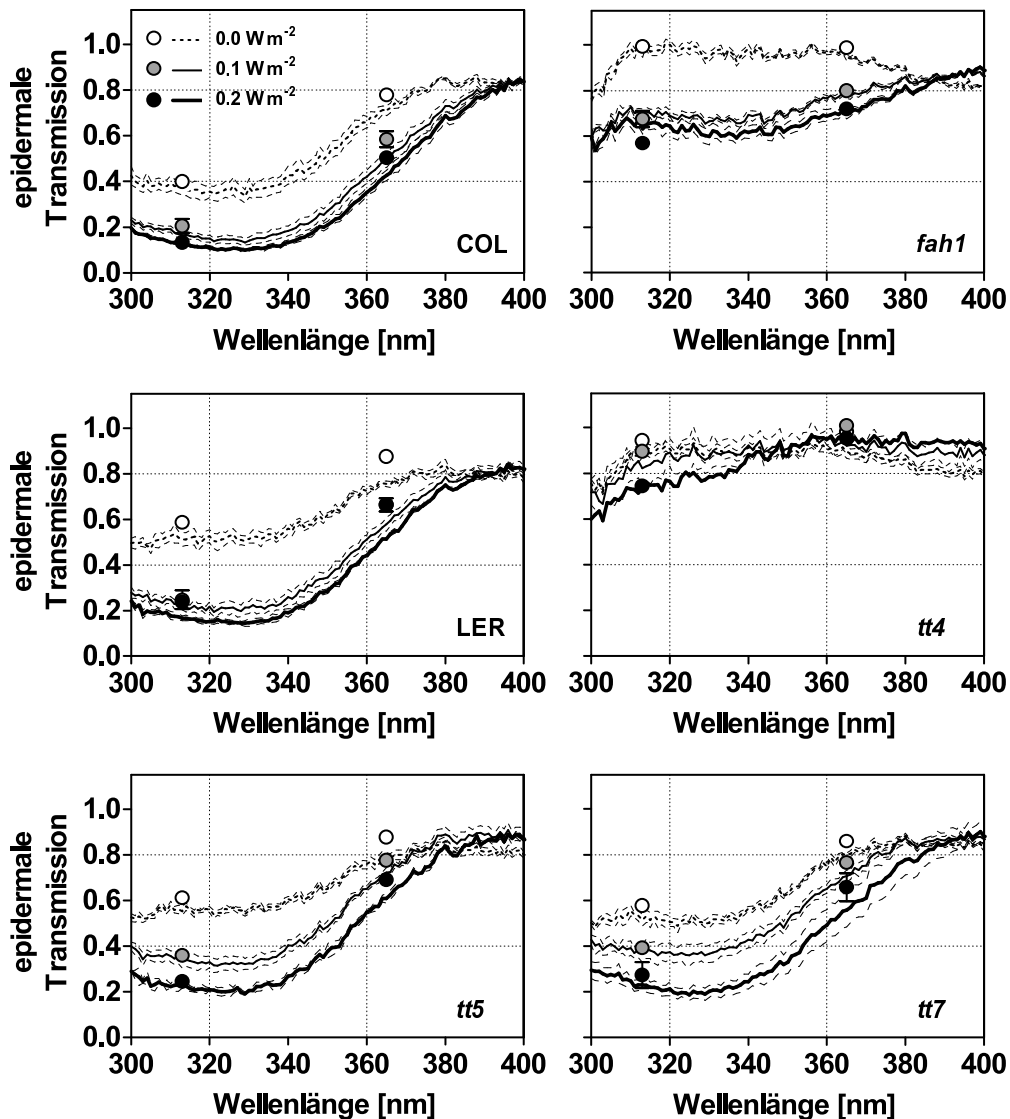


Abbildung 3.14.: Spektrale UV-Transmission in Blättern der Wildtypen *Columbia* (COL) und *Landsberg erecta* (LER) sowie der Deletionsmutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 21 °C und einer UV-B-Bestrahlungsstärke von 0 W m^{-2} (gestrichelte Linie / weißes Symbol), $0,1 \text{ W m}^{-2}$ (dünn durchgezogene Linie / graues Symbol) und $0,2 \text{ W m}^{-2}$ (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. $n \geq 3$, $\pm SEM$.

$0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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 *tt4*-Mutante zeigte ähnliche Kurvenverläufe. In ihrem Fall entsprachen sich die beiden UV-Transmissionsspektren der Blätter, die bei 0 W m^{-2} und $0,1 \text{ W m}^{-2}$ gewachsen waren, einander. Zwischen 400 nm und 300 nm blieben sie konstant bei etwa 0,8. In Blättern, die bei einer Einstrahlung von $0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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 *fah1*- Mutante ist diese Fähigkeit zur UV-Transmissionserniedrigung stark eingeschränkt und die *tt4*-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} , $0,1 \text{ W m}^{-2}$ und $0,2 \text{ W m}^{-2}$ UV-B_{ir} angezogen. Wie bei 21°C zeigten die Versuchspflanzen auch bei 9°C durch die Verminderung der epidermalen UV-Durchlässigkeit eine deutliche Reaktion auf erhöhte UV-Einstrahlungen. Lediglich bei der *tt5*-Mutante konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Die Transmissionsspektren der beiden Wildtypen sowie der *tt7*-Mutante zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Bei einer UV-B-Bestrahlungsstärke von 0 W m^{-2} während der Anzuchtphase 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. $0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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 *fah1*-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 *fah1*-Mutante auf UV-B-Strahlung ebenfalls mit einer erhöhten Abschirmung sichtbarer Strahlung.

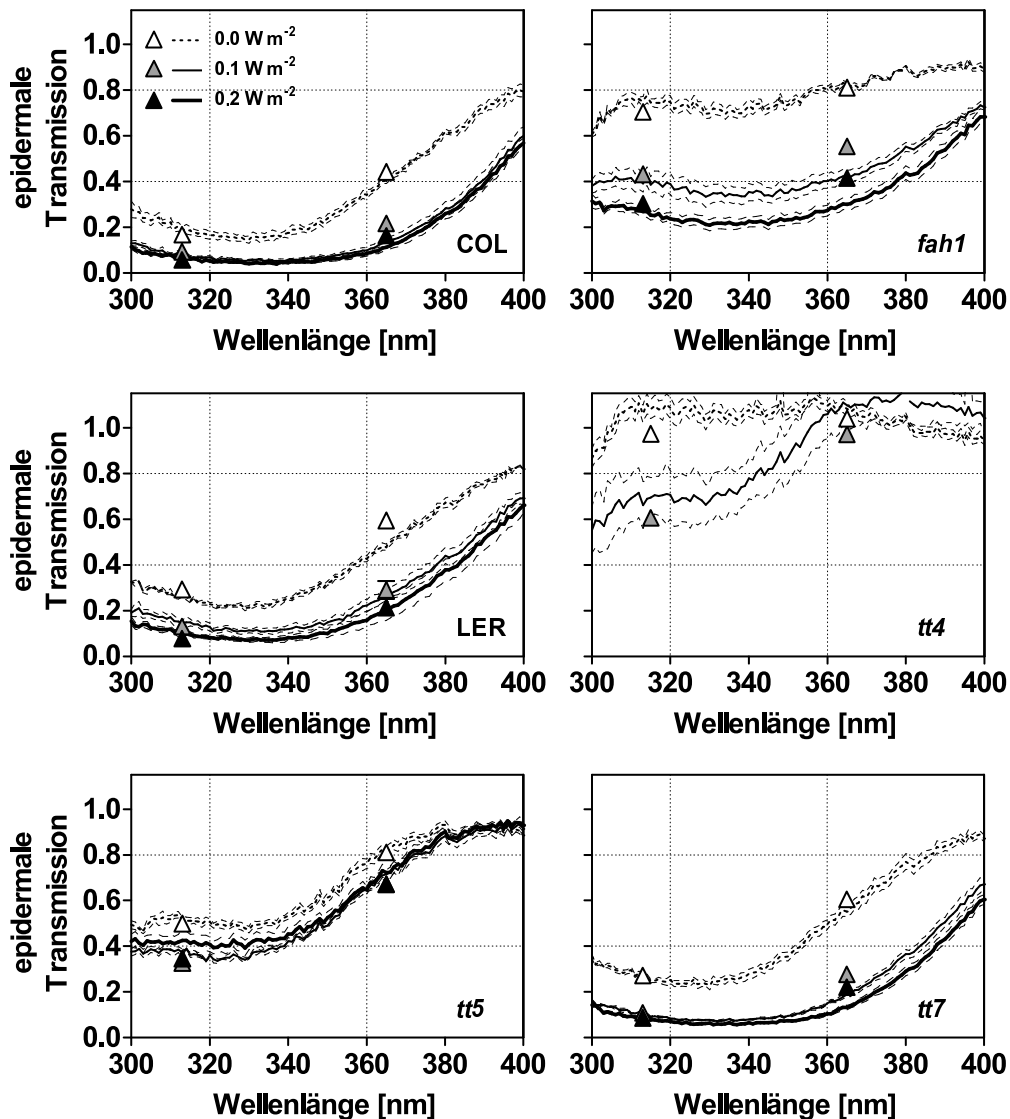


Abbildung 3.15.: Spektrale UV-Transmission in Blättern der Wildtypen *Columbia* (COL) und *Landsberg erecta* (LER) sowie der Deletionsmutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 9°C und einer UV-B-Bestrahlung von 0 W m⁻² (gestrichelte Linie / weißes Symbol), 0,1 W 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. $n \geq 3$, $\pm SEM$.

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 $0,1 \text{ W m}^{-2}$ 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 $0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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 $0,1 \text{ W m}^{-2}$ bzw. $0,2 \text{ W m}^{-2}$ 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.

Bei Vergleich der Auswirkungen verschiedener Temperaturen während der Anzucht auf die epidermale UV-Abschirmung wird deutlich, dass Kühle allgemein eine deutliche Verstärkung der UV-Abschirmung bewirkt. Diese Verstärkung beschränkt sich nicht allein auf den kurzwelligen UV-Bereich unterhalb von 360 nm, sondern macht sich besonders im langwelligen UV-A-Bereich bemerkbar. Sie reicht sogar bis in den sichtbaren Spektralbereich oberhalb von 400 nm hinein.

Der Vergleich der verschiedenen Deletionsmutanten mit den Wildtypen zeigt, dass sich bei 21°C vor allem die *fah1*- und die *tt4*-Mutante von den zugehörigen Wildtypen durch deutlich abgeschwächte UV-Abschirmungen unterscheiden. Diese Abschwächungen betreffen vor allem den kurzwelligen UV-Bereich zwischen 300 nm und 350 nm. Bei 9°C hingegen zeigt die *tt5*-Mutante eine von den Wildtypen klar abweichende Reaktion. Während alle anderen Pflanzentypen bei Kühle ihren UV-Schutz insbesondere im langwelligen Strahlungsbereich oberhalb von 360 nm verstärken, zeigt diese Mutante keine derartige Reaktion.

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

Neben der nicht-invasiven Quantifizierung der epidermalen UV-Abschirmung und der Schädigung von PS II wurde mittels HPLC-Analyse auch der Gehalt an Flavonolen und Hydroxyzimtsäuren in den Blättern der Versuchspflanzen qualitativ und quantitativ bestimmt. Die qualitative Bestimmung erfolgte durch eine HPLC mit UV/VIS-DA-Detektor und zusätzlich angeschlossenen ESI-Massenspektrometer. Die Aneinanderreihung beider Detektoreinheiten an die HPLC ermöglicht die simultane Aufzeichnung von substanzspezifischen Absorptionsspektren und Massesignalen. Durch den Abgleich dieser Messdaten mit Daten in einer bereits existierenden Polyphenolbibliothek (HARBAUM et al. 2007) war es im Anschluss möglich, verschiedenen Chromatogrammsignalen spezifische Polyphenole zuzuordnen.

Qualitative Bestimmung polyphenolischer Komponenten in *A. thaliana*

Die zwei verschiedenen Wildtypen von *A. thaliana* und die vier verschiedenen Deletionsmutanten mit jeweils unterschiedlichem genetischem Hintergrund, wurden auf qualitative Unterschiede in ihrer Synthese von löslichen Polyphenolen untersucht. In den beiden Wildtypen von *A. thaliana* wurden insgesamt zwölf durch Polyphenole hervorgerufene Signale nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um vier Signale durch Hydroxyzimtsäuren, sieben Signale durch Flavonole und ein Signal des bei der Extraktion in definierter Menge als interner Standard hinzugegebenen Naringinin-Aglykons. Zwischen den beiden Wild- bzw. Akzessionen *COL* und *LER* gab es lediglich einen Unterschied (Abbildung 3.16). Während es sich bei Signal 7 in *COL* um eine nicht näher analysierbare Hydroxyzimtsäure handelt, erscheint in *LER* bei dieser Retentionszeit ein Signal, welches mit großer Wahrscheinlichkeit durch ein Kämpferol-Rhamnosid-di-Glukosid hervorgerufen wird. In Tabelle 3.1 wird es daher als Signal 8 bezeichnet. Zwischen den anderen detektierten Signalen beider Ökotypen traten bei der Analyse keinerlei Unterschiede auf.

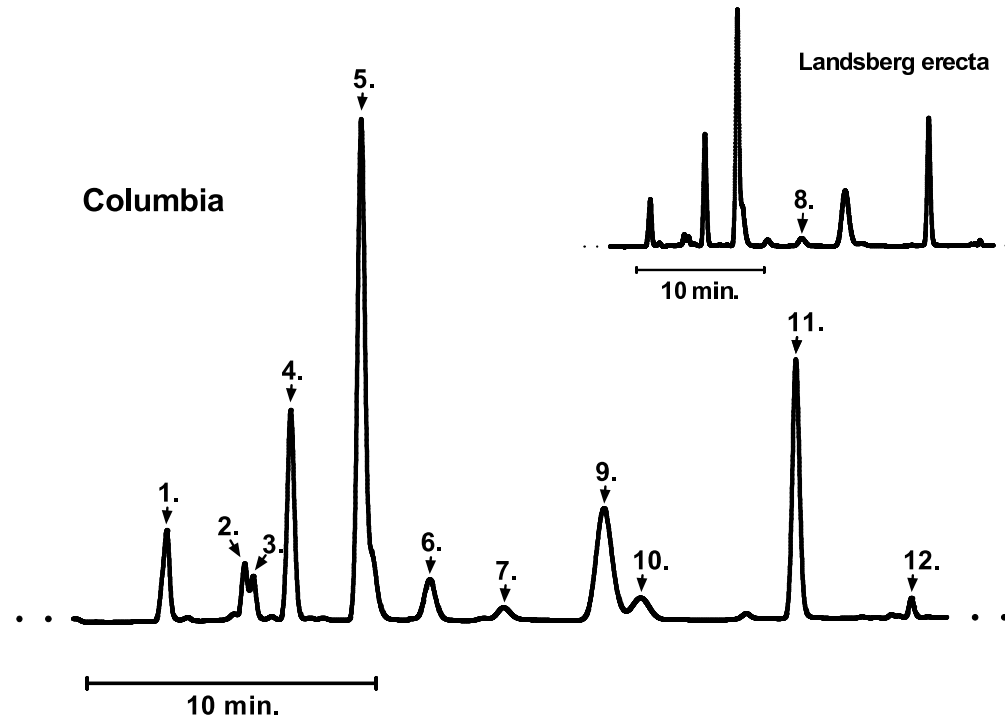


Abbildung 3.16.: Chromatogramme von Extrakten aus Blättern zweier Akzessionen von *A. thaliana*. Die große Grafik zeigt das Chromatogramm eines Extraktes der Akzession *Columbia*, die kleine Grafik ein Chromatogramm eines Blattextraktes des Ökotyps *Landsberg erecta*. In beiden Fällen handelt es sich um Extrakte von Pflanzen, die bei 9°C kultiviert worden waren. Die Absorptionssignale 1 bis 12 wurden bei 314 nm aufgezeichnet. Die für die Signale verantwortlichen Substanzen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet und durch die Angabe von Retentionszeit und Masse-Ladungs-Zahl genauer charakterisiert.

Tabelle 3.1.: Lösliche Polyphenole in Blättern von *A. thaliana*. Genannt werden für die in Abbildung 3.16 gezeigten Absorptionssignale 1 bis 12 die spezifischen Retentionszeiten (t_R), die Masse-Ladungs-Zahl (m/z), das jeweils vermutete Polyphenol sowie die angehängten Restgruppen. Die letzten sechs Spalten geben die Existenz der Absorptionssignale für die sechs in dem Experiment verwendeten Pflanzentypen an. Die Angabe eines + entspricht einem Nachweis dieser Substanz im jeweiligen Pflanzentyp, bei Angabe eines – konnte ein Nachweis dieser Substanz in dem Pflanzentyp nicht erbracht werden. Die fett-gedruckten Masse-Ladungs-Zahlen charakterisieren das Hauptfragment der vermuteten Substanz. Abweichungen von einem ansonsten bei allen Pflanzentypen einheitlichen Synthesemuster sind durch die Buchstaben **A**, **B** und **C** kenntlich gemacht.

Signal	t_R [min]	m/z			polyphenol. Substanz	Restgruppen	Auftreten in					
		MS ¹ [M-H] ⁻	MS ² [M-H] ⁻	MS ³ [M-H] ⁻			COL	LER	<i>fah1</i>	<i>tt4</i>	<i>tt5</i>	<i>tt7</i>
1	13,3	385	223	–	Sinapoyl	Glukose (162)	+	+	–	A	+	+
2	15,7	–	–	–	HCA	–	C	C	C	–	C	C
3	16,5	755	609	301 /445/463	Quercetin	2×Rhamnose (146), Glukose (162)	+	+	+	–	–	–
4	17,4	739	593	429/ 284	Kämpferol	2×Rhamnose (146), Glukose (162)	+	+	+	–	–	+
5	19,6	339	223	–	Sinapoyl	Malat (116)	+	+	B	B	+	+
6	22,0	609	447	301	Quercetin	Glukose (162), Rhamnose (146)	+	+	+	–	–	–
7	24,5	591	–	–	HCA	–	C	–	–	–	–	–
8	25,1	755	609	285	Kämpferol	Rhamnose (146), 2×Glukose (162)	–	+	–	–	–	+
9	28,2	593	447	285	Kämpferol	Glukose (162), Rhamnose (146)	+	+	+	–	–	+
10	29,5	593	447	301	Quercetin	2×Rhamnose (146)	+	+	+	–	–	–
11	35,2	577	431	285	Kämpferol	2×Rhamnose (146)	+	+	+	–	–	+
12	38,1	271	–	–	Naringenin	Interner Standard	+	+	+	+	+	+

MS¹: Vollständiges Molekül

MS²: Nach 1. Fragmentierung

MS³: Nach 2. Fragmentierung

A: m/z: MS¹ [M-H]⁻ = 355, MS² [M-H]⁻ = 193, nicht näher bestimmtes Feruloylglycosid

B: m/z: MS¹ [M-H]⁻ = 309, MS² [M-H]⁻ = 193, vermutlich Feruloylmalat

C: Unbekannte Hydroxymizsäure, 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 unbekanntem Hexose verbunden ist. Bei den Retentionszeiten 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 ausgegebene 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.

Die beiden nachfolgenden Signale betreffen die bereits zu Beginn angesprochenen Komponenten, welche jeweils nur in einem der beiden Wildtypen nachzuweisen sind. Signal 7, mit einer Retentionszeit von 24,5 min, ist nur im Wildtyp *Columbia* nachweisbar. Dem Absorptionsspektrum zufolge handelt es sich hierbei eindeutig um eine Hydroxyzimtsäure. Leider war bei der massenspektrometrischen Untersuchung dieses Signal nicht näher analysierbar, so dass keine Masse-Ladungs-Zahl für diese Substanz ermittelt werden konnte. Das nur in den Proben von *LER* detektierbare Signal 8 mit einer Retentionszeit von etwa 25,1 min konnte hingegen als Kämpferolderivat mit einem angehängtem Rhamnoseresst und zwei zusätzlichen Glukosemolekülen bestimmt werden. Bei den nächsten beiden Signalen (Signal 9 und 10), mit den Retentionszeiten 28,2 und 29,5 min, handelt es sich ebenfalls um Flavonole. Signal 9 wird durch ein Kämpferol ($m/z = 285$) mit je einem Glukose- und einem Rhamnosemolekül und Signal 10 durch ein Quercetin ($m/z = 301$) mit zwei Rhamnosemolekülen hervorgerufen. Bei Signal 11 handelt es sich ebenfalls um ein mit zwei Rhamnosemolekülen verestertes Flavonol. In diesem Fall weist die Masse-Ladungs-Zahl von $m/z = 285$ allerdings auf ein Kämpferolderivat hin. Das während der Extraktion als interner Standard hinzugegebene Naringenin tritt in den Chromatogrammen als Signal 12 bei einer Retentionszeit von 38,1 min in Erscheinung.

Durch die Einbeziehung der Deletionsmutanten in die qualitativen HPLC-MSⁿ-Analysen konnten einige Unsicherheiten bei der Signalbestimmung vermieden werden. Auf diese Weise war beispielsweise die Bestimmung von Signal 2 und 3 als Hydroxyzimtsäure bzw. Quercetinderivat möglich. In den Chromatogrammen der Wildtypen treten diese beiden Signale häufig sehr dicht nebeneinander auf, so dass sich beide Substanzen oft gegenseitig überdecken und weder durch spektrale Absorptionsmessungen noch durch Massenspektrometrie eindeutig qualitativ bestimmbar sind. Die Verwendung der *fah1*- bzw. *tt7*-Deletionsmutanten ermöglichte jedoch, durch Ausschluss von jeweils einer der beiden Substanzen, die genaue Zuordnung der beiden Polyphenole in den Pflanzen.

Das Muster der Flavonolsynthese in der *fah1*-Mutante entspricht dem des *COL*-Ökotyps. Erwartungsgemäß gibt es jedoch zwischen diesen beiden Pflanzentypen Unterschiede in Bezug auf deren Synthesemuster der Hydroxyzimtsäuren. Während typische Derivate des Ferulats in dieser Mutante (siehe Signal 2 in Tabelle 3.1) nachweisbar waren, sind die im *COL*-Wildtyp normalerweise in relativ großen Mengen auftretenden Sinapoylderivate hier nicht bzw. nur als entsprechende Feruloylderivate (Signal 5) vorhanden. Ebenfalls den Erwartungen entsprechen die Ergebnisse zu den Deletionsmutanten *tt5* und *tt7*. Während die Hydroxyzimtsäuren in beiden Mutanten unverändert zum genetisch zugehörigen *LER*-Ökotyp synthetisiert wurden, gab es vom Wildtyp deutlich abweichende Unterschiede in der Flavonolsynthese. So konnten in *tt5*-Pflanzen keine Flavonole und in *tt7*-Pflanzen keine Quercetinderivate nachgewiesen werden.

Etwas überraschend waren die HPLC-Ergebnisse für die *tt4*-Mutante. Pflanzen dieses Typs sind aufgrund des Fehlens einer funktionellen Chalconsynthase 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

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene qualitative Bestimmung der löslichen Polyphenole ermöglichte eine genaue Analyse, inwieweit Temperatur und UV-Strahlung die Akkumulation von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen quantitativ beeinflussen. Die Resultate dieser quantitativen Analyse sind in den Abbildungen 3.17 und 3.18 dargestellt.

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde darauf verzichtet, die Abhängigkeit jeder einzelnen Substanz von den Umweltfaktoren darzustellen. Stattdessen wurden zur Vereinfachung drei Gruppen gebildet. In einer Gruppe werden alle Hydroxyzimtsäuren gemeinsam, sowohl Sinapoyl- als auch Feruloylderivate behandelt. Eine zweite Gruppe beinhaltet alle Kämpferol- und eine dritte Gruppe alle Quercetinglykoside.

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 $0,1 \text{ W m}^{-2}$ steigerbar. Die Synthese von Quercetinderivaten wurde dagegen bei 9 °C mit zunehmender UV-B-Bestrahlung bis $0,5 \text{ W m}^{-2}$ 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.

Die Mutanten erzielten von den Wildtypen stark abweichende Syntheseleistungen. So zeigte die *fah1*-Mutante eine deutlich verringerte Syntheseleistung von Hydroxyzimtsäuren. Im Gegensatz zu den *tt*-Mutanten ist die *fah1*-Mutante eine aus dem *COL*-Wildtyp entstandene Deletionsmutante. Die genetische Deletion betrifft in ihrem Fall die Ferulat-5-Hydroxylase, aufgrund dessen die Mutante nur noch eingeschränkt zur Synthese von Hydroxyzimtsäuren befähigt ist. Lediglich zur Synthese von geringen Mengen an Ferulaten sollte sie befähigt sein. Allerdings schienen diese Mengen durch ein Absenken der Temperatur von 21 °C auf 9 °C steigerbar zu sein. Zusätzlich erfolgte auch die Flavonolsynthese, insbesondere die Synthese von Kämpferolderivaten nur eingeschränkt. Bei 21 °C war dieser Effekt nicht so deutlich (Abbildung 3.17), jedoch zeigte sich die Synthese von Kämpferol bei 9 °C im Vergleich zum zugehörigen Wildtyp um etwa 50 % vermindert (Abbildung 3.18), die Quercetinsynthese erfolgte hingegen unverändert.

Die *Transparent Testa*-Mutanten (*tt4*, *tt5*, *tt7*) mit genetischen Ausfällen jeweils verschiedener Flavonoidsynthese-Enzyme zeigten deutliche vom *LER*-Wildtyp abweichende Polyphenolsynthese-Muster. Bei 21 °C wurden in Blättern der *tt4*-Mutante keinerlei Polyphenole produziert (Abbildung 3.17). Obwohl die Deletion nur das Gen für die Chalconsynthese und somit nur den Flavonoidbiosyntheseweg betrifft, scheint auch die Biosynthese von Hydroxyzimtsäuren von diesem genetischen Defekt betroffen zu sein. Die

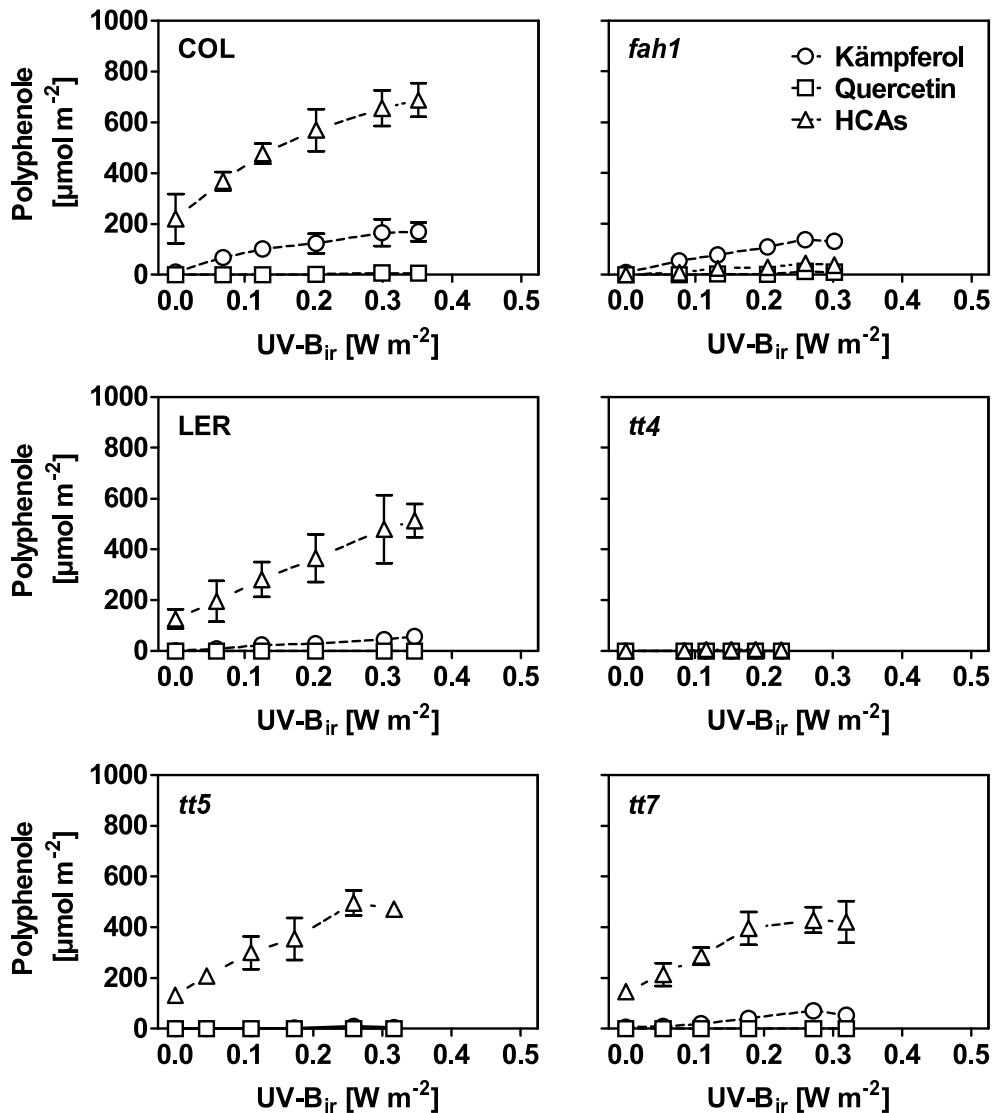


Abbildung 3.17.: Polyphenolgehalte in Blättern der Wildtypen *Columbia* (COL) und *Landsberg erecta* (LER) sowie der Deletionsmutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 21 °C im UV-B-Gradienten. Gezeigt sind die Blattgehalte für Kämpferolderivate (Kreise), Quercetinderivate (Quadrate) und der Gesamtgehalt an Hydroxyzimtsäuren (Sinapoyl- und Feruloylderivate, Dreiecke). In der *fah1*-Mutante wurden ausschließlich Ferulatverbindungen nachgewiesen. $n = 6$, $\pm 195\%$.

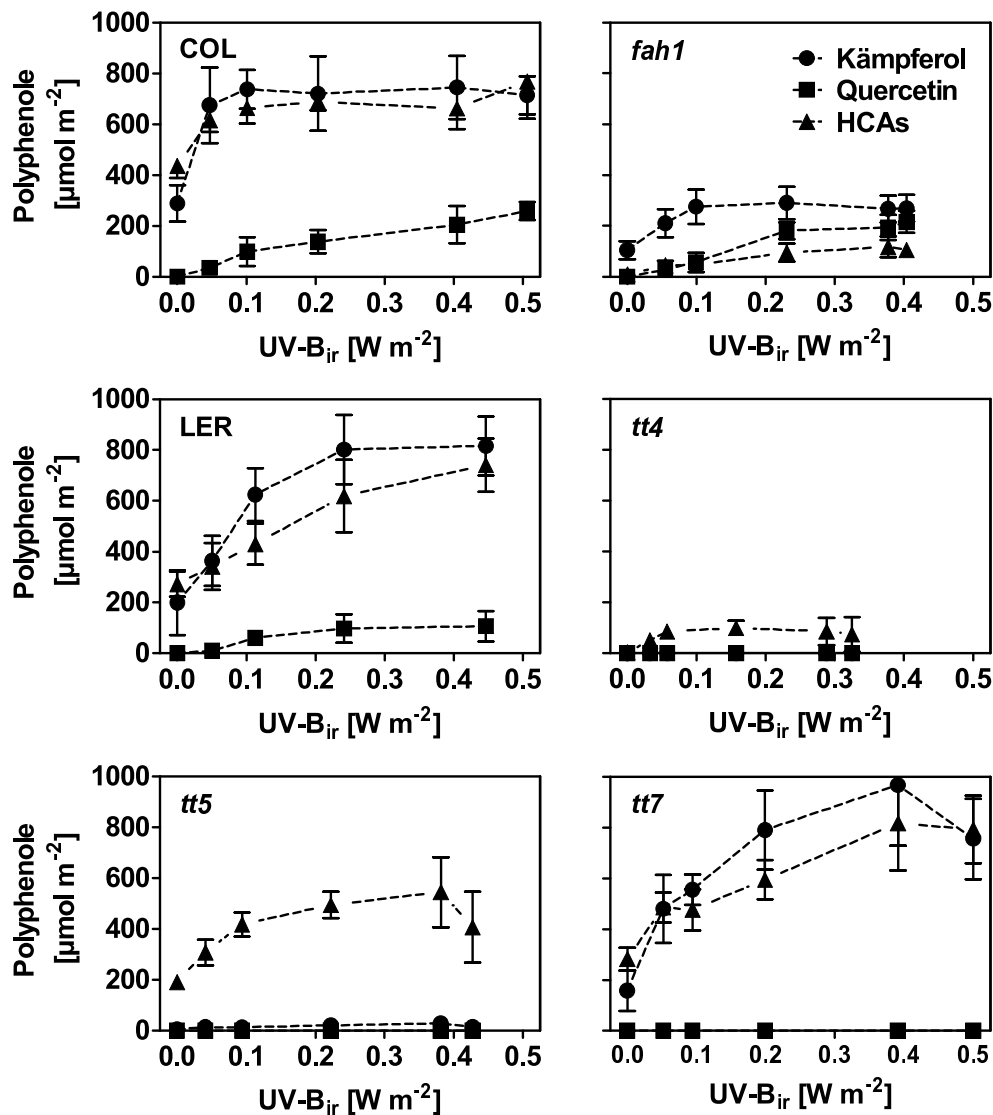


Abbildung 3.18.: Polyphenolgehalte in Blättern der Wildtypen *Columbia* (*COL*) und *Landsberg erecta* (*LER*) sowie der Deletionsmutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* von *A. thaliana* nach Kultivierung bei 9°C im UV-B-Gradienten. Gezeigt sind die Blattgehalte für Kämpferol-derivate (Kreise), Quercetinderivate (Quadrate) und der Gesamtgehalt an Hydroxyzimtsäuren (Sinapoyl- und Feruloylderivate, Dreiecke). In der *fah1*-Mutante wurden ausschließlich Ferulatverbindungen nachgewiesen. $n = 6$, $\pm 195\%$.

aufgrund eines Gendefekts nicht zur Flavonolsynthese befähigte *tt5*-Mutante synthetisierte hingegen lediglich keine Kämpferol- und Quercetinglykoside. In diesem Fall war die Produktion von Hydroxyzimtsäuren von dem Gendefekt nicht betroffen. Die *tt7*-Mutante mit defekter Flavonoid-3'-Hydroxylase wies bei 21 °C keinen Unterschied zum zugehörigen *LER*-Wildtyp auf. Bei 9 °C jedoch war keine Quercetinsynthese zu beobachten (Abbildung 3.18). Die *tt4*- und *tt5*-Mutanten synthetisierten bei dieser Temperatur jeweils keine Flavonole. Hingegen erfolgte die Synthese von Hydroxyzimtsäuren in beiden Mutanten unterschiedlich. Während in der *tt5*-Mutante bei Kühle diese Substanzgruppe in vergleichbarer Menge wie im *LER*-Wildtyp akkumulierte, wurden in Blättern der *tt4*-Mutante nur sehr geringe Mengen davon produziert.

UV-abschirmender Effekt durch Polyphenole

Um beurteilen zu können, welche der identifizierten Polyphenole für die epidermale UV-Abschirmung in *A. thaliana* verantwortlich sind, wurde auf zweierlei Weise die Beziehung zwischen den durch Extraktion ermittelten Polyphenol-Gehalten und der *in vivo* beobachteten UV-Abschirmung untersucht. Zum einen wurden die mit Hilfe der Xenon-PAM ermittelten epidermalen UV-A- und UV-B-Transmissionen in entsprechende Absorptionswerte umgerechnet und diese gegen die UV-Gesamtabsorptionen der HPLC-Extrakte aufgetragen, die während der HPLC-Analyse bei den gleichen Wellenlängen bestimmt worden waren (Abbildung 3.19). Zum anderen wurden aus den epidermalen Transmissionsspektren (Abbildung 3.14 und 3.15) Absorptionsspektren berechnet und diese anschließend mit Extinktionsspektren verglichen, die zuvor aus zugehörigen Blatt-Polyphenolgehalten der verschiedenen Wildtypen und Mutanten sowie spektral aufgelösten, molaren Extinktionskoeffizienten rekonstruiert worden waren (Abbildung 3.20).

Die Gegenüberstellung der mit Hilfe der Xenon-PAM ermittelten UV-A- und UV-B-Absorptionen mit den entsprechenden UV-Gesamtabsorption der Extrakte in Abbildung 3.19 zeigt sowohl für UV-A als auch für UV-B eine sehr hohe Korrelation. In beiden Fällen sprechen die hohen Bestimmtheitsmaße (für UV-A $R^2 = 0,9641$, für UV-B $R^2 = 0,9322$) für einen direkt linearen Zusammenhang zwischen den Polyphenolgehalten der Blätter und den jeweils zugehörigen epidermalen UV-Absorptionen. Die sehr dicht am Ursprung liegenden y-Achsenabschnitte der eingetragenen Regressionen weisen zudem darauf hin, dass die epidermale UV-A- bzw. UV-B-Absorption vollständig auf die Anwesenheit der untersuchten Polyphenole zurückzuführen ist. Weitere mögliche UV-Vermeidungsmechanismen als die der epidermalen Akkumulation der hier identifizierten Polyphenole scheinen somit keine Rolle bei der UV-Abschirmung zu spielen.

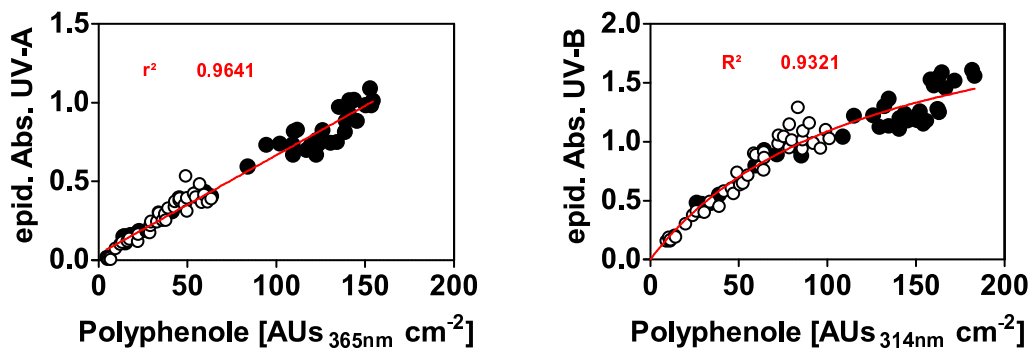


Abbildung 3.19.: Regression von epidermaler UV-Absorption und Polyphenolgehalt in Blättern des *A. thaliana*-Ökotyps *Columbia* (*COL*) nach Kultivierung im UV-B-Gradienten. Die linke Grafik zeigt die Abhängigkeit der UV-A-Absorption, die rechte Grafik die Abhängigkeit der UV-B-Absorption vom Phenolgehalt der Blätter. Es wurden sowohl Blätter, die bei 9 °C (schwarze Symbole) als auch Blätter, die bei 21 °C (weiße Symbole) gewachsen waren, in die Berechnung der Regression einbezogen. Der Polyphenolgehalt ist in Absorptions-Flächeneinheiten (AUs_λ) angegeben, wie sie aus den zugehörigen Chromatogrammen abzulesen sind.

Eine ähnliche Schlussfolgerung ergibt sich auch bei Betrachtung der in Abbildung 3.20 dargestellten Absorptionsspektren (schwarze Linien). Hierbei handelt es sich um Absorptionsspektren von Blattepidermen der *Arabidopsis*-Wildtypen *COL* und *LER* sowie der verschiedenen Polyphenol-Mangel-Mutanten (*fah1*, *tt4*, *tt5* und *tt7*). Zusätzlich zu diesen *in vivo* Spektren sind in diesen Grafiken Extinktionsspektren (rote Linien) eingetragen, welche sich bei Extraktion der in diesen Blättern enthaltenen Polyphenole in wässrigen Methanollösungen ergeben würden. Die Extinktionsspektren wurden aus den in Abbildung 3.18 aufgeführten Polyphenolgehalten und den in Abbildung 1.6 dargestellten, spektral aufgelösten molaren Extinktionskoeffizienten rekonstruiert und beziehen sich wie die *in vivo* Spektren auf Blätter, die sich bei 9 °C ohne UV-B-Bestrahlung entwickelten. Vor Erstellung dieser Spektren wurde angenommen, dass bei Extraktion aller in einem Blatt enthaltenen Polyphenole, die für die epidermale UV-Abschirmung von Relevanz sind, ein Extrakt entstünde, dessen spektrale Absorptionseigenschaft weitestgehend mit dem Absorptionsspektrum der zugehörigen Blattepidermis übereinstimmt. Bei Berücksichtigung von nicht-relevanten Substanzen oder Nicht-Beachtung von relevanten Komponenten sollten diese rekonstruierten Extinktionsspektren deutlich von den epidermalen Absorptionsspektren abweichen. Doch der Vergleich zwischen diesen verschiedenartig erstellten Spektren zeigt, dass unabhängig vom jeweils untersuchten Pflanzentyp hohe Übereinstimmungen zwischen diesen Spektren bestehen. Dies wird als ein weiterer Beleg dafür gewertet, dass die epidermale UV-Abschirmung allein auf die durch die HPLC-Analyse identifizierten Polyphenole zurückzuführen ist.

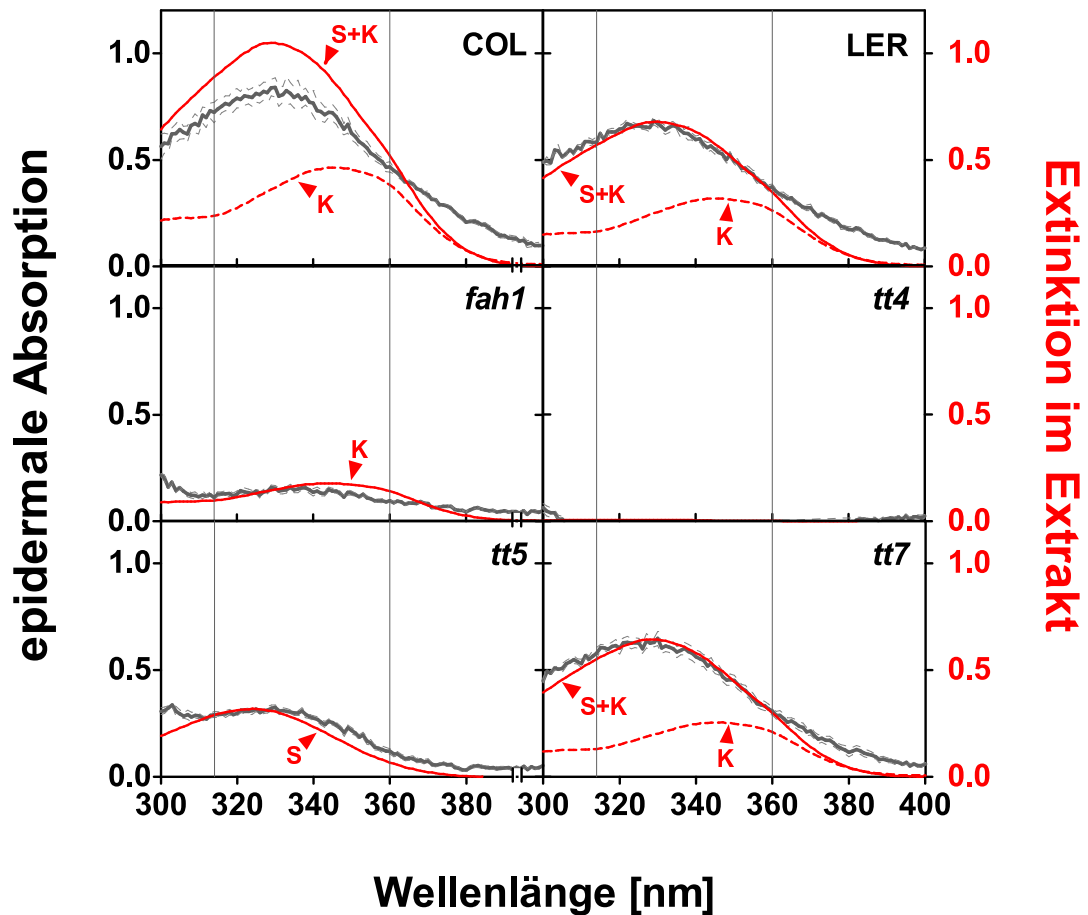


Abbildung 3.20.: Die epidermalen Absorptionsspektren wurden an Blattoberseiten bestimmt (schwarze Linien). Die untersuchten Blätter entwickelten sich bei 9 °C ohne zusätzliche UV-B-Einstrahlung. Ebenfalls eingetragen sind Extinktionsspektren (rote Linien), welche sich für die in den Blättern enthaltenen Polyphenole in wässrigen Methanollösungen (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, $n \geq 3$, $\pm SEM$.

In welchem Umfang die in den Blättern des *COL*-Wildtyps synthetisierten Hydroxyzimtsäuren, sowie Kämpferol- und Quercetinglykoside jeweils zur epidermalen UV-A- und UV-B-Absorption in Pflanzen beitragen könnten, ist den vier Grafiken in Abbildung 3.21 zu entnehmen. Zum einen sind in dieser Abbildung für 21 °C und 9 °C die epidermalen UV-A- (obige Reihe) und UV-B-Absorptionen (untere Reihe) in Abhängigkeit zur eingestrahlten UV-B-Intensität dargestellt. Ebenfalls in Abhängigkeit zur UV-B-Bestrahlungsstärke, zeigen die Grafiken das jeweilige UV-A- und UV-B-Absorptionsvermögen der Blattextrakte, welche aus den *COL*-Wildtyppflanzen hergestellt wurden. Diese Daten wurden mittels HPLC-Analyse erhoben. Durch die Auftrennung der verschiedenen Polyphenole war es möglich, für jede untersuchte Substanz ihren relativen Absorptionsanteil an der UV-Gesamtabsorption im Extrakt zu bestimmen. Da die UV-Gesamtabsorptionen der Extrakte in weiten Bereichen im linearen Zusammenhang mit den epidermalen UV-Absorptionen der Blätter stehen, kann aus den hier für die Extrakte dargestellten Absorptionsanteilen auch auf die jeweiligen UV-Absorptionsanteile der verschiedenen Polyphenole in den Epidermen geschlossen werden. Die gemittelten UV-Absorptionsanteile der verschiedenen Substanzen über den UV-B-Bestrahlungsbereich von $0,0 \text{ W m}^{-2}$ bis $0,4 \text{ W m}^{-2}$ sind in die Grafiken eingetragen und in Prozent angegeben.

Hierbei zeigt sich, dass bei 21 °C mit zunehmender UV-B-Einstrahlung von $0,0 \text{ W m}^{-2}$ bis $0,4 \text{ W m}^{-2}$ UV-B_{ir} 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 Versuchspflanzen 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 Pflanzen erheblich gesteigert wurde. So erreichten Extrakte von Blättern, die zuvor ohne UV-B-Bestrahlung jedoch bei 9 °C gewachsen waren, UV-Absorptionen, welche von Extrakten, die aus bei 21 °C gewachsenen Blättern stammten, nur erreicht wurden, wenn die Blätter zuvor einer zusätzlichen UV-B-Belastung von $0,4 \text{ W m}^{-2}$ 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

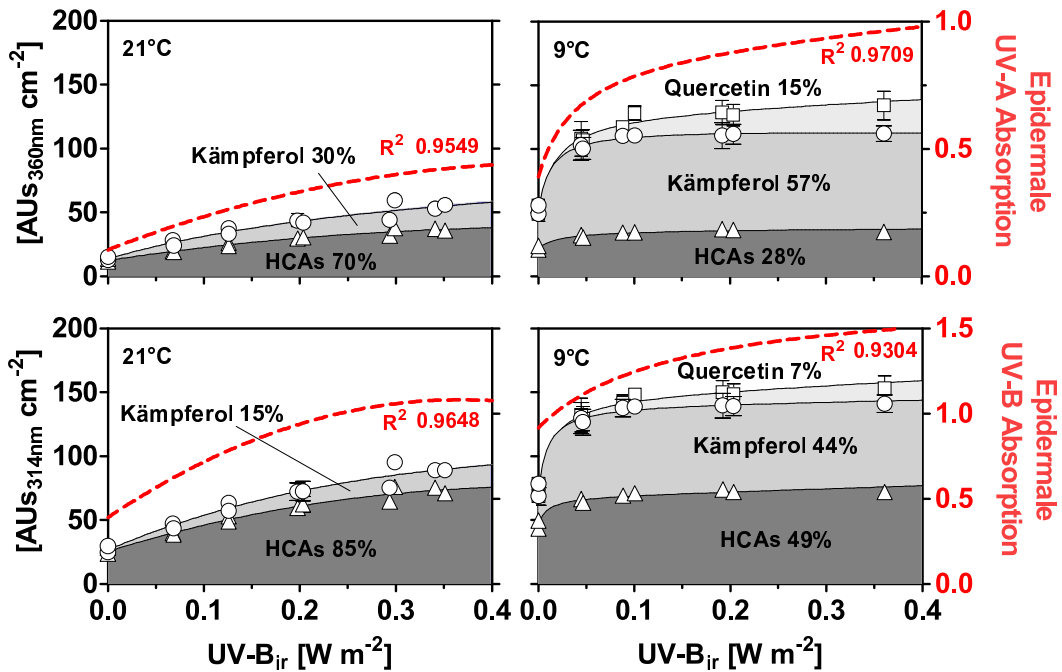


Abbildung 3.21.: Die relativen Anteile der untersuchten Polyphenole an der Gesamt-UV-Absorption in Blattextrakten des *A. thaliana*-Ökotyps *Columbia* (*COL*) nach 14-tägiger Anzucht bei 21 °C (linke Spalte) sowie 9 °C (rechte Spalte) und verschiedenen konstanten UV-B-Bestrahlungsstärken. Die linke y-Achse gibt jene UV-Absorptionseinheiten an, die in den Blattextrakten allein durch Hydroxyzimtsäuren (Dreiecke), durch Hydroxyzimtsäuren und Kämpferolderivate (Kreise) bzw. durch alle drei Phenolgruppen gemeinsam (Quadrate) in Abhängigkeit zum eingestrahlt UV-B während der Pflanzenkultivierung nachgewiesen wurden. Die zugehörigen Regressionsfunktionen (durchgezogene Kurven) sind eingetragen. Die verschiedenen schattierten Flächen zwischen den durchgezogenen Kurven beschreiben die relativen Anteile an der Gesamt-UV-Absorption für die drei einzelnen Polyphenolgruppen im UV-B-Bestrahlungsbereich zwischen 0 W m^{-2} und $0,4 \text{ W m}^{-2}$ UV- B_{ir} . Die berechneten Anteile der einzelnen Polyphenolgruppen an der Gesamt-UV-Absorption sind jeweils prozentual angegeben. Zusätzlich zu den Absorptionsmessungen an den Blattextrakten wurden die zugehörigen Blätter fluorezenzspektrometrisch untersucht und daraus die jeweiligen epidermalen UV-Absorptionen berechnet. Die aus diesen Absorptionswerten berechneten Regressionsfunktionen (rot-gestrichelte Kurven) sind mit zugehörigen Regressionskoeffizienten (in roter Schrift) in die Grafiken eingefügt. Die epidermalen UV-Absorptionen sind auf der rechten y-Achse abzulesen. $n = 3$, $\pm SEM$.

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.

Werden diese für Blattextrakte erhobenen Daten auf die *in vivo* Absorptionen der Epidermen übertragen, so bedeutet dies, dass bei 21 °C etwa 70 % der UV-A-Abschirmung durch Hydroxyzimtsäuren verursacht würden, dieser Anteil bei 9 °C aber auf unter 30 % absinke. Ähnliches gilt für die temperaturabhängige UV-B-Abschirmung. Auch hier würde bei 9 °C der relative Anteil der durch Hydroxyzimtsäuren verursachten Abschirmung erheblich unter die bei 21 °C erreichten 80 % sinken. Sowohl im UV-A- als auch im UV-B-Wellenlängenbereich würde bei Kühle die Abschirmung zunehmend durch Flavonole verursacht werden. Die bei Kühle größer werdende Bedeutung von Flavonolen als UV-Abschirmsubstanzen, lässt jedoch nicht den Umkehrschluss zu, dass bei 9 °C den Hydroxyzimtsäuren bei der UV-Abschirmung eine geringere Bedeutung zukäme. Wie die Ergebnisse es zeigen, spielen Hydroxyzimtsäuren auch bei 9 °C als UV-Abschirmsubstanzen eine wichtige Rolle. Sie werden bei Kühle lediglich zunehmend durch Flavonole unterstützt und verlieren daher nur Anteile an der Gesamt-UV-Abschirmung.

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.

Auch wenn UV-B verschiedene Pflanzenschäden verursacht (Abschnitt 1.2.1), konzentrierte sich die Schadensanalyse auf durch UV-B hervorgerufene PS II-Schädigungen. Das PS II besitzt eine sehr hohe UV-B-Empfindlichkeit und eignet sich daher besonders gut für die Bestimmung von UV-B-Schäden in Pflanzen (BOOIJ-JAMES et al. 2000). Zudem macht die einfache Bestimmbarkeit seines Aktivitätszustands mittels PAM-Fluorometrie es zu einem idealen Untersuchungsobjekt, um den Einfluss von Stress jeglicher Art auf Pflanzen zu untersuchen (MAXWELL & JOHNSON 2000). Aus diesem Grund wurde die Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber UV-B-Strahlung bei unterschiedlicher Temperatur am PS II mittels PAM-Fluorometrie bestimmt. Die in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellten PS II-Schädigungen UV-B-behandelter Pflanzen belegen, dass bei 9 °C die Empfänglichkeit von Pflanzen für UV-B-induzierte Photoinhibition deutlich größer ist als bei 21 °C. Die gezeigten Daten stammen zwar von Pflanzen, welche durch ihre Kultivierung bei 21 °C nicht an Kühle akklimatisiert waren, doch auch Pflanzen, welche durch ihre Anzucht an niedrige Temperaturen akklimatisiert waren, wiesen bei Kühle eine höhere UV-B-Empfindlichkeit als bei moderater Temperatur (21 °C) auf (Daten nicht dargestellt).

Dass Kühle die Anfälligkeit nicht akklimatisierter Pflanzen für Photoinhibition von PS II durch sichtbare Strahlung steigert, wurde bereits mehrfach beschrieben (GREER et al. 1991, MELIS 1999, ALLEN & ORT 2001). Das plötzliche Einsetzen von Kühle soll zentrale Enzyme des Calvin-Zyklus hemmen (KINGSTON-SMITH et al. 1997, ALLEN & ORT

2001) und dadurch zu einem Ungleichgewicht zwischen Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese führen (ÖQUIST et al. 1993, MELIS 1999). Ein erhöhter Redoxzustand innerhalb der Elektronentransportkette wäre die Folge und die Wahrscheinlichkeit einer akzeptorseitig hervorgerufenen Photoinhibition von PS II würde zunehmen (ÖQUIST et al. 1993, FISAHN et al. 1995, MELIS 1999). Dieses Schädigungsmodell mag die bei Kühle höhere Empfindlichkeit von PS II gegenüber sichtbarer Strahlung erklären. Warum jedoch bei Kühle die mit UV-B verknüpfte Inhibition von PS II vermehrt auftritt, wird hierdurch nicht beantwortet. Das Phänomen, dass bei Temperaturschwankungen die Aktivitäten von Enzymen des Calvin-Zyklus verändert werden, bleibt natürlich auch bei einer durch UV-B hervorgerufenen Inhibition bestehen, da dieser Vorgang unabhängig von der Bestrahlungsart einer Pflanze ist. Jedoch muss es als sehr unwahrscheinlich betrachtet werden, dass eine veränderte Aktivität des Calvin-Zyklus dazu führt, dass UV-B eine akzeptorseitige Inhibition von PS II bewirken könnte, da UV-B deutlich weniger photosynthetisch aktiv ist als sichtbare Strahlung (HALLIDAL 1964, MCCREE 1972, INADA 1976, MCCREE 1981). Ein in Abbildung 4.1 dargestelltes Aktionsspektrum beschreibt die von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts abhängige Quantenausbeute der Photosynthese.

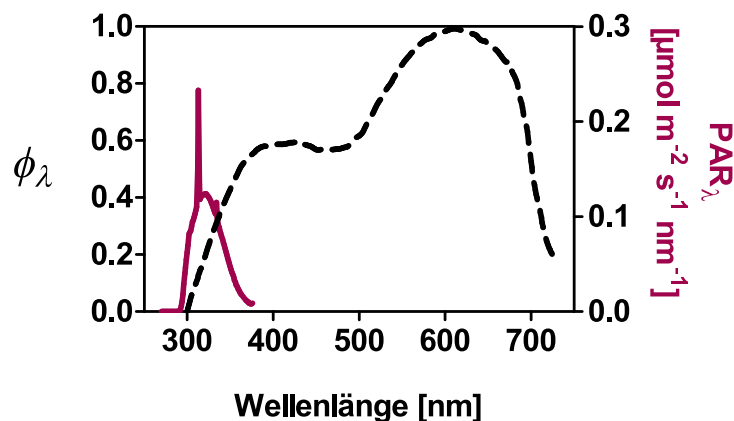


Abbildung 4.1.: Von der Wellenlänge des Anregungslichts abhängige relative Quantenausbeute der Photosynthese. Die Quantenausbeute der Photosynthese (ϕ_λ , gestrichelte Linie) eines Blattes (*Brassica oleracea* L.) ohne Epidermis ist stark abhängig von der Wellenlänge der photosynthetisch aktiven Strahlung (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 entspricht einer Bestrahlungsstärke von $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Neben der schwachen photosynthetischen Effizienz von UV-B wirkt diese Strahlung im Vergleich zu sichtbarem Licht zudem meist in sehr geringer Photonendichte auf Pflanzen ein. Dies gilt sowohl bei der Bestrahlung von Pflanzen mit natürlichem Sonnenlicht als auch bei der Verwendung künstlicher UV-B-Strahlungsquellen. Die Versuchspflanzen des hier diskutierten Experiments wurden beispielsweise für 2,5 h mit $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sichtbarem Licht bestrahlt. Die während dieser Zeit maximal eingestrahlte UV-B-Bestrahlungsstärke betrug jedoch nur $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abbildung 4.1). Es ist unwahrscheinlich, dass diese zusätzlich eingestrahlte UV-B-Strahlung eine nennenswerte Anzahl zusätzlicher Ladungstrennungen in PS II-Reaktionszentren induziert. Auch im Zusammenhang mit einer bei Kühle verringerten Aktivität des Calvin-Zyklus sollte UV-B dieser Bestrahlungsstärke zu keiner Erhöhung des Redoxzustands des Plastochinonpools führen. Die für die akzeptorseitige Photoinhibition von PS II klassischerweise verantwortlich gemachte Anhäufung von geschlossenen PS II-Reaktionszentren müsste somit auch bei niedriger Temperatur ausbleiben. Ein weiterer Grund, weshalb kühlebedingte Ungleichgewichte zwischen Licht- und Dunkelreaktion nicht in einer gesteigerten UV-B-Empfindlichkeit von PS II münden, ist, dass UV-B unabhängig vom Redoxzustand des Plastochinonpools in erster Linie den Wasserspaltapparat von PS II schädigt (RENGER et al. 1989, VASS et al. 1999, LARKUM et al. 2001). Ein verlangsamter Calvin-Zyklus hätte auf diese donorseitig direkt erfolgende Schädigung von PS II keinen Einfluss. Sehr viel wahrscheinlicher ist, dass der Mechanismus, welcher bei Kühle eine Steigerung der UV-B-Empfindlichkeit von PS II bewirkt, im Zusammenhang mit der Reparatur von geschädigten PS II-Zentren steht. Aus diesem Grund wurde bei unterschiedlichen Temperaturen die Reparatur von zuvor UV-B-geschädigten PS II-Zentren untersucht. Die Ergebnisse hierzu werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

4.1.2. Schädigung und Reparatur bestimmen Maß der Photoinhibition

Die Schädigung von PS II-Zentren durch ein Überangebot an photosynthetisch aktiver Strahlung stellt in lebenden Organismen, die oxidative Photosynthese betreiben, einen häufigen und unvermeidbaren Vorgang dar (VASS et al. 2007, TAKAHASHI & MURATA 2008). Um die Anhäufung von geschädigten PS II-Zentren zu vermeiden, entstanden in diesen Organismen sehr effiziente Mechanismen, die einen kontrollierten Abbau sowie eine effiziente Reparatur von geschädigten PS II-Zentren ermöglichen. Eine Vielzahl von Prozessen ist an dem Abbau und an der Reparatur dieser geschädigten Photosysteme beteiligt (ARO et al. 1993, TAKAHASHI & MURATA 2008). Hierzu gehören das Herauslösen der geschädigten Reaktionszentren aus den betroffenen Photosystemen, deren lateraler Transfer innerhalb der Thylakoidmembran in die Stroma-exponierten Bereiche der

Thylakoide, die Degradierung der D1-Proteine durch Proteasen sowie die Neusynthese intakter D1-Proteine (YOKTHONGWATTANA & MELIS 2006, CHEREGI et al. 2007). Das Zusammenspiel von Schädigung und Schadensreparatur bestimmt das sichtbare Ausmaß der Schädigung von PS II. Im Optimum hält die Reparatur mit der Schädigung schritt, beide Vorgänge stehen im Gleichgewicht und eine sichtbare Schädigung tritt nicht auf. Erst wenn die Rate der Schädigung die der Reparatur zu übersteigen beginnt, wird die Schädigung sichtbar. Dies kann z. B. bei einer Hemmung der Reparatur geschehen. Viele Prozesse der PS II-Reparatur sind temperaturabhängig und laufen daher bei Kühle in nicht akklimatisierten Systemen nur verlangsamt ab (ALLAKHVERDIEV & MURATA 2004). So werden in Kulturen des einzelligen Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803, die zuvor bei 34 °C kultiviert wurden, bereits bei 25 °C und 18 °C viele der Reparaturreaktionen inhibiert. Sinkt die Temperatur auf 10 °C, kommen sie gänzlich zum Erliegen (ALLAKHVERDIEV & MURATA 2004, NISHIYAMA et al. 2006b). Auch bei *A. thaliana* konnte nach lichtinduzierter Inhibition von PS II ein deutlich verlangsamer Wiederanstieg der maximalen Quantenausbeute beobachtet werden, wenn die Erholung unterhalb einer Temperatur von 22 °C erfolgte (VIJAYAN & BROWSE 2002). Wäre dies auch nach einer durch UV-B induzierten Inhibition von PS II zu beobachten gewesen?

Die in Abbildung 3.3 präsentierten Daten belegen, dass auch die Reparatur von UV-B-geschädigten PS II-Zentren von der Temperatur abhängig ist. Es wird gezeigt, dass an eine moderate Temperatur (21 °C) akklimatisierte Pflanzen bei Kühle (9 °C) deutlich verlangsamte Reparaturreaktionen zeigen und bei Kühle nach einer Erholungsphase von 9 h nur etwa 70 % jener maximalen Quantenausbeute erzielen, welche sie bei 21 °C erreichen würden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die für warm-kultivierte Pflanzen beobachtete höhere UV-B-Empfindlichkeit bei Kühle zumindest teilweise auf ineffizientere Reparaturmechanismen zurückzuführen ist. Auch GOMBOS et al. (1994) folgern, dass die unter kühlen Bedingungen bei *Synechocystis* sp. PCC6803 verstärkt auftretende Photoinhibition von PS II hauptsächlich auf einer verlangsamteten Reparatur beruht.

In Abbildung 3.3 wird jedoch auch gezeigt, dass *A. thaliana* in begrenztem Umfang zu einer Akklimatisation der PS II-Reparatur an Kühle befähigt ist. Reparaturraten von UV-B-bedingten PS II-Schäden, wie sie bei 21 °C von temperat akklimatisierten Pflanzen erzielt werden, konnten jedoch nicht beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Ursache der erhöhten UV-B-Empfindlichkeit bei Kühle - die verlangsamtete Reparatur - in Pflanzen durch Akklimatisation in ihrem Ausmaß zwar gemindert, nicht aber vollständig verhindert werden kann. Daher sind in Pflanzen weitere Strategien erforderlich, mittels derer sie ihre Überlebenschancen bei Kühle verbessern. Eine Verbesserung der epidermalen UV-B-Abschirmung ist eine derartige Strategie, mit der sie bei Kühle einen höheren UV-B-Resistenzgrad erreichen.

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

In tropischen Pflanzen können kurzfristige Kühleperioden große Schäden bewirken (LYONS 1973). Die in dieser Arbeit bisher gezeigten Daten belegen, dass plötzlich eintretende Temperaturabnahmen auch für *A. thaliana* problematisch sein können, da sie die UV-B-Empfindlichkeit deutlich erhöhen (Abschnitt 4.1.1). Eine langfristige Kultivierung bei niedriger Temperatur oberhalb des Gefrierpunkts führt in Pflanzen jedoch zu einem Abhärtungsprozess, der es z.B. nicht-tropischen Pflanzen ermöglicht, Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes dauerhaft zu überstehen (SCHÖNER & KRAUSE 1990, THOMASHOW 1999, ALLEN & ORT 2001, USADEL et al. 2008). Ein verbessertes antioxidativ wirksames Schutzsystem (SCHÖNER & KRAUSE 1990), ein verstärkter Einbau ungesättigter Lipide in Membransysteme zur Steigerung der Membranfluidität (MOON et al. 1995) und die Anpassung des Calvin-Zyklus an Kälte durch eine vermehrte Aktivierung von Rubiscomolekülen (KINGSTON-SMITH et al. 1999) fördern die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber Kühle und Frost.

Ferner geht aus dem Vergleich von kühl mit warm kultivierten Pflanzen in Abbildung 3.4.A hervor, dass auch die Resistenz von Pflanzen gegenüber schädlicher UV-B-Strahlung sich erhöht, wenn diese bei Kühle kultiviert werden. Worauf ist die erhöhte UV-B-Resistenz von bei Kühle kultivierten Pflanzen zurückzuführen? Um zu beurteilen, ob die ausgeprägtere UV-B-Resistenz auf einer höheren UV-B-Toleranz oder auf einer effektiveren UV-B-Vermeidung beruht, wurden die UV-B-induzierten PS II-Schädigungen gegen die in den Pflanzen wirksamen UV-B-Bestrahlungsstärken ($UV-B_{ef}$) aufgetragen (Abbildung 3.4.B). Vorteilhaft bei dieser Darstellungsweise ist, dass die Schädigungsraten hier um mögliche Effekte der epidermalen UV-B-Abschirmung bereinigt werden, bleibende Unterschiede zwischen den Schädigungsraten wären somit allein auf unterschiedliche UV-B-Toleranzen in beiden Anzuchtgruppen zurückzuführen. Es zeigt sich, dass auch nach Abzug von UV-B-Vermeidungseffekten, die UV-B-induzierten PS II-Schädigungen in kühl kultivierten Pflanzen geringer ausfallen, die UV-B-Toleranz dieser Pflanzen also etwas größer einzuschätzen ist. Jedoch sind die Unterschiede zwischen den Schädigungskurven beider Kultivierungsgruppen nur gering und weisen daher auf relativ unbedeutende unterschiedliche UV-B-Toleranzgrade zwischen beiden Gruppen hin. Es ist folglich davon auszugehen, dass die höhere UV-B-Resistenz von kühl kultivierten Pflanzen vor allem auf einer besseren epidermalen Abschirmung von schädlicher UV-B-Strahlung beruht.

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 effektiver UV-B-Bestrahlungsstärke behandelte Pflanzen sich etwas schneller

erholen, wenn sie zuvor bei Kühle kultiviert wurden. Diese unabhängig von der epidermalen Abschirmung etwas höhere UV-B-Resistenz von kühl kultivierten Pflanzen macht sich auch in Abbildung 3.4.B in den geringen Unterschieden zwischen den beiden Schädigungskurven bemerkbar. So weisen ungeachtet des jeweils bei Kühle angewendeten UV-B_{ef} die bei Kühle gewachsenen Pflanzen eine konstant etwas geringere PS II-Schädigung auf als die bei 21 °C kultivierten Pflanzen.

Eine zentrale Bedeutung für die höhere UV-B-Toleranz von bei Kühle kultivierten Pflanzen könnte die bereits genannte Anpassung der Membranfluidität an niedrige Temperaturen durch die Erhöhung des Anteils an ungesättigten Lipiden in den Membranen haben (MOON et al. 1995, KRESLAVSKI et al. 2007). PS II-Komplexe sind in den Chloroplasten zum größten Teil in den Thylakoidmembranen der Granastapel organisiert (ANDERSSON & ANDERSON 1980). Die Reparatur dieser Komplexe nach Photoinhibition findet jedoch in den Stroma-exponierten Bereichen der Thylakoide statt (BARBATO et al. 1992), da dort die für die Proteinsynthese zuständigen, plastidären Ribosomen lokalisiert sind (HERRIN & MICHAELS 1985, BOSCHETTI et al. 1990). Nicht funktionstüchtige PS II-Komplexe müssen zur Reparatur demnach zunächst durch Diffusionsprozesse zu den Ribosomen transportiert werden. Die Diffusionsrate und damit die Reparaturgeschwindigkeit steht jedoch in Abhängigkeit zur Fluidität der Thylakoidmembran (MOON et al. 1995). Diese nimmt mit sinkender Temperatur ab. Es ist bekannt, dass Pflanzen die Fluidität ihrer Membranen der Temperatur entsprechend anpassen, indem sie die Menge an ungesättigten Fettsäuren in den Membranen steigern (COSSINS 1994, NISHIDA & MURATA 1996). Es ist daher anzunehmen, dass die schnellere Reparatur von PS II-Schäden bei kühl kultivierten Pflanzen auf deren höheren Gehalt an ungesättigten Membranlipiden zurückzuführen ist und diese Pflanzen auch deshalb eine höhere UV-B-Resistenz aufweisen.

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 Anzuchtstemperatur kaum variiert, wenn diese bei ihrer jeweiligen Anzuchtstemperatur mit UV-B relativ geringer Bestrahlungsstärke (bis $0,2 \text{ W m}^{-2}$) 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

befähigt sind. Ob diese Beobachtung jedoch auch unter natürlichen Strahlungsbedingungen gemacht werden kann, wenn neben UV-B auch UV-A und sichtbares Licht mit hoher Bestrahlungsstärke auf Pflanzen einwirken, bedarf einer eingehenden Prüfung. Hilfreich wären hierbei sicherlich UV-B- und UV-A-Ausschlussexperimente, wie sie in ähnlicher Weise von TISCHLER (2010) unter Freilandbedingungen durchgeführt wurden. Jedoch müsste bei solchen Freilandexperimenten neben der einfallenden Strahlung auch die Kultivierungstemperatur aktiv einregelbar sein, um mittels der Resultate solcher Experimente auf die Bedeutung der epidermalen Abschirmung für die Temperaturakklimatisation von Pflanzen schließen zu können.

4.1.4. $UV-B_{ef}$ - 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 eingestrahelter UV-B-Bestrahlungsstärke ($UV-B_{ir}$) berechnet und als die effektive UV-B-Strahlung ($UV-B_{ef}$) 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 ($UV-B_{ir}$) 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 ($UV-B_{ef}$) 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 $UV-B_{ef}$ als unabhängige Messgröße ermöglicht die Zusammenfassung von Abbildung 3.1.A und 3.1.B zu

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.

Bei der Messung der epidermalen Transmission von Blättern mittels Xenon-PAM-Technik wurde durch einen Messstrahl mit fester Wellenlänge und geringer Spaltbreite die Transmission der Epidermis erfasst. Der Messstrahl zur Bestimmung der UV-B-Transmission entsprach einer Wellenlänge von 314 nm (Abbildung 2.3). Die Berechnung des UV-B_{ef} mittels dieser Methode war daher nur möglich, da das spektrale Intensitätsmaximum der während der Pflanzenanzucht und -behandlung verwendeten UV-B-Strahlungsquelle mit dem des verwendeten UV-B-Messstrahl übereinstimmte. Bei der Verwendung einer UV-B-Strahlungsquelle mit einem anderen spektralen Maximum wäre ein entsprechender UV-B-Messstrahl für die Bestimmungen von T(UV-B) und UV-B_{ef} erforderlich gewesen. Wird anstatt einer künstlichen UV-B-Strahlungsquelle natürliches Sonnenlicht verwendet, wäre die Anwendung der schnellen XE-PAM-Technik zur Bestimmung von UV-B_{ef} nicht korrekt. Die Bestimmung von UV-B_{ef} stellte sich in diesem Fall wesentlich komplizierter dar, weil für den vollständigen UV-Spektralbereich natürlichen Sonnenlichts die Berechnung der UV-Transmission wie bei CEROVIC et al. (2002) und BIDELE et al. (2007) auf Basis von Chlorophyll-Anregungsspektren erfolgen müsste.

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 überschritten wurde (THIMIYAN 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.

Doch auch nach Etablierung des epidermalen UV-B-Schutzschirms bleiben Blattepidermen für UV-B weiterhin geringfügig durchlässig. Aus den Abbildungen 3.6 und 3.11 geht hervor, dass bei 21 °C noch etwa 65 mW m⁻² und bei 9 °C ca. 50 mW m⁻² UV-B bis zu den Chloroplasten vordringen. Verantwortlich hierfür scheinen die Zellwände zwischen den Epidermiszellen zu sein. Nach KOLB & PFÜNDEL (2005) bleiben diese auch nach Etablierung des epidermalen UV-B-Schutzschirms für UV-B transparent und verhindern dadurch eine vollständige UV-B-Abschirmung. Doch diese Eigenschaft ist nicht unbedingt von Nachteil für Pflanzen, da auf diese Weise auch nach Aufbau des epidermalen UV-B-Schutzschirms die Fähigkeit von Blättern erhalten bleibt, UV-B wahrzunehmen. UV-B wird in Pflanzen durch den Rezeptor UVR 8 wahrgenommen (JENKINS 2009b). Es beeinflusst die Photomorphogenese (JANSEN et al. 1998, BROSCHE & STRID 2003, ULM et al. 2004) und stimuliert die Expression von Genen, welche den Grad der UV-B-Abschirmung sowie die Effizienz der Schadensreparatur in Pflanzen bestimmen (CONKLIN et al. 1996, BROSCHE & STRID 2003, FROHNMEYER & STAIGER 2003). Für *A. thaliana* wie auch für *Zea mays* wurde zudem nachgewiesen, dass ein in Blättern aufgenommenes UV-B-Signal nicht nur vor Ort sondern auch in anderen Pflanzenorganen, wie z.B. den Wurzeln ein verändertes Transkriptprofil bewirkt (CASATI & WALBOT 2004, KILIAN et al. 2007). Wären Epidermen von UV-B-akklimatisierten Blättern für UV-B vollständig undurchdringlich, könnte der Photorezeptor UVR 8 UV-B nicht mehr wahrnehmen und typische, UV-B-abhängige Reaktionen in der Pflanze würden nicht mehr induziert. Für die Induktion solcher Pflanzenreaktionen sollen zwischen 2,5 % (BROWN & JENKINS 2008) und 25 % (FROHNMEYER & STAIGER 2003) der UV-B-Strahlung des für hiesige Breitengrade typischerweise auftretenden Sonnenlichts ausreichend sein. Dies entspräche einer UV-B-Bestrahlungsstärke von 5 bis 50 mW m⁻² und somit einer Bestrahlungsstärke, die weder in PS II-Zentren (Abbildung 3.1) noch in der DNA (BATSCHAUER et al. 1996, KIM et al. 1998, FROHNMEYER et al. 1999) zu gravierenden Schäden führt. Die 50 bis 65 mW m⁻² UV-B, welche durch Epidermen bereits UV-B-akklimatisierter Pflanzen gelangen, könnten somit die UV-B-assoziierte Signaltransduktion aufrechterhalten ohne dabei für diese Pflanzen schädlich zu werden.

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

Für einige pflanzentypische Phänomene, wie dem Hypokotyllängenwachstum, dem circadianen Rhythmus oder der Vernalisationsempfindlichkeit, wurde gezeigt, dass deren Ausprägung in Akzessionen von *A. thaliana* mit der geografischen Breite ihrer jeweiligen Herkunftsorte korreliert (STENOIEN et al. 2002, MICHAEL et al. 2003, STINCHCOMBE et al. 2005). Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der geografischen Breite eines natür-

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 verschieden 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 verschiedenen 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 winterannualen Akzessionen *TRI*, *COL* und *LER* wären daher bis zur Blüte einer täglichen UV-B-Bestrahlungsstärke von 500 bis $1500 \text{ J m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ausgesetzt (Abbildung 4.2). Wird für den nordeuropäischen und ebenfalls winterannualen Ökotyp *ORN* eine etwa um 3 Wochen spätere Blühphase angenommen, so ergeben

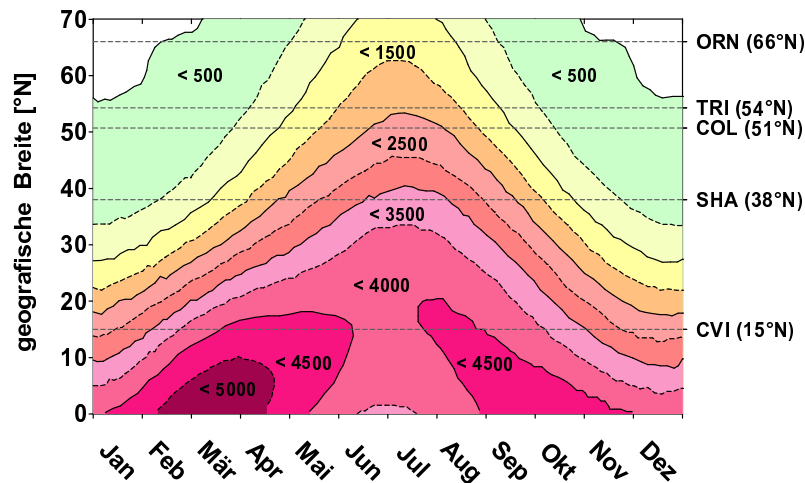


Abbildung 4.2.: Jahreslauf der auf der Erdoberfläche auftreffenden und von der geografischen Breite abhängigen UV-B-Bestrahlungsstärke. Die Abbildung zeigt für die nördliche Hemisphäre zwischen 0° und 70°N (siehe linke Ordinate) den von der geografischen Breite abhängigen Jahreslauf (siehe Abszisse) der täglichen UV-B-Strahlungsbelastung. Punkte gleicher Strahlungsbelastung sind in dieser Darstellung ähnlich wie in einem Höhenlinienmodell durch Isolinien miteinander verbunden. Die UV-B-Bestrahlungsstärke ist in $\text{J m}^{-2} \text{d}^{-1}$ angegeben. Auf der rechten Ordinate sind entsprechend der geografischen Breitengrade ihrer Herkunftsorte die fünf untersuchten *Arabidopsis*-Akzessionen ORN, TRI, COL, SHA und CVI eingetragen. Die exakten Breitengrade ihrer Herkunftsorte stehen in Klammern hinter den jeweiligen Ökotyp-Bezeichnungen. Weitere Informationen zu diesen Akzessionen sind Kapitel 2.1 sowie der Abbildung 3.7 zu entnehmen. Die Daten zur Erstellung dieser Abbildung stammen aus MADRONICH (1993).

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 winterannuellen europäischen Akzessionen von *A. thaliana*, keimt dieser Ökotyp im Juni und hat bereits gegen Ende Juli seinen Entwicklungszyklus vollständig abgeschlossen (KHURMATOV 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 der extremen klimatischen Bedingungen an ihren natürlichen Wuchsstandorten ist es sowohl für den *SHA*- als auch für den *CVI*-Ökotyp nicht möglich, zur Pflanzenentwicklung auf Zeiträume im Jahr auszuweichen, an denen sie nur geringen UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt wären. Die Hypothese einer derartigen Vermeidungsreaktion muss folglich abgelehnt werden. Wahrscheinlicher ist, dass *A. thaliana*-Akzessionen, welche in Mitteleuropa bevorzugt offene Ackerflächen, sandige Dünen (Abbildung 4.3) und Ruderalstellen wie Wegesränder besiedeln (BÄSSLER et al. 1996), in strahlungsinintensiven Breiten an wesentlich geschützteren Stellen, mit moderaterem Mikroklima anzutreffen sind. So beschreibt LOBIN (1983) beispielsweise, dass sich auf den Capverdischen Inseln *A. thaliana* nicht wie in Europa auf den in den Ebenen liegenden Feldern, sondern in relativ großer Höhe oberhalb von 1200 m in schattigen Felspalten entwickelt und dort in der Regel von Moosen bedeckt ist. Durch eine derartige Beschattung wäre dieser Ökotyp dort vor extremer UV-B-Bestrahlung geschützt.



Abbildung 4.3.: *A. thaliana* (Ökotyp *TRI*) auf einer Düne an der Westküst von Schleswig-Holstein am 9. April 2008.

Aufgrund dieser Ergebnisse muss also Abstand von der Hypothese genommen werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Resistenz eines Ökotypen 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

Beobachtungen an anderen Ökotypen von *A. thaliana* bestätigt zu finden. *COL* gehört zu den in botanischen Laboren am längsten und am häufigsten verwendeten Ökotypen des Modellorganismus *A. thaliana* (BENTSINK & KOORNNEEF 2002, MASSONNET et al. 2010). In der Regel findet die Hälterung solcher Modellorganismen im Labor über viele Generationen bei konstant bleibenden Umweltbedingungen statt. Bei der in der Zoologie als Modellorganismus etablierten Taufliege *Drosophila melanogaster* können solche, über viele Generationen konstanten Hälterungsbedingungen z.B. zu einer allgemein verringerten Stresstoleranz sowie einer verkürzten Lebenserwartung führen (HOFFMANN et al. 2001). LAKEMAN et al. (2009) beschreiben verschiedene genetische Prozesse, die während der Kultivierung von Mikroalgen-Isolaten bei diesen häufig zu einer verminderten genetischen Vielfalt und einer damit einhergehenden, verringerten Stressresistenz führen und prinzipiell auch für Pflanzen denkbar sind. PIGLIUCCI (2002) geht z.B. für *A. thaliana* davon aus, dass in Laboren, aufgrund einer unbewussten genetischen Selektion auf stark verkürzte Lebenszyklen, Stämme entstanden sind, die bereits eine stark verringerte Plastizität aufweisen. Sie könnten bereits einen Verlust an phänotypischen Merkmalen aufweisen und daher für die Untersuchung von einigen Fragestellungen, wie z.B. der nach der Perzeptionsfähigkeit von Kühle, ungeeignet sein. Da jedoch zwischen den verschiedenen Akzessionen in Bezug auf deren UV-B-Akklimationsfähigkeit keine wesentlichen Unterschiede und auch keine Besonderheiten zum im Vorfeld untersuchten *COL*-Ökotyp festgestellt worden sind, wird davon ausgegangen, dass der *COL*-Ökotyp einen für die hier vorgestellten Untersuchungen geeigneten Modellorganismus darstellt.

4.3. Temperaturabhängige UV-B-Akklimation durch Polyphenole

In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, wie Kühle allein oder im Zusammenspiel mit UV-B-Strahlung eine verstärkte UV-Abschirmung in *A. thaliana* induziert (siehe auch BILGER et al. (2007)). Im Folgenden soll nun diskutiert werden, auf welche Substanzen dieser verstärkte UV-Schutz zurückzuführen ist. Da in Blättern bei Kühle parallel zu der Erhöhung der Abschirmung eine verstärkte Flavonoidsynthese zu beobachten ist (LEYVA et al. 1995, OLSEN et al. 2008, ALBERT et al. 2009, BROSSA et al. 2009) und diese Polyphenole als UV-B-Abschirmpigmente betrachtet werden (CALDWELL et al. 1983, LI et al. 1993, BORNMAN et al. 1997), liegt die Vermutung nahe, dass die bei Kühle verstärkte UV-Abschirmung durch erhöhte Flavonoidgehalte verursacht wird.

Jedoch wird die potenzielle UV-Abschirmfunktion von Flavonoiden auch in Frage gestellt. LANDRY et al. (1995) verglichen z.B. *fah1*- mit *tt5*-Mutanten von *A. tha-*

liana im Hinblick auf deren UV-B-Resistenz. Sie beobachteten, dass nach UV-B-Bestrahlung in Blättern von *fah1*-Mutanten deutlich größere Schäden in Form von Chlorosen sichtbar wurden als in Blättern von *tt5*-Mutanten. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch vergleichende Untersuchungen an *fah1*- und *tt4*-Mutanten. Zusätzlich zu den UV-B-Empfindlichkeiten bestimmte SHEAHAN (1996) über Chlorophyll- bzw. Phenolfluoreszenz-Messungen die jeweiligen UV-Abschirmungsgrade in diesen Mutanten. Wegen der vergleichsweise geringen UV-B-Empfindlichkeit und der relativ hohen UV-Abschirmung bei *tt4*-Mutanten schrieb er Flavonoiden eine nur geringe, Hydroxyzimtsäuren jedoch eine sehr viel größere UV-abschirmende Wirkung zu. Auch AGATI et al. (2007, 2009) bescheinigen Flavonoiden, unter anderem aufgrund der Arbeiten von LANDRY et al. (1995) und SHEAHAN (1996) sowie aufgrund der geringen Extinktionskoeffizienten von Flavonoiden im Wellenlängenbereich von UV-B-Strahlung, keine bedeutende UV-B-Abschirmfunktion. Sie gehen jedoch wegen des hohen antioxidativen Potenzials bei Flavonoiden (SALAH et al. 1995, RICE-EVANS et al. 1997, HERNANDEZ et al. 2009) von Substanzen aus, welche bei UV-B-Stress eine Entgiftung und Neutralisierung von verstärkt gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies bewirken könnten.

Aufgrund dieser Kontroverse um die Funktion von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen wurde das im vorigen Abschnitt (Kapitel 4.2) diskutierte Experiment zur UV-B-Akklimatisation ein weiteres Mal durchgeführt. Zusätzlich wurden jedoch die Polyphenolgehalte in den Blättern der Versuchspflanzen qualitativ wie auch quantitativ durch geeignete HPLC-Methoden bestimmt und den zugehörigen epidermalen Abschirmungswerten gegenübergestellt. Da mit dieser Untersuchung der Beitrag von spezifischen Polyphenolen an der epidermalen UV-Abschirmung bestimmt werden sollte, wurden neben den beiden Wildtyp-Akzessionen *Columbia*- und *Landsberg erecta* auch die von ihnen abzuleitenden Polyphenol-Mangel-Mutanten *tt4*, *tt5*, *tt7* und *fah1* überprüft. Die funktionelle Bedeutung der verschiedenen phenolischen Substanzen für *A. thaliana* wird nun diskutiert.

4.3.1. Polyphenole in *A. thaliana*

Identifikation UV-absorbierender Polyphenole in Blättern von *A. thaliana*

Untersuchungen an identischen Genotypen von *A. thaliana* ergeben, dass trotz standardisierter Wachstumsbedingungen in verschiedenen Laboren kultivierte Pflanzen häufig signifikant unterschiedliche Phänotypen ausbilden (MASSONNET et al. 2010). Phänotypisch zu unterscheiden sind sowohl morphologische Merkmale wie Blatt- und Rosettengröße als auch die Zusammensetzung der in den Pflanzen gebildeten Metabolite und

Transkripte. Auch Transkripte der Polyphenolbiosynthese werden in nicht einheitlicher Menge gebildet. Um die Repräsentativität der in dieser Arbeit vorgestellten Daten zu belegen, wurde daher die Zusammensetzung der in den Blättern der Versuchspflanzen gebildeten Polyphenole mittels ESI-MS-HPLC-Technik qualitativ bestimmt. In dem sich jetzt anschließendem Abschnitt werden die Resultate dieser qualitativen Polyphenolanalyse auf Übereinstimmung mit entsprechenden Daten anderer Autoren geprüft.

Polyphenole liegen in der pflanzlichen Zelle in der Regel nicht als Aglyka vor, sondern bilden mit unterschiedlichen, kovalent gebundenen Substituenten zusammengesetzte, größere Moleküle. Bei Flavonoiden handelt es sich bei diesen Substituenten um Methyl- und Acetylgruppen sowie um verschiedene, glykosidisch gebundene Zucker (WINKEL 2006). Durch diese Modifikationsmöglichkeit existiert für jedes Flavonoid ein mannigfaltiges Spektrum an verschiedenen Derivaten. Alleine für Quercetin wurden bisher 350 verschiedene Derivate beschrieben (HARBORNE & BAXTER 1999). Für die massenspektrometrische qualitative Bestimmung werden Polyphenole daher zunächst in ihre einzelnen Bestandteile fragmentiert (Abschnitt 2.8.2). Anschließend werden die molekularen Massen dieser Molekülfragmente sukzessive bestimmt.

Für *A. thaliana* konnte GRAHAM (1998) auf diese Weise die Zusammensetzung von mehreren, verschiedentlich mit Rhamnose- und Glukosemolekülen glykosidierten Flavonolderivaten darstellen. Da diese Ergebnisse jedoch auf rein massenspektrometrischen Daten beruhten, wurde damals keine Aussage über die jeweiligen Lokalisationen der verschiedenen Substituenten an den zentralen Flavonolderivaten gemacht. Erst Struktur-aufklärende Untersuchungen mittels NMR-Technik gaben Aufschluss über die Anbindungsstellen der von GRAHAM (1998) beschriebenen Flavonolsubstituenten. VEIT & PAULI (1999), JONES et al. (2003) und KERHOAS et al. (2006) zeigten unabhängig voneinander, dass die in *A. thaliana* synthetisierten Flavonole in der Regel an Position 3 und 7 (Abbildung 4.4) glykosidiert werden. Bei den hierfür verantwortlichen Enzymen handelt es sich um sogenannte Flavonol-Rhamnosyl- bzw. -Glukosyltransferasen, welche jeweils in der Lage sind, sowohl Kämpferol- als auch Quercetinmoleküle zu glykosidieren. Die in *A. thaliana* stattfindende Flavonol-Glykosidierung ist in den Arbeiten von JONES et al. (2003) und KERHOAS et al. (2006) ausführlich beschrieben worden.

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 bestimmbaren 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

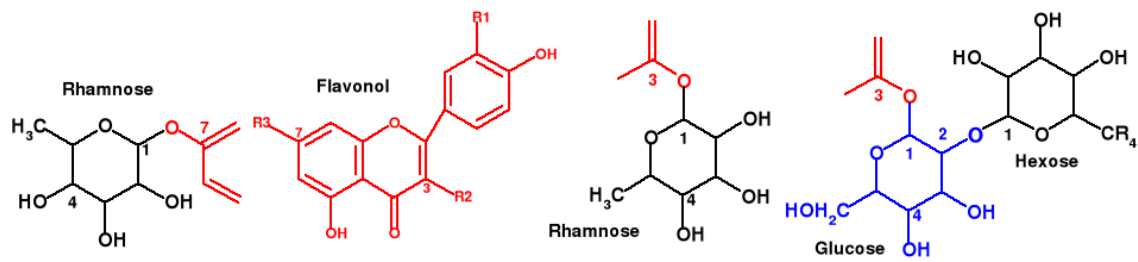


Abbildung 4.4.: Anbindungsstellen der Substituenten von Flavonolen in *A. thaliana*. In *A. thaliana* werden Flavonole (rot) an Position 7 (= R3) mit einem einzelnen Rhamnosemolekül (schwarz) und an Position 3 (= R2) entweder ebenfalls mit einem einzelnen Rhamnosemolekül (schwarz) oder einem Di-Hexosid glykosidiert. Das Di-Hexosid ist über ein Glukosemolekül (blau) (3→1)-glykosidisch mit dem Flavonol verbunden. Zwischen dem Glukose- und einem weiteren Hexosemolekül (Rhamnose: R4 = CH₃ oder Glukose: R4 = CH₂OH) besteht eine (1→2)-glykosidische Bindung. Quercetin: R1 = OH, Kämpferol: R1 = H.

(Signal2 und 7) konnte massenspektrometrisch nicht geklärt werden. Aufgrund der UV-Absorptionseigenschaften handelt es sich bei diesen beiden Substanzen jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit um Hydroxyzimtsäuren.

Die aufgrund der Zusammensetzung abgeleiteten Strukturen der massenspektrometrisch untersuchten Polyphenole sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Bei Übereinstimmung dieser Strukturen mit Ergebnissen anderer Autoren, sind diese in der Tabelle jeweils als Referenz angegeben.

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.

Signal	t_R [min]	Einzelkomponenten	Vermutete Substanz (Referenz)
1	13,3	Sinapoyl, Hexose	Sinapoylglukose (LORENZEN et al. 1996)
2	15,7	HCA	5-Hydroxy-Feruloylglukose (HOFFMANN-WÜLFING 2007)
3	16,5	Quercetin, 2 × Rhamnose, Glukose	Quercetin-3-O-Rhamnoglukosid-7-O-Rhamnosid (GRAHAM 1998, JONES et al. 2003)
4	17,4	Kämpferol, 2 × Rhamnose, Glukose	Kämpferol-3-O-Rhamnoglukosid-7-O-Rhamnosid (GRAHAM 1998, JONES et al. 2003)
5	19,6	Sinapoyl, Malat	Sinapoylmalat (LORENZEN et al. 1996)
6	22,0	Quercetin, Glukose, Rhamnose	Quercetin-3-O-Glukosid-7-O-Rhamnosid (GRAHAM 1998, KERHOAS et al. 2006)
7	24,5	HCA	-
8	25,1	Kämpferol, Cumaroyl, 2 × Glukose	Kämpferol-3-O-di-Glukosid-7-O-Rhamnosid (VEIT & PAULI 1999)
9	28,2	Kämpferol, Glukose, Rhamnose	Kämpferol-3-O-Glukosid-7-O-Rhamnosid (GRAHAM 1998, VEIT & PAULI 1999)
10	29,5	Quercetin, 2 × Rhamnose	Quercetin-3-O-Rhamnosid-7-O-Rhamnosid (GRAHAM 1998, KERHOAS et al. 2006)
11	35,2	Kämpferol, 2 × Rhamnose	Kämpferol-3-O-Rhamnosid-7-O-Rhamnosid (GRAHAM 1998, VEIT & PAULI 1999)

Die Zusammensetzungen der sieben detektierten Flavonolglykoside entsprechen den Ergebnissen von GRAHAM (1998), VEIT & PAULI (1999), JONES et al. (2003) und KERHOAS et al. (2006). Daher wird für sie jeweils von den Strukturen ausgegangen, welche auch in diesen Arbeiten beschrieben stehen. Lediglich zwei der Substanzen, welche bei KERHOAS et al. (2006) aufgeführt sind, konnten im untersuchten Pflanzenmaterial nicht nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um das Kämpferol- bzw. das Quercetin-3-O-Rhamnosid. Nach JONES et al. (2003) sind diese Flavonol-Rhamnoside lediglich als Zwischenprodukte der Flavonolglykosid-Synthese zu betrachten, welche in *A. thaliana* nach Entstehen sofort an Position 7 durch eine Glukosyl- bzw. eine Rhamnosyltransferase glykosidiert werden. Aus diesem Grund treten in Blättern von *A. thaliana* in der Regel nur sehr geringe Mengen dieser Substanzen auf. Das geringe Vorkommen mag erklären, weshalb beide Substanzen im untersuchten Pflanzenmaterial nicht nachgewiesen werden konnten. Bei den für Signal 1 und 5 verantwortlichen Sinapoylderivaten handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Sinapoylglukose (Signal 1) und Sinapoylmalat (Signal 5). Beide Sinapinderivate sind wichtige Bestandteile des Sinapinsäure-Metabolismus. Innerhalb dieses pflanzlichen Synthesewegs wird Sinapinsäure zunächst mit Glukose zu Sinapoylglukose verestert. In Blättern von *A. thaliana* wird Sinapoylglukose anschließend durch Austausch des Glukosemoleküls mit einem Malatrest zu Sinapoylmalat umgesetzt (LORENZEN et al. 1996). Im Gegensatz zu Sinapoylglukose und anderen löslichen Hydroxyzimtsäuren akkumuliert Sinapoylmalat in *A. thaliana* in den Vakuolen der Epidermiszellen und hat daher unter den Hydroxyzimtsäuren die größte Bedeutung für die UV-B-Abschirmung (CHAPPLE et al. 1992, LORENZEN et al. 1996). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier vorgestellten Daten der qualitativen Polyphenolanalyse durch entsprechende Ergebnisse aus der Literatur belegt werden.

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 $250 \mu\text{mol m}^{-2}$ auf etwa $700 \mu\text{mol m}^{-2}$ an. Niedrige Temperatur während der Kultivierung bewirkte keine Erhöhung der Maximalmenge an Hydroxyzimtsäuren, jedoch wurde

diese bei 9 °C schon bei geringeren UV-B-Bestrahlungsstärken erreicht. Im Gegensatz hierzu 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 steuerbaren 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 steuerbare, UV-B-abhängige Synthese von Flavonolen in Pflanzen beobachten.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Daten, dass die Akkumulation der Flavonole wesentlich stärker von den induzierenden Umweltfaktoren Kühle und UV-B abhängig ist als die der Hydroxyzimtsäuren. Aber wie verhält es sich, wenn *A. thaliana* nicht in Klimakammern, sondern im Freiland kultiviert wird? Wie stark unterscheiden sich die Polyphenolgehalte in unter natürlichen Umweltbedingungen gewachsenen Pflanzen von denen der in Klimakammern kultivierten Versuchspflanzen? Im Zusammenhang mit diesen Fragen wurde im Rahmen einer Diplomarbeit die Induktion der epidermalen UV-B-Abschirmung an *A. thaliana* im Freiland untersucht (TISCHLER 2010). Ergebnisse der quantitativen Polyphenolbestimmung aus dieser Diplomarbeit sind in Tabelle 4.2 den hier diskutierten Daten gegenübergestellt. In beiden Fällen beziehen sich die angegebenen Flavonol- und Hydroxyzimtsäure-Gehalte auf den *COL*-Ökotyp von *A. thaliana*.

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.

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

	Klimakammer				Freiland			
	21 °C		9 °C		<i>A. thaliana</i> ¹		<i>V. vinifera</i> ²	
	WL	+UV-B	WL	+UV-B	März	Mai	-UV	SL
HCA	201 ±79	696 ±45	436 ±41	728 ±84	268 ±19	434 ±47	1289 ±142	903 ±51
Kämpf.	9 ±8	185 ±29	290 ±62	725 ±86	583 ±54	2051 ±264	127 ±21	599 ±83
Querc.	0	7 ±3	0	247 ±45	2429 ±456	2103 ±513	450 ±59	1426 ±81

¹ TISCHLER (2010) ² KOLB et al. (2001)

Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung und der Gehalt an Polyphenolen für jede Pflanzenart spezifisch zu betrachten ist (BATE-SMITH 1968). Ein Vergleich der Polyphenolgehalte der Klimakammerkulturen von *A. thaliana* mit Freilandkulturen anderer Pflanzenarten ist daher grundsätzlich als nicht zuverlässig anzusehen. Um jedoch einen Eindruck zu erhalten, welche Polyphenolgehalte von anderen Pflanzenarten im Freiland akkumuliert werden, sind in Tabelle 4.2 auch Daten für *Vitis vinifera* aufgeführt (KOLB et al. 2001). Es fällt auf, dass bei natürlicher Sonneneinstrahlung, wie in *A. thaliana* so auch in *V. vinifera* wesentlich mehr Flavonole ($2000 \mu\text{mol m}^{-2}$) als Hydroxyzimtsäuren ($900 \mu\text{mol m}^{-2}$) gebildet werden. Für andere Arten wurde ebenfalls beschrieben, dass im Freiland unter natürlichen Strahlungsbedingungen vor allem die Synthese von Flavonolen induziert wird (BIDEL et al. 2007).

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

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?

Aus den Ergebnissen der quantitativen Bestimmung der Polyphenolgehalte geht hervor, dass in den untersuchten Mutanten die Polyphenolgruppen, deren Synthesewege von der jeweiligen Mutation direkt betroffen waren, wirklich nicht gebildet werden (Abbildungen 3.17 und 3.18). Auch zeigen die Daten, dass das Fehlen einer solchen Substanz nicht durch die verstärkte Bildung einer zweiten Substanz kompensiert wird. Bei näherer Betrachtung der Resultate fällt jedoch auf, dass in den *fah1*- und *tt4*-Mutanten nicht ausschließlich jene Substanzen fehlen oder in geringeren Mengen enthalten sind, deren Synthesewege von der Gendeletion direkt betroffen sind. Auch die Gehalte anderer Polyphenole, deren Synthesewege von den Gendeletionen unbeeinflusst bleiben sollten, können in diesen Mutanten von den entsprechenden Mengen in Wildtypen abweichen.

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.

(2009) beschrieben ebenfalls dieses Phänomen. Die mögliche Ursache hierfür ist, dass Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide jeweils verschiedene Endprodukte des gleichen Phenylpropanoid-Synthese-Wegs sind. Die unterschiedlichen Enzyme dieses Synthesewegs sind im Endoplasmatischen Reticulum (ER) innerhalb eines Multienzymkomplexes organisiert (STAFFORD 1974, HRAZDINA & WAGNER 1985, SASLOWSKY & WINKEL-SHIRLEY 2001). Einige dieser Enzyme besitzen neben der katalytischen Funktion zusätzlich die Aufgabe, über membranständige Domänen den Enzymkomplex am ER anzubinden und verleihen dem Enzymkomplex auf diese Weise eine funktionelle Struktur (WINKEL 2004). Die Ferulat-5-Hydroxylase (F5H), ein P450-Protein, besitzt eine solche membranständige Domäne (MEYER et al. 1996). Dieses Protein katalysiert den vorletzten Schritt der Sinapinsäuresynthese und ist in der *fah1*-Mutante genetisch ausgeschaltet (CHAPPLE et al. 1992). Es ist möglich, dass bei Nicht-Expression dieses, die Struktur des Enzymkomplexes stabilisierenden Proteins der Ablauf der gesamten Phenylpropanoid-synthese gestört wird und neben der Sinapinsäuresynthese auch andere Syntheseschritte im Enzymkomplex beeinträchtigt werden. Letztlich könnte dies die Ursache dafür sein, weshalb in der *fah1*-Mutante deutlich weniger Flavonole als im Wildtyp synthetisiert werden (Abbildung 3.18).

Dass genetische Defekte in Polyphenol-Mangel-Mutanten mit pleiotropen Effekten verbunden sein können, wurde auch in anderen Untersuchungen beschrieben. So beobachteten PELLETIER et al. (1999) in *tt4*-Mutanten, dass bei Nicht-Expression der Chalconsynthase (CHS) auch geringere Proteinmengen der Chalconisomerase (CHI) gebildet werden. LI et al. (1993) wiederum konnten in der *tt5*-Mutante neben dem Fehlen von Flavonoiden auch deutlich geringere Mengen an Sinapinsäurederivaten feststellen. Ein sehr viel stärkerer und bisher noch nicht beschriebener pleiotroper Effekt wurde jedoch in der hier vorliegenden Arbeit bei *tt4*-Mutanten beobachtet. In diesen Pflanzen waren bei 21 °C gänzlich keine (Abbildung 3.17) und bei 9 °C (Abbildung 3.18) nur sehr geringe Mengen an Hydroxyzimtsäuren zu detektieren. Für eine zukünftige Arbeit ergäbe sich somit die Möglichkeit, eine beinahe vollständig Polyphenol-freie Mutante auf ihre UV-Resistenzeigenschaften untersuchen zu können.

Eine Konsequenz aus der quantitativen Polyphenolbestimmung ist, dass von den Wildtypen abweichende Besonderheiten der Polyphenol-Mangel-Mutanten nicht ausschließlich auf die Nicht-Synthese von spezifischen polyphenolischen Stoffgruppen zurückzuführen sind. Eine Ursache hierfür ist, dass auch die Gehalte der Polyphenole, deren Synthesewege von der jeweiligen Gen-Mutation nicht betroffen sein sollten, in diesen Mutanten durch pleiotrope Effekte vermindert sein können. Da die, den Mutanten jeweils zugrundeliegenden Wildtypen zudem graduell unterschiedliche UV-B-Resistenzen aufweisen (Abbildung 3.12 und BOOIJ-JAMES et al., 2000), muss die Interpretation der Ergebnisse zu den Mutanten sehr vorsichtig erfolgen.

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

Bisher wurde gezeigt, dass *A. thaliana* sich an UV-B-Stress akklimatisiert, indem die epidermale UV-B-Abschirmung der jeweiligen UV-B-Bestrahlungsstärke und Temperatur angepasst wird. In der Folge wird das in den Blättern wirksam werdende UV-B_{ef} auf eine tolerierbare Bestrahlungsstärke gesenkt. Doch wie bereits einleitend beschrieben, wird darüber diskutiert, welche Stoffgruppe der Polyphenole hauptsächlich für diese Art der UV-B-Akklimatisation von Blättern verantwortlich ist (CALDWELL et al. 1983, LANDRY et al. 1995, SHEAHAN 1996, BURCHARD et al. 2000, KOLB et al. 2001, BIDEL et al. 2007). In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, dass UV-B und Kühle in Blättern jeweils eine verstärkte Synthese von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen bewirken. Die Synthese der Flavonole wird durch diese Umweltfaktoren jedoch besonders stark induziert. Dennoch ist hiermit die Bedeutung dieser Stoffgruppen für die epidermale UV-B-Abschirmung noch nicht geklärt.

Wenn eine spezifische Substanz für die UV-B- und kühleinduzierte UV-Abschirmung verantwortlich ist, dann müsste ihr Gehalt in UV-B-akklimatisierten Blättern mit dem jeweiligen Grad der epidermalen Abschirmung korrelieren. Um den spezifischen Beitrag von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen zur UV-Abschirmung erkennen zu können, wurden deshalb zunächst die epidermalen UV-Absorptionen von Blättern mit ihren jeweils zugehörigen Gehalten an diesen Polyphenolen in Beziehung gesetzt. Für die Korrelationsanalyse wurden Blätter des *COL*-Wildtyps verwendet, von denen angenommen wurde, dass sie, da sie keine UV-B-bedingten Schädigungen aufwiesen (Abbildung 3.12), vollständig an UV-B-Stress akklimatisiert waren. Das in Abbildung 3.19 dargestellte Ergebnis dieser Analyse zeigt, dass epidermale UV-A- und UV-B-Absorption in linearer Abhängigkeit zur Gesamtmenge der aus Blättern extrahierbaren Polyphenole stehen. Auch BURCHARD et al. (2000) stellen einen derartigen linearen Zusammenhang zwischen Polyphenolmenge im Blatt und epidermaler UV-Abschirmung her. Im Gegensatz zur UV-A-Absorption ist die epidermale UV-B-Absorption jedoch ab einer UV-B-Gesamtabsorption von $90 \text{ AU}_{314\text{nm}} \text{ cm}^{-2}$ in den Extrakten in nur noch immer geringer werdendem Maße durch weitere Polyphenole zu steigern. Die bis dahin durch eine linear verlaufende Regressionskurve beschriebenen Messdaten beginnen nun, um eine Sättigungskurve zu streuen.

Es gibt mehrere mögliche Ursachen für den Übergang der linearen Beziehung von Polyphenolgehalt und Absorption in eine Sättigungskurve. KOLB & PFÜNDEL (2005) begründen dies damit, dass die als UV-Abschirmsubstanzen fungierenden Polyphenole vor allem in den Vakuolen von Epidermiszellen akkumulieren, diese Vakuolen jedoch nur etwa 90 %

der Gesamtoberfläche eines Blattes abdecken. Die Räume zwischen den Vakuolen bleiben frei von UV-Abschirmsubstanzen und folglich UV-durchlässig (VOGELMANN 1986, DAY 1993). Aufgrund dieses sogenannten „Sieb effekts“ würde sich die epidermale UV-Absorption eines Blattes bei steigendem Polyphenolgehalt einem maximalen Grenzwert annähern, welcher von der Fläche der UV-transparenten Räume zwischen den epidermalen Zellvakuolen bestimmt werden würde. Ein weiterer Grund für den Übergang des linear verlaufenden Zusammenhangs in eine Sättigungskurve ist die veränderte Lokalisation von bei hohen UV-B-Bestrahlungsstärken synthetisierten Polyphenolen. Während bei geringer UV-B-Bestrahlung fast ausschließlich in der Epidermis UV-abschirmungsrelevante Polyphenole gebildet werden, nimmt mit steigender Bestrahlungsstärke der Anteil von im Mesophyll synthetisierten Polyphenolen zu (AGATI et al. 2009). Der UV-abschirmende Effekt dieser Substanzen ist jedoch aufgrund ihrer tiefer im Blatt liegenden Lokalisation geringer als der von epidermalen Polyphenolen (BURCHARD et al. 2000, BILGER et al. 2001). Für eine entsprechende Steigerung der UV-B-Abschirmung bedarf es daher größerer Polyphenolmengen, wenn diese im Mesophyll und nicht in der Epidermis akkumulieren. Eine ebenfalls nicht zu vernachlässigende Ursache für die Sättigungskurve ist der sogenannte „Packungseffekt“ (MOREL & BRICAUD 1981). Bei zu hoher Konzentration („Packung“) beginnen Pigmente sich in einer Lösung gegenseitig zu beschatten. Dadurch verkleinert sich die jedem Chromophor zur Absorption zur Verfügung stehende Fläche und der *in vivo* Absorptionskoeffizient einer Substanz wird kleiner.

Trotz des Umschlagens des linearen in einen durch eine Sättigungskurve beschreibbaren Zusammenhang von Polyphenolgehalt und epidermaler Absorption sind diesen Grafiken (Abbildung 3.19) verschiedene Informationen zu entnehmen. So geht aus den jeweils nah am Ursprung liegenden Y-Achsenabschnitten der Regressionen hervor, dass mit der Extraktion der Hydroxyzimtsäuren, Kämpferol- und Quercetinderivate alle relevanten UV-Abschirmsubstanzen erfasst wurden. Des Weiteren wird aus den hohen Bestimmtheitsmaßen der Regressionen deutlich, dass Hydroxyzimtsäuren und Flavonole gemeinsam für die UV-A- und UV-B-Abschirmung verantwortlich sein müssen. Für die linearen Bereiche der Regressionskurven muss zudem gelten, da hier die Polyphenole der Blätter in direkter Beziehung zu der epidermalen UV-A- und UV-B-Abschirmung stehen, dass bei Extraktion der Polyphenole die resultierenden Extrakte das UV-A- und UV-B-Absorptionsvermögen der Epidermen realistisch wiedergeben. Belegt wird dies durch die in Abbildung 3.20 aufgeführten epidermalen Absorptionsspektren von Blattoberseiten. Die Blätter, auf die sich diese Spektren beziehen, stammen von *COL*- und *LER*-Wildtypen sowie von den untersuchten Polyphenol-Mangel-Mutanten (*fah1*-, *tt4*-, *tt5*-, *tt7*-Mutante). Die Polyphenolgehalte dieser Blätter entsprachen alle einer Gesamtabsorption von weniger als $75 \text{ AU}_{314\text{nm}} \text{ cm}^{-2}$ in den Extrakten, so dass von einem linearen Zusammenhang

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.

Die hohe qualitative und quantitative Übereinstimmung der Spektren *in vivo* und in den Extrakten ist angesichts der Unterschiede, die zwischen den optischen Eigenschaften einer Blattepidermis und einem klaren Extrakt bestehen, erstaunlich. So wurden die Extinktionsspektren für verdünnte und klare Methanollösungen berechnet, für die die Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ($A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$) zulässig ist. Eine gegenseitige Beschattung von Chromophoren oder störende Lichtstreuungen aufgrund von Eintrübungen durch ungelöste Bestandteile im Medium existieren hier nicht. Blätter hingegen sind komplexere optische Systeme. Wie erwähnt, sind UV-absorbierende Polyphenole hier weder homogen verteilt, noch liegen sie in stark verdünnter Lösung vor. Die bereits beschriebene Kombination aus „Sieb-“ und „Packungseffekt“ (DUYSENS 1956, DAY 1993, KOLB & PFÜNDEL 2005) sowie die für biologisches Material charakteristische, durch ungelöste Zellbestandteile verursachte Lichtstreuung (SHIBATA 1958, BUTLER 1962, 1964) bewirken, dass das Lambert-Beersche Gesetz in Blättern keine Gültigkeit hat.

Doch trotz der andersartigen optischen Eigenschaften, die Blätter im Vergleich zu verdünnten Lösungen besitzen, weisen die in Abbildung 3.20 paarweise zusammengestellten Spektren hohe Ähnlichkeiten miteinander auf. Der Vergleich der unterschiedlich erstellten Spektren bestätigt somit die Annahme, dass innerhalb der linearen Bereiche der in Abbildung 3.19 gezeigten Regressionskurven die spektralen Lichtabschwächungen in Blattepidermen und die Absorptionsspektren von zugehörigen phenolhaltigen Blattextrakten einander entsprechen. Die verschiedenen Polyphenole sollten daher in den Extrakten in gleichen Proportionen wie in den Blattepidermen an der UV-Gesamtabsorption beteiligt sein. Werden die Mengen, in denen Hydroxyzimtsäuren und Flavonole jeweils in Blattextrakten enthalten sind, mittels HPLC-Technik bestimmt, so kann für diese Substanzen aus ihren jeweiligen Absorptionsspektren deren spezifischer Beitrag zur UV-A- und UV-B-Absorption im Extrakt und damit in der Blattepidermis bestimmt werden. Die in Abbildung 3.21 aufgetragenen relativen Beiträge der verschiedenen Polyphenole zur UV-Absorption von Extrakten beschreiben daher, solange die Polyphenolgehalte der Blätter innerhalb der linearen Bereiche der in Abbildung 3.19 gezeigten Regressionen liegen, auch die prozentualen Anteile, die diese Substanzen jeweils an der UV-Gesamtabsorption von Blattepidermen besitzen.

In Übereinstimmung mit LANDRY et al. (1995) und SHEAHAN (1996) ist diesen relativen Absorptionsanteilen zu entnehmen, dass bei 21 °C der Hauptteil der epidermalen UV-Abschirmung durch Hydroxyzimtsäuren verursacht wird. Nur etwa 30 % der UV-A- und 15 % der UV-B-Abschirmung sind bei 21 °C im *COL*-Ökotyp auf Kämpferol-derivate zurückzuführen. Quercetinderivate sind bei dieser Temperatur ohne Bedeutung. Bei 9 °C jedoch, wenn die Synthese der Flavonole zunehmend induziert wird, gewinnen Flavonole für die epidermale UV-Abschirmung an Bedeutung. Mehr als 70 % der UV-A-Abschirmung werden bei dieser Temperatur durch Flavonole hervorgerufen. Für Blätter, die sich bei 9 °C entwickelt hatten, ließ sich der relative Anteil der Flavonole an der epidermalen UV-B-Abschirmung leider nicht exakt ermitteln, da ab einer UV-B-Bestrahlungsstärke von $4,5 \text{ mW m}^{-2}$ die Polyphenolgehalte der Blätter mehr als einer UV-B-Gesamtabsorption von 90 AU cm^{-2} in den Extrakten entsprachen. Damit lagen diese Gehalte außerhalb der linearen Beziehung von UV-B-Absorption im Extrakt und epidermaler UV-B-Absorption. Der höchste Punkt auf der linearen Beziehung zwischen UV-B-Absorption und Pigmentgehalt entspricht allerdings einem Anteil der Flavonole an der UV-B-Gesamtabsorption von etwa 40 % (Abbildung 3.21). Bei voll induzierter Flavonolsynthese in den Blättern ist daher für Flavonole mit einem Mindestbeitrag von 40 % an der epidermalen UV-B-Abschirmung auszugehen.

Doch wie bereits in Kapitel 4.3.1 angemerkt, wird der Einfluss von Flavonolen auf die epidermale UV-B-Abschirmung in dieser Untersuchung möglicherweise unterschätzt dargestellt. Dass dies sehr wahrscheinlich ist, geht aus Abbildung 4.5 hervor. In dieser Abbildung sind, ähnlich wie in der zuvor diskutierten Abbildung 3.21, die jeweiligen Anteile von Flavonolen (hellgraue Flächen) und Hydroxyzimtsäuren (dunkelgraue Flächen) an der UV-B-Gesamtabsorption in den Extrakten dargestellt. Im Gegensatz zu der vorherigen Darstellung, sind in dieser Abbildung jedoch zusätzlich entsprechende Freiland-Daten aus TISCHLER (2010) eingefügt (Symbole mit roter Markierung). Da das den Freiland-Pflanzen während der Kultivierung zur Verfügung gestandene Sonnenlicht aufgrund seiner spektralen Zusammensetzung nicht mit solchen Strahlungsquellen zu vergleichen ist, wie sie in Klimakammern verwendet werden, wurden die UV-B-Absorptionswerte der Extrakte auf die UV-B-Absorptionen der zugehörigen Blattepidermen bezogen.

Wie andere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so beschreibt auch Abbildung 4.5, dass Extrakte aus Blättern mit hoher epidermaler UV-B-Absorption, hohe Gesamtgehalte an Polyphenolen enthalten. So enthielten Extrakte von Blättern, die in der Klimakammer kultiviert wurden und maximale epidermale UV-B-Absorptionen von etwa 1,5 aufwiesen, eine Gesamtmenge an Polyphenolen, die etwa einer UV-B-Absorption von 200 AU cm^{-2} in den Extrakten entsprach. Mindestens 50 % der UV-B-Absorptionen in den Extrakten waren dabei auf Hydroxyzimtsäuren zurückzuführen. Blätter, die hingegen im Freiland wuchsen, erreichten epidermale UV-B-Absorptionswerte von bis zu 2,7. Gegenüber

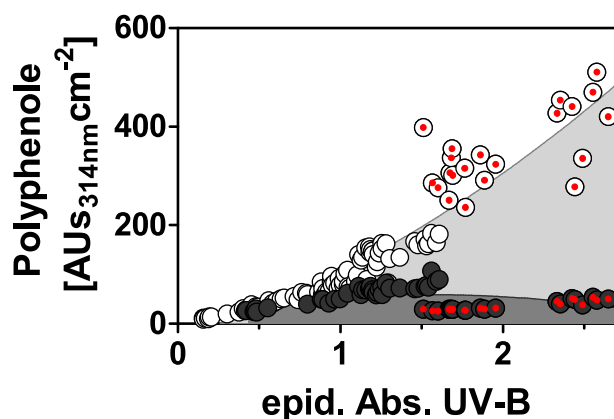


Abbildung 4.5.: Die relativen Anteile von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen an der UV-B-Gesamtabsorption in Extrakten in Beziehung zur Summe der UV-B-Absorptionen der oberen und unteren Blattepidermis. Die Extrakte stammen von Blättern des *COL*-Ökotyps mit jeweils unterschiedlicher epidermaler UV-B-Absorption. Die y-Achse gibt die UV-B-Absorptionseinheiten an, die in den Blattextrakten durch Hydroxyzimtsäuren (dunkle Symbole) oder durch Hydroxyzimtsäuren und Flavonole (helle Symbole) verursacht werden. Aus dem Freiland stammende Daten sind zusätzlich durch einen roten Punkt gekennzeichnet. Die entsprechenden Regressionsfunktionen (durchgezogene Kurven) sind eingetragen. Die verschieden schattierten Flächen zwischen den durchgezogenen Kurven beschreiben für beide Stoffgruppen (hellgrau für Flavonole, dunkelgrau für Hydroxyzimtsäuren) deren relative Anteile an den UV-B-Gesamtabsorptionen der Extrakte.

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 SHEAHAN (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

relativ geringen Flavonolgehalt in diesen Pflanzen schließen. Daten von HOFFMANN-WÜLFING (2007) ist zu entnehmen (Abbildung 4.6, rot-gestrichelte Linie 3), dass unter solchen Licht- und Temperaturbedingungen im *COL*-Ökotyp von *A. thaliana* nur etwa $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Kämpferol gebildet werden. Für die von SHEAHAN (1996) untersuchten Blätter ist ein maximaler Kämpferolgehalt von $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ anzunehmen.

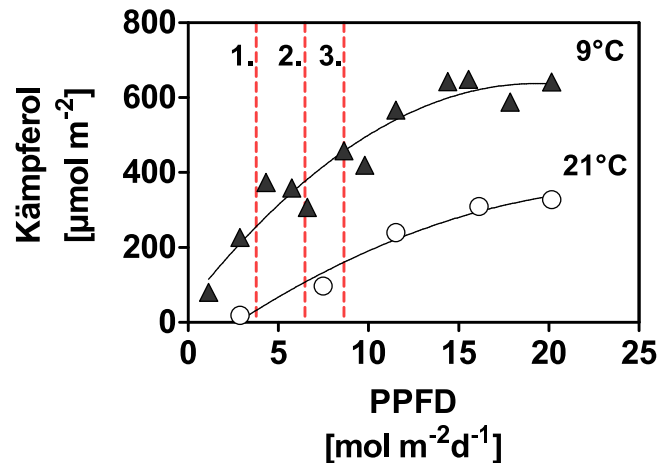


Abbildung 4.6.: Lichtabhängigkeit der Kämpferolsynthese in *A. thaliana* bei 9 °C und 21 °C. Die Kämpferolsynthese in *A. thaliana* ist abhängig von der für die Photosynthese täglich zur Verfügung stehenden Photonenmenge. Diese Größe berechnet sich aus dem Produkt der täglichen Bestrahlungsdauer und der PPFD. Die abgebildeten Resultate basieren auf Daten aus HOFFMANN-WÜLFING (2007). Die rot-gestrichelte Linie 1 beschreibt die Tagessumme an Photonen, welche den Pflanzen im hier diskutierten Experiment zur Verfügung stand. Die in den Arbeiten von SHEAHAN (1996) und LANDRY et al. (1995) verwendeten Tagessummen sind durch Linie 2 und Linie 3 dargestellt. $R^2 = 0,9710$ bei 21 °C und $R^2 = 0,9262$ bei 9 °C.

Nach Abbildung 3.21 (Kultivierung bei 9 °C und 0 W m^{-2} UV-B) entfallen in *Arabidopsis*-Blättern mit diesem geringen Kämpferolgehalt nur 30 % der UV-B-Abschirmung auf Flavonole, der Rest hingegen auf Hydroxyzimtsäuren. Aufgrund der unter diesen Wuchsbedingungen vergleichsweise geringen Bedeutung von Flavonolen für die UV-B-Abschirmung konnten die von LANDRY et al. (1995) und SHEAHAN (1996) untersuchten *tt5*-Mutanten vermutlich nicht UV-B-empfindlicher als *fah1*-Mutanten sein. Die Autoren mussten Hydroxyzimtsäuren somit als die bedeutenderen UV-B-Abschirmsubstanzen betrachten. Ergebnisse aus der Diplomarbeit von TISCHLER (2010) zeigen jedoch, dass die Folgerungen dieser Autoren nur für die in ihren Versuchen angewandten Bedingungen gelten. Die Untersuchung von TISCHLER (2010) ergab, dass im Freiland kultivierte *fah1*-Mutanten, die keine Hydroxyzimtsäuren enthielten, erheblich geringere sichtbare Strahlungsschäden als vergleichbar kultivierte *tt5*-Mutanten aufwiesen. Während *fah1*-Mutanten den Wildtypen vergleichbare PS II-Quantenausbeuten und Zuwachsraten

in ihrer Biomasse zeigten, wurden *tt5*-Mutanten im Freiland durch den erhöhten Strahlungsstress nachhaltig geschädigt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen als Abschirmsubstanzen von kurzwelliger UV-Strahlung fungieren. Da sie in *A. thaliana* zudem konstitutiv synthetisiert werden und ihre Synthese nach den vorgestellten Daten nur relativ wenig von äußeren Umweltbedingungen beeinflusst wird, scheinen sie, wie auch von BIDEL et al. (2007) vorgeschlagen, in der Epidermis von Blättern für einen basalen Abschirmschutz gegen UV-B-Strahlung verantwortlich zu sein. Wenn sich hingegen aufgrund zunehmender Strahlungsbelastung oder sinkender Kultivierungstemperatur die Wachstumsbedingungen für Pflanzen verschlechtern, wird die Synthese zusätzlicher UV-Abschirmpigmente induziert. In erster Linie handelt es sich hierbei um Flavonole. In Pflanzen wird durch sie eine erhebliche Steigerung der epidermalen UV-Abschirmung bewirkt. Die Abschirmung durch Flavonole reicht im Gegensatz zu der von Hydroxyzimtsäuren vom UV-B bis in den Bereich der langwelligen UV-A- und sichtbaren Strahlung hinein und bietet einen wesentlich umfangreicheren Schutz vor energiereicher Strahlung als die einzig auf Hydroxyzimtsäuren beruhende UV-Abschirmung.

4.3.3. Die Funktion der Flavonole in *A. thaliana*

Die Ergebnisse der hier diskutierten Untersuchung unterstreichen, dass bei den in *A. thaliana* wirksamen UV-B-Abschirmsubstanzen zwischen konstitutiv gebildeten und induzierbaren Substanzen differenziert werden muss. Auch für andere Pflanzenarten wurde diese Unterscheidung bereits vorgenommen (TATTINI et al. 2000, BIDEL et al. 2007). Die Zusammensetzung der konstitutiven Abschirmsubstanzen ist nach BATE-SMITH (1962) artspezifisch einzuschätzen. Vor allem Hydroxyzimtsäuren wie Cumar-, Kaffee- oder Sinapinsäure, aber auch Hydroxybenzoesäuren wie etwa Vanillin fungieren als solche Abschirmsubstanzen und bewirken einen von äußeren Faktoren relativ unabhängigen konstitutiven UV-Schutz. Im Gegensatz hierzu werden Flavonoide den durch Strahlungsstress und Kühle induzierbaren UV-Abschirmsubstanzen zugeordnet (LEYVA et al. 1995, REUBER et al. 1996b, BORNMAN et al. 1997). BIDEL et al. (2007) konnten in den Pflanzenarten *Morus nigra*, *Prunus mahaleb* und *Lagerstroemia indica* jeweils Quercetin- und in erheblich geringerem Maß Kämpferolglykoside als solche Flavonoide identifizieren. Die Resultate von HOFFMANN-WÜLFING (2007) und OLSEN et al. (2009) sowie die Daten der hier vorliegenden Arbeit belegen zudem, dass Flavonole auch in *A. thaliana* den induzierbaren UV-Schutz bewirken.

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-

cher Weise an dieser Schutzeinrichtung beteiligt sind. Zweifel an einer gleichwertigen Beteiligung von Quercetin- und Kämpferolglykosiden an der UV-B-Abschirmung wären aufgrund der vorgestellten Ergebnisse berechtigt. So waren in Extrakten aus Blättern, die in Klimakammern gewachsen waren, höchstens 7 % der UV-B-Gesamtabsorption auf Quercetin zurückzuführen (Abbildung 3.21). Des Weiteren waren nicht zur Quercetin-Synthese befähigte *tt7*-Mutanten nach Kultivierung unter UV-B-Stressbedingungen anhand der Ergebnisse kaum vom *LER*-Wildtyp zu unterscheiden. Sowohl die epidermale UV-B-Abschirmung dieser Pflanzen (Abbildung 3.13) als auch die festgestellten PS II-Schädigungen (Abbildung 3.12) stimmten im Gegensatz zu Daten von anderen Polyphenol-Mangel-Mutanten mit den entsprechenden Werten von Wildtypen überein. Anhand dieser Daten ist anzunehmen, dass Quercetin keine entscheidende Rolle bei der UV-B-Abschirmung zukommt.

Hingegen zeigen die für den *COL*-Wildtyp in Tabelle 4.2 aufgeführten Polyphenolgehalte, dass bei Freiland-Kultivierung wesentlich mehr Quercetin ($2429 \mu\text{mol m}^{-2}$) als Kämpferol ($2051 \mu\text{mol m}^{-2}$) in Blättern akkumuliert. Auch Untersuchungen an anderen Pflanzenarten belegen, dass im Freiland oder unter Freiland-ähnlichen Strahlungsbedingungen in Blättern die Quercetin- die Kämpferolgehalte deutlich übersteigen (RYAN et al. 1998, OLSSON et al. 1998, KOLB et al. 2001, BIDEL et al. 2007). Aufgrund dieser erheblichen Steigerung des Quercetinsgehalts könnte angenommen werden, dass Quercetinglykoside besondere, von Kämpferolglykosiden abweichende Funktionen oder Wirksamkeiten besitzen, die unter Freiland-Bedingungen für das Überleben der Pflanze entscheidend sein könnten. Doch wieder zeigen von TISCHLER (2010) durchgeführte Freiland-Untersuchungen, dass nicht zur Quercetin-Synthese befähigte *tt7*-Mutanten wie entsprechende Wildtypen in der Lage sind, UV-B in ihren Epidermen abzuschirmen. Diese Mutanten wiesen im Freiland keine sichtbaren Schädigungen auf und schienen den Mangel an Quercetin durch eine verstärkte Bildung von Kämpferol zu kompensieren. Eine spezifische Funktion von Quercetin konnte daher auch in dieser Untersuchung nicht ermittelt werden.

Untersuchungen an Blättern von *Brassica napus* belegen vor allem eine epidermale Lokalisation von Quercetinglykosiden (CEN 1993, BORNMAN et al. 1997). Für *Ligustrum vulgare* wurde aber gezeigt, dass auch Zellen des Palisadenparenchyms und des Mesophylls Quercetin enthalten können (TATTINI et al. 2004, AGATI et al. 2009). Außerdem wird vermutet, dass Flavonoide in der Lage sind, in Chloroplasten Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) zu entgiften (AGATI et al. 2007, HERNANDEZ et al. 2009). Da das antioxidative Potenzial von Quercetin deutlich höher einzuschätzen ist als das von Kämpferol (SALAH et al. 1995, RICE-EVANS et al. 1997, BROWN et al. 1998), könnte Quercetin als antioxidativ wirksame Substanz in den Chloroplasten fungieren. In diesem Fall wäre jedoch zu erwar-

ten, dass PS II-Zentren von *tt7*-Mutanten deutlich UV-B-empfindlicher wären als solche in Wildtypen. Da dies aber weder bei den Untersuchungen der hier vorgestellten Arbeit noch bei den Untersuchungen von TISCHLER (2010) zu beobachten war, bleibt auch eine mögliche antioxidative Schutzfunktion von Quercetin in Pflanzen weiterhin fraglich.

Während in der hier vorliegenden Arbeit die kühleabhängige Synthese von Flavonoiden mit einem bei Kühle erhöhten Bedarf an UV-B-Abschirmung begründet wird, schlagen KORN et al. (2008) vor, dass bei Kühle synthetisierte Flavonoide der Kälte- bzw. Frost-Akklimatisation dienen. Die Autoren zeigen, wie die Frosthärte von *A. thaliana* mit dem Blattgehalt an Flavonolen korreliert. An die Membranen angelagert sollen diese Substanzen bei frostbedingter Zellentwässerung zu ihrer Stabilisation beitragen. Auch wird beschrieben, dass im Xylem des Sprosses von *Cercidiphyllum japonicum* durch Flavonoide eine Unterkühlung bis deutlich unter 0 °C ermöglicht wird (KASUGA et al. 2008). Die von TISCHLER (2010) erhobenen Freiland-Daten können jedoch keinen kühleabhängigen Anstieg der Flavonolkonzentration in Blättern belegen. So enthielten die Pflanzen im März (mittlere Minimal-/Maximaltemperatur im März: 2,7 °C / 12,3 °C) etwa 30 % weniger Flavonole als vergleichbare Pflanzen im wesentlich milderen Mai (mittlere Minimal-/Maximaltemperatur im Mai: 6,0 °C / 20,7 °C). Bemerkenswert jedoch ist, dass diese *Arabidopsis*-Pflanzen im März trotz der geringeren Kämpferolgehalte, erheblich mehr Quercetin akkumulierten als im Mai. Auch Daten von HOFFMANN-WÜLFING (2007) belegen, dass in Blättern von *A. thaliana* Quercetin vor allem bei Kühle akkumuliert wird. Besitzen also Flavonole und insbesondere Quercetin eine spezielle Funktion bei der Kühle- oder Frostakklimatisation? Nach Untersuchungen von LEYVA et al. (1995) an *A. thaliana* ist die Wahrscheinlichkeit hierfür als gering einzuschätzen. Ein von ihnen durchgeführter Vergleich von *COL*-Wildtypen mit *tt4*-Mutanten ergab hinsichtlich der jeweiligen Frostresistenz keinerlei Unterschiede. Jedoch muss auch zu dieser Untersuchung angemerkt werden, dass das untersuchte Pflanzenmaterial der Wildtypen aufgrund der Kultivierungsbedingungen (Klimakammer, Temperatur: 20 °C, PAR: 8,6 mol m⁻² d⁻¹) nur geringe Mengen an Flavonolen hat enthalten können (vgl. Abbildung 4.6). Gravierende Unterschiede in der Kälte- und Frosttoleranz, die auf verschiedene Flavonolgehalte zwischen Wildtypen und Mutanten beruhen könnten, wären somit kaum zu erwarten gewesen.

Neben der Möglichkeit, dass Flavonole in Pflanzen antioxidativ und als Frostschutzmittel wirken können, werden diese Polyphenole auch mit Auxin-assoziierten Signalwegkomponenten in Verbindung gebracht (FERTE et al. 1999, GEISLER et al. 2005, PEER & MURPHY 2006). Als wirklich gesichert kann jedoch nur ihre Funktion als pflanzliche UV-B-Abschirmsubstanzen betrachtet werden. Doch als wie bedeutend für Pflanzen ist der bei Kühle durch Flavonole bewirkte, epidermale UV-A-Schutz einzuschätzen? Verschiedenen UV-Aktionsspektren (SETLOW 1974, THIMIJJAN et al. 1978, QUAITE et al. 1992)

ist zu entnehmen, dass die schädigende biologische Wirksamkeit von UV-A-Strahlung im Vergleich zu der von UV-B-Strahlung zu vernachlässigen ist. Weshalb findet aber dann bei Kühle in Pflanzen eine Steigerung der epidermalen UV-A-Abschirmung statt? Wurde der schädigende Einfluss von UV-A-Strahlung bisher unterschätzt? Neuere Untersuchungen weisen UV-A eine erheblich schädigendere Wirkung als sichtbarer Strahlung zu (SARVIKAS et al. 2006, TAKAHASHI et al. 2010). Betrachtet man etwa die spektrale Empfindlichkeit des Wasserspaltapparats von PS II gegenüber elektromagnetischer Strahlung (HAKALA et al. 2005, TYYSTJÄRVI 2008), so ist UV-B etwa 15mal, UV-A jedoch immerhin noch etwa 10mal schädigender als sichtbare Strahlung. Bei Berücksichtigung, dass im Sonnenlicht der Anteil der UV-A- den der UV-B-Strahlung bei weitem übersteigt, wird klar, dass unter natürlichen Lichtbedingungen auch UV-A-Strahlung einen höchst schädigenden Effekt auf Pflanzen haben muss. FLINT & CALDWELL (2003) haben ein UV-Aktionsspektrum für Pflanzen erstellt, welches bis in den langwelligen Bereich von UV-A-Strahlung hineinreicht. Zum Vergleich dieses Spektrums mit einem herkömmlichen Aktionsspektrum (THIMIJJAN et al. 1978) ist ein im April 2009 aufgezeichnetes Sonnenspektrum mit beiden jeweils verrechnet worden und in Abbildung 4.7 dargestellt.

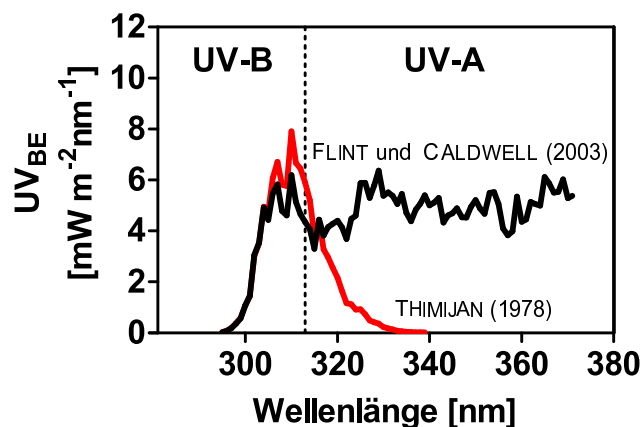


Abbildung 4.7.: Biologisch gewichtetes Sonnenspektrum, aufgezeichnet im April 2009. Das mit roter Linie eingezeichnete Spektrum beschreibt ein nach THIMIJJAN et al. (1978) biologisch gewichtetes Sonnenspektrum. Das Spektrum mit schwarzer Linie wurde nach FLINT & CALDWELL (2003) erstellt.

Die Gegenüberstellung ergibt, dass das von FLINT & CALDWELL (2003) um den UV-A-Bereich erweiterte Aktionsspektrum für UV-A-Strahlung des Sonnenlichts eine ähnlich hohe biologische Schädigung erwarten lässt wie für UV-B-Strahlung. Eine aktuelle Studie zu Sonnenlicht-induzierter Photoinhibition beschreibt sogar, dass hauptsächlich UV-A und nicht UV-B für die Schädigung von PS II verantwortlich ist (HAKALA-YATKIN et al.

2010). Aus diesem Grund muss die auf Flavonolen basierende, hohe epidermale UV-A-Abschirmung eine große Bedeutung für das Überleben von Pflanzen im Sonnenlicht haben. Da sowohl UV-B-Strahlung als auch sichtbares Licht bei Kühle schädigender auf Pflanzen wirkt (Abschnitt 3.1), muss auch für UV-A-Strahlung von diesem Sachverhalt ausgegangen werden. Die Steigerung der UV-A-Abschirmung durch zusätzlich akkumulierte Flavonole scheint bei Kühle für Pflanzen somit ebenso bedeutend zu sein wie die Verstärkung des UV-B-Schutzschilds.

5. Zusammenfassung

UV-B ist eine energiereiche elektromagnetische Strahlung. Sie ist Teil des natürlichen Sonnenlichts und kann in Lebewesen große Schäden verursachen. Höhere Pflanzen sind zum Leben auf das Sonnenlicht angewiesen und daher regelmäßig auch hohen UV-B-Bestrahlungsstärken ausgesetzt. Zum Schutz vor schädigender UV-B-Strahlung lagern Pflanzen in den Vakuolen ihrer Epidermiszellen UV-B-absorbierende Substanzen ein. Neben den Umweltfaktoren Licht und UV-B induziert auch Kühle eine Verstärkung dieser epidermalen UV-B-Abschirmung. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Kühleabhängig gebildeten UV-B-Abschirmung zu klären und die im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* hierfür verantwortlichen UV-absorbierenden Substanzen zu charakterisieren. Verschiedene Chlorophyll-fluorometrische Methoden und HPLC-Analysetechniken fanden bei dieser Untersuchung ihre Anwendung.

Die Resultate der durchgeführten Experimente zeigen, dass ungeachtet der jeweiligen Kultivierungstemperatur die Reparatur von UV-B-geschädigten PS II-Zentren in Pflanzen bei 9 °C generell langsamer als bei 21 °C erfolgt. Die apparente Empfindlichkeit von PS II-Zentren gegenüber UV-B nimmt deshalb mit sinkender Temperatur zu, der UV-B-Stress in Pflanzen wird größer. Die bei Kühle verstärkte Synthese von UV-B-absorbierenden Substanzen und die damit einhergehende Verstärkung der UV-B-Abschirmung in der Epidermis muss daher als eine Kompensationsreaktion für die Verlangsamung der Reparatur von UV-B-geschädigten PS II-Zentren bei niedriger Temperatur betrachtet werden.

Die Bestimmung der für die UV-B-Abschirmung relevanten Substanzen ergab, dass ausschließlich Hydroxycimtsäuren und Flavonole in *Arabidopsis thaliana* zum epidermalen UV-B-Schutz beitragen. Während Hydroxycimtsäuren 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.

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 Hydroxyzimtsäuren und Flavonoiden. . .	12
1.6. Einleitung: Molare Extinktionskoeffizienten (ϵ_{λ}) für ausgesuchte Hydroxyzimtsäuren und Flavonole.	14
1.7. Einleitung: <i>In vivo</i> Chlorophyllfluoreszenz.	15
1.8. Einleitung: UV-Strahlungsintensitäten innerhalb und außerhalb eines Blattes.	17
1.9. Einleitung: Verschiedene Akzessions- bzw. Ökotypen von <i>A. thaliana</i> . . .	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 $F(\text{UV})/F(\text{BG})$ vom Chlorophyll <i>a</i> -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

3.5. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige PS II-Schädigung durch UV-B bei <i>Columbia</i>	48
3.6. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige Anpassung der UV-B-Abschirmung bei <i>Columbia</i>	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 _{ef} bei verschiedenen Akzessionen I.	53
3.11. Ergebnisse 2: Temperaturabhängige Anpassung des UV-B _{ef} 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 _{ef} durch epidermale UV-Abschirmung.	58
3.14. Ergebnisse 3: Spektrale UV-Transmission in Blättern nach Kultivierung bei 21 °C.	61
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 <i>A. thaliana</i> nach Kultivierung bei 21 °C im UV-B-Gradienten.	71
3.18. Ergebnisse 3: Polyphenole in <i>A. thaliana</i> 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: <i>A. thaliana</i> am natürlichen Standort.	91
4.4. Diskussion 3: Flavonole in <i>A. thaliana</i>	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-Transmissionen für Abschnitt 3.3.	148

Tabellenverzeichnis

2.1. Material und Methoden: Verwendete Akzessionen und Mutanten von <i>A. thaliana</i>	23
2.2. Material und Methoden: Fundorte der verwendeten Akzessionen von <i>A. thaliana</i>	24
2.3. Material und Methoden: Laufmittelzusammensetzung in der HPLC.	36
2.4. Material und Methoden: Kalibrierfunktion des DA-Detektors.	36
3.1. Ergebnisse 3: Lösliche Polyphenole in Blättern von <i>A. thaliana</i>	67
4.1. Diskussionsion 3: Auflistung der in <i>A. thaliana</i> 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

- AGATI, G., MATTEINI, P., GOTI, A. & TATTINI, M. (2007): Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* **174** (1): 77–89.
- AGATI, G., STEFANO, G., BIRICOLTI, S. & TATTINI, M. (2009): Mesophyll distribution of 'antioxidant' flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany* **104** (5): 853–861.
- ALBERT, A., SAREEDENCHAI, V., HELLER, W., SEIDLITZ, H. K. & ZIDORN, C. (2009): Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. *Oecologia* **160** (1): 1–8.
- ALLAKHVERDIEV, S. I. & MURATA, N. (2004): Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1657** (1): 23–32.
- ALLEN, D. J., MCKEE, I. F., FARAGE, P. K. & BAKER, N. R. (1997): Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. *Plant Cell and Environment* **20** (5): 633–640.
- ALLEN, D. J. & ORT, D. R. (2001): Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* **6** (1): 36–42.
- ALONSO, J. M., STEPANOVA, A. N., LEISSE, T. J., KIM, C. J., CHEN, H. M., SHINN, P., STEVENSON, D. K., ZIMMERMAN, J., BARAJAS, P., CHEUK, R., GADRINAB, C., HELLER, C., JESKE, A., KOESEMA, E., MEYERS, C. C., PARKER, H., PREDNIS, L., ANSARI, Y., CHOY, N., DEEN, H., GERALT, M., HAZARI, N., HOM, E., KARNES, M., MULHOLLAND, C., NDUBAKU, R., SCHMIDT, I., GUZMAN, P., AGUILAR-HENONIN, L., SCHMID, M., WEIGEL, D., CARTER, D. E., MARCHAND, T., RISSEEUW, E., BROGDEN, D., ZEKO, A., CROSBY, W. L., BERRY, C. C. & ECKER, J. R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301** (5633): 653–657.
- ALONSO-BLANCO, C. & KOORNNEEF, M. (2000): Naturally occurring variation in *Arabidopsis thaliana*: An underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science* **5** (1): 22–29.
- ANDERSSON, B. & ANDERSON, J. M. (1980): Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **593** (2): 427 – 440.
- ARO, E. M., VIRGIN, I. & ANDERSSON, B. (1993): Photoinhibition of photosystem II - Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1143** (2): 113–134.
- ARONSSON, H. & JARVIS, P. (2002): A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Febs Letters* **529** (2-3): 215–220.

- ASPINALL-O'DEA, M., WENTWORTH, M., PASCAL, A., ROBERT, B., RUBAN, A. & HORTON, P. (2002): In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (25): 16331–16335.
- BALLARÉ, C. L., ROUSSEAU, M. C., SEARLES, P. S., ZALLER, J. G., GIORDANO, C. V., ROBSON, T. M., CALDWELL, M. M., SALA, O. E. & SCOPEL, A. L. (2001): Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina). An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **62**: 67.
- BALLARÉ, C. L., SCOPEL, A. L., STAPLETON, A. E. & YANOVSKY, M. J. (1996): Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiology* **112** (1): 161–170.
- BARBATO, R., FRISO, G., RIGONI, F., DALLA VECCHIA, F. & GIACOMETTI, G. M. (1992): Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids. *Journal of Cell Biology* **119** (2): 325–335.
- BATE-SMITH, E. C. (1962): The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance: Dicotyledons. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* **58** (371): 95–173.
- BATE-SMITH, E. C. (1968): The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* **60** (383): 325–356.
- BATSCHAUER, A., ROCHOLL, M., KAISER, T., NAGATANI, A., FURUYA, M. & SCHAFFER, E. (1996): Blue and UV-A light-regulated CHS expression in *Arabidopsis* independent of phytochrome A and phytochrome B. *Plant Journal* **9** (1): 63–69.
- BENSASSO, R. & LAND, E. J. (1973): Optical and kinetic properties of semireduced plastoquinone and ubiquinone - Electron-acceptors in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **325** (1): 175–181.
- BENTSINK, L. & KOORNNEEF, M. (2002): Seed dormancy and germination. In: *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists.
- BIDEL, L. P. R., MEYER, S., GOULAS, Y., CADOT, Y. & CEROVIC, Z. G. (2007): Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: *In vivo* qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology* **88** (2-3): 163–179.
- BILGER, W., JOHNSEN, T. & SCHREIBER, U. (2001): UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants. *Journal of Experimental Botany* **52** (363): 2007–2014.
- BILGER, W., ROLLAND, M. & NYBAKKEN, L. (2007): UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* **6** (2): 190–195.

- BILGER, W. & SCHREIBER, U. (1986): Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynthesis Research* **10** (3): 303–308.
- BILGER, W., SCHREIBER, U. & BOCK, M. (1995): Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* **102** (4): 425–432.
- BILGER, W., VEIT, M., SCHREIBER, L. & SCHREIBER, U. (1997): Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* **101** (4): 754–763.
- BISCHOF, K., KRABS, G., WIENCKE, C. & HANELT, D. (2002): Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta* **215** (3): 502–509.
- BJORN, L. O., WIDELL, S. & WANG, T. (2002): Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Space Life Sciences: Extraterrestrial Organic Chemistry, UV Radiation on Biological Evolution and Planetary Protection* **30** (6): 1557–1562.
- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E. & FAGERSTEDT, K. V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
- BLUMTHALER, M., AMBACH, W. & ELLINGER, R. (1997): Increase in solar UV radiation with altitude. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **39** (2): 130–134.
- BLUMTHALER, M., AMBACH, W. & REHWALD, W. (1992): Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at 2 alpine stations at different altitudes. *Theoretical and Applied Climatology* **46** (1): 39–44.
- BOOIJ-JAMES, I. S., DUBE, S. K., JANSEN, M. A. K., EDELMAN, M. & MATTOO, A. K. (2000): Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis thaliana* mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiology* **124** (3): 1275–1283.
- BORNMAN, J. & TERAMURA, A. (1993): Effect of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In: YOUNG, A., BJÖRN, L., MOAN, J. & NULTTSCH, W. (Hg.) *Environmental UV Photobiology*, Plenum Press, New York, 427–472.
- BORNMAN, J. F., REUBER, S., CEN, Y.-P. & WEISSENBOCK, G. (1997): Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In: LUMSDEN, P. J. (Hg.) *Responses to environmental change*, Cambridge University Press, Cambridge, England, *Plants and UV-B*, 157–168.
- BORNMAN, J. F. & SUNDBY-EMANUELSSON, C. (1995): Response of plants to UV-B radiation - Some biochemical and physiological effects. In: SMIRNOFF, N. (Hg.) *Environment and Plant Metabolism - Flexibility and Acclimation*. Plant-Metabolism-Group on Environment and Plant Metabolism, Bios Scientific Publishers Ltd., *Environmental Plant Biology*, 245–262.
- BOSCHETTI, A., BREIDENBACH, E. & BLATTLER, R. (1990): Control of protein-formation in chloroplasts. *Plant Science* **68** (2): 131–149.

- BRITT, A. B. (1996): DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 75–100.
- BROSCHÉ, M. & STRID, A. (2003): Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum* **117** (1): 1–10.
- BROSSA, R., CASALS, I., PINTO-MARIJUAN, M. & FLECK, I. (2009): Leaf flavonoid content in *Quercus ilex* L. resprouts and its seasonal variation. *Trees - Structure and Function* **23** (2): 401–408.
- BROWN, B. A., CLOIX, C., JIANG, G. H., KAISERLI, E., HERZYK, P., KLIEBENSTEIN, D. J. & JENKINS, G. I. (2005): A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (50): 18225–18230.
- BROWN, B. A., HEADLAND, L. R. & JENKINS, G. I. (2009): UV-B action spectrum for UVR8-mediated HY5 transcript accumulation in *Arabidopsis*. *Photochemistry and Photobiology* **85** (5): 1147–1155.
- BROWN, B. A. & JENKINS, G. I. (2008): UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiology* **146** (2): 576–588.
- BROWN, J. E., KHODR, H., HIDER, R. C. & RICE-EVANS, C. A. (1998): Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* **330**: 1173–1178.
- BÄSSLER, M. V., JÄGER, E. & WERNER, K. (1996): Abteilung Samenpflanzen - Spermatophyta. In: BÄSSLER, M. V., JÄGER, E. & WERNER, K. (Hg.) *Gefäßpflanzen: Grundband*, 16. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena - Stuttgart, Deutschland.
- BURCHARD, P., BILGER, W. & WEISSENBOCK, G. (2000): Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell and Environment* **23** (12): 1373–1380.
- BUTLER, W. L. (1962): Absorption of light by turbid materials. *Journal of the optical society of America* **52**: 292–299.
- BUTLER, W. L. (1964): Absorption spectroscopy *in vivo*; theory and application. *Annual review of plant physiology* **15**: 451–460.
- BUTLER, W. L. & KITAJIMA, M. (1975): Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **376** (1): 116–125.
- CALDWELL, M. M. (1971): Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plants. *Photophysiology* **6**: 131–177.
- CALDWELL, M. M., BORNMAN, J. F., BALLARE, C. L., FLINT, S. D. & KULANDAIVELU, G. (2007): Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with both climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences* **6** (3): 252–266.

- CALDWELL, M. M., ROBBERECHT, R. & BILLINGS, W. D. (1980): A steep latitudinal gradient of solar ultraviolet-B radiation in the arctic-alpine life zone. *Ecology* **61** (3): 600–611.
- CALDWELL, M. M., ROBBERECHT, R. & FLINT, S. D. (1983): Internal filters - Prospects for UV acclimation in higher-plants. *Physiologia Plantarum* **58** (3): 445–450.
- CASATI, P. & WALBOT, V. (2004): Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biology* **5** (3): R16.
- CEN, Y.-P. (1993): Physical, biochemical and physiological effects of ultraviolet radiation on *Brassica napus* and *Phaseolus vulgaris*. Diss., Lund, Sweden.
- CEROVIC, Z. G., OUNIS, A., CARTELAT, A., LATOUCHE, G., GOULAS, Y., MEYER, S. & MOYA, I. (2002): The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell and Environment* **25** (12): 1663–1676.
- CHAPPLE, C. C. S., VOGT, T., ELLIS, B. E. & SOMERVILLE, C. R. (1992): An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4** (11): 1413–1424.
- CHEREGI, O., SICORA, C., KOS, P. B., BARKER, M., NIXON, P. J. & VASS, I. (2007): The role of the FtsH and Deg proteases in the repair of UV-B radiation-damaged photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767** (6): 820–828.
- CHRISTIE, P. J., ALFENITO, M. R. & WALBOT, V. (1994): Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways - Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* **194** (4): 541–549.
- CLUIS, C., MOUCHEL, C. F. & HARDTKE, C. S. (2004): The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant Journal* **38**: 332–347.
- COCKELL, C. S. (1998): Ultraviolet radiation, evolution and the π -electron system. *Biological Journal of the Linnean Society* **63** (3): 449–457.
- COCKELL, C. S. & KNOWLAND, J. (1999): Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews* **74** (3): 311–345.
- CONKLIN, P. L., WILLIAMS, E. H. & LAST, R. L. (1996): Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (18): 9970–9974.
- COSSINS, A. R. (1994): Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. In: COSSINS, A. R. (Hg.) *Temperature Adaptation of Biological Membranes*, Portland Press, London, England, 63–76.
- CRUTZEN, P. J. (1970): Influence of nitrogen oxides on atmospheric ozone content. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* **96** (408): 320–325.
- DAY, T. A. (1993): Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* **95**: 542–550.

- DEMMIG, B. & BJÖRKMAN, O. (1987): Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77k) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* **171** (2): 171–184.
- DEMMIG, B., WINTER, K., KRUGER, A. & CZYGAN, F. C. (1987): Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves - A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiology* **84** (2): 218–224.
- DEMMIG-ADAMS, B. & ADAMS, W. W. (1992): Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 599–626.
- DIXON, R. A. (2001): Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411** (6839): 843–847.
- DONAHUE, B. A., YIN, S., TAYLOR, J. S., REINES, D. & HANAWALT, P. C. (1994): Transcript cleavage by RNA-polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (18): 8502–8506.
- DURRANT, J. R., GIORGI, L. B., BARBER, J., KLUG, D. R. & PORTER, G. (1990): Characterization of triplet-states in isolated photosystem II reaction centers - Oxygen quenching as a mechanism for photo-damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1017** (2): 167–175.
- DUYSENS, L. (1956): The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. *Biochimica et Biophysica Acta* **19**: 1–12.
- FARMAN, J. C., GARDINER, B. G. & SHANKLIN, J. D. (1985): Large losses of total ozone in antarctica reveal seasonal Cl-ox/ -nox interaction. *Nature* **315** (6016): 207–210.
- FERTE, J., KUHNEL, J. M., CHAPUIS, G., ROLLAND, Y., LEWIN, G. & SCHWALLER, M. A. (1999): Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: Synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **42** (3): 478–489.
- FISAHN, J., KOSSMANN, J., MATZKE, G., FUSS, H., BILGER, W. & WILLMITZER, L. (1995): Chlorophyll fluorescence quenching and violaxanthin deepoxidation of FBPase antisense plants at low-light intensities and low-temperatures. *Physiologia Plantarum* **95** (1): 1–10.
- FLINT, S. & CALDWELL, M. (2003): A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiologia Plantarum* **117** (1): 137–144.
- FLINT, S. D., RYEL, R. J. & CALDWELL, M. M. (2003): Ecosystem UV-B experiments in terrestrial communities: a review of recent findings and methodologies. *Agricultural and Forest Meteorology* **120** (1-4): 177–189.
- FROHNMEYER, H., LOYALL, L., BLATT, M. R. & GRABOV, A. (1999): Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca²⁺ and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant Journal* **20** (1): 109–117.
- FROHNMEYER, H. & STAIGER, D. (2003): Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology* **133** (4): 1420–1428.
- GATES, D. M. (1980): Energy budget of a leaf. In: *Biophysical ecology*, Springer, 26–27.

- GEISLER, M., BLAKESLEE, J. J., BOUCHARD, R., LEE, O. R., VINCENZETTI, V., BANDYOPADHYAY, A., TITAPIWATANAKUN, B., PEER, W. A., BAILLY, A., RICHARDS, E. L., EJENDA, K. F. K., SMITH, A. P., BAROUX, C., GROSSNIKLAUS, U., MULLER, A., HRYCZYNA, C. A., DUDLER, R., MURPHY, A. S. & MARTINOIA, E. (2005): Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant Journal* **44** (2): 179–194.
- GOMBOS, Z., WADA, H. & MURATA, N. (1994): The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane-lipids - a mechanism of chilling tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (19): 8787–8791.
- GRAHAM, T. L. (1998): Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36** (1-2): 135–144.
- GREER, D. H., BERRY, J. A. & BJORKMAN, O. (1986): Photoinhibition of photosynthesis in intact bean-leaves - Role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta* **168** (2): 253–260.
- GREER, D. H., OTTANDER, C. & ÖQUIST, G. (1991): Photoinhibition and recovery of photosynthesis in intact barley leaves at 5 and 20 °C. *Physiologia Plantarum* **81** (2): 203–210.
- GRIGGS, M. (1968): Absorption coefficients of ozone in ultraviolet and visible regions. *Journal of Chemical Physics* **49** (2): 857–859.
- HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. (1989): Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 347–369.
- HAKALA, M., TUOMINEN, I., KERANEN, M., TYYSTJARVI, T. & TYYSTJARVI, E. (2005): Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1706** (1-2): 68–80.
- HAKALA-YATKIN, M., MÄNTYSAARI, M., MATTILA, H. & TYYSTJÄRVI, E. (2010): Contributions of visible and ultraviolet parts of sunlight to photoinhibition. *Plant and Cell Physiology* **51**: 1745–1753.
- HALLIDAL, P. (1964): Ultraviolet action spectra of photosynthesis and photosynthetic inhibition in a green and a red alga. *Physiologia Plantarum* **17**: 414–421.
- HANKAMER, B., BARBER, J. & BOEKEMA, E. J. (1997): Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 641–671.
- HARBAUM, B., HUBBERMANN, E. M., WOLFF, C., HERGES, R., ZHU, Z. & SCHWARZ, K. (2007): Identification of flavonols and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSⁿ and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55** (20): 8251–8260.
- HARBORNE, J. & BAXTER, H. A. (1999): *Handbook of the natural flavonoids*. Wiley, New York, USA, 1768 pp.

- HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55** (6): 481–504.
- HEGGLIN, M. I. & SHEPHERD, T. G. (2009): Atmospheric chemistry: Ozone's winners and losers. *Nature* **461**: 148.
- HERNANDEZ, I., ALEGRE, L., VAN BREUSEGEM, F. & MUNNÉ-BOSCH, S. (2009): How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* **14** (3): 125–132.
- HERRIN, D. & MICHAELS, A. (1985): The chloroplast 32 kDa protein is synthesized on thylakoid-bound ribosomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* **184** (1): 90–95.
- HIDEG, E. & VASS, I. (1996): UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Science* **115** (2): 251–260.
- HOFFMANN, A. A., HALLAS, R., SINCLAIR, C. & PARTRIDGE, L. (2001): Rapid loss of stress resistance in *Drosophila melanogaster* under adaptation to laboratory culture. *Evolution* **55** (2): 436–438.
- HOFFMANN-WÜLFING, K. (2007): The induction and regulation of epidermal flavonoid accumulation at low temperature in *Arabidopsis thaliana*. Diss., Botanisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- HOLLOSY, F. (2002): Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* **33** (2): 179–197.
- HORLER, D. N. H. & BARBER, J. (1981): Principles of remote sensing of plants. In: SMITH, H. (Hg.) *Plants and the daylight spectrum*, Academic Press, London, England, 43–64.
- HRAZDINA, G. & WAGNER, G. J. (1985): Metabolic pathways as enzyme complexes - Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane-associated enzyme complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **237** (1): 88–100.
- HUANG, J., BHINU, V.-S., LI, X., DALLAL BASHI, Z., ZHOU, R. & HANNOUFA, A. (2009): Pleiotropic changes in *Arabidopsis f5h* and *sct* mutants revealed by large-scale gene expression and metabolite analysis. *Planta* **230**: 1057–1069. 10.1007/s00425-009-1007-2.
- HUDSON, M. E. (2000): The genetics of phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Seminar of Cell Development Biolgy* **11**: 475–483.
- INADA, K. (1976): Action spectra for photosynthesis in higher plants. *Plant and Cell Physiology* **17**: 355–365.
- INN, E. C. Y. & TANAKA, Y. (1953): Absorption coefficient of ozone in the ultraviolet and visible regions. *Journal of the Optical Society of America* **43** (10): 870–873.
- IRIBARNE, J. V. & THOMSON, B. A. (1976): Evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics* **64** (6): 2287–2294.
- JANSEN, M. A. K., GABA, V. & GREENBERG, B. M. (1998): Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* **3** (4): 131–135.

- JANSEN, M. A. K., LE MARTRET, B. & KOORNNEEF, M. (2010): Variations in constitutive and inducible UV-B tolerance; dissecting photosystem II protection in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Physiologia Plantarum* **138** (1): 22–34.
- JENKINS, G. I. (2009a): Photomorphogenic UV-B perception and signal transduction in *Arabidopsis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Molecular & integrative Physiology* **153A** (2): 203–S203.
- JENKINS, G. I. (2009b): Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 407–431.
- JENKINS, G. I., LONG, J. C., WADE, H. K., SHENTON, M. R. & BIBIKOVA, T. N. (2001): UV and blue light signalling: Pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **151** (1): 121–131.
- JOHNSTON, H. (1971): Reduction of stratospheric ozone by nitrogen oxide catalysts from supersonic transport exhaust. *Science* **173** (3996): 517–522.
- JONES, P., MESSNER, B., NAKAJIMA, J. I., SCHAFFNER, A. R. & SAITO, K. (2003): UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278** (45): 43910–43918.
- JORDAN, B. R., HE, J., CHOW, W. S. & ANDERSON, J. M. (1992): Changes in messenger-RNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell and Environment* **15** (1): 91–98.
- KAKANI, V. G., REDDY, K. R., ZHAO, D. & SAILAJA, K. (2003): Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and Forest Meteorology* **120** (1-4): 191–218.
- KARABOURNIOTIS, G. & BORNMAN, J. F. (1999): Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum* **105** (4): 655–661.
- KASUGA, J., HASHIDOKO, Y., NISHIOKA, A., YOSHIBA, M., ARAKAWA, K. & FUJIKAWA, S. (2008): Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell and Environment* **31** (9): 1335–1348.
- KAUL, S., KOO, H. L., JENKINS, J., RIZZO, M., ... & SOMERVILLE, M. C. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408** (6814): 796–815.
- KAUTSKY, H. & HIRSCH, A. (1931): Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* **48**: 964.
- KAUTSKY, H. & HIRSCH, A. (1934): Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. *Biochemische Zeitung* **274**: 422–434.
- KEBARLE, P. & PESCHKE, M. (2000): On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta* **406** (1): 11–35.

- KERHOAS, L., AOUAK, D., CINGOZ, A., ROUTABOUL, J. M., LEPINIEC, L., EINHORN, J. & BIRLIRAKIS, N. (2006): Structural characterization of the major flavonoid glycosides from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (18): 6603–6612.
- KHURMATOV, K. K. (1982): Heterogeneity of natural populations of *Arabidopsis thaliana* (Pamiro-Alay) in the flowering time. *Arabidopsis Information Service* **19**: 63–65.
- KILIAN, J., WHITEHEAD, D., HORAK, J., WANKE, D., WEINL, S., BATISTIC, O., D'ANGELO, C., BORNBERG-BAUER, E., KUDLA, J. & HARTER, K. (2007): The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal* **50** (2): 347–363.
- KIM, B. C., TENNESSEN, D. J. & LAST, R. L. (1998): UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **15** (5): 667–674.
- KINGSTON-SMITH, A. H., HARBINSON, J. & FOYER, C. H. (1999): Acclimation of photosynthesis, H₂O₂ content and antioxidants in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures. *Plant Cell and Environment* **22** (9): 1071–1083.
- KINGSTON-SMITH, A. H., HARBINSON, J., WILLIAMS, J. & FOYER, C. H. (1997): Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiology* **114** (3): 1039–1046.
- KITAJIMA, M. & BUTLER, W. L. (1975): Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **376** (1): 105–115.
- KOLB, C. A., KASER, M. A., KOPECKY, J., ZOTZ, G., RIEDERER, M. & PFÜNDEL, E. E. (2001): Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology* **127** (3): 863–875.
- KOLB, C. A. & PFÜNDEL, E. E. (2005): Origins of non-linear and dissimilar relationships between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. *Plant Cell and Environment* **28** (5): 580–590.
- KORN, M., PETEREK, S., MOCK, H. P., HEYER, A. G. & HINCHA, D. K. (2008): Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant Cell and Environment* **31** (6): 813–827.
- KRAMER, G. F., NORMAN, H. A., KRIZEK, D. T. & MIRECKI, R. M. (1991): Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane-lipids in *Cucumber*. *Phytochemistry* **30** (7): 2101–2108.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 313–349.
- KRESLAVSKI, V. D., CARPENTIER, R., KLIMOV, V. V., MURATA, N. & ALLAKHVERDIEV, S. I. (2007): Molecular mechanisms of stress resistance of photosynthetic apparatus. *Biologicheskie Membrany* **24** (3): 195–217.

- KRIEGER-LISZKAY, A. (2005): Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **56** (411): 337–346.
- LAKEMAN, M. B., VON DASSOW, P. & CATTOLICO, R. A. (2009): The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae* **8** (5): 746–758.
- LANDRY, L. G., CHAPPLE, C. C. S. & LAST, R. L. (1995): *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* **109** (4): 1159–1166.
- LARKUM, A. W. D., KARGE, M., REIFARTH, F., ECKERT, H. J., POST, A. & RENGER, G. (2001): Effect of monochromatic UV-B radiation on electron transfer reactions of photosystem II. *Photosynthesis Research* **68** (1): 49–60.
- LEYVA, A., JARILLO, J. A., SALINAS, J. & MARTINEZ-ZAPATER, J. M. (1995): Low temperature induces the accumulation of *phenylalanine ammonia-lyase* and *chalcone synthase* mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* **108** (1): 39–46.
- LI, J. Y., OULEE, T. M., RABA, R., AMUNDSON, R. G. & LAST, R. L. (1993): *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5** (2): 171–179.
- LI, S. S., WANG, Y. & BJORN, L. O. (2004): Effects of temperature on UV-B-induced DNA damage and photorepair in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences - China* **16** (1): 173–176.
- LOBIN, W. (1983): The occurrence of *Arabidopsis thaliana* in the Cape Verde Islands. *Arabidopsis Information Service* **20**: 119–122.
- LORENZEN, M., RACICOT, V., STRACK, D. & CHAPPLE, C. (1996): Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **112** (4): 1625–1630.
- LYONS, J. M. (1973): Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **24**: 445–466.
- MADRONICH, S. (1993): The atmosphere and UV-B radiation at ground level. In: YOUNG, A. R., MOAN, J., BJÖRN, L. O. & NULTSCH, W. (Hg.) *Environmental UV Photobiology*, Plenum Press, New York, USA.
- MADRONICH, S., MCKENZIE, R. L., BJORN, L. O. & CALDWELL, M. M. (1998): Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology* **46** (1-3): 5–19.
- MADRONICH, S., MCKENZIE, R. L., CALDWELL, M. & BJORN, L. O. (1995): Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio* **24** (3): 143–152.
- MARINOVA, K., KLEINSCHMIDT, K., WEISSENBOCK, G. & KLEIN, M. (2007): Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology* **144** (1): 432–444.

- MASSONNET, C., VILE, D., FABRE, J., HANNAH, M. A., CALDANA, C., LISEC, J., BEEMSTER, G. T. S., MEYER, R. C., MESSERLI, G., GRONLUND, J. T., PERKOVIC, J., WIGMORE, E., MAY, S., BEVAN, M. W., MEYER, C., RUBIO-DIAZ, S., WEIGEL, D., MICOL, J. L., BUCHANAN-WOLLASTON, V., FIORANI, F., WALSH, S., RINN, B., GRUISSEM, W., HILSON, P., HENNIG, L., WILLMITZER, L. & GRANIER, C. (2010): Probing the reproducibility of leaf growth and molecular phenotypes: A comparison of three *Arabidopsis* accessions cultivated in ten laboratories. *Plant Physiology* **152** (4): 2142–2157.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51** (345): 659–668.
- MCCREE, K. J. (1972): Action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agricultural Meteorology* **9** (3-4): 191–216.
- MCCREE, K. J. (1981): Photosynthetically active radiation. In: LANGE, O. L., NOBEL, P., OSMOND, C. B. & ZIEGLER, H. (Hg.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 12A, 41–55.
- MEHRTENS, F., KRANZ, H., BEDNAREK, P. & WEISSHAAR, B. (2005): The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology* **138**: 1083–1096.
- MELIS, A. (1999): Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science - Reviews* **4**: 130–135.
- MEYER, K., CUSUMANO, J. C., SOMERVILLE, C. & CHAPPLE, C. C. S. (1996): Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (14): 6869–6874.
- MICHAEL, T. P., SALOMÉ, P. A., YU, H. J., SPENCER, T. R., SHARP, E., MCPEEK, M. A., ALONSO, J. M., ECKER, J. R. & MCCLUNG, C. R. (2003): Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* **302**: 1049–1053.
- MISHRA, R. K. & SINGHAL, G. S. (1992): Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat-stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiology* **98** (1): 1–6.
- MITCHELL, D. L., VAUGHAN, J. E. & NAIRN, R. S. (1989): Inhibition of transient gene expression in chinese-hamster ovary cells by cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts in transfected ultraviolet irradiated plasmid DNA. *Plasmid* **21** (1): 21–30.
- MÜLLER, N. (1874): Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll des lebenden Blattes. *Jahrbuch der wissenschaftlichen Botanik* **9**: 42–49.
- MOLINA, M. J. & ROWLAND, F. S. (1974): Stratospheric sink for chlorofluoromethanes - Chlorine atomic-catalysed destruction of ozone. *Nature* **249** (5460): 810–812.

- MOON, B. Y., HIGASHI, S. I., GOMBOS, Z. & MURATA, N. (1995): Unsaturation of the membrane-lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (14): 6219–6223.
- MOREL, A. & BRICAUD, A. (1981): Theoretical results concerning light-absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep Sea Research Part A - Oceanographic Research Papers* **28**: 1375–1393.
- NEUSCHAEFER-RUBE, O., ALBERT, A., SEIDLITZ, H. K., STICH, S., HELLER, W. & ERNST, D. (2009): Temperature strongly modulates UV-B effects in *Arabidopsis thaliana*. International Conference - Plant abiotic stress tolerance. Vom 8. bis 11. Februar in Wien, Posterbeitrag .
- NEWMAN, P. A., OMAN, L. D., DOUGLASS, A. R., FLEMING, E. L., FRITH, S. M., HURWITZ, M. M., KAWA, S. R., JACKMAN, C. H., KROTKOV, N. A., NASH, E. R., NIELSEN, J. E., PAWSON, S., STOLARSKI, R. S. & VELDEERS, G. J. M. (2009): What would have happened to the ozone layer if chlorofluorocarbons (CFCs) had not been regulated? *Atmospheric Chemistry and Physics* **9** (6): 2113–2128.
- NISHIDA, I. & MURATA, N. (1996): Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 541–568.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S. I. & MURATA, N. (2006a): A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757** (7): 742–749.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S. I. & MURATA, N. (2006b): Regulation by environmental conditions of the repair of photosystem II in cyanobacteria. In: DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W. W. & MATTOO, A. K. (Hg.) *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*, Springer, Dordrecht, Niederlande, 21, 193–203.
- NIYOGI, K. K., BJORKMAN, O. & GROSSMAN, A. R. (1997): The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (25): 14162–14167.
- NYBAKKEN, L., AUBERT, S. & BILGER, W. (2004a): Epidermal UV screening of arctic and alpine plants along a latitudinal gradient in Europe. *Polar Biology* **27** (7): 391–398.
- NYBAKKEN, L., BILGER, W., JOHANSON, U., BJORN, L. O., ZIELKE, M. & SOLHEIM, B. (2004b): Epidermal UV-screening in vascular plants from Svalbard (Norwegian Arctic). *Polar Biology* **27** (7): 383–390.
- OHNISHI, N., ALLAKHVERDIEV, S. I., TAKAHASHI, S., HIGASHI, S., WATANABE, M., NISHIYAMA, Y. & MURATA, N. (2005): Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* **44** (23): 8494–8499.
- OLSEN, K. M., LEA, U. S., SLIMESTAD, R., VERHEUL, M. & LILLO, C. (2008): Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Journal of Plant Physiology* **165** (14): 1491–1499.

- OLSEN, K. M., SLIMESTAD, R., LEA, U. S., BREDE, C., LOVDAL, T., RUOFF, P., VERHEUL, M. & LILLO, C. (2009): Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: Experimental and kinetic model studies. *Plant Cell and Environment* **32** (3): 286–299.
- OLSSON, L. C., VEIT, M., WEISSENBOCK, G. & BORNMAN, J. F. (1998): Differential flavonoid response to enhanced uv-b radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* **49** (4): 1021–1028.
- PEER, W. A. & MURPHY, A. S. (2006): Flavonoids as signal molecules - Targets of flavonoid action. In: GROTEWOLD, E. (Hg.) *The science of flavonoids*, Springer Science and Business Media, New York, USA, 239–268.
- PELLETIER, M. K., BURBULIS, I. E. & WINKEL-SHIRLEY, B. (1999): Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Molecular Biology* **40** (1): 45–54.
- PFÜNDEL, E. E., PAN, R. S. & DILLEY, R. A. (1992): Inhibition of violaxanthin deepoxidation by ultraviolet-B radiation in isolated-chloroplasts and intact leaves. *Plant Physiology* **98** (4): 1372–1380.
- PIGLIUCCI, M. (2002): Ecology and evolutionary biology of *Arabidopsis*. In: *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists.
- PORRA, R. J., THOMPSON, W. A. & KRIEDEMANN, P. E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and chlorophyll *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.
- POWLES, S. B. (1984): Photoinhibition of photosynthesis induced by visible-light. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**: 15–44.
- PROTIC-SABLJIC, M. & KRAEMER, K. H. (1985): One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in *Xeroderma pigmentosum* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82** (19): 6622–6626.
- QUAITE, F. E., SUTHERLAND, B. M. & SUTHERLAND, J. C. (1992): Action spectrum for DNA damage in *alfalfa* lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature* **358** (6387): 576–578.
- QUATTROCCHIO, F., BAUDRY, A., LEPINIEC, L. & GROTEWOLD, E. (2006): The regulation of flavonoid biosynthesis. In: GROTEWOLD, E. (Hg.) *The science of flavonoids*, Springer Science and Business Media, New York, USA, 97–122.
- ÖQUIST, G., HURRY, V. M. & HUNER, N. P. A. (1993): The temperature-dependence of the redox state of Q_a and susceptibility of photosynthesis to photoinhibition. *Plant Physiology and Biochemistry* **31** (5): 683–691.
- RALPH, P. J., SCHREIBER, U., GADEMANN, R., KUHL, M. & LARKUM, A. W. D. (2005): Coral photobiology studied with a new imaging pulse amplitude modulated fluorometer. *Journal of Phycology* **41** (2): 335–342.

- RAO, M. V., PALIYATH, G. & ORMROD, D. P. (1996): Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110** (1): 125–136.
- RAPPAPORT, F., GUERGOVA-KURAS, M., NIXON, P. J., DINER, B. A. & LAVERGNE, J. (2002): Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II. *Biochemistry* **41** (26): 8518–8527.
- RAUSHER, M. D. (2006): The evolution of flavonoids and their genes. In: GROTEWOLD, E. (Hg.) *The science of flavonoids*, Springer Science and Business Media, New York, USA, 175–211.
- RÉDEI, G. (1970): *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliographica Genetica* **20**: 1–151.
- REHM, H. (2006): Massenspektrometrie. In: MOLTSMANN, U. G. & SAGLIO, B. (Hg.) *Der Experimentator. Proteinbiochemie / Proteomics*, 5. Auflage, Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland.
- RENGER, G., VOLKER, M., ECKERT, H. J., FROMME, R., HOHMVEIT, S. & GRABER, P. (1989): On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation. *Photochemistry and Photobiology* **49** (1): 97–105.
- VAN RENSEN, J. J. S., VREDENBERG, W. J. & RODRIGUES, G. C. (2007): Time sequence of the damage to the acceptor and donor sides of photosystem II by UV-B radiation as evaluated by chlorophyll *a* fluorescence. *Photosynthesis Research* **94** (2-3): 291–297.
- REUBER, S., BORNMAN, J. F. & WEISSENBOCK, G. (1996a): A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant Cell and Environment* **19** (5): 593–601.
- REUBER, S., BORNMAN, J. F. & WEISSENBOCK, G. (1996b): Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum* **97** (1): 160–168.
- REX, M., SALAWITCH, R. J., VON DER GATHEN, P., HARRIS, N. R. P., CHIPPERFIELD, M. P. & NAUJOKAT, B. (2004): Arctic ozone loss and climate change. *Geophysical Research Letters* **31** (4): L04116.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sciences* **2** (4): 152–159.
- ROBBERECHT, R. & CALDWELL, M. M. (1978): Leaf epidermal transmittance of ultraviolet-radiation and its implications for plant sensitivity to ultraviolet-radiation induced injury. *Oecologia* **32** (3): 277–287.
- RODRIGUES, G. C., JANSEN, M. A. K., VAN DEN NOORT, M. E. & VAN RENSEN, J. J. S. (2006): Evidence for the semireduced primary quinone electron acceptor of photosystem II being a photosensitizer for UVB damage to the photosynthetic apparatus. *Plant Science* **170** (2): 283–290.
- ROUTABOUL, J. M., KERHOAS, L., DEBEAUJON, I., POURCEL, L., CABOCHE, M., EINHORN, J. & LEPINIEC, L. (2006): Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224** (1): 96–107.

- RUNGE, F. I. (2003): ESI-Untersuchungen zur Erzeugung und Reaktivität von Ammonium- und Phosphonium-Ionen in der Gasphase. Diss., Technische Universität zu Darmstadt.
- RYAN, K. G., MARKHAM, K. R., BLOOR, S. J., BRADLEY, J. M., MITCHELL, K. A. & JORDAN, B. R. (1998): UV-B radiation induced increase in quercetin : kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochemistry and Photobiology* **68** (3): 323–330.
- SALAH, N., MILLER, N. J., PAGANGA, G., TIJBURG, L., BOLWELL, G. P. & RICE-EVANS, C. (1995): Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous-phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **322** (2): 339–346.
- SARVIKAS, P., HAKALA, M., PATSIKKA, E., TYYSTJÄRVI, T. & TYYSTJÄRVI, E. (2006): Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and *npq1-2* and *npq4-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47** (3): 391–400.
- SASLOWSKY, D. & WINKEL-SHIRLEY, B. (2001): Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* **27** (1): 37–48.
- SASS, L., SPETEA, C., MATE, Z., NAGY, F. & VASS, I. (1997): Repair of UV-B induced damage of photosystem II via *de novo* synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research* **54** (1): 55–62.
- SCHÖNER, S. & KRAUSE, G. H. (1990): Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. *Planta* **180**: 383–389.
- SCHNITZLER, J. P., JUNGBLUT, T. P., HELLER, W., KOFFERLEIN, M., HUTZLER, P., HEINZMANN, U., SCHMELZER, E., ERNST, D., LANGEBARTELS, C. & SANDERMANN, H. (1996): Tissue localization of UV-B screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist* **132** (2): 247–258.
- SCHREIBER, U. (1986): Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis Research* **9** (1-2): 261–272.
- SCHREIBER, U. (2001): Box 2.1: *In vivo* Chlorophyllfluoreszenz: Analyse und Zustandsdiagnose der Photosynthesefunktion. In: *Ökophysiologie der Pflanzen*, Larcher, W.
- SETLOW, R. B. (1966): Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science* **153** (3734): 379–386.
- SETLOW, R. B. (1974): Wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer - Theoretical analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71** (9): 3363–3366.
- SETLOW, R. B. & CARRIER, W. L. (1966): Pyrimidine dimers in ultraviolet irradiated DNAs. *Journal of Molecular Biology* **17** (1): 237.
- SHEAHAN, J. J. (1996): Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **83** (6): 679–686.
- SHIBATA, K. (1958): Spectrophotometry of intact biological materials. *The Journal of Biochemistry* **45**: 599–623.

- SHIRLEY, B. W., HANLEY, S. & GOODMAN, H. M. (1992): Effects of ionizing radiation on a plant genome - Analysis of 2 *Arabidopsis* transparent-testa mutations. *Plant Cell* **4** (3): 333–347.
- SMITH, J. L., BURRITT, D. J. & BANNISTER, P. (2000): Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B-absorbing compounds as indicators of a plant's sensitivity to UV-B radiation. *Annals of Botany* **86**: 1057–1063.
- SMITH, K. C. (1977): Ultraviolet radiation effects on molecules and cells. In: C., S. K. (Hg.) *The Science of Photobiology*, Plenum Press, New York, USA, 113–142.
- SNYRYCHOVA, I., KOS, P. B. & HIDEK, E. (2007): Hydroxyl radicals are not the protagonists of UV-B-induced damage in isolated thylakoid membranes. *Functional Plant Biology* **34** (12): 1112–1121.
- SPEARMAN, C. (1904): The proof and measurement of association between 2 things. *American Journal of Psychology* **15**: 72–101.
- STAFFORD, H. A. (1974): The metabolism of aromatic compounds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **25**: 459–486.
- STENOIEN, H. K., FENSTER, C. B., KUITTINEN, H. & SAVOLAINEN, O. (2002): Quantifying latitudinal clines to light responses in natural populations of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **89**: 1604–1608.
- STINCHCOMBE, J. R., CAICEDO, A. L., HOPKINS, R., MAYS, C., BOYD, E. W., PURUGGANAN, M. D. & SCHMITT, J. (2005): Vernalization sensitivity in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae): the effects of latitude and FLC variation. *American Journal of Botany* **92**: 1701–1707.
- STRACKE, R., FAVORY, J. J., GRUBER, H., BARTELNIEWOEHNER, L., BARTELS, S., BINKERT, M., FUNK, M., WEISSHAAR, B. & ULM, R. (2010): The *Arabidopsis* bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant Cell and Environment* **33** (1): 88–103.
- STRACKE, R., ISHIHARA, H., BARSCH, G. H. A., MEHRTENS, F., NIEHAUS, K. & WEISSHAAR, B. (2007): Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant Journal* **50** (4): 660–677.
- STRID, A., CHOW, W. S. & ANDERSON, J. M. (1990): Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1020** (3): 260–268.
- STRID, A., CHOW, W. S. & ANDERSON, J. M. (1994): UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research* **39** (3): 475–489.
- STRID, A. & PORRA, R. J. (1992): Alterations in pigment content in leaves of *Pisum sativum* after exposure to supplementary UV-B. *Plant Cell Physiology* **33**: 1015–1023.
- SULLIVAN, J. H., HOWELLS, B. W., RUHLAND, C. T. & DAY, T. A. (1996): Changes in leaf expansion and epidermal screening effectiveness in *Liquidambar styraciflua* and *Pinus taeda* in response to UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* **98** (2): 349–357.

- SZILARD, A., SASS, L., DEAK, Z. & VASS, I. (2007): The sensitivity of photosystem II to damage by UV-B radiation depends on the oxidation state of the water splitting complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767** (6): 876–882.
- TAKAHASHI, S. & MURATA, N. (2008): How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* **13** (4): 178–182.
- TAKAHASHI, S. E., S. AND MILWARD, YAMORI, W., EVANS, J. R., HILLIER, W. & BADGER, M. R. (2010): The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiology* **153**: 988–993.
- TAKEUCHI, Y., MURAKAMI, M., NAKAJIMA, N., KONDO, N. & NIKAIDO, O. (1996): Induction and repair of damage to DNA in *Cucumber* cotyledons irradiated with UV-B. *Plant Cell Physiol.* **37** (2): 181–187.
- TATTINI, M., GALARDI, C., PINELLI, P., MASSAI, R., REMORINI, D. & AGATI, G. (2004): Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* **163** (3): 547–561.
- TATTINI, M., GRAVANO, E., PINELLI, P., MULINACCI, N. & ROMANI, A. (2000): Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes in *Phullyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* **148**: 69–77.
- TERAMURA, A. H. & SULLIVAN, J. H. (1994): Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* **39** (3): 463–473.
- THIMIJJAN, R. W., CARNS, H. R. & CAMPBELL, L. E. (1978): Radiation sources and related environmental control for biological and climatic effects of UV research (BACER). Final report (epa-iagd6-0168), EPA, Washington DC, USA.
- THOMASHOW, M. F. (1999): Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571–599.
- TISCHLER, Y. (2010): Schutz gegen UV-B-Strahlung bei *Arabidopsis thaliana* in Freiland-Kultur. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Botanisches Institut, Ökophysiologie der Pflanzen.
- TYYSTJÄRVI, E. (2008): Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* **252** (3-4): 361–376.
- ULM, R., BAUMANN, A., ORAVECZ, A., MATE, Z., ADAM, E., OAKELEY, E. J., SCHÄFER, E. & NAGY, F. (2004): Genome wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (5): 1397–1402.
- USADEL, B., BLASING, O. E., GIBON, Y., POREE, F., HOHNE, M., GÜNTER, M., TRETHERWEY, R., KAMLAGE, B., POORTER, H. & STITT, M. (2008): Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non freezing range. *Plant Cell and Environment* **31** (4): 518–547.

- VANDEBUSSCHE, F., HABRICOT, Y., CONDIFF, A. S., MALDINEY, R., VAN DER STRAETEN, D. & AHMAD, M. (2007): HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **49** (3): 428–441.
- VASS, I., CSER, K. & CHEREGI, O. (2007): Molecular mechanisms of light stress of photosynthesis. *Stress Responses in Biology and Medicine - Stress of Life in Molecules, Cells, Organisms, and Psychosocial Communities* **1113**: 114–122.
- VASS, I., KIRILOVSKY, D. & ETIENNE, A. L. (1999): UV-B radiation induced donor and acceptor side modifications of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **38** (39): 12786–12794.
- VASS, I., SASS, L., SPETEA, C., BAKOU, A., GHANOTAKIS, D. F. & PETROULEAS, V. (1996): UV-B induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochemistry* **35** (27): 8964–8973.
- VASS, I., STYRING, S., HUNDAL, T., KOIVUNIEMI, A., ARO, E. M. & ANDERSSON, B. (1992): Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced Q_a species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (4): 1408–1412.
- VEIT, M., BILGER, T., MUHLBAUER, T., BRUMMET, W. & WINTER, K. (1996): Diurnal changes in flavonoids. *Journal of Plant Physiology* **148** (3-4): 478–482.
- VEIT, M. & PAULI, G. F. (1999): Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Natural Products* **62** (9): 1301–1303.
- VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. (2008): Reactive oxygen species and antioxidants. In: VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. (Hg.) *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, Dordrecht, Niederlande.
- VIJAYAN, P. & BROWSE, J. (2002): Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiology* **129** (2): 876–885.
- VOGELMANN, T. C. (1986): Light within the plant. In: KENDRICK, R. E. & KRONENBERG, G. H. M. (Hg.) *Photomorphogenesis in plants*, Martinus Nijhoff Publication, Dordrecht, Netherlands.
- VONARX, E. J., MITCHELL, H. L., KARTHIKEYAN, R., CHATTERJEE, I. & KUNZ, B. A. (1998): DNA repair in higher plants. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **400** (1-2): 187–200.
- WADE, H. K., BIBIKOVA, T. N., VALENTINE, W. J. & JENKINS, G. I. (2001): Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant Journal* **25** (6): 675–685.
- WADE, H. K., SOHAL, A. K. & JENKINS, G. I. (2003): *Arabidopsis* ICX1 is a negative regulator of several pathways regulating flavonoid biosynthesis genes. *Plant Physiology* **131** (2): 707–715.
- WANG, H. Y., MA, L. G., LI, J. M., ZHAO, H. Y. & DENG, X. W. (2001): Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* **294** (5540): 154–158.

7. Literaturverzeichnis

- WEISSHAAR, B. & JENKINS, G. I. (1998): Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **1** (3): 251–257.
- VON WILLERT, D. J., MATYSSEK, R. & HERPPICH, W. (1995): Abiotische Faktoren des Standortes - Mikrometeorologische Faktoren. In: WILLERT, D. J. v., MATYSSEK, R. & HERPPICH, W. (Hg.) *Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, Thieme, 50–134.
- WINKEL, B. S. J. (2004): Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 85–107.
- WINKEL, B. S. J. (2006): The biosynthesis of flavonoids. In: GROTEWOLD, E. (Hg.) *The science of flavonoids*, Springer Science and Business Media, New York, USA, 71–95.
- WINKEL-SHIRLEY, B. (2002): Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5** (3): 218–223.
- YANG, H. Q., TANG, R. H. & CASHMORE, A. R. (2001): The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* **13** (12): 2573–2587.
- YOKTHONGWATTANA, K. & MELIS, A. (2006): Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: Mechanism of a photosystem II damage and repair cycle. In: DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W. W. & MATTOO, A. K. (Hg.) *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*, Springer, Dordrecht, Niederlande.
- ZHANG, J. W., HU, X., HENKOW, L., JORDAN, B. R. & STRID, A. (1994): The effects of ultraviolet-B radiation on the CF₀F₁-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1185** (3): 295–302.

A. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle A.1.: Abkürzungsverzeichnis.

*	statistische Interaktion zwischen Faktoren (Statistik)
Abs UV	epidermale UV-Absorption
Abs _λ	Absorption bei der Wellenlänge λ
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AUs	Flächeneinheiten in Chromatogrammen, englisch: Area Units
bzw.	beziehungsweise
BG	blau-grünes Licht
°C	Grad Celsius
CHI	Chalconisomerase
CHS	Chalconsynthase
<i>COL</i>	<i>Columbia</i> , Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
<i>CVI</i>	Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
CI95%	95% Konfidenzintervall / Vertrauensbereich (Statistik)
d	Tag
D	strahlungslose Dissipation bzw. Wärme
D ₁	Protein im Photosystem II
D ₂	Protein im Photosystem II
DAD	Dioden-Array-Detektor
ESI-MS	Elektro-Spray-Ionisations-Massenspektrometrie
epid.	epidermale
<i>fah1</i>	Mutante von <i>A. thaliana</i> (Tabelle 2.1)
F (m / o / v)	Fluoreszenz von PS II (maximale / Grund- / variable-)
F(BG)	Mit blau-grünem Licht angeregte Chlorophyllfluoreszenz
F(UV)	Mit UV-Strahlung angeregte Chlorophyllfluoreszenz
F3H	Flavonol-3-Hydroxylase

Tabelle A.2.: Abkürzungsverzeichnis, Fortsetzung I.

F3'H	Flavonol-3'-Hydroxylase
F5H	Ferulat-5-Hydroxylase
g	Gramm oder Gravitation (=9,81 m s ⁻² /N kg ⁻¹)
h	Stunde(n)
HCA	Hydroxyzimtsäuren, englisch: Hydroxycinnamic acids
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie
Hz	Hertz
J	Joule
<i>LER</i>	<i>Landsberg erecta</i> , Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
m	Meter
Mio.	Million(en)
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
min	Minute
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
mW	Milliwatt (10 ⁻³ W)
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
μmol	Mikromol (10 ⁻⁶ mol)
m/z	Masse-Ladungs-Zahl
N	Norden
n	Stichprobenumfang (Statistik)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
nmol	Nanomol (10 ⁻⁹ mol)
ü. NN	über Normalnull
n. s.	nicht signifikant (Statistik)
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
³ O ₂	Triplett-Sauerstoff
•OH	Hydroxylradikal
O	Osten
OD	optische Dichte
<i>ORN</i>	Ökotyp von <i>A. thaliana</i>

Tabelle A.3.: Abkürzungsverzeichnis, Fortsetzung II.

p	p-Wert (Statistik)
P	Photochemie
PAM	Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer
P680 ⁺	oxidiertes Reaktionszentrum im PS II
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung
Pheo ⁻	reduziertes Phäophytin
PPFD	Photosynthetisch aktive Photonen-Flux-Dichte
Q _A	Quinon A
Q _A ²⁻	2fach reduziertes Quinon A
r ² /R ²	Bestimmtheitsmaße (Statistik)
r _S	Spearman-Korrelationskoeffizient (Statistik)
rel.	relative /-r
s	Sekunde
SEM	Standardfehler vom Mittelwert (Statistik)
SHA	Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
t _R	Retentionszeit
TRI	Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
tt4, tt5, tt7,	Mutanten von <i>A. thaliana</i> (Tabelle 2.1)
Tλ	Transmission für Strahlung der Wellenlänge λ
T(UV /-A / -B)	epidermale UV /-A / -B-Transmission
UV-A /-B /-C	biologisch gewichtete Ultraviolett-A /-B /-C Strahlung
UV-B _{ef}	effektive Ultraviolett-B Strahlung, ef für effektiv
UV-B _{ir}	eingestrahlte Ultraviolett-B Strahlung, ir für irradiated
VE-Wasser	vollentsalztes (demineralisiertes) Wasser
V	Volt
W	Watt / Westen
w/v	Anteiliges Gewicht von Substanz A im Gesamtvolumen
v/v	Anteiliges Volumen von Lösung A am Gesamtvolumen
Xe-PAM	Xenon-Puls-Amplituden-Modulations-Fluorimeter
z.B.	zum Beispiel

Chemikalienliste

Tabelle A.4.: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

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

HPLC-Kalibration

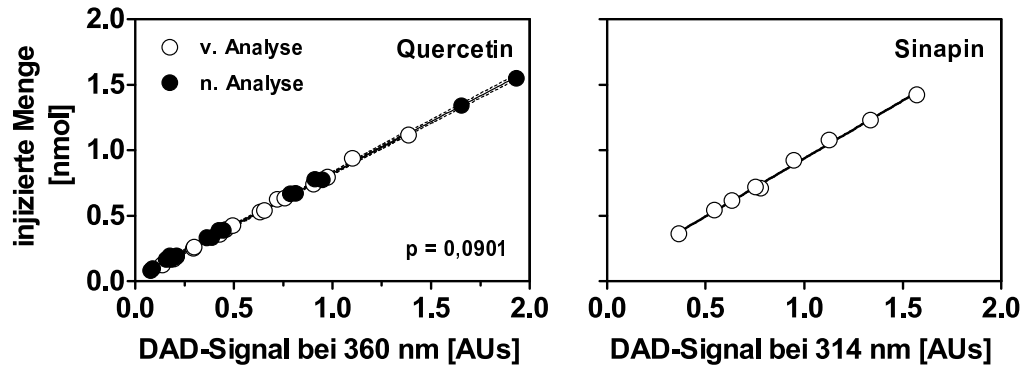


Abbildung A.1.: HPLC-Kalibrationskurven für Sinapin und Quercetin. Zugehörige Funktionsgleichungen und Bestimmtheitsmaße sind Tabelle 2.4 zu entnehmen.

UV-B-induzierte PS II-Schädigungen

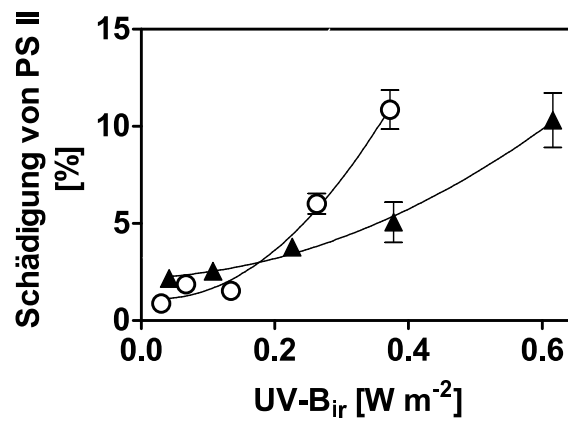


Abbildung A.2.: UV-B-induzierte PS II-Schädigungen kühl (9°C, schwarze Symbole) und warm (21°C, weiße Symbole) akklimatisierter Pflanzen, die bei ihrer jeweiligen Anzuchtstemperatur mit UV-B-behandelt worden waren. $n = 6$, $\pm SEM$.

Epidermale UV-B-Transmissionen

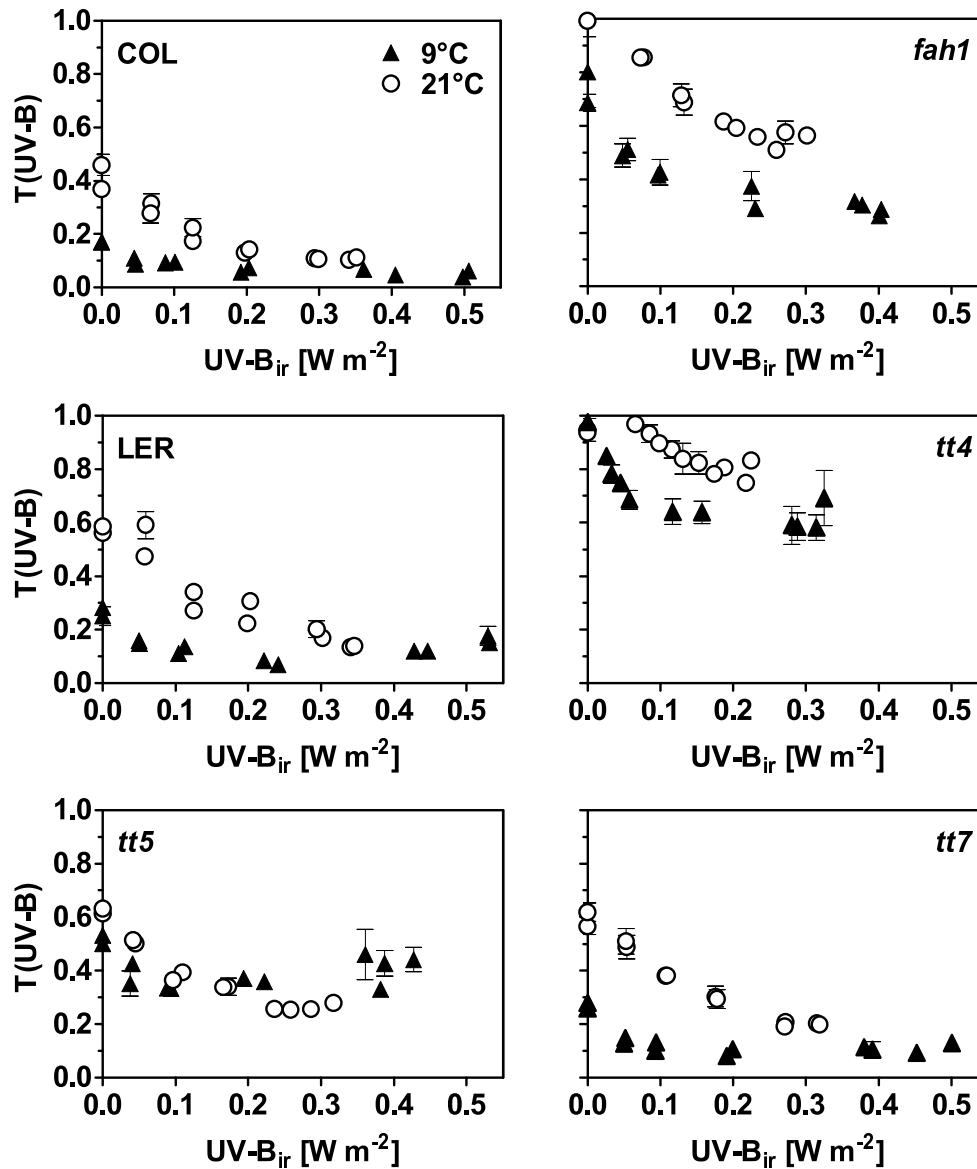


Abbildung A.3.: UV-B-Transmissionen der in Abschnitt 3.3 untersuchten Wildtypen von *A. thaliana* COL und LER sowie der Deletionsmutanten *fah1*, *tt4*, *tt5* und *tt7*. $n = 3$, $\pm \text{SEM}$.

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 entgegen gebracht. Dafür ein großes Dankeschön!

Ebenfalls großen Anteil an dieser Arbeit hatte Frau PROF. DR. K. KRUPINSKA. Als Leiterin des ehemaligen Graduiertenkollegs 820 (GRK 820) hat sie sich stets für uns Stipendiaten eingesetzt und diese Arbeit damit überhaupt erst möglich gemacht. Dafür möchte ich ihr meinen herzlichsten Dank aussprechen.

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 unterstützt 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

07/1997 Abitur am Gymnasium am Treckfahrtstief, Emden

08/1997 bis 07/1998 Zivildienst in den Beschützenden Werkstätten
Ostfriesland, Emden

09/1998 bis 02/2005 Studium der Biologie an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Seit 12/2005 Promotionsstudium am Botanischen Institut
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

12/2005 bis 09/2008 Stipendiat des Graduiertenkollegs 820:
"Natürliche Antioxidantien, ihr Wirkungsspektrum
in Pflanzen, Lebensmitteln, Tier und Mensch"
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen

- Karena Sprick, Matthias Schultze und Wolfgang Bilger (2004): „Contrasting Age Dependence of the Inducibility of Flavonoid Biosynthesis in Leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Hedera canariensis*“, Posterbeitrag, Botanikertagung Braunschweig.
- Matthias Schultze (2004): „Fluoreszenzuntersuchungen am einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 im Vergleich zu anderen photosynthetischen Organismen“, Diplomarbeit, Botanisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Matthias Schultze und Wolfgang Bilger (2007): „Function of UV-B screening pigments at low temperature“, Posterbeitrag, 12th Congress of the European Society for Photobiology, Bath.
- Matthias Schultze und Wolfgang Bilger (2008): „Why do plants form UV-B screening pigments at low temperature?“, Posterbeitrag, 9. AKOE-Tagung in Tharandt, Experimental Ecology.
- Matthias Schultze und Wolfgang Bilger (2009): „Relative contribution of different phenolic compounds to UV screening in *A. thaliana*“, Posterbeitrag und Vortrag, 15th International Congress on Photobiology 2009, Düsseldorf.
- Matthias Schultze, Björn Forberich, Sascha Rexroth, Nina Gwendolyn Dyczmons, Matthias Roegner, Jens Appel (2009): „Localization of cytochrom *b₆f* complexes implies an incomplete respiratory chain in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787: 1479 - 1485
- Matthias Schultze und Wolfgang Bilger (2010): „Relative contribution of different phenolics to UV screening“ Posterbeitrag, 10. AKOE-Tagung in Kiel, Experimental Ecology.
- Ylva Tischler, Matthias Schultze und Wolfgang Bilger (2010): „Protection from UV-B radiation in *A. thaliana* in the field“, Posterbeitrag, 10. AKOE-Tagung in Kiel, Experimental Ecology.

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)