



UNIVERSITÄT HOHENHEIM

Fakultät Agrarwissenschaften

Institut für Tropische Agrarwissenschaften

Fachgebiet für Wasserstress-Management bei Kulturpflanzen in den Tropen und
Subtropen (490g)

Photoprotektive Pigmente bei Weizen (*Triticum aestivum*)

Bachelorarbeit

Jana Beck

Studiengang Agrarwissenschaften

Matrikel-Nr.: 723901

Prüfer: Prof. Dr. Folkard Asch

Eingereicht am: 30.09.21

Kurzfassung

In dieser Arbeit sollte das photoprotektive Pigmentensemble fünf hitzetoleranter Weizenlinien untereinander sowie mit einer lokalen Winterweizensorte dünn-schichtchromatographisch und spektrophotometrisch verglichen werden. Darüber hinaus sollte der Effekt zusätzlicher Beleuchtung und der Einfluss der Position des geernteten Blattes am Trieb der Weizenjungpflanzen untersucht werden, weshalb die jüngsten und die dritten vollentwickelten Blätter gewählt wurden. Zunächst wurden für die dünn-schichtchromatographische Analyse der Pigmente diverse Extraktionsmethoden sowie Material getestet. Die mit der finalen Methode entwickelten Chromatogramme bildeten sechs Pigmente ab, von denen sich vier den photoprotektiven Carotinoiden zuweisen ließen. Diesbezüglich unterschieden sich weder die Linien untereinander, noch diese und die Sorte Apostel. Des Weiteren schien die Beleuchtung und die Blattposition keinerlei Einfluss auf das photoprotektive Pigmentprofil zu haben, was mit der Analyse im Spektralphotometer, bei der das Absorptionsspektrum der Carotinoide bei 400- 500 nm gemessen wurde, bestätigt werden konnte. Unterschiede in Hinblick auf die Komposition ihres Pigmentensembles waren zwischen den Linien, aber besonders zwischen diesen und Apostel vorhanden, die auf genotypische Unterschiede sowie auf eine differenzierte Fähigkeit zur Akklimatisierung an unterschiedliche Lichtverhältnisse verweisen könnten. Ein Lichteffect konnte anhand der Absorptionswerte nur bei den jüngsten vollentwickelten Blättern der Weizenlinien ausgemacht werden, da diese eine positive Korrelation zwischen Beleuchtung und hoher relativer Mengen der photoprotektiven Pigmente aufzeigten. Für die dritten vollentwickelten Blätter beleuchteter Pflanzen konnte dieser aufgrund von Beschattung oder infolge einer veränderten Lichtreaktion der Pflanzen nach einem Standortwechsel vor der Probennahme nicht beobachtet werden. Es wird die Präsenz der drei Xanthophylle Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein sowie die des Carotins β -Carotin suggeriert, die bereits in vorangegangenen Pigmentanalysen bei Weizen gefunden wurden. Zukünftig ließen sich mithilfe quantitativer Ansätze präzisere Aussagen über etwaige Differenzen im Pigmentensemble der hitzetoleranten Weizenlinien und folglich über ihre photoprotektiven Tendenzen unter diversen Umwelteinflüssen treffen.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen	2
1.1.1 Photoprotektive Pigmente	2
1.1.2 Dünnschichtchromatographie	5
1.1.3 Spektrophotometrie	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.2 Methoden	9
2.2.1 Pflanzenanzucht	9
2.2.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmente	11
2.2.3 Spektrophotometrische Analyse	14
2.2.4 Datenaufbereitung	14
3 Ergebnisse	15
3.1 Chromatogramme	15
3.1.1 Vorversuche	15
3.1.2 Finale Ergebnisse	16
3.2 Absorption	23
4 Diskussion	30
4.1 Pigmentensemble	30
4.1.1 Einfluss Beleuchtung und Blattposition	30
4.2 Charakterisierung und Identifizierung der Pigmente	32
4.3 Pigmentanalyseverfahren	34
4.4 Potentielle Fehlerquellen	35
5 Fazit und Ausblick	36
Literaturverzeichnis	V
Anhang	IX
Danksagung	XI
Eigenständigkeitserklärung	XII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der photosynthetischen Antworten des Photosynthese-Apparats auf die Absorption steigender Mengen PFD	3
Abbildung 2: Der VAZ-Zyklus	4
Abbildung 3: Schematischer Ablauf einer Dünnschichtchromatographie	6
Abbildung 4: Anordnung der Töpfe und Tablette der beleuchteten Weizenpflanzen im Gewächshaus	10
Abbildung 5: Verlauf der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus des Instituts von Aussaat bis Ernte.	11
Abbildung 6: Chromatogramm der Probenextrakte 1-12 (Wiederholung 1) des jüngsten vollentwickelten Blattes.....	16
Abbildung 7: Chromatogramm der Probenextrakte 13-24 (Wiederholung 2) des jüngsten vollentwickelten Blattes.....	17
Abbildung 8: Chromatogramm der Probenextrakte 25-36 (Wiederholung 3) des jüngsten vollentwickelten Blattes.....	18
Abbildung 9: Chromatogramm der Probenextrakte 37-48 (Wiederholung 1) des dritten vollentwickelten Blattes.....	19
Abbildung 10: Chromatogramm der Probenextrakte 49-60 (Wiederholung 2) des dritten vollentwickelten Blattes.....	20
Abbildung 11: Chromatogramm der Probenextrakte 61-72 (Wiederholung 3) des dritten vollentwickelten Blattes.....	21
Abbildung 12: Absorptionsspektren der Pigmente unbeleuchteter Pflanzen des jüngsten vollentwickelten Blattes.....	24
Abbildung 13: Absorptionsspektren der Pigmente beleuchteter Pflanzen des jüngsten vollentwickelten Blattes.....	25
Abbildung 14: Absorptionsmaxima der Pigmente beleuchteter und unbeleuchteter Pflanzen des jüngsten vollentwickelten Blattes.....	26
Abbildung 15: Absorptionsspektren der Pigmente unbeleuchteter Pflanzen des dritten vollentwickelten Blattes.....	27
Abbildung 16: Absorptionsspektren der Pigmente beleuchteter Pflanzen des dritten vollentwickelten Blattes.....	28
Abbildung 17: Absorptionsmaxima der Pigmente beleuchteter und unbeleuchteter Pflanzen des dritten vollentwickelten Blattes	29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....	8
Tabelle 2: Liste der untersuchten Weizenlinien des International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)	9
Tabelle 3: Variation des Trägermaterials und des organischen Laufmittels	12
Tabelle 4: Variation der Laufmittelverhältnisse.....	13
Tabelle 5: Retentionsfaktorwerte der Wiederholungen 1-3 des jüngsten vollentwickelten Blattes sowie des dritten vollentwickelten Blattes	22
Tabelle 6: Wellenlängenposition der Absorptionsmaxima ($\lambda_{\max}$ [nm]) der untersuchten Carotinoide in Ethanol	23

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
Ø	Durchmesser
$^1\text{Chl}^*$	Angeregtes Singulett-Chlorophyll
$^1\text{O}_2^*$	Angeregtes Singulett-Sauerstoff
$^3\text{Chl}^*$	Angeregtes Triplett-Chlorophyll
cm	Zentimeter
DC	Dünnschichtchromatographie
h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
NPQ	Non-photochemisches Quenching
PFD	Photonenflussdichte
Rf	Retentionsfaktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
μ	Mikro
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

Die Nutzbarmachung von Lichtenergie in Form von Photosynthese ist essentiell für das Überleben pflanzlicher Organismen. Der Energietransfer findet über die in den Antennenkomplexen der Photosysteme eingelagerten Pigmente statt. Diese absorbieren Licht verschiedener Wellenlängen, vorrangig die des sichtbaren Lichts, und werden dabei durch Übernahme der Photonenenergie angeregt. Es kommt zu einer Elektronentransportkette, die wiederum diverse Prozesse in Gang setzt. Neben ihrer lichtsammelnden Funktion übernehmen die Pigmente allerdings auch photoprotektive Aufgaben, indem sie den photosynthetischen Apparat vor Überlastung schützen. Bedingt wird diese durch einen Überfluss an absorbierter Lichtenergie, der den Sättigungspunkt der Photosynthese übersteigt, sowie durch abiotische Stressfaktoren, die die Effizienz photosynthetischer Energiekonversion der Pflanze limitieren (Demmig-Adams, 1990; Demmig-Adams und Adams, 1992b).

Schon jetzt sind Pflanzen durch die Auswirkungen klimatischer Veränderungen und Extreme zusätzlichen Stressoren ausgesetzt. Weizen steht global gesehen bezüglich beanspruchter Landfläche auf Platz eins der kommerziellen Nutzpflanzen (FAOSTAT, 2014). Da in den nächsten 30 Jahren zusätzlich ein Bedarfsanstieg von 50% prognostiziert wird (CIMMYT, 2021), zielen züchterische Ambitionen auf klimaresiliente Eigenschaften ab, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Toleranz gegenüber Hitze und Trockenheit gelegt wird. Im Hinblick darauf stellt sich die Frage, ob sich tolerante Pflanzen in ihrem Angebot an Pigmenten, die an einer photoprotektiven Antwort auf stressinduzierende und dynamische Umweltbedingungen beteiligt sind, von weniger gut angepassten Pflanzen unterscheiden. Infolgedessen besteht das Ziel dieser Arbeit darin die Pigmentprofile hitzetoleranter Weizenlinien zu untersuchen. Diese sollen untereinander und mit einer lokalen Sorte unter qualitativen Gesichtspunkten dünnschichtchromatographisch und spektrophotometrisch verglichen werden. Darüber hinaus soll die Auswirkung von zusätzlicher Beleuchtung und der Einfluss der Blattposition auf das Pigmentensemble untersucht werden.

1.1 Grundlagen

1.1.1 Photoprotektive Pigmente

Höhere Pflanzen besitzen eine Reihe von Möglichkeiten sich vor exzessiver Lichtenergie – beispielsweise bedingt durch eine erhöhte Photonflussdichte (PFD, *photon flux density*) im Verhältnis zur Photosynthese - zu schützen. Die Bewegung photosynthetischer Organe wie Blätter oder Chloroplasten beugen der Absorption vor (Powles und Björkman, 1981). Bei bereits erfolgter Absorption von Lichtenergie, ohne die Fähigkeit diese wegen Sättigung oder stressbedingter Ineffizienz umzusetzen, verhindern diverse photoprotektive Mechanismen innerhalb des Photosyntheseapparats die potentielle Schädigung desselben (siehe Abb. 1) (Demmig-Adams und Adams, 1992b). In den Chloroplasten befinden sich einige oxidationshemmende Systeme, die in der Lage sind bei Lichtstress gebildete freie Radikale sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) zu deaktivieren und somit einer Schädigung der Pflanze durch Photooxidation vorzubeugen. Zu den Antioxidantien zählen Enzyme, phenolische Komponenten oder Pigmente wie die Carotinoide (Demmig-Adams, 1990). Diese deaktivieren nicht nur bereits gebildete Sauerstoffradikale wie das angeregte Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$, *singlet oxygen*), sondern verhindern auch deren Formierung durch Deaktivierung des angeregten Triplett-Chlorophylls ($^3\text{Chl}^*$) (Siefermann-Harms, 1987; Young, 1991). Neben den Chlorophyllen gehören die Carotinoide zu den Pigmenten der photosynthetischen Membranen. Sie absorbieren ebenso wie das Chlorophyll b als sogenannte akzessorische Pigmente zusätzliche Wellenlängen und erweitern das Spektrum auf den blaugrünen Bereich (Siefermann-Harms, 1987). Ihre Hauptaufgabe liegt jedoch in der Photoprotektion des Photosyntheseapparates.

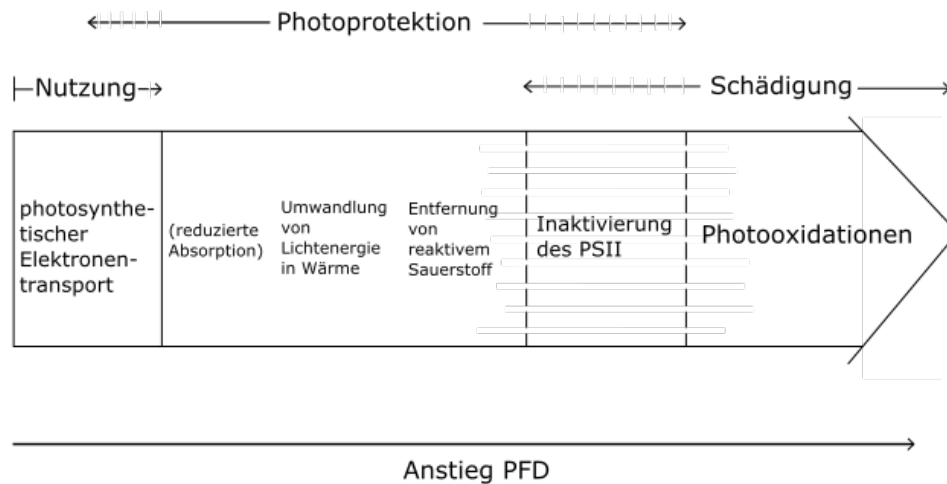


Abbildung 1: Schematische Darstellung der photosynthetischen Antworten des Photosynthese-Apparats auf die Absorption steigender Mengen PFD. Dazu zählen die Nutzung der Lichtenergie über Photosynthese, diverse Photoprotektionsmechanismen und potentieller Schaden. Sich überlappende Bereiche repräsentieren solche für die die Interpretation der Antwort des Photosynthese-Apparats als kontrovers gilt oder für die die Antwort sowohl als Nutzung als auch als Photoprotektion beziehungsweise als Photoprotektion oder Schaden angesehen werden könnte. PSII, Photosystem II; PFD, *photon flux density* (Photonenflussdichte) (Adaptiert nach Demmig-Adams und Adams, 1992b).

Die photoprotektiven Carotinoide unterteilen sich in Carotine und Xanthophylle. Letztere sind oxidierte Carotine, besitzen also neben Kohlenwasserstoffen auch Sauerstoffgruppen. Während das β -Carotin im Reaktionszentrum des Photosystems II (PS II) als Antioxidans für die Deaktivierung des $^1\text{O}_2^*$ zuständig ist (Dall'Osto *et al*, 2007), agieren die Xanthophylle in den lichtammelnden pigmentbindenden Antennenproteinen des PS II (Mozzo *et al*, 2008). Der VAZ-Zyklus ist am non-photochemischen Quenching (NPQ) beteiligt. Bei diesem pH-abhängigen Prozess wird überschüssige Lichtenergie thermisch dissipiert und bereits das angeregte Singulett-Chlorophyll ($^1\text{Chl}^*$) deaktiviert (Demmig-Adams und Adams, 1996). Das Xanthophyll Violaxanthin de-epoxidiert, unter Verbrauch der Lichtenergie und zusätzlichem NADPH, über die Zwischenform Antheraxanthin zu Zeaxanthin (siehe Abb. 2), die beide über dissipative Fähigkeiten verfügen (Demmig-Adams und Adams, 1992b; Pfündel und Bilger, 1994; Horton *et al*, 1996; Gilmore, 1997). Im taxonomisch eingegrenzten Luteinepoxid-Zyklus (García-Plazaola *et al*, 2007; Esteban *et al*, 2009) wandelt sich das epoxidierte Lutein in das de-epoxidierte Lutein um. Letzteres übernimmt neben seiner stabilisierenden Funktion in Antennenkomplexen dort auch das photoprotektive Quenchen

von $^3\text{Chl}^*$ und gilt als das abundanteste unter den Xanthophyllen höherer Pflanzen (Jahns und Holzwarth, 2012).

In beiden Zyklen sind die epoxidierten Stadien der Xanthophyllide Violaxanthin und Luteinepoxid bei schlechten Lichtverhältnissen oder Dunkelheit für lichtsammelnde Aufgaben verantwortlich, während die de-epoxidierten Stadien Zeaxanthin, Antheraxanthin und Lutein für das Dissipieren übermäßiger Energie bei hohem Lichtangebot zuständig sind. Infolgedessen sind die Xanthophyllide an der kurz- sowie langfristigen Akklimatisierung von Pflanzen an variierende Lichtverhältnisse beteiligt (Demmig-Adams und Adams, 1992b; Jahns und Holzwarth, 2012).

Das Xanthophyll Neoxanthin ist kein Teil des non-photochemischen Quenchens der Xanthophyll-Zyklen, doch wird ihm eine direkte photoprotektive Rolle durch seine antioxidativen Fähigkeiten zugewiesen und darüber hinaus seine indirekte Rolle beim Energietransfer zwischen anderen photosynthetischen Pigmenten sowie bei der Stabilisierung der Antennenkomplexe suggeriert (Giossi *et al*, 2020).

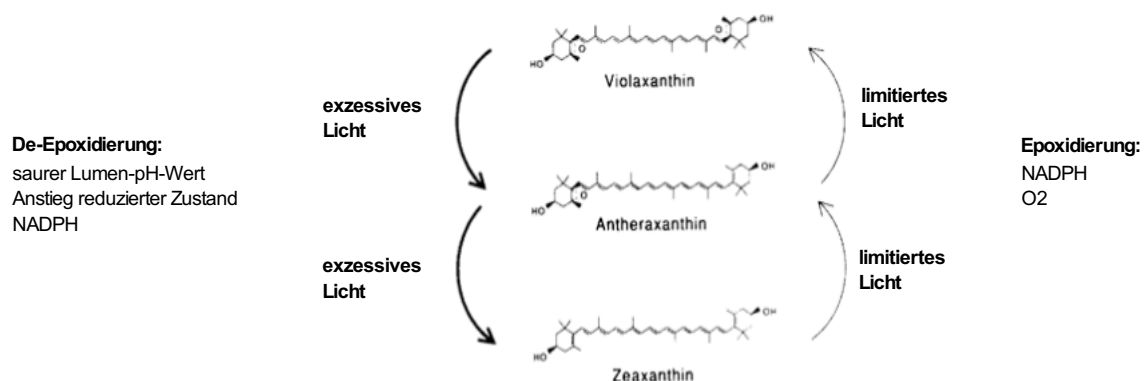


Abbildung 2: Der VAZ-Zyklus. Dargestellt sind die De-Epoxidierung von Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin sowie die Epoxidierung von Zeaxanthin über Antheraxanthin zu Violaxanthin (Adaptiert nach Demmig-Adams, 1990).

Anthocyane gehören nicht zu den Pigmenten der photosynthetischen Membranen. Doch durch die Absorption von ultravioletter (UV) Strahlung und ihre Eigenschaft als Antioxidantien schützen auch sie die Pflanze vor Photodestruktion und lassen sich daher zu den photoprotektiven Pigmenten zählen (Agati *et al*, 2021; Zheng *et al*, 2020).

Die bisher bei Weizen detektierten photoprotektiven Pigmente umfassen β -Carotin, Lutein, Neoxanthin sowie die Xanthophyllide des VAZ-Zyklus. Durch stressinduzierende Bedingungen wie Dehydration bei Hartweizen (*Triticum durum*) (Loggini *et al*, 1999; Tambussi *et al*, 2002)

und hohe Lichtintensitäten bei Weichweizen (*Triticum aestivum*) (Behera und Choudhury, 2001; Behera und Choudhury, 2002) konnte ein Anstieg des Anteils photoprotektiver Pigmente im Pigmentprofil des Weizens in Relation zu den lichtsammelnden Chlorophyllen a und b infolge der reduzierten Photosyntheseraten und der Ansammlung von Lichtenergie nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist besonders ein Anstieg der de-epoxidierten Xanthophylle A und Z bei voranschreitender Seneszenz der Weizenblätter (Lu et al, 2001; Lu et al 2003) oder in stresssensitiven Pflanzen (Loggini et al, 1999) zu verzeichnen. Auch die kurzfristige oder diurnale Variation des Lichtangebots bedingt Veränderungen in der Pigmentkomposition der Weizenpflanze, ohne dass weitere Stressoren auf die Pflanze wirken (Lu et al, 2001; Demmig-Adams und Adams, 1992b).

1.1.2 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein analytisches Adsorptionsverfahren. Die Trennung von Substanzen erfolgt durch den Transport der mobilen Phase, dem Lauf- oder Elutionsmittel, durch die stationäre Phase, das Adsorbens.

Auch Pigmente lassen sich mithilfe der DC auftrennen, da sie bedingt durch unterschiedliche funktionelle Gruppen in der Molekülstruktur verschieden mit organischen Laufmitteln interagieren. Bei der Wahl der mobilen Phase ist die Elutionswirkung der individuellen Komponenten organischer Lösemittelgemische zu beachten. Ein primär unpolares Laufmittel wäre in der Lage lipophile und ebenfalls unpolare Stoffe wie Chlorophylle und Carotine zu lösen (Kleinig, 1977). Im Falle der DC würde dies bedeuten, dass diese Pigmente eine hohe Fließgeschwindigkeit aufweisen würden. Da die Xanthophylle im Gegensatz zu den Carotininen auch polare Sauerstoffgruppen besitzen, würden sie infolge ihrer Polarität kaum von dem unpolaren Laufmittel getragen werden.

Anthocyane sind im Gegensatz zu den hydrophoben Carotinoiden, die sich mit organischen Lösemitteln und schlecht in Wasser lösen lassen (Popova, 2017), hydrophile Moleküle (Filip et al, 2012).

Der Ablauf einer DC ist wie folgt (Abb. 2). Nach der Extraktion der zu untersuchenden Substanzen werden diese als Lösung mittels einer Pipette oder Glaskapillare auf eine DC-Platte aufgetragen. Das gewählte Laufmittel wird in gewünschter Konzentration und Menge, welche von der Größe der DC-Entwicklungskammer sowie von der Höhe der eingezeichneten oder vorgegebenen Startlinie der Platte abhängt, hergestellt. Das Laufmittel sollte sich in der Kammer noch unterhalb der Startlinie befinden. Sobald die Platte in die Entwicklungskammer

transferiert wird, wird diese verschlossen und möglichst abgedunkelt oder im Dunkeln aufbewahrt (Kleinig, 1977). Licht kann ebenso wie Hitze, Säure oder inadäquate Lagerung die Degradierung der Pigmente vorantreiben (Fernández-Marín *et al*, 2018). Nach Entnahme der Platte werden zügig Laufmittelfront sowie die Lage der Substanzflecken markiert. Diese werden zur Ermittlung des Rf-Wertes (*ratio of fronts*) benötigt. Er ergibt sich aus den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Substanzen während des DC-Laufs:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

wobei

Rf: Retentionsfaktor

a: Wanderstrecke der Substanz

b: Wanderstrecke des Laufmittels.

Der Rf-Wert ist ein weiteres Mittel zur Identifizierung einer Substanz.

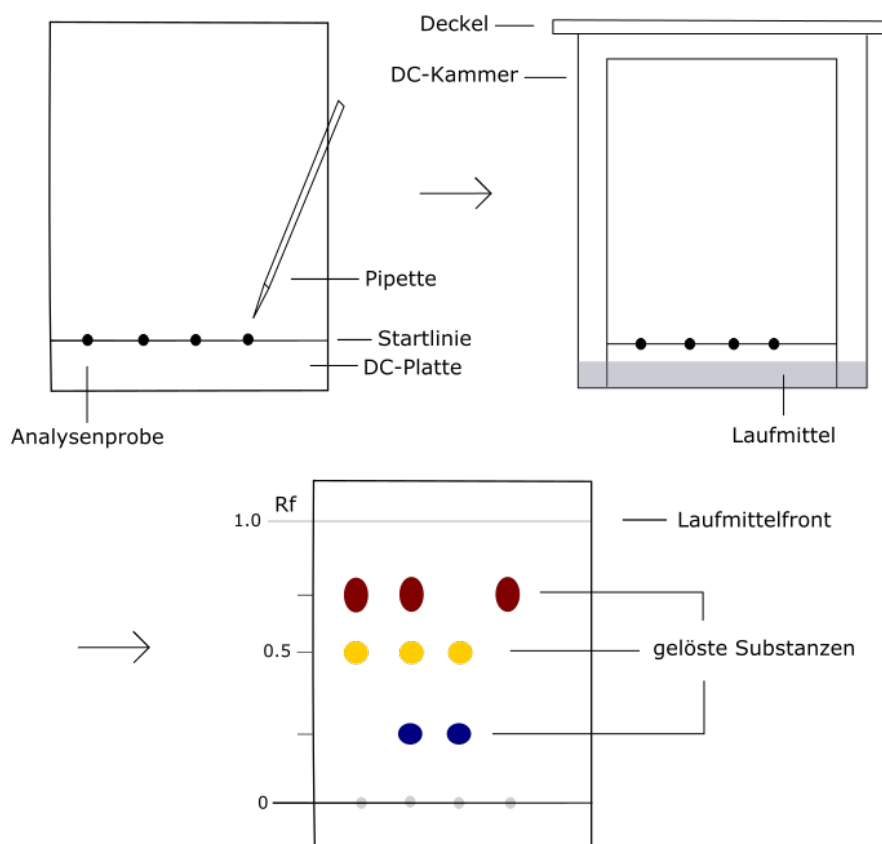


Abbildung 3: Schematischer Ablauf einer Dünnschichtchromatographie.

1.1.3 Spektrophotometrie

Analog zur Charakterisierung und Identifizierung über chemische Eigenschaften, die auf einem Chromatogramm deutlich werden, ermöglichen auch spektrale Eigenschaften Aussagen über die Identität der Pigmente. Mithilfe eines Spektralphotometers wird die Absorption dieser in einem festgelegten Wellenlängenbereich gemessen. Zu den individuellen spektralen Eigenschaften von Pigmenten zählen die Wellenlängenposition der Absorptionsmaxima ($\lambda_{\max}$ [nm]) sowie die Form des Spektrums (Rodríguez-Amaya und Kimura, 2004).

Carotinoide absorbieren im blaugrünen Bereich des sichtbaren Lichts zwischen 400 und 500 nm (Lichtenthaler, 1987; Young, 1991). Daher nimmt ihre eigene Farbausprägung die der zum absorbierten Farbbereich komplementären Farbe Gelb an.

Anthocyane absorbieren im ultravioletten Spektrum bei 260-280 nm sowie im sichtbaren Bereich bei 490-550 nm. Ihre Farbausprägung umfasst Rot, Orange, Violett und Blau.

Die Lage des Absorptionsmaximums ist abhängig vom verwendeten Lösemittel (Lichtenthaler, 1987), das Maximum der Anthocyane außerdem vom pH-Wert der Umgebung (Filip *et al*, 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die Ausführung dieser Arbeit wurden Chemikalien des Herstellers Carl Roth (Deutschland) sowie des Herstellers VWR (Deutschland) verwendet. Die genutzten Geräte sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller	Sitz
Feinwaage	Quintix	Sartorius	Deutschland
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus	Deutschland
Pflanzenbeleuchtung	SON-T AGRO 400W	Philips	Niederlande
Spektralphotometer	Infinite M200 Pro	Tecan	Österreich
Homogenisierer	FastPrep 24	MP Biomedicals	Deutschland

Das Saatgut der verwendeten Weizenlinien wurde vom International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT, Mexiko) zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 2). Da die Bezeichnungen der Linien sehr lang sind, werden sie in dieser Arbeit zur Vereinfachung mit ihrer Parzellennummer benannt. Die verwendeten Linien zeichnen sich durch Hitzetoleranz aus. Weitere Charakteristiken sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Linien waren zum Zeitpunkt der Saatgutauswahl nicht bekannt. Zusätzlich wurde die Weizensorte Apostel (Meiereihof, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland) als *local check* und somit als Kontrolle verwendet. Dabei handelt es sich um eine Winterweizensorte.

Tabelle 2: Liste der untersuchten Weizenlinien des International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Angegeben sind die vollständige Bezeichnung sowie die zugehörigen Parzellennummern der Linien.

Parzellennummer	Bezeichnung
9402	KS940935.7.1.2/2*PASTOR/4/FRAME/ /MILAN/KAUZ/3/PASTOR/5/D67.2/PARANA 66.270//AE.SQUARROSA(320)/3/CUNNINGHAM/4/VORB
9409	MTRWA92.161/PRINIA/5/SERI/*3/ /RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92/6/W15.92/4/PASTOR//HXL7573/2*BAU/ 3/WBLL1
9410	CROC_1/AE.SQUARROSA (333)/ /2*KUTZ
9414	SOKOLL/WBLL1/5/D67.2/PARANA 66.270/ /AE.SQUARROSA(320)/3/CUNNINGHAM/4/VORB
9432	BAJ #1

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht des Weizens fand im Gewächshaus des Fachgebiets für Wasserstress-Management bei Kulturpflanzen in den Tropen und Subtropen des Hans-Ruthenberg-Instituts für Tropische Agrarwissenschaften statt.

Bei der Aussaat (09.06.21) wurden pro Topf fünf Saatkörner gesät, um genug Pflanzenmaterial für die späteren Probennahmen sicherzustellen. Sandiger Lehm diente als Substrat, die Saattiefe betrug 3 cm. Zur Untersuchung des Einflusses zusätzlicher Beleuchtung auf die Pigmentprofile wurden je Linie und Sorte drei Töpfe mit zwei nebeneinander hängenden Natriumdampflampen beleuchtet und drei Töpfe im nicht beleuchteten Teil des Gewächshauses platziert. Die beleuchteten sowie die unbeleuchteten Töpfe wurden jeweils auf zwei große Untersetzer aufgeteilt, die der kollektiven Bewässerung dienten (Abb. 4). Um die gleichen Bedingungen im Gewächshaus zu gewährleisten, standen beide Tablette derselben Lichtbehandlung dicht nebeneinander. Die Töpfe wurden randomisiert auf die beiden Untersetzer verteilt.



Abbildung 4: Anordnung der Töpfe und Tablette der beleuchteten Weizenpflanzen im Gewächshaus.

Die Beleuchtungsdauer der Lampen betrug bis zu ihrem Abschalten nach 16 Tagen täglich 12h. Aufgrund der hohen Temperaturen im Gewächshaus (Abb. 5) wurde die Beleuchtung für 7 Tage unterbrochen. In einem zweiten Ansatz (23.06) wurden pro Linie und für die lokale Sorte zusätzlich 10 Saatkörner auf befeuchtetem Papier in einem Gefäß in der Klimakammer des Instituts zur Keimung gebracht. Diese wurden nach zwei Tagen in die bereits vorhandenen Töpfe im Gewächshaus eingesetzt. Nach Etablierung der Keimlinge wurde die Beleuchtung wieder eingeschaltet.

Nach 36 Tagen (15.07.21) konnten die Weizenblätter geerntet werden. Mittlerweile waren genug Pflanzen vorhanden, um eine Messwiederholung von $n=3$ für jede Linie und Sorte beider Lichtbehandlungen durchzuführen. Um den Einfluss der Blattposition zu untersuchen, wurden am ersten Tag der Probennahme die jüngsten vollentwickelten Blätter (Blattöhrchen erkennbar) beprobt, am darauffolgenden Tag das dritte vollentwickelte Blatt (beginnend mit dem jüngsten vollentwickelten Blatt von der Triebspitze aus gezählt). Zwischen beiden Probennahmen befanden sich die Pflanzen im Labor des Instituts statt im Gewächshaus. Folglich waren die zuvor beleuchteten Pflanzen keinem zusätzlichen Lampenlicht mehr ausgesetzt bevor ihre Blätter untersucht wurden.

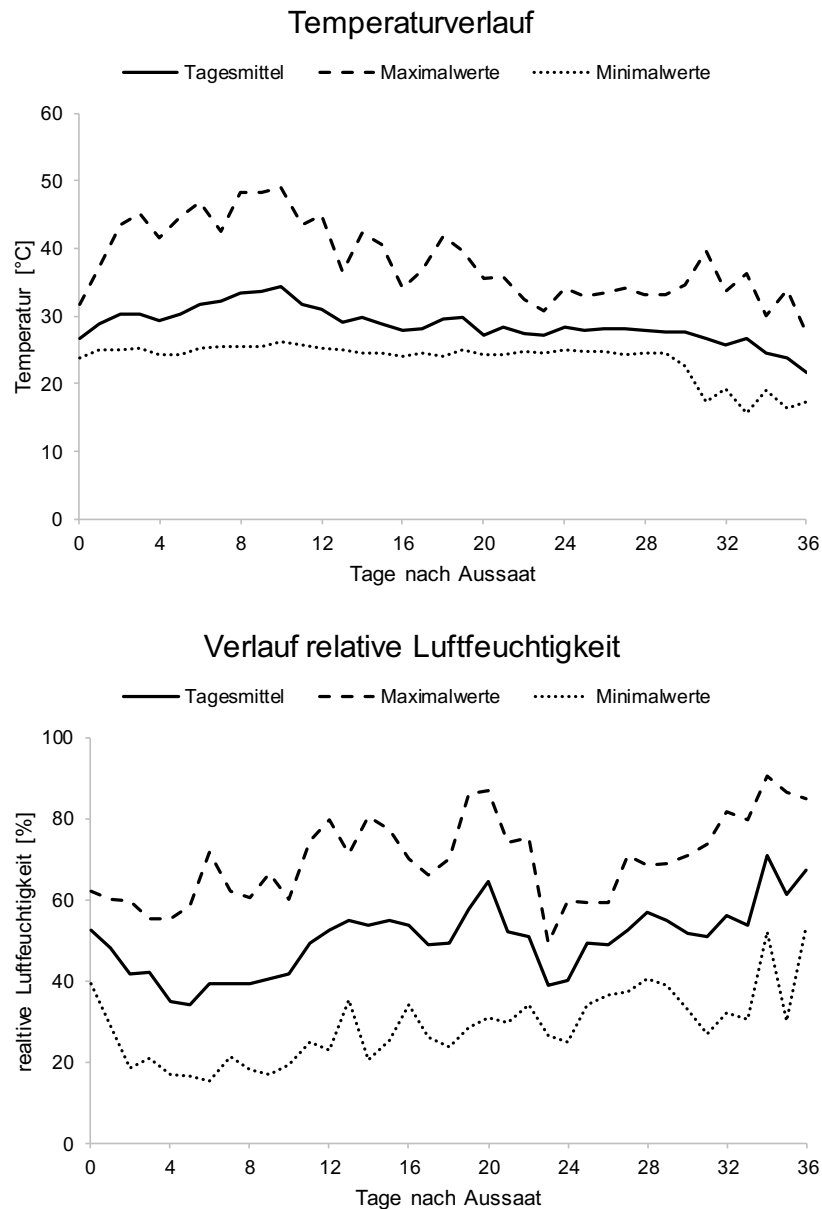


Abbildung 5: Verlauf der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus des Instituts von Aussaat bis Ernte. Angegeben sind mittlere Tageswerte, Tagesmaxima und Tagesminima.

2.2.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmente

Die photoprotektiven Pigmente wurden mithilfe von Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Dafür wurden während der Wachstumsphase der Weizenkeimlinge zunächst diverse Extraktionsmethoden sowie unterschiedliche organische Laufmittel und deren Verhältnisse erprobt.

Vorversuche

Für die Vorversuche wurde Blattmaterial von Süßkartoffel (beleuchtet und unbeleuchtet angezogen), Mais, Kaffee und Sorghum aus einem anderen Versuch genutzt, da zu der Zeit noch kein Weizenmaterial zur Verfügung stand. Zur Extraktion der Pigmente wurden 2 Methoden getestet: (1) Mörsern des Blattmaterials mit etwa 1 ml 100%igem Aceton und einer Spatelspitze Seesand (mit Säure gereinigt, Macherey-Nagel, Deutschland) und (2) Homogenisation mit dem FastPrep24, mit 200 µl Aceton und sechs Ø 2,8 mm und ca. 0,2 g Ø 1,4 mm Keramikugeln (VWR, Deutschland). Da Aceton sehr leicht flüchtig ist, mussten bei (1) ab und an geringe Mengen Aceton zugegeben werden, da die Blattmasse sonst eintrocknete. Es wurden 3 verschiedene Trägermaterialien auf Dünnschichtchromatographieplatten (Macherey-Nagel, Deutschland), zwei Plattengrößen und 5 Laufmittelzusammensetzungen getestet. Außerdem wurden diese in verschiedenen Konzentrationen mit den Platten getestet. Die geprüften Kombinationen aus Laufmittel und Platte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Ein Überblick der Laufmittelverhältnisse liefert Tabelle 4.

Tabelle 3: Variation des Trägermaterials und des organischen Laufmittels.

Trägermaterial (DC-Platte)	Laufmittel
Cellulose auf Alu klein (40 x 80 mm)	Petrolether - Aceton
Kieselgel auf Alu klein (40 x 80 mm)	Petrolether - Aceton
	Diethylether-Toluol-Isopropanol
	Chloroform - Aceton
	Ethanol - Aceton - Wasser
	Isopropanol - Petrolether - Wasser
Kieselgel auf Polyester klein (40 x 80 mm)	Diethylether-Toluol-Isopropanol
	Chloroform - Aceton
	Ethanol - Aceton - Wasser
Kieselgel auf Alu groß (20 x 20 cm)	Diethylether-Toluol-Isopropanol
	Isopropanol - Petrolether - Wasser

Tabelle 4: Variation der Laufmittelverhältnisse.

Laufmittel	Verhältnis
Petrolether - Aceton	70:30
Diethylether-Toluol-Isopropanol	90:10:4
	80:10:14
	80:20:4
	70:30:4
Chloroform - Aceton	80:25
Ethanol - Aceton - Wasser	30:20:1
Isopropanol - Petrolether - Wasser	100:10:0,25
	90:20:0,35
	90:10:1,25
	110:10:0,25

Finale Methode

Die geernteten Blätter der Weizenpflanzen wurden ohne einen weiteren Lagerungsschritt zerkleinert und auf der Feinwaage 0,0032g in Mikroreaktionsgefäße abgewogen. Zur Probe wurden 200 µl 100%iger Aceton pipettiert und mit sechs Ø 2,8 mm und ca. 0,2 g Ø 1,4 mm Keramikkugeln im FastPrep 24 für 1 min bei 6,5 rpm homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde anschließend fünf Minuten bei 2000 rpm und einer Raumtemperatur von 20°C zentrifugiert. Die Proben wurden aus dem Überstand pipettiert.

Das in dieser Arbeit verwendete Laufmittel Diethylether-Toluol-Isopropanol wurde im Verhältnis 80:20:4 gemischt und eine Menge von 10 ml für drei Wiederholungen hergestellt. Auf einer 20 x 20 cm DC-Kieselgelplatte wurde 2 cm vom unteren Ende aus eine horizontale Bleistiftlinie gezogen, die den Startpunkt der Wanderungsstrecke der Pigmente darstellte. Die Platte wurde außerdem in 12 gleich große Bereiche für die ersten 12 zu untersuchenden Proben unterteilt. Vom Überstand des zentrifugierten Extraktes wurde 15 µl in 1 µl Schritten punktförmig auf die DC-Platte aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein möglichst kleiner, konzentrierter Punkt entsteht. Die Platte wurde im Anschluss in die DC-Entwicklungskammer (Carl Roth, Deutschland) gestellt, mit dem Deckel verschlossen und sofort mit einem passenden Karton bedeckt, um die Pigmente vor Licht zu schützen. Nach 22 Minuten wurde die Platte der Kammer entnommen, im Abzug kurz angetrocknet und gekennzeichnet wo sich 1) Laufmittelfront und 2) die einzelnen Pigmentbanden befinden. Da sich das Laufmittel schnell verflüchtigte, war es wichtig die Kammer während des Laufs gut zu verschließen sowie die noch erkennbare Front beim Herausnehmen der Platte direkt zu

markieren. Die Kennzeichnung von dieser Laufmittelfront sowie der Position der Pigmente diente der Ermittlung des Retentionsfaktors (siehe Kapitel 1.1.2).

Es wurden pro Blattposition drei Chromatogramme à drei Wiederholungen entwickelt. Für jede Blattposition wurden unbeleuchtet sowie beleuchtet aufgezogene Pflanzen aller Linien sowie der Sorte Apostel gemessen.

2.2.3 Spektrophotometrische Analyse

Mit Hilfe eines Skalpell wurden alle Pigmentbanden des Chromatogramms außer die gut zu erkennenden grünen Chlorophylle separat abgeschabt und auf einmal gefaltetem Papier aufgefangen, um das erhaltene Pulver besser abfüllen zu können. Dieses wurde in einem Mikroreaktionsgefäß mit 300 µl Ethanol versetzt, kurz geschüttelt und 5 min bei 2000 rpm und 20°C Raumtemperatur zentrifugiert. 200 µl der Lösung wurde anschließend in eine Mikroplatte (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, USA) pipettiert. Für einen Analysedurchgang wurden 1 ½ Mikroplatten verbraucht, da jedes Chromatogramm 48 Pigmente von Interesse aufwies (Abb. 5-10). Im Spektralphotometer wurde das Absorptionsspektrum der Pigmentlösungen zunächst in 1er-Schritten im Bereich von 300 bis 1000 nm gemessen. Allerdings wurde der Bereich nach der 1. Messung auf 400 bis 500 nm (Abb. 11-14) angepasst, da dieser dem charakteristischen Absorptionsbereich der photoprotektiven Carotinoide entspricht (siehe 1.1.3) und die Messungen so weniger Zeit in Anspruch nahmen.

2.2.4 Datenaufbereitung

Alle Daten wurden zunächst in Microsoft Excel (Version 16.13.1) sortiert und aufbereitet. Mittels eines Welch-Tests und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurden die spektrophotometrischen Daten statistisch ausgewertet.

Die Abbildungen dieser Arbeit wurden mithilfe von Microsoft Excel (Version 16.13.1) sowie Inkscape (Version 1.1.0) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Chromatogramme

3.1.1 Vorversuche

Das erste erprobte Laufmittel Petrolether-Aceton (Verhältnis 70:30) lieferte sowohl auf der Cellulose-Platte sowie auf der kleineren Kieselgel-Alu-Platte nur sehr schwache Ergebnisse. Auf der Cellulose-Platte war es zudem nicht möglich eine Startlinie mit Bleistift zu zeichnen. Das zweite geprüfte Laufmittel Diethylether-Toluol-Isopropanol (Verhältnis 90:10:4) lieferte sehr gute Ergebnisse. Die Pigmente trennten sich klar auf und setzten sich voneinander ab. Lediglich auf der Kieselgel-Polyester-Platte kam es zu keiner klaren Trennung.

Die darauffolgenden geprüften Laufmittel Chloroform-Aceton (Verhältnis 80:25) und Aceton-Ethanol-Wasser (Verhältnis 30:20:1), die jeweils noch auf Kieselgel-Alu- und Kieselgel-Polyester-Platten getestet wurden, erzeugten keine Pigmentbahnen, sondern Schlieren. Zudem bildeten die Chromatogramme, die mithilfe dieser beiden Laufmittel entwickelt wurden, keine Carotinoide ab.

Das letzte geprüfte Laufmittel Petrolether-Isopropanol-Wasser (Verhältnis 100:10:0,25) trennte in der Oberphase besonders gut Chlorophylle von Carotinoiden ab.

Das Laufmittel Diethylether-Toluol-Isopropanol zeigte nach der Variation des Verhältnisses 90:10:4 zu 80:10:4 sowie 70:30:4 keine brauchbaren Ergebnisse. Im Verhältnis 80:20:4 trennte das Laufmittel jedoch die Carotinoide in der Unterphase auf. Das zweite favorisierte Laufmittel Petrolether-Isopropanol-Wasser zeigte im Verhältnis 110:10:0,25 - im Gegensatz zu 100:10:0,25, 90:20:0,35 und 90:10:1,25 - die deutlichste Auftrennung der im Extrakt erhaltenen Pigmente. Auf den größeren DC-Platten mit den Maßen 20 x 20 cm lieferte das Laufmittel Petrolether-Isopropanol-Wasser jedoch auch in diesem Verhältnis ein schlechteres Resultat als Diethylether-Toluol-Isopropanol im Verhältnis 80:20:4, da sich die einzelnen Pigmente nicht deutlich genug voneinander absetzten.

3.1.2 Finale Ergebnisse

Das genutzte Laufmittel Diethylether-Toluol-Isopropanol im Verhältnis 80:20:4 hatte alle Probenextrakte, die auf die DC-Platte pipettiert wurden, gleichmäßig auftrennen können.

Das erste Chromatogramm der jüngsten vollentwickelten Blätter (Wiederholung 1) bildete insgesamt 72 Pigmente ab (Abb. 6). 24 Pigmente davon waren durch ihre grüne sowie blaugrüne Färbung und ihrer Position auf dem Chromatogramm als Chlorophylle zu erkennen. Die restlichen Pigmente ordneten sich durch ihre gelbe Färbung den Carotinoiden zu. Das oberste Carotinoid wurde direkt von der Laufmittelfront getragen und befand sich deshalb nach Ablauf der Entwicklungszeit der Platte an gleicher Stelle. Während das darunterliegende Carotinoid noch deutlich erkennbar war, waren die beiden am nächsten an der Startlinie liegenden Carotinoide stark verblasst. Die Pigmentbahnen der Probenextrakte 1-12 befanden sich jeweils auf derselben Höhe.

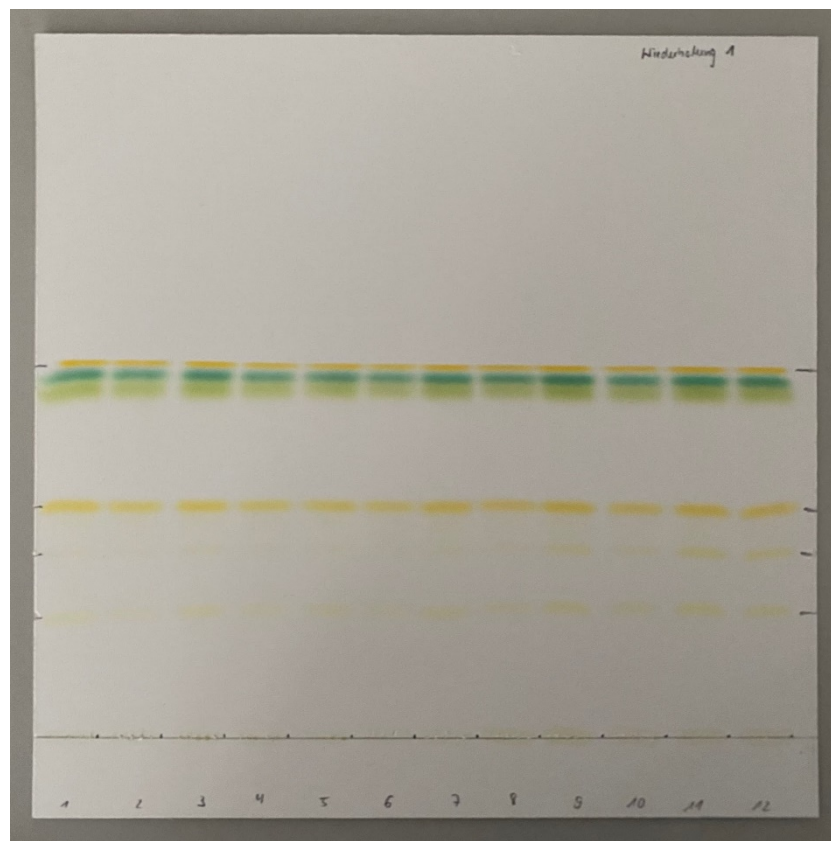


Abbildung 6: Chromatogramm der Probenextrakte 1-12 (Wiederholung 1) des jüngsten vollentwickelten Blattes. Von links nach rechts 1 Apostel-unbeleuchtet 2 9409-unbeleuchtet 3 9402-unbeleuchtet 4 9414-unbeleuchtet 5 9410-unbeleuchtet 6 9432-unbeleuchtet 7 Apostel-beleuchtet 8 9409-beleuchtet 9 9402-beleuchtet 10 9414-beleuchtet 11 9410-beleuchtet 12 9432-beleuchtet.

Auch das zweite Chromatogramm der jüngsten vollentwickelten Blätter (Wiederholung 2) bildete die gleiche Anzahl aufgetrennter Pigment ab (Abb. 7). Es ließen sich zur Wiederholung 1 keine optischen Unterschiede feststellen. Erneut waren die Chlorophylle und die beiden oberen Carotinoide deutlich erkennbar. Die zwei unteren Carotinoide waren jedoch verblasst. Auch auf diesem Chromatogramm befanden sich die Pigmentbahnen der Probenextrakte (hier 13-24) jeweils auf derselben Höhe.

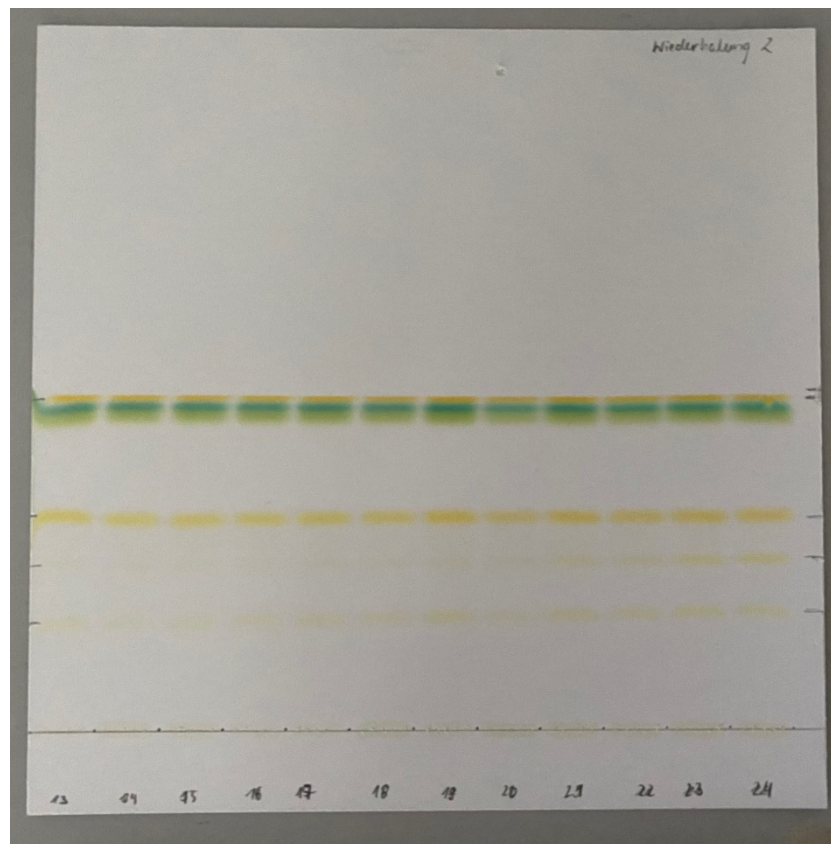


Abbildung 7: Chromatogramm der Probenextrakte 13-24 (Wiederholung 2) des jüngsten vollentwickelten Blattes. Von links nach rechts **13** Apostel-unbeleuchtet **14** 9409-unbeleuchtet **15** 9402-unbeleuchtet **16** 9414-unbeleuchtet **17** 9410-unbeleuchtet **18** 9432-unbeleuchtet **19** Apostel-beleuchtet **20** 9409-beleuchtet **21** 9402-beleuchtet **22** 9414-beleuchtet **23** 9410-beleuchtet **24** 9432-beleuchtet.

Die dritte und letzte Wiederholung der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Proben der jüngsten vollentwickelten Blätter (Abb. 8) zeigte zu den zwei vorangegangenen Auftrennungen keine optischen Unterschiede bezüglich der Höhe der Pigmentbahnen pro Probenextrakt und der Anzahl und Ausprägung der aufgetrennten Pigmente. Außerdem waren erneut die zwei untersten Carotinoide des Chromatogramms verblasst.

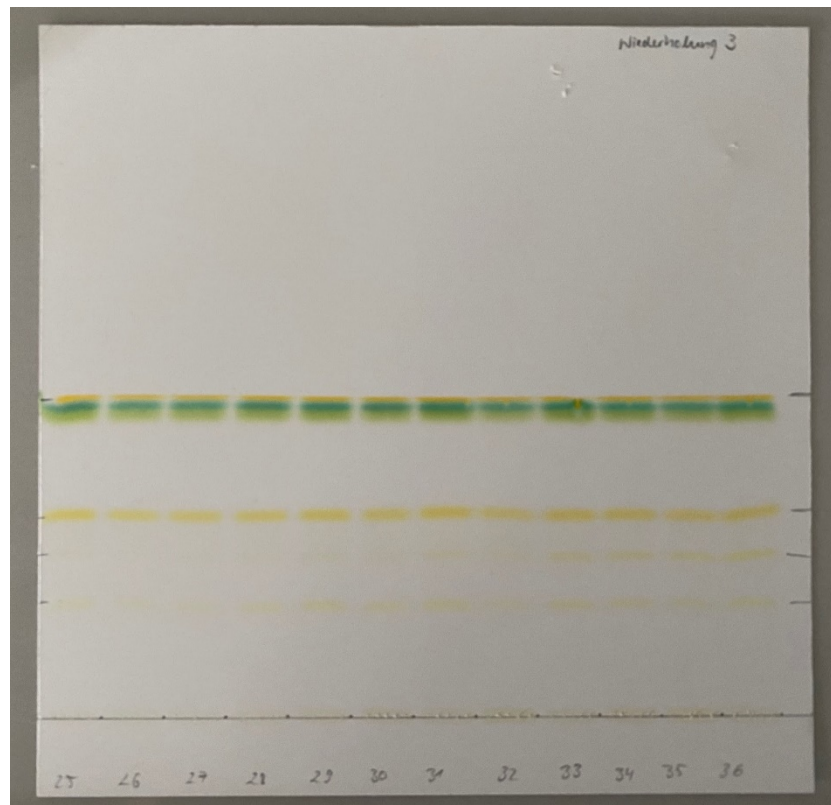


Abbildung 8: Chromatogramm der Probenextrakte 25-36 (Wiederholung 3) des jüngsten vollentwickelten Blattes. Von links nach rechts **25** Apostel-unbeleuchtet **26** 9409-unbeleuchtet **27** 9402-unbeleuchtet **28** 9414-unbeleuchtet **29** 9410-unbeleuchtet **30** 9432-unbeleuchtet **31** Apostel-beleuchtet **32** 9409-beleuchtet **33** 9402-beleuchtet **34** 9414-beleuchtet **35** 9410-beleuchtet **36** 9432-beleuchtet.

Die Chromatogramme der Wiederholungen 1-3 der dritten vollentwickelten Blätter (Abb. 9-11) wiesen erneut eine Gesamtanzahl von 72 aufgetrennten Pigmenten auf. Auch hier zeigten 48 Pigmente eine gelbe Farbausprägung. Pro Probenextrakt trennten sich sechs Pigmente auf, welche sich erneut in ein grünes Chlorophyll, ein grünblaues Chlorophyll sowie in vier gelbe Carotinoide gliederten. Auch hier waren die oberen beiden gelben Pigmentbahnen deutlich zu erkennen und die unteren zwei gelben Pigmentbahnen verblasst. Außerdem lagen die Pigmentbahnen jedes Probenextraktes auch hier auf derselben Höhe.

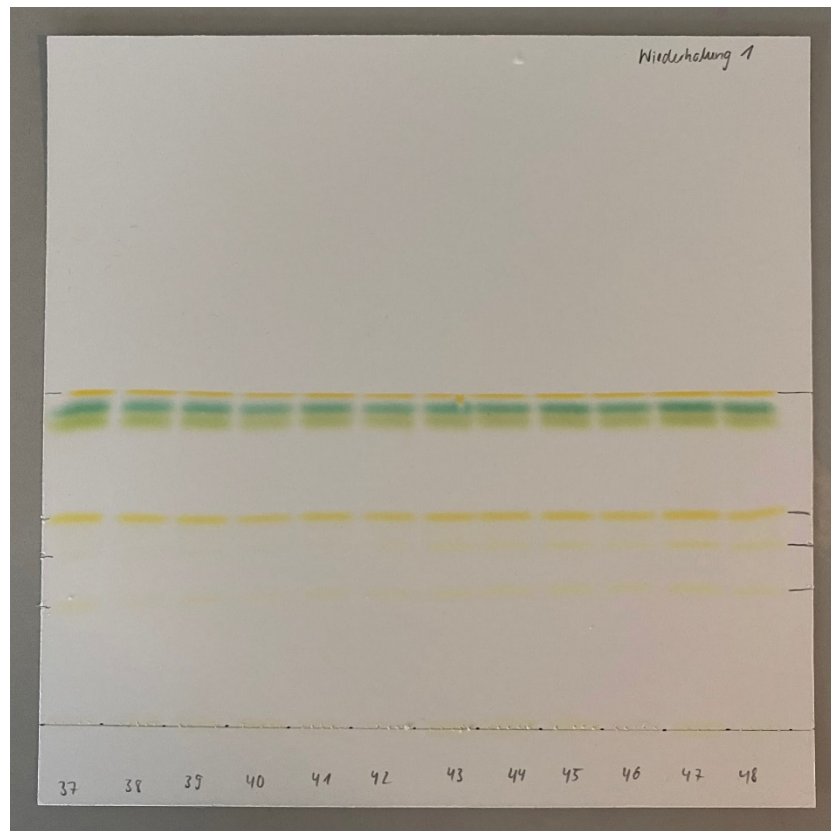


Abbildung 9: Chromatogramm der Probenextrakte 37-48 (Wiederholung 1) des dritten vollentwickelten Blattes. Von links nach rechts **37** Apostel-unbeleuchtet **38** 9409-unbeleuchtet **39** 9402-unbeleuchtet **40** 9414-unbeleuchtet **41** 9410-unbeleuchtet **42** 9432-unbeleuchtet **43** Apostel-beleuchtet **44** 9409-beleuchtet **45** 9402-beleuchtet **46** 9414-beleuchtet **47** 9410-beleuchtet **48** 9432-beleuchtet.

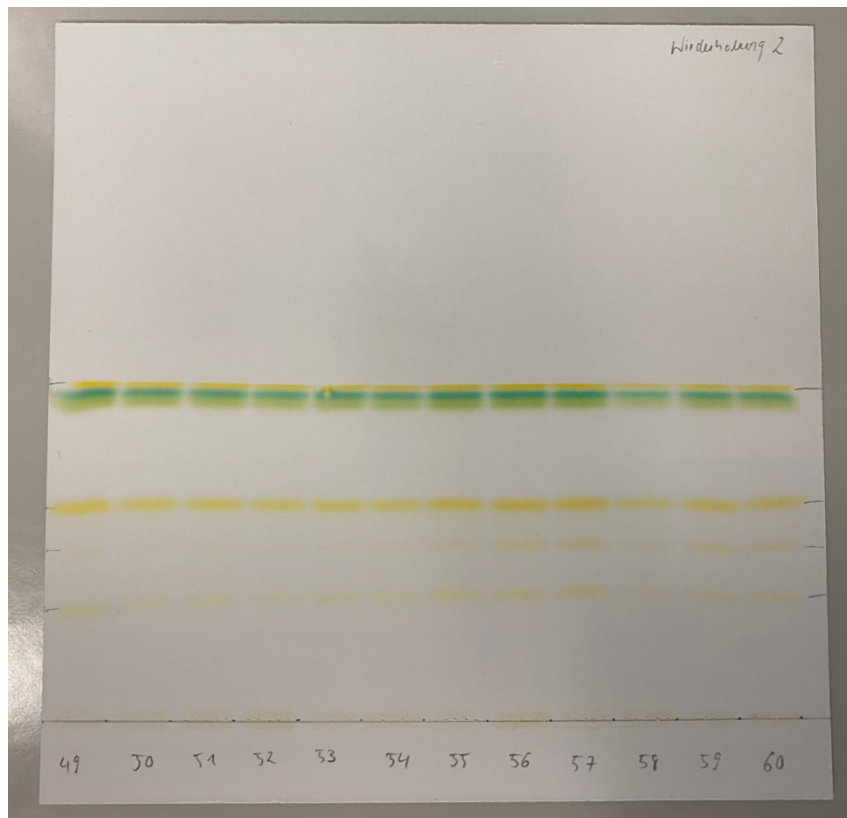


Abbildung 10: Chromatogramm der Probenextrakte 49-60 (Wiederholung 2) des dritten vollentwickelten Blattes. Von links nach rechts **49** Apostel-unbeleuchtet **50** 9409-unbeleuchtet **51** 9402-unbeleuchtet **52** 9414-unbeleuchtet **53** 9410-unbeleuchtet **54** 9432-unbeleuchtet **55** Apostel-beleuchtet **56** 9409-beleuchtet **57** 9402-beleuchtet **58** 9414-beleuchtet **59** 9410-beleuchtet **60** 9432-beleuchtet.

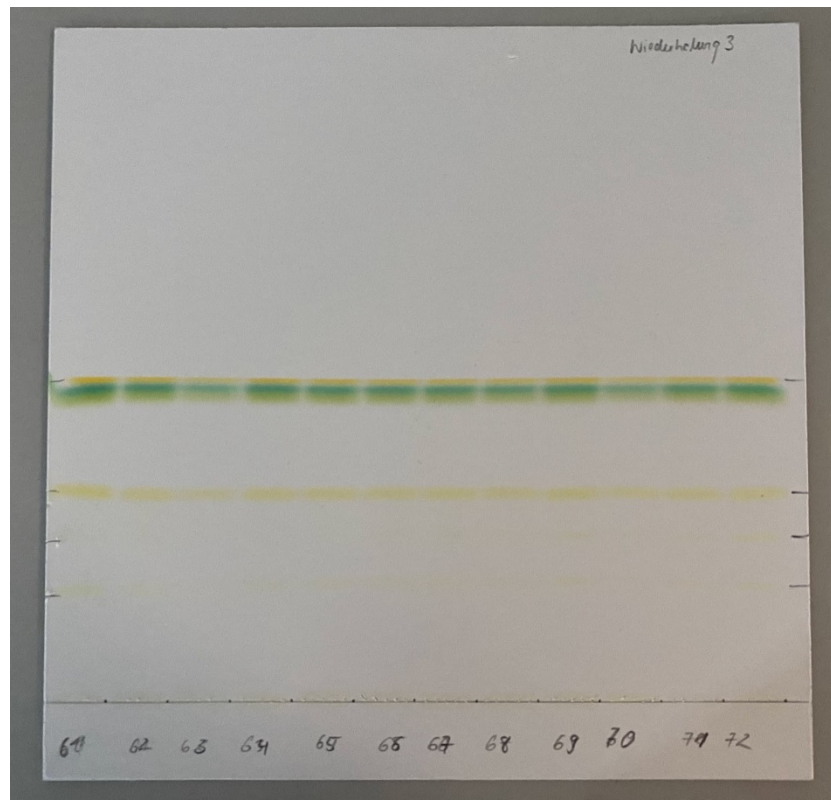


Abbildung 11: Chromatogramm der Probenextrakte 61-72 (Wiederholung 3) des dritten vollentwickelten Blattes. Von links nach rechts **61** Apostel-unbeleuchtet **62** 9409-unbeleuchtet **63** 9402-unbeleuchtet **64** 9414-unbeleuchtet **65** 9410-unbeleuchtet **66** 9432-unbeleuchtet **67** Apostel-beleuchtet **68** 9409-beleuchtet **69** 9402-beleuchtet **70** 9414-beleuchtet **71** 9410-beleuchtet **72** 9432-beleuchtet.

Infolge der übereinstimmenden Positionen beziehungsweise Höhe der Pigmentbahnen für jede Probe, ergaben sich insgesamt sechs Pigmentbahnen, deren Rf-Werte die des gesamten Chromatogramms repräsentierten. In Tabelle 5 sind jedoch nur die Werte für die vier gelben der sechs erkennbaren Pigmentbahnen dargestellt, da die Chlorophylle für diese Arbeit zu vernachlässigen waren.

Die Markierung des obersten Carotinoids war gleichzeitig die der Laufmittelfront. Daher nahm der Retentionsfaktor hier den Wert 1 an (siehe Kapitel 1.1.2).

Zwischen den drei Wiederholungen und zwischen beiden Probennahmen (jüngstes und drittes vollentwickeltes Blatt) waren die Differenzen der Rf-Werte der jeweiligen Pigmentbahn sehr gering bis gar nicht vorhanden.

Tabelle 5: Retentionsfaktorwerte der Wiederholungen 1-3 des jüngsten vollentwickelten Blattes sowie des dritten vollentwickelten Blattes. Die Nummerierung der Pigmentbahnen erfolgte auf einem Chromatogramm von unten nach oben. JVB, jüngstes vollentwickeltes Blatt; 3. VB, drittes vollentwickeltes Blatt.

Blatt	Wiederholung	Pigmentbahn			
		1	2	3	4
JVB	1	0,32	0,49	0,61	1
	2	0,36	0,51	0,7	1
	3	0,35	0,49	0,63	1
3. VB	1	0,35	0,5	0,62	1
	2	0,36	0,51	0,65	1
	3	0,36	0,51	0,62	1

3.2 Absorption

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse in diesem Kapitel lautet die Bezeichnung der Carotinoide in Hinblick auf die dünnenschichtchromatographischen Ergebnisse wie folgt: Das oberste Carotinoid wird als Carotin bezeichnet, während die unteren Carotinoide die Bezeichnung Xanthophyll 1, Xanthophyll 2 und Xanthophyll 3 (Nummerierung auf dem Chromatogramm von unten nach oben) erhalten.

Für fast alle Linien und für Apostel war je Pigment die gleiche Spektralform zu beobachten (Abb. 11, 12, 14, 15). Eine Verschiebung der Maxima auf höhere oder niedrigere Wellenlängen war abhängig von der Lichtbehandlung oder vom Blattalter nicht zu beobachten. Jedoch waren Maxima der Pigmente Xanthophyll 1 und Xanthophyll 2 deutlich unausgeprägter als die Maxima des Xanthophylls 3 sowie des Carotins. Die deutlich zu identifizierenden Absorptionsmaxima im verwendeten organischen Lösemittel Ethanol sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Das Xanthophyll 1 (X1) wies sein Maximum bei der ersten gemessenen Wellenlänge 400 nm auf. Jedoch waren weitere Maxima bei 421 nm und bei 448 nm angedeutet. Auch für das Xanthophyll 2 (X2) wurde das Absorptionsmaximum bei 400 nm und ein weiteres nur angedeutetes Maximum bei 427 nm gemessen. Linie 9402 des jüngsten vollentwickelten Blattes unbeleuchteter Pflanzen wies jedoch als einzige Probe für X2 ein Spektrum auf, bei dem das Hauptabsorptionsmaximum nicht bei 400 nm, sondern bei 446 nm lag. Weitere Maxima wurden bei 475 und 420 nm gemessen. Das Xanthophyll 3 (X3) wies zwei deutlich erkennbare Absorptionsmaxima auf. Diese wurden bei 447 und 473 nm gemessen. Eine angedeutete Schulter befand sich in etwa bei 423 nm. Ebenso verhielt sich das Carotin (Car). Es gaben sich zwei Maxima bei 450 und 476 nm zu erkennen. Auch hier deutete sich eine Schulter an, welche bei 424 nm lag.

Tabelle 6: Wellenlängenposition der Absorptionsmaxima ($\lambda_{\max}$ [nm]) der untersuchten Carotinoide in Ethanol. $\lambda_{\max}$, Hauptabsorptionsmaximum; $\lambda^2_{\max}$, zweites Absorptionsmaximum; $\lambda^3_{\max}$, drittes Absorptionsmaximum oder Schulter.

Pigment	Carotinoid-Art	$\lambda_{\max}$	$\lambda^2_{\max}$	$\lambda^3_{\max}$
1	Xanthophyll	400	421	448
2	Xanthophyll	400 [446]	427 [475]	- [420]
3	Xanthophyll	447	473	423
4	Carotin	450	476	424

Die Absorptionsspektren der Pigmente der jüngsten vollentwickelten Blätter unbeleuchteter Pflanzen sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Absorption des X1 und des Carotins waren bei allen Linien und bei der Kontrollsorte Apostel niedrig. Für das X2 war nur eine erhöhte Absorption bei 9410 zu beobachten. Die Linie 9414 zeigte als einzige für das X3 erhöhte Absorptionswerte. Nichtsdestotrotz waren zwischen den Linien sowie zwischen den Linien und Apostel keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

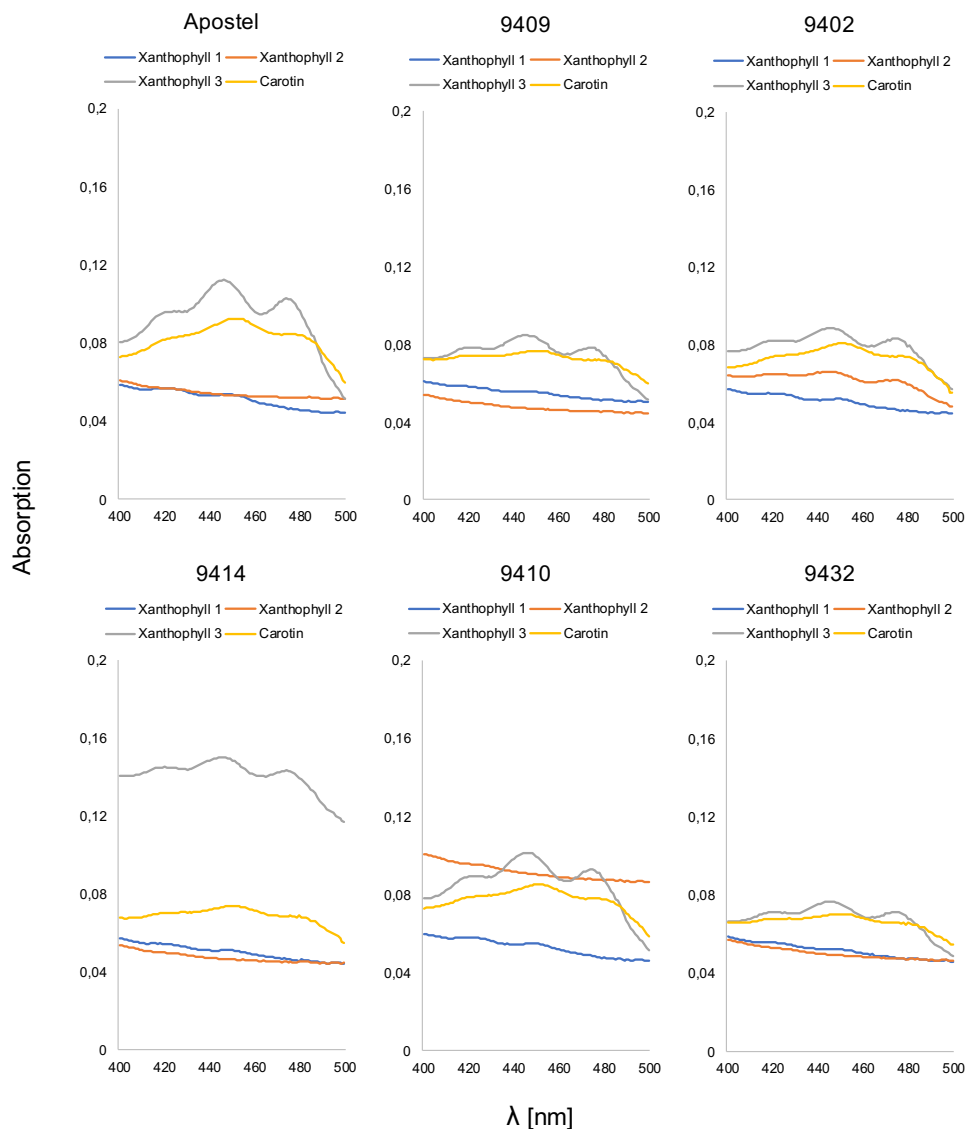


Abbildung 12: Absorptionsspektren der Pigmente unbeleuchteter Pflanzen des jüngsten vollentwickelten Blattes. Dargestellt sind die gemittelten Absorptionswerte im aufgenommenen Bereich von 400-500 nm.

Die Absorptionsspektren der Pigmente der jüngsten vollentwickelten Blätter beleuchteter Pflanzen sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Absorptionswerte des X1 waren bei Apostel, 9409 und 9402 niedrig, jedoch bei 9414, 9410 und 9432 erhöht. Die Absorptionswerte des X2 waren bei allen Linien erhöht, jedoch bei Apostel niedrig. Die Werte für das X3 waren sehr erhöht bei 9409, 9402 und 9410, eher unverändert bei Apostel und 9414, jedoch niedrig bei 9432. Die Absorptionswerte für das Car waren bei allen Linien außer 9409 erhöht und bei Apostel ähnlich. Trotz der zu beobachteten Unterschiede zwischen den Linien sowie zwischen den Linien und Apostel, konnten diese nicht statistisch nachgewiesen werden.

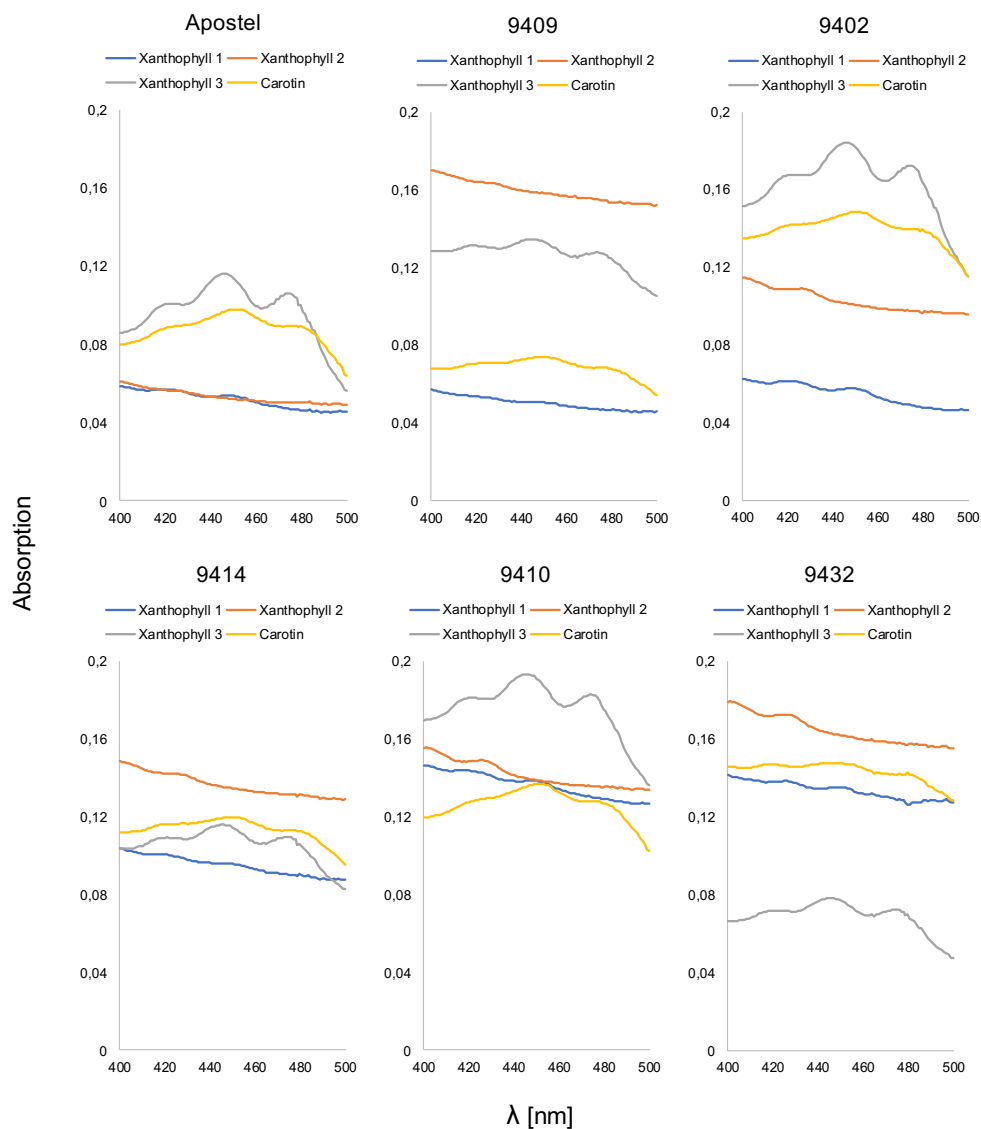


Abbildung 13: Absorptionsspektren der Pigmente beleuchteter Pflanzen des jüngsten vollentwickelten Blattes. Dargestellt sind die gemittelten Absorptionswerte im aufgenommenen Bereich von 400-500 nm.

Vergleicht man die gemittelten maximalen Absorptionswerte der Pigmente beider Lichtbehandlungen miteinander ist ein Lichteffect zu beobachten (Abb. 14). Die Werte von Pigmenten beleuchteter Pflanzen waren tendenziell höher als die der Pigmente unbeleuchteter Pflanzen. Dabei war dieser Lichteffect jedoch nicht signifikant.

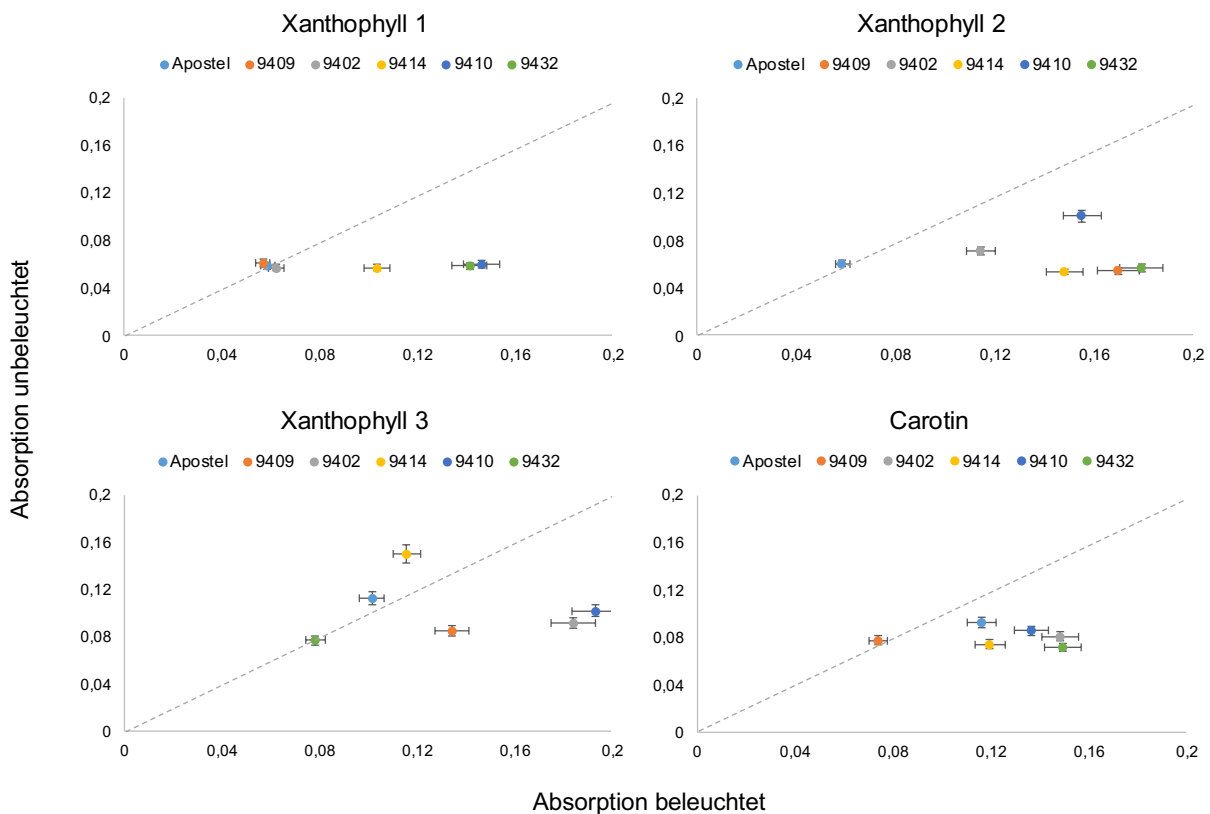


Abbildung 14: Absorptionsmaxima der Pigmente beleuchteter und unbeleuchteter Pflanzen des jüngsten vollentwickelten Blattes. Die Ergebnisse entsprechen den gemittelten maximalen Absorptionswerten + Standardfehler.

Die Absorptionsspektren der Pigmente der dritten vollentwickelten Blätter unbeleuchteter Pflanzen sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Absorptionswerte der Xanthophylle 1 und 2 sowie des Carotins waren bei allen Linien und Apostel niedrig. Das X3 wies bei der Sorte Apostel signifikant erhöhte Absorptionswerte im Vergleich mit den Linien auf.

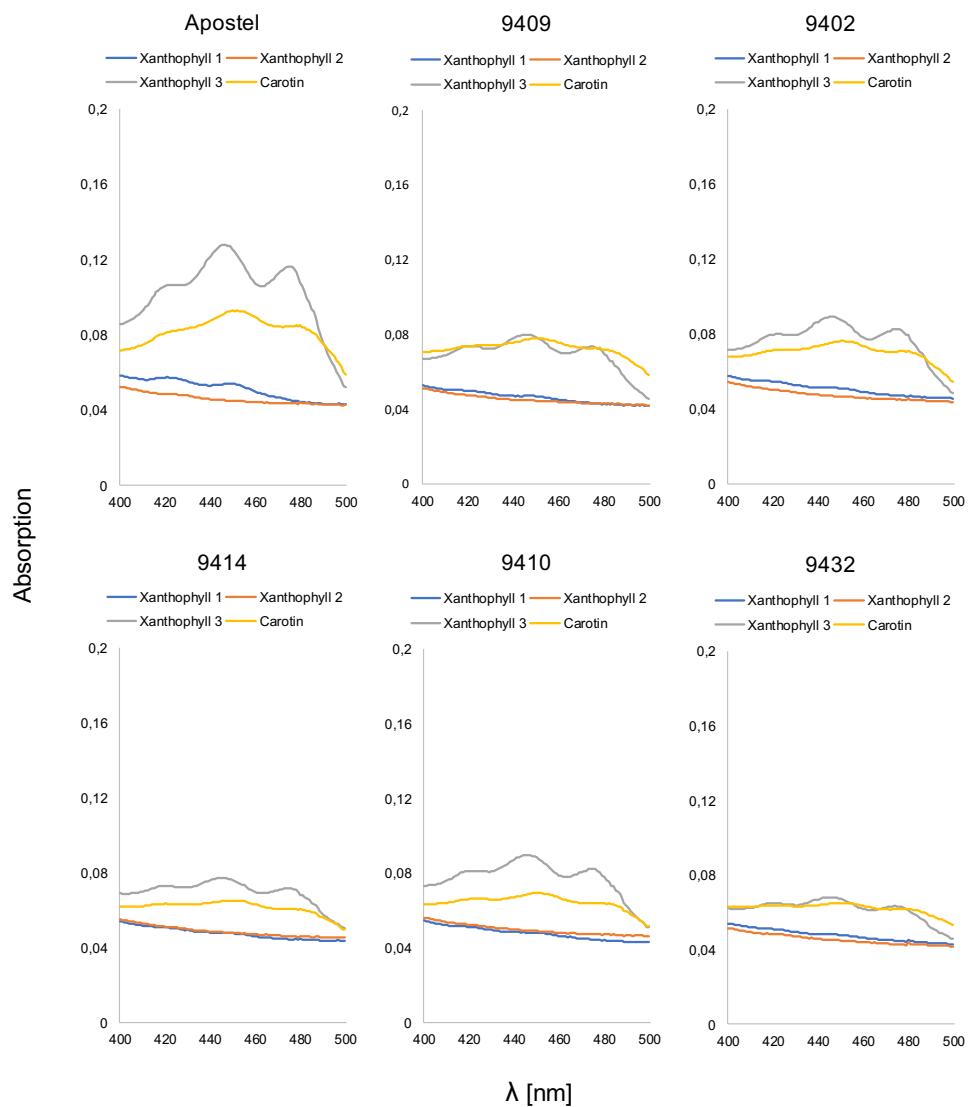


Abbildung 15: Absorptionsspektren der Pigmente unbeleuchteter Pflanzen des dritten vollentwickelten Blattes. Dargestellt sind die gemittelten Absorptionswerte im aufgenommenen Bereich von 400-500 nm.

Die Absorptionsspektren der Pigmente der dritten vollentwickelten Blätter beleuchteter Pflanzen sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Absorptionswerte für das X1 waren bei jeder Linie und der Sorte Apostel niedrig. Die Ausnahme bildete hier die Linie 9402 mit überdurchschnittlich hohen Werten. Ebenso die Werte des X2 waren für alle Linien und für Apostel niedrig. Für X3 waren die Werte zwischen den Linien 9402 und 9414 sowie zwischen Apostel und der Linie 9414 signifikant verschieden. Die unterschiedlich hohen Werte des Carotins waren nicht statistisch signifikant.

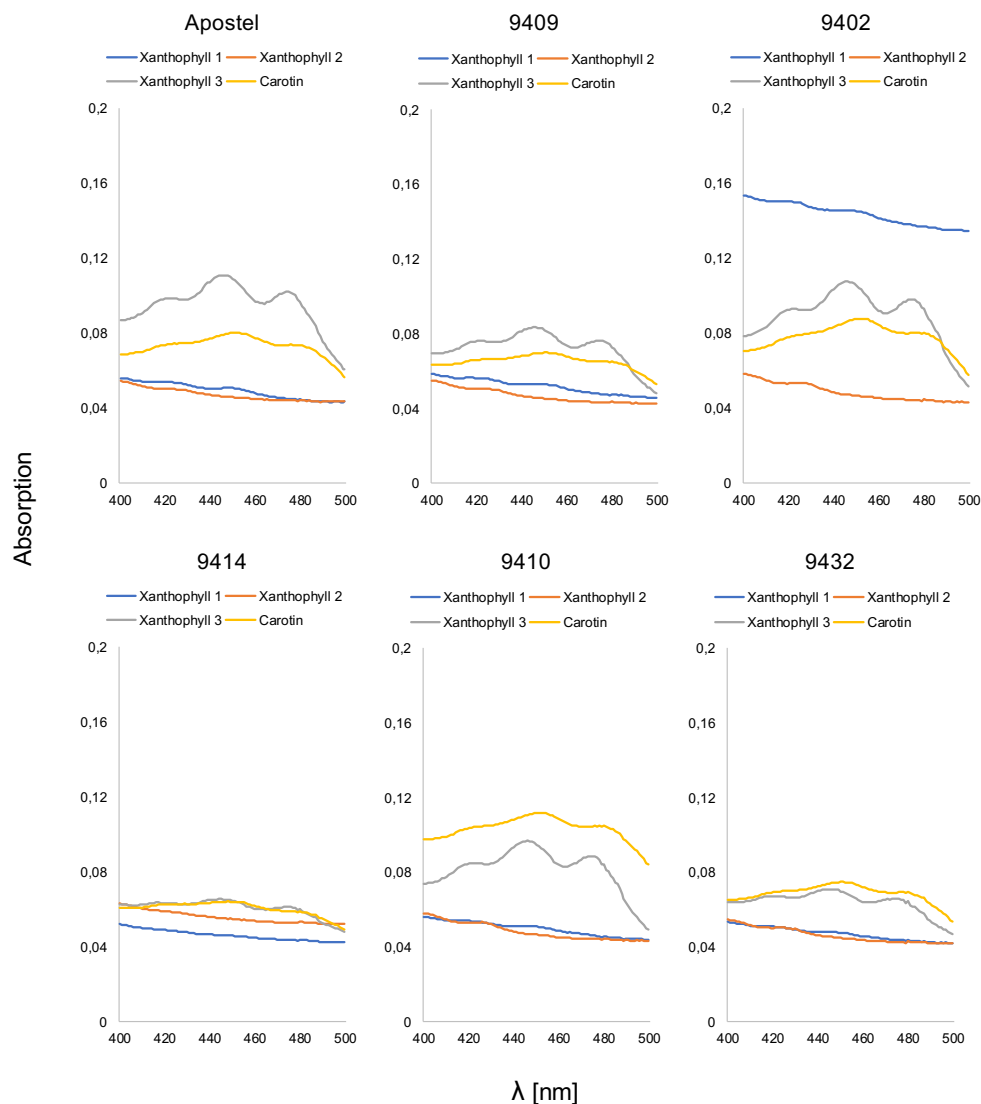


Abbildung 16: Absorptionsspektren der Pigmente beleuchteter Pflanzen des dritten vollentwickelten Blattes. Dargestellt sind die gemittelten Absorptionswerte im aufgenommenen Bereich von 400-500 nm.

Vergleicht man auch für das dritte vollentwickelte Blatt die gemittelten maximalen Absorptionswerte der Pigmente unbeleuchteter Pflanzen mit den Werten der Pigmente von beleuchteten Pflanzen (Abb. 17) ist kein Lichteffekt zu beobachten. Bis auf den Ausreißer der Linie 9402 bei X1, der stark vom Trend abweicht, unterscheiden sich die Absorptionsmaxima der Xanthophylle 1, 2, 3 und des Carotins zwischen beleuchteten und unbeleuchteten Pflanzen wenig bis gar nicht.

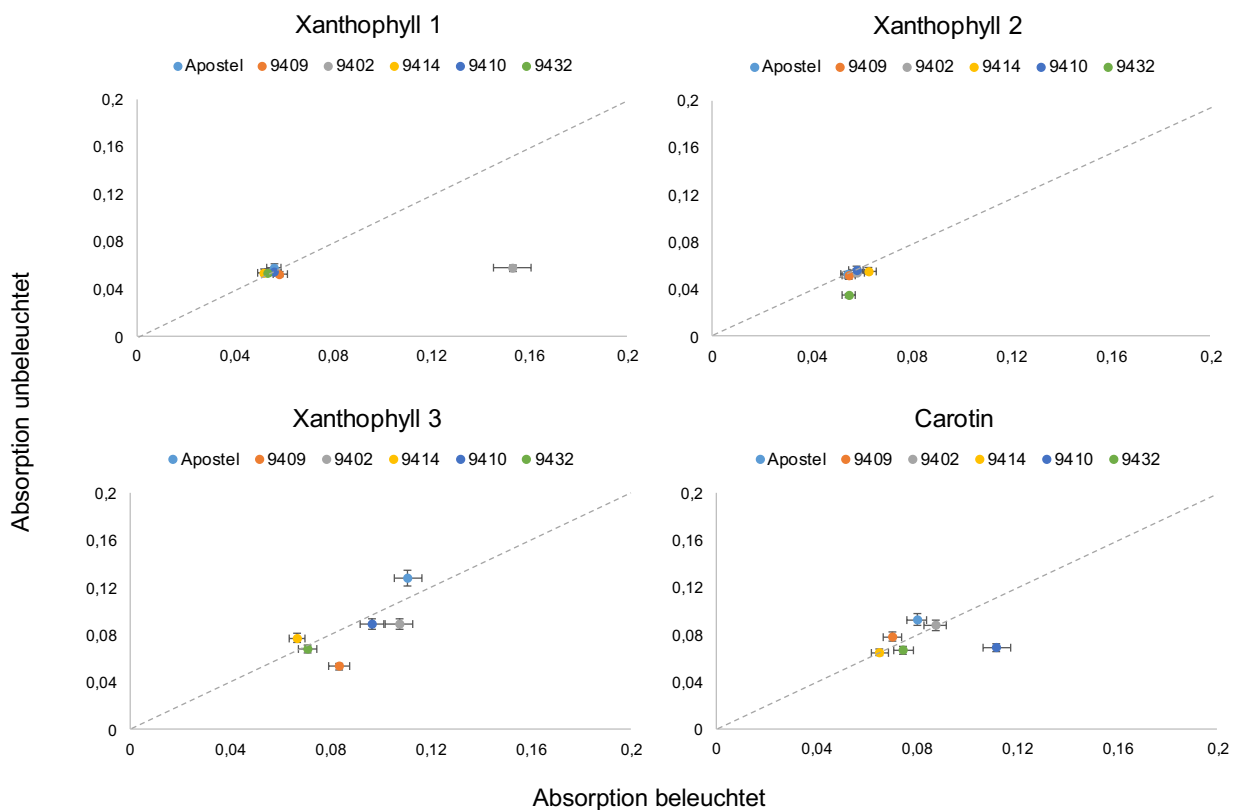


Abbildung 17: Absorptionsmaxima der Pigmente beleuchteter und unbeleuchteter Pflanzen des dritten vollentwickelten Blattes. Die Ergebnisse entsprechen den gemittelten maximalen Absorptionswerten + Standardfehler.

4 Diskussion

4.1 Pigmentensemble

Die geringen Differenzen zwischen den gemessenen Retentionswerten unterstützen den ersten optischen Eindruck beim Betrachten der Chromatogramme, dass es keine Unterschiede bezüglich der vorhandenen photoprotektiven Pigmente zwischen den Weizenlinien 9409, 9402, 9414, 9410 und 9432 sowie zwischen den Linien und der Winterweizensorte Apostel gibt. Auch die Absorptionsspektren der untersuchten Pigmente Carotin und die Xanthophylle 1, 2 und 3 wiesen für jede Linie und Apostel sowie unabhängig von Lichtbehandlung und der Position des Blattes die gleiche Form auf. Darüber hinaus stimmten die Wellenlängen der entsprechenden Maxima größtenteils miteinander überein. Entsprechende Ausnahmen wie das Pigment X2 der Linie 9402 des jüngsten vollentwickelten Blattes unbeleuchteter Pflanzen könnten auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Aufnahme womöglich das Spektrum zusammengelegener Pigmente abbildete.

Unterschiede waren bezüglich der Absorptionswerte vorhanden, die auf relative Mengenunterschiede der Pigmente in den beprobten Linien und Apostel hindeuteten und weiterführend auf genotypische Unterschiede der Linien zurückzuführen sein könnte.

4.1.1 Einfluss Beleuchtung und Blattposition

In dieser Arbeit wurde ein Teil der Weizenpflanzen täglich für 12h mit Natriumdampflampen beleuchtet und somit einer zusätzlichen Lichtmenge ausgesetzt. Die erhöhten Absorptionswerte der Pigmente des jüngsten vollentwickelten Blattes der beleuchteten Pflanzen zeigten eine positive Korrelation zwischen Beleuchtung und erhöhten Anteilen photoprotektiver Pigmente auf. Es wurde bereits etabliert, dass eine Akklimatisierung von Pflanzen an ihre Lichtumgebung durch die Vergrößerung oder Verkleinerung des Pools der VAZ-Xanthophylle stattfindet (Thayer und Björkman, 1990). Andere Carotinoide hingegen reagieren weniger dynamisch beziehungsweise ohne einheitliches Muster auf kurzfristige Änderungen der Lichtverhältnisse (Demmig-Adams und Adams, 1992b), was die bei den fünf Weizenlinien und Apostel unterschiedlichen Absorptionswerte des gleichen Pigments beider Lichtbehandlungen und Blattpositionen erklären könnte.

Bei Apostel waren für die Xanthophylle 1 und 2 in den jüngsten vollentwickelten Blättern keine Unterschiede zwischen beiden Lichtbehandlungen und für X3 sowie das Carotin nur sehr geringe Differenzen festzustellen. Dies suggeriert eine bessere Akklimatisierung der hier untersuchten Weizenlinien an Veränderungen hinsichtlich der Lichtquantitäten, die womöglich durch ihre differenzierte Pigmentkomposition bedingt wird.

Bei den Pigmenten der dritten vollentwickelten Blätter der beleuchtet aufgezogenen Pflanzen wurde der Lichteffekt nicht beobachtet. Hierfür präsentieren sich folgende Ursachen: (1) Die Anordnung der Blätter am Trieb der Weizenjungpflanze könnte verantwortlich dafür gewesen sein, dass es zu einer Beschattung der unteren Blätter kam. Obwohl nicht jedes der fünf gesäten Saatkörner pro Topf keimte, könnte bereits der wenig dichte Pflanzenbestand zu einer Abnahme und Filterung von einfallendem Licht in untere Blätter geführt haben. Dieser mögliche verminderte Lichteinfall innerhalb des Weizenbestandes könnte sich in den geringen Absorptionswerten der vier Pigmente in den dritten vollentwickelten Blättern beleuchteter Pflanzen im Vergleich mit den Werten der Pigmente in den jüngsten vollentwickelten Blättern beleuchteter Pflanzen widerspiegeln.

Eine weitere mögliche Ursache (2) könnte im Standortwechsel der Weizenpflanzen liegen. Diese wurden für die erste Probennahme an den jüngsten vollentwickelten Blättern in das Labor transferiert. Da die zuvor beleuchteten Pflanzen bis zur zweiten Probennahme am darauffolgenden Tag nicht wieder unter den Lampen im Gewächshaus platziert wurden, kann es womöglich zu einer veränderten Lichtreaktion der betroffenen Pflanzen gekommen sein.

Schließlich wäre nur ein erneuter Versuch mit gleichen Lichtbedingungen für die Pflanzen zwischen den Probenahmen ausschlaggebend dafür, ob letztlich Beschattung der unteren Blätter während der Wachstumsphase im Gewächshaus oder veränderte Standort- und damit Lichtverhältnisse verantwortlich für die Unterschiede zwischen den Werten der jüngsten und dritten vollentwickelten Blätter beleuchteter Pflanzen waren.

4.2 Charakterisierung und Identifizierung der Pigmente

Im chromatographischen Trennverfahren wird der Rf-Wert für die Identifizierung von Substanzen genutzt. Da dieser jedoch von vielen Faktoren abhängig und allgemein nicht gut reproduzierbar ist (Wulff, 1968), besteht Unsicherheit beim Vergleich mit Werten aus der Literatur (Rodríguez-Amaya und Kimura, 2004). Eine Identifizierung der Pigmente ist anhand der Rf-Werte möglich, wenn vergleichende Reinsubstanzen für die chromatographische Analyse zur Verfügung stehen (Bashan *et al*, 2005). Es wurde sich gegen den Kauf von Reinsubstanzen entschieden, da sie für den Umfang dieser Arbeit zu teuer waren.

Dennoch ließen sich bereits Vermutungen über die Identitäten der hier untersuchten Pigmente beim Betrachten der Chromatogramme anstellen, da die chemischen Eigenschaften des genutzten Laufmittels mit den Positionen und Ausfärbungen der Pigmente in Verbindung gesetzt werden konnten. Da die mobile Phase in dieser Arbeit aus dem unpolaren Laufmittelgemisch Diethylether-Toluol-Isopropanol bestand, musste das am weitesten gewanderte Carotinoid ebenfalls durch eine unpolare Molekülstruktur wie die der Carotine charakterisiert sein, da sich Gleiches in Gleichem löst. Die restlichen drei Carotinoide hatten niedrige bis sehr niedrige Rf-Werte, wurden dementsprechend in der stationären Phase gelöst und daher den polaren Xanthophyllen zugeordnet. Infolgedessen kam es zur entsprechenden Benennung der Pigmente für die Darstellung der spektrophotometrischen Ergebnisse.

Die Erkenntnisse von Lichtenthaler (1987) bezüglich spektraler Eigenschaften der Carotinoide ermöglichen detailliertere Annäherungen an eine Identifizierung des Pigmentprofils der untersuchten Linien sowie der Kontrollsorte Apostel. Den Carotinoiden weist er jeweils ein typisches Absorptionsspektrum mit zwei bis drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 500 nm zu. Das Xanthophyll 3 sowie das Carotin zeigten im für die spektrophotometrischen Messungen verwendeten Ethanol zwei deutliche Absorptionsmaxima sowie eine Schulter, die eine Zuordnung von X3 zu Lutein und vom Carotin zu β -Carotin ermöglichen könnte. Dass die Xanthophylle 1 und 2 nur bei vereinzelt Proben deutliche Absorptionsmaxima aufwiesen, erschwert den Vergleich mit Literaturwerten.

Die im Praktikumsprotokoll der Universität Hamburg (1985) aufgeführten Ergebnisse, die die Nutzung des auch in dieser Arbeit verwendeten Laufmittels Diethylether-Toluol-Isopropanol voraussetzen, suggerieren ebenfalls, dass es sich bei Carotin um β -Carotin, beim X3 um Lutein und darüber hinaus beim X2 um Violaxanthin sowie beim X1 um Neoxanthin gehandelt haben könnte. Die möglichen Identitäten des X2 und des Carotins würden ihre erhöhten Absorptionswerte in den jüngsten vollentwickelten Blättern beleuchteter Pflanzen

der Weizenlinien erklären, die sich womöglich über die Vergrößerung des Pools an VAZ-Zyklus-Komponenten sowie über die erhöhten Mengen an β -Carotin an die Lichtumgebung angepasst haben (Demmig-Adams und Adams, 1992a).

Doch selbst die Übereinstimmungen mit Ergebnissen aus der Literatur können ohne verfügbare Reinsubstanzen keine Bestätigung der Vermutungen zulassen, zumal die Wellenlängenpositionen der Absorptionsmaxima desselben Pigments bei spektrophotometrischen Messungen je nach herangezogener literarischer Quelle um einige nm voneinander abweichen (Rodríguez-Amaya und Kimura, 2004).

4.3 Pigmentanalyseverfahren

Das dünnsschichtchromatographische Verfahren zur Analyse der Pigmente erwies sich bei dieser Arbeit als äußerst effektiv trotz seiner einfachen und kostengünstigen Ausführung. Schlussendlich wurde sich bei der Extraktion der Pigmente gegen das Mörsern des Blattmaterials entschieden, da der dafür benötigte Seesand beim Pipettieren des Extraktes aus der Schale mittransferiert wurde, weshalb später auf den DC-Platten Rückstände zu finden waren. Die homogenisierten Extrakte vereinfachten durch die überstehenden Lösungen das Abpipettieren und Auftragen deutlich. Zum Zeitpunkt der Laufmittelwahl wurde noch davon ausgegangen, dass die Pigmentbahnen für die anschließende Messung im Spektralphotometer mit der Schere abgetrennt werden mussten, weshalb sich final für die einfacher zu bearbeitende Kieselgelplatte mit Aluminiumunterschicht statt einer Polyesterunterschicht entschieden wurde. Qualitativ gesehen unterschieden sich diese jedoch nicht voneinander. Bezüglich der Plattengröße fiel die Wahl auf die größere Platte mit den Maßen 20 x 20 cm, da es auf der kleineren Platte mit den Maßen 40 x 80 mm, trotz guter Pigmentauftrennung, nicht möglich war viele Probenextrakte nebeneinander laufen zu lassen.

Für zukünftige Arbeiten ließe sich die Auftrennung der Pigmente eventuell verbessern, indem (1) das Laufmittel variiert wird und/oder (2) die DC-Platte nach der ersten Entwicklung mit einem wenig polaren Lösungsmittel erneut mit einem polaren Lösungsmittel entwickelt wird, um potentiell zusammengelegene Xanthophylle einzeln abzubilden.

Eventuell könnten sich durch zusätzliche UV- und Fluoreszenz-Aufnahmen, durch Anregung der auf den Chromatogrammen befindlichen Pigmenten mit Blau- und UV-Licht, unentdeckte Pigmente abbilden lassen. Die ebenfalls photoprotektiven Anthocyane absorbieren ebenso wie Carotinoide teilweise im blauen Spektrum, grenzen sich aber durch ihre Absorption im UV-Bereich von ihnen ab und wären daher bei UV-Bestrahlung identifizierbar.

4.4 Potentielle Fehlerquellen

Die Abbildungen der Chromatogramme (Abb. 6-11) sind teilweise unterschiedlich belichtet und die Farben ausgeprägter oder verblasster. Dies ist der ungleichen Lichtverhältnisse und Ablageorte der DC-Platten beim Fotografieren dieser zu schulden. Es könnte der Eindruck entstehen, dass die Farbausprägungen der Pigmente tatsächlich unterschiedlich waren. Darauf sollte zukünftig geachtet werden.

Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass weitere Pigmente durch nicht getroffene Vorkehrungen gegen unerwünschte Einflüsse des Arbeitsumfeldes bereits so stark degradiert worden sind, dass sie auf dem Chromatogramm nicht mehr abzubilden waren. Die Xanthophylle 1 und 2 waren bereits stark verblasst. Infolgedessen ist es möglich, dass das hier beschriebene Pigmentprofil der individuellen Weizenlinien unvollständig ist. Um der Degradierung von Pigmenten vorzubeugen, ist es bei der Extraktion der Substanzen aus dem Pflanzenmaterial wichtig vor allem auf die Lichtverhältnisse zu achten. Zukünftig könnten alle Lichtquellen eliminiert werden, indem die Extraktionsproben und Pigmentlösungen in dunklen Räumen oder Schränken sowie gegen Oxidation in verschlossenen Gefäßen bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Durch Messunterbrechungen des Spektralphotometers fehlten für das Xanthophyll 3 der Linie 9409 unbeleuchtet und das Xanthophyll 2 der Linie 9432 unbeleuchtet Absorptionswerte (siehe Anhang 1 und 2), die eine Mittelwertbildung des maximalen Absorptionswertes mit $n = 2$ bedingten. Da die statistische Auswertung anhand der gemittelten Werte aus $n = 3$ erfolgte, kann es möglicherweise zu einer Verzerrung der statistischen Signifikanz gekommen sein.

5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es das Pigmentangebot der ausgewählten hitzetoleranten Weizenlinien zu etablieren und miteinander zu vergleichen. Zusätzlich wurde die lokale Winterweizensorte Apostel zum Vergleich herangezogen. Dabei ließen sich weder zwischen den Linien noch zwischen diesen und Apostel Unterschiede feststellen. Es lässt sich außerdem festhalten, dass sich das Pigmentensemble weder durch Beleuchtung noch durch die Position des untersuchten Blattes verändert hat. Diese Faktoren hatten nur Auswirkungen auf die Komposition der vorhandenen Pigmente. Eine annähernde Identifizierung der untersuchten Pigmente suggeriert die Präsenz der bereits bei Weizen detektierten Carotinoide β -Carotin, Lutein, Violaxanthin sowie Neoxanthin. Die Identitäten könnten bei Verwendung dieser Reinsubstanzen bestätigt werden.

Für zukünftige Fragestellungen ist besonders die Quantifizierung der individuellen Pigmente interessant. Bei der spektrophotometrischen Messung könnte die Extinktion der bei der DC mit Reinsubstanzen identifizierten Pigmente gemessen werden und über ihre Extinktionskoeffizienten die Konzentrationen bestimmt werden. Durch Angaben absoluter Mengen und der Verhältnisse von photoprotektiven Pigmenten zu lichtsammelnden Chlorophyllen lassen sich präzisere Aussagen über den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen und -faktoren auf das Pigmentensemble treffen.

Literaturverzeichnis

- Agati G, Guidi L, Landi M, Tattini M (2021) Anthocyanins in photoprotection: knowing the actors in play to solve this complex ecophysiological issue. *New Phytologist*.
- Bashan Y, Bustillos JJ, Leyva LA, Hernandez JP, Bacilio M (2005) Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* **42**, 279-285.
- Behera RK, Choudhury NK (2001) Photosynthetic characteristics of chloroplasts of primary wheat leaves grown under different irradiance. *Photosynthetica* **39** (1), 11-15.
- Behera RK, Choudhury NK (2002) High irradiance induced pigment degradation and loss of photochemical activity of wheat chloroplasts. *Biologia Plantarum* **45** (1), 45-49.
- Behera RK, Mishra PC, Choudhury NK (2002) High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* **159**, 967-973.
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* **25**, 173-185.
- Choudhury NK, Choe HT (1996) Photoprotective effect of kinetin on pigment content and photochemical activities of wheat chloroplasts aging *in vitro*. *Biologia Plantarum* **38** (1), 61-69.
- CIMMYT (2021) Wheat research. <https://www.cimmyt.org/work/wheat-research/> (Zugriff am 15.09.21).
- Dall'Osto L, Fiore A, Cazzaniga S, Giuliano G, Bassi R (2007) Different roles of α - and β -branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35056–35068.
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochemica et Biophysica Acta* **1020**, 1-24.
- Demmig-Adams B, Adams WW (1992a) Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants of different life forms. *Plant, Cell and Environment* **15**, 411-419.

- Demmig-Adams B, Adams WW (1992b) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Reviews Plant Physiology. Plant Molecular Biology* **43**, 599-626.
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Science*. **1**, 21–26.
- Demmig-Adams B, Winter K, Winkelmann E, Krüger A, Czygan FC (1989) Photosynthetic characteristics and the ratios of chlorophyll, β -carotene, and the components of the xanthophyll cycle upon a sudden increase in growth light regime in several plant species. *Botanica Acta* **102**, 319-325.
- Esteban R, Becerril JM, García-Plazaola JI (2009) Lutein epoxide cycle, more than just a forest tale. *Plant Signal Behaviour* **4**, 342–344.
- FAOSTAT (2014) Wheat – largest primary commodity.
<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/240943/>
 (Zugriff am 15.09.21).
- Fernández-Marín B, García-Plazaola JI, Hernández A, Esteban R (2018) Plant photosynthetic pigments: methods and tricks for correct quantification and identification. *Advances in plant ecophysiology techniques*. Springer, Berlin, 29-50.
- Filip M, Vlassa M, Copaciu F, Coman V (2012) Identification of anthocyanins and anthocyanidins from berry fruits by chromatographic and spectroscopic techniques to establish the juice authenticity from market. *Journal of Planar Chromatography* **25**, 534-541.
- García-Plazaola JI, Matsubara S, Osmond CB (2007) The lutein epoxide cycle in higher plants: its relationship to other xanthophyll cycles and possible functions. *Functional Plant Biology* **34**, 759-773.
- Gilmore AM (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* **99**, 197-209.
- Giossi C, Cartaxana P, Cruz S (2020) Photoprotective role of neoxanthin in plants and algae. *Molecules* **25** (20), 4617.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 655–684.
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, 182-193.

- Kleinig H (1977) Das Experiment: Dünnschichtchromatographie der lipophilen Blattpigmente. *Biologie in unserer Zeit* **7** (3), 94-95.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F (1999) Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology* **119**, 1091-1099.
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 633-662.
- Lu C, Lu Q, Zhang J, Kuang T (2001) Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1805-1810.
- Lu Q, Wen X, Lu C, Zhang Q, Kuang T (2003) Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 749-754.
- Mozzo M, Dall'Osto L, Hienerwadel R, Bassi R, Croce R (2008) Photoprotection in the antenna complexes of photosystem II: role of individual xanthophylls in chlorophyll triplet quenching. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 6184–6192.
- Pfündel E, Bilger W (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynthesis Research* **42**, 89–109.
- Popova AV (2017) Spectral characteristics and solubility of beta-carotene and zeaxanthin in different solvents. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles* **70**, 53-60.
- Powles SB, Björkman O (1981) Leaf movement in shade species *Oxalis oregana*. Role in protection against injury by intense light. *Year Book – Carnegie Institution of Washington* **80**, 63-66.
- Rodriguez-Amaya DB, Kimura M (2004) HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. *HarvestPlus Technical Monograph* **2**.
- Siefermann-Harms D (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum* **69**, 561-568

- Sivathanu B, Palaniswamy S (2012) Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Biomedicine and Preventive Nutrition* **2**, 276-282.
- Tambussi EA, Casadesus J, Munné-Bosch S, Araus JL (2002) Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum): changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments. *Functional Plant Biology* **29**, 35-44.
- Thayer SS, Björkman O (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* **23**, 331-343.
- Universität Hamburg (1985) Dünnschichtchromatographie der Chloroplasten-Pigmente. *Kleines pflanzenphysiologisches Praktikum*. 29.
- Wulff G (1968) Dünnschichtchromatographie von Blütenfarbstoffen. *Chemie in unserer Zeit* **2** (5), 159-163.
- Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* **83**, 702-708.
- Zheng XT, Yu ZC, Tang JW, Cai ML, Chen YL, Yang CW, Chow WS, Peng CL (2020) The major photoprotective role of anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* under long-term high light treatment: antioxidant or light attenuator? *Photosynthesis Research* **149**, 24-40.

Anhang

Anhang 1: Maximale Absorptionswerte der untersuchten Pigmente Xanthophyll 1 und Xanthophyll 2. Angegeben sind zudem Mittel und Standardfehler.
Wdh, Wiederholung; Strd.fehler, Standardfehler.

Pigment	Blatt	Beleuchtung	Wdh.	Linie/Sorte															
				Apostel		9409		9402		9414		9410		9432					
				Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler
Xanthophyll 1	JVB	ja	1	0,056	0,0587	0,00165227	0,0579	0,057	0,00165025	0,0628	0,0625	0,00119304	0,0576	0,10356667	0,04497037	0,0583	0,14653333	0,08638994	0,056600001
			2	0,0584			0,0593			0,0644			0,0596			0,062			0,063100003
			3	0,0617			0,0538			0,0603			0,1935			0,3193			0,304699987
		nein	1	0,0595	0,0583	0,00064291	0,053	0,06093333	0,00753687	0,0562	0,05976667	0,00242647	0,0558	0,05713333	0,00070553	0,0566	0,05983333	0,00222586	0,0581
			2	0,0573			0,076			0,0587			0,0574			0,0641			0,057799999
			3	0,0581			0,0538			0,0644			0,0582			0,0588			0,059599999
	3. VB	ja	1	0,0552	0,05596667	0,00062272	0,0576	0,0584	0,00085049	0,0552	0,1534	0,09715189	0,0508	0,05183333	0,00055478	0,058	0,05616667	0,00116667	0,052999999
			2	0,0572			0,0575			0,0573			0,052			0,054			0,052999999
			3	0,0555			0,0601			0,3477			0,0527			0,0565			0,054099999
		nein	1	0,0573	0,05596667	0,00145182	0,0516	0,0584	0,00048419	0,0611	0,05633333	0,00227156	0,0524	0,05183333	0,00104934	0,0546	0,05616667	0,00043205	0,0517
			2	0,0562			0,053			0,0581			0,0559			0,0534			0,051800001
			3	0,061			0,0531			0,0533			0,0533			0,0552			0,058899999
Xanthophyll 2	JVB	ja	1	0,0557	0,06103333	0,00274125	0,0565	0,17016667	0,10552422	0,0604	0,07204444	0,05403336	0,0508	0,1456	0,08979735	0,0654	0,15543333	0,08759475	0,059599999
			2	0,0648			0,073			0,0606			0,0609			0,0703			0,07
			3	0,0626			0,38100001			0,2226			0,3251			0,33059999			0,408300012
		nein	1	0,072	0,06063333	0,00576262	0,0519	0,0541	0,00110151	0,0989	0,07256667	0,01318488	0,0549	0,05356667	0,00067659	0,0544	0,10063333	0,04258694	0,0546
			2	0,0566			0,0551			0,0582			0,0527			0,0618			0,058899999
			3	0,0533			0,0553			0,0606			0,0531			0,1857			0,056899998
	3. VB	ja	1	0,056	0,0544	0,00080829	0,0544	0,0548	0,00077675	0,0598	0,05806667	0,00126667	0,0532	0,0628	0,01087397	0,0623	0,05786667	0,00231397	0,057300001
			2	0,0538			0,0563			0,0588			0,0507			0,0568			0,052000001
			3	0,0534			0,0537			0,0556			0,0845			0,0545			0,054499999
		nein	1	0,0525	0,0523	0,0007	0,0502	0,0513	0,0010504	0,0576	0,05426667	0,00196412	0,0584	0,0551	0,00136382	0,0625	0,05623333	0,00316719	0,051199999
			2	0,051			0,0503			0,0544			0,0539			0,0523			0,052200001
			3	0,0534			0,0534			0,0508			0,053			0,0539			/

Anhang 2: Maximale Absorptionswerte der untersuchten Pigmente Xanthophyll 3 und Carotin. Angegeben sind zudem Mittel und Standardfehler. Wdh, Wiederholung; Strd.fehler, Standardfehler.

Pigment	Blatt	Beleuchtung	Wdh.	Linie/Sorte																	
				Apostel		9409		9402		9414		9410		9432							
				Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler	Mittel	Strd.fehler						
Xanthophyll 3	JVB	ja	1	0,0998	0,11626667	0,01344028	0,0657	0,13446667	0,06534703	0,1053	0,18436667	0,06598208	0,0654	0,11596667	0,03368404	0,1042	0,19333333	0,07664325	0,057999998	0,0784	0,01144727
			2	0,1429		0,0726			0,13240001			0,1027			0,12989999			0,097599998			
			3	0,1061		0,2651			0,3154			0,1798			0,3459			0,079599999			
		nein	1	0,0979	0,1122	0,00715705	0,0783	0,0848	0,00440492	0,0553	0,0974	0,02253819	0,0644	0,1502	0,0723	0,0787	0,1015	0,0123887	0,0614	0,07693334	0,00802524
			2	0,1188			0,0932			0,1045			0,0923			0,1213			0,088200003		
			3	0,1199			0,0829			0,13240001			0,29390001			0,1045			0,081200004		
	3. VB	ja	1	0,0975	0,1109	0,00708684	0,0866	0,0837	0,01212477	0,1095	0,10746667	0,00674545	0,0746	0,06673333	0,00444872	0,1305	0,09673333	0,01694249	0,082900003	0,071	0,00618897
			2	0,1136			0,1031			0,118			0,0592			0,0823			0,068000004		
			3	0,1216			0,0614			0,0949			0,0664			0,0774			0,062100001		
		nein	1	0,1276	0,12796666	0,00672863	0,0899	0,08005	0,00985	0,1033	0,0893	0,01060566	0,0763	0,0772	0,0059925	0,0978	0,0897	0,00428991	0,0766	0,0683	0,00488091
			2	0,1165			/			0,0961			0,0673			0,0832			0,068599999		
			3	0,1398			0,0702			0,0685			0,088			0,0881			0,059700001		
Carotin	JVB	ja	1	0,0854	0,09803333	0,00869527	0,0648	0,07413333	0,00664764	0,0966	0,14853334	0,05044077	0,0627	0,11983334	0,0432304	0,0939	0,1368	0,03608033	0,074299999	0,1496	0,07365616
			2	0,1147			0,087			0,0996			0,0922			0,108			0,077600002		
			3	0,094			0,0706			0,2494			0,20460001			0,2085			0,296900004		
		nein	1	0,0861	0,09256666	0,00429625	0,0702	0,07706667	0,00430555	0,0812	0,088	0,00582866	0,0627	0,0738	0,00867583	0,0726	0,08523333	0,00643748	0,060600001	0,07136667	0,00722642
			2	0,0909			0,076			0,0832			0,0678			0,0894			0,068400003		
			3	0,1007			0,085			0,0996			0,0909			0,0937			0,085100003		
	3. VB	ja	1	0,0665	0,08013333	0,0088405	0,07	0,07026667	0,00438989	0,0879	0,08746667	0,00280852	0,0817	0,0652	0,00825409	0,1132	0,11196667	0,01614872	0,083700001	0,07473333	0,00466774
			2	0,0967			0,078			0,0921			0,0574			0,0834			0,072499998		
			3	0,0772			0,0628			0,0824			0,0565			0,1393			0,068000004		
		nein	1	0,1011	0,09276666	0,00769249	0,0768	0,07806667	0,0082228	0,0879	0,08746667	0,00280852	0,0638	0,06506667	0,0007513	0,0786	0,0693	0,00501431	0,067299999	0,06626667	0,00674595
			2	0,0998			0,0929			0,0921			0,065			0,0679			0,077399999		
			3	0,0774			0,0645			0,0824			0,0664			0,0614			0,054099999		

Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Asch für die Ermöglichung dieser Bachelorarbeit in dem von ihm geleiteten Fachgebiet, für die Beantwortung meiner Fragen sowie für die Ratschläge.

Außerdem möchte ich Dipl.-Agr.Biol. Julia Asch für ihre tatkräftige Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor und im Gewächshaus danken und darüber hinaus für ihre Zeit, ihre Ideen und ihr offenes Ohr während der Verschriftlichung dieser Arbeit.