



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7128

**Pflanzenphysiologische
Untersuchungen der
nichtparasitären
Blattverbräunung
der Sommergerste
*Hordeum vulgare L.***

M. Zahn

Institut für Meteorologie und Klimaforschung

Juli 2005

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7128

**Pflanzenphysiologische Untersuchungen der
nichtparasitären Blattverbräunung der
Sommergerste *Hordeum vulgare* L.**

Martina Zahn

Institut für Meteorologie und Klimaforschung

von der Fakultät für Biologie
der Universität Freiburg im Breisgau genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2005

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071281

Pflanzenphysiologische Untersuchungen der
nichtparasitären Blattverbräunung der Sommergerste
Hordeum vulgare L.

Martina Zahn

Oktober 2004

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Biologie der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Dekan der Fakultät für Biologie	Prof. Dr. G. Fuchs
Betreuer an der Fakultät	Prof. Dr. E. Wagner
Betreuer der praktischen Arbeit	PD Dr. J.-P. Schnitzler
Koreferent	Prof. Dr. H. Rennenberg

Tag der mündlichen Prüfung	11. Februar 2005
----------------------------	------------------

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die nichtparasitär bedingte Blattverbräunung (NBV) bei der Sommergerste *Hordeum vulgare* L. untersucht. Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, durch welche Faktoren die NBV ausgelöst wird. Ausgangspunkt für die Versuche waren Beobachtungen, die zur allgemeinen Hypothese führten, dass es sich bei der NBV um eine Blattschädigung durch oxidativen Stress handelt. Es sollte geprüft werden, wie Stress in verschiedenen Kultivaren der Gerste gegebenenfalls zu NBV führt. Hierzu wurden in Klimakammerexperimenten verschiedene Umweltbedingungen simuliert, um den Einfluss von hohen Bestrahlungsstärken und erhöhten Ozonbelastungen auf die Entstehung der NBV zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse aus den Kammerversuchen konnte gezeigt werden, dass der Photonenfluss eine entscheidende Rolle spielt. So wurden bei dem Gerstenkultivar cv. Ricarda als Repräsentant einer bezüglich NBV empfindlichen Sorte, eine signifikant höhere Superoxidanion-Radikal Verteilung nachgewiesen als beim resistenten Zuchtstamm IPZ 24727. Die NBV war insgesamt bei den Versuchspflanzen, die erhöhten Bestrahlungsintensitäten ausgesetzt waren, stärker ausgeprägt. In Freilandversuchen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass lichtzugewandte Blätter höhere Schädigungen zeigten als Schattenblätter. Zwischen Ozon und der Blattverbräunung konnte kein direkter Zusammenhang gefunden werden. Die Frage, ob es entscheidend ist, zu welchem Entwicklungsstadium ein Faktor wie Strahlung oder Ozon auf die Pflanzen in besonderem Maße einwirkt, konnte aufgrund der geringen Zahl von (Freiland-) Versuchen nicht beantwortet werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die NBV sich immer zwischen den Entwicklungsstadien BBCH 53 und 56, d.h. zum Zeitpunkt des Ährenschiebens, schlagartig entwickelt. In diesem Zusammenhang wurde die Altersabhängigkeit der antioxidativen Schutzsysteme bei der Gerste näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Ascorbat und Glutathion mit zunehmendem Alter abnehmen, ebenso sinkt die Aktivität der Cu/Zn-SOD in den Chloroplasten. Parallel dazu wurde auch eine Abnahme der Superoxidanion-Radikal Verteilung zwischen BBCH 49 und 55 beobachtet. Möglicherweise treten die Pflanzen zu diesem Zeitpunkt in die vegetative Phase ein, in der die älteren Blätter bei geregelter Seneszenz ihre Ressourcen für die Samenbildung bereitstellen. Aus den oben geschilderten Ergebnissen und den von BEHN, 2003, gemachten Beobachtungen mit *mlo*-Gerstensorten,

mehltauresistenten Kultivaren, die ein verfrühtes Seneszenzverhalten zeigen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Empfindlichkeit gegenüber NBV eng verbunden ist mit dem Seneszenzverhalten der verschiedenen Sorten. Da seneszente Pflanzen möglicherweise empfindlicher gegenüber oxidativem Stress sind, reagieren sie auch empfindlicher auf erhöhte Strahlung und sind eher bereit, NBV zu manifestieren. Die Untersuchungen zur Entstehung von oxidativem Stress sollten auch klären, ob die bei den einzelnen Sorten unterschiedlich starke Ausprägung der Blattschädigung auf eine Überproduktion an ROS oder eine schlechtere „Entgiftung“ derselben zurückzuführen ist. Hierzu wurden die antioxidativen Schutzsysteme der einzelnen Kultivare geprüft. Es zeigte sich, dass IPZ 24727 eine geringere Radikal Verteilung in den Blättern als *cv. Ricarda* aufwies, was auf die höheren Cu/Zn-SOD-Aktivitäten in IPZ 24727 zurückgeführt wurde. Diskussionen über die Beteiligung von Pilzbefall mit *Ramularia collo-cygni* an der Entstehung von NBV waren Anlass zu mikroskopischen Untersuchungen von geschädigten Blättern. Es konnten keine Hinweise auf eine Pathogenbeteiligung gefunden werden. Auch die Ergebnisse aus der Untersuchung der Genexpression von ESTs pathogen-relevanter Stoffwechselwege unterstützen die These, dass es sich bei NBV um eine nichtparasitäre Blatterkrankung handelt. Diese molekularbiologischen Versuche waren durchgeführt worden, um nach Unterschieden in der Genexpression stressrelevanter Stoffwechselwege zwischen den Kultivaren zu suchen. Die höhere Expression der Chitinase-ESTs der *cv. Ricarda* gab einen weiteren Hinweis darauf, dass diese Sorte schon in einem früheren Entwicklungsstadium als IPZ 24727 einem oxidativen Stress ausgesetzt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Annahme, dass es sich bei der NBV um eine durch oxidativen Stress hervorgerufene Blattschädigung handelt, die durch Umweltbedingungen erzeugt wird, bei denen Licht eine entscheidende Rolle spielt. Die Phytokammerexperimente zeigten, dass UV-B-Strahlung allerdings als alleiniger Verursacher dieses Stresses genauso ausgeschlossen werden kann wie Ozon. Vielmehr ergeben Strahlung, Luftschadstoffe, eventuell auch die Temperatur zusammen ein Szenario, gegen das Sorten, die zu einer früh einsetzenden Seneszenz neigen und daher empfindlich gegen oxidativen Stress sind, nur ein schwächer arbeitendes antioxidatives System entgegensetzen können als resistente Sorten. ROS werden in den empfindlichen Kultivaren unzureichend abgebaut und bewirken so eine stärkere Ausprägung der NBV. Möglicherweise ist eine frühe Blütenbildung bei geringerer Biomasse der Pflanzen eine Prädisposition für NBV. Zur Klärung dieser Frage sind weiterführende Experimente zu möglichen Unterschieden im Blühverhalten von Sommer- und Wintergerste angezeigt.

Plantphysiological investigations of non-parasitic leaf spots of barley
***Hordeum vulgare* L.**

Abstract

Non-parasitic leaf spots (NPLS) of barley cultivars *Hordeum vulgare* L. are a leaf damage which has been observed only in the last fifteen years. It is unknown what the main reasons for these damages may be. The hypothesis that oxidative burst is the origin for these spots relies on the observation that they mostly occur when the radiation is high and the plants are in a defined stage of development. Several trials in climate chambers were made to investigate the development of the NPLS. For this reason the plants underwent different conditions, like enhanced sun radiation and high ozone concentrations. It could be demonstrated that the photon flux is important for the spot formation. In comparison to the resistant cultivar IPZ 24727 a significant higher level of superoxide anion radicals was found in the sensitive NPLS cultivar *cv.* Ricarda. Leafs of barley plants developed much more NPLS than the control plants when they were tested under high radiation conditions during the experiments. This observations were also made in freeland trials. There was no correlation found between higher ozone concentrations and the development of NPLS, but between stage of development of the barley and decrease of the spots. Even when the ears began to arise the spots developed very quickly. In view of this observation the antioxidative systems were analyzed. The concentrations of ascorbat and glutathione decreased with growing age like the enzyme activity of Cu/Zn-SOD in the chloroplasts. A decrease of superoxide anion radicals was observed when the plants are grew older. In this stage of development it may be that the older leafs switch over to put their supply at seed's disposal. The hypothesis is that cultivars which are sensitive regarding to NPLS getting senescent earlier than the resistant cultivars. In this stage of development the plants are more sensitive against oxidative burst and it may be that they react to high radiation with a marked manifestation of spots.

The results of this investigations strengthen the assumption that the main reason for NPLS is an oxidative burst which is generated by enviromental conditions. Radiation is an important factor but not the only one. In the NPLS sensitive cultivars ROS were'nt reduced in the way of the resistant cultivars because of an lower enzyme activity of Cu/Zn-SOD.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1 Geschichtliche Entwicklung der Gerste in der Landwirtschaft.....	1
1.2 Entdeckung der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung der Gerste.....	2
1.3 Strahlung, Ozon und oxidativer Stress.....	6
1.4 Antioxidative Schutzsysteme der Pflanze.....	14
1.5 Ziele der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Pflanzenmaterial.....	21
2.2 Bezeichnung der Pflanzenentwicklungsstadien.....	22
2.3 Experimente in den Sonnensimulatoren.....	25
2.3.1 Anzucht.....	25
2.3.2 Aufbau der Sonnensimulatoren.....	26
2.3.3 Experimentelles Design.....	28
2.4 Freilandexperimente.....	31
2.4.1 Anzucht.....	31
2.4.2 Versuchsflächen der LfL bei Frankendorf.....	33
2.4.3 Aufzeichnung der Klimadaten.....	33
2.4.4 Experimentelles Design.....	34
2.4.4.1 Landessortenversuche.....	34
2.4.4.2 Sortenvergleich cv. Ricarda und IPZ 24727.....	35
2.5 Probennahme.....	36
2.6 Bonitur.....	36
2.7 Mikroskopische Untersuchungen der NBV.....	37
2.7.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	37
2.8 Biochemische Methoden.....	38
2.8.1 <i>In situ</i> Färbung auf Superoxidation-Radikale mit NBT.....	38

2.8.2 Bestimmung von Antioxidantien.....	39
2.8.2.1 Herstellung des Blattextraktes.....	39
2.8.2.2 Messung von Ascorbat.....	39
2.8.2.3 Messung von Glutathion und Cystein.....	40
2.8.2.4 Wiederfindung extrahierter Antioxidantien.....	43
2.8.3 Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität.....	44
2.8.3.1 Herstellung des Blattextraktes.....	44
2.8.3.2 Spektralphotometrische Bestimmung der SOD-Enzymaktivität.....	44
2.8.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD.....	48
2.9 Molekularbiologische Methoden.....	49
2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Gerstenblättern.....	49
2.9.2 Spektralphotometrische und gelelektrophoretische Bestimmung der Reinheit und Ausbeute der Gesamt-RNA.....	51
2.9.3 Messung differentieller Genexpression mittels „cDNA-Array“- Technologie.....	52
2.9.3.1 Auswahl spezifischer ESTs aus der Datenbank der IPK Gatersleben.....	54
2.9.3.2 Herstellung der Gensonden über PCR.....	56
2.9.3.3 Aufbringen der Sonden auf die Membran.....	57
2.9.3.4 Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA und markieren mit ³³ P.....	58
2.9.3.5 Hybridisierung der Membran mit ³³ P-markierter cDNA.....	59
2.9.3.6 Auswertung der „cDNA-Arrays“.....	60
2.10 Datenverarbeitung und Statistik.....	61
2.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	62
3. Ergebnisse.....	64
3.1 Validierung des RanSOD-Testes für die Bestimmung von SOD aus Pflanzen- extrakten.....	64
3.2 Abgrenzung der NBV von anderen Blatterkrankungen der Gerste.....	68
3.3 Experimente im Sonnensimulator mit zwei unterschiedlich NBV-sensitiven Gerstenkultivaren.....	70
3.3.1 Einfluss der Bestrahlungsstärke auf die NBV und das antioxidative System.....	70
3.3.1.1 Auftreten der NBV.....	70
3.3.1.2 Häufigkeitsverteilung der Superoxidanion-Radikale in unterschiedlich lichtexponierten Blattbereichen.....	71

3.3.1.3 Verteilung der Superoxidanion-Radikale in Blättern unterschiedlicher Entwicklungsstadien.....	73
3.3.1.4 Ascorbat und Glutathionkonzentrationen.....	74
3.3.1.5 SOD-Aktivitäten.....	75
3.3.2 Einfluß von Ozon auf die NBV und das antioxidative System.....	76
3.3.2.1 Auftreten der NBV.....	76
3.3.2.2 Verteilung der Superoxidanion-Radikale im Blatt.....	77
3.3.2.3 Ascorbat und Glutathionkonzentrationen.....	78
3.3.2.4 SOD-Aktivitäten.....	79
3.4 Freilandversuche in Frankendorf mit unterschiedlich empfindlichen Sommergerstenkultivaren.....	81
3.4.1 Landessortenversuche 2000 - 2002.....	81
3.4.1.1 Globalstrahlung und Temperaturverlauf.....	81
3.4.1.2 Landessortenversuch 2000.....	84
3.4.1.3 Landessortenversuch 2001.....	87
3.4.1.4 Landessortenversuch 2002.....	90
3.4.1.5 Vergleich Tag-Nacht.....	93
3.4.2 Entwicklungsabhängige Untersuchungen an IPZ 24727 und <i>cv.</i> Ricarda.....	95
3.4.2.1 Zeitliche Entwicklung der NBV.....	95
3.4.2.2 Altersabhängige Verteilung der Superoxidanion Radikale im F-1 Blatt.....	96
3.4.2.3 Verlauf der Ascorbat- und Glutathion-Konzentrationen im F-1 Blatt.....	97
3.4.2.4 Verlauf der SOD-Aktivitäten im F-1 Blatt.....	98
3.4.2.5 Verlauf der Genexpression stressrelevanter ESTs.....	100
3.4.2.5.1 Expressionsmuster von ESTs aus dem antioxidativen Stoffwechsel....	108
3.4.2.5.2 Expressionsmuster von ESTs aus dem Phenylpropan- und Flavonoid-Stoffwechsel.....	112
3.4.2.5.3 Expressionsmuster von pathogen-relevanten ESTs.....	114
4. Diskussion.....	117
4.1 Nichtparasitäre Blattverbräunung – Abgrenzung zu pathogen bedingten Blatterkrankungen.....	117
4.2 Strahlung als primärer Faktor für die Induktion der NBV.....	119
4.3 Interaktion mit Ozon.....	123

4.4 Auftreten der NBV in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium – NBV und Seneszenz – Eine Frage der Photoperiode?.....	125
4.5 Bedeutung des Antioxidativen Stoffwechsels für die Kultivarempfindlichkeit – Rolle der Cu/Zn-SODs.....	126
4.6 Ausblick.....	129
5. Literatur.....	131
6. Anhang.....	141
6.1 Einteilung der Entwicklungsstadien bei Getreide nach BBCH.....	141
6.2 Bonitur: Klassifizierung der Blattschäden.....	143
6.3 RNA-Isolierung mit Nucleon PhytoPure Extraction Kit, nach KIEFER ET AL, 2000 und nach CHANG ET AL, 1993.....	145
6.4 Übersicht über die relativen Expressionen aller untersuchten ESTs.....	148

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BBCH	Entwicklungsstadien landwirtschaftlich genutzter Nutzpflanzen, festgelegt von der <u>B</u> iologischen Landesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, <u>B</u> undessortenamt und der <u>c</u> hemischen Industrie (Bayer, BASF, Ciba, Hoechst) Siehe Anhang
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cDNA	komplementäre DNA
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
cpm	counts per minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat (RNAse – Inhibitor)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein, Strahlungseinheit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG	Frischgewicht
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, 9.81 m s^{-2}
GSH	reduziertes Glutathion
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IFU	Institut für Atmosphärische Umweltforschung
IMK	Institut Meteorologie und Klimaforschung
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPZ	Institut für Pflanzenzucht
IP	Spektralbereich der Infrarot-Strahlung (>780 nm)

λ	Wellenlänge des Lichtes
LfL	Landesanstalt für Landwirtschaft
LiCl	Lithiumchlorid
LSV	Landessortenversuch
M	Molar
μCi	Mikro-Curie
min	Minute
mM	Millimolar
mmol	Millimol (10^{-3} mol)
μmol	Mikromol (10^{-6} mol)
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau - Tetrazoliumchlorid
NBV	Nichtparasitär bedingte Blattverbräunung
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
$\text{OD}_{x\text{nm}}$	O ptische D ichte bei einer Wellenlänge von x nm
ODS	O cta – D ecyl - S ilicium
PAR	p hotosynthetic a ctive r adiation (Photosynthetisch aktive Strahlung), $\lambda = 400\text{-}700$ nm
PCR	p olymerase c hain r eaction (Polymeraseketten-Reaktion)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
PVP	Polyvinylpyrrolidone
r^2	Regressionskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	R eactive O xygen S pecies
σ	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Natriumcitrat
SOD	Superoxiddismutase

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UV-A, -B, -C	Ultraviolettes Licht: UV-A = 380-315 nm UV-B = 315-280 nm UV-C = 280-100 nm
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	Sichtbarer Spektralbereich der Solarstrahlung (380-780 nm)
W m ⁻²	Einheit Bestrahlungsstärke: Watt pro Quadratmeter
w/v	Gewicht pro Volumen

1.Einleitung

1.1 Geschichtliche Entwicklung der Gerste in der Landwirtschaft

„...das Grasz der Gersten ist breyter, vnd freydiger anzusehen, dann des Weyszens.“

H. Bock, Kreutterbuch, 1539

Die Gerste (*Hordeum* L.) ist von allen Getreidesorten diejenige, die am frühesten in Kultur genommen wurde. Ursprünglich aus dem vorderasiatischen Raum stammend, ist die Gerste als Kulturpflanze ca. 5000 v. Chr. bei den Sumerern angebaut worden und hat sich dann im Nahen Osten und Mitteleuropa, später auch im Fernen Osten und, nach Columbus, in Amerika verbreitet. Als Wildgräser waren jene Gerstensorten verbreitet, die ihr Korn besonders gut verteilen konnten, d.h. vor allem Sorten mit sehr leicht loszulösendem Korn. Durch die Kultivierung wurden Sorten selektiert, die ihr Korn bis in das Reifestadium hinein in der Ähre hielten (RAVEN, 2000). Heute wird Gerste hauptsächlich in gemäßigtem Klima angebaut, allerdings weiter südlich und nördlich als z. B. der Roggen und auch in den Subtropen und Hochlagen der Tropen, wie den Anden.

Man unterscheidet zwischen zwei Formen der Gerste, der zweizeiligen (*Hordeum distichon* L., Abb. 1.1) und der vielzeiligen Gerste (*Hordeum vulgare* L.), beiden Formen liegt der gleiche Bauplan zugrunde. Die zweizeilige Gerste besitzt größere Körner und bringt nur zwei Reihen von Früchten hervor, während die vielzeiligen Formen kleinere Körner haben und vier bis sechs Reihen von Früchten bilden (AICHELE, 1991).



Abb. 1.1: *Hordeum distichon* L. (Gramineae) aus THOME, 1885.

In Mitteleuropa erfolgen im Jahr zwei Aussaaten, die der Winter- und der Sommergerste. Die Sommergerste, welche meist aus zweizeiligen Sorten gezüchtet wird, reift in ca. 95 Tagen auch bei mäßigen Temperaturen, während die Wintergerste, meist vielzeilige Sorten, eine längere Vegetationsphase und mehr Wärme beansprucht. Daher ist das Anbaugebiet der Sommergerste weiträumiger, so findet man Anbaufelder der Sommergerste von Nordafrika bis hoch nach Skandinavien. Die Aussaat findet bei der Wintergerste Ende September, bei der Sommergerste im März-April statt, die Ernte erfolgt bei Gelb- bis Vollreife nach ca. 3 Monaten. Wintergerste liefert 10-40 dt/ha, Sommergerste 7-36 dt/ha.

Der wirtschaftliche Nutzen der Gerste liegt in drei Bereichen: 1) dient sie in vielen „Dritte Welt Ländern“ immer noch als Brotgetreide bzw. liefert Graupen und Grütze für Brei und Suppen, 2) wird die Gerste, und hier speziell die Wintergerste, als Futtermittel für die Schweine- und Geflügelmast angebaut und 3) findet die Sommergerste als Braugerste Verwendung. Für die Bierherstellung werden Sorten verwendet, die über ein besonders volles Korn, geringen Eiweißgehalt (möglichst unter 9 %) und hohen Stärkeanteil (über 65 %) verfügen. Für die Bierbrauerei liefert die Gerste das Malz, rund 10 % der Gerstenweltermte werden hierfür genutzt, wobei 1 t Ernte ca. 750 kg Malz ergeben, bzw. 40 hl Bier (AICHELE, 1991). Die Braugerste hat einen hohen wirtschaftlichen Stellenwert und man ist bemüht, die Qualität und den Ertrag der Ernte stetig zu verbessern. Zu diesem Zweck werden in Deutschland an den Landesanstalten für Landwirtschaft und bei privaten Züchtern neue Sorten gezüchtet, die den Anforderungen an steigenden Ertrag und neuerdings auch an die sich verändernden Umweltbedingungen gerecht werden. Bis eine neue Sorte allerdings auf dem Markt erscheint, dauert es mitunter 10 Jahre.

1.2 Entdeckung der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung der Gerste

Seit ungefähr zwanzig Jahren beobachten Landwirte in verschiedenen Regionen Europas, in den USA, Kanada und Australien bei Winter- und Sommergerste Blattschäden, deren Ursache noch nicht eindeutig geklärt ist. Ganz offensichtlich handelt es sich um eine sehr komplexe Schadensentwicklung, für die als abiotische Faktoren Strahlung, Temperatur, Luftschadstoffe, Schwermetalle, und sowohl Nährstoffmangel als auch -überangebot diskutiert werden (WU ET AL., 2001). So ist von einzelnen Gerstensorten bekannt, dass sie generell sensitiv gegenüber

Ozon reagieren (TIEDEMANN & WU, 2001). In Deutschland werden die Symptome vermehrt in den letzten zehn Jahren beobachtet, wobei vor allem Gebiete mit hoher Globalstrahlung betroffen sind (BAUMER ET AL, 2001). Für das Land Bayern heißt das, dass im ost- und nordbayrischen Mittelgebirge weniger Schäden auftreten, während im schwäbischen-, ober- und niederbayerischen tertiären Hügelland, auf dem fränkischen Jura und in den mittelfränkischen Keupergebieten beträchtliche Schäden entstehen. Die Schäden zeigen sich in Form von Chlorosen, die sich innerhalb weniger Tage zu Nekrosen entwickeln (Abb. 1.2).



Abb. 1.2: Nichtparasitär bedingte Blattverbräunung am F-1 Blatt der *cv.* Barke am 09. Juli 2002 im Entwicklungsstadium BBCH (nach dem Getreide-Code der Biologischen Landesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und der chemischen Industrie, s. 6.1) 75.

Wenn man sich die Blattnekrosen im Zusammenhang mit den Entwicklungsstadien der Pflanze betrachtet, so treten die sogenannten Blattverbräunungen nach dem Erreichen des Fahnenblatt-Stadiums (BBCH 39, siehe Anhang 6.1) in den oberen Blattetagen des Getreides auf und entwickeln sich von punktförmigen Aufhellungen der Blattspreite innerhalb weniger Tage zu Sprekelnekrosen. Betroffen sind zunächst die lichtexponierten Blattbereiche, die Kulminationspunkte der älteren Blätter. Die Nekrosen werden schnell größer und zerstören weite Areale des photosynthetisch aktiven Blattgewebes (Abb. 1.2 und 1.3). Bis zur Milchreife sind die Schäden über das Fahnenblatt und die Blattscheide bis in die Spitze der Pflanze vorgedrungen, die Grannen bleichen aus, das Korn wird nicht mehr ausreichend versorgt und die Pflanzen reifen 2-3 Wochen früher ab. Diese Pflanzen sind „notreif“ und liefern eine schlechte Kornqualität (OBST ET AL., 2001, BEHN ET AL., 2002).



Abb. 1.3: Senescente F-2 Blätter der Sorten *cv.* Barke (links) und IPZ 24727 (rechts). Auch auf den abgestorbenen Blättern ist die NBV noch gut zu erkennen. Die Musterung der Barke-Blätter zeigt die punktförmigen Nekrosen während auf den Blättern der resistenten IPZ 24727 keine Verbräunungen sichtbar sind.

Durch die Nekrosen, die in dieser Entwicklungsphase auch die Halme befallen haben, wird das Stroh brüchig und es kommt zum Halmknicken. An besonders betroffenen Standorten wurden bei der Sommergerste Ernteverluste bis zu 22 % verzeichnet, bei der Wintergerste sogar bis zu 45 % (BAUMER ET AL., 2001). Die angebauten Gerstensorten sind unterschiedlich empfindlich (Abb. 1.4) gegenüber dieser als „Teerflecken“, „unspezifisch bedingte Blatflecken“ oder „nichtparasitär bedingter Blattverbräunung“ (NBV) bezeichneten Krankheit (OBST ET AL., 2001). Die Braugerste *cv.* Barke z. B. ist dafür bekannt, dass sie sehr stark durch die NBV geschädigt wird (Abb. 1.3), während der Zuchtstamm IPZ 24727 wenig Symptome zeigt (LfL, 2002).

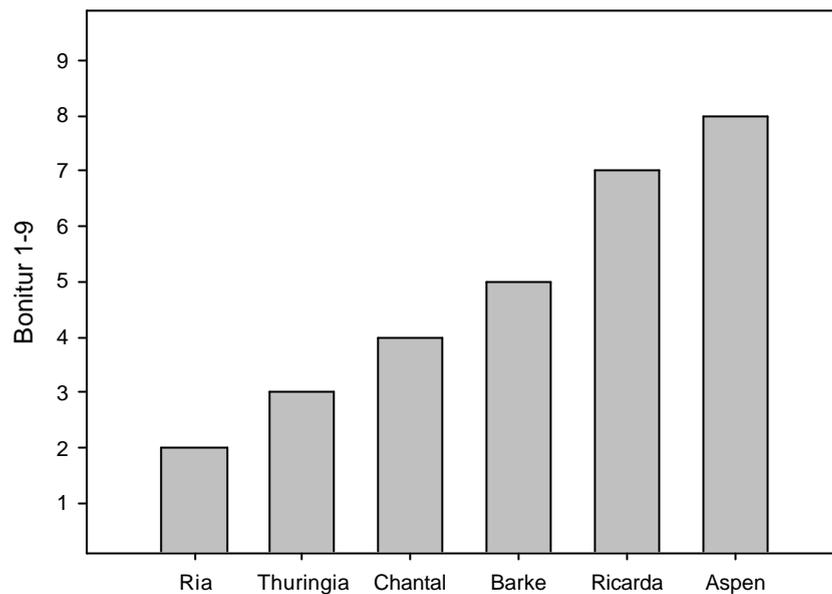


Abb. 1.4: Bonituren der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung bei der Sommergerste im Jahr 2000. Quelle: Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), München, Frankendorf Bonitur am 20.06.2000 bei F-1. Die Boniturstufen 1-9 geben den Befallsgrad der Pflanzen an.

Unklar war bisher, ob es sich hierbei um eine Pilzerkrankung der Pflanzen handelt oder um eine Schädigung der Zellen bedingt durch nichtparasitäre Einflüsse. Da man die Erkrankung sehr leicht mit den von *Ramularia collo-cygni* hervorgerufenen Schäden verwechseln kann, hielt man sie lange Zeit für ein und dieselbe Erkrankung (SACHS, 2000). In den Anfangsstadien kann es weiterhin zur Verwechslung mit der Netzfleckenkrankheit (*Drechslera teres*), Mehltauabwehrnekrosen oder Mangan- bzw. Magnesiummangelsymptomen kommen. Untersuchungen hinsichtlich dieser Krankheiten haben aber ergeben, dass keiner dieser Krankheitserreger bzw. keine Mangelerscheinungen beim Auftreten der Blattverbräunungen nachgewiesen werden konnten (WU ET AL, 2001). Ist die Pflanze durch die NBV geschwächt, kommt es oft zu einer Sekundärinfektion durch den Schwächeparasiten *Ramularia collo-cygni* (LfL, 2002).

Ein anderer Aspekt ist, dass eine schwach negative Korrelation festgestellt werden konnte zwischen mehltauresistenten Sorten und einer leicht erhöhten Tendenz zur Blattverbräunung sowohl in Mecklenburg-Vorpommern (TIEDEMANN ET AL, 2001) als auch in Bayern (mündliche Mittel. BEHN).

Ausgehend von diesem Erkenntnisstand, liegt der Schluss nahe, die Ursache für die NBV in einem abiotischen Stress zu suchen. Da die Schäden an den lichtzugewandten Blatteilen

zuerst auftreten, ist ein Hauptfaktor in der Strahlung zu vermuten. In den vergangenen Jahren wurde beobachtet, dass die Symptome besonders stark ausgeprägt waren, wenn ein extremer Strahlungswechsel erfolgt, wie es nach langen Regenperioden durch hohe Sonneneinstrahlung geschehen kann (OBST ET AL., 2001). Diese Konstellation, extreme Wetterlage zu einem Entwicklungsstadium, in dem die Pflanzen vom vegetativen zum generativen Wachstum übergehen, wird als Ursache für die NBV beschrieben (BAUMER ET AL., 2001).

Durch die geringen Strahlungsintensitäten während der Schlechtwetterperiode reduzieren die Pflanzen ihre Wachsschicht und den Anthocyangehalt der Epidermis. Kommt es nun zu Starklichtgeschehen, so ist die Pflanze nicht ausreichend geschützt und die Zellen können durch zu hohe UV-B-Strahlung geschädigt werden (BORNMAN ET AL., 1994). Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Gerstenblätter an den der Strahlung ausgesetzten Blattteilen, z. B. am Kulminationspunkt, an dem sich das Blatt dreht, den größeren Schaden aufweisen. Beschattete Blätter oder Blattunterseiten sind zum selben Zeitpunkt noch fast schadfrei. (HABERMEYER ET AL., 2002). Bislang ist aber wenig über die physiologischen Abläufe im Blatt, die zur NBV führen, bekannt. Dass die Ursache nicht allein in der Strahlung zu finden ist, legt die Beobachtung nahe, dass an Standorten in geringer räumlicher Entfernung große Unterschiede des Schadgeschehens festgestellt werden (OBST ET AL., 2001). Ein Zusammenspiel von Stressfaktoren wie hohe Temperaturen, Trockenheit und Ozon dürften bei der Entstehung der NBV eine entscheidende Rolle spielen.

1.3 Strahlung, Ozon und oxidativer Stress

Pflanzen vermögen durch die Photosynthese Strahlungsenergie in chemische Energie umzuwandeln. Strahlung ist somit Energiequelle auf der einen Seite (photoenergetische Wirkung), fungiert aber auch als entwicklungssteuernder Reiz (photokybernetische Wirkung) und als Belastungsfaktor (photodestruktive Wirkung) (LARCHER, 1994). Entscheidend für die Wirkung ist Dauer, Einfallrichtung und spektrale Zusammensetzung der Strahlung (Tab. 1.1) sowie das Entwicklungsstadium der Pflanze.

Spektralbereich	Wellenlänge [nm]	Strahlungswirkungen			
		Photosynthetisch	photomorphogenetisch	Photodestruktiv	thermisch
UV	100-400	Unbedeutend	Gering	Wirksam	Unbedeutend
PAR	400-710	Wirksam	Wirksam	Gering	Wirksam
NIR	710-4000	Unbedeutend	Wirksam	Unbedeutend	Wirksam
Langwellige Strahlung	3000-100000	Unbedeutend	Unbedeutend	Unbedeutend	Wirksam

Tab. 1.1: Spektralbereiche und Strahlungswirkungen auf Pflanzen nach ROSS, 1981.(LARCHER, 1994). UV: Ultraviolett, PAR: photosynthetisch wirksame Strahlung, NIR: Nahes Infrarot

Wenn man davon ausgeht, dass die NBV hauptsächlich durch die Strahlung verursacht wird, und von der Globalstrahlung der UV-Anteil photodestruktiv wirksam ist, ist es nötig, die Zusammensetzung und Wirkungsweise der UV-Strahlung näher zu betrachten. Des weiteren muss beachtet werden, dass bei zu starker Solarstrahlung die Pflanzen unter Lichtstress geraten und durch Photoinhibition geschädigt werden können.

Der UV-Anteil der Globalstrahlung lässt sich in drei Spektralbereiche untergliedern:

- 1) UV-C 100 – 280 nm
- 2) UV-B 280 – 320 nm
- 3) UV-A 320 – 400 nm

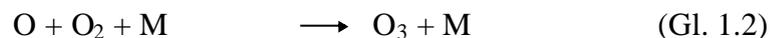
Die kurzwellige UV-C-Strahlung wäre für biologische Systeme der bedenklichste Bereich des Sonnenspektrums, da sie stark mit Proteinen und der DNA lebender Zellen wechselwirken könnte, würde sie nicht vollständig von der Atmosphäre absorbiert (ROZEMA ET AL, 1997). Das Gleiche gilt für die UV-B-Strahlung, allerdings wird diese hauptsächlich vom stratosphärischen (50-10 km Höhe) Ozon in der Erdatmosphäre absorbiert, das in den vergangenen Jahren nicht nur über der Antarktis merklich abgenommen hat (CALDWELL ET AL., 1994, TEVINI, 1995). Ozon absorbiert kürzere UV-B-Wellenlängen effektiver als längere, d.h. bei einer Verringerung der Ozonkonzentration in der Stratosphäre kommt es an der Erdoberfläche zu einer Verstärkung der UV-B-Strahlung zu kürzeren Wellenlängen hin (RUNECKLES ET AL, 1994). Des weiteren nimmt die Intensität der UV-B-Strahlung durch die Abnahme der Ozonschicht global zu (TEVINI, 1995). Die UV-A-Strahlung wird von der Atmosphäre nur in geringem Maße absorbiert und erreicht fast vollständig die Erdoberfläche, stellt aber aufgrund der geringeren Energie keine große Belastung für biologische Systeme dar.

Pflanzen sind aufgrund ihrer lichtabhängigen Lebensweise auf die Qualität der Strahlung angewiesen und werden als ortgebundene Organismen auch als erste durch Extremstrahlung geschädigt. Da die UV-B-Strahlung der Bereich des Sonnenspektrums ist, der sich am meisten verändert und den größten Schaden anrichten kann, stellt sich die Frage, wie UV-B-Licht auf Pflanzen wirkt. UV-B kann in einer Pflanze verschiedene Systeme beeinträchtigen, bzw. verändern (MAZZA ET AL., 1999, ROZEMA ET AL., 1997). Nukleinsäuren als Träger der Erbinformation können von der energetisch hohen Strahlung in einen angeregten Zustand versetzt werden, indem sie UV-B-Photonen absorbieren. Die Basenpaarstruktur der DNA wird hierbei zerstört, indem es zu Strangbrüchen und Dimerisierung der Thymingruppen kommt, was zu Transkriptionsdefekten führt (LARCHER, 1994, LOIS ET AL., 1994). Dies wiederum kann sich in einer Konzentrationsverringerung der Proteine bemerkbar machen. Absorption von UV-B-Strahlung kann aber auch indirekt zur DNA-Schädigung führen, indem durch Photooxidation freie Radikale gebildet werden (BJÖRN ET AL., 1996). Enzyme können unter UV-B-Einfluss ihre Aktivität bzw. Funktion verlieren. In den Zellmembranen kann durch Lipidperoxidation die Struktur so drastisch verändert werden, dass es zu einer Destabilisierung kommt, von der vor allem die Chloroplasten betroffen sind (KRAMER ET AL., 1991). Diese Schädigung kann zu einer verminderter Photosyntheseleistung führen (MAZZA ET AL., 1999; BORNMAN & TERAMURA, 1993).

Höhere Pflanzen werden durch zu hohe Strahlung einem Lichtstress ausgesetzt und reagieren mit enzymatischen und nicht-enzymatischen Schutz- und Reparaturmechanismen, auf die in Abschnitt 1.4 näher eingegangen wird. Ist das Gleichgewicht in der Elektronentransportkette gestört, so werden die Pflanzen durch Photodestruktion bzw. Photoinhibition geschädigt. Von Bedeutung ist in besonderem Maße die Photoinhibition, welche bei zuviel Sonneneinstrahlung die effektive photosynthetische Quantenausbeute massiv senkt. Nimmt die Bestrahlungsstärke ab, so erholt sich das System innerhalb weniger Stunden (BAKER ET BOWYER, 1994). Diese Leistungsminderung der Photosynthese liegt vermutlich in der reversiblen Schädigung des D1/D2-Proteinkomplexes im Photosystem II des Photosyntheseapparates durch das Starklichtgeschehen. Proteasen bauen den Komplex ab, wodurch es zu einer Verminderung des Elektronentransportes kommt, was wiederum als Schutzmechanismus der Pflanze gegen zu hohe Strahlung verstanden werden kann. Der D1/D2-Proteinkomplex wird durch Reparaturmechanismen der Pflanze wieder regeneriert.

Ozon

Wie oben erläutert, geht man heute von einer multifaktorellen Ursache für die Ausbildung von NBV-Symptomen aus. Neben der Strahlung ist Ozon ein Schadstoff, der mit zunehmender Industrialisierung eine wichtige Rolle im Stressgeschehen der Pflanzen spielt. Ozon (O₃), eine sehr reaktive und stark oxidierend wirkende Form des Sauerstoffs, ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Erdatmosphäre zur Abschirmung der schädlichen UV-Strahlung (UV-Absorption < 300 nm durch stratosphärisches Ozon (Gl. 1.3)). Ozon hat eine ambivalente Natur, es ist ein sehr giftiges Gas, dessen Geruch noch in sehr geringen Konzentrationen (2 ppm) wahrnehmbar ist, wodurch das Gas zu seinem Namen gekommen ist, οζον, das „Duftende“ (Holleman & Wiberg, 1985). In der Stratosphäre¹⁾ entsteht Ozon in einem photochemischen Prozess durch hohe Strahlungsintensitäten (UV-Licht), die Sauerstoffmoleküle in Sauerstoffatome spalten (Gl. 1.1), welche sich wiederum mit molekularem Sauerstoff zu Ozon addieren (Gl. 1.2):



M = Stickstoff als Stoßpartner

In der Troposphäre¹⁾ entsteht Ozon neben dem Eintrag durch Austausch mit der Stratosphäre (GUDERIAN, 1985) durch photochemische Oxidation als Nebenprodukt der Verbrennung fossiler Energieträger. Stickstoffdioxid (NO₂) zerfällt dabei unter Strahlungseinfluss in Stickstoffmonoxid (NO) und atomaren Sauerstoff (O) (Gl. 1.5).



¹⁾Man unterscheidet bei der Atmosphäre als unterste Schichten die Stratosphäre und die Troposphäre. Die verschiedenen Schichten werden nach ihrer vertikalen Temperaturverteilung eingeteilt. Die Troposphäre schwankt je nach Region zwischen 8 km Höhe (Polarregion) und 18 km (tropische Breiten), die Temperatur nimmt mit zunehmender Höhe ab. Troposphäre und Stratosphäre sind durch die sogenannte Tropopause voneinander getrennt. Die Stratosphäre dehnt sich bis zu einer Höhe von 50 km aus, die Temperatur nimmt in diesem Bereich mit zunehmender Höhe zu. Die Tropopause markiert das Temperaturminimum zwischen den beiden Schichten (WARNECK, 1988).

Oxidativer Stress

Pflanzen sind durch ihre Standortbindung darauf angewiesen, dass sie sich den Umweltbedingungen optimal anpassen können. Ändern sich diese aber zu schnell und in einem Maße, dass die Pflanze sie nicht mehr ausgleichen kann, weichen die Bedingungen zu sehr von den optimalen Lebensumständen ab, so entsteht für die Pflanze eine Stresssituation. Dies kann z. B. durch veränderte Lichtverhältnisse, Trockenheit oder Einengung durch konkurrierende Vegetation geschehen. Generell muss man zwei Stressgeschehen unterscheiden, den temporären und den permanenten Stress. Der Organismus kann auf einen temporären Stress positiv antworten und sein Schutzsystem so modifizieren, dass er gestärkt aus der Belastung herausgeht. Wird er allerdings über einen zu langen Zeitraum negativ beeinflusst, so kann es zu irreparablen Schädigungen kommen. Man bezeichnet diese beiden Stressgeschehen auch als Eustress und Distress. Betrachtet man den zeitlichen Ablauf eines Stressgeschehens, so stellt man fest, dass sich die Pflanzen nach einer Alarmphase an eine neue Situation anpassen können und ihre Widerstandsfähigkeit erhöhen können (Abb. 1.6).

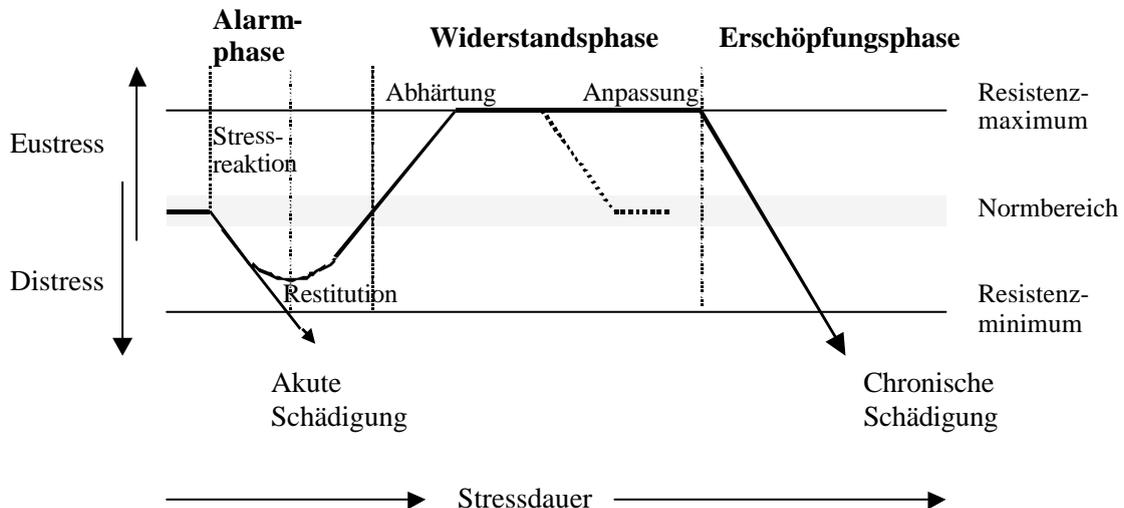
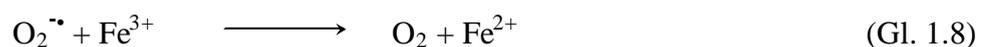


Abb. 1.6: Phasenmodell des Stressgeschehens nach H. SELYE (1936) und O. STOCKER (1947) aus LARCHER, (1994). Durch äußere Einflüsse kommt es in der Alarmphase zu einer *Stressreaktion*, die eine negative Funktionsstörung mit sich bringt. Ist der Stress nicht kompensierbar, kommt es zu einer akuten Schädigung. Anderenfalls reagiert der Organismus mit restabilisierenden Gegenmaßnahmen (*Restitution*) gegen die schädigenden Faktoren und versucht bei andauernder Belastung mit Überkompensation (*Abhärtung*) die Stressresistenz zu erhöhen (*Anpassung*). Kommt es zu einer chronischen Stresssituation, wird der Organismus irreversibel geschädigt (*Erschöpfung*).

Stressauslösende Umweltbedingungen kann man in abiotische und biotische Faktoren unterteilen. Klassische Beispiele für abiotische Stressfaktoren sind Strahlung (ROZEMA ET AL., 1997;), Ozon (SCHRAUDNER ET AL., 1998, RAO, DAVIS, 2001), Temperatur, Wasser (SAIRAM & SAXENA, 2000, MARTINEZ ET AL., 2001), Trockenheit (MORAN ET AL., 1994) und Mineralstoffe (OBATA ET AL., 2001), für biotische Stressfaktoren sind es Pflanzen, Mikroorganismen (DOKE ET AL., 1996; WOJTASZEK, 1997) oder Tiere.

Meist ist es ein Zusammenspiel mehrerer Einflüsse, die eine Pflanze schädigen. Fast immer führen extreme Umweltbedingungen zu einem oxidativen Stress, einer Störung des Gleichgewichts von Oxidantien und Antioxidantien, in Folge derer es zu einem Überschuss an ROS im Organismus kommt, welcher zu einer Zellschädigung führen kann. ROS sind ein Nebenprodukt des normalen Pflanzenstoffwechsels (ASADA ET AL., 1987), sie entstehen z. B. während der Photosynthese durch Energietransfer bei der Photosensibilisierung (physikalische Sauerstoffaktivierung) oder in den Mitochondrien während der Atmung (Tab. 1.2). Erfährt eine Pflanze einen oxidativen Stress, werden vermehrt ROS in ihren Organellen gebildet, die über die eigenen Schutzmechanismen nicht mehr entgiftet bzw. abgebaut werden können. So wird in der Epidermis durch Lichtenergie aus dem reaktionsträgen Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) reaktiver Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), in den Chloroplasten entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff das Superoxidanion-Radikal, das enzymatisch durch Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutiert (SCANDALIOS, 1993, s. 1.4, Abb. 1.5). Diese als Mehler-Reaktion bezeichnete Bildung von Superoxidanion-Radikalen läuft bei vermehrter Photosynthese ab und soll überschüssige Anregungsenergie vom Photosystem II (PS II) in Wärme, die leicht abgegeben werden kann, umwandeln (HELDT, 1996). Das Superoxidanion-Radikal (Gl. 1.8) kann als stark reduzierendes Agens mit Fe^{3+} und Cu^{2+} , Metallen, die in Proteinen komplexiert vorliegen, reagieren. In der sogenannten Fenton-Reaktion:



können so die äußerst reaktiven Hydroxyl-Radikale entstehen, die zu Zellschädigung und Veränderungen von Makromolekülen führen (MEHDY, 1994). Hydroxyl-Radikale werden

aber auch über den Haber-Weiss-Mechanismus (BOWLER ET AL., 1992):



gebildet. Eine andere Quelle für ROS ist die Bildung von H_2O_2 in den Peroxisomen während der Photorespiration durch die Glykolatoxidase. Durch die Produktion von ROS werden Prozesse wie Programmierter Zelltod und Pathogenabwehr initiiert, welche Einfluss nehmen auf das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien (JABS ET AL., 1996, MEHDY ET AL., 1996, BOLWELL & WOJTASZEK, 1997).

Bildung	Bildungsort	ROS
Photosynthese ET und PS I und II	Chl	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Atmung ET	Mit	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Glycolatoxidase	Per	H_2O_2
Chlorophyll	Chl	$^1\text{O}_2$
NADPH Oxidase	PM	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Fettsäuren β -Oxidation	Per	H_2O_2
Oxalatoxidase	Apo	H_2O_2
Xanthinoxidase	Per	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Peroxidasen, Mn^{2+} , NADH	ZW	$\text{H}_2\text{O}_2, \text{O}_2^{\cdot -}$
Aminoxidase	Apo	H_2O_2

Tab. 1.2: Bildungswege und -orte von ROS nach MITTLER, 2002. ET: Elektronentransport, PS: Photosystem, Chl: Chloroplast, Mit: Mitochondrien, Per: Peroxisomen, PM: Plasma Membran, Apo: Apoplast, ZW: Zellwand.

Die Bildungsraten bzw. Konzentrationen der ROS können durch Stresssituationen in der Zelle von niedrigen Werten ($240 \mu\text{m s}^{-1} \text{O}_2^{\cdot -}$ und Gleichgewichtskonzentration von $0.5 \mu\text{m H}_2\text{O}_2$ im Chloroplasten) drastisch ansteigen ($240\text{-}720 \mu\text{m s}^{-1} \text{O}_2^{\cdot -}$ und Gleichgewichtskonzentration von $5\text{-}15 \mu\text{m H}_2\text{O}_2$ im Chloroplasten, POLLE, 2001). ROS sind nicht nur schädlich für die Zelle, sie müssen auch als Signal zur Aktivierung des Abwehrsystems der Pflanze betrachtet werden (KNIGHT & KNIGHT, 2001). So fungieren die ROS als zelluläre Indikatoren für Stress und als sekundäre Botenstoffe für Signalketten der Stressreaktion. Die Pflanze kann anhand der ROS-Konzentrationen den intrazellulären Stresszustand beobachten und kontrollieren (ASADA ET AL., 1987).

Unter diesem Gesichtspunkt wird deutlich, dass die Pflanze zwei verschiedene Mechanismen benötigt, um ROS-Konzentrationen zu regulieren. Zum einen muss für die Signalübertragung ein bestimmtes ROS-Niveau erreicht werden, andererseits soll eine zu hohe Bildungsrate vermieden werden, um Zellschädigungen vorzubeugen. Dieses Zusammenspiel wird gewährleistet durch ROS-produzierende und ROS-entgiftende bzw. ROS-unterdrückende Mechanismen, die im folgenden erklärt werden.

1.4 Antioxidative Schutzsysteme der Pflanze

Pflanzen verfügen über verschiedene Abwehrmechanismen, um sich vor Schäden durch zu hohe Radikal- bzw. ROS-Konzentrationen zu schützen (Tab. 1.3). Prinzipiell kann man zwischen den enzymatischen und den nicht-enzymatischen Schutzsystemen unterscheiden. Beide zusammen bezeichnet man als das antioxidative System der Pflanzen (ASADA & TAKAHASHI, 1987). Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören einerseits wasserlösliche Stoffe wie Ascorbat und Glutathion, welche bei der Entgiftung von Wasserstoffperoxid eine Rolle spielen (Halliwell-Asada-Zyklus, Abb. 1.7, C; ASADA & TAKAHASHI, 1987). Des weiteren Carotinoide, die in den Thylakoidmembranen Singulett-Sauerstoff entgiften und das lipidlösliche α -Tocopherol (Vitamin E), das die Membran vor Lipidperoxidation schützt, indem es Lipid-Radikale abfängt (Abb. 1.7, A). Zu den enzymatischen Entgiftungssystemen gehören an erster Stelle die Superoxiddismutasen (BOWLER ET AL, 1992), Enzyme mit einem aktiven Metallzentrum, des weiteren Katalasen, welche katalytisch Wasserstoffperoxid entgiften und die Membranen vor Lipidperoxidation schützen (Abb. 1.7, E; WILLEKENS ET AL., 1997), Glutathion-Peroxidasen (GPX), die allgemein Hydroperoxide in Anwesenheit von Glutathion umsetzen (Abb. 1.7, D), Glutathion-S-Transferasen (GSTs), die ähnlich wie GPX enzymatisch wirken, aber nicht mit H_2O_2 reagieren (OBERLEY, 1999). Glutathion Reduktase (GR) reduziert Glutathiondisulfid (GSSG) wieder zu Glutathion (GSH) und gewährleistet einen ausreichenden Konzentrationsspiegel an GSH (Abb. 1.7, D), Thioredoxin Peroxidasen (TRXP) entgiften analog zu GPX Wasserstoffperoxid unter Bildung von Thioredoxindisulfid aus den Zellen (OBERLEY, 1999). Des weiteren gibt es eine Reihe an unspezifischen Peroxidasen, die noch nicht weiter bekannt sind. Meist enthalten sie ein Häm-Zentrum und bauen wie die Katalasen H_2O_2 ab, kommen

aber im Gegensatz zu dieser in fast allen Zellkompartimenten vor (ASADA & TAKAHASHI, 1987).

Entgiftung durch	Ort	ROS
Superoxiddismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$O_2^{\cdot -}$
Ascorbat-Peroxidase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Katalase	Per	H_2O_2
Glutathion-Peroxidase	Cyt	$H_2O_2, ROOH$
Peroxidasen	ZW, Cyt, Vac	H_2O_2
Thioredoxin-Peroxidase	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2
Ascorbat	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$H_2O_2, O_2^{\cdot -}$
Glutathion	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
α -Tocopherol	Membranen	$ROOH, O_2^{\cdot -}$
Carotinoide	Chl	1O_2

Tab. 1.3: Antioxidantien und Entgiftungsort von ROS nach MITTLER, 2002. Chl: Chloroplast, Cyt: Cytosol, Mit: Mitochondrien, Per: Peroxisomen, Apo: Apoplast, ZW: Zellwand, Vac: Vacuole.

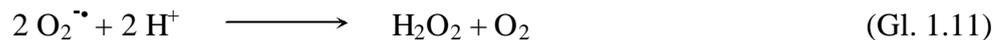
Pflanzen haben des weiteren die Möglichkeit, die ROS-Bildung zu unterdrücken, indem sie versuchen Stress wie Trockenheit und Starklicht zu vermeiden (Tab. 1.4). So können sie durch anatomische Anpassung wie Blattstellung und -drehung oder Ausbildung einer lichtbrechenden Epidermis (MITTLER, 2002) Lichtstress vermeiden, sich physiologisch anpassen oder den photosynthetisch aktiven Apparat und seine Antennen an die Lichtverhältnisse adaptieren bzw. die Photosynthese unterdrücken. Die Bildung von ROS kann auch dadurch reduziert werden, dass Elektronen in der Elektronentransportkette der Chloroplasten und Mitochondrien von alternativen Oxidasen abgefangen werden (MITTLER, 2002).

Unterdrückung der ROS-Bildung	Ort	ROS
Anatomische Anpassung	Blattstruktur, Epidermis	$O_2^{\cdot -}, H_2O_2, ^1O_2$
C_4 oder CAM Stoffwechsel	Chl, Cyt, Vac	$O_2^{\cdot -}, H_2O_2$
Chl Veränderung	Cyt	$O_2^{\cdot -}, H_2O_2, ^1O_2$
Unterdrückung der Photosynthese	Chl	$O_2^{\cdot -}, H_2O_2,$
PS und Antennen Modulierung	Chl	$O_2^{\cdot -}, ^1O_2$
Alternative Oxidasen	Chl, Mit	$O_2^{\cdot -}$

Tab. 1.4: Unterdrückung der ROS-Bildung durch alternative Mechanismen nach MITTLER, 2002. Chl: Chloroplast, Cyt: Cytosol, Mit: Mitochondrien, Vac: Vacuole.

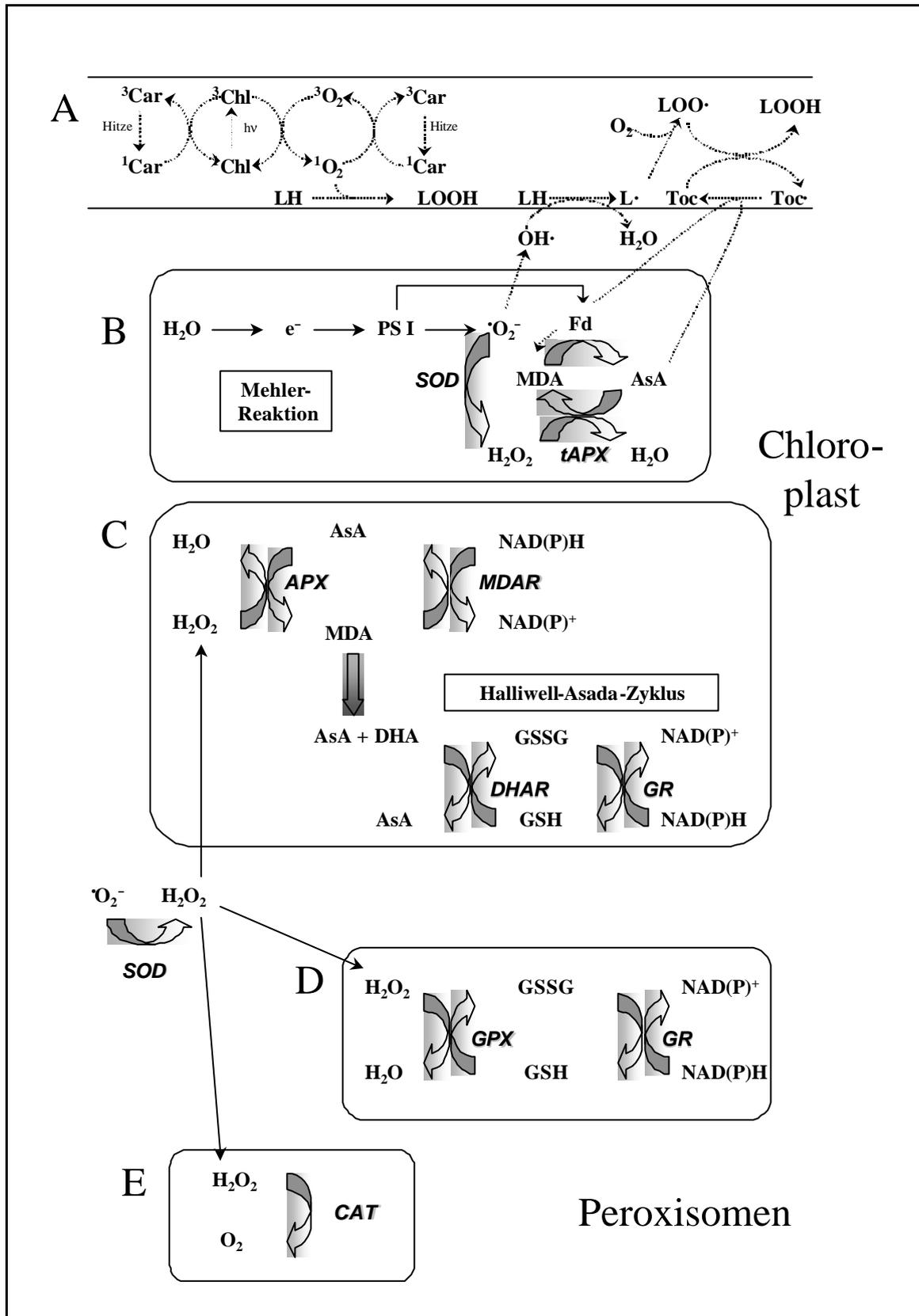
Superoxiddismutase

Das Enzym Superoxiddismutase, als antioxidativer Schutzmechanismus 1969 von MCCORD & FRIDOVICH entdeckt, entgiftet in den Chloroplasten, Mitochondrien und im Cytosol Superoxidanion-Radikale, indem es die Radikale zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umsetzt (Gl. 1.11):



Es sind drei Isozyme der Superoxiddismutase bekannt, benannt nach den Metallionen in ihrem Zentrum: Neben der Kupfer/Zink-(Cu/Zn)-SOD, die Mangan-(Mn)-SOD und Eisen-(Fe)-SOD (BANNISTER ET AL, 1987). Die drei SOD-Typen können anhand ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Kaliumcyanid (KCN) und H_2O_2 experimentell identifiziert werden (BOWLER ET AL, 1992, SCANDALIOS, 1993). Cu/Zn-SOD wird durch KCN und H_2O_2 gehemmt, Fe-SOD kann durch H_2O_2 irreversibel inhibiert werden, während Mn-SOD resistent gegen beide Reagenzien ist. Strukturell unterscheidet man zwei Klassen an SODs, zum einen die Mn- und Fe-SOD, welche große Homologien zueinander zeigen, zum anderen die Cu/Zn-SOD (FRIDOVICH, 1995). In allen Prokaryoten finden sich Mn- und Fe-SOD, Cu/Zn-SOD nur in vereinzelt Fällen, dafür aber in den höheren Eukaryoten, was auf eine evolutionär unterschiedliche Entwicklung hindeutet. Subzelluläre Untersuchungen haben gezeigt, dass in Pflanzen Mn-SOD in der Mitochondrien-Matrix lokalisiert ist, während die Cu/Zn-SOD hauptsächlich im Cytosol und im Chloroplastenstroma, in dem man auch Fe-SOD nachweisen konnte, vorkommt (BOWLER, 1992). Da in grünen Blättern die chloroplastidäre SOD den Hauptbestandteil der SOD-Aktivität ausmacht, wurde in dieser Arbeit die Analytik auf dieses Isozym beschränkt. Apoplastidäre SOD-Isozyme wurden von VANACKER ET AL, 1998, in der Gerste nachgewiesen.

Abb. 1.7 nächste Seite: Antioxidative Systeme in Pflanzen aus MITTLER, 2002. A) Mechanismen in der Thylakoidmembran B) Wasser-Wasser-Zyklus, C) Ascorbat (AsA)-Glutathion (GSH)-Zyklus (Halliwell-Asada-Zyklus), D) Glutathion-Peroxidase (GPX)-Zyklus, E) Katalase (CAT). Superoxiddismutase (SOD) steht als erstes Glied in der Kette und entgiftet Superoxidanion-Radikale, indem sie sie in H_2O_2 und Wasser überführt. Wasserstoffperoxid kann durch CAT, GPX oder Ascorbat Peroxidase (APX) umgesetzt werden, wobei GPX und APX im Gegensatz zu CAT einen AsA bzw. GSH regenerierenden Zyklus (B, C, D) benötigen. Das Reduktionspotential für die Reaktionen kommt entweder direkt aus der Photosynthese (B) oder aus der Umsetzung von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ (C, D). Abkürzungen: GSSG: Glutathiondisulfid, GR: Glutathion Reduktase, DHA: Dehydroascorbat, DHAR: Dehydroascorbat Reduktase, MDA: Monodehydroascorbat, MDAR: Monodehydroascorbat Reduktase, PS I: Photosystem I, Fd: Ferredoxin, tAPX: thylakoidgebundene APX, LH: Lipid, LOOH, Lipidhydroperoxid, ¹Car und ³Car: Carotinoide im Singulett- und Triplettzustand, ¹Chl und ³Chl: Chlorophyll im Singulett- und Triplettzustand, Toc: α-Tocopherol.



Ascorbat und Glutathion

Das Produkt der Entgiftung der Superoxidanion-Radikale, Wasserstoffperoxid, wird als ebenfalls schädigendes ROS von den nicht enzymatischen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion umgesetzt (POLLE ET AL, 1990, CHEN & ASADA, 1989). Ascorbat (AsA) wirkt als Reduktionsmittel, indem es bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser durch die Ascorbat Peroxidase zum Monodehydroascorbat-Radikal (MDA) oxidiert wird. Im Halliwell-Asada-Zyklus (Abb. 1.7, C) wird das Ascorbat über zwei Wege wieder regeneriert (ASADA & TAKAHASHI, 1987). Einmal kann MDA enzymatisch durch die Monodehydroascorbat Reduktase (MDAR) unter Umsetzung von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ zu Ascorbat reduziert werden (HOSSAIN ET AL, 1984), zum anderen disproportioniert MDA schnell zu Dehydroascorbat und Ascorbat (ASADA & TAKAHASHI, 1987). Dehydroascorbat wiederum wird von Glutathion mit Hilfe der Dehydroascorbat Reduktase zu Ascorbat reduziert, das dabei entstandene Glutathiondisulfid wird von der Glutathion Reduktase unter Umsetzung von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ reduziert (FOYER & HALLIWELL, 1976).

Alle Enzyme diese Reaktionsweges sind im Cytoplasma (KLAPHECK ET AL, 1990) und im Chloroplasten (FOYER & HALLIWELL, 1976) lokalisiert.

1.5 Ziel der Arbeit

Wenn man die diversen Pflanzenschutzprospekte der Industrie studiert, stellt man schnell fest, dass es sich bei dem Thema NBV durchaus um ein marktwirtschaftliches Thema handelt, das einer gezielten Untersuchung wert ist. Da es immer noch nicht klar ist, was die Blattverbräunung auslöst und welche Stoffwechselfvorgänge in den Pflanzen ablaufen, war es zum einen Ziel dieser Arbeit, der Ursache der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung näher zu kommen, zum anderen sollte die Physiologie, die schließlich zu der vorzeitigen Seneszenz der Blätter führt, erforscht werden. Da aus den Vorarbeiten ersichtlich war, dass ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von NBV die Strahlung darstellt, wurde das Projekt im Rahmen des Bayerischen Forschungsverbundes UV-Strahlung (BayForUV) bearbeitet. In diesem Verbund wurde die Auswirkung von UV-Strahlung auf verschiedene biologische und chemische Systeme untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Einfluss der UV-Strahlung und anderer Umwelteinflüsse wie Ozon in Zusammenhang mit der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung zu sehen. In den Sonnensimulatoren der GSF sollte anhand von Simulation extremer Umweltbedingungen die NBV künstlich induziert werden, um so den auslösenden Faktor der Erkrankung herauszufinden.

Unter der Annahme, dass die Strahlung einer der Hauptauslöser der NBV ist, wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass bei zu viel Bestrahlung in den Blättern ein oxidativer Stress durch zu viel reaktive Sauerstoffspezies entsteht. Ist die Pflanze nun nicht genügend auf diese Situation vorbereitet und kann sie die Radikale nicht schnell genug entgiften, so kann es durch Lipidperoxidation zu irreversiblen Zellschäden kommen. Da es bislang noch keine Untersuchungen zum antioxidativen Schutzsystem verschiedener Gerstenkultivare bezüglich der NBV unter definierten Bedingungen gab, sollte in dieser Arbeit erstmals der Einfluss von hoher Bestrahlung und Temperatur zum einen und Ozon zum anderen auf das antioxidative System untersucht werden. Unter Freilandbedingungen sollte weiterhin die Frage geklärt werden, ob die Pflanzen in einem bestimmten Entwicklungsstadium besonders anfällig für die Blattverbräunung sind. Untersuchungsobjekte waren zwei Sorten der Sommergerste als Extremvertreter einer anfälligen (*cv.* Ricarda) und einer resistenten Sorte (IPZ 24727), des weiteren wurden Sorten aus den Landessortenversuchen der Jahre 2000, 2001 und 2002 der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising verglichen. Anhand dieser Kultivare, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit bezüglich

NBV ausgewählt wurden, sollte untersucht werden, ob die Sensibilität gegenüber der NBV mit mangelhaften Antioxidativen Schutzsystemen korreliert.

Inbesondere sollten folgende Fragen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- 1) Spielen Umweltfaktoren wie Ozon bei der Entstehung der NBV ein Rolle?
- 2) Ist es entscheidend, wann die auslösenden Einflüsse auf die Pflanzen einwirken, d.h. ist die Pflanze zu einem bestimmten Entwicklungsstadium besonders sensibel für die NBV?
- 3) Wie verhält sich das antioxidative System mit zunehmenden Alter der Pflanzen?
- 4) Wenn die Entstehung der NBV auf Reaktive Sauerstoffspezies zurückzuführen sein sollte, werden dann zuviel Radikale erzeugt oder werden sie in den empfindlichen Sorten zu schlecht abgebaut? Lassen sich unter den verschiedenen Sorten Unterschiede im antioxidativen Schutzsystem finden?
- 5) Sind Unterschiede in der Genexpression in den stressrelevanten Stoffwechselwegen zwischen den Sorten zu erkennen?

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen zur nichtparasitär bedingten Blattverbräunung (NBV) wurden an der Sommergerste *Hordeum distichon* L., der zweizeiligen Gerste, die heute allgemein als *Hordeum vulgare* L. bezeichnet wird, durchgeführt. Hierzu wurden sowohl in Gewächshäusern angezogene als auch im Freiland ausgesäte Gerstenpflanzen beprobt.

Für die Experimente in den Sonnensimulatoren des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) in Neuherberg, Institut für Bodenökologie, Abteilung Experimentelle Umweltsimulation, sowie für die Freilanduntersuchungen der altersabhängigen Physiologie der Blätter auf den Versuchsflächen der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL, Freising) in Frankendorf, wurden zwei Gerstensorten ausgewählt. Als Vertreter eines sehr empfindlichen Kultivars gegenüber der NBV die Braugerste *cv.* Ricarda und der Zuchtstamm IPZ 24727 als Vertreter einer sehr resistenten Sorte.

Neben diesen zwei Kultivaren wurden aus dem ebenfalls in Frankendorf angebauten Landessortenversuch der LfL, Freising, in drei Sommern repräsentative Sorten beprobt, die eine Aussage über die sortenabhängige Sensitivität gegenüber der NBV ermöglichen sollten. Diese Beprobungen wurden zusätzlich zu den oben genannten Sorten an den Kultivaren *cv.* Thuringia, *cv.* Chantal, *cv.* Aspen, *cv.* Ria, *cv.* Barke und *cv.* Krona im Freiland durchgeführt. Bei all diesen Sorten handelt es sich um Braugerste.

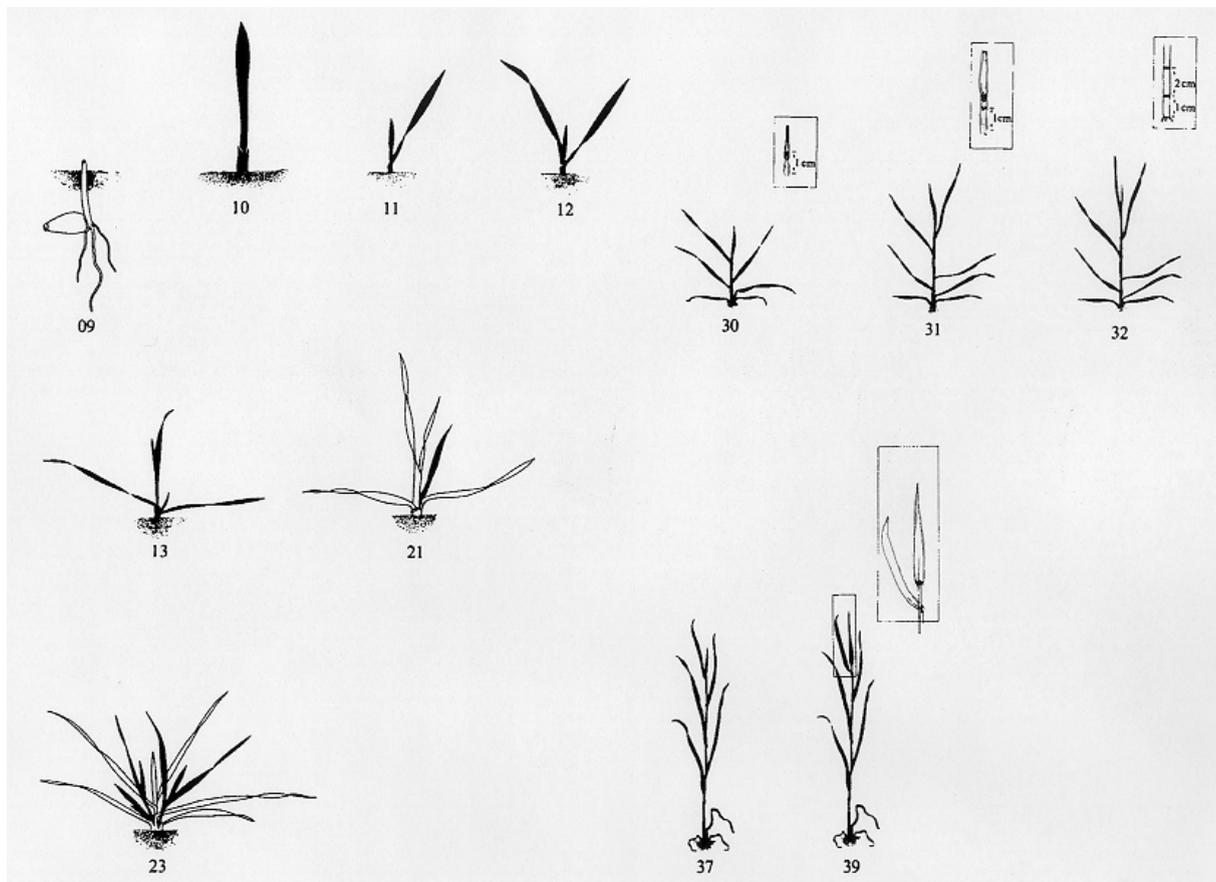
Der Zuchtstamm IPZ 24727 ist eine Sommergerste, die im Anbau noch nicht verwendet wird. Resistent gegenüber Mehltau und Blattverbräunung, zeigt dieser Stamm eine hohe Anfälligkeit gegen Zwergrost, ist zur Zeit aber die unempfindlichste Sorte in Bezug auf NBV. Bei *cv.* Ricarda handelt es sich um eine sehr alte Braugerste, die trotz Anfälligkeit gegenüber Blattkrankheiten wie der NBV gute Ernteerträge erzielt und eine hohe Brauqualität hat. *Cv.* Thuringia, *cv.* Ria und *cv.* Barke zeichnen sich alle drei durch sehr gute Brauqualität aus, wobei *cv.* Barke nur mittlere Erträge gegenüber den ertragsstarken Sorten *cv.* Thuringia und *cv.* Ria aufweist. Eine Mehltaresistenz durch Ausbildung von Resistenzflecken, den nach dem Resistenzgen benannten *mlo*-Flecken (LfL, 2002), zeigt sich bei den Sorten *cv.* Krona, *cv.* Chantal, *cv.* Barke und *cv.* Ricarda (LfL, 2002, mündl. Mitteilung BAUMER). Bei einer

Klassifizierung der angeführten Sorten bezüglich der NBV gelten die Sorten in folgender Reihe als zunehmend anfällig:

IPZ 24727 - *cv.* Thuringia - *cv.* Ria - *cv.* Barke - *cv.* Ricarda - *cv.* Chantal - *cv.* Aspen - *cv.* Krona

2.2 Bezeichnung der Pflanzenentwicklungsstadien

Um das Entwicklungsstadium der Gerste zu beschreiben, wurde der von WITZENBERGER ET AL. (1989) publizierte BBCH- (Biologische Landesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und chemische Industrie) Getreide-Code verwendet. Es werden Makrostadien (Ziffer 1) und Mikrostromadien (Ziffer 2) unterschieden, jeweils in einer Skala von 1 – 9 (siehe Anhang 7.1). Dabei wird das letzte Blatt der Pflanze, das sogenannte Fahnenblatt, das sich erst Ende des Schossens entfaltet, mit F bezeichnet, das nächstjüngere mit F-1, usw. (Abb. 2.1).



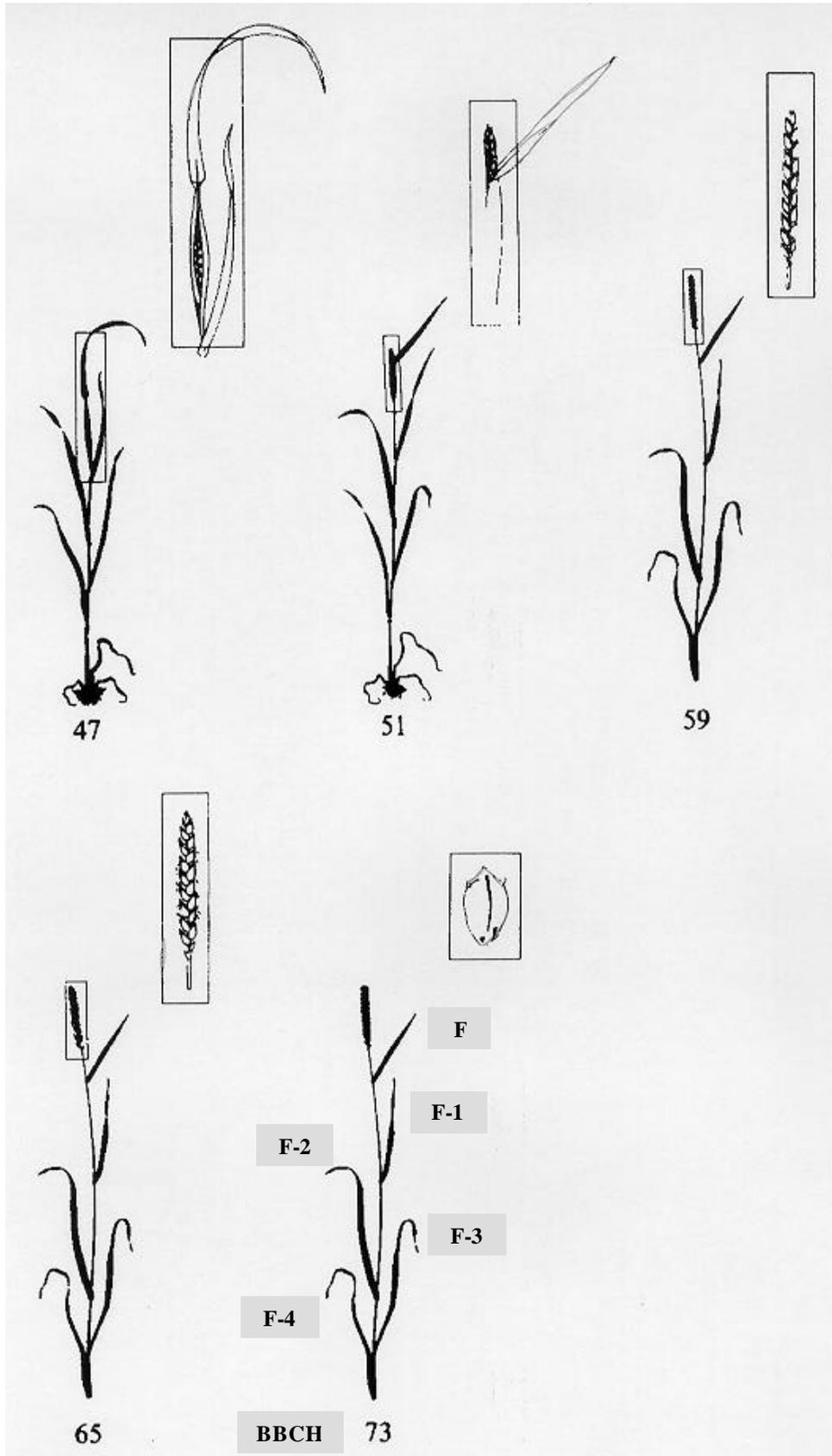


Abb. 2.1: Einteilung der Entwicklungsstadien des Getreides nach dem BBCH (Biologische Landesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und chemische Industrie)-Getreide-Code von WITZENBERGER ET AL. (1989) nach ©Bayer 1989. Die Ziffern stehen für die Makro- bzw. Mikro-stadien (Ziffer 1 bzw. 2). **Makrostadium 0:** Keimung. BBCH 09: Auflaufen: Keimscheide (Koleoptile) durchbricht Bodenfläche. **Makrostadium 1:** Blattentwicklung. BBCH 10: erstes Blatt aus der Koleoptile ausgetreten. BBCH 11: 1-Blatt-Stadium, 1. Laubblatt entfaltet, Spitze des 2. Blattes sichtbar. BBCH 12: 2-Blatt-Stadium, 2. Laubblatt entfaltet, Spitze des 3. Blattes sichtbar. BBCH 13: 3-Blatt-Stadium, 3. Laubblatt entfaltet, Spitze des 4. Blattes sichtbar. **Makrostadium 2:** Bestockung. BBCH 21: Erster Bestockungstrieb sichtbar: Beginn der Bestockung. BBCH 23: 3 Bestockungstriebe sichtbar. **Makrostadium 3:** Schossen. BBCH 30: Beginn des Schossens: Haupttrieb und Bestockungstrieb stark aufgerichtet, beginnen sich zu strecken. Ährenspitzen mind. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt. BBCH 31: 1-Knoten-Stadium: 1. Knoten dicht über der Bodenoberfläche wahrnehmbar, mind. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt. BBCH 32: 2-Knoten-Stadium: 2. Knoten wahrnehmbar, mind. 2 cm vom 1. Knoten entfernt. BBCH 37: Erscheinen des letzten Blattes (Fahnenblatt), letztes Blatt noch eingerollt. BBCH 39: Ligula (Blatthäutchen)-Stadium: Blatthäutchen des Fahnenblattes gerade sichtbar, Fahnenblatt voll entwickelt. **Makrostadium 4:** Ähren-/Rispen-schwellen. BBCH 47: Blattscheide des Fahnenblattes öffnet sich. **Makrostadium 5:** Ähren-/Rispen-schieben. BBCH 51: Beginn des Ähren-/Rispen-schiebens: Die Spitze der Ähre/Rispe tritt heraus oder drängt seitlich aus der Blattscheide. BBCH 59: 80 % der Ähre/Rispe ausgetreten. **Makrostadium 6:** Blüte. BBCH 65: Mitte der Blüte: 50% reife Staubgefäße. **Makrostadium 7:** Fruchtentwicklung. BBCH 73: Frühe Milchreife.

Blattbezeichnungen: Von der ausgewachsenen Pflanze ausgehend, wird das jüngste Blatt als Fahnenblatt (F) bezeichnet, es folgen chronologisch das F-1, F-2, F-3, usw. Blatt.

2.3 Experimente in den Sonnensimulatoren

2.3.1 Anzucht

Die Anzucht der beiden Sorten IPZ 24727 und *cv.* Ricarda der Sommergerste *Hordeum vulgare* L. für die Experimente im Sonnensimulator der GSF-Neuherberg erfolgte in den Gewächshäusern der LfL, Freising. Es wurden jeweils zwei Samenkörner in lehmhaltiges Substrat (entsprechend der Freilanderde des Standortes Frankendorf, s. 2.4.2) in einen Topf mit 14 cm Durchmesser ausgesät, die Keimung erfolgte bei 16/17/19°C (Nacht / Tag / bei Belüftung). Nach zirka acht bis zehn Tagen befanden sich die Pflanzen im BBCH 11 (das erste Blatt war cirka 8-10 cm groß) und wurden vereinzelt. Für die Vernalisation wurde die Gerste zwei Wochen in eine Klimakammer bei einer Temperatur von 4°C gestellt. In der vierten Woche erfolgte eine Düngung der Pflanzen mit Blaukorn (BASF, Ludwigshafen), in den Konzentrationen von 12-12-17-2 [mg 100 g⁻¹ Boden] für N-P-K-Mg. Bis zur Behandlung wurden die Gerstenpflanzen bei 15/16/18°C (Nacht / Tag/ bei Belüftung) im Gewächshaus bei einer relativen Feuchte von 60 % weitergezogen. Die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) lag zwischen 460 und 1288 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bei PAR-Intensitäten unter 460 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde eine Zusatzbeleuchtung eingeschaltet, bei Intensitäten von mehr als 1288 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ konnten die Gewächshäuser mit Jalousien abgedunkelt werden. Die Dauer der Beleuchtung erfolgte pro Tag über 15 Stunden von 6:00 bis 21:00 Uhr. Die Bewässerung (100 ml pro Topf) wurde in den ersten Wochen drei- bis viermal die Woche direkt in den Topf durchgeführt, danach über eine automatische Tischbewässerung, so dass die Pflanzen mit der gleichen Menge von unten bewässert wurden.

2.3.2 Aufbau der Sonnensimulatoren

Die Experimente zur Simulation von Globalstrahlung wurden in zwei Expositions-kammern (Sonnensimulatoren) der GSF, Neuherberg durchgeführt (Abb. 2.2 und 2.3).

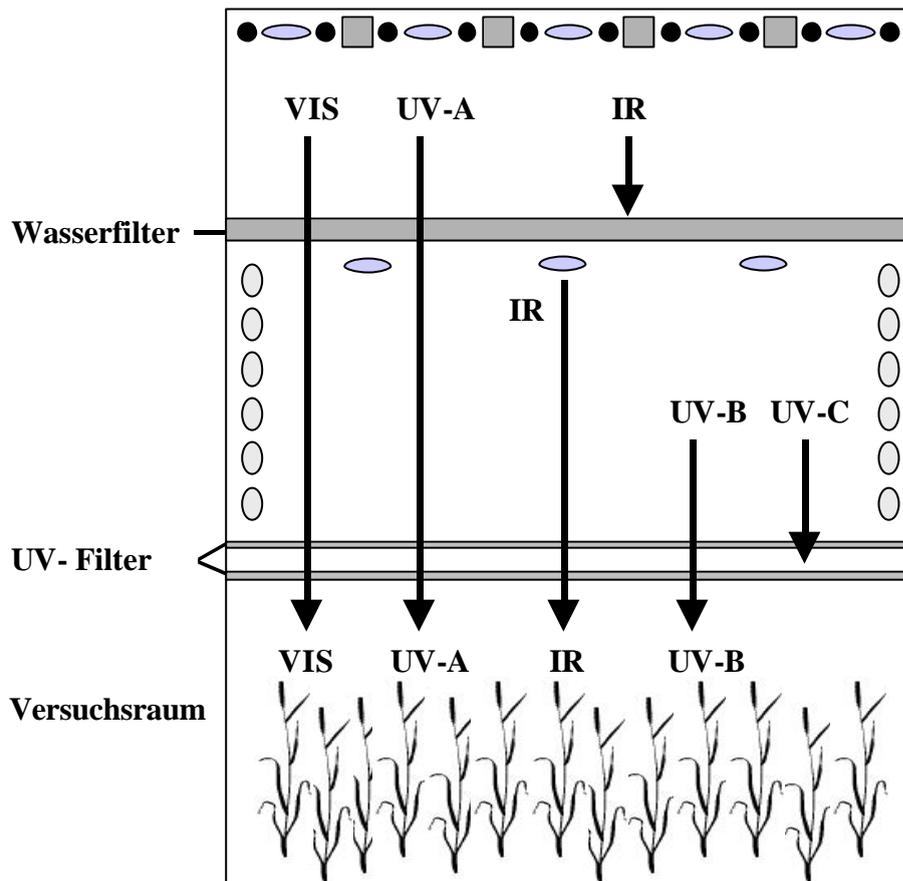


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer Expositions-kammer zur Simulation von Globalstrahlung an der GSF-Neuherberg: Im oberen Teil der Kammer wurde der Hauptteil der sichtbaren Strahlung sowie die UV-A- und IR-Strahlung erzeugt. Überschüssige IR-Strahlung konnte durch einen Wasserfilter (2 cm Dicke), der den oberen vom unteren Lampenraum abtrennte, herausgefiltert werden. Im unteren Lampenraum wurde ein Großteil der UV-Strahlung erzeugt, wobei ein UV-Filter die Pflanzen im Versuchsraum vor zu kurzwelliger Strahlung schützte, sodass ein Spektrum der Globalstrahlung für 60° Sonnenhöhe simuliert werden konnte.

○ Quarzhalogenlampe, □ Blaue Leuchtstofflampe, ○ UV-B-Lampe, ● Metallhalogenlampe, IR: Spektralbereich der Infrarot-Strahlung (>780 nm), VIS: Sichtbarer Spektralbereich der Solarstrahlung (380-780 nm), UV-A: Ultraviolett-Strahlung im Spektralbereich 380-315 nm, UV-B: Ultraviolett-Strahlung im Spektralbereich 315-280 nm, UV-C: Ultraviolett-Strahlung im Spektralbereich 280-100 nm.

Die Kammern sind in drei Einheiten untergliedert: Im oberen Teil der Kammern befanden sich an der Decke 36 Metallhalogenidlampen HQI 400 W, Typ Daylight (Osram, München),

32 Quarzhalogenlampen Halostar 300 W und 500 W (Osram, München) sowie 6 blaue Leuchtstofflampen TLD 18, 36 W (Philips, Hamburg). Diese Lampen erzeugten den größten Teil der sichtbaren, der infraroten und einen Teil der UV-A-Strahlung des Spektrums.

Um den überschüssigen Anteil der Infrarotstrahlung herauszufiltern, war der obere Lampenraum durch einen Wasserfilter von dem unteren Teil des Lampenraums getrennt. Die Wasserschichtdicke des Filters betrug 2 cm und wurde durch zwei 6.5 mm starke Borsilikat - Glasscheiben (Tempax, Schott, Mainz) begrenzt. Im unteren Lampenraum waren an den Seitenwänden der Kammer 96 UV-B-Lampen Typ TL12 40W (Philips, Hamburg) angebracht. Diese erzeugten den Hauptanteil der UV-Strahlung. Um die eingestellten Pflanzen vor zu kurzweiliger UV-B bzw. UV-C-Strahlung zu schützen, verfügten die Kammern zwischen unterem Lampenraum und Versuchsraum über ein zweilagiges UV-Filter-System aus jeweils 6.5 mm starken Borsilikat-Glasscheiben (Tempax bzw. Pyran, Schott, Mainz). Der Versuchsraum mit einer Größe von 1.4 m x 1.4 m x 1.0 m (Länge x Breite x Höhe), war mit einer höhenverstellbaren Schublade ausgestattet, mit der die Pflanzen in die Distanz von den Lampen gebracht werden konnten, in der sie die erwünschte Strahlung erhielten. Um die Kammern zu temperieren und die erwünschte relative Feuchte einzustellen, war an den Seiten ein Zu- und Abluftsystem installiert, über das die definierte Temperatur und Feuchte eingestellt werden konnte. Zusätzlich zur Simulation verschiedener Klimabedingungen verfügten die Kammern über die Möglichkeit, die Versuchspflanzen einer Behandlung mit verschiedenen Gasen zu unterziehen (THIEL ET AL., 1996).



Abb. 2.3: Expositions-kammer zur Simulation von Globalstrahlung an der GSF, Neuherberg mit Gerstenpflanzen im Entwicklungsstadium BBCH 55 (Foto: J.P. Schnitzler, IMK-IFU).

2.3.3 Experimentelles Design

Es wurden zwei Experimente in den Sonnensimulatoren der GSF, Neuherberg durchgeführt. Grundsätzlich lag beiden Experimenten der gleiche Tagesablauf zugrunde, allein die Maximalwerte differierten (Abb. 2.4). Jedes Experiment wurde einmal wiederholt, wobei die Bedingungen bei der Wiederholung in den Expositions-kammern getauscht wurden, um Kammereffekte auszuschließen.

Die Pflanzen für die Versuchsreihen wurden in den Gewächshäusern der LfL Freising (siehe 2.3.1) angezogen und im Entwicklungsstadium BBCH 39 (Abb. 2.1) in die Kammern eingebracht. Um Artefakte durch den Standortwechsel auszuschließen, wurden sie über einen Zeitraum von sieben Tagen an die Bedingungen in den Sonnensimulatoren akklimatisiert. Nach dieser Eingewöhnungsphase wurden in den zwei Expositions-kammern verschiedene Einstellungen vorgenommen.

Experiment 1: Einfluss der Bestrahlungsstärke auf die NBV und das antioxidative System

Im ersten Experiment sollte die physiologische Reaktion der zwei unterschiedlich empfindlichen Kultivare *cv. Ricarda* und *IPZ 24727* auf einen „Schattentag“ mit der auf einen „Sonnentag“ verglichen werden. Hierzu wurden in Kammer 1 die Bedingungen eines bewölkten Tages simuliert, während in Kammer 2 die Parameter für einen Sonnentag eingestellt wurden (Tab. 2.1).

Parameter	Akklimatisierung	Kammer Wolkentag	Kammer Sonnentag	Dauer [h]
Temperatur [°C]	18/12	18/12	25/12	Tag / Nacht
Relative Feuchte [%]	60/85	60/85	60/85	Tag / Nacht
UV-B [W m⁻²]	0.068	0.068	0.267	Tag / 6
PAR [μmol m⁻² s⁻¹]	200 – 500	500	1500	Tag / 6
Ozon [ppb]	20	20	50	Tag / 6

Tab. 2.1: Strahlungsdaten, Ozon-, Temperatur- und Feuchteinstellungen im Experiment 1. Tag : 5:00 – 19:00 h (14 h), Nacht : 19:00 – 5:00 h (10 h). Die angegebenen Werte in der Tabelle für Temperatur und Feuchte, UV-B-, PAR- und Ozon-Behandlung entsprechen jeweils den Maximal- bzw. Minimalwerten, die am Tag respektive in der Nacht erreicht wurden. Über 6 Stunden um die Tagesmitte wurden die Maximalwerte beibehalten.

Als Ausgangsdaten diente ein berechnetes Spektrum der Globalstrahlung für 60° Sonnenhöhe und 320 Dobson Einheiten Ozonsäule (THIEL ET AL., 1996).

Am Beispiel des Experimentes 1 soll in der folgenden Grafik (Abb. 2.4) der Tagesgang in der Kammer mit dem simulierten Wolkentag gezeigt werden:

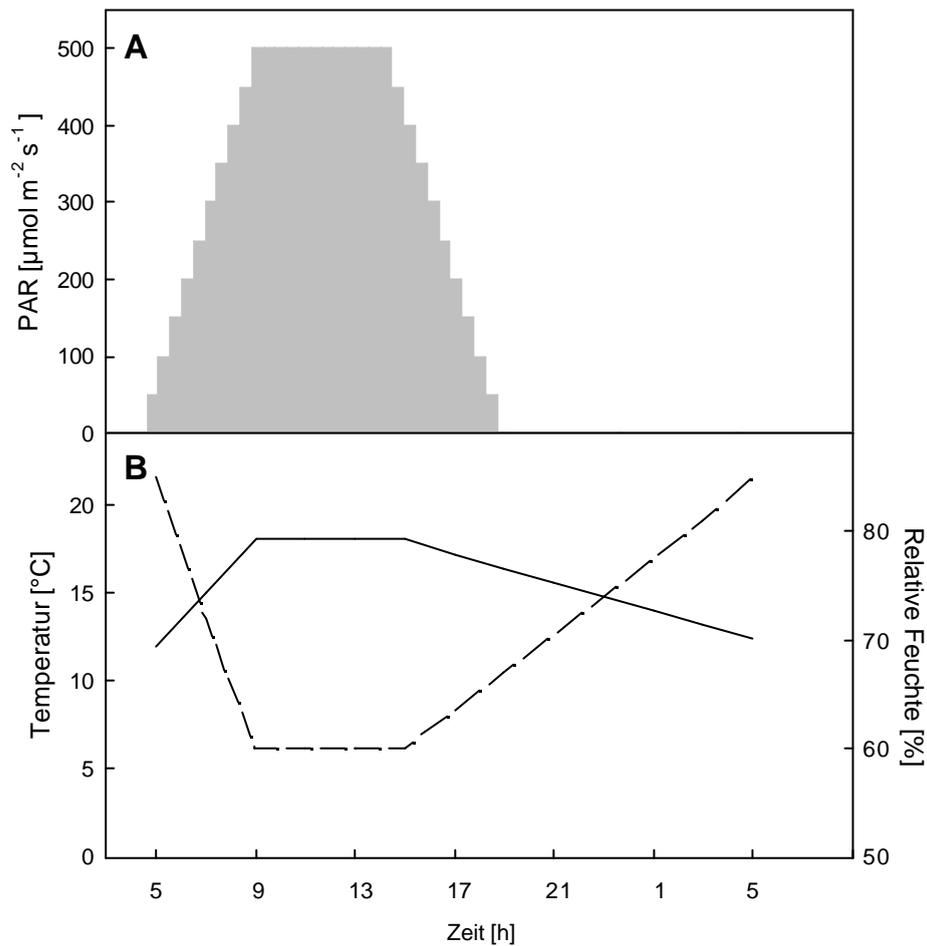


Abb. 2.4: Tagesgang der PAR (A), der Temperatur (—) und relativen Feuchte (— —) (B) im Experiment 1 in der Kammer mit simuliertem Wolkentag. Die Bestrahlung erfolgte über 14 Stunden von 5:00 – 19:00 h über eine stufenweise Anpassung der Strahlungsintensität. Der maximalen Bestrahlungsstärke wurde die Pflanzen über einen Zeitraum von 6 Stunden in der Mittagszeit ausgesetzt. Temperatur und Feuchte wurden äquivalent eingestellt: Ab 5:00 h morgens wurde die Temperatur hoch- und die Feuchte heruntergeregelt, so dass die Extremwerte entsprechend der Bestrahlungsstärke über die Mittagszeit erreicht wurden. Nach 6 Stunden wurde die Feuchte wieder hoch- und die Temperatur heruntergefahren.

Die Pflanzen wurden nach der Anpassungsphase für zwei Wochen den definierten Strahlungs- und Klimabedingungen ausgesetzt und in diesem Zeitraum dreimal beprobt:

Tag	-7	0	8	15
BBCH	39	49	57	65
Behandlung	Akklimatisierung	Simulation Stark- /Schwachlicht	Simulation Stark- /Schwachlicht	Simulation Stark- /Schwachlicht
Probennahme		0	1	2
Blatt		F-1	F-1	F

Tab. 2.2: Versuchsverlauf und Probennahmen im Experiment 1. **BBCH:** Getreide-Code der Biologischen Landesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und der chemischen Industrie, **F-1:** zweitjüngstes Blatt, **F:** Fahnenblatt.

Experiment 2: Einfluss von Ozon auf die NBV und das antioxidative System

Im zweiten Experiment wurde die physiologische Reaktion der zwei Gerstenkultivare auf unterschiedliche Ozonkonzentrationen untersucht. Hierfür wurden nach der Akklimatisierung für alle Parameter außer Ozon in den beiden Kammern die gleichen Einstellungen gewählt (Tab. 2.3), um eine Aussage über den Einfluss von Ozon auf die Entstehung von NBV und die physiologische Reaktion der Pflanzen machen zu können.

Parameter	Akklimatisierung	Kammer minus Ozon	Kammer plus Ozon	Dauer [h]
Temperatur [°C]	18/12	25/12	25/12	Tag/Nacht
Relative Feuchte [%]	60/80	60/80	60/80	Tag/Nacht
UV-B [W m⁻²]	0.971	0.971	0.971	6
PAR [μmol m⁻² s⁻¹]	200 -500	1500	1500	6
Ozon [ppb]	20	20	80 - 110	5

Tab. 2.3: Strahlungsdaten, Ozon-, Temperatur- und Feuchteinstellungen im Experiment 2. Tag : 5:00 – 19:00 h (14 h), Nacht : 19:00 – 5:00 h (10 h). Die in der Tabelle angegebenen Werte für Temperatur und Feuchte, UV-B-, PAR- und Ozon-Behandlung entsprechen jeweils den Maximal- bzw. Minimalwerten, die am Tag respektive in der Nacht erreicht wurden. Über 6 Stunden um die Tagesmitte wurden die Maximalwerte beibehalten.

Die Ozonkonzentrationen in der Kammer „plus Ozon“ entsprachen hierbei den Werten eines Sonnentages, die Behandlung erfolgte um die Tagesmitte über einen Zeitraum von fünf Stunden, bei einer Konzentration von 80 ppb. Über den Zeitpunkt des simulierten Sonnenhöchststandes wurde über eine Stunde mit 110 ppb behandelt. Die Probennahme erfolgte wie in Tabelle 2.4 dargestellt:

Tag	-7	0	4	9
BBCH	39	45	49	53
Behandlung	Akklimatisierung	Simulation minus/plus Ozon	Simulation minus/plus Ozon	Simulation minus/plus Ozon
Probennahme		0	1	2
Blatt		F-1 + F	F-1 + F	F-1 + F

Tab. 2.4: Versuchsverlauf und Probennahmen im Experiment 2. **BBCH:** Getreide-Code der Biologischen Landesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und der chemischen Industrie, **F-1:** zweitjüngstes Blatt, **F:** Fahnenblatt.

2.4 Freilandexperimente

Für die Freilandversuche wurden Gerstensorten aus dem Landessortenversuch der LfL, Freising, auf den Versuchsflächen bei Frankendorf beprobt. Der Beprobungszeitraum befand sich in den drei Untersuchungsjahren immer im Monat Juni.

2.4.1 Anzucht

Die Aussaat erfolgte je nach Wetterbedingungen Mitte März bis Anfang April. Es wurde pro Vegetationsperiode eine Bodenanalyse (im Februar des Anbau-Jahres, Tab. 2.5) und eine Stickstoffdüngung (BBCH 13-21, Abb. 2.1, Tab. 2.5) durchgeführt, eine getreidespezifische Grunddüngung (P, K, Mg; Tab. 2.5) fand im Herbst des Vorjahres statt. Des weiteren wurden Insektizide und Herbizide wie folgt eingesetzt (Tab. 2.5):

Jahr	2000	2001	2002
Vorfrucht	Winterweizen	Winterweizen	Winterweizen
Vor-Vorfrucht	Mais	Mais	Mais
Aussaat	03.04.2000	04.04.2001	18.03.2002
Düngung			
N [kg ha ⁻¹]	40	50	50
P [kg ha ⁻¹]	105	105	98
K [kg ha ⁻¹]	135	135	126
Mg [kg ha ⁻¹]	50	50	78
Niederschlag (Vegetationsperiode)	218 mm	345 mm	270 mm
Pestizidapplikation			
Insektizide		05.06.2001: 0.2 l ha ⁻¹ Karate	27.05.2002: 0.2 l ha ⁻¹ Karate
Herbizide	10.05.2000: 2.5 l ha ⁻¹ Basagran DP; 1 l ha ⁻¹ Tolkan Flo	14.05.2001: 2.5 l ha ⁻¹ Basagran DP; 1 l ha ⁻¹ Tolkan Flo	29.04.2002: 3.0 l ha ⁻¹ Basagran DP; 1.2 l ha ⁻¹ Tolkan Flo

Tab. 2.5: Anzuchtbedingungen für die Freilandversuche am Standort Frankendorf in den Jahren 2000, 2001 und 2002. In allen drei Versuchsjahren wurden auf den Feldern die gleichen Vorfrüchte angebaut. Die Düngung mit P, K, und Mg erfolgte als Grunddüngung im Herbst des Vorjahres, die Stickstoffdüngung im Entwicklungsstadium BBCH 13-21 (s .2.2). Die Pflanzen wurden bei Bedarf mit dem Insektizid Karate (Syngenta, Basel, Schweiz, Wirkstoff: 5.5% Lambda Cyhalothrin) gegen Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*) bzw. mit den Herbiziden Basagran DP (BASF, Ludwigshafen, Wirkstoff: Bentazon 333 g l⁻¹, Dichlorprop-P, 233 g l⁻¹) gegen zweikeimblättrige Samenunkräuter und Tolkan Flo (Bayer crop science, Leverkusen, Wirkstoff: Isoproturon (IPU)) gegen Gräser allgemein behandelt.

Für die Grunddüngung wurde Hyperphoskali der Firma BASF, Ludwigshafen ausgebracht, die Stickstoffdüngung erfolgte mit Kalkamonsalpeter (BASF, Ludwigshafen). Für die Insektizidbehandlung wurde Karate (Syngenta, Basel, Schweiz, Wirkstoff: 5.5% Lambda Cyhalothrin) gegen Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*) verwendet, für die Herbizidapplikation wurde Basagran DP (BASF, Ludwigshafen, Wirkstoff: Bentazon, 333 g l⁻¹, Dichlorprop-P, 233 g l⁻¹) und Tolkan Flo, ein Isoproturon (IPU)-haltiges Herbizid (Bayer crop science, Leverkusen) eingesetzt (Tab. 2.5). Basagran DP wird als Herbizid gegen zweikeimblättrige Samenunkräuter, insbesondere Kamillearten, Klettenlabkraut und Vogelmiere in Getreide, Kartoffel, Erbse, Pferdebohne, Sojabohne und Lein angewandt, Tolkan Flo als Herbizid gegen Gräser allgemein.

2.4.2 Versuchsflächen der LfL bei Frankendorf

Die Versuchsflächen der LfL bei Frankendorf, Gemeinde Fraunberg, befinden sich 455 m ü. NN, und gehören zur Erdinger Altmoräne. Im langjährigen Mittel beträgt der Niederschlag 820 mm und die Temperatur 7.8°C. Bei dem Anbauboden handelt es sich um sandigen Lehm mit der Bodenzahl 80, der Bodentyp entspricht Braunerde auf Löß. Die Bodenanalysen wurden jeweils im Februar vor der Aussaat durch die LfL, Freising durchgeführt (Tab. 2.6):

Jahr	2000	2001	2002
pH-Wert	7.2	6.8	7.1
P₂O₅ [mg 100 g⁻¹ Boden]	16	15	16
K₂O [mg 100 g⁻¹ Boden]	20	26	23
MgSO₄ [mg 100 g⁻¹ Boden]	7	6	6
N_{min} [kg ha⁻¹] in 0-60 cm	65	24	53

Tab. 2.6: Bodenbedingungen am Standort Frankendorf. Die Bodenproben wurden jeweils im Februar der Jahre 2000, 2001 und 2002 entnommen und von der LfL, Freising analysiert (pers. Mitteilung IIEBL). N_{min} entspricht dem mindestens enthaltenen Stickstoff in einer Bodentiefe von 0-60 cm.

2.4.3 Aufzeichnung der Klimadaten

Die Klimadaten für die Freilandversuchsflächen wurden in den drei Versuchsjahren von der Wetterstation Nr. 45 Standort Frankendorf des agrarmeteorologischen Messnetzes Bayern aufgezeichnet. Die beprobten Flächen befanden sich 200-400 m von der Station entfernt. Die Globalstrahlung wurde von einem Pyronometer mit einem Messbereich von 400-1100 nm erfasst. Im zweiten und dritten Jahr wurden durch das IMK-IFU, Garmisch-Partenkirchen, zusätzlich im Versuchsfeld Strahlungssensoren für drei breite Spektralbereiche aufgestellt. Es handelte sich hierbei um Sensoren für (1) die Erythemwirksame Bestrahlungsstärke des UV-B-Bereichs, Firma Solar Light, USA, (2) die integrale Bestrahlungsstärke vom UV-A-Bereich, Firma Solar Light, USA, und (3) die Photosynthetisch aktive Photonenbestrahlungsstärke des PAR-Bereichs, Firma LICOR, USA (THIEL, 1999).

2.4.4 Experimentelles Design

2.4.4.1 Landessortenversuche

Um eine Aussage über die unterschiedliche Empfindlichkeit der Kultivare hinsichtlich der NBV machen zu können, wurden aus den Landessortenversuchen (LSV) des Landes Bayern die in Tabelle 2.7 aufgeführten Sorten der Sommergerste beprobt.

Im Jahr 2000 wurden hierzu von sechs Kultivaren im Stadium BBCH 45 F-1 Blätter geerntet, im Stadium BBCH 55 Fahrenblätter. Im Jahr 2001 wurde von den Sorten, die im Vorjahr aus dem LSV beprobt worden waren und die im Jahr 2001 wiederangebaut wurden, zu drei Entwicklungsstadien F-1 Blätter geerntet. Zusätzlich wurden die Sorten IPZ 24727, die im Jahr zuvor zu einem späteren Zeitpunkt ausgesät worden war, sowie die *cv.* Barke beprobt. Im Jahr 2002 erfolgten über eine Entwicklungsphase von BBCH 35 bis BBCH 59 drei Probenahmen, bei denen ebenfalls die F-1 Blätter geerntet wurden. Die Proben wurden aus Parzellen von 10 m² Fläche genommen (Abb. 2.5).

Jahr	2000		2001			2002		
BBCH	45	55	39	56	61	35	52	59
Sorten:								
<i>cv.</i> Thuringia	F-1	F	F-1	F-1	F-1			
<i>cv.</i> Ria	F-1	F	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1
<i>cv.</i> Ricarda	F-1	F	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1
<i>cv.</i> Barke			F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1
<i>cv.</i> Krona	F-1	F	F-1	F-1	F-1			
<i>cv.</i> Aspen	F-1	F						
<i>cv.</i> Chantal	F-1	F						
IPZ 24727			F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1

Tab. 2.7: Probenahme von F-1 und F - Blättern repräsentativer Gerstensorten der Landessortenversuche auf den Versuchsflächen der LfL in Frankendorf in den Jahre 2000, 2001 und 2002 zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Es wurden n = 5 Parallelen genommen, mit je 10 Blättern von verschiedenen Pflanzen pro Probe.



Abb. 2.5: Parzellen des Landessortenversuchs der LfL, Freising auf den Versuchsfeldern bei Frankendorf im Jahr 2002. Im Vordergrund die Parzellen der Sorte *cv. Thuringia*.

2.4.4.2 Sortenvergleich *cv. Ricarda* und IPZ 24727

Um einen direkten Vergleich zweier hinsichtlich der NBV sehr unterschiedlichen Gerstenkultivare anstellen zu können, wurden die Sorten, die in den Sonnensimulator-Experimenten untersucht wurden, im Freiland über einen längeren Entwicklungszeitraum beprobt. In den Jahren 2001 und 2002 wurden die beiden Sommergersten-Kultivare *cv. Ricarda* und IPZ 24727 von BBCH 39 bis BBCH 59 sieben- bzw. sechsmal beprobt. Es wurden jeweils drei Parallelen der F-1 Blätter geerntet, wobei sich eine Parallele aus drei bis fünf Blättern verschiedener Pflanzen zusammensetzte (Tab. 2.8). Zusätzlich wurden im Jahr 2002 drei Nachtbeprobungen durchgeführt, die einen Ausgangswert für die histochemische Anfärbung der Blätter und die Bestimmung von Antioxidantien darstellen sollten. Die Probenahme der Nachtproben erfolgte vor der Dämmerung im Schein einer Blaulicht-Kopflampe zwischen 2:00 und 3:00 h.

Jahr	2001							2002						
	BBCH	39	41	51	56	58	59	61	35	39	51	52	55	59
cv. Ricarda	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	
IPZ 24727	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	F-1	
Nachtbeprobung beider Sorten										F-1	F-1	F-1		

Tab. 2.8: Probennahme von F-1 Blättern der beiden Gerstenkultivare *cv. Ricarda* und *IPZ 24727* in den Jahren 2001 und 2002 auf den Versuchsflächen der LfL in Frankendorf zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien (BBCH 35-61), es wurden $n = 3$ Parallelen genommen, mit je 10 Blättern von verschiedenen Pflanzen pro Probe.

2.5 Probennahmen

Die Probennahmen der Gerstenblätter für die biochemischen Untersuchungen im Labor erfolgten stets zur gleichen Tageszeit, in den Sonnensimulatoren ca. 4 Stunden nach Strahlungsbeginn, im Freiland ca. 5 Stunden nach Sonnenaufgang. Aufgrund des verfügbaren Probenmaterials und der Blattgröße wurden im Freiland nur die F-1 Blätter, im Kammerexperiment auch die Fahnenblätter geerntet. Für die Laboruntersuchungen wurden drei Parallelen pro Sorte geerntet, wobei eine Parallele aus drei bis fünf Blättern verschiedener Pflanzen bestand. Die Blätter wurden nach dem Abtrennen von der Pflanze sofort in eine Aluminiumtüte verpackt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei -80°C zwischengelagert.

2.6 Bonitur

Wichtigste Vergleichsgröße für die physiologische Reaktion der Pflanzen war die Blattbonitur hinsichtlich der NBV. Zu jedem Zeitpunkt einer Probennahme wurden die Blattschäden der Gerstenpflanzen nach den Richtlinien der LfL Freising bewertet. Man versteht unter der Bonitur der Pflanzen die Abschätzung des Umfangs der Schadsymptome, differenziert nach Schadensursache. Die Boniturklassen 1-9 ergeben sich aus dem Verhältnis befallener Blattfläche zur Gesamtfläche des Blattes. Meist wurde das Krankheitsbild aber in Prozent geschädigte Blattfläche angegeben (s. Anhang 7.2).

2.7 Mikroskopische Untersuchungen der NBV

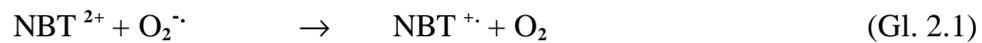
2.7.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Um die These zu überprüfen, dass es sich bei der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung um eine Krankheit ohne Pathogenbeteiligung handelt, wurden befallene Blätter mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden ausgewählte Gerstenblätter direkt nach der Ernte für die Mikroskopie vorbereitet. Die Blätter wurden mit Hilfe einer Spritze mit einer Fixierlösung (4 % (w/v) para-Formaldehyd, 0.2 % (w/v) Glutaraldehyd, 100 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7.0) infiltriert und die fixierten Proben bis zum Mikroskopieren bei 4°C aufbewahrt. Die Messungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Vorteil der cLSM ist das Betrachten dickerer Objekte, da das Präparat Schicht für Schicht mit Hilfe des gebündelten Laserstrahls durchgescannt werden kann. Bei den für die Anregung verwendeten Lasern handelte es sich um einen UV-Laser (365 nm) und einen Blaulaser (488 nm). Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wurde in drei Spektralbereichen von 400-435 nm (Blaukanal), 515-565 nm (Grünkanal) und > 590 nm (Rotkanal) detektiert. Durch die Möglichkeit, das Präparat in unterschiedlichen Tiefen zu betrachten, konnten durch Übereinanderlagerung der verschiedenen Ebenen dreidimensionale Bilder erzeugt werden.

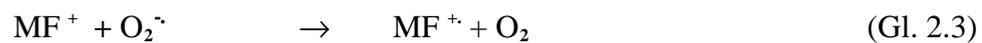
2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 *In situ*-Färbung auf Superoxidanion-Radikale mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)

Um die Verteilung von Superoxidanion-Radikalen im Blatt zu untersuchen, wurde die Methode nach JABS ET AL., 1996 bzw. SCHRAUDNER ET AL., 1998, gewählt. Hierbei macht man sich die Reaktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, einem gelben, wasserlöslichen Farbstoff, mit den Sauerstoffradikalen im Blattgewebe zu dem blauen Farbstoff Formazan zu Nutze. Im physiologischen pH-Bereich liegt NBT als Dikation vor, das durch Superoxidanion Radikale zum NBT^{•+}-Radikal reduziert wird (Gl. 2.1). Über Disproportionierung entsteht aus diesem Radikal Monoformazan und NBT²⁺ (Gl. 2.2).



Monoformazan wird durch weitere Superoxid-Radikale zum Monoformazan-Radikal und schließlich zu Diformazan reduziert (Gl. 2.3/2.4).



Bei beiden Reaktionsprodukten handelt es sich um blaue Farbstoffe (UDILOVA, 1999).

Die *in situ*-Färbung der Superoxidanion-Radikale zur Ermittlung der Radikal Verteilung im Blatt wurde vom Zeitpunkt der Blatternte bis zur vollständigen Extraktion des Chlorophylls aus dem Blatt im Dunkeln durchgeführt, um Artefakte zu vermeiden. Die frisch geernteten Gerstenblätter wurden mit einer 0.1 %igen NBT-Lösung (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.4, 10 mM Natriumazid) infiltriert und 20 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die infiltrierten Blättern in 95 % igen Ethanol eingelegt, um das Chlorophyll aus den Blättern zu

extrahieren. Der Alkohol wurde sooft gewechselt, bis die Lösung farblos blieb. Die vom Chlorophyll befreiten und mit NBT angefärbten Blätter wurden auf die Superoxidation-Radikal-Verteilung bonitiert und anschließend digitalisiert (Scan Jet 4c, Hewlett Packard, Böblingen). Mit der Bildauswertungssoftware Sigma ProScan (SPSS Science, Chicago, USA) wurden die Intensitäten der Anfärbung quantifiziert und mit den Boniturdaten verglichen.

2.8.2 Bestimmung von Antioxidantien

2.8.2.1 Herstellung des Blattextraktes

Die Extraktion der Antioxidantien aus Gerstenblättern wurde modifiziert nach POLLE ET AL (1992) durchgeführt. Hierzu wurde das in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene und bei -80°C zwischengelagerte Blattmaterial mit Pistill und Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und 50 mg des tiefgefrorenen Pulvers in 1 ml 0.1 N HCl eingewogen. Da Thiole mit steigendem pH-Wert und steigenden Temperaturen zunehmend Oxidationsreaktionen unterliegen, wurde die Extraktion in saurem Milieu und auf Eis durchgeführt. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln und guter Durchmischung wurde die Probe bei 15000 g 10 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

2.8.2.2 Messung von Ascorbat

Für die Bestimmung des reduzierten Ascorbats nach POLLE ET AL (1992) wurden 100 μl des salzsauren Blattextraktes in 400 μl kalte 0.1 N HCl pipettiert, gemischt und unter isokratischen Bedingungen getrennt („reversed-phase“ ODS-Hypersil-Trennsäule, C-18, 5 μm Partikelgröße, 250 * 4.6 mm, Bischoff, Leonberg). Die Injektion erfolgt über einen automatischen Probengeber (Beckman, System Gold Autosampler 507e), die Flussrate des Laufmittels (2 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 2.8) betrug 1 ml min^{-1} und wurde durch die beiden Laufmittelpumpen (Beckman System Gold Solvent Module 128) aufrechterhalten. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (Beckman, System Gold Detector, 168) bei einer Wellenlänge von 245 nm. Die Retentionszeit des Ascorbats betrug unter diesen Bedingungen 4.45 ± 0.03 Minuten. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Systemsoftware

Beckman Gold Nouveau Chromatography Data System, Version 1.6. Um zu gewährleisten, dass es während der Verweilzeit auf dem Autosampler nicht zum Abbau des reduzierten Ascorbats kommt, bestand eine Serie aus nicht mehr als 20 Analysen, zu jeder Serie wurden zwei Standards (0.025 mg ml^{-1} , 0.05 mg ml^{-1}) als Kontrolle gemessen.

Die Bestimmung des oxidierten Ascorbats erfolgte indirekt über die Messung des Gesamtascorbats, welches sich aus oxidiertem und reduziertem Ascorbat zusammensetzt. Hierfür wurde das oxidierte Ascorbat mit Dithiothreitol (DTT) reduziert und so das Gesamtascorbat in der reduzierten Form gemessen. Während einer 60 minütigen Inkubation von $100 \mu\text{l}$ Blattextrakt mit $150 \mu\text{l}$ 2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure (CHES, 200 mM , $\text{pH } 9.3$) und $100 \mu\text{l}$ DTT (120 mM) bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die Reduktion, anschließend wurde nach der Zugabe von $150 \mu\text{l}$ HCl (0.1 N) das Gesamtascorbat in oben beschriebener Art und Weise detektiert. Aus der Differenz von Gesamtascorbat und reduziertem Ascorbat ergab sich die Konzentration an oxidiertem Ascorbat im Blattextrakt.

2.8.2.3 Messung von Glutathion und Cystein

Die Thiol-Bestimmung erfolgte nach FAHEY ET AL (1981) und SCHUPP (1991) und basiert auf einer nukleophilen Substitutionsreaktion der Thiole mit der allylischen Bromfunktion von mono-Bromobiman (mBrB). Durch die Derivatisierung der Thiole entsteht ein Thiol-Konjugat, das im Gegensatz zum Substrat nach Anregung bei $380\text{-}390 \text{ nm}$ eine intensive Fluoreszenz bei $475\text{-}485 \text{ nm}$ zeigt. Die Derivatisierung fand unter reduzierenden Bedingungen statt, um eine Autoxidation der Thiole zu vermeiden. Bei der Methode nach FAHEY ET AL (1981) wird daher immer der Gesamtgehalt der Thiole bestimmt. Zur Quantifizierung des Glutathions und Cysteins wurden $120 \mu\text{l}$ des Proteinextraktes mit $180 \mu\text{l}$ CHES (0.2 M , $\text{pH } 9.3$) und $30 \mu\text{l}$ DTT (6 mM) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Derivatisierung erfolgte durch Zugabe von $20 \mu\text{l}$ mono-Bromobiman (15 mM , gelöst in Acetonitril) und einer Inkubation von 15 min im Dunkeln. Die Reaktion wurde mit $250 \mu\text{l}$ 10% iger Essigsäure abgestoppt und die Probe anschließend 10 min bei 14000 g zentrifugiert. Es wurden $500 \mu\text{l}$ des Überstandes in HPLC-Gefäße pipettiert und $50 \mu\text{l}$ mit Hilfe eines Autosamplers auf die Säule injiziert. Die Trennung erfolgte nach dem Prinzip der „reversed-phase“-Chromatographie auf einer ODS-Hypersil-Trennsäule (C-18, $5 \mu\text{m}$

Partikelgröße, 250 * 4.6 mm, Bischoff, Leonberg). Als HPLC-System wurde die unter 2.8.2.2 beschriebene System Gold Anlage der Firma Beckman verwendet. Die Fluoreszenz der mBrB-derivatisierten Proben wurde mit einem Fluoreszenz-Detektor (Fluorometer RF 551, Shimadzu) nach Anregung bei 380 nm bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm detektiert. Als Laufmittel wurden Essigsäure/Methanol-Lösungen eingesetzt:

Laufmittel A (0.25 % Essigsäure, 10.0 % Methanol, pH 3.9)

Laufmittel B (0.25 % Essigsäure, 90.0 % Methanol, pH 3.9)

die nach der Herstellung durch einen 0.45 µm Teflon-Filter (Sartorius GmbH, Göttingen) gereinigt und anschließend entgast wurden. Die Laufmittel waren über einen Zeitraum von 2-3 Tagen bei 4°C haltbar (SCHUPP, 1991). Mit einem nach SCHUPP modifizierten Pumpenprogramm (Tab. 2.9) wurde für die Trennung der Thiole ein binärer Gradient gefahren. Bei einem Fluss von 1.0 ml min⁻¹ erfolgte die Trennung der Thiole innerhalb von 16 min. Die Retentionszeit für Glutathion betrug unter diesen Bedingungen 15.7 ± 0.03 Minuten, die für Cystein 10.75 ± 0.03 Minuten.

Zeit [min]	Laufmittel B [%]	Gradientenprofil
0 – 10.0	0 – 8	1
10.0 – 15.0	8 – 14	2
15.0 – 17.5	14 – 100	2
17.5 – 25.5	100	
25.5 – 26.0	100 – 0	2
26.0 – 30.0	0	

Tab. 2.9: Programm zur Steuerung der HPLC-Pumpen für die Messung der Thiole mittels Laufmittelgradient nach SCHUPP (1991). (1 : konkav, 2 : linear).

Laufmittel B diente im wesentlichen zum Spülen der Säule; so eluierten z. B. DTT-Derivate erst bei einer Retentionszeit von 18.3 ± 0.03 Minuten.

Berechnung der Antioxidantienkonzentration

Die Konzentration der Thiole wie auch des Ascorbats wurde mit Hilfe von Eichgeraden der entsprechenden Antioxidantien ermittelt. Die Standardkurven deckten den zu erwarteten Konzentrationsbereich der analysierten Proben ab. Für Ascorbat wurde aus einer

Stammlösung von 1 mg ml^{-1} Ascorbat in 0.1 N HCl eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen $0.0025 - 0.005 - 0.01 - 0.025 - 0.05 - 0.1 \text{ [mg ml}^{-1}\text{]}$ (Abb. 2.6), für die Thiole aus einer Stammlösung von 1 mM Glutathion in 0.1 N HCl in den Konzentrationen $0.2 - 0.4 - 0.8 - 1.25 - 2.0 - 4.0 \text{ [}\mu\text{mol ml}^{-1}\text{]}$ bzw. von 1 mM Cystein in 0.1 N HCl in den Konzentrationen $0.2 - 0.4 - 0.8 - 1.0 - 2.0 - 4.0 \text{ [}\mu\text{mol ml}^{-1}\text{]}$ (Abb. 2.7) hergestellt und unter den selben Bedingungen wie die Proben chromatographisch analysiert. Aus dem Quotienten der Konzentrationen und den Flächeneinheiten der Standards ergab sich der Faktor zur Umrechnung der gemessenen Flächeneinheiten in Konzentrationseinheiten. Nach Verrechnung der eingewogenen Blattmenge ergab sich die Einheit $[\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ FG}]$.

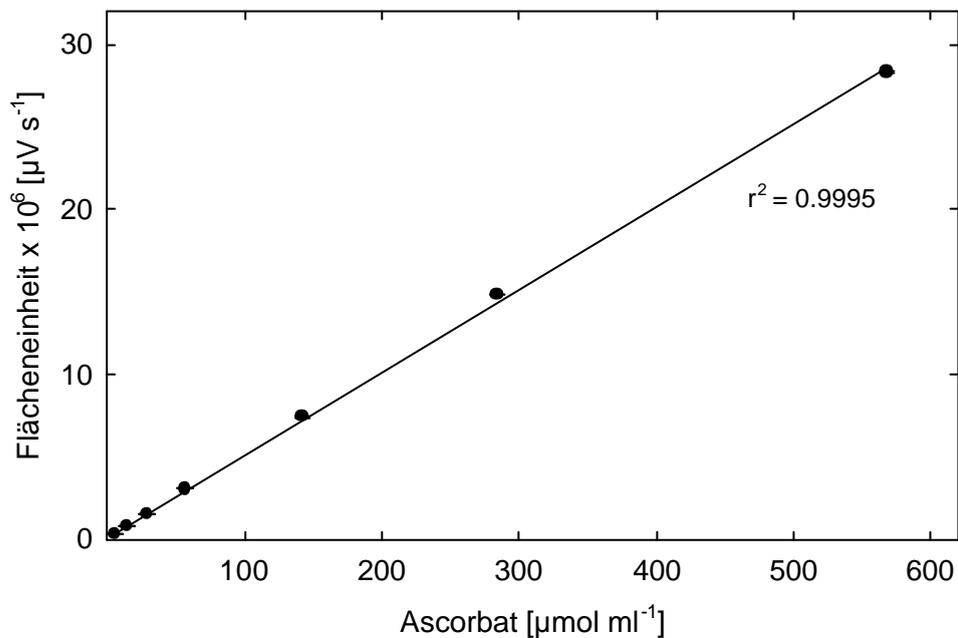


Abb. 2.6: Eichkurve zur Bestimmung der Ascorbatkonzentration. Als Standard diente Ascorbat der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, in den Konzentrationen von 0.0025 bis 0.1 mg ml^{-1} in 0.1 N HCl , die Messung erfolgte nach POLLE ET AL., 1992, wie unter 2.8.2.2 beschrieben. Der Regressionskoeffizient der linearen Regression betrug $r^2 = 0.9995$ ($n = 3, \pm \sigma$).

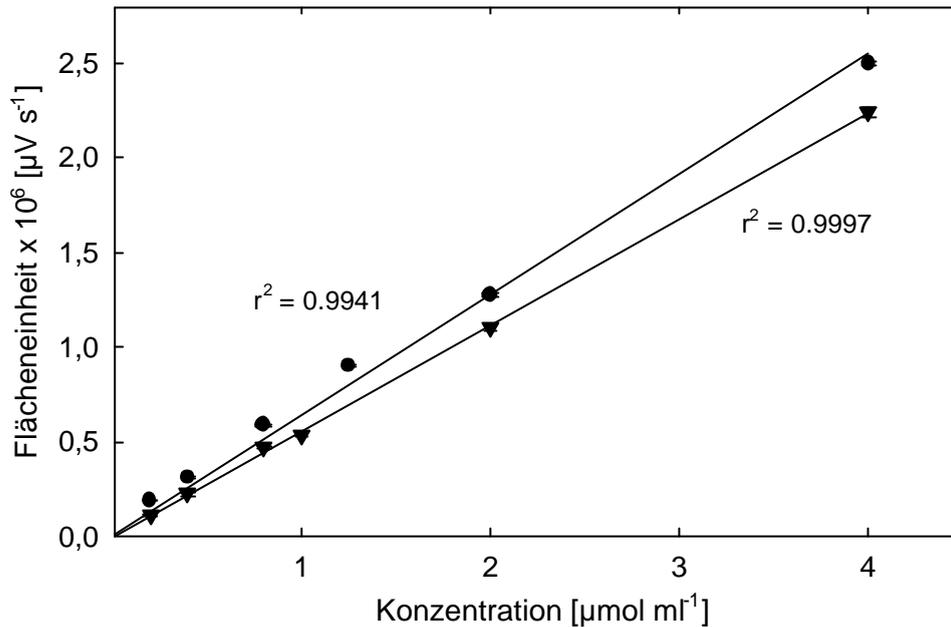


Abb. 2.7: Eichkurve zur Bestimmung der Glutathion-(●) bzw. Cystein-(▼)Konzentration. Als Standard diente Glutathion bzw. Cystein in den Konzentrationen von 0.2 bis 4 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ in 0.1 N HCl, die Messung erfolgte nach SCHUPP ET AL., 1991, wie unter 2.8.2.3 beschrieben. Der Regressionskoeffizient der linearen Regression betrug für Glutathion $r^2 = 0.9941$ ($n = 3, \pm \sigma$) und für Cystein $r^2 = 0.9997$ ($n = 3, \pm \sigma$).

2.8.2.4 Wiederfindung extrahierter Antioxidantien

Um sicherzustellen, dass während der Extraktion und Probenvorbereitung keine Verluste an Antioxidantien auftreten und um zu überprüfen, dass die gewählte Methode zur Bestimmung von Ascorbat, Glutathion und Cystein geeignet ist, wurde die Wiederfindungsrate für die drei Substanzen ermittelt (Tab. 2.10). Hierzu wurde in vier Parallelansätzen zu Beginn der Extraktion der Extraktionslösung eine definierte Menge des internen Standards zugegeben. Die Wiederfindungsrate f errechnete sich wie folgt aus den gemessenen Daten:

$$f = (a_{(p+s)} - a_p) * 100/a_s \quad (\text{Gl. 2.5})$$

$a_{(p+s)}$ steht hierbei für die gemessenen Flächeneinheiten der Probe mit zugesetztem internen Standard, a_p für die gemessenen Flächeneinheiten der reinen Probe und a_s für die gemessenen Flächeneinheiten des reinen Standards.

Substanz	Wiederfindung	n
Ascorbat	96.04 ± 5.05	12
Glutathion	91.87 ± 6.82	12
Cystein	93.41 ± 5.88	12

Tab. 2.10: Wiederfindungsraten für die Bestimmung von Ascorbat, Glutathion und Cystein aus Blattmaterial der Gerste. Die Wiederfindung errechnete sich aus der Differenz der Probe mit und ohne internen Standard (0.01 mg ml⁻¹ für Ascorbat, 0.4 µmol ml⁻¹ für die Thiole) im Verhältnis zum reinen Standard (n = Anzahl Messungen).

2.8.3 Bestimmung der Superoxiddismutase - Aktivität

Es wurden die Aktivitäten der Gesamt-SOD und der Cu/Zn-SOD mittels eines spektralphotometrischen Enzymtests bestimmt, wobei die Messung der Cu/Zn-SOD indirekt durch die Inhibierung dieses Isozyms mittels 5 mM KCN (BEAUCHAMP ET AL 1973) erfolgte. Aus der Differenz der Gesamt-SOD-Aktivität und der bei Inhibierung mit KCN gemessenen Mn- + Fe-SOD-Aktivitäten errechnete sich die Aktivität der Cu/Zn-SOD.

2.8.3.1 Herstellung des Blattextraktes

Für die Extraktion der Superoxiddismutase aus Gerstenblättern wurden 50 mg des in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen und bei -80°C zwischengelagerten Blattmaterials mit Pistill und Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und nach Zugabe von 600 µl Extraktionspuffer (50 mM Kalium-Phosphat, 0.1 % BSA, 0.1 % Ascorbat, frisch zugegeben: 0.05 % β-Mercaptoethanol, pH 7.8) 15 min bei 4°C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 g und 4°C wurde der Überstand dekantiert und der Extrakt sofort für die Aktivitätsbestimmung weiterverwendet.

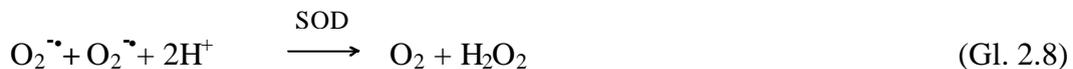
2.8.3.2 Spektralphotometrische Bestimmung der SOD-Enzymaktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase erfolgte mit Hilfe des RanSOD Testes (Firma Randox, Crumlin, England). Da dieser Test für die humanmedizinische Diagnostik

entwickelt wurde, war es erforderlich, den Test für die Bestimmung der SOD aus Pflanzenmaterial zu validieren und zu optimieren (s. 3.1). Messprinzip ist die Bestimmung der Enzymaktivität anhand der Hemmung der Bildung des Farbstoffes Formazan durch das Enzym Superoxiddismutase. Durch die Reaktion (Gl. 2.6) von Xanthin mit Xanthin-Oxidase (XOD) werden in der Probe Superoxidanion-Radikale generiert, welche 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenol)-5-Phenyltetrazoliumchlorid (INT) zu einem roten Formazanfarbstoff reduzieren (Gl. 2.7), der spektralphotometrisch bei 492 nm gemessen werden kann. Da SOD Superoxidanion-Radikale in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandelt (Gl. 2.8), steht für die Reaktion von INT zu Formazan weniger Reduktionsmittel zur Verfügung, die Farbstoffbildung verringert sich. Die Superoxiddismutase-Aktivität wird anhand der Hemmung dieser Reaktion gemessen.



bzw.



Der Testkit beinhaltet gemischtes Substrat (0.05 mmol l⁻¹ Xanthin, 0.025 mmol l⁻¹ INT), Puffer (40 mmol l⁻¹ 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS), pH 10.2, 0.94 mmol l⁻¹ EDTA) zum Auflösen des Substrats, Probenverdünnungspuffer (0.01 mmol l⁻¹ Phosphat-Puffer, pH 7.0), Xanthin-Oxidase (80 U l⁻¹) und SOD-Standard (4.9 U ml⁻¹). Alle Reagenzien lagen lyophilisiert vor und wurden am Tag der Verarbeitung wie folgt aufgelöst: Das gemischte Substrat in 20 ml Puffer, die Xanthin-Oxidase und der Standard in jeweils 10 ml bidestilliertem Wasser. Nach Herstellerangaben sind die Reagenzien in gelöstem Zustand 2 Wochen bei 2-8°C haltbar.

Für die Eichkurve wurden je nach Ausgangskonzentration des gekauften Standards mit dem Probenverdünnungsmittel folgende Konzentrationen hergestellt: 0.153 - 0.306 - 0.613 - 1.225 - 2.45 - 4.9 [U ml⁻¹] bzw. 0.0844 - 0.1688 - 0.3375 - 0.675 - 1.35 - 2.7 - 5.4 [U ml⁻¹]. Als

Leerwert wurde der Verdünnungspuffer eingesetzt. Eine Einheit (Unit) Superoxiddismutase-Aktivität wird definiert als die Menge SOD, die die Formazanbildung um 50% hemmt.

Auf Grund der großen Probenanzahl wurde der Test anstatt wie nach Herstellerangabe in Halbmikroküvetten, in einer Mikrottestplatte aus Quarzglas (Hellma, Müllheim, Deutschland, 8 x 12 x 300 µl) durchgeführt. Dies ermöglichte eine parallele Analyse von 12 Proben. Jede Probe wurden dreifach gemessen. Dazu wurden je 5 µl Probe bzw. Standard, 150 µl gemischtes Substrat, 20 µl Verdünnungsmittel bzw. KCN-Lösung für die Bestimmung der Gesamt- bzw. Cu/Zn-SOD Aktivität, in eine Vertiefung der Platte pipettiert. Diese Volumina entsprachen im Verhältnis den Volumina der Testvorschrift. Nach guter Durchmischung der Platte wurden 25 µl Xanthin-Oxidase zugegeben und die Platte nochmals geschüttelt. Nach 30 sec erfolgte die Bestimmung der Anfangsabsorption A_1 , 3 min nach A_1 die der Endabsorption A_2 . Die Messung wurde in einem Plattenphotometer (Spectra Image, SLT, Crailsheim) bei 492 nm durchgeführt.

Für die Berechnung der Konzentration wurde nach Formel Gl. 2.9 die Absorptionsänderung pro Minute ermittelt:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A \text{ Standard bzw. Probe min}^{-1} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Um die Konzentration in $U \text{ ml}^{-1}$ zu errechnen, musste zunächst, ausgehend von der ungehemmten Reaktionsrate des Verdünnungsmittels = 100 %, die Absorptionsänderung der Probe in % der Verdünnungsmittelrate konvertiert werden. Anhand dieses Wertes wurde die prozentuale Hemmung der Farbstoffbildung errechnet.

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{Standard min}^{-1}} \times 100}{\Delta A_{S1 \text{ min}^{-1}}} = \% \text{ Hemmung} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{Probe min}^{-1}} \times 100}{\Delta A_{S1 \text{ min}^{-1}}} = \% \text{ Hemmung} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Durch Auftragen der prozentualen Hemmung jeden Standards gegen Log_{10} wurde die Standardkonzentration in $SOD \text{ U ml}^{-1}$ berechnet (Abb. 2.8). Anhand der Eichkurve konnte

aus der prozentualen Hemmung der Probe die Einheit U von SOD ermittelt werden. Da bei der Eichkurve ein sigmoider Kurvenverlauf vorlag, wurden die Proben so verdünnt, dass die Hemmung zwischen 30 % und 60 % der Verdünnungsmittelrate, d.h. im linearen Bereich der Kurve lag. In der Regel wurde das durch eine 1:10 Verdünnung der Probe erreicht. Im Anschluss an die Aktivitätsmessung wurde aus den Extrakten die Proteinkonzentrationen nach BRADFORD (1976, siehe 2.8.3.3) bestimmt. Anhand der gemessenen Proteingehalte wurde die SOD-Aktivität auf mg^{-1} Protein bezogen.

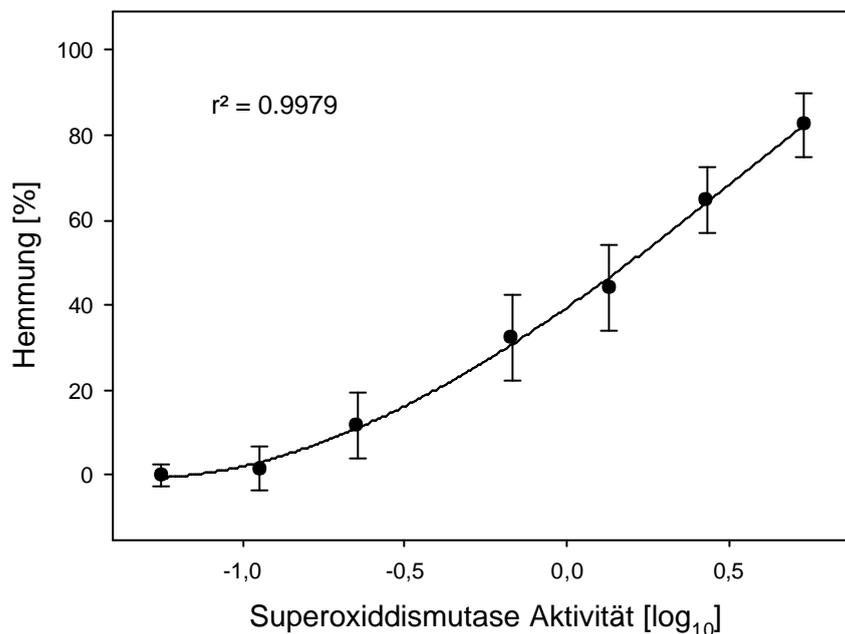


Abb. 2.8: Eichkurve zur Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität. Der Standard stammte aus dem Testkit RanSOD, Randox, Crumlin, England, in den Konzentrationen von 0.153 bis 4.9 U ml^{-1} . Die Messung erfolgte spektralphotometrisch, nachdem zu $5 \mu\text{l}$ Standard $150 \mu\text{l}$ Substrat, $20 \mu\text{l}$ Verdünnungsmittel und, nach gutem Mischen, $25 \mu\text{l}$ Xanthin-Oxidase zugegeben wurden. Es wurde eine Absorptionmessung bei 492 nm zum Zeitpunkt Null und 3 min später durchgeführt. Die Werte errechneten sich über die Absorptionsänderung mit der Zeit wie unter 2.8.3.2 beschrieben. Es ergab sich ein Regressionskoeffizient von $r^2 = 0.9979$ ($n = 3, \pm \sigma$).

2.8.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD

Um die Proteinkonzentration in den Extrakten zu bestimmen, wurde die Methode nach BRADFORD (1976) verwendet. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine. Vorteil dieser Methode ist die Unempfindlichkeit des Testes gegenüber störenden Ionen und Reduktionsmitteln. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung, die über eine Standardkurve rechnerisch ermittelt wurde. Für die Messung wurde in Halbmikroküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) zu 10 µl Blattextrakt bzw. Standard (BSA, Serva, Heidelberg) 2 ml Bradford-Lösung (0.01 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250, 5 % Ethanol, 10 % (v/v) ortho-Phosphorsäure, H₂O_{bidest.} ad 1000 ml, filtrieren) gegeben, die Probe gut durchmischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Lambda 2 UV/VIS-Spektralphotometer (Perkin Elmer, Überlingen) bei 595 nm. Für die Eichgerade wurde aus einem 1 mg ml⁻¹ BSA-Standard eine Verdünnungsreihe im Bereich der Probenkonzentrationen angesetzt. Die Standardkonzentrationen betragen somit 0.125, 0.25, 0.4 und 0.5 mg ml⁻¹ (Abb. 2.9). Proben und Standards wurden dreifach gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte anhand der Eichgeraden über Mittelwertsbestimmung.

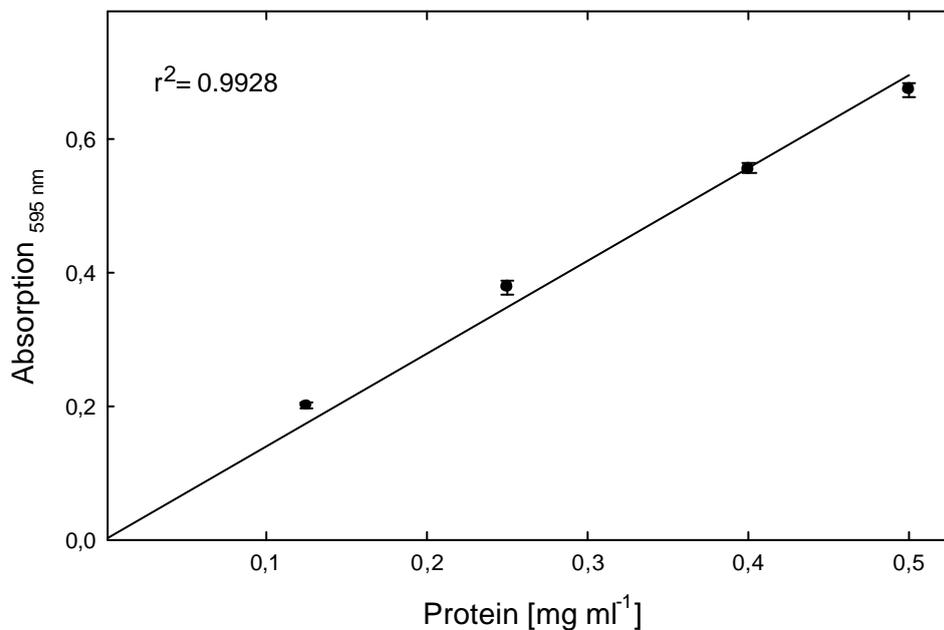


Abb. 2.9: Eichkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976). Als Standard diente BSA in den Konzentrationen von 0.125 bis 0.5 mg ml⁻¹. Der Regressionskoeffizient der linearen Regression betrug $r^2 = 0.9928$ ($n = 3, \pm \sigma$).

2.9 Molekularbiologische Methoden

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden sollte die Expression repräsentativer stress-induzierter Gene untersucht werden. Zu diesem Zweck war es nötig, die Gesamt-RNA aus den beprobten Pflanzen zu isolieren. Für die RNA-Isolierung wurden ausschließlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O_{bidest} gespülte Gefäße sowie autoklavierte Probengefäße und mit DEPC-H₂O_{bidest} angesetzte Lösungen verwendet. DEPC-H₂O_{bidest} wurde hergestellt, indem 0.2 ml DEPC in 100 ml H₂O_{bidest} über 12 Stunden unter Rühren gelöst und anschließend autoklaviert wurde. DEPC ist ein RNase-Inhibitor und gewährleistet eine RNasefreie Umgebung. Zum Autoklavieren wurde ein Dampfsterilisator (Vapoclav Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) verwendet, der über 20 min auf einen Druck von 1.2 bar und eine Temperatur von 120°C eingestellt wurde.

2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Gerstenblättern

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gerstenblättern erfolgte nach der TRIzol-Methode, welche beim Vergleich von drei verschiedenen Methoden die besten Werte an Reinheit und Konzentration erzielt hatte (Tab. 2.11). Für die TRIzol-Methode wurden alle Reagenzien vor Arbeitsbeginn auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden während der Isolierung ausschließlich mit der Pipette durchmischt. 100 mg des unter flüssigem Stickstoff homogenisierten Blattmaterials wurden mit 1 ml TRIzol (Invitrogen, Groningen, NL) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur besseren Extraktion wurde die Probe mehrmals gut durchmischt und anschließend 200 µl Chloroform zugegeben. Nach 15 sec Überkopfschütteln und nochmaliger Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur wurde die Probe für 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Es entstand eine untere, rote Phenol-Chloroform Phase, eine feste Zwischenphase und eine farblose, obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Nach Dekantieren der wässrigen Phase in ein frisches Gefäß wurden 250 µl Isopropanol zum Fällen der RNA zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließende Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für 10 min ergaben ein oft schlecht sichtbares Sediment. Dieses wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 1 ml 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und nochmals bei 7500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das

RNA-Sediment wurde an der Luft getrocknet und in 50 μl DEPC- $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert. Die so gewonnene RNA wurde spektrometrisch und elektrophoretisch auf Reinheit und Konzentration überprüft. Die Probe wurde bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Für den Vergleich verschiedener Methoden der Gesamt-RNA-Isolierung wurden 1) der Nucleon PhytoPure Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) 2) die Methode nach CHANG ET AL., 1993 und 3) die Isolierung mit TRIzol (Invitrogen, Groningen, NL) getestet (Abb. 2.10).

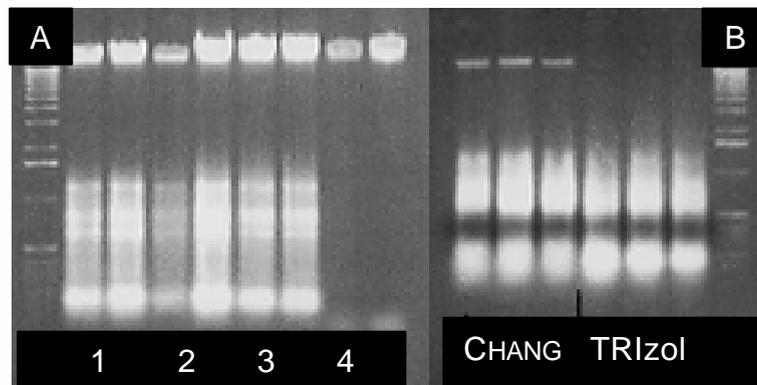


Abb. 2.10: Mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Gesamt-RNA-Isolierung. Gel **A** zeigt die Isolierung mit Nucleon PhytoPure Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), Spur 1 + 3 = Isolierung ohne Zusatz von DNase, 2 = Isolierung unter Zugabe von DNase, 4 = Isolierung unter Zugabe von RNase. Gel **B** zeigt die Isolierung nach den Methoden CHANG ET AL., 1993 und TRIzol. Spur 1 in Gel **A** bzw. Spur 7 in Gel **B** enthalten 3 μl eines DNA-Längenstandards (1 Kb-Leiter).

Die Methoden (Durchführung (1) und (2) s. Anhang 7.3) zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Konzentration der gewonnenen RNA. Die Isolierung mit dem Testkit Nucleon PhytoPure ergab eine Ausbeute von $1.8 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, die Methode nach CHANG ET AL., 1993 $1.6 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, wohingegen die Methode mit dem TRIzol-Reagenz eine Ausbeute von $3.4 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ RNA ergab. Da auch die Reinheit dieser Proben am höchsten war und die Methode für größere Probenzahlen gut durchführbar ist, wurde für die Isolierung der RNA die TRIzol-Methode gewählt.

Methode	Reinheit [$A_{260/280 \text{ nm}}$]	Ausbeute [$\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$]
Nucleon PhytoPure	1.53 ± 0.06	1.8 ± 0.3
CHANG ET AL., 1993	1.58 ± 0.07	1.6 ± 0.2
TRIzol	1.75 ± 0.02	3.4 ± 0.3

Tab. 2.11: Vergleich der getesteten RNA-Isolierungsmethoden bezüglich Reinheit und Ausbeute [$\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$] der gewonnenen RNA. Die Reinheit ergibt sich spektralphotometrisch aus dem $A_{260/280 \text{ nm}}$ Verhältnis, bei einem Wert zwischen 1.6 und 2.0 kann von einer reinen Nukleinsäure ausgegangen werden. Die Ausbeute errechnet sich aus der Absorption bei 260 nm ($A_{260 \text{ nm}}$), dem Verdünnungsfaktor der Probe und dem Faktor 0.04 (bei 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Nukleinsäurekonzentration von $40 \mu\text{g ml}^{-1}$). Beste Werte konnten mit der TRIzol-Methode erzielt werden. Der Testkit Nucleon PhytoPure und die Methode nach CHANG ET AL., 1993 zeigten im Gel Rückstände von DNA, die $A_{260/280 \text{ nm}}$ -Werte deuteten auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.9.2 Spektralphotometrische und gelelektrophoretische Bestimmung der Reinheit und Ausbeute der Gesamt-RNA

Für die vergleichende Untersuchung der Expression spezifischer Gene zwischen unterschiedlichen Kultivaren war es nötig, gleiche Mengen an RNA in den Versuchen einzusetzen. Zur Bestimmung der Ausbeute und zur Abschätzung der Reinheit der gewonnenen RNA wurde spektralphotometrisch das $A_{260/280 \text{ nm}}$ -Verhältnis bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:100 mit DEPC – $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt und in einer Quarzküvette (Quarzglas Suprasil, Hellma, Müllheim) die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Bei einem OD-Verhältnis von 260 nm : 280 nm zwischen 1.6 und 2.0 konnte von einer reinen Nukleinsäure ausgegangen werden. War der Wert erheblich niedriger, konnte das an einer nicht vollständig resuspendierten oder mit Proteinen verunreinigten RNA liegen. Aus dem $A_{260 \text{ nm}}$ -Wert kann die RNA-Ausbeute der Probe abgeschätzt werden. Ein Wert von 1 entspricht in etwa einer Nukleinsäurekonzentration von $40 \mu\text{g ml}^{-1}$, so dass mit folgender Formel die Konzentrationen der Proben errechnet werden konnten (SAMBROOK ET AL., 1989):

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g ml}^{-1}] = A_{260 \text{ nm}} \cdot 0.04 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Zur Überprüfung der erfolgreichen RNA-Isolierung wurde in einer selbstgebauten Elektrophorese-Einheit eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass im Gel kein RNA-Verdau durch RNase stattfindet, wurde die Anlage vor der Elektrophorese mit RNase Free (Roth, Karlsruhe) gereinigt.

Für die Auftrennung wurde ein 0.8 %iges Agarosegel gegossen (0.8 g Agarose wurden in 100 ml Tris-Aacetat-EDTA-Elektrophoresepuffer pH 8.0 (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA) durch kurzes Erhitzen gelöst, 4 µl Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹) zugegeben und die Lösung in einer Gelkammer für 30 min polymerisiert). Während der Elektrophorese kommt es zur Bindung des Ethidiumbromids an die RNA, sodass sich die Nukleinsäurebanden im UV-Licht darstellen. Es wurden jeweils 1 µg RNA 1:5 mit Probenpuffer (1.4 mg Bromphenolblau, 1.0 ml Tris/HCl (10 mM, pH 8.0), 1.0 ml Glycerin) verdünnt, auf das Gel aufgetragen und ca. 40 min bei 120 V in TAE-Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Zur Auswertung wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

2.9.3 Messung differentieller Genexpression mittels „cDNA-Array“-Technologie

Die „cDNA-Array“-Technologie ermöglichte es, die Expression von ausgewählten Genen des pflanzlichen Stressstoffwechsels (s. Tab. 2.12) auf Transkriptionsebene gleichzeitig in einem Versuchsansatz zu untersuchen. Hierzu wurden „Expressed sequence tags“ (ESTs) des Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben mittels PCR amplifiziert und auf Filter pipettiert. Aus Pflanzenproben isolierte Gesamt-RNA wurde bei der Umschreibung in cDNA mit radioaktivem Phosphor [³³P] markiert und auf den Filtern mit den genspezifischen Sonden hybridisiert (Abb. 2.11). Nach Exposition der Filter auf Image-Platten wurden die radioaktiven Signale detektiert und die Gene auf ihre differentielle Expression hin digital ausgewertet.

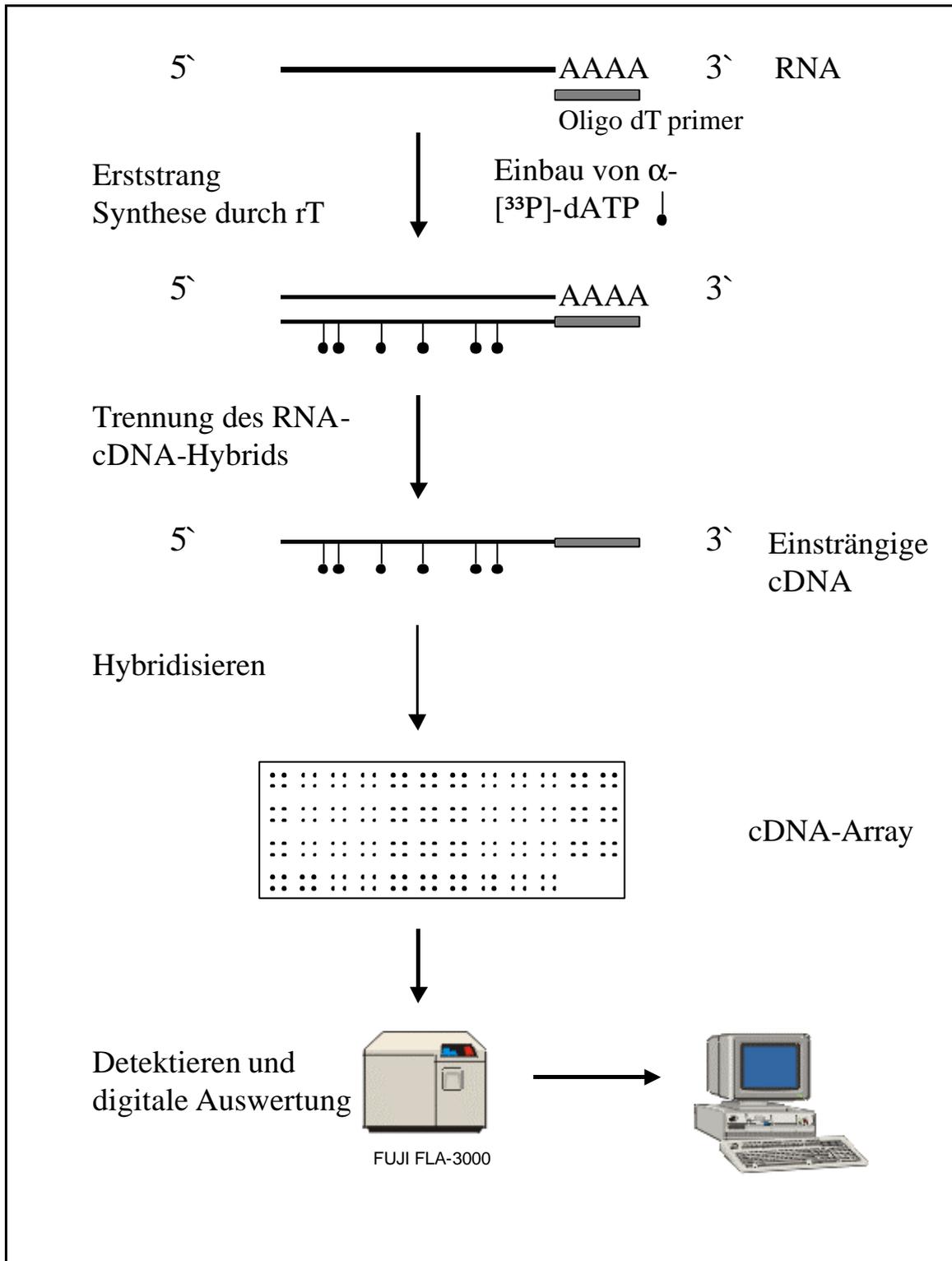


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Messung differentieller Genexpressionen mittels „cDNA-Array“-Technologie: Aus Pflanzenmaterial isolierte Gesamt-RNA wurde beim Umschreiben in cDNA mit α - ^{32}P -dATP (\downarrow) markiert. Ausgewählte ESTs des IPK Gatersleben wurden amplifiziert und auf Nylonmembranen aufgebracht. Die Membranen wurden mit der markierten cDNA hybridisiert und die radioaktiven Signale mittels „Photostimulierter Lumineszenz“ detektiert und digital ausgewertet.

2.9.3.1 Auswahl spezifischer ESTs aus der Datenbank des IPK Gatersleben

Für die Messung differentieller Genexpression mittels „cDNA-Array“-Technologie wurden aus der Datenbank des IPK Gatersleben repräsentative ESTs aus dem Bereich des pflanzlichen Stressstoffwechsels ausgewählt (Tab. 2.12). Das Spektrum umfasste ESTs des Ethylen-, oxidativen Stress-, Phenylpropanoid-/Flavonoid-Stoffwechsels sowie der Signalübertragung und der PR-Proteine („pathogenesis-related“). Des Weiteren wurden drei „house keeping genes“ (Ribosomales Protein L5, L34 und L37A) als Referenz eingesetzt.

Nr.	Phenylpropanoid-/Flavonoid-Stoffwechsel	Accession Nr.	Quelle	Sequenz ID	Identität
1	PLASTIDÄRE 3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONAT 7-PHOSPHAT SYNTHASE 2	AL507096	Petroselinum	HY05G15T	83
2	PHENYLALANIN AMMONIUM LYASE	AL505744	Vitis vinifera	HW09G10V	98
3	PHENYLALANIN AMMONIUM LYASE (EC 4.3.1.5)	AL503572	Oryza	HW02K13T	94
4	4-COUMARAT COA-LIGASE (EC 6.2.1.12)	AL510457	Glycine	HY04P21u	81
5	KAFFEESÄURE COA O-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.104)	AL503249	Zea	HW01E24T	56
6	KAFFEESÄURE O-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.68)	AL505122	Zea	HW07H11V	78
7	CHALCON REDUKTASE HOMOLOG	AL509174	Sesbania	HY10O20V	37
8	FLAVANON 3-BETA-HYDROXYLASE (EC 1.14.11.9)	AL507778	Hordeum	HY06N06V	99
9	DIHYDROFLAVONOL 4-REDUKTASE (EC 1.1.1.219)	AL505972	Arabidopsis	HY05E15T	48
	Oxidativer Stress				
10	SUPEROXIDDISMUTASE Cu-Zn (EC 1.15.1.1)	AL503386	Triticum	HW01P06T	82
11	ASCORBAT PEROXIDASE (EC 1.11.1.11)	AL503632	Hordeum	HW02O04T	98
12	MONODEHYDROASCORBAT REDUKTASE	AL507490	Oryza	HY05P14V	86
13	DIHYDROASCORBAT REDUKTASE	AL508888	Hordeum	HY10B17V	99
14	GLUTATHION REDUKTASE	AL503318	Oryza	HW01J20T	91
15	GLUTATHION TRANSFERASE (EC 2.5.1.18)	AL505972	Alopecurus	HY01C15T	88
16	NADPH OXIDASE	AL510860	Arabidopsis	HY06D14u	68
17	CATALASE 1 (EC 1.11.1.6)	AL505053	Hordeum	HW07D22V	98
18	PEROXIDASE (EC 1.11.1.7)	AL503679	Triticum	HW03A22T	94
19	RETICULIN OXIDASE-LIKE PROTEIN	AL503690	Arabidopsis	HW03B14T	41
20	RESPIRATORY BURST OXIDASE PROTEIN	AL507795	Arabidopsis	HY06N24V	60
21	GERMIN LIKE PROTEIN	AL505876	Triticum	HW09M16V	94
	Ethylen-Biosynthese				
22	ACC SYNTHASE (EC 4.4.1.14)	AL507850	Triticum	HY07A14V	93
23	ACC OXIDASE	AL499770	Sorghum	HK03F13r	79

	"Pathogenesis related" (PR) Proteine	Accession-Nr.	Quelle	Sequenz ID	Identität
24	PUTATIVE BETA-1,3-GLUKANASE	AL504555	Arabidopsis	HW05K08V	73
25	XYLOGLUKAN ENDO-1,4-BETA-GLUKANASE (EC 3.2.1.)	AL450708	Triticum	HK03O01u	88
26	CHITINASE (EC 3.2.1.14)	AL499683	Secalis	HK01K20r	66
27	LIPOPHOSPHODIESTERASE II (EC 3.1.4.4)	AL505240	Zea	HW07N10V	92
28	S-ADENOSYLMETHIONIN SYNTHASE (EC 2.5.1.6)	AL505970	Oryza	HY01C11T	94
29	S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEIN HYDROLASE (EC 3.3.1.1)	AL508453	Triticum	HY08N01V	99
30	BASIC PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN PR5 PRECURSOR	AL500072	Hordeum	HK04M10r	79
31	BASIC PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN PR5 PRECURSOR	AL505722	Hordeum	HW09F09V	84
32	HYDROXYPROLIN REICHES GLYKOPROTEIN	AL507449	Pisum	HY05L15V	71
	Signalübertragung				
33	MYB 1 TRANSKRIPTIONS FAKTOR	AL506267	Petroselinum	HY02J05T	67
34	14-3-3 LIKE PROTEIN	AL502999	Hordeum	HW09G13u	100
35	MAP KINASE	AL504341	Avena	HW04P17V	98
36	LIPOXYGENASE 2 (EC 1.13.11.12)	AL507960	Hordeum	HY07F20V	100
37	HISTIDIN KINASE HOMOLOG	AL508494	Escherichia	HY08O20V	95
38	PUTATIVE ETHYLEN RESPONSE SENSOR	AL506329	Phalaenopsis	HY02M07T	92
	Photosynthese				
39	CHLOROPHYLL A/B BINDENDEN PROTEIN	AL503679	Spinach	HW03A22T	92
40	APOPROTEIN A2	AL450790	Oenothera	HK04D24u	98
	DNS-Photoreparatur				
41	6-4 PHOTOLYASE	AL510249	Arabidopsis	HY04F19u	74
	"House keeping genes"				
	60S RIBOSOMALES PROTEIN L5	AL503583	Oryza	HW02L03T	85
	60S RIBOSOMALES PROTEIN L34	AL504595	Nicotiana	HW05M07V	93
	60S RIBOSOMALES PROTEIN L37A	AL502850	Pseudotsuga	HW08O19u	96

Tab. 2.12: Repräsentative „Expressed sequence tags“ (ESTs) für die Messung differentieller Genexpression mittels „cDNA-Array“-Technologie. Das Spektrum umfasste ESTs der Ethylenbiosynthese, des Oxidativen Stress-, Phenylpropanoid-/Flavonoid-Stoffwechsels, der Photosynthese, DNA-Reparatur sowie der Signalübertragung und der PR-Proteine („pathogenesis-related“). Anhand bekannter Gene anderer Arten wurden über Sequenzvergleiche verwandte ESTs mit hoher Identität ausgewählt. Des Weiteren wurden drei „house keeping genes“ (Ribosomales Protein L5, L34 und L37A) als Referenz ausgesucht. In der Tabelle sind neben der Accession-Nummer der bekannten Gene aus der EMBL-Datenbank, die Quelle (Art aus der das Gen stammt) und die Sequenz-Bezeichnung des IPK Gatersleben (Sequenz ID) mit den dazugehörigen Homologien der ESTs mit den Genen (Identität) angegeben.

2.9.3.2 Herstellung der Gensonden über PCR

Aus den Plasmid-Klonen des IPK Gatersleben wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die spezifischen Sonden in ausreichender Menge vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden anhand eines Agarosegels kontrolliert und anschließend gereinigt und aufkonzentriert.

Die PCR der Plasmid-Klone wurde in einer Mikrotiterplatte in einem Volumen von je 100 μl durchgeführt. Für den Ansatz der 46 Klone wurde eine Reagenzmischung aus 10x Taq-Puffer (750 mM Tris/HCl (pH 9.0), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 % Tween 20, 25 mM MgCl_2), 10 mM dNTPs, 10 μM M13 forward Primer, 10 μM M13 reverse Primer und 5 U μl^{-1} Taq-Polymerase hergestellt und davon 28.5 μl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von je 1 μl der verschiedenen Klonproben wurden je 70.5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ in die Vertiefungen pipettiert und gut vermischt. Die PCR wurde in dem PCR Express (Thermo Hybaid, Frankfurt) mit folgendem PCR-Programm durchgeführt (Tab. 2.13) :

	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	40
Anlagerung (Annealing)	55	0.75	
Kettenverlängerung (Extension)	72	2	
Kettenverlängerung (Extension)	72	7	1

Tab. 2.13: PCR-Programm zur Amplifikation der spezifischen Sonden des IPK Gatersleben. Es wurden nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 95°C über 5 min, 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95°C , einem Annealing bei 55°C und einer Extension bei 72°C über 2 min durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Extension bei 72°C über 7 min.

Nach der PCR wurden zur Überprüfung der PCR-Produkte 5 μl auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die restlichen 95 μl wurden auf einer Filtrationsplatte (Multiscreen PCR-Platte, Millipore, Eschborn) aufgereinigt und konzentriert. Hierzu wurden die PCR-Produkte auf die Mikrotiterplatte pipettiert und mit einer selbstgebauten Vakuumeinrichtung die Flüssigkeit abgesaugt. Aufgrund der Porengröße der Filter verblieben die PCR-Produkte auf der Platte und konnten in 55 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert werden. Die Lösungen wurden auf eine MikroWell Platte (NUNC, Wiesbaden) überführt und 5 μl auf ein 1 %iges Agarosegel

aufgetragen. Die gereinigten und konzentrierten PCR-Produkte wurden bis zur Aufbringung auf die Filter bei -20°C aufbewahrt.

2.9.3.3 Aufbringen der Sonden auf die Membran

Um die spezifischen Sonden auf die Filter (Hybond-N+-Nylonmembranen, 119 mm x 78 mm, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufzubringen (Abb. 2.12), bediente man sich eines Pipettier-Roboters. Die PCR-Produkte wurden aus der MicroWell-Platte heraus mit dem MicroGridII (BioRobotics, Cambridge, UK) auf die Membranen aufgebracht, indem ein Stempel mit 96 Nadeln, die einen Durchmesser von jeweils 400 μm hatten, aus der MicroWell-Platte heraus die Proben aufnahm und auf die Membranen pipettierte. Um zu verhindern, dass die Membranen beim Pipettieren verschoben werden, wurden sie mit doppelseitigem Klebeband (Beiersdorf, Hamburg) auf Nunclon Omnitrays (NUNC, Eschborn) fixiert. Jede Sonde wurde vierfach in einer quadratischen Anordnung auf den Filter aufgebracht, wobei jeder Punkt zehnmal mit der jeweiligen Probe benetzt wurde, so dass sich ein Muster von 12 x 4 ESTs in Vierfachbestimmungen ergab:

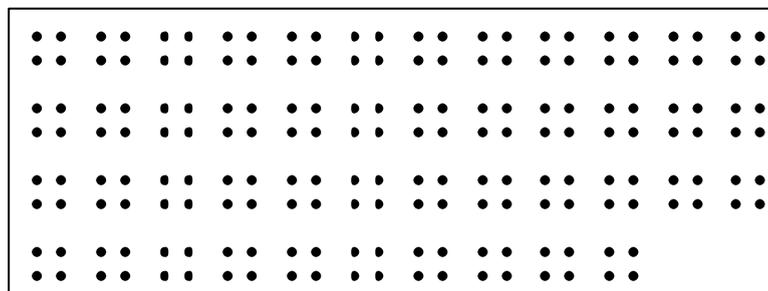


Abb. 2.12: Schema einer Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit fixierten spezifischen Sonden zur Bestimmung der differentiellen Expression ausgewählter Gene. Die ESTs wurden im Muster 12 x 4 mit jeweils 4 Signalen pro EST ($\begin{matrix} \bullet & \bullet \\ \bullet & \bullet \end{matrix}$) auf die Membran pipettiert.

Nach dem Pipettieren auf die Membranen wurden die ESTs durch UV-Strahlung (1200 μJoule UV-Licht des Stratalinkers 1800, Stratagene, La Jolla, USA) mit der Membran vernetzt und danach denaturiert. Die Denaturierung erfolgte, indem die Membranen für jeweils 5 min in 1) 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, 2) 0.5 M Tris, 1.5 M NaCl und 3) 2x SSC inkubiert wurden, wobei darauf geachtet wurde, dass die Benetzung der Membranen gleichmäßig erfolgte, da andernfalls mit einem zu hohen Hintergrund gerechnet werden

musste. Nach dem Trocknen der Filter auf Whatmanpapier wurden sie nochmals mit 1200 μ Joule UV-Licht bestrahlt, in Folie verschweißt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

2.9.3.4 Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA und Markierung mit ^{33}P

Für die Hybridisierung der Filter wurde die isolierte RNA aus den Pflanzenproben in cDNA umgeschrieben, wobei radioaktiv markierte Adenosintriphosphate (α - ^{33}P]-dATP) in die cDNA eingebaut wurden. Von jeder Probe wurden 30 μg der isolierten Gesamt-RNA aufkonzentriert, indem sie unter Vakuum getrocknet und in 10 μl DEPC- $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert wurden. Für die Erststrang-Synthese wurde der RNA 1 μl Oligo dT-Primer (0.5 $\mu\text{l ml}^{-1}$) zugegeben, der am 3'-Ende (poly-(a)-Ende) der RNA bindet, für 10 min bei 70°C im Heizblock (Bachofer GmbH, Reutlingen) inkubiert und anschließend 3 min auf Eis abgekühlt. Das Oligo dT dient der reversen Transkriptase, die aus Desoxynucleosid-Triphosphaten die Erststrang-Synthese durchführt, als Primer. Hierbei werden die Oligo dTs in 5'-Richtung verlängert und die radioaktiven α - ^{33}P]-dATPs eingebaut. Es wurden jedem Ansatz 14.5 μl des Reagenziengemisches I (Tab. 2.14) zugesetzt und für 2 Stunden bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Das entstandene RNA-DNA-Hybrid wurde getrennt, indem es mit 5 μl des alkalischen Reagenziengemisches II (Tab. 2.14) versetzt und über 30 min bei 65°C inkubiert wurde. Nach weiteren 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 62.5 μl des Reagenziengemisches III (Tab. 2.14) neutralisiert und anschließend von nicht eingebauten Nukleotiden über Eluation auf MicroSpin Columns S-400 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gereinigt. Die Säulen wurden gut aufgeschüttelt, geöffnet und kurz anzentrifugiert, um überschüssigen Puffer zu entfernen. Anschließend wurde die Probe auf die Säule pipettiert und bei 3000 g für 1 min zentrifugiert. Von dem Zentrifugat wurde 1 μl in Szintillationslösung gegeben und die Radioaktivität über ein Szintillationsmessgerät (Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim) ermittelt. Bei einem Wert zwischen 40-60 cpm 100 μl^{-1} konnte man von einem erfolgreichen Einbau der radioaktiven Nukleotide ausgehen. Das übrige Zentrifugat wurde zur Denaturierung 3 min auf 100 °C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt, um anschließend in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt zu werden.

Reagenz	Konzentration	Menge [μl]
Mix I		
dNTPs ohne dATP	7.5 mM	1
Erststrang-Synthese Puffer	5x	6
DTT	0.1 M	3
RNase Inhibitor	35 U μl^{-1}	1
dATP	32 μM	1
α -[^{33}P]-dATP	70 μCi	7
Superscript Reverse Transkriptase II	200 U μl^{-1}	1.5
Mix II		
SDS	1 % w/v	1
EDTA	0.5 M, pH 8.0	1
NaOH	3 M	3
Mix III		
Tris/HCl	1 M, pH 8.0	10
HCl	2 M	3
H ₂ O _{bidest.}		49.5

Tab. 2.14: Zusammensetzung der Reagenziengemische III für die Synthese der einsträngigen cDNA unter Einbau von α -[^{33}P]-dATP mittels reverser Transkriptase. Zu 10 μl mit Oligo dT-Primer versehener RNA-Probe (30 μg) wurden 14.5 μl Mix I pipettiert und anschließend bei 42°C für 2 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 5 μl Mix II wurde über 30 min bei 65°C und 15 min bei RT inkubiert und anschließend die Probe mit 62.5 μl Mix III neutralisiert.

2.9.3.5 Hybridisierung der Membran mit ^{33}P – markierter cDNA

Zur Vorhybridisierung wurde jeweils eine Membran in ein Hybridisierungsröhrchen (ThermoHybaid, Heidelberg) mit der Oberseite nach innen gelegt und mit 5 ml Prähybridisierungslösung (Tab. 2.15) :

Volumina	Substanz	Zusammensetzung Stammlösung
1.5 ml	20x SSC	
300 µl	100x Denhardt-Lösung	10 g Ficoll 10 g Polyvinylpyrrolidon-360 (PVP) 10 g BSA H ₂ O _{bidest.} ad 500 ml, sterilfiltriert (0.2 µm) und bei -20°C aufbewahrt
300 µl	10 % SDS	
60 µl	salmon sperm DNA, (ssDNA)	100 µg ml ⁻¹ , vor Zugabe bei 100°C für 2 min denaturieren, sofort auf Eis abkühlen
ad 6 ml H ₂ O		

Tab. 2.15: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung.

über mindestens vier Stunden bei 65°C in einem Drehofen (Hybrid 2000, H. Sauer, Reutlingen) inkubiert. Nach der Vorhybridisierung wurde zu den Filtern die mit ³³P markierte cDNA (Gesamtvolumen aus Markierungsreaktion) der jeweiligen Probe gegeben und die Filter bei 65°C im Drehofen über mindestens 12 Stunden hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen bei 65°C für jeweils 20 min mit (1) 2x SSC, 0.1 % SDS und (2) 0.2x SSC, 0.1 % SDS gewaschen und anschließend auf Image-Screens exponiert.

2.9.3.6 Auswertung der „cDNA-Arrays“

Zur Auswertung wurden die Membranen in Folie eingeschweißt, auf eine Image-Platte für den Scanner FLA 3000 (Fuji Photo Film, Japan) aufgelegt und in einer Fotokassette für 24 Stunden exponiert. Die Image-Platte ist mit einer flexiblen Polyesterschicht überzogen, welche mit Bariumfluoridhalogen-Phosphor-Kristallen (BaF [Br,I] : Eu²⁺) beschichtet ist. Das Prinzip dieser Auswertung der Arrays beruht auf der sogenannten „Photo-stimulierten Lumineszenz“. Legt man eine radioaktiv markierte Probe auf einer Image-Platte auf, wird die Energie von der Probe auf die Phosphor-Kristalle übertragen und Elektronen in einen energetisch höheren Zustand versetzt. Es entstehen Europium (Eu²⁺)-Ionen „Löcher“. Die Elektronen formen sogenannte F-Center, welche eine Absorptionsbande bei 600 nm zeigen.

Wird die exponierte Platte mit einem He-Ne-Laser (633 nm) eingelesen, so fallen die Elektronen zurück auf den Ausgangszustand und Energie wird in Form von Photonen bei 400 nm freigesetzt. Das emittierte Blaulicht wird detektiert und produziert das digitale Bild. Nach Belichtung mit UV-Licht konnte die Image-Platte wiederverwendet werden.

Mit Hilfe der Array-Vision Software 5.1. (Interfocus, Suffolk, England) wurden die digitalen Bilder der radioaktiven Signale quantitativ ausgewertet. Im ersten Schritt wurde eine Schablone eines Filters und der darauf pipettierten ESTs angelegt und den Vierfachsignalen der entsprechende Klonname zugeordnet. Diese Schablone wurde über die eingelesenen Filter gelegt, sodass jedem Signal ein EST zugeordnet war. Um den Hintergrund zu berücksichtigen, wurde ein Punkt in dem Quadrat der vier Signale als Hintergrund definiert. Dieser Punkt wurde automatisch von den radioaktiven Signalen abgezogen. Des weiteren wurden ausgewählte ESTs als „house keeping genes“ erklärt, um einen Bezugswert für die relative Veränderung der Expression der ESTs zu erhalten. Unter „house keeping genes“ versteht man Gene, die sich bei den gewählten Behandlungen in ihrer Expression nicht verändern, d.h. bei denen man davon ausgeht, dass sie über einen Zeitverlauf den gleichen Expressionsstatus behalten. Die Filter wurden nun normalisiert, indem die Werte der untersuchten ESTs durch die der „house keeping genes“ dividiert wurden. Die normierten Werte wurde zum einen graphisch mit der Software Sigma Plot (SPSS Science, Chicago, USA) ausgewertet, des weiteren wurden die verschiedenen zeitlichen Expressionsverläufe mit self organising maps (SOM) mit Hilfe der Software Gene Cluster 1.0 (Whitehead Institute, Center for Genome Research) analysiert und bewertet.

2.10 Datenverarbeitung und Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten wurden in Microsoft Exel erfasst und für die graphische Darstellung, die mit der Software Sigma Plot 6.0 (SPSS Science, Chicago, USA) erfolgte, vorbereitet.

Die statistischen Auswertungen wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 8.0.0, SPSS Science, Chicago, USA) für Windows durchgeführt. Als Tests für signifikante Unterschiede zwischen unabhängigen Stichproben wurden zwei Verfahren angewendet: Der paarweise Vergleich von Mittelwerten wurde mittels Student's T-Test (ZÖFEL, 1992) für die

verschiedenen Behandlungsvarianten in den Sonnensimulatoren durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen von Mittelwerten, wie es in den Freilandversuchen der Fall war, wurde ein einfaktorieller ANOVA angewendet.

Für die Berechnung der Superoxiddismutase-Aktivitäten wurde das Programm MuPAD Light (SciFace, Universität Paderborn) verwendet. Anhand der Regressionsgleichungen aus den in SigmaPlot erstellten Graphen konnten mit Hilfe von MuPAD Light die für die Hemmung errechneten Werte in $U\ ml^{-1}$ umgerechnet werden.

Die Auswertung der „cDNA-Arrays“ erfolgte zum einen über die digitale Auswertung der Filter mit der Software Array Vision, des weiteren mit Sigma Plot und SPSS zur Darstellung und Betrachtung der Signifikanzen.

2.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

α -[³³ P]-dATP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarose, Elektrophoresis grade	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ascorbat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovine Serum Albumine (BSA)	Serva, Heidelberg
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Cystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ficoll, Type 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol, HPLC grade	Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
MonoBromobimane (mBrB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nucleon PhytoPure DNA Extraction kit for Plant DNA extraction	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nukleotide, dTTP, dCTP, dGTP	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo dT-Primer	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	Merck, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon	Fluka, Neu-Ulm
RanSOD-Testkit	Randox, Crumlin, UK
RNase Inhibitor	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Spermidine	Serva, Heidelberg
Superoxiddismutase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Superscript Reverse Transkriptase II	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
TRIzol	Invitrogen, Life Technologies, Groningen, NL
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3. Ergebnisse

3.1 Validierung des RanSOD-Testes für die Bestimmung der SOD-Aktivität aus Pflanzenextrakten

Für die Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität aus Gerstenblättern wurde der RanSOD-Test der Firma Randox aus der medizinischen Diagnostik verwendet. Im Vorfeld der Aktivitätsbestimmung in der Gerste wurde überprüft, ob die Durchführung des RanSOD-Testes nach Herstellerangaben übernommen werden konnte. Des Weiteren wurde, um eine große Probenanzahl analysieren zu können, die Durchführung des Tests von der Halbmikroküvette auf eine Quarzmikrotiterplatte übertragen. Hierzu mußte überprüft werden, ob die Analyse in der Quarzmikrotiterplatte mit verringerten Probenvolumina Einfluss auf die Quantifizierung der Superoxiddismutase-Aktivität besaß. Der Vergleich der Eichgerade in der Halbmikroküvette (Abb. 3.1) mit der Analyse der Eichgerade in der Quarzmikrotiterplatte

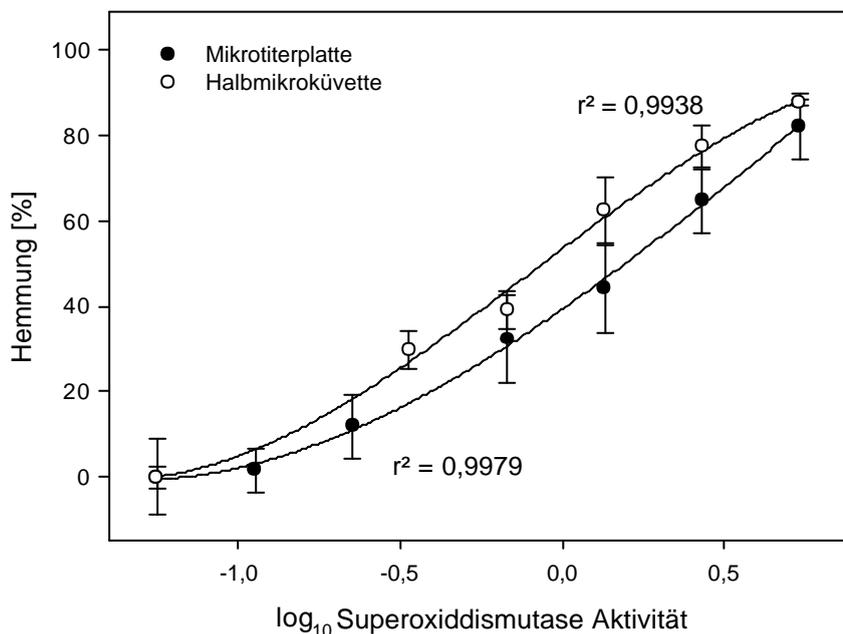


Abb. 3.1: Eichkurven zur Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität in Halbmikroküvetten (○) (Sarstedt, Deutschland) und einer Quarzmikrotiterplatte (●) (Hellma, Müllheim) gemessen. Der Regressionskoeffizient betrug für die Halbmikroküvetten 0,9938 ($n = 3, \pm \sigma$) und für die Mikrotiterplatte 0,9979 ($n = 3, \pm \sigma$).

ergab einen annähernd parallelen Kurvenverlauf, wobei die Eichgerade aus dem Mikrotiterplatten-Test einen etwas stärkeren Anstieg und damit besseren linearen Bereich als

die Messung in der Halbmikroküvette aufwies. Um weiterhin sicherzustellen, dass die verringerten Probenvolumina keinen Einfluss auf die Kinetik der Reaktion hatten, wurden über einen Zeitraum von 60 min in regelmäßigen Abständen die Absorptionsänderungen der Eichgerade gemessen (Abb. 3.2.).

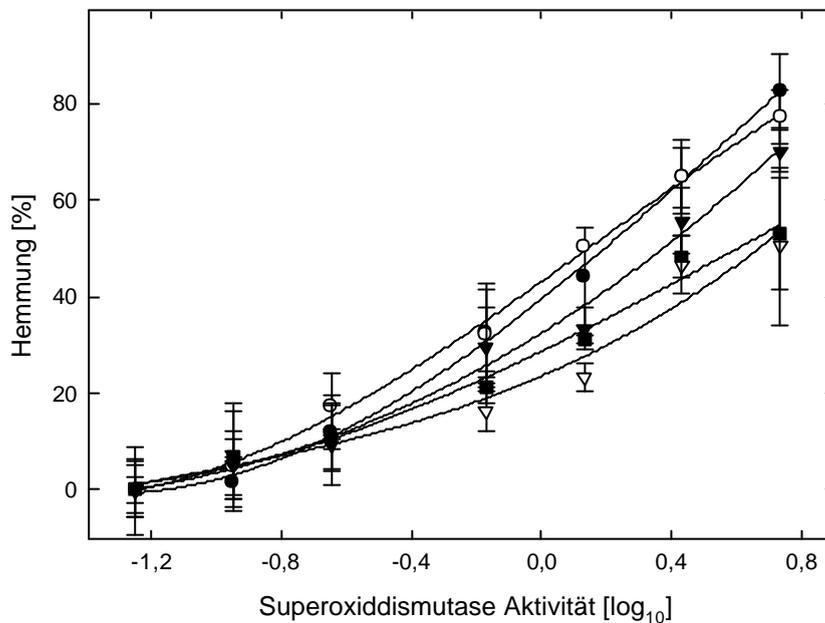


Abb. 3.2: Eichkurve gemessen zu den Zeitpunkten 3 min (●) $r^2 = 0.9979$, 6 min (○) $r^2 = 0.9971$, 13 min (▼) $r^2 = 0.9889$, 41 min (▽) $r^2 = 0.9557$ und 60 min (■) $r^2 = 0.9853$. Die Eichgerade gemessen bei 3 min erwies sich mit dem stärksten Anstieg als optimal ($n = 3, \pm \sigma$).

Bei der Durchführung des Tests in der Mikrotiterplatte ergab die Messung der Absorption 3 min nach Ablesen der Anfangsabsorption die Eichgerade mit der größten Steigung. Somit wurde für die weiteren Messungen der Zeitpunkt zur Bestimmung von ΔA bei 3 min beibehalten. In weiteren Versuchsreihen wurde die Wiederfindung, Präzision und Reproduzierbarkeit der SOD-Aktivitätsbestimmung aus den Gerstenblättern überprüft.

Die Wiederfindung der Superoxiddismutase-Aktivität aus Gerstenextrakten mit dem RanSOD-Testkit hatte zum Ziel, sicherzustellen, dass es während der Extraktion und Probenvorbereitung zu keinem Verlust der Enzymaktivität kommt. Die Wiederfindungsrate f wurde bestimmt, indem der reine Blattextrakt a_p gemessen wurde, eine Probe $a_{(p+s)}$, der bei der Extraktion eine definierte Menge eines internen Standard zugegeben worden war und der interne Standard a_s selbst (Gl. 3.1.). Die Differenz der Extraktwerte mit und ohne internen Standard sollte dem Wert des internen Standards entsprechen.

$$f = (a_{(p+s)} - a_p) * \frac{100}{a_s} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Bei einer Aufarbeitung von acht Gerstenproben konnte eine Wiederfindungsrate von $89.93 \pm 12.66 \%$ ermittelt werden (Abb. 3.3). Für die Berechnung der SOD-Aktivität ergab sich somit ein Faktor von 1.11 ± 0.18 .

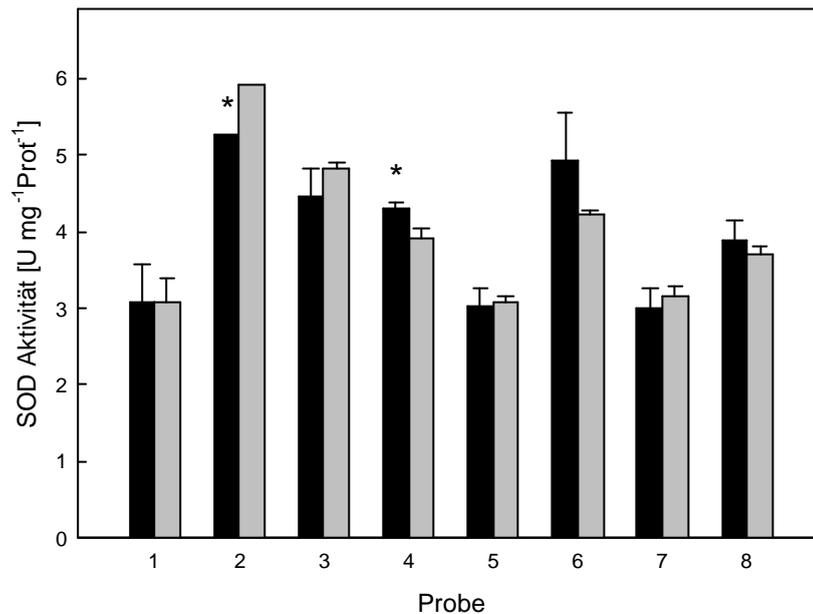


Abb. 3.3: Bestimmung der Wiederfindungsrate: Extraktion von acht Gerstenproben ohne internen Standard und unter Zugabe von 0.306 U ml^{-1} SOD-Standard aus dem Testkit. ■ Blattextrakt mit internem Standard, □ Summe aus Blattextrakt und SOD-Standard 0.306 U ml^{-1} . Es wurde eine Wiederfindung von $89.93 \pm 12.66 \%$ ermittelt (* signifikante Unterschiede, $p = 0.05$; $n = 3$, $\pm \sigma$).

Unter der Präzision versteht man das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen, durch die zufällige Fehler erfasst werden. Als Maß dient die Standardabweichung σ oder der Variationskoeffizient VK mit \bar{x} = Mittelwert der gemessenen Extrakte (Gl. 3.2).

$$\text{VK} = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{x}} * 100 \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Um die Präzision der SOD-Aktivitätsbestimmung zu überprüfen, wurde eine Probe an einem Tag unabhängig voneinander achtmal vermessen (Abb. 3.4). Dabei ergab sich ein Variationskoeffizient von 13.19% . Nach KROMIDAS entspricht dieser Wert den Leitlinien, die vorgeben, dass der Variationskoeffizient kleiner als 15% sein sollte.

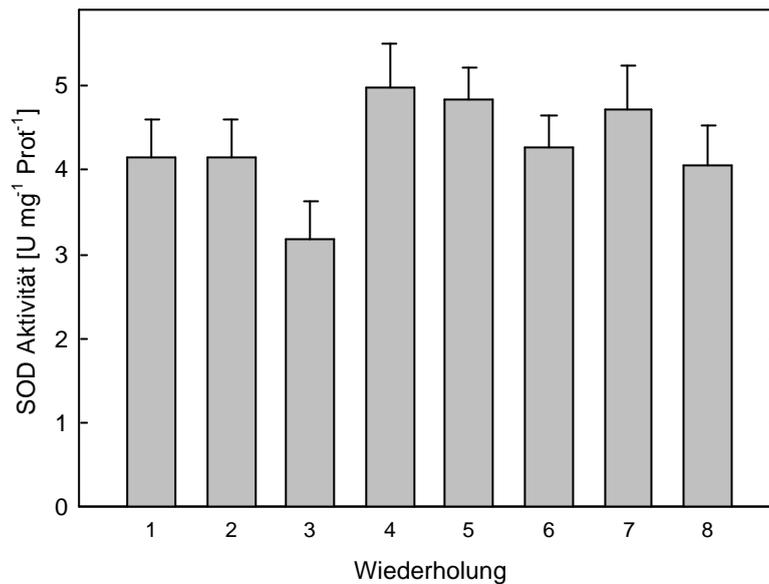


Abb. 3.4: Zur Ermittlung des zufälligen Fehlers des Analyseverfahren wurde die Präzision ermittelt. Hierzu wurde ein Blattextrakt an einem Tag achtmal gemessen. Es ergab sich eine Präzision von 13.19 % ($n = 3$, $\pm \sigma$).

Die Bestimmung der SOD-Aktivität wurde weiterhin auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Hierzu wurden aus demselben Blattmaterial sieben Blattextrakte unter identischen Bedingungen am selben Tag hergestellt und nach dem oben beschriebenen Verfahren (siehe 2.8.3.2) analysiert (Abb. 3.5). Aus den sieben Parallelansätzen des gleichen Probenmaterials ergab sich ein Mittelwert der SOD-Aktivität mit einer Standardabweichung von ± 6.99 %.

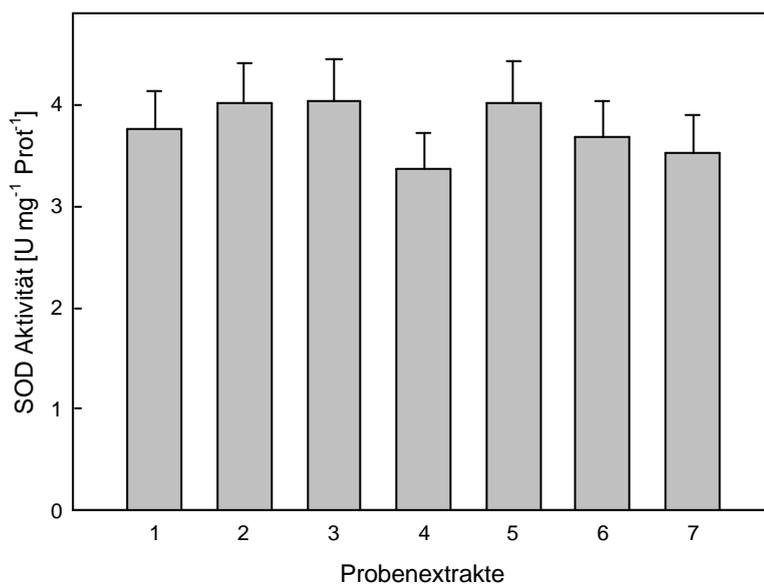


Abb. 3.5: Reproduzierbarkeit der Bestimmung von Enzymaktivitäten der Superoxiddismutase. Es wurden aus demselben Blattmaterial sieben Blattextrakte hergestellt und die Aktivität in einem Ansatz wie unter 2.8.3.2 beschrieben analysiert ($n = 3$, $\pm \sigma$).

3.2 Abgrenzung der NBV von anderen Blatterkrankungen der Gerste - Differentialdiagnose

Die nichtparasitär bedingte Blattverbräunung (NBV) (Abb. 3.6, **E**) tritt nicht nur in Deutschland, sondern auch in Irland, Österreich, Nordamerika und Australien auf. Die Symptome sind denen durch einen Pathogenbefall von *Ramularia collo-cygni* (Abb. 3.6, **C**) verursachten sehr ähnlich, weswegen für die Beurteilung der Krankheitsursache eine genaue visuelle Analyse erforderlich ist. Bei den *Ramularia collo-cygni*-Blattflecken handelt es sich um einen Pilzbefall, der an den Blättern, Halmen, Blattscheiden und Grannen auftritt, während die NBV vorwiegend auf den Blättern zu beobachten ist. Die Größe der Pathogen-Symptome ist auf allen Wirten gleich und man findet um die Blattflecken einen chlorotischen Hof. Die Begrenzung der Pathogenschäden erfolgt an den Blattadern, während die NBV-Symptome weder begrenzt noch von einem Hof umgeben sind. Weitere Verwechslungen der Krankheit sind mit den sogenannten *mlo*-Flecken (Abb. 3.6, **D**, **F**) oder der Netzflecken-Krankheit (*Drechslera teres*) (Abb. 3.6, **A**, **B**) möglich. Die *mlo*-Flecken treten bei mehлтаuresistenten Sorten auf und sind an ihrer charakteristischen, wässrigen Struktur sehr gut zu erkennen. Die Netzfleckenkrankheit entwickelt sich, von den Blattadern begrenzt, auf den Blättern in länglichen, gelben Aufhellungen als Netzmuster aus, welches sich später braun färbt (LfL, 2002). Die Netzflecken sind auf Blattober- und Blattunterseite gleich stark ausgeprägt.

Zweifelsfrei kann eine Diagnose mittels confokaler Laser Scanning Mikroskopie (cLSM, 2.7) gestellt werden. In Abbildung 3.6, **G** ist die Aufnahme einer NBV Chlorose der *cv.* Ricarda abgebildet. Wie auch auf diesem Bild zu sehen, bildeten sich die Chlorosen meist um Stomatazellen herum aus. In Abbildung 3.6, **H** ist im Vergleich zu der NBV Chlorose ein von *Ramularia collo-cygni* befallenes Blatt der *cv.* Ricarda mit diffusem Schadbild und Pilzhyphen zu sehen.

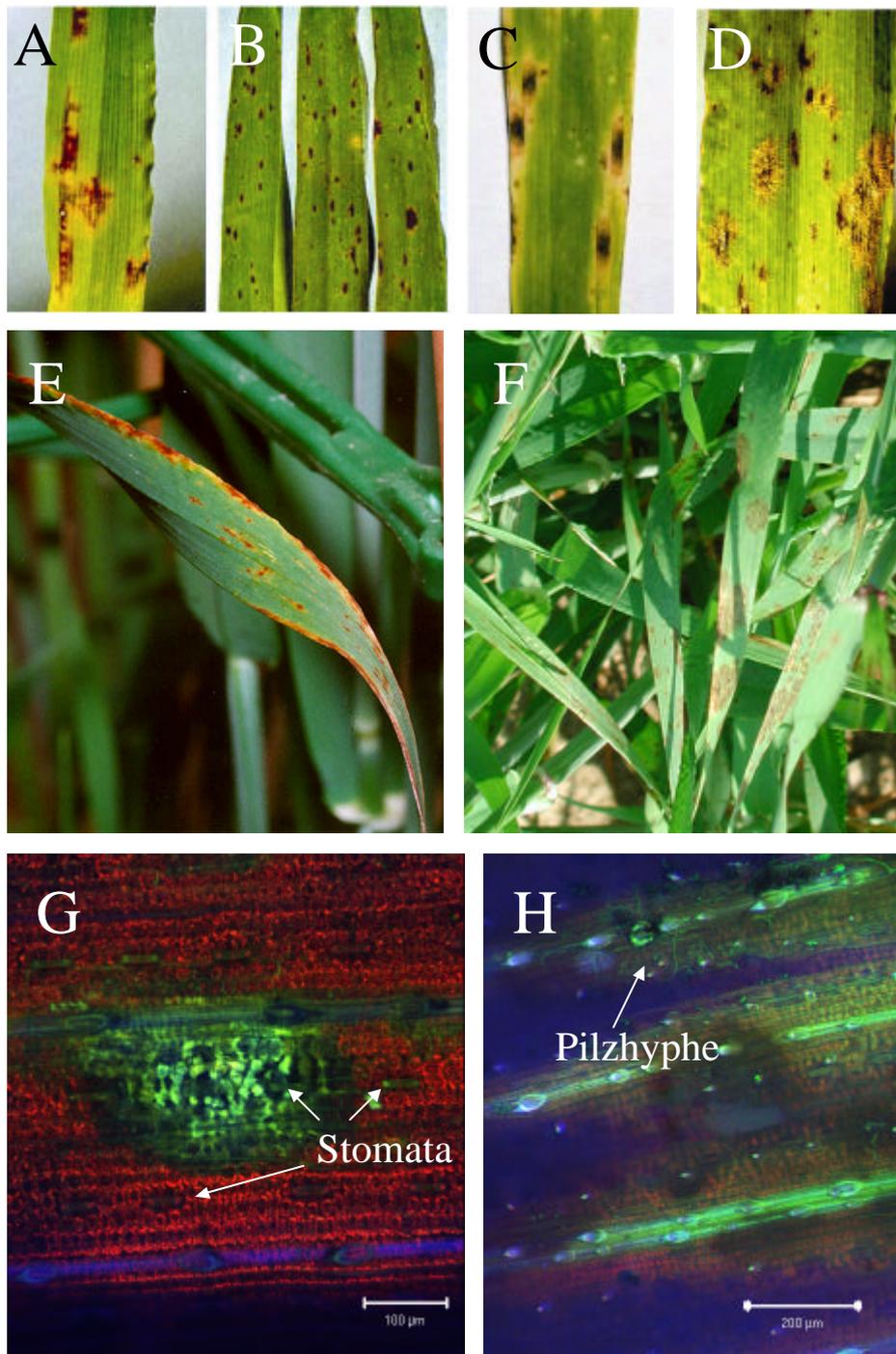


Abb. 3.6: Fotografien von Netzflecken (*Drechslera teres*) (A, B), *Ramularia collo-cygni* Flecken (C) und *mlo*-Schäden (D, F) auf Gerstenkultivaren (Aufnahmen: LfL, Freising) im Vergleich zu NBV Nekrosen auf *cv. Ricarda* (E). cLSM-Aufnahmen von einer NBV Chlorose auf *cv. Ricarda* (G), die Stomatazellen lagen meist im Mittelpunkt der Schadstellen. (H) zeigt die cLSM-Aufnahme eines mit *Ramularia collo-cygni* befallenen Blattes.

3.3 Experimente im Sonnensimulator mit zwei unterschiedlich NBV-sensitiven Gerstenkultivaren

Ziel der Experimente in den Sonnensimulatoren der GSF war es, das Krankheitsbild der NBV unter kontrollierten Bedingungen künstlich hervorzurufen. Es wurde die Auswirkung verschiedener Strahlungsbedingungen (Sonnen-/Schattentag) und der Effekt hoher umweltrelevanter Ozonbelastung auf die Bildung der NBV und den antioxidativen Stoffwechsel der Pflanzen untersucht.

Als Versuchspflanzen wurden die beiden Gerstenkultivare *cv. Ricarda* als NBV-sensitives und der Zuchtstamm IPZ 24727 als NBV-resistentes Kultivar ausgewählt.

3.3.1 Einfluss der Bestrahlungsstärke auf die NBV und das antioxidative System

Eine Hypothese für die Entstehung der NBV ist eine zu hohe Belastung der Pflanzen mit UV-B-Strahlung. Um diese Theorie zu untersuchen, wurden die Gerstensorten in den Simulatoren hohen Lichtintensitäten (Gesamtstrahlung und UV-B) und Temperaturen, wie sie an einem Sonnentag gemessen wurden, ausgesetzt. Die Pflanzen wurden, sobald alle Blätter voll entwickelt waren (BBCH 39) eine Woche in den Simulatoren akklimatisiert und ab Stadium Ährenschieben (BBCH 49) mit den unterschiedlichen Klimabedingungen behandelt.

3.3.1.1 Auftreten der NBV

Die Entwicklung der NBV wurde während des Experiments durch Bonituren der F und F-1 Blätter bestimmt (Abb. 3.7). Die Bonituren wurden, wie unter 2.6 beschrieben, vorgenommen. In beiden Blatttagen konnte bei den untersuchten Kultivaren ein exponentieller Anstieg der Schädigung durch NBV zu Beginn der Blüte (BBCH 61) festgestellt werden. Über den gesamten Behandlungszeitraum wurden signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) in der Ausprägung der NBV zwischen den Sorten beobachtet. Bei Betrachtung des Schadbildes innerhalb eines Kultivars unter den unterschiedlichen Klimabedingungen zeigten sich bei *cv. Ricarda* von der ersten Bonitur an sowohl beim F als auch beim F-1 Blatt signifikante Unterschiede. Die unter Sonnentag-Bedingungen gezogenen Pflanzen wiesen wesentlich mehr geschädigte Blattflächen auf, als die Pflanzen, die

schwächeren Bestrahlungsstärken ausgesetzt waren. Bei IPZ 24727 traten erst nach BBCH 61 signifikant größere Schäden bei den Pflanzen auf, die einem Sonnentag-Szenario ausgesetzt waren. Diese Unterschiede stellte man sowohl im F als auch im F-1 Blatt fest. Bis auf die letzte Probennahme des F-1 Blattes zeigte *cv.* Ricarda deutlich stärkere Schäden als IPZ 24727.

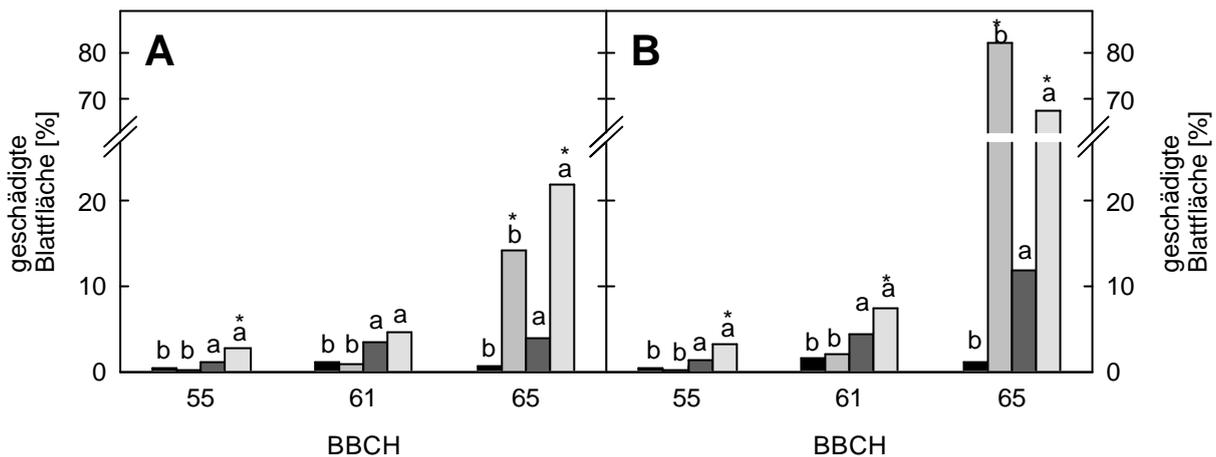


Abb. 3.7: Bonituren der F (A) bzw F-1 Blätter (B) zu verschiedenen BBCH-Stadien. Aufgetragen ist die durch NBV geschädigte Blattfläche in Prozent. Der Boniturwert ergab sich durch Mittelung der Schäden der betrachteten F bzw. F-1 Blätter aller Pflanzen, $n = 48$. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den Sorten bei gleicher Behandlung sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet, signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den Behandlungsvarianten des gleichen Kultivar sind mit einem * gekennzeichnet.

■ IPZ 24727, Schattentag, □ IPZ 24727, Sonnentag, ■ *cv.* Ricarda, Schattentag
□ *cv.* Ricarda, Sonnentag

3.3.1.2 Häufigkeitsverteilung der Superoxidanion-Radikale in unterschiedlich lichtexponierten Blattbereichen

Bei der Betrachtung der Verteilung der NBV auf den Blättern (Abb. 3.7), konnte ein unterschiedlich starkes Auftreten der Flecken in Abhängigkeit von der Lichtexposition festgestellt werden. Zuerst wurden Stellen geschädigt, die dem Licht stark ausgesetzt waren, wie es am Kulminationspunkt der Blätter der Fall ist. Bei der Anfärbung eines Gerstenblattes mit NBT auf Superoxidanion-Radikale (Abb. 3.8) zeigte sich eine „Negativabbildung“ der Lichtexposition. Die dem Licht zugewandten Blattbereiche waren stärker angefärbt als die dem Licht abgewandten Bereiche, was mit den Entstehungsorten der NBV übereinstimmte.

Bei der Ernte der Blätter wurde durch den Schnitt das Blatt so irritiert, dass es an den Schnittstellen zu einer verstärkten Färbung durch Wundreaktion kam. Diese Bereiche wurden in die Auswertung der Verteilung der Superoxidanion-Radikale nicht mit einbezogen.

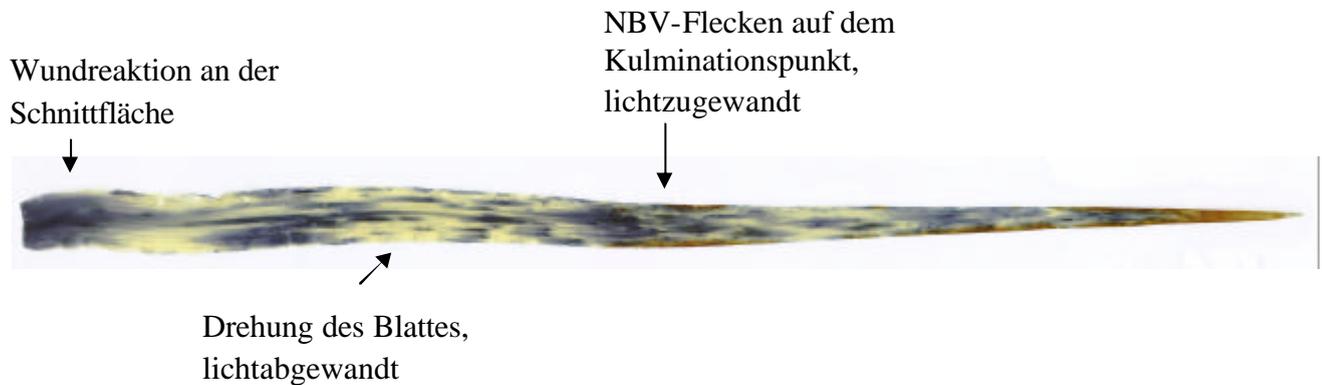


Abb. 3.8: Mit NBT auf Superoxidanion-Radikale angefärbtes F Blatt von *cv. Ricarda*. Die durch den Schnitt bei der Ernte erfolgte Verletzung des Blattes zog eine verstärkte Färbung durch NBT nach sich. Bei der Auswertung wurde diese Fläche nicht mit einbezogen. Deutlich sieht man an dem durch die Drehung des Blattes lichtabgewandten Blatteil eine schwächere NBT-Färbung, während an der Stelle mit den NBV-Flecken eine verstärkte Färbung durch Superoxidanion-Radikale stattgefunden hat.

Um den Einfluss von Superoxiddismutase auf das Vorhandensein von Superoxidanion-Radikalen und somit auf die Anfärbung der Blätter mit NBT zu untersuchen, wurden Gerstenblätter einmal herkömmlich nach Versuchsprotokoll mit NBT angefärbt und einmal mit 2.5 µm/ml (ca. 5-25 U/ml) SOD coinfiltriert. Die Kontrolle war deutlich stärker durch die Bildung von Formazan gefärbt als die Variante mit SOD. Durch die erhöhte Konzentration an SOD in den Gerstenblättern wurden die Superoxidanion-Radikale entgiftet und es kam zu einer geringeren Bildung von Formazan.



Abb. 3.9: Abgleich der NBT-Färbung in Gerstenblättern. Für die Kontrolle wurden Blätter nach Vorschrift mit NBT auf Superoxidanion-Radikale angefärbt, in der Vergleichsprobe wurden die Blätter mit Superoxiddismutase, 2.5 mg/ml (5-25 U/ml), coinfiltriert.

3.3.1.3 Verteilung der Superoxidanion-Radikale in Blättern unterschiedlicher Entwicklungsstadien

Die Verteilung der Superoxidanion-Radikale wurde zu drei Entwicklungsstadien (s. 2.3.3, Tab. 2.2) untersucht. Zuerst nach der Akklimatisierung an die Bedingungen in den Sonnensimulatoren, direkt vor Behandlungsbeginn zu Beginn des Ährenschiebens (BBCH 49). Die zweiten Proben wurden nach acht Tagen Behandlung, am Ende des Ährenschiebens (BBCH 57) genommen und die dritten nach weiteren acht Tagen, zur Zeit der Blüte (BBCH 65). Für die ersten beiden Probennahmen wurden F-1 Blätter geerntet, die letzte Probennahme wurde an F Blättern vorgenommen. Zu allen Zeitpunkten und bei beiden Behandlungsvarianten zeigte sich eine höhere Superoxidanion-Radikal Verteilung in den Blättern der *cv. Ricarda* (Abb. 3.10), wobei signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) bei der ersten Probennahme und der Beprobung des F Blattes der Schattentagvariante auftraten. Zu BBCH 57 konnte eine Erhöhung der Radikal-Verteilung in den Sonnentagvarianten im Vergleich zu den Schattentagpflanzen beobachtet werden.

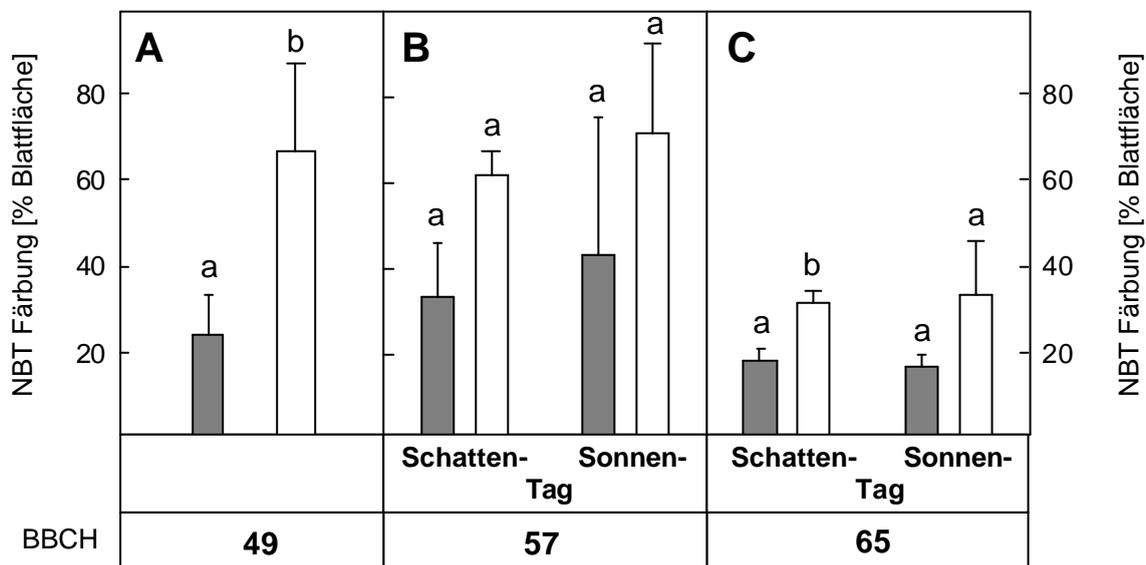


Abb. 3.10: Verteilung der Superoxidanion-Radikale im F-1 (A, B) bzw. F Blatt (C) der Sorten PZ 24727 (■) und *cv. Ricarda* (□) während der Behandlung mit unterschiedlichen Klimabedingungen. Die Beprobung zum Stadium BBCH 49 (A) erfolgte direkt vor Behandlungsbeginn, die folgenden Probennahmen acht Tage zu BBCH 57 (B) bzw. vierzehn Tage zu BBCH 65 (C) später. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet, ($n = 3, \pm \sigma$).

Das F Blatt zeigte sowohl in der Schattentag- wie in der Sonnentagvariante zu BBCH 65 eine deutlich geringere Verteilung an Superoxidanion-Radikalen als das F-1 Blatt zu BBCH 57. Ein Unterschied zwischen den Behandlungen konnte nicht festgestellt werden.

3.3.1.4 Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen

Die Bestimmung der Gesamt-Ascorbatkonzentration in den Blättern ergab keine Unterschiede zwischen den Kultivaren (Abb. 3.11). Beim Vergleich der beiden Behandlungen ließ sich tendenziell eine höhere Konzentration an Ascorbat in beiden Kultivaren in der Sonnentagvariante zur Zeit der zweiten Probenahme erkennen. Die Glutathionkonzentrationen unterschieden sich zwischen den Sorten nicht, eine leichte Erhöhung des Glutathionspiegels war in den Sonnentagvarianten zu bemerken. Signifikanzen traten weder zwischen den Kultivaren noch zwischen den Behandlungen auf.

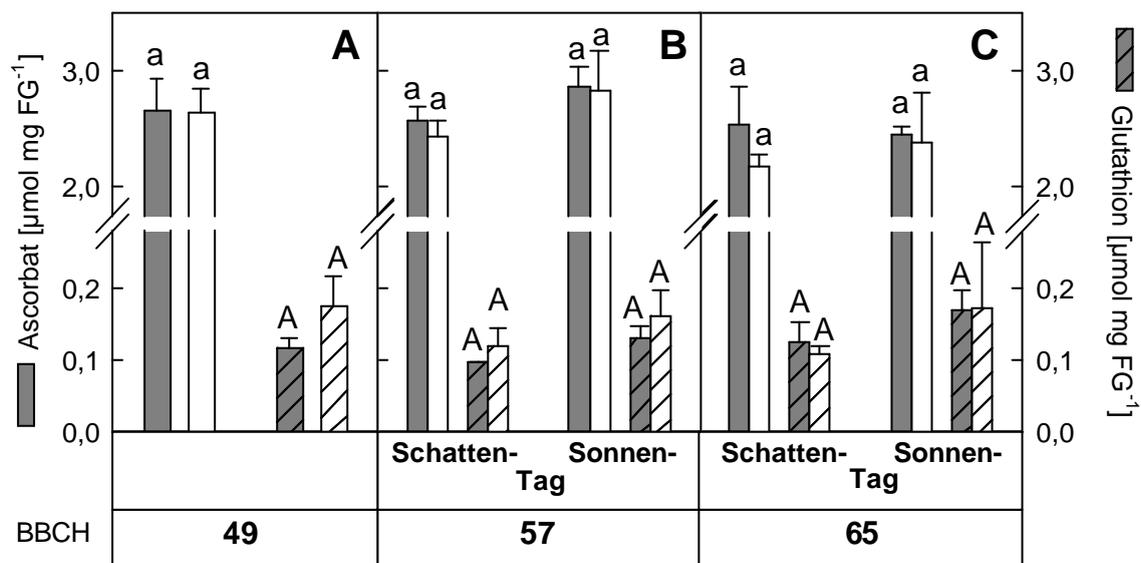


Abb. 3.11: Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen im F1 (A, B) bzw. F Blatt (C) der Sorten IPZ 24727 (■) und cv. Ricarda (□) während der Behandlung mit unterschiedlichen Klimabedingungen. Die Beprobung zum Stadium BBCH 49 (A) erfolgte direkt vor Behandlungsbeginn, die folgenden Probenahmen acht Tage zu BBCH 57 (B) bzw. vierzehn Tage zu BBCH 65 (C) später. Es war kein Unterschied der Ascorbatkonzentrationen zwischen den Kultivaren zu beobachten, die Glutathionkonzentrationen waren im Vergleich zu der Schattentagvariante bei den Sonnentagpflanzen leicht erhöht. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet, ($n = 3, \pm \sigma$).

3.3.1.5 SOD-Aktivitäten

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Gesamt-SOD-Aktivität und die Cu/Zn-SOD-Aktivität bestimmt, wobei sich ein sehr ähnliches Bild der Verteilung der Gesamt- und Cu/Zn-SOD-Aktivitäten ergab. Zwischen den Kultivaren zeigten sich signifikante Unterschiede der Enzymaktivität sowohl bei der Gesamt- als auch bei der Cu/Zn-SOD zum Zeitpunkt der ersten und zweiten Beprobung im F-1 Blatt, welche sich tendenziell in der weiteren Probennahme bestätigte (Abb. 3.12). Die sensitive Sorte *cv.* Ricarda verfügte dabei über eine höhere Enzymaktivität als der resistente Gerstenzuchtstamm IPZ 24727. Die Behandlung mit erhöhten Bestrahlungsstärken wirkte sich durch insgesamt niedrigere Aktivitäten in den Kultivaren aus, so wurde bei den Sonnentagvarianten deutlich niedrigere Aktivitäten als bei den Schattentagvarianten gefunden, sowohl im F-1 als auch im F Blatt.

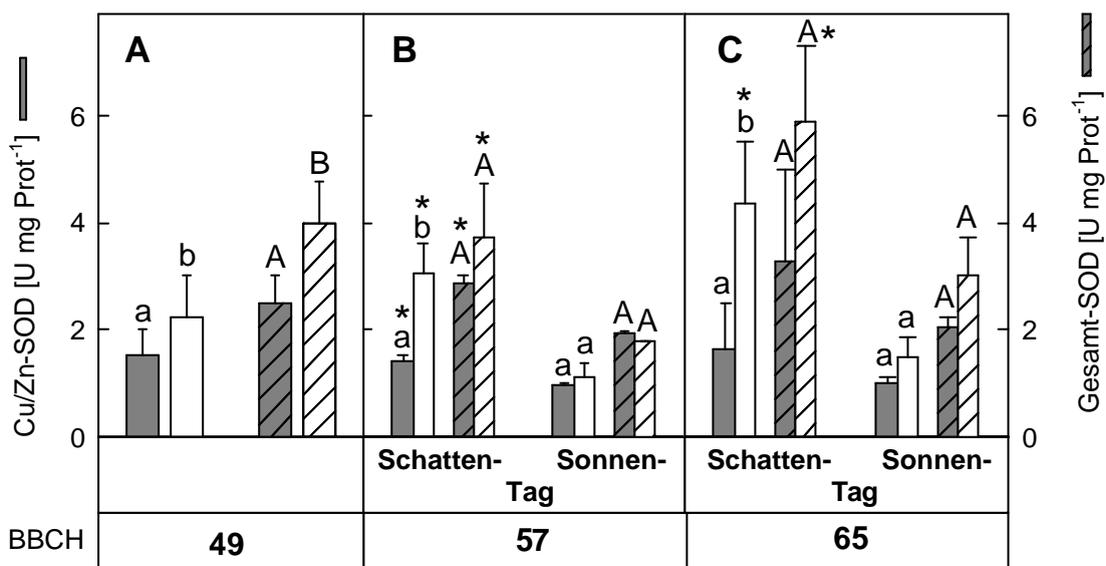


Abb. 3.12: Cu/Zn-SOD- und Gesamt-SOD-Aktivitäten im F-1 (A, B) bzw. F Blatt (C) der Sorten IPZ 24727 (■) und *cv.* Ricarda (▨) während der Behandlung mit unterschiedlichen Klimabedingungen. Die Beprobung zum Stadium BBCH 49 (A) erfolgte direkt vor Behandlungsbeginn, die folgenden Probennahmen acht Tage zu BBCH 57 (B) bzw. vierzehn Tage zu BBCH 65 (C) später. Bei den beprobten Blättern der Schattentagvariante konnte eine signifikant ($p = 0.05$) erhöhte Cu/Zn-SOD-Aktivität bei der empfindlichen Sorte *cv.* Ricarda festgestellt werden, bei den Sonnentagproben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikanzen ($p = 0.05$) zwischen den Sorten sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet, zwischen den Behandlungen mit * ($n = 3, \pm \sigma$).

3.3.2 Einfluss von Ozon auf die NBV und das antioxidative System

Bei Schönwetterbedingungen werden neben hohen Lichtintensitäten auch erhöhte Ozonkonzentrationen gemessen. Um den Einfluss dieser zusätzlichen Klimabelastung auf den pflanzlichen antioxidativen Stoffwechsel und die Entstehung der NBV zu untersuchen, wurden die beiden Gerstenkultivare in den Sonnensimulatoren mit max. 110 ppb Ozon behandelt (siehe Experimentelles Design 2.3.3).

3.3.2.1 Auftreten der NBV

Im zweiten Sonnensimulator-Experiment wurde der Einfluss von Ozon auf die Entstehung der NBV untersucht. Die Pflanzen wurden zu einem früheren Entwicklungsstadium (Erscheinen des Fahnenblatt, BBCH 37) als beim Bestrahlungsexperiment (siehe 3.3.1) in die Kammern eingestellt. Bei der Bonitur der Blätter bzgl. NBV (Abb. 3.13) fiel auf, dass die Schädigungen des F-1 Blattes zu BBCH 53 (Ährenschieben) im Vergleich zum vorhergehenden Experiment leicht erhöht waren.

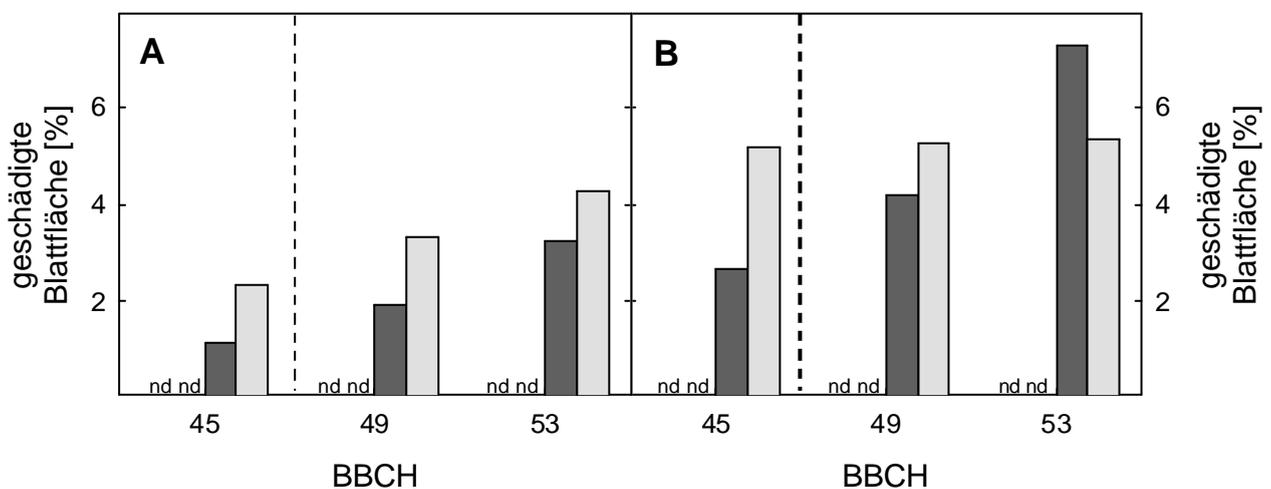


Abb. 3.13: Bonituren der F (A) bzw F-1 Blätter (B) zu den Beprobungsterminen. Aufgetragen ist die durch NBV geschädigte Blattfläche in Prozent. Der Boniturwert ergab sich durch Mittelung der Schäden der F bzw. F-1 Blätter aller Pflanzen, n = 48. Aufgrund des frühen Entwicklungsstadiums waren bei IPZ 24727 noch keine NBV zu erkennen, bzw. waren die Schäden bei cv. Ricarda noch sehr gering (n.d. = keine Schäden feststellbar). ■ IPZ 24727 ohne Ozon, □ IPZ 24727 mit Ozon, ■ cv. Ricarda ohne Ozon, □ cv. Ricarda mit Ozon

IPZ 24727 zeigte während des gesamten Beprobungszeitraumes keine NBV, bei cv. Ricarda wurde im behandelten F Blatt eine stärkere Schädigung als im unbehandelten Blatt

beobachtet, im F-1 Blatt war die Schädigung des unbehandelten Blattes größer als im F-1 Blatt der Ozonvariante. Die Schädigung des F-1 Blattes von *cv. Ricarda* war insgesamt stärker als im F Blatt.

3.3.2.2 Verteilung der Superoxidanion-Radikale im Blatt

Der resistente Zuchtstamm IPZ 24727 zeigte in der unbehandelten Variante eine einheitliche Entwicklung der Superoxidanion-Radikal Verteilung, mit zunehmendem Blattalter nahm die Radikalkonzentration ab (Abb. 3.14). Das gleiche Bild zeigte sich bei *cv. Ricarda*, welche aber im Vergleich zur resistenten Sorte signifikant höhere Superoxidanion-Radikal Verteilungen aufwies. Innerhalb der Kultivare kam es bei den mit Ozon behandelten Pflanzen von IPZ 24727 in BBCH 53 zu einer leichten Erhöhung der Radikalverteilung, was bei *cv. Ricarda* nur im F-1 Blatt zu beobachten war. Insgesamt war zwischen den Blattstadien F und F-1 kein Unterschied in der Intensität der Verteilung zu erkennen. Beide Sorten verhielten sich bzgl. Entwicklung und Behandlung ähnlich.

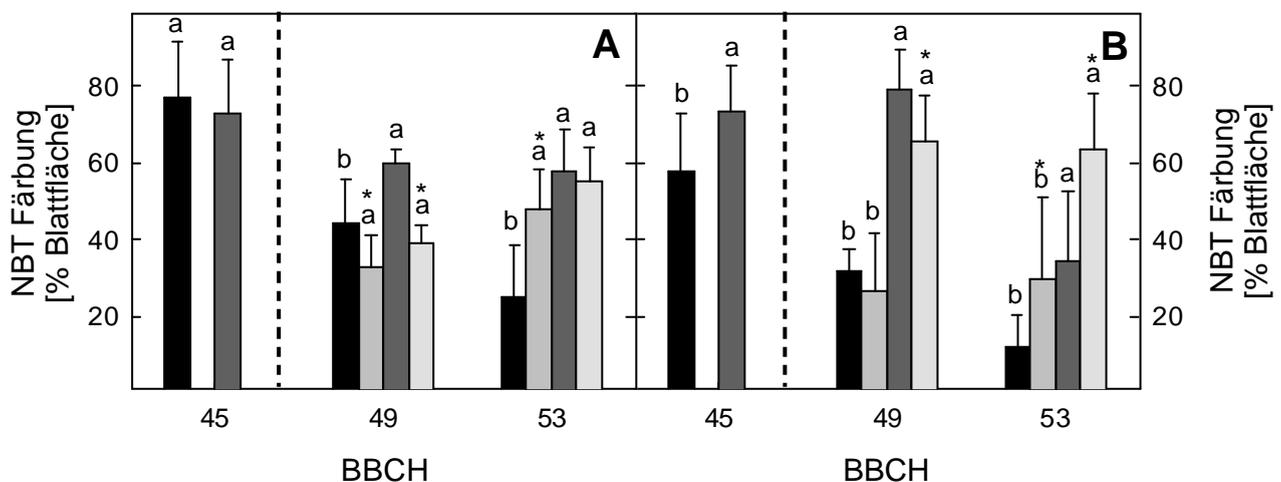


Abb. 3.14: Verteilung der Superoxidanion-Radikale im F (A) bzw F-1 Blätter (B) zu verschiedenen BBCH-Stadien. Aufgetragen ist die durch NBT angefärbte Blattfläche in Prozent. Es wurden im F und F-1-Blatt signifikante Unterschiede zwischen den Kultivaren beobachtet (gekennzeichnet mit unterschiedlichen Buchstaben) und innerhalb der Kultivare unter den unterschiedlichen Ozonbedingungen (gekennzeichnet mit einem *). Die behandelten Varianten zeigten im F Blatt keine Signifikanzen zwischen den Kultivaren ($n = 3 \pm \sigma$).

IPZ 24727 ohne Ozon,
 IPZ 24727 mit Ozon,
 cv. Ricarda ohne Ozon,
 cv. Ricarda mit Ozon

Im Vergleich zum Bestrahlungsexperiment (siehe 3.3.1) bestätigten sich die Ergebnisse. Im Stadium BBCH 49 zeigten sich im F-1 Blatt bei IPZ 24727 ca. 25 % mit NBT angefärbte

Blattfläche, bei *cv.* Ricarda ca. 70 %. Die empfindliche Sorte wies somit in beiden Experimenten im Vergleich zum resistenten Kultivar IPZ 24727 eine deutlich erhöhte Superoxidanion Verteilung in den Blättern auf.

3.3.2.3 Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen

Zwischen den Sorten und den Behandlungsvarianten (hohe bzw. niedrige Ozonkonzentrationen) konnten keine Unterschiede in den Antioxidantienkonzentrationen festgestellt werden (Abb. 3.15). Tendenziell war die Ascorbat-Konzentration in *cv.* Ricarda ca. $0,2 \mu\text{mol mg}^{-1}$ FG höher als in IPZ 24727. Man konnte eine altersabhängige Entwicklung des Antioxidantienstatus feststellen, so wiesen die F-1 Blätter beider Kultivare deutlich geringere Ascorbatspiegel auf als die F Blätter. Über die drei Probennahmen hinweg konnte allerdings auf einer Blatttage (F bzw. F-1 Blatt) keine Veränderung der Antioxidantienkonzentrationen festgestellt werden.

Ähnliches wurde in beiden Sorten bei Glutathion beobachtet. Hier wurden ca. $0,2 \mu\text{mol mg}^{-1}$ FG höhere Glutathionkonzentrationen bei *cv.* Ricarda als bei IPZ 24727 gemessen. Statistische Untersuchungen mittels Student's T-Test ergaben lediglich eine Signifikanz bei Glutathion zu BBCH 49 im F-1 Blatt der Sorte IPZ 24727 zwischen den Behandlungsvarianten (Abb. 3.15, **D**). Alle anderen Messungen unterschieden sich nicht signifikant.

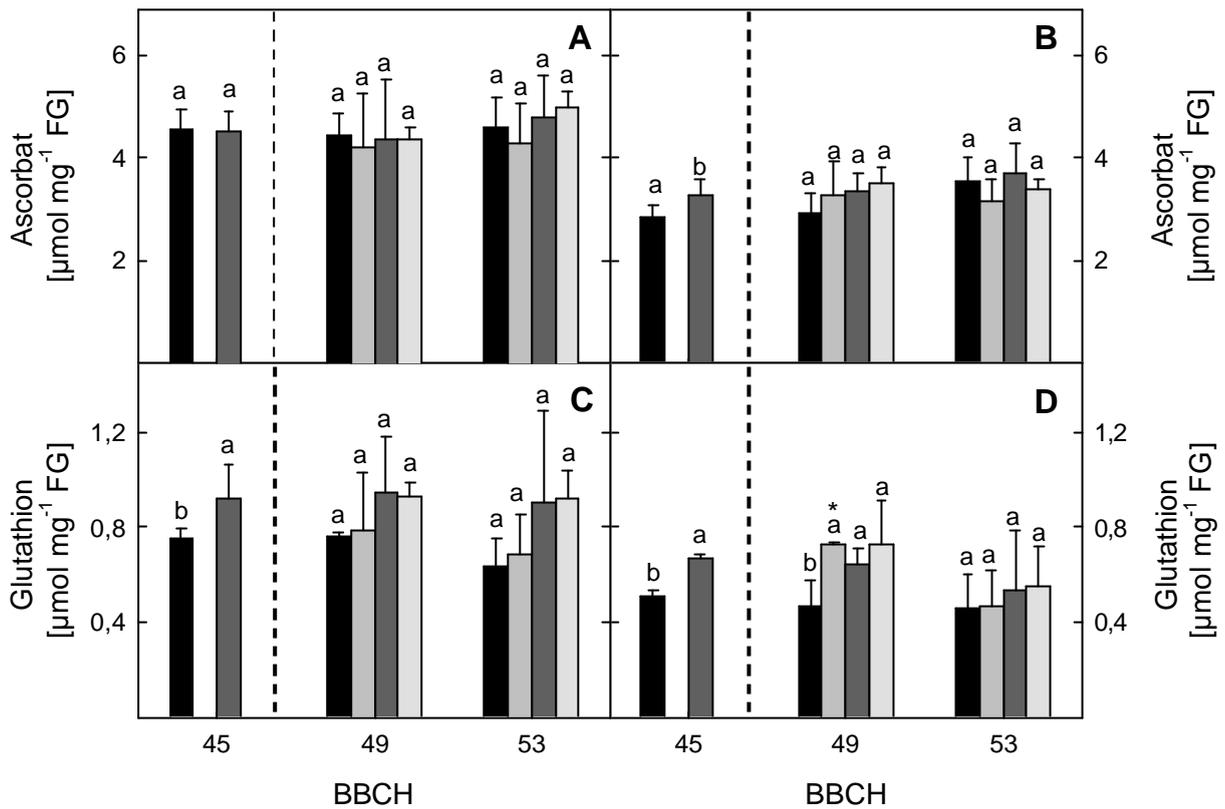


Abb. 3.15: Ascorbat- (A, B) und Glutathionkonzentrationen (C, D) im F (A, C) bzw F-1 Blätter (B, D) zu verschiedenen BBCH-Stadien. Die Sorten- und Behandlungsvarianten unterschieden sich in den Antioxidantienkonzentrationen nur geringfügig. Bei Ascorbat wurde im F-1 Blatt ein signifikanter Unterschied zwischen den Kultivaren festgestellt, bei Glutathion zeigten sich signifikant erhöhte Konzentrationen bei *cv. Ricarda* jeweils in den Nullproben und im F-1 Blatt in der ersten Beprobung nach Behandlung. Signifikante Unterschiede (Student T-Test) zwischen den Kultivaren wurden mit unterschiedlichen Buchstaben, innerhalb der Kultivare unter den unterschiedlichen Ozonbedingungen mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

IPZ 24727 ohne Ozon,
 IPZ 24727 mit Ozon,
 cv. Ricarda ohne Ozon,
 cv. Ricarda mit Ozon

3.3.2.4 SOD-Aktivitäten

Es wurden die Gesamt-SOD-Aktivitäten und die Cu/Zn-SOD-Aktivitäten ermittelt. Die Cu/Zn-SOD-Aktivität ergab das gleiche Verteilungsbild wie die Gesamt-SOD, weswegen in den weiteren Untersuchungen auf die Darstellung der Gesamt-SOD verzichtet wurde. Es zeigte sich in diesem Experiment eine vermehrte Aktivität der SOD bei **PZ 24727** im Vergleich zu *cv. Ricarda* (Abb. 3.16).

Die Enzymaktivität der Cu/Zn-SOD war in den unbehandelten Pflanzen von IPZ 24727 in den F-1 Blättern signifikant höher als in den mit Ozon (110 ppm) behandelten. Die Behandlung mit Ozon bewirkte in den Kultivaren eine tendenzielle Erniedrigung der SOD-Aktivität, welche sich aber weder in der NBV-Bonitur noch in der Radikal-Verteilung widerspiegelte.

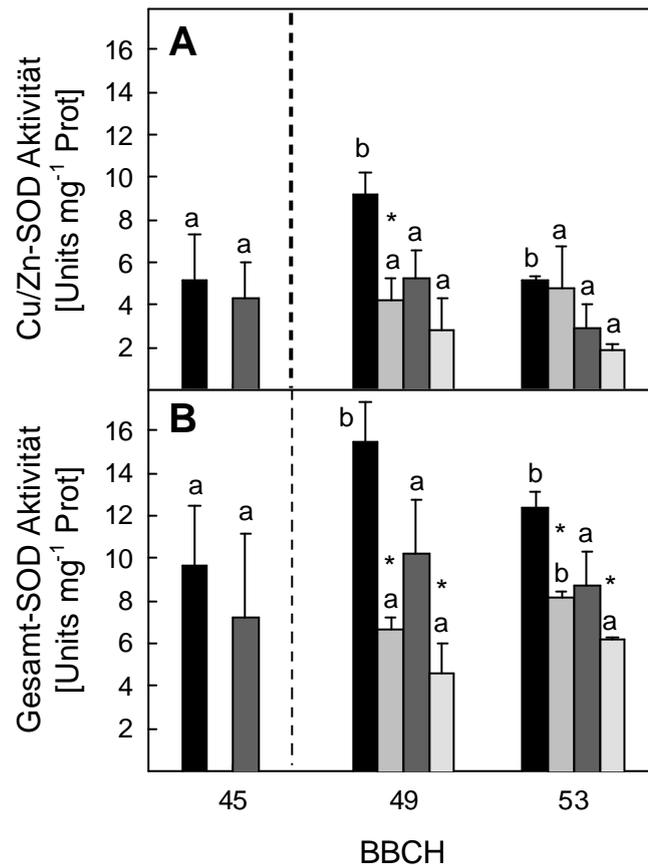


Abb. 3.16: Cu/Zn-SOD- (A) und Gesamt-SOD- (B) Aktivität im F-1 Blatt zu verschiedenen BBCH-Stadien. Signifikant erhöhte Cu/Zn-SOD-Aktivitäten zeigten sich bei IPZ 24727 im Vergleich zu *cv. Ricarda* bei den unbehandelten Pflanzen. Bei den den erhöhten Ozonkonzentrationen (110 ppm) ausgesetzten Gerstensorten zeigte IPZ 24727 bei der Gesamt-SOD-Aktivität im F1 Blatt in BBCH 53 einen signifikant höheren Wert. Signifikanzen zwischen den Kultivaren sind mit Buchstaben, zwischen den Behandlungsvarianten innerhalb eines Kultivar mit * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

IPZ 24727 ohne Ozon,
 IPZ 24727 mit Ozon,
 cv. Ricarda ohne Ozon
 cv. Ricarda mit Ozon

3.4 Freilandversuche in Frankendorf mit unterschiedlich empfindlichen Sommergerstenkultivaren

3.4.1 Landessortenversuche der Jahre 2000-2002

3.4.1.1 Globalstrahlung und Temperaturverlauf

Im Vergleich der drei Jahre wies das Jahr 2000 in den Monaten April bis Juni höhere mittlere Tagesdosen der Globalstrahlung (Tab. 3.1) und höhere Mittelwerte der Lufttemperatur (Tab. 3.2) auf. Das Jahr 2001 war durch unbeständiges Wetter mit relativ niedrigen Lufttemperaturen und das Jahr 2002 durch hohe mittlere Tagesdosen an Globalstrahlung bei mittleren Lufttemperaturen ausgezeichnet.

Monat	2000	2001	2002
April	15369 ± 5795	14550 ± 6109	13201 ± 5304
Mai	19098 ± 7148	20874 ± 7399	22416 ± 8533
Juni	23032 ± 6480	19812 ± 8703	27199 ± 7030

Tab. 3.1: Mittlere Tagesdosis der Globalstrahlung in den Monaten April, Mai und Juni der Versuchsjahre 2000, 2001 und 2002 in [kJ m²]. Die Daten wurden von der Klimastation Nr.45 der Lfl Freising, Standort Frankendorf aufgezeichnet. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung.

Monat	2000	2001	2002
April	7.98 ± 2.85	6.79 ± 3.66	9.67 ± 4.34
Mai	15.13 ± 3.77	14.77 ± 2.93	14.41 ± 2.78
Juni	21.05 ± 3.9	14.27 ± 3.19	17.25 ± 3.54

Tab. 3.2: Mittelwerte der Lufttemperatur in den Monaten April, Mai und Juni der Versuchsjahre 2000, 2001 und 2002 in [°C]. Die Daten wurden von der Klimastation Nr.45 der LfL Freising, Standort Frankendorf in 2 m Höhe aufgezeichnet. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung.

Der Verlauf der Globalstrahlung war in den drei aufgezeichneten Jahren untereinander vergleichbar. Hingegen zeigte der Temperaturverlauf im Jahr 2002 ein extremes Maximum am Ende des Beprobungszeitraumes (Abb. 3.17) im Juni.

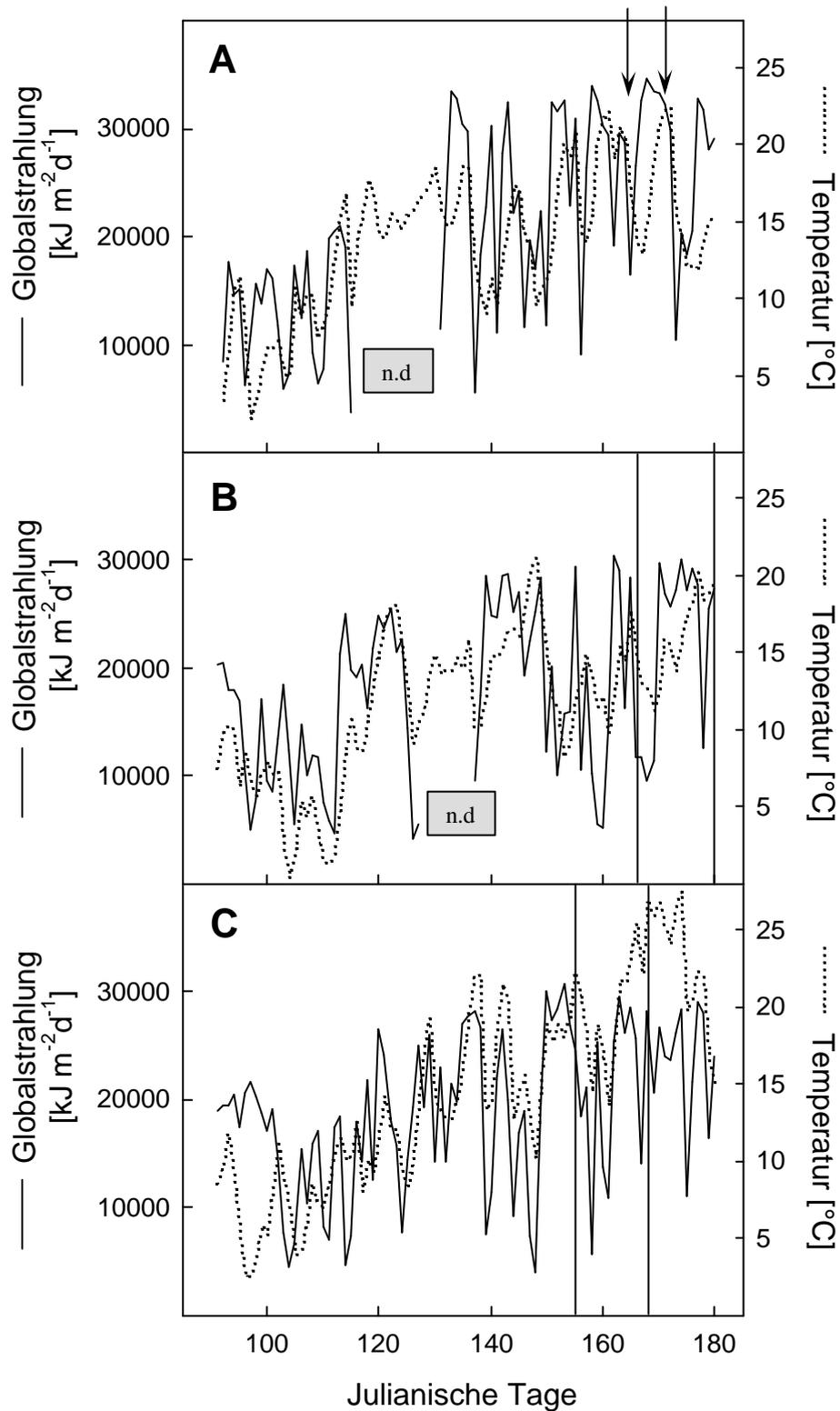


Abb. 3.17: Globalstrahlung (—) in $\text{kJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$ und Temperatur (.....) in den Jahren 2000 (A), 2001 (B) und 2002 (C) auf den Versuchsfeldern der LfL Freising. Dargestellt sind für die Globalstrahlung die mittlere Tagesdosis und für die Temperatur die Tagesmittelwerte. Die Daten wurden von der Klimastation Nr.45 der LfL Freising, Standort Frankendorf in 2 m Höhe aufgezeichnet. Die Pfeile in A zeigen die beiden Beprobungstage im Jahr 2000, die hinterlegten Bereiche stellen den Beprobungszeitraum in den Jahren 2001 und 2002 dar (n.d. = keine Daten verfügbar).

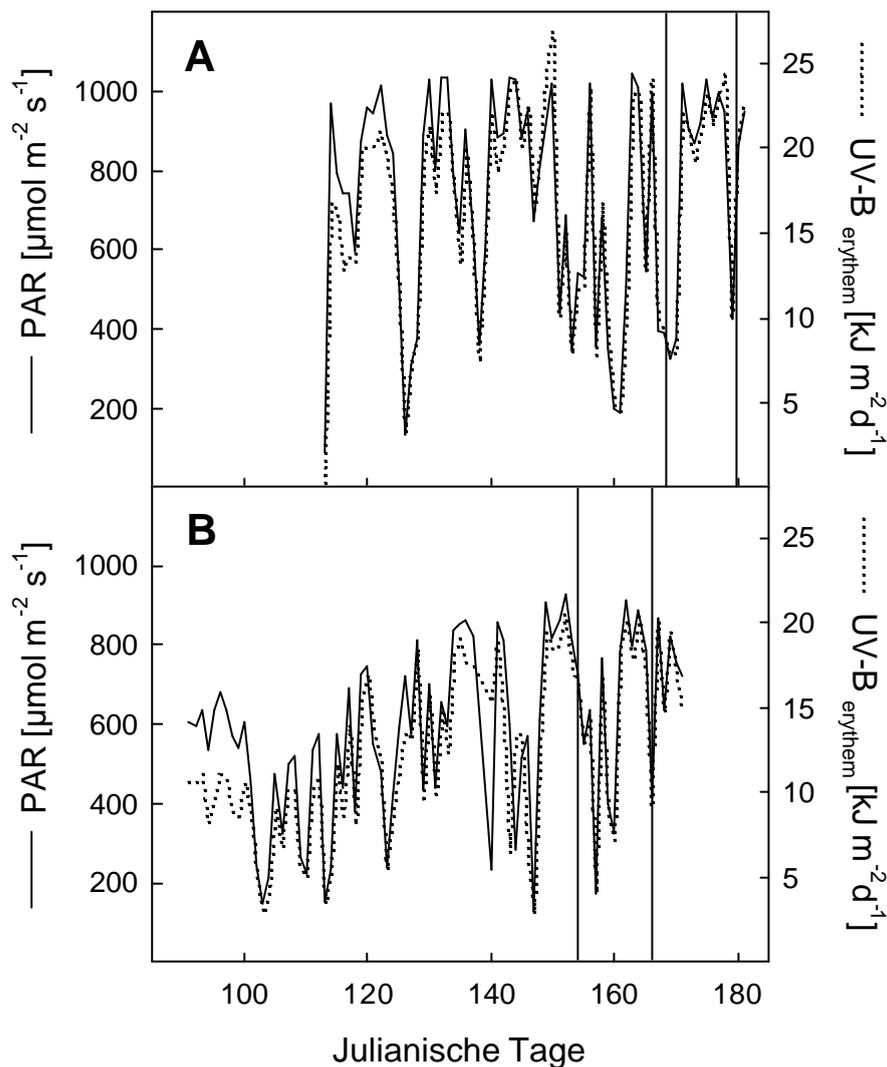


Abb. 3.18: Lichtperiodenmittel der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) (—) in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und Tagesdosen der erythemgewichteten UV-B-Strahlung (.....) in $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ in den Jahren 2001 (A) und 2002 (B) auf den Versuchsfeldern der LfL Freising. Die Daten wurden von dem Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Meteorologie und Klimaforschung (IMK-IFU) aufgezeichnet. Die hinterlegten Bereiche stellen den Beprobungszeitraum (2001: BBCH 39-61, 2002: BBCH 35-59) dar.

Der Verlauf der PAR und UV-B-Strahlung (Abb. 3.18) war in den Jahren 2001 und 2002 sehr unterschiedlich, so zeigten sich in 2001 deutlich höhere Lichtperiodenmittel an PAR und UV-B-Strahlung zwischen dem 120. und 150. Julianischen Tag als in 2002. Während des Beprobungszeitraumes im Jahr 2001 (166. bis 180. Julianischer Tag) war die Bestrahlung relativ konstant, im Jahr 2002 (155. bis 168. Julianischer Tag) wurden durch eine instabile Wetterlage sehr uneinheitliche Lichtstärken aufgezeichnet.

3.4.1.2 Landessortenversuch 2000

Im Jahr 2000 wurden im Rahmen des LSV sechs gegenüber der NBV unterschiedlich empfindliche Kultivare untersucht. Es wurden zum Entwicklungsstadium BBCH 45 F-1 Blätter und eine Woche später, zu BBCH 55, F Blätter geerntet. Bei der Probennahme der F-1 Blätter wurden lichtzugewandte und beschattete Blätter geerntet. In Abbildung 3.19 ist die Bonitur der F-1 Blätter der untersuchten Gerstensorten im Stadium BBCH 55 dargestellt (Bonitur-Verfahren siehe 2.6). Man konnte einen deutlichen Anstieg der Schädigung der Blätter durch NBV von < 10% bis 70% zwischen den Kultivaren feststellen. Diese Bonitur deckt sich mit den Literaturangaben über die sortenabhängige Ausbreitung der NBV (OBST ET AL., 2001).

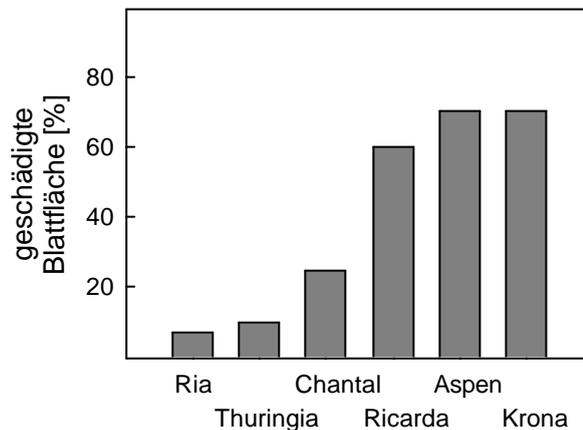


Abb. 3.19: Bonitur zu BBCH 55 im F1 Blatt in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches der LfL Freising auf den Versuchsfeldern bei Frankendorf. Bei der Bonitur wurden die gesamten Parzellen beurteilt. Die Beurteilung fand am 20.06.2000 (172. Julianischer Tag) statt.

In den Abbildungen 3.20, **A-D** sind die Sorten entsprechend ihrer Sensitivität gegenüber der NBV aufgetragen. Bei den Antioxidantienkonzentrationen ergab sich eine Tendenz im F-1 Blatt zu BBCH 45 zu höheren Ascorbatkonzentrationen ($3.5 - 4.3 \mu\text{mol mg FG}^{-1}$ Ascorbat, Abb. 3.20, **A**) mit zunehmender Empfindlichkeit der Kultivare. In den beschatteten Blattteilen war der Ascorbatgehalt deutlich geringer (ca. $1 \mu\text{mol mg FG}^{-1}$ Ascorbat) als in den dem Licht zugewandten Blattbereichen. Gleiches wurde bei den Glutathionkonzentrationen beobachtet (Abb. 3.20, **C, D**). Auch hier wiesen die empfindlicheren Kultivare tendenziell höhere Glutathionspiegel (bis zu $0.1 \mu\text{mol mg FG}^{-1}$ Glutathion) auf als die resistenten Sorten. Zu BBCH 55 konnte man im F Blatt durchschnittlich um ca. $1.0 \mu\text{mol mg FG}^{-1}$ höhere Ascorbatkonzentrationen als zu BBCH 45 im F-1 Blatt finden, was die Altersabhängigkeit der

Ascorbatkonzentrationen (siehe 3.3.2.3.) bestätigte. Eine Korrelation, berechnet über eine einfaktorische ANOVA, zwischen geschädigter Blattfläche und Antioxidantienkonzentrationen konnte jedoch nicht gefunden werden.

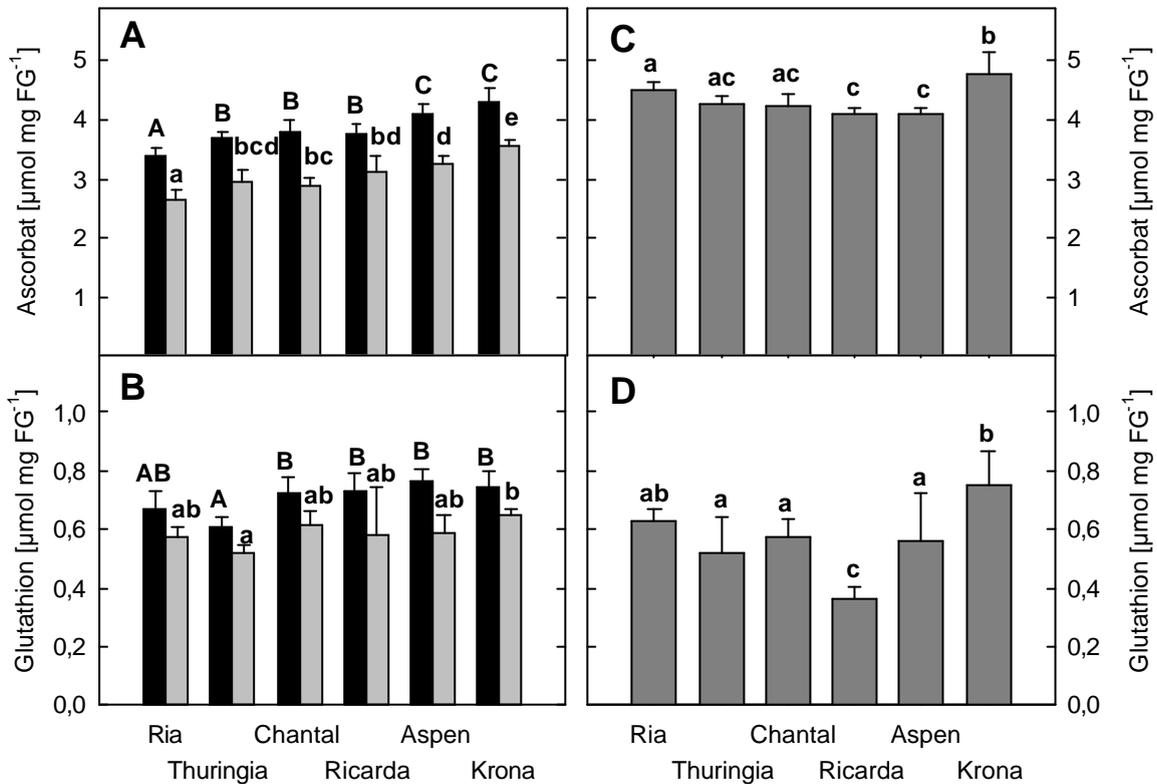


Abb. 3.20: Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen im F-1 Blatt zu BBCH 45 (A, B), bzw. zu BBCH 55 im F Blatt (C, D) in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches der LfL Freising auf den Versuchsflächen bei Frankendorf. Signifikante Unterschiede ($p=0.05$) zwischen den Kultivaren sind mit unterschiedlichen Buchstaben dargestellt, $n=5$, $\pm \sigma$. Die Beprobungen fanden am 14.06.2000 und 20.06.2000 (Julianische Tage 166 und 172) statt.

■ Lichtzugewandte Blatteile, □ beschattete Blatteile, ■ Gesamtblätter

Bei der Färbung der Blätter auf Superoxidanion-Radikale mittels NBT (Abb. 3.21, A, B) zeigte sich zu BBCH 45 im F-1 Blatt nur bei der sehr empfindlichen Sorte *cv.* Krona eine signifikante Erhöhung ($p=0.05$). Zu BBCH 55 beobachtete man im F Blatt einen ähnlichen Verlauf in der Radikal Verteilung wie bei der geschädigten Blattfläche im F-1 Blatt zum gleichen Zeitpunkt. Eine Schädigung des F Blattes war zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten. Bei der Betrachtung der SOD-Aktivitäten (Abb. 3.21, C-F) zeigten *cv.* Ria und *cv.* Thuringia als unempfindliche Sorten hohe Enzymaktivitäten (7.8 bzw. 12.4 units mg Prot⁻¹ bei der Cu/Zn-SOD-Aktivität). Des weiteren war bei diesen beiden Sorten auffällig, dass einen starker Unterschied in der Enzymaktivität zwischen den Licht- und

Schattenblättern zu beobachten war. In den Lichtblättern lag die Cu/Zn-SOD-Aktivität ca. 5.5 units mg Prot⁻¹ über der Aktivität in den Schattenblättern, während bei den anderen Sorten die Cu/Zn-SOD in den Lichtblättern lediglich bis zu 2.0 units mg Prot⁻¹ über der Aktivität in den Schattenblättern lag. Weiterhin war zu beobachten, dass in *cv.* Ricarda die Cu/Zn-SOD-Aktivität in den Schattenblättern höher war als in den Lichtblättern. Die Aktivitäten der Gesamt- bzw. Cu/Zn-SOD zeigten die gleichen Verhältnisse zueinander, weswegen im Folgenden auf die Darstellung der Gesamt-SOD-Aktivität verzichtet wird.

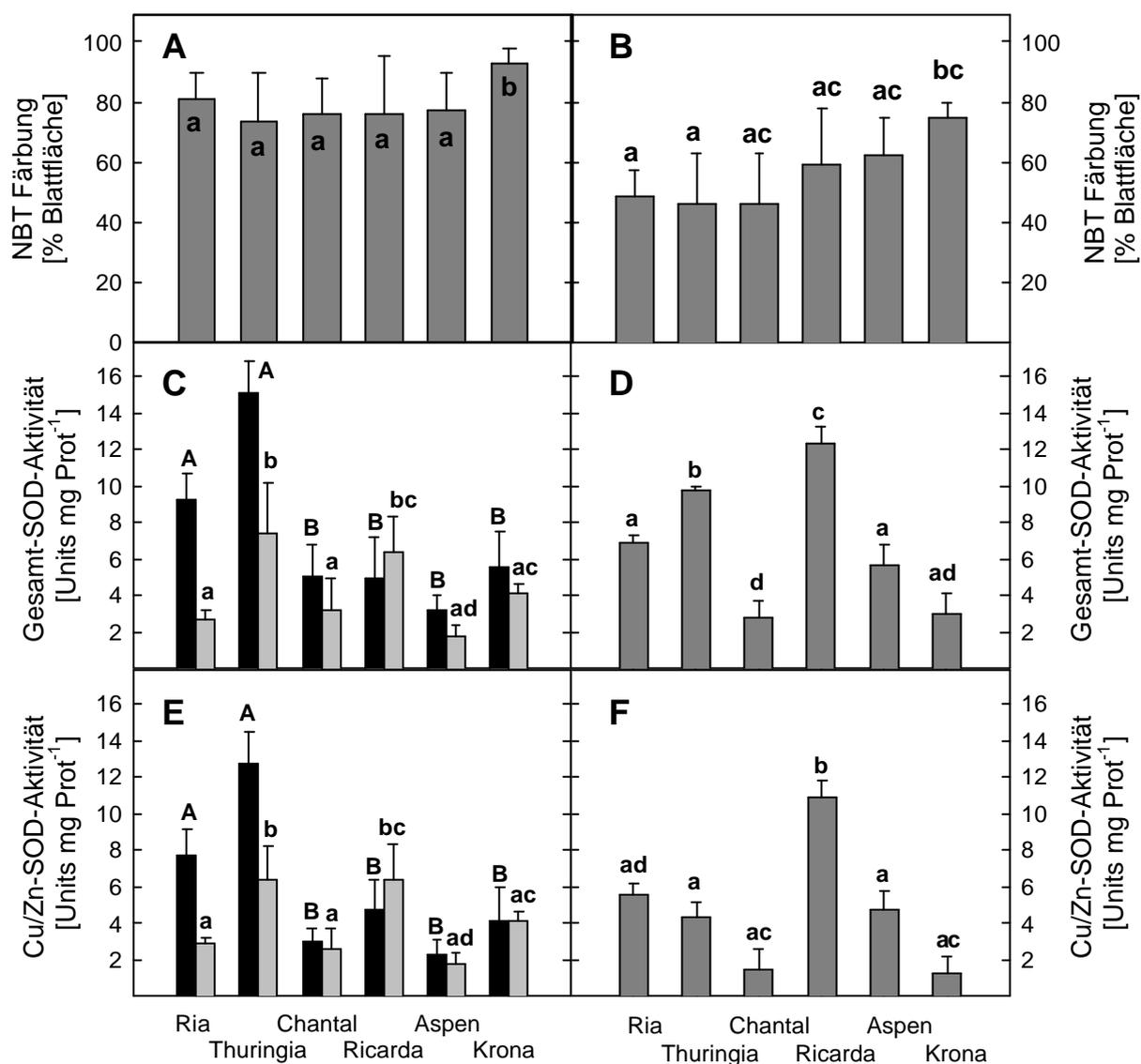


Abb. 3.21: Färbung auf Superoxidation-Radikale im F-1 Blatt zu BBCH 45 (A) bzw. im F Blatt zu BBCH 55 (B), Gesamt-SOD- und Cu/Zn-SOD-Aktivität im F-1 Blatt zu BBCH 45 (C, E), bzw. zu BBCH 55 im F Blatt (D, F) in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches der LfL Freising auf den Versuchsfeldern bei Frankendorf. Signifikante Unterschiede ($p=0.05$) zwischen den Kultivaren sind mit unterschiedlichen Buchstaben dargestellt. $n=5$, $\pm \sigma$.

■ Lichtzugewandte Blattteile, □ beschattete Blattteile, ▒ Gesamtblätter

Auffällig war die hohe Enzymaktivität der SOD in den F Blättern bei *cv. Ricarda* als Vertreterin einer sehr empfindlichen Gerstensorte.

Aufgrund der Ergebnisse des Jahres 2000 wurde für die Experimente im Jahr 2001 geplant, die Beprobung zu einem früheren Entwicklungsstadium zu beginnen und zusätzlich zu dem Landessortenversuch zwei Sorten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber NBV über einen längeren Entwicklungszeitraum zu untersuchen.

3.4.1.3 Landessortenversuch 2001

Im Jahr 2001 wurde zu den Entwicklungsstadien BBCH 39, 56 und 61 das F-1 Blatt der Sorten IPZ 24727, *cv. Ria*, *cv. Thuringia*, *cv. Barke*, *cv. Ricarda* und *cv. Krona* beprobt. Anhand der Boniturwerte auf NBV (Abb. 3.22, **A**) konnte man den exponentiellen Anstieg der Schädigung ab BBCH 61 bei den sensitiven Kultivaren verfolgen. Während bei den Sorten IPZ 24727, *cv. Ria* und *cv. Thuringia* die Boniturwerte zu den drei Beprobungsterminen zwischen 0 und 7 % lagen, wurden bei *cv. Ricarda* zu BBCH 61 über 60 % geschädigte Blattfläche festgestellt. In der Abbildung 3.22 sind die Sorten entsprechend ihrer Empfindlichkeit gegenüber NBV aufgetragen.

Bei den Ascorbatkonzentrationen (Abb. 3.22, **B**) konnte man zum einen eine altersabhängige Abnahme von im Mittel $3 \mu\text{mol Ascorbat mg}^{-1} \text{FG}^{-1}$ beobachten, zum anderen zeigte sich zu BBCH 39 eine signifikante Abnahme des Ascorbatspiegels von den resistenten zu den empfindlichen Sorten hin. Ausnahme hiervon war *cv. Ricarda*. Bei den Glutathionkonzentrationen (Abb. 3.22, **C**) beobachtete man ein eher uneinheitliches Bild, auffällig war der hohe Glutathiongehalt bei IPZ 24727 über den gesamten Beprobungszeitraum hinweg. Auch bei Glutathion ließ sich eine altersabhängige Abnahme der Konzentration von im Mittel $0.2 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{FG}^{-1}$ beobachten.

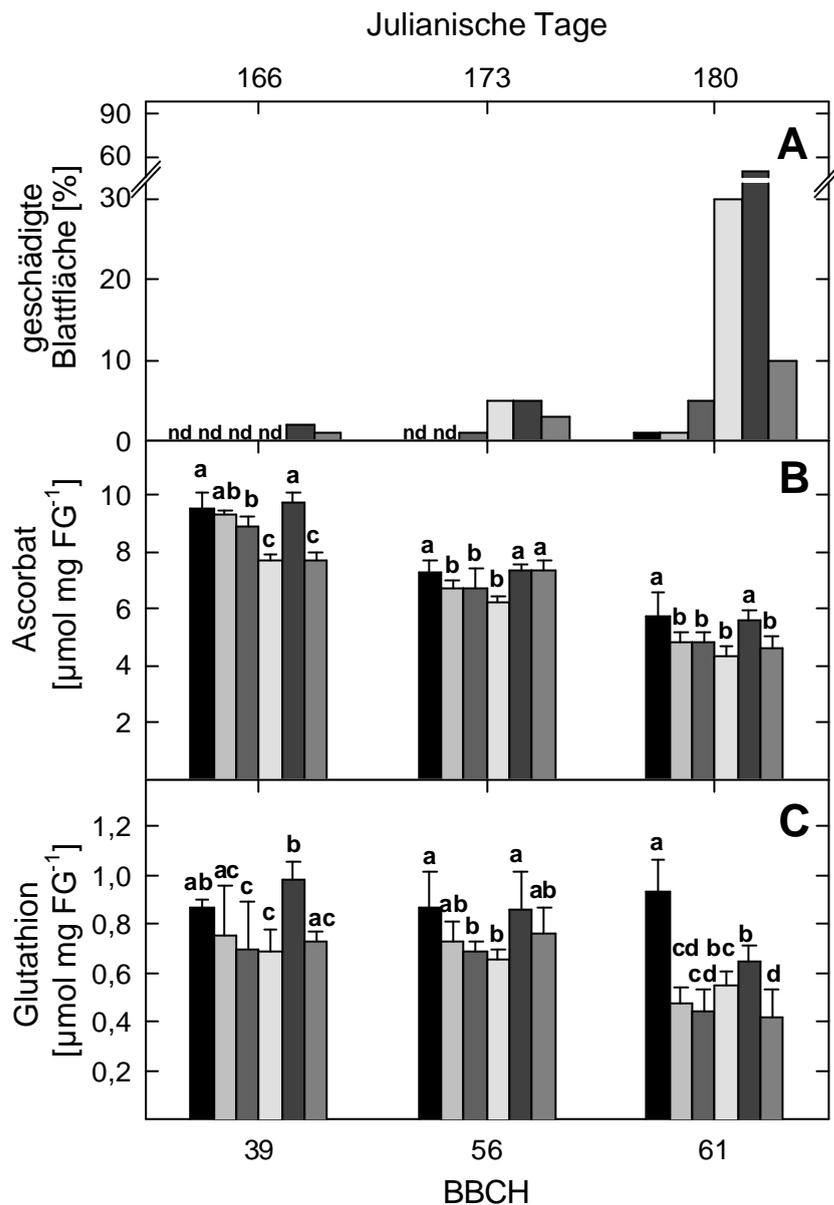


Abb. 3.22: Bonitur des F-1 Blattes auf NBV zu BBCH 39, 50, 56 und 61 (A) in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches im Jahr 2001, sowie Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen im F-1 Blatt zu BBCH 39, 56 und 61 (B, C). Es stellte sich eine altersabhängige Abnahme der Antioxidantienkonzentrationen dar, der Zuchtstamm IPZ 24727 zeigte bei der letzten Beprobung signifikant höhere Glutathionkonzentrationen. Signifikante Unterschiede ($p=0.05$) zwischen den Kultivaren zu einem Beprobungstermin sind mit unterschiedlichen Buchstaben dargestellt, $n=5$, $\pm \sigma$, bei der Bonitur wurden die gesamten Parzellen beurteilt. Die Beprobungen fanden am 15.06., 22.06. und 29.06. statt (Julianische Tage: 166, 173 und 180).

■ IPZ 24727, □ cv. Ria, ■ cv. Thuringia, □ cv. Barke, ■ cv. Ricarda, ■ cv. Krona

Die Färbung auf Superoxidanion-Radikale mittels NBT (Abb. 3.23, A) zeigte eine Abnahme der Radikalverteilung mit dem Blattalter. Während bei BBCH 39 bis zu 100 % der Blattflächen bei den verschiedenen Kultivaren angefärbt waren, konnte man in BBCH 61 nur noch Färbungen von bis zu 50 % Blattfläche beobachten. Ein Zusammenhang zwischen der

Schädigung der Blätter durch NBV und einer höheren Verteilung an Superoxidation-Radikalen in den Blättern konnte im Freiland aufgrund der stärkeren Färbung durch NBT nicht so eindeutig wie in den Sonnensimulatorexperimenten (siehe 3.3.1/3.3.2) festgestellt werden. Der resistente Zuchtstamm IPZ 24727 zeigte z. B. die gleiche Radikal-Verteilung wie die sensitive Gerstensorte *cv.* Ricarda, die empfindliche Sorte *cv.* Barke wies zu BBCH 56 die geringste Färbung auf Radikale von den untersuchten Sorten auf.

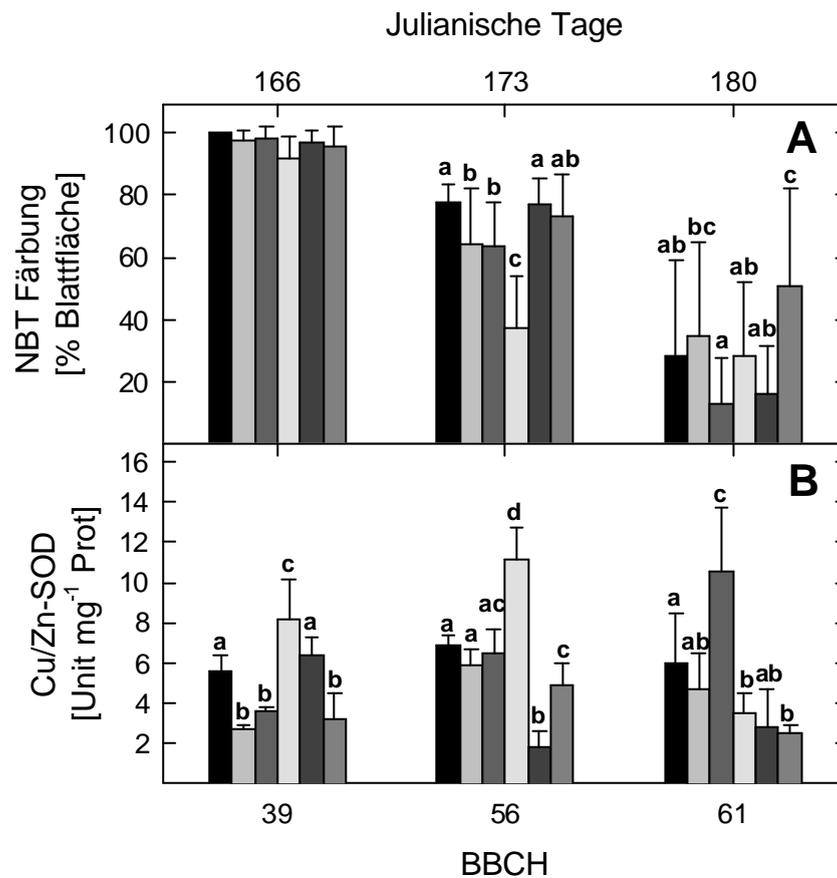


Abb. 3.23: NBT-Färbung auf Superoxidation-Radikale im F-1 Blattes zu BBCH 39, 56 und 61 (A) in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches im Jahr 2001, sowie Cu/Zn-SOD-Aktivitäten im F-1 Blatt zu BBCH 39, 56 und 61 (B). Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den Kultivaren zu einem Beprobungstermin sind mit unterschiedlichen Buchstaben dargestellt. $n = 5$, $\pm \sigma$.
 ■ IPZ 24727, ■ *cv.* Ria, ■ *cv.* Thuringia, ■ *cv.* Barke, ■ *cv.* Ricarda, ■ *cv.* Krona

Die Bestimmung der Cu/Zn-SOD-Aktivität (Abb. 3.23, B) zeigte einen sehr unterschiedlichen Verlauf bei den einzelnen Sorten. Bei der resistenten Sorte *cv.* Thuringia konnte man eine Zunahme der Cu/Zn-SOD-Aktivität mit dem Alter beobachten, während die meisten Kultivare ein Maximum der Aktivität bei BBCH 56, wenn die Pflanzen mitten im

Ährenschieben sind, zeigten. *Cv.* Ricarda verhielt sich gegenläufig mit einem Minimum bei BBCH 56. *Cv.* Barke zeigte mit bis zu 11 units Cu/Zn-SOD mg^{-1} Prot die höchste Aktivität über den Beprobungszeitraum, *cv.* Ricarda mit Aktivitätswerten zwischen 2 – 6 units Cu/Zn-SOD mg^{-1} Prot die niedrigsten Aktivitäten. Der Zuchtstamm IPZ 24727 lag mit ca. 6 units Cu/Zn-SOD mg^{-1} Prot an zweithöchster Stelle der Kultivare.

3.4.1.4 Landessortenversuch 2002

Im Jahr 2002 wurden im Rahmen des Landessortenversuches von den im Jahr 2001 untersuchten Kultivaren nur noch die Sorten IPZ 24727, *cv.* Ria, *cv.* Barke und *cv.* Ricarda angebaut. Daher beschränkten sich die Untersuchungen auf diese Kultivare. Die Beprobung wurde zu BBCH 35, bevor das Fahnenblatt spitzt, begonnen, um einen besseren Einblick in die Entwicklungsabhängigkeit zu bekommen. Die Bonitur (Abb. 3.24, **A**) zeigte wie im Vorjahr einen exponentiellen Anstieg der Blattverbräunung nach BBCH 52, dem Beginn des Ährenschiebens und somit dem Übergang der Pflanze von der vegetativen in die generative Phase. Bei *cv.* Ricarda wurde zu diesem Zeitpunkt schon eine verstärkte Bildung der NBV festgestellt, während bei *cv.* Barke erst zu BBCH 59, am Ende des Ährenschiebens, eine schlagartige Ausbildung der NBV zu beobachten war.

Bei den Antioxidantien (Abb. 3.24, **B**, **C**) konnte die altersabhängige Abnahme der Ascorbatkonzentration, die im Jahr 2001 beobachtet worden war, bestätigt werden, sowie die Tatsache, dass man keinen Unterschied zwischen den Kultivaren findet. Bei den empfindlichen Sorten *cv.* Barke und *cv.* Ricarda war ein Maximum der Glutathionkonzentration zu BBCH 52 festzustellen. Die Sorten lagen zu diesem Termin geringfügig höher ($0.1 \mu\text{mol mg}^{-1}$ FG) als IPZ 24727 und *cv.* Ria. Bei allen Sorten nahm die Glutathionkonzentration von BBCH 35 zu BBCH 59 hin tendenziell ab.

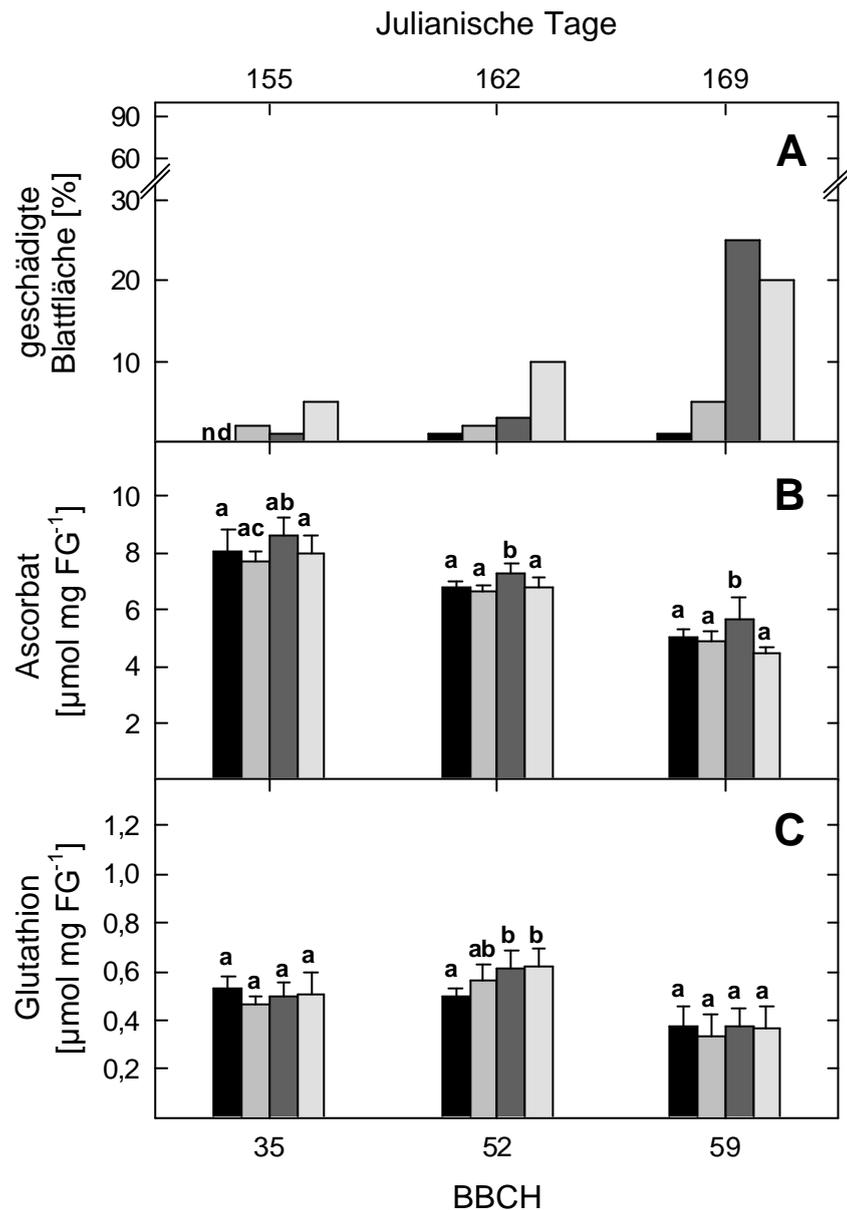


Abb. 324: Bonitur des F1 Blattes auf NBV zu BBCH 35, 52 und 59 (A) in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches im Jahr 2002, sowie Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen im F-1 Blatt zu BBCH 35, 52 und 59 (B, C). Es stellte sich eine altersabhängige Abnahme der Ascorbatkonzentrationen dar, der Zuchtstamm IPZ 24727 zeigte bei der letzten Beprobung signifikant höhere Glutathionkonzentrationen. Signifikante Unterschiede ($p=0.05$) zwischen den Kultivaren zu einem Beprobungstermin sind mit unterschiedlichen Buchstaben dargestellt, $n=5$, $\pm \sigma$, bei der Bonitur wurden die gesamten Parzellen beurteilt. Die Beprobungen fanden am 04.06., 11.06. und 17.06. statt (Julianische Tage: 155, 162 und 169).

■ IPZ 24727, □ cv. Ria, ■ cv. Barke, □ cv. Ricarda

Die Verteilung der Superoxidanion-Radikale zeigte zum ersten Beprobungstermin bei BBCH 35 (Abb. 3.25., A) wie im Vorjahr eine 100 % ige Anfärbung der Blätter mit NBT, welche mit zunehmendem Blattalter schwächer wurde. Zu BBCH 59 waren nur noch ca. 50 % der Blattflächen angefärbt. Allgemein wurde eine sehr starke Varianz zwischen den Sorten

festgestellt, so dass eine signifikante Erhöhung (einfaktorielle ANOVA) der Radikal-Verteilung nur bei *cv. Ricarda* zu BBCH 59 festgestellt wurde. Die Enzymaktivität der Cu/Zn-SOD zeigte zu den Entwicklungsstadien BBCH 35 und 52 deutliche Unterschiede zwischen den unempfindlichen Gerstensorten (IPZ 24727 und *cv. Ria*) und den sensitiven Kultivaren (*cv. Barke* und *cv. Ricarda*). So wies *cv. Ria* zu BBCH 35 ca. 6 units SOD mg⁻¹ Prot mehr auf als *cv. Ricarda*, IPZ 24727 hatte zu BBCH 52 ca. 2.5 units SOD mg⁻¹ Prot mehr als *cv. Barke*. IPZ 24727 lag zu BBCH 35 ca. 2.8 und zu BBCH 52 ca. 1.5 units SOD mg⁻¹ Prot über *cv. Ricarda*. Auffällig war die Entwicklung der Aktivitäten mit dem Pflanzenalter.

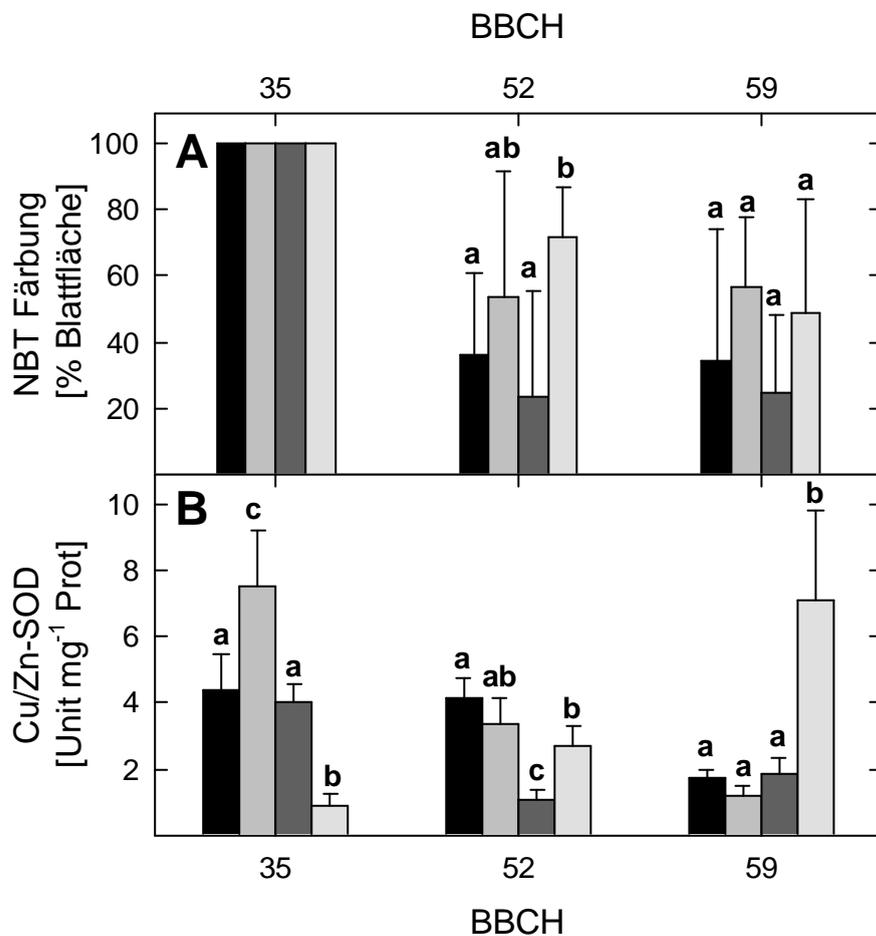


Abb. 3.25: NBT-Färbung auf Superoxidation-Radikale im F-1 Blattes zu BBCH 35, 52 und 52 (A) in verschiedenen Sorten des Landessortenversuches im Jahr 2002, sowie Cu/Zn-SOD-Aktivitäten im F-1 Blatt zu BBCH 35, 52 und 52 (B). Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den Kultivaren zu einem Beprobungstermin sind mit unterschiedlichen Buchstaben dargestellt. $n = 5, \pm \sigma$.
 ■ IPZ 24727, ■ *cv. Ria*, ■ *cv. Barke*, ■ *cv. Ricarda*

Die unempfindlicheren Sorten zeigten eine abnehmende SOD-Aktivität mit zunehmenden Alter, bei *cv. Ria* von 7.6 auf 1.2 units Cu/Zn-SOD mg⁻¹ Prot, während bei *cv. Ricarda* mit

zunehmendem Blattalter die Enzymaktivität von 0.9 auf 7.1 units Cu/Zn-SOD mg^{-1} Prot anstieg. Zu BBCH 59 wurde daher bei *cv.* Ricarda ein signifikant erhöhter Wert der Cu/Zn-SOD-Aktivität im Vergleich zu den anderen Kultivaren gemessen. Ein ähnliches Verhalten war im Jahr 2001 bei *cv.* Thuringia beobachtet worden.

3.4.1.5 Vergleich Tag-Nacht

Um zu untersuchen, inwieweit die Bestrahlungsstärke Einfluss auf die NBT-Färbung durch die Superoxidanion-Radikale besaß, wurden im Jahr 2002 während des Freilandexperiments an drei Beprobungsterminen Tag- und Nachtproben geerntet (siehe 2.4.3.2). Die Beprobung der Tagproben fand zum gleichen Zeitpunkt (zwischen 8:00 und 10:00h morgens) statt, wie die Probennahme der übrigen Proben. Die Nachtproben wurden zwischen 2:00 und 3:00 h nachts geerntet, bevor die Dämmerung einsetzte. Es wurden von den Sorten *cv.* Ricarda und IPZ 24727 je drei Parallelproben genommen, die Antioxidantien Ascorbat und Glutathion und die Enzymaktivität der Superoxiddismutase bestimmt, sowie die Blätter mit NBT auf Superoxidanion-Radikale angefärbt (Abb. 3.26).

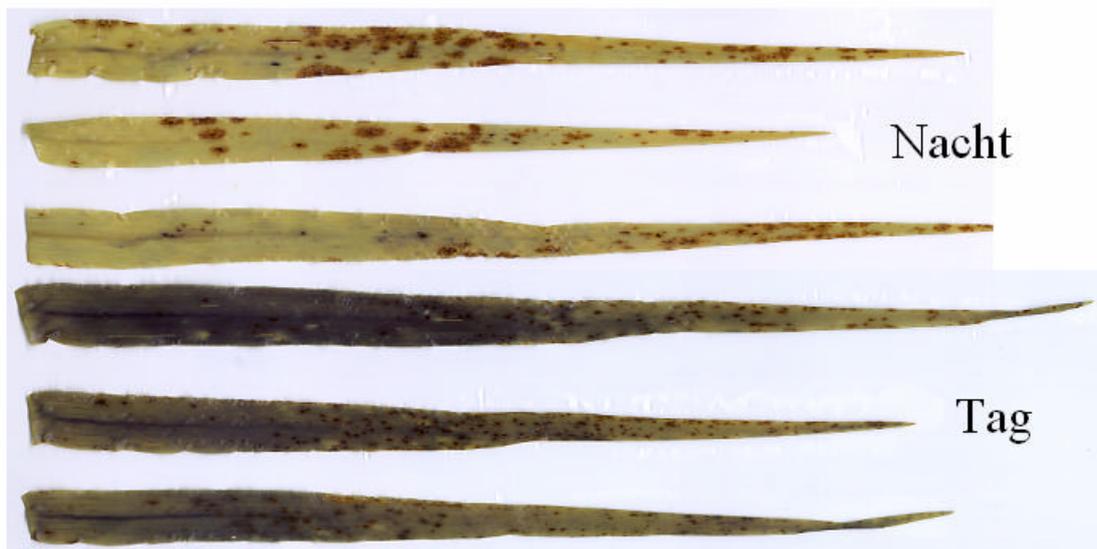


Abb. 3.26: Anfärbung von Gerstenblättern der *cv.* Ricarda zu BBCH 52 (11.06.2002). Es wurden drei Blätter bei Nacht (zwischen 2:00 und 3:00 h) und drei Blätter bei Tag (zwischen 8:00 und 9:00 h) geerntet und mit NBT auf Superoxidanion-Radikale angefärbt. Bei den Nachtproben wurde kaum Formazan gebildet, während die Tagproben fast durchgehende Färbung der Blattflächen aufwiesen.

In Abb. 3.27 A ist sehr deutlich zu sehen, dass Superoxidanion-Radikalen abhängig von der Strahlungsintensität gebildet werden: Die Tagproben wiesen zu BBCH 52 und 55 bis zu 70 %

mehr angefärbte Blattfläche auf, als die bei Nacht geernteten Blätter. Diese Beobachtung wurde durch die Enzymaktivität der Cu/Zn-SOD bestätigt (Abb. 3.27, **B**). Zu BBCH 52 und 55 lagen die Enzymaktivitäten bei beiden Kultivaren in den bei Tag beprobten Blättern im Mittel 3 units mg^{-1} Prot über den Nachtproben. Zu BBCH 51 konnten keine auffälligen Unterschiede in der Enzymaktivität gemessen werden, was zu den Werten passte, die zu diesem Termin bei der NBT-Anfärbung gefunden wurden. Hier konnte bei IPZ 24727 kein Unterschied zwischen den Tag- und Nachtproben gefunden werden, beide wiesen mit unter 10 % Anfärbung der Blattfläche ein gleich geringe Radikalverteilung auf, während bei *cv.* Ricarda sowohl bei der NBT-Anfärbung als auch bei der Cu/Zn-SOD-Aktivität ein Unterschied zu verzeichnen war.

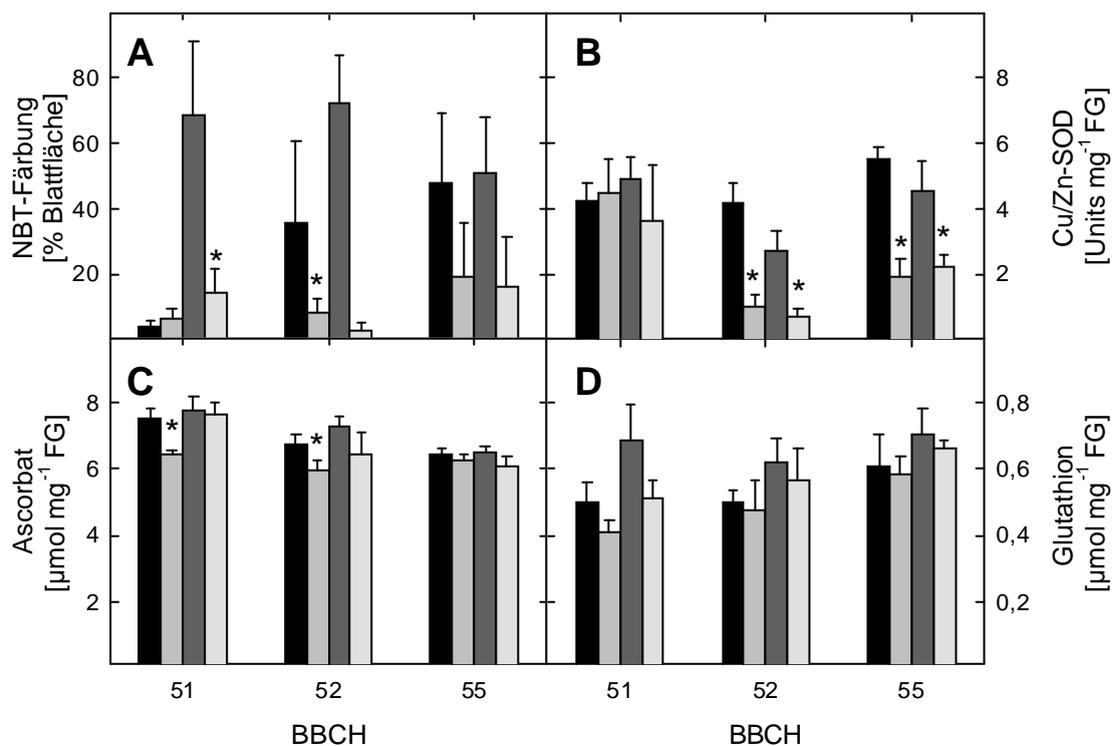


Abb. 3.27: Vergleich der Superoxidation-Radikal-Verteilung (**A**), Cu/Zn-SOD-Aktivität (**B**) sowie der Konzentrationen von Ascorbat (**C**) und Glutathion (**D**) bei Tag- und Nachtproben im F1 Blatt zu BBCH 51, 52 und 55 der Sorten *cv.* Ricarda und IPZ 24727 im Jahr 2002. Signifikante Unterschiede ($p=0.05$) zwischen Tag und Nacht zu einem Beprobungstermin sind mit * dargestellt. $n = 3, \pm \sigma$.
 ■ IPZ 24727-Tag, ■ IPZ 24727-Nacht, ■ *cv.* Ricarda-Tag, ■ *cv.* Ricarda-Nacht

Die Antioxidantien Ascorbat (**C**) und Glutathion (**D**) zeigten wie im Jahr 2000, als Schatten- und Lichtblätter zu BBCH 45 geerntet worden waren (3.4.1.2), einen Unterschied von bis zu 1 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ FG im Ascorbatgehalt und von bis zu 0.1 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ FG im Glutathiongehalt zwischen Tag und Nacht.

3.4.2. Entwicklungsabhängige Untersuchungen an IPZ 24727 und *cv.* Ricarda

3.4.2.1 Zeitliche Entwicklung der NBV

In den Jahren 2001 und 2002 wurden die Kultivare IPZ 24727 und *cv.* Ricarda im Entwicklungsstadium des Wechsels von der vegetativen in die generative Phase (Jahr 2001: BBCH 39, Fahnenblatt voll entwickelt bis BBCH 61, Ähren vollständig da, Jahr 2002: BBCH 35, kurz bevor Fahnenblatt spitzt bis BBCH 59, Ende Ährenschieben) beprobt, um die Entstehung der NBV in Abhängigkeit vom Pflanzenstadium zu untersuchen (Abb. 3.28).

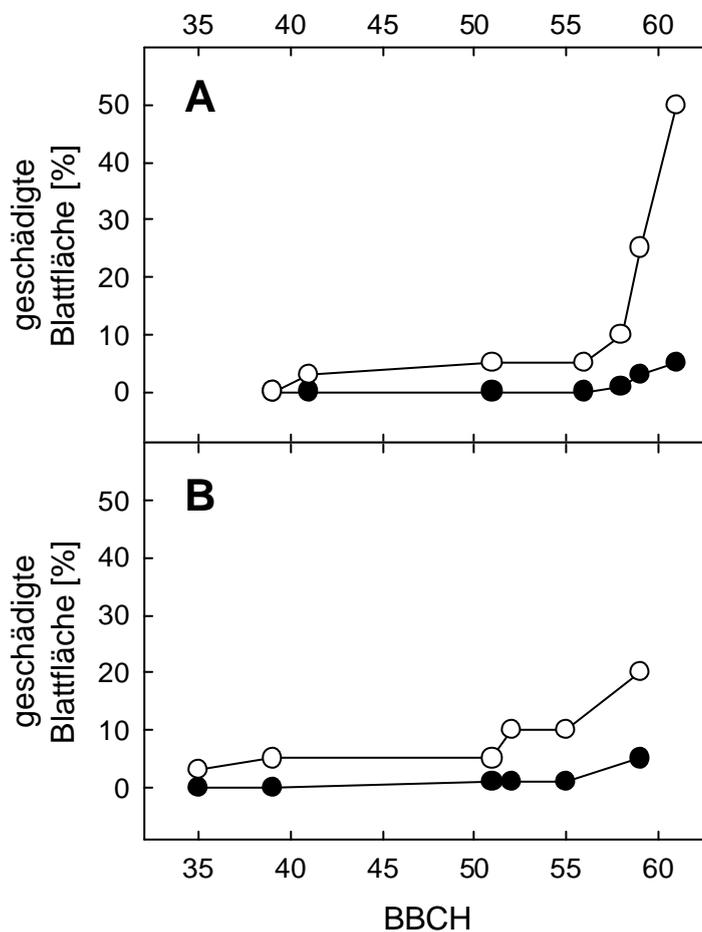


Abb. 3.28: Bonitur des F-1 Blattes auf NBV zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 (A) und zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55, und 59 im Jahr 2002 (B) in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv.* Ricarda (—○—). Es zeigte sich in beiden Jahren, dass die Entstehung der NBV zu BBCH 55 begann und in den Sorten unterschiedlich stark ausgebildet wurde. Es wurde jeweils die gesamte Sorte betrachtet.

Es wurde an den F-1 Blättern zum jeweiligen Beprobungstermin eine Bonitur vorgenommen, die Radikalverteilung der Superoxidation-Radikale über die NBT-Färbung ermittelt, die

Antioxidantien sowie die Cu/Zn-SOD-Aktivitäten untersucht. Bei der Bonitur (Abb. 3.28, **A**, **B**) konnte man einen sehr ähnlichen Verlauf der Entwicklung der NBV in beiden Jahren beobachten. Von BBCH 35 bis BBCH 55 bzw. 52 lag die Schädigung der Blätter bei beiden Sorten unter 5 %, danach stieg der Grad der Schädigung durch NBV bei *cv.* Ricarda im Gegensatz zu IPZ 24727 rasch an, so dass zu BBCH 61 bei der empfindlichen *cv.* Ricarda 50 % geschädigte Blattfläche festgestellt wurden, während bei IPZ 24727 lediglich 5 % geschädigte Blattfläche beobachtet wurden.

3.4.2.2 Altersabhängige Verteilung der Superoxidanion-Radikale im F-1 Blatt

Es wurde in beiden Jahren 2001 (Abb. 3.29, **A**) und 2002 (Abb. 3.29, **B**) eine altersabhängige Abnahme der Superoxidanion-Radikale im Blatt beobachtet, wie es auch bei den

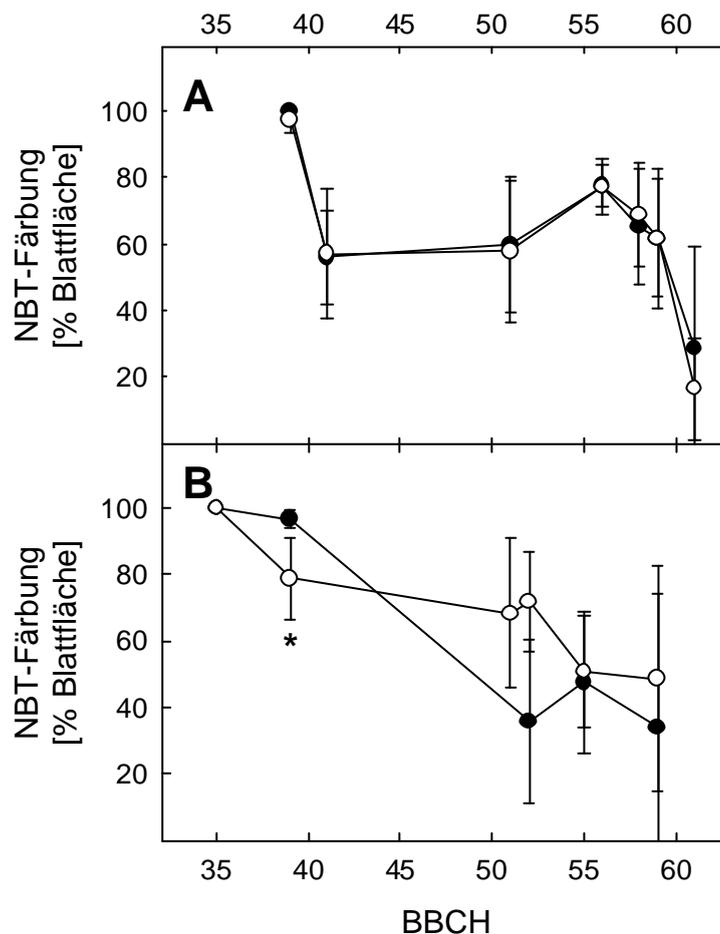


Abb. 3.29: Verteilung der Superoxidanion-Radikale im F-1 Blattes zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 (**A**) und zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55, und 59 im Jahr 2002 (**B**) in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv.* Ricarda (—○—). Es zeigte sich in beiden Jahren eine altersabhängige Abnahme der Radikalverteilung, wobei zwischen den Kultivaren kein Unterschied zu beobachten war ($n = 5, \pm \sigma$).

Untersuchungen im LSV festgestellt worden war. Dabei konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kultivaren festgestellt werden. Im Vergleich zu den Sonnensimulator-Experimenten lagen die Anfärbungen wesentlich höher, was mit den höheren Strahlungsintensitäten (in den Kammern konnte nur ein typischer Sonnentag im April simuliert werden) erklärt wurde. Zu BBCH 39 betrug die Anfärbung der Blätter durch NBT noch nahezu 100 % , welche sich zu BBCH 59/61 hin aber kontinuierlich bis auf ca. 20 % reduzierte. In beiden Jahren setzte die Abnahme der Radikalverteilung zum gleichen Entwicklungsstadium ein, sodass ein Zusammenhang zwischen Radikalproduktion und Alter der Blätter gegeben war.

3.4.2.3 Verlauf der Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen im F-1 Blatt

Die Ascorbatkonzentrationen verliefen in den Jahren 2001 und 2002 (Abb. 3.30, **A** und **C**) parallel und entsprechend den Superoxidation-Radikal Verteilungen (Abb. 3.29). Es konnte eine kontinuierliche Abnahme der Konzentrationen von ca. 10 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ FG auf knapp 6 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ FG im Entwicklungszeitraum BBCH 39 bzw. 35 zu BBCH 61 bzw. 59 hin beobachtet werden. Die Sorten verhielten sich dabei nicht unterschiedlich. Bei den Glutathionkonzentrationen (2001, Abb. 3.30, **B**, 2002 Abb. 3.30, **D**) wurde in den beiden Jahren ein uneinheitlicher Verlauf beobachtet. Im Jahr 2001 zeigte sich ein annähernd gleicher Verlauf beider Kultivare mit einer signifikanten Erhöhung der Glutathionkonzentration in IPZ 24727 zu BBCH 61, während im Jahr 2002 *cv.* Ricarda höhere Werte zeigte und zu BBCH 59 beide Sorten eine Abnahme der Glutathionspiegel verzeichneten.

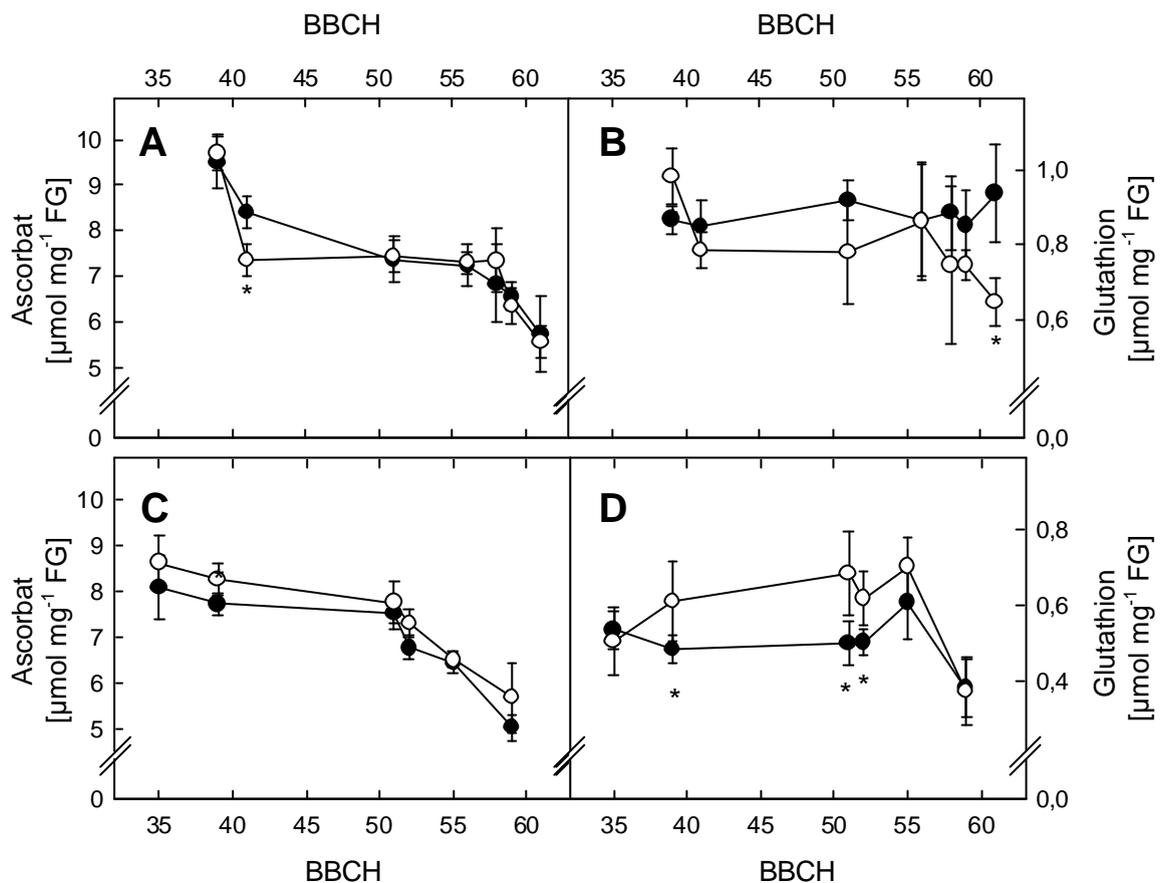


Abb. 3.30: Ascorbat- (A, C) und Glutathionkonzentrationen (B, D) im F-1 Blattes zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 (A, B) und zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55, und 59 im Jahr 2002 (C, D) in den Sorten IPZ 24727 (●) und *cv.* Ricarda (○). Es zeigte sich in beiden Jahren eine altersabhängige Abnahme der Ascorbatkonzentrationen, wobei zwischen den Kultivaren kein Unterschied zu beobachten war. Die Glutathionkonzentrationen zeigten keinen einheitlichen Trend ($n = 3, \pm \sigma$).

3.4.2.4 Verlauf der SOD-Aktivitäten im F-1 Blatt

Die Cu/Zn-SOD-Enzymaktivität war in den Jahren 2001 und 2002 sehr unterschiedlich. 2001 (Abb. 3.31, A) wurde zwischen BBCH 39 und 51 kein Unterschied zwischen den Sorten aber ein leichter Anstieg der Enzymaktivität von ca. 6 units auf ungefähr 8 units beobachtet. Ab BBCH 51 nahm die Aktivität auf bis zu 0.2 units (*cv.* Ricarda) ab, wobei in IPZ 24727 mit 2.5 units noch signifikant höhere Aktivitäten gefunden wurden als in *cv.* Ricarda. Zum letzten Beprobungszeitpunkt BBCH 61 stiegen die Werte nochmal an, IPZ 24727 hatte immer noch deutlich höhere Werte als *cv.* Ricarda.

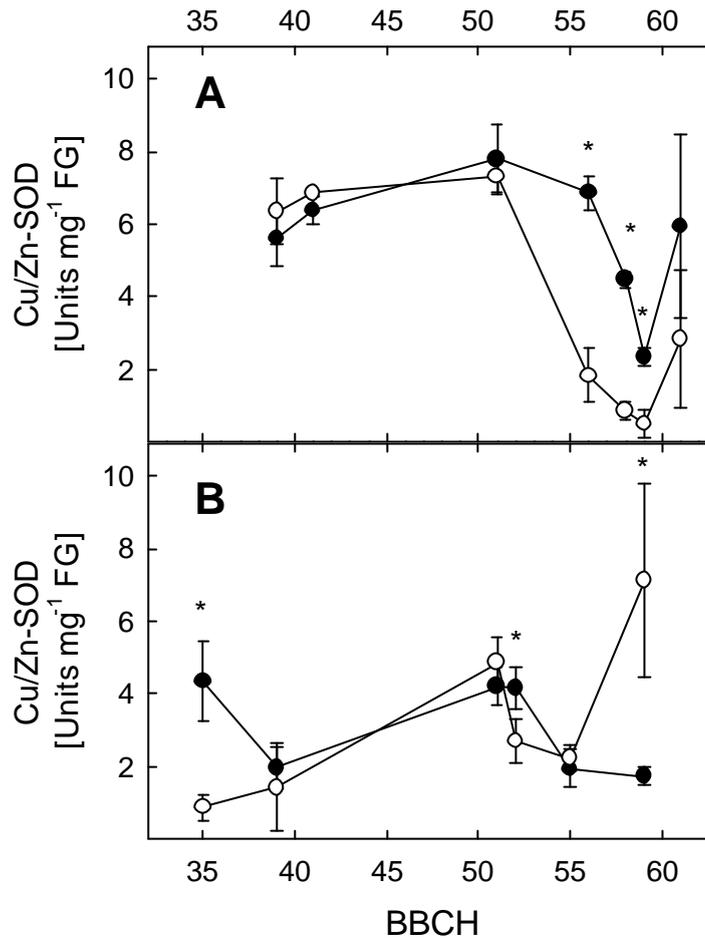


Abb. 3.31: Cu/Zn-SOD-Enzymaktivität im F-1 Blattes zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 (**A**) und zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55, und 59 im Jahr 2002 (**B**) in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv.* Ricarda (—○—). Im Jahr 2001 wurde zu BBCH 39, 41 und 51 kein Unterschied zwischen den Kultivaren beobachtet. Ab BBCH 56 zeigten sich signifikant erhöhte Enzymaktivitäten bei IPZ 24727. Im Jahr 2002 wurden zu BBCH 35 eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität in IPZ 24727 und zu BBCH 59 in *cv.* Ricarda festgestellt ($n = 3, \pm \sigma$).

Im Jahr 2002 (Abb. 3.31, **B**) wurden zu BBCH 35 signifikant höhere Enzymaktivität bei IPZ 24727 festgestellt. Danach kam es in beiden Kultivaren zu einem leichten Anstieg der Aktivität von ca. 2.0 units mg^{-1} FG auf 4.5 – 5.0 units mg^{-1} FG. Ab BBCH 51 konnte man, entsprechend dem Vorjahr, eine Abnahme der SOD-Aktivität verzeichnen. Zum letzten Beprobungstermin zeigte *cv.* Ricarda eine signifikant höhere Aktivität als IPZ 24727, entgegen den Vorjahreswerten. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Klima und Untersuchungsergebnissen festgestellt werden.

3.4.2.5 Verlauf der Genexpression stressrelevanter ESTs

Im Rahmen der Studien zur Entwicklungsabhängigkeit der NBV wurde der Verlauf der Genexpression stressrelevanter „expressed sequence tags“ (ESTs) untersucht. Hierzu wurden nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus den Blättern der Kultivare IPZ 24727 und *cv.* Ricarda cDNA-Arrays aus 41 ausgewählten ESTs verschiedener Stoffwechselwege zusammengestellt (s. 2.9.3.1, Tab. 2.12 bzw. 6.4, Abb. 6.4/6.5). Um einen ersten Überblick über die Unterschiede zwischen den Sorten zu bekommen bzw. um zu sehen, ob es überhaupt Unterschiede in der Expression zwischen den Sorten gibt, wurden die relativen Expressionen der Kultivare für die einzelnen Tage verglichen (Abb. 3.32).

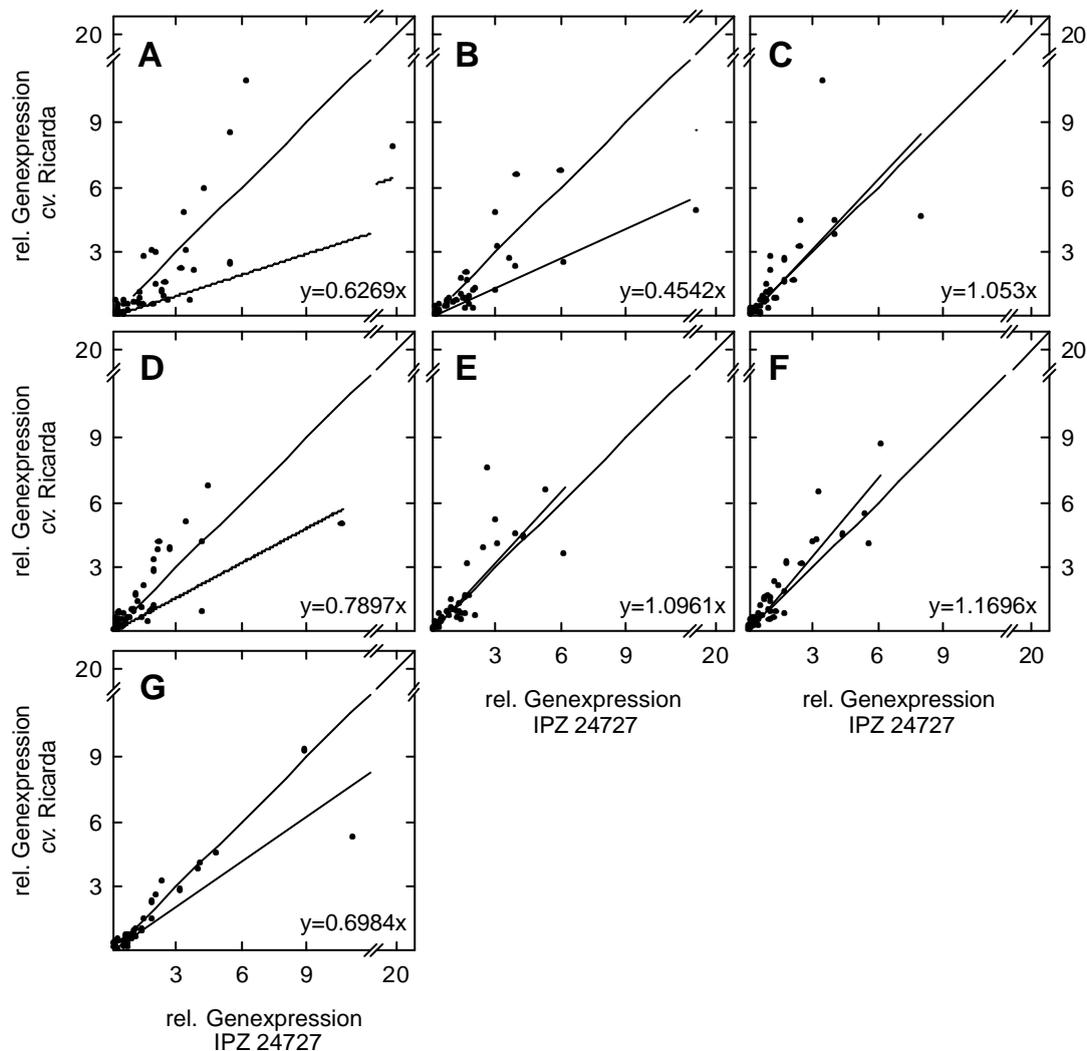


Abb. 3.32: Vergleich der relativen Genexpressionen im F-1 Blattes zu BBCH 39 (A), 41 (B), 51 (C), 56 (D), 58 (E), 59 (F) und 61 (G) im Jahr 2001 in den Sorten IPZ 24727 und *cv.* Ricarda. Es wurden die relativen Expressionen aller 41 ESTs der beiden Kultivare gegeneinander aufgetragen. Zusätzlich wurden die Regressionsgeraden mit Gleichung eingezeichnet.

In Abb. 3.32 sind für das Jahr 2001 die rel. Expressionen aller ESTs der beiden Sorten gegenübergestellt. Ist die Steigung der Regressionsgeraden gleich „eins“, so entsprachen sich die Expressionen der beiden Sorten, bei $y < 1$ waren die ESTs bei IPZ 24727 stärker exprimiert, bei $y > 1$ wies *cv. Ricarda* eine höhere Expression auf.

An den ersten beiden Beprobungsterminen (Abb. 3.32, **A**, **B**) wurden insgesamt höhere Expressionen bei IPZ 24727 gemessen, im weiteren Verlauf (Abb. 3.32, **C-G**) zeigten sich eher höhere Expressionen bei *cv. Ricarda*. Es konnte keine Tendenz festgestellt werden, dass eine Sorte generell höhere Expressionen aufwies. Auch konnte man keine Entwicklungsabhängigkeit entdecken, wenn man die Ergebnisse des Jahres 2001 mit den Werten von 2002 vergleicht. Im Jahr 2002 (Abb. 3.33) war die Verteilung der Expressionen weniger gestreut wie im Vorjahr, es zeigten sich durchweg höhere Expressionen bei IPZ 24727. In beiden Jahren war die Streuung zwischen den Entwicklungsstadien BBCH 39 bzw. 35 und BBCH 51 am größten.

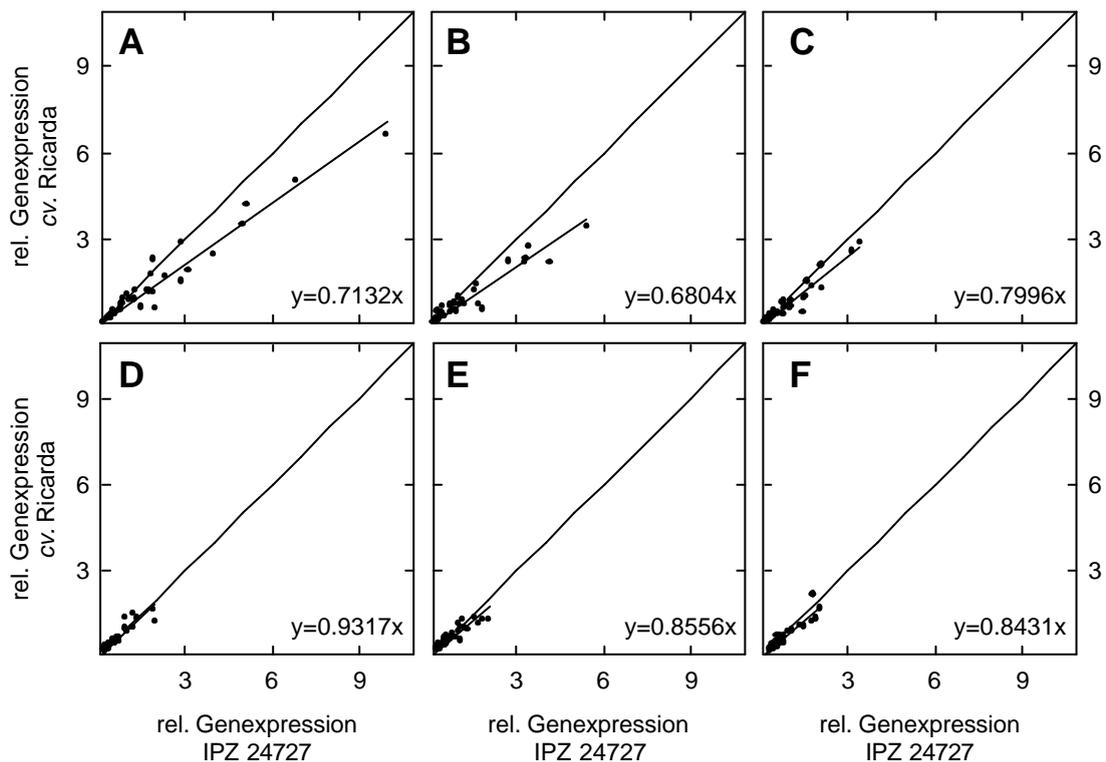


Abb. 3.33: Vergleich der Genexpressionen im F-1 Blattes zu BBCH 35 (**A**), 39 (**B**), 51 (**C**), 52 (**D**), 55 (**E**), und 59 (**F**) im Jahr 2002 in den Sorten IPZ 24727 und *cv. Ricarda*. Es wurden die relativen Expressionen aller 41 ESTs der beiden Kultivare gegeneinander aufgetragen. Zusätzlich wurden die Regressionsgeraden mit Gleichung eingezeichnet.

Um zu überprüfen, ob es über den Beprobungszeitraum Entwicklungsverläufe in der Expression der ESTs gibt, wurden für die beiden untersuchten Jahre sogenannte self organising maps (SOMs) erstellt (Software Gene Cluster 1.0 (Whitehead Institute, Center of Genome Research). Anhand dieser SOMs konnten typische Verläufe der Expressionen ermittelt und den ESTs zugeordnet werden. Für das Jahr 2001 ergaben sich folgende Tendenzen:

47 ESTs zeigten einen Verlauf in ihrer Expression nach Kurve c0, 23 ESTs wie c1 und 14 folgten einem Verlauf wie c2. Dabei unterschieden sich die Kurven weniger in ihrer Steigung als in ihrer Intensität (Abb. 3.34).

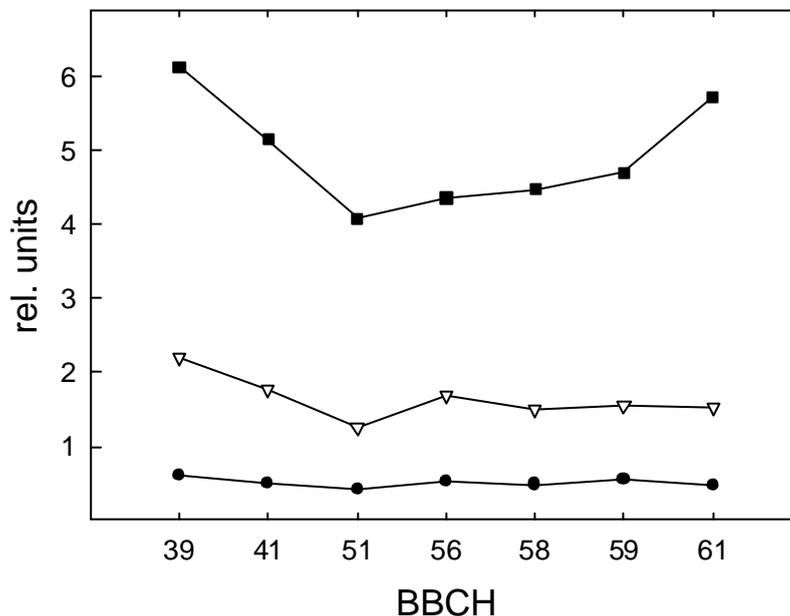


Abb. 3.34: Verlauf der Genexpressionen im F-1 Blattes zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 in den Sorten IPZ 24727 und cv. Ricarda. Für die beiden Kultivare ergaben sich die drei verschiedenen Grundverlaufstypen c0 (—●—), c1 (—▽—) und c2 (—■—), n = 84.

Im Vergleich zum Jahr 2001 ergaben sich zwei unterschiedliche Verläufe der Expressionen. Während c0 und c1 eher gleichbleibende Intensitäten aufwiesen, zeigte c2 einen deutlichen Verlauf mit dem Entwicklungsstadium. Im Jahr 2002 unterschieden sich die Kurven nicht in ihrem Verhalten, aber in Ihrer Intensität. In Abb. 3.35 sind die Tendenzen der Expressionen im Jahr 2002 wiedergegeben. Hier folgten 12 ESTs einem Verlauf Typ c0, 25 ESTs wiesen einen Verlauf wie Kurve c1 auf und 45 verhielten sich wie c2. Es zeigten sich somit bei den meisten ESTs altersabhängige Abnahmen der Genexpressionen.

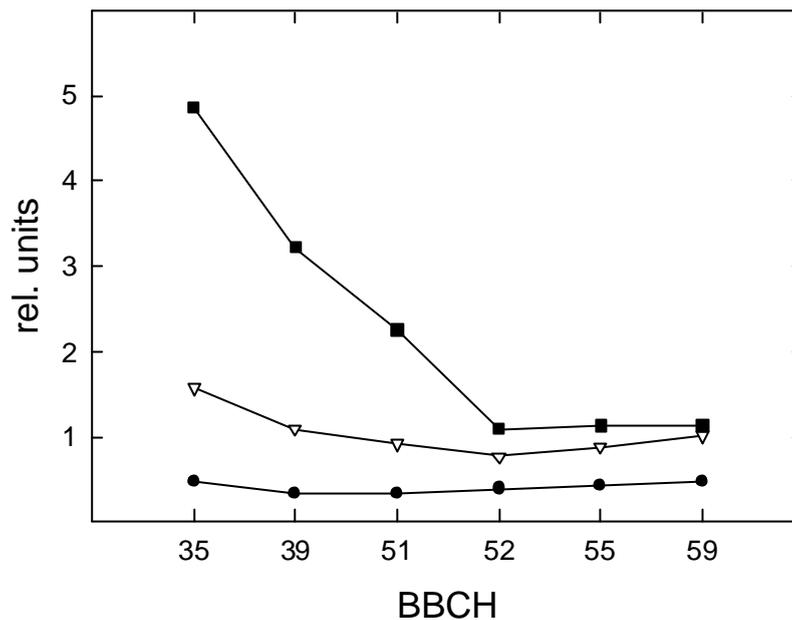
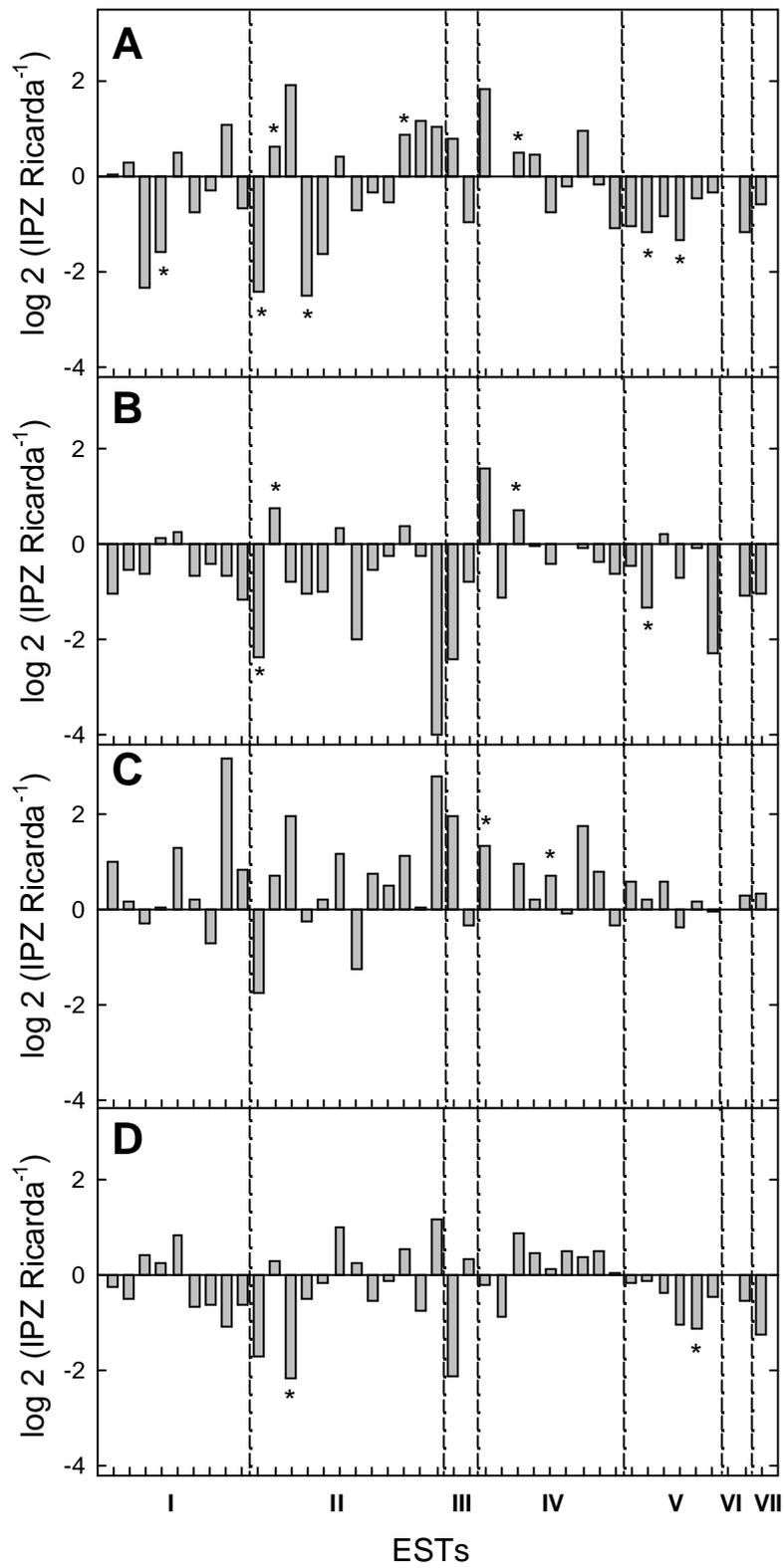


Abb. 3.35: Verlauf der Genexpressionen im F-1 Blattes zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55 und 59 im Jahr 2002 in den Sorten IPZ 24727 und *cv.* Ricarda. Für die beiden Kultivare ergaben sich die drei verschiedenen Grundverlaufstypen c0 (—●—), c1 (—▽—) und c2 (—■—), $n = 82$.

Will man sich nun die Induktion einzelner ESTs betrachten, in diesen Experimenten speziell die Unterschiede zwischen den beiden Kultivaren, so ist es bei der Auswertung von DNA-Arrays üblich, von einer Induktion zu sprechen, wenn die untersuchte Sorte im Vergleich zur Kontrolle doppelt so stark expremiert ist. Daher wurden die Expressionen, um einen Eindruck über die Unterschiede im Transkriptionsniveau zwischen den Kultivaren über den Beprobungszeitraum hin zu bekommen, logarithmisch zur Basis 2 dargestellt (Abb. 3.36, 3.37). Signifikanzen ($p = 0.05$) wurden für die einzelnen Beprobungstage mit * (Abb. 3.36, **A-G**, Abb. 3.37, **A-F**) gekennzeichnet. Die ausgewählten ESTs wurden hierzu ihrer Zugehörigkeit zu Stoffwechsel bzw. Synthesewegen nach angeordnet: Bei Gruppe I handelte es sich um Gene des Phenylpropanoid- /Flavonoidstoffwechsels, bei Gruppe II um Gene des Oxidativen Stress-Stoffwechsels, bei Gruppe III um Gene der Ethylenbiosynthese, Gruppe IV beinhaltete Gene der „Pathogenesis related“ PR-Proteine, Gruppe V der Signalübertragung, Gruppe VI der Photosynthese und Gruppe VII schließlich Gene der DNA-Photoreparatur. Betrachtet man sich im Jahr 2001 (Abb. 3.36) die Anzahl der signifikant unterschiedlichen Transkriptionsniveaus, so fällt auf, dass die Unterschiede der Expressionen zwischen den Kultivaren gegen BBCH 61 (Ende Ährenschieben, Wechsel von der vegetativen zur generativen Phase) weniger werden.



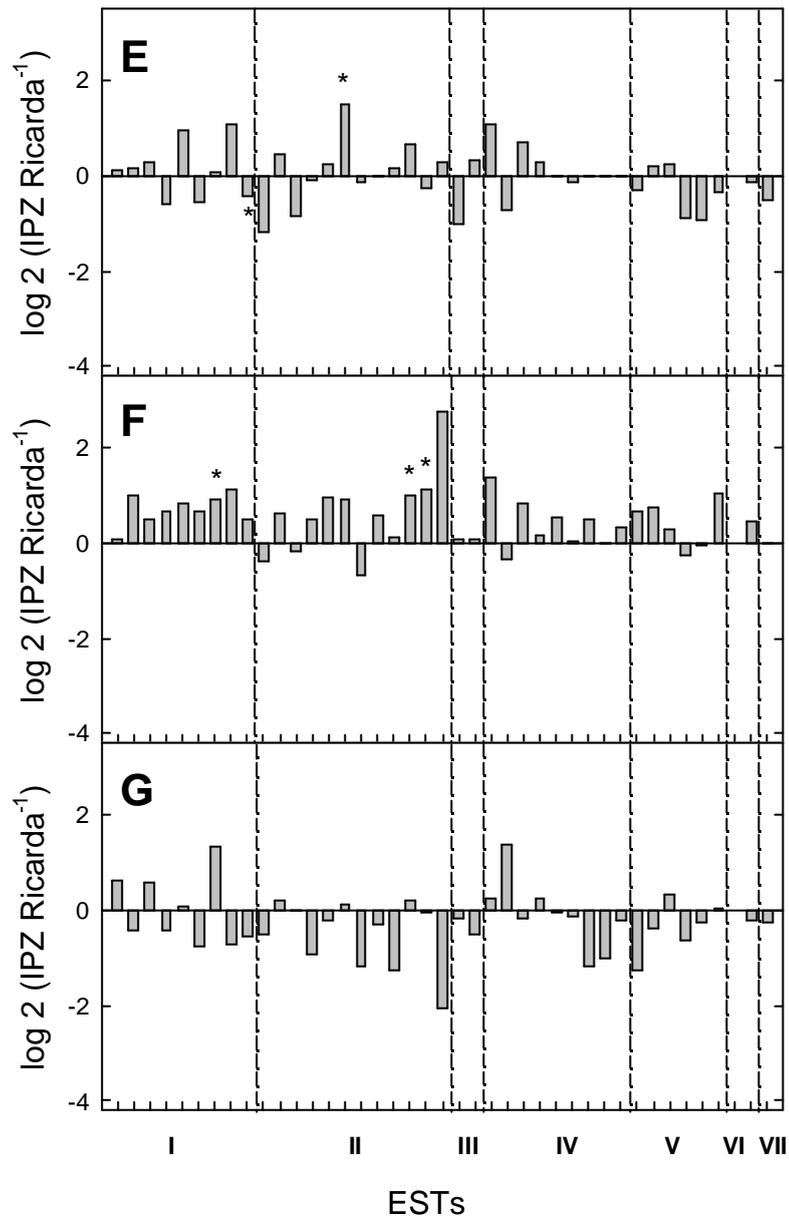
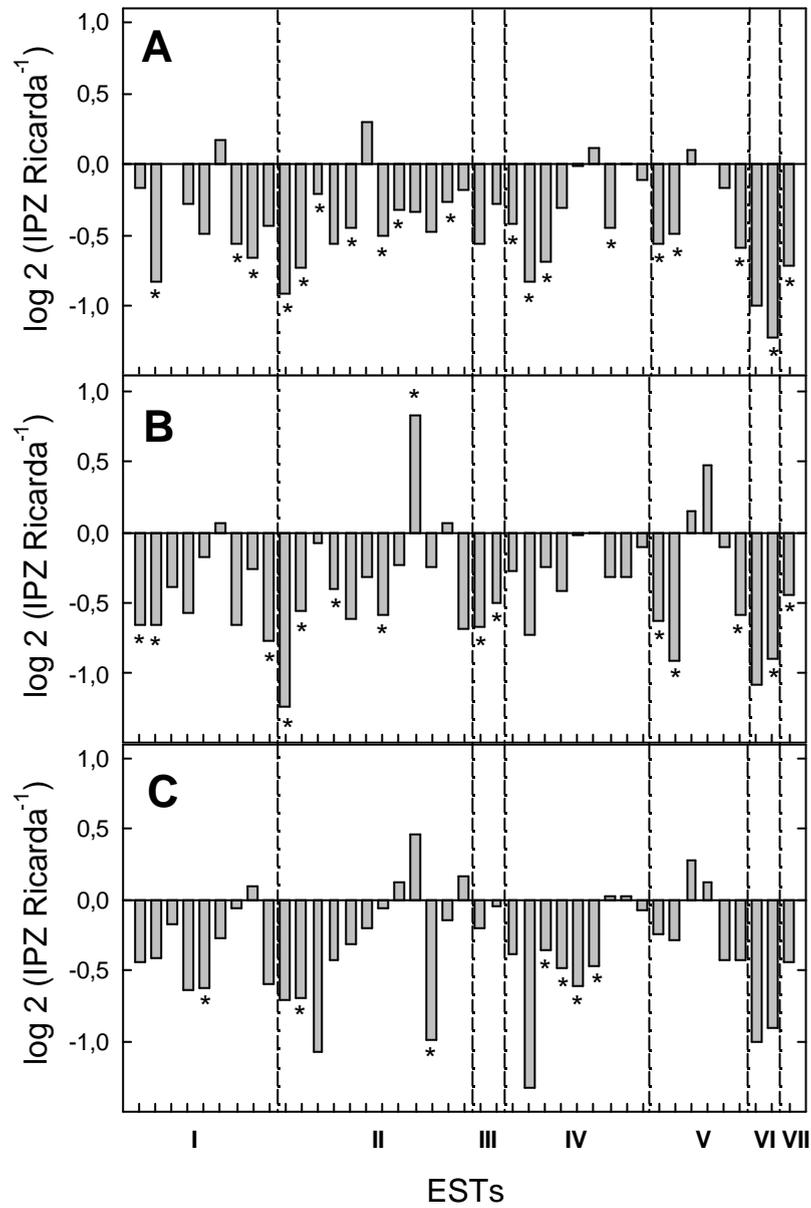


Abb. 3.36: Veränderungen der Transkriptionsniveaus der beiden Kultivare IPZ 24727 und *cv.* Ricarda logarithmisch dargestellt zur Basis 2. Die Genexpressionen wurden im F-1 Blatt zu BBCH 39 (A), 41 (B), 51 (C), 56 (D), 58 (E), 59 (F) und 61 (G) im Jahr 2001 gemessen. Die Gruppen I-VII beinhalten Gene folgender Stoffwechsel- bzw. Synthesewege: **I:** Phenylpropanoid- /Flavonoidstoffwechsel, **II:** Oxidativer Stress, **III:** Ethylenbiosynthese, **IV:** „Pathogenesis related“ PR-Proteine, **V:** Signalübertragung, **VI:** Photosynthese, **VII:** DNA-Photoreparatur.

Im Jahr 2002 (Abb. 3.37) konnte man für die ersten drei Beprobungen (A-C) einen ähnlichen Verlauf wie im Jahr 2001 beobachten, zu BBCH 52 (D) konnten keine Signifikanzen

festgestellt werden und zu BBCH 59 hin nahmen die Unterschiede wieder zu. Das Transkriptionsniveau lag im Jahr 2002 insgesamt wesentlich niedriger als im Vorjahr.



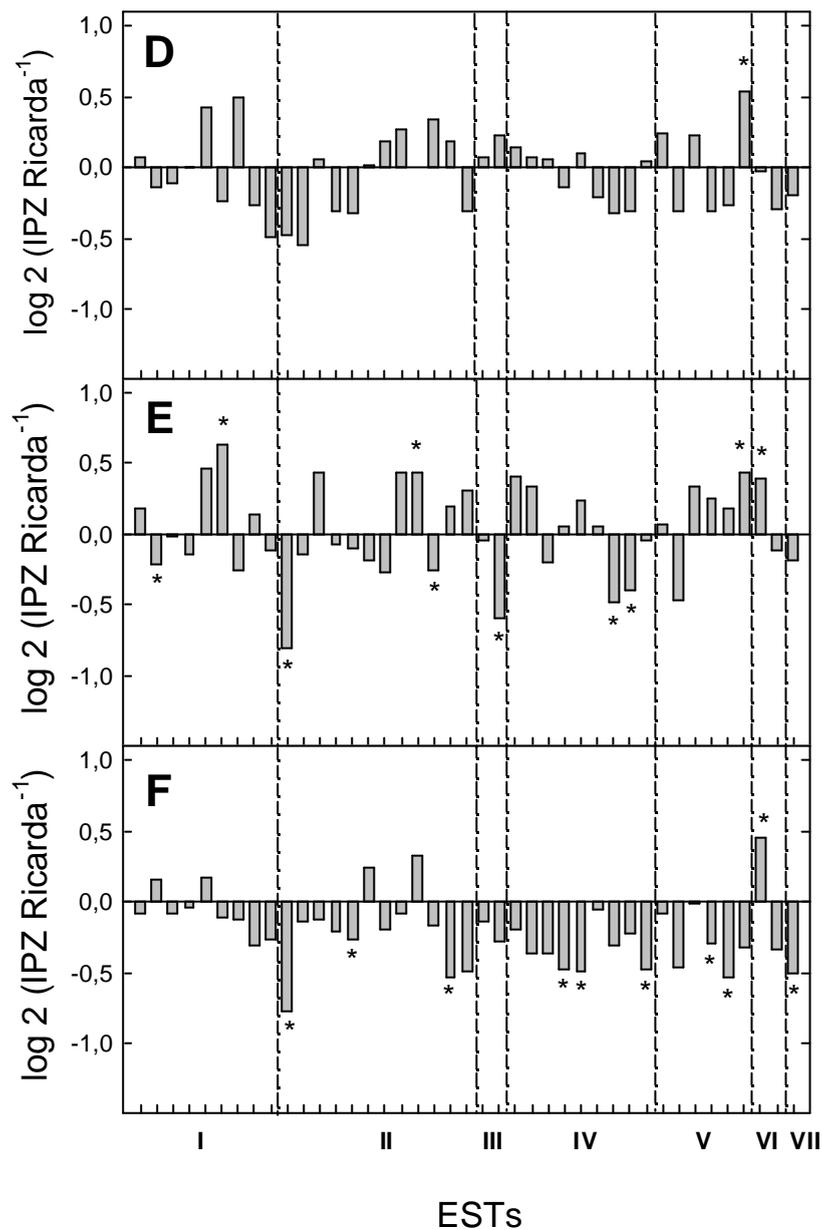


Abb. 3.37: Veränderungen der Transkriptionsniveaus der beiden Kultivare IPZ 24727 und *cv.* Ricarda logarithmisch dargestellt zur Basis 2. Die Genexpressionen wurden im F-1 Blatt zu BBCH 35 (A), 39 (B), 51 (C), 52 (D), 55 (E), und 59 (F) im Jahr 2002 gemessen. Die Gruppen I-VII beinhalten Gene folgender Stoffwechsel- bzw. Synthesewege: **I:** Phenylpropanoid- /Flavonoidstoffwechsel, **II:** Oxidativer Stress, **III:** Ethylenbiosynthese, **IV:** „Pathogenesis related“ PR-Proteine, **V:** Signalübertragung, **VI:** Photosynthese, **VII:** DNA-Photoreparatur.

Für das Jahr 2001 konnte ein signifikanter Unterschied mit einem Betrag von 2 bei folgenden ESTs für IPZ 24727 gefunden werden:

BBCH 39	Cu/Zn-SOD, Dihydroascorbat-Reduktase
BBCH 41	Cu/Zn-SOD
BBCH 51	-
BBCH 56	Monodehydroascorbat Reduktase
BBCH 58	-
BBCH 59	-
BBCH 61	-

cv. Ricarda zeigte keine Unterschiede mit einem Betrag von 2 bei gleichzeitiger Signifikanz. Für das Jahr 2002 konnten keine Veränderungen in der Expression zwischen den Sorten mit einem Betrag über 2 festgestellt werden. Signifikante Unterschiede wurden zahlreich ermittelt, die für die vorliegende Arbeit Bedeutensten sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.4.2.5.1 Expressionsmuster von ESTs aus dem antioxidativen Stoffwechsel

Von den 42 ausgewählten ESTs wurden repräsentative ESTs verschiedener Stoffwechselwege genauer ausgewertet (Abb. 3.38 – 3.45). Es wurden die ESTs, von denen signifikante Unterschiede ermittelt wurden, in ihrem physiologischen Umfeld betrachtet. Aus dem antioxidativen Stoffwechsel wurden die ESTs der **Cu/Zn-SOD**, Ascorbatperoxidase (**AP**), Monodehydroascorbat Reduktase (**MDAR**), die Dehydroascorbat Reduktase (**DHAR**) und die Glutathion Reduktase (**GR**) der beiden Kultivare einander gegenübergestellt. Im Jahr 2001 ließ sich für die ESTs der Cu/Zn-SOD ein altersabhängiger Trend feststellen (Abb. 3.38), wobei eine signifikant höhere Expression bei IPZ 24727 ermittelt wurde. Die Dehydroascorbat Reduktase zeigte bei BBCH 39 in IPZ 24727 ebenfalls eine höhere Expression als in *cv.* Ricarda, während bei Glutathion Reduktase und Monodehydroascorbat Reduktase keine Unterschiede der Transkriptionsniveaus beobachtet wurden. Bei der Ascorbat Peroxidase wurde eine signifikant höhere Expression bei *cv.* Ricarda gefunden.

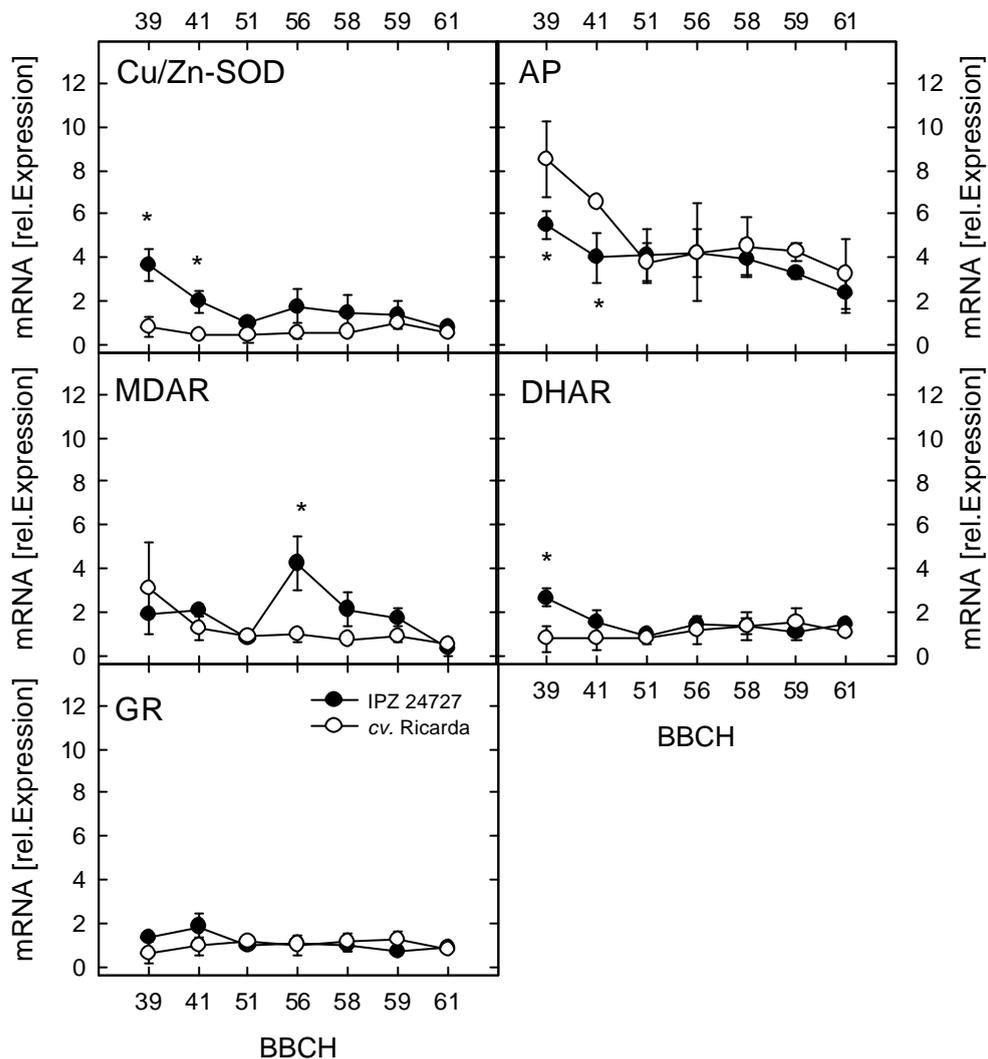


Abb. 3.38: Vergleich der relativen Genexpressionen der ausgewählten ESTs aus dem antioxidativen Stoffwechsel im F-1 Blatt zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Cu/Zn-Superoxiddismutase (**Cu/Zn-SOD**) wurden die Ascorbat Peroxidase (**AP**), die Monodehydrascorbat Reduktase (**MDAR**), die Dehydroascorbat Reduktase (**DHAR**) und die Glutathion Reduktase (**GR**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

Weitere ESTs, die im antioxidativen System eine bedeutende Rolle spielen, sind die Glutathion Transferase (**GST**), die **NADPH Oxidase**, die Katalase (**CAT**) und Peroxidase (**POD**). Bei den ESTs der Glutathion Transferase konnte im Jahr 2001 (Abb. 3.38) in beiden Kultivaren ein entwicklungsabhängiger Anstieg der Expression beobachtet werden, wobei es bei BBCH 58 und 59, gegen Ende des Ährenschiebens, zu signifikant höheren Werten bei *cv. Ricarda* im Vergleich zu IPZ 24727 kam.

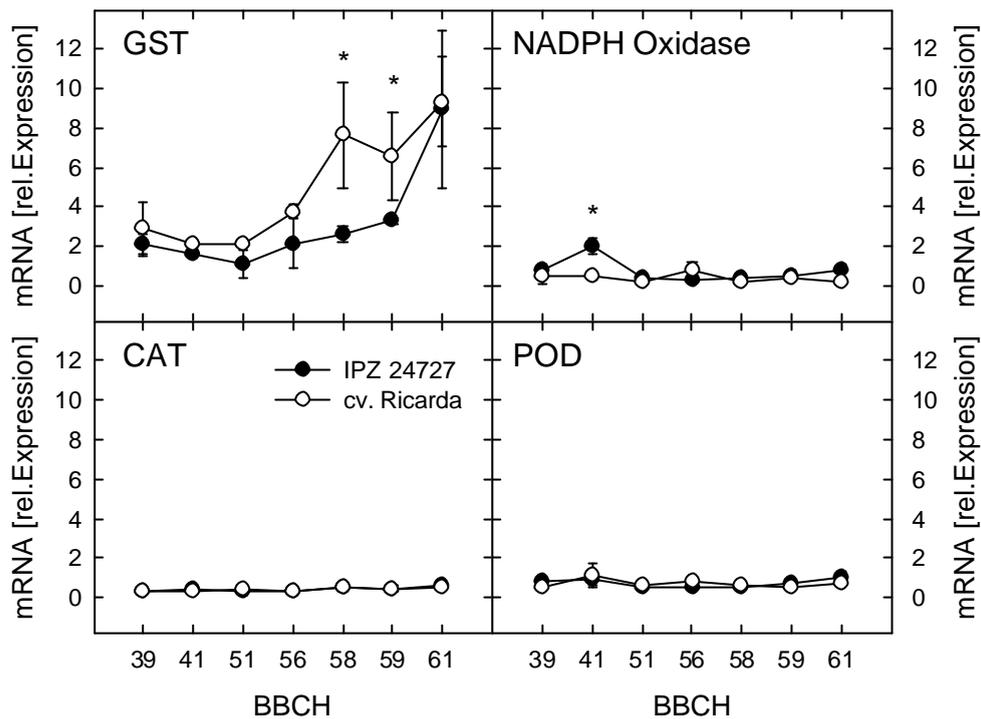


Abb. 3.39: Vergleich der relativen Genexpressionen der ausgewählten ESTs aus dem antioxidativen Stoffwechsel im F-1 Blatt zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Glutathion S-Transferase (**GST**) wurden die NADPH Oxidase, die Katalase (**CAT**) und die Peroxidase (**POD**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

Die ESTs der NADPH Oxidase, Katalase und Peroxidase zeigten weder Unterschiede zwischen den Sorten noch einen entwicklungsabhängigen Trend.

Im Jahr 2002 (Abb. 3.40) wurden bei den ESTs der Cu/Zn-SOD und der AP der gleiche altersabhängige Abfall der Genexpression wie im Jahr zuvor beobachtet. Signifikant höhere Transkriptionsniveaus wurden bei der Cu/Zn-SOD wieder in der IPZ 24727 zu BBCH 35 und 39 festgestellt, bei der Ascorbat Peroxidase lagen die Werte von *cv. Ricarda* allerdings entgegen dem Vorjahr 2001 signifikant unter denen von IPZ 24727. Beide Kultivare pendelten sich bei BBCH 52 (kurz nach Beginn Ährenschieben) ähnlich dem Vorjahr um einen gleichen Wert ein. Bei den ESTs von MDAR, DHAR und GR gab es keine Auffälligkeiten, die Expressionen waren vergleichbar mit dem Jahr 2001.

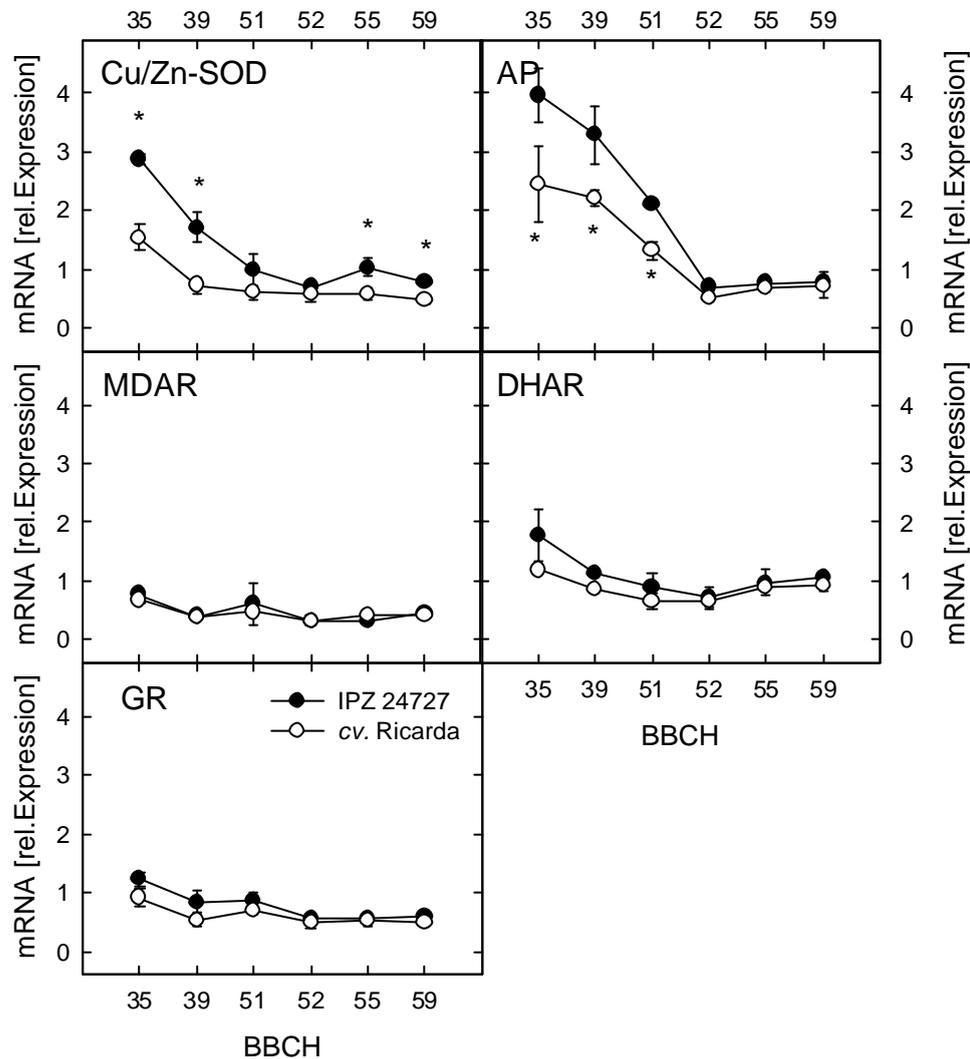


Abb. 3.40: Vergleich der relativen Genexpressionen der ausgewählten ESTs aus dem antioxidativen Stoffwechsel im F-1 Blatt zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55 und 59 im Jahr 2002 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Cu/Zn-Superoxiddismutase (**Cu/Zn-SOD**) wurden die Ascorbat Peroxidase (**AP**), die Monodehydrascorbat Reduktase (**MDAR**), die Dehydroascorbat Reduktase (**DHAR**) und die Glutathion Reduktase (**GR**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

Ebenfalls keine Auffälligkeiten zeigten die Expressionen des GST-ESTs. Es wies wie im Jahr 2001 einen Trend zu einer altersabhängigen Zunahme auf, aber nicht so ausgeprägt wie im Jahr zuvor. NADPH Oxidase, CAT und POD verliefen unauffällig ohne Unterschied zwischen den Sorten und zeigten keinen veränderlichen Verlauf über die verschiedenen Entwicklungsstadien hinweg.

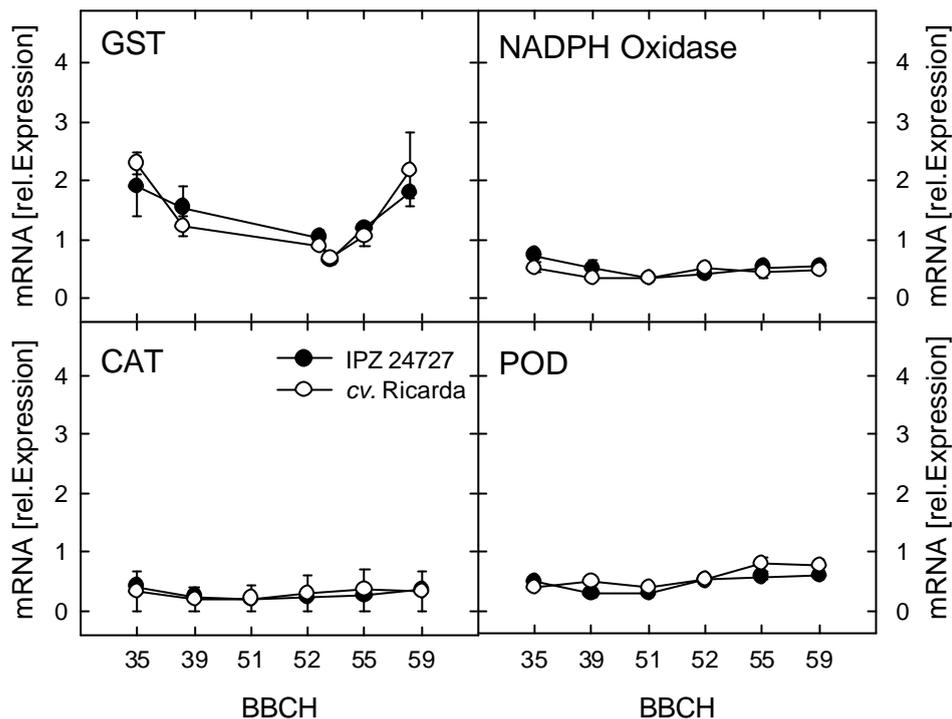


Abb. 3.41: Vergleich der relativen Genexpressionen der ausgewählten ESTs aus dem antioxidativen Stoffwechsel im F-1 Blatt zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55 und 59 im Jahr 2002 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Glutathion S-Transferase (**GST**) wurden die NADPH Oxidase, die Katalase (**CAT**) und die Peroxidase (**POD**) betrachtet. Es konnten keine signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten festgestellt werden ($n = 3, \pm \sigma$).

3.4.2.5.2 Expressionsmuster von ESTs aus dem Phenylpropan- und Flavonoid-Stoffwechsel

Für die Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe sind verschiedene Enzyme von großer Bedeutung, so z. B. die Phenylalanin Ammonium Lyase (**PAL**). Um zu untersuchen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von NBV und der Expression für die Biosynthese interessanter ESTs des Phenylpropan- und Flavonoidstoffwechsels besteht, wurden die ESTs der Phenylalanin Ammonium Lyase (**PAL**), 4-Cumarat CoA-Ligase (**4-CCoL**), Flavanon 3 β - Hydroxylase (**FbH**) und die Dihydroflavonol 4-Reduktase (**DHFR**) näher betrachtet. Die PAL ist das Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Zimtsäure über den **Shikimat**-Weg, während 4-Cumarat CoA-Ligase, Flavanon 3 β -Hydroxylase und Dihydroflavonol 4-Reduktase eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Flavan-Derivaten und der Bildung von Anthocyanidinen spielen.

Im Jahr 2001 (Abb. 3.42) ließ sich weder ein sortenspezifischer Unterschied in den Expressionen der untersuchten ESTs feststellen, noch war ein entwicklungsabhängiger Trend zu beobachten. Lediglich bei der **DHFR** fiel ein Wert bei IPZ 24727 aus dem Rahmen, hier muss von einem Artefakt ausgegangen werden.

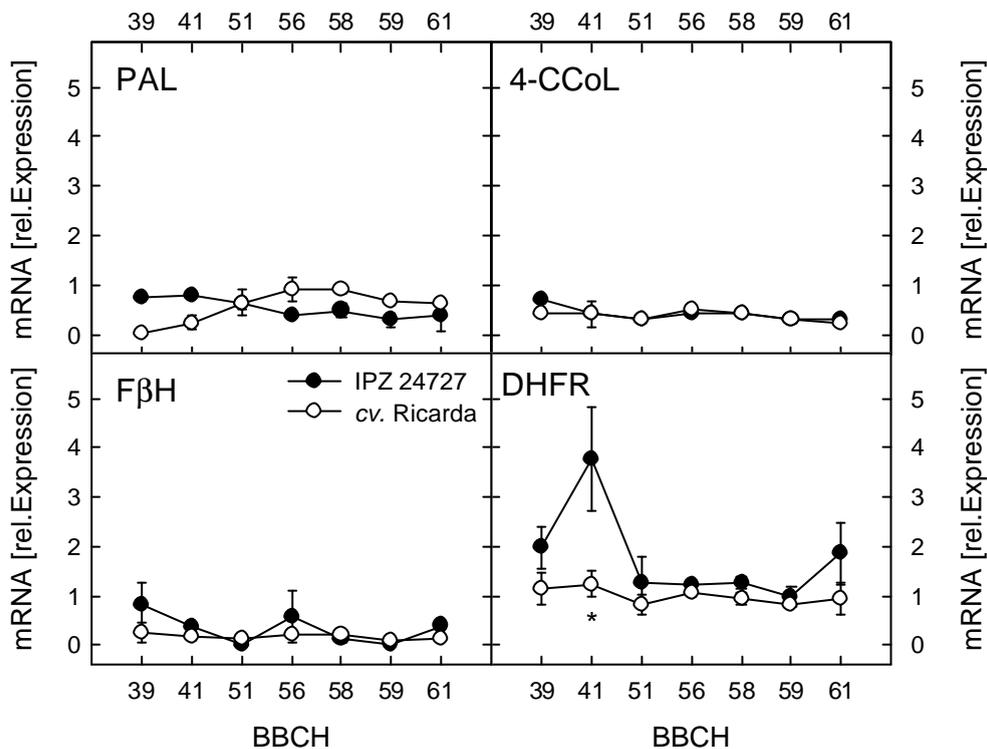


Abb. 3.42: Vergleich der relativen Genexpressionen der ausgewählten ESTs aus dem Phenylpropan-/Flavonoidstoffwechsel im F-1 Blatt zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Phenylalanin Ammonium Lyase (**PAL**) wurden die 4-Cumarat CoA-Ligase (**4-CCoL**), die Flavanon 3-beta-Hydroxylase (**FβH**) und die Dihydroflavonol 4-Reduktase (**DHFR**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

Im zweiten Versuchsjahr (Abb. 3.43) konnte ein leichter altersabhängiger Trend bei **DHFR** festgestellt werden, beide Kultivare wiesen mit zunehmendem Alter geringere Expressionen auf.

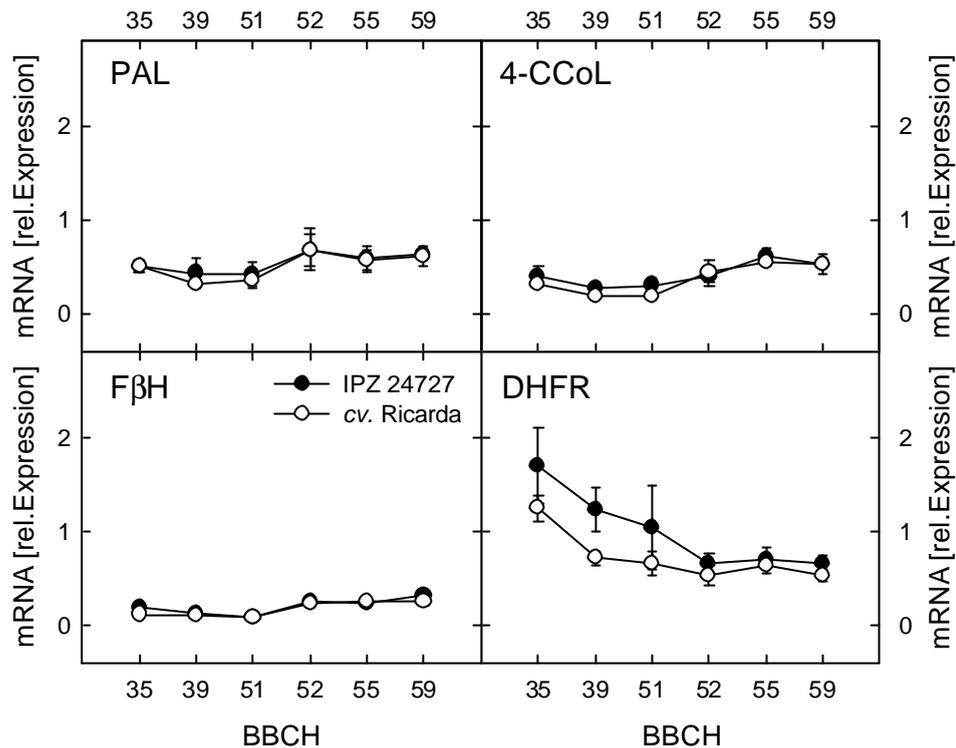


Abb. 3.43: Vergleich der relativen Genexpressionen der ausgewählten ESTs aus dem Phenylpropan-/Flavonoidstoffwechsel im F-1 Blatt zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55 und 59 im Jahr 2002 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Phenylalanin Ammonium Lyase (**PAL**) wurden die 4-Cumarat CoA-Ligase (**4-CCoL**), die Flavanon 3beta-Hydroxylase (**FbH**) und die Dihydroflavonol 4-Reduktase (**DHFR**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

3.4.2.5.3 Expressionsmuster von pathogen-relevanten ESTs

Um letztendlich die histologischen Untersuchungen zur Herkunft der NBV zu unterstützen, bzw. um auch auf der molekularbiologischen Ebene eine Bestätigung zu bekommen, dass es sich bei der NBV um eine nicht parasitär bedingte Erkrankung der Pflanzen handelt, wurden ESTs pathogen-relevanter Gene betrachtet. Für die genauere Betrachtung wurden die putative beta-Glucanase (**b-GI**), die Chitinase, die *s*-Adenosylmethionin Synthase (**SAM-S**) und das Hydroxyprolin reiche Glykoprotein (**HRGP**) als repräsentative Gene gegenübergestellt. Von der Glucanase und der Chitinase weiß man, dass sie als Stressproteine nach Einwirkung von z. B. Salicylsäure auf die Pflanze von dieser synthetisiert und akkumuliert werden und eine fungizide Wirkung zeigen. Salicylsäure wirkt dabei als Botenstoff, dessen Konzentration ansteigt, sobald eine Infektion vorliegt. S-Adenosylmethionin Synthase ist ein wichtiges

Enzym in der Biosynthese von Ethylen, welches als Phytohormon verschiedene Wachstumsprozesse wie die Seneszenz der Blätter, Fruchtreifung, Samenkeimung reguliert. Weiterhin kann Ethylen als Stressantwort wirken. Diese Eigenschaft wird in der Pathogenabwehr, bei Verwundung oder abiotischem Stress genutzt, indem die Pflanze durch Abwurf infizierter Blätter, verfrühte Seneszenz oder Induktion spezifischer Abwehrengene reagiert.

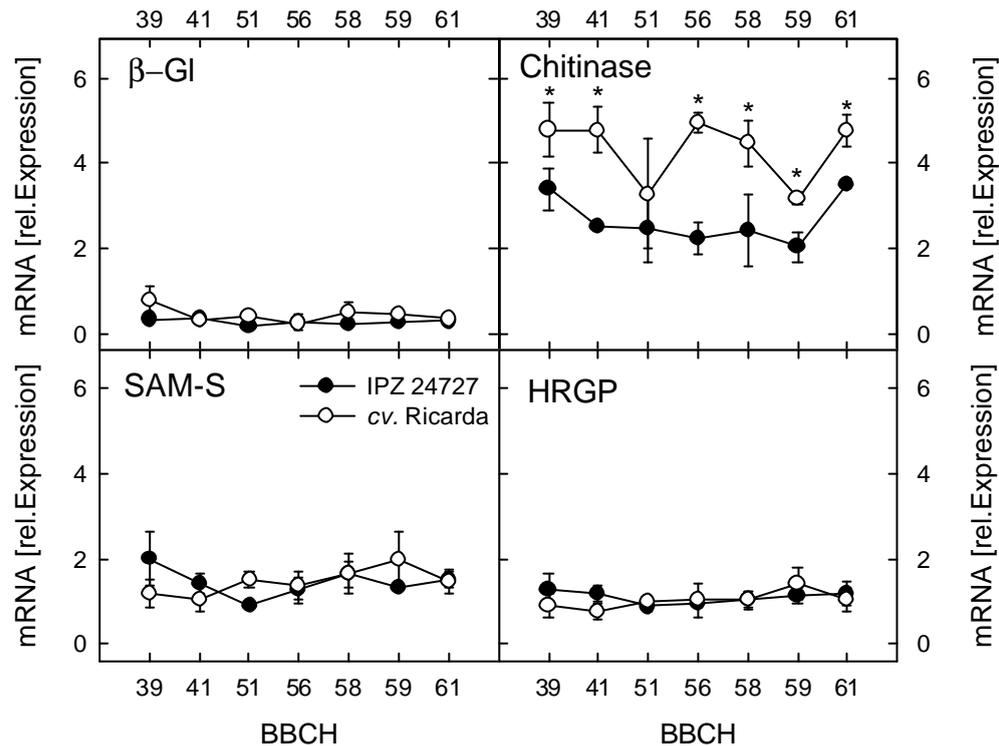


Abb. 3.44: Vergleich der relativen Genexpressionen ausgewählter ESTs der pathogen relevanten Enzyme aus dem im F1 Blatt zu BBCH 39, 41, 51, 56, 58, 59 und 61 im Jahr 2001 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und *cv. Ricarda* (—○—). Neben der Putativen beta-Glukanase (**β-Gl**) wurden die Chitinase, die *s*-Adenosylmethionin Synthase (**SAM-S**) und das Hydroxyprolin reiche Glykoprotein (**HRGP**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

Bei der Auswertung konnte kein Zusammenhang zwischen Schadgeschehen und erhöhten Expressionen der pathogen relevanten ESTs gefunden. Im Jahr 2001 (Abb. 3.44) zeigte sich lediglich bei der Chitinase ein sortenspezifischer Unterschied, der aber im Folgejahr nicht mehr festgestellt werden konnte. Eine entwicklungsabhängige Zu- oder Abnahme der Expression konnte 2001 bei keinem EST beobachtet werden.

Im Jahr 2002 (Abb. 3.45) verhielten sich die Expression der betrachteten ESTs ebenfalls unauffällig, bei dem EST der Chitinase konnte kein Unterschied zwischen den Sorten mehr

festgestellt werden, aber das Transkriptionsniveau nahm mit zunehmendem Alter von ca. 3 auf 0.5 relative Einheiten ab.

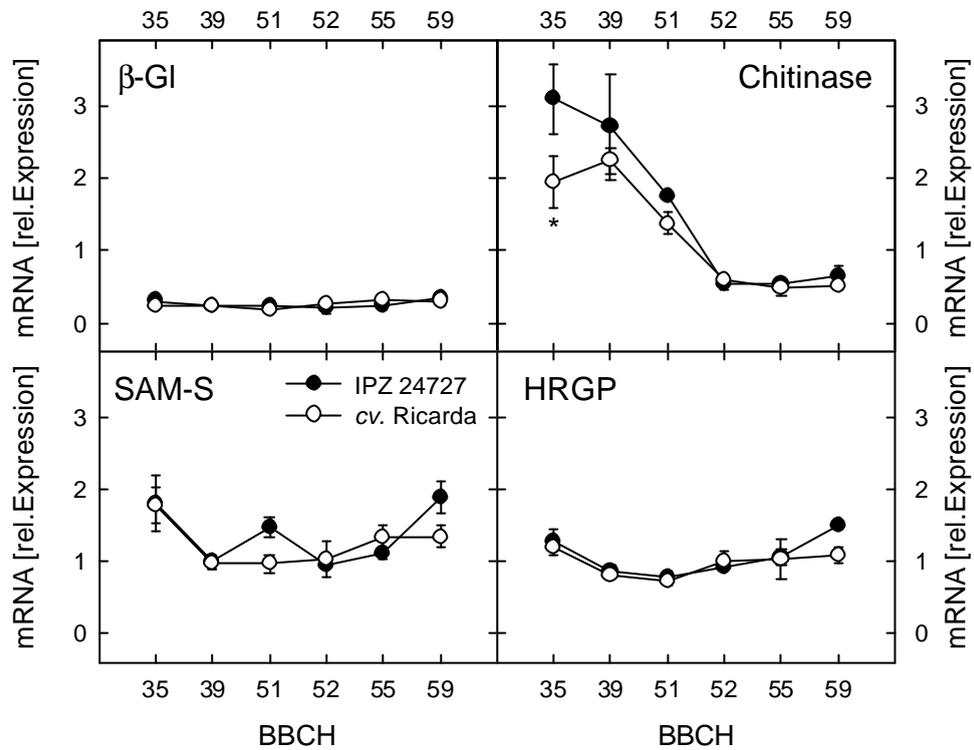


Abb. 3.45: Vergleich der relativen Genexpressionen ausgewählter ESTs pathogen relevanter Enzyme im F1 Blatt zu BBCH 35, 39, 51, 52, 55 und 59 im Jahr 2002 in den Sorten IPZ 24727 (—●—) und cv. Ricarda (—○—). Neben der Putativen beta-Glukanase (**b-Gl**) wurden die Chitinase, die s-Adenosylmethionin Synthase (**SAM-S**) und das Hydroxyprolin reiche Glykoprotein (**HRGP**) betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p = 0.05$) zwischen den rel. Expressionen der Sorten wurden mit einem * gekennzeichnet ($n = 3, \pm \sigma$).

4. Diskussion

Bei der Gerste werden verschiedene Blatterkrankungen beobachtet, für die die einzelnen Kultivare mehr oder weniger anfällig sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die physiologischen Ursachen für die Entstehung der nichtparasitären Blattverbräunung (NBV) anhand der Resistenz des Zuchtstammes IPZ 24727 gegenüber NBV im Vergleich zu empfindlichen Sorten wie z. B. *cv. Ricarda* untersucht. Bei IPZ 24727 handelt es sich um einen Zuchtstamm, der von einem israelischen Wildtyp abstammt. Nach ELLIS ET AL., 2000, sind Resistenzen oder zumindest Toleranzen gegenüber abiotischen Stressschäden bei Wildgerstenkultivaren häufiger als bei gezüchteten Sorten zu beobachten. Bei der NBV wird von abiotischen Ursachen ausgegangen, nachdem lange Zeit ein Pathogenbefall durch *Ramularia collo-cygni* als auslösender Faktor diskutiert wurde (SACHS, 2000).

4.1 Nichtparasitäre Blattverbräunung – Abgrenzung zu pathogen bedingten Blatterkrankungen

Die Schäden der NBV sehen denen durch *Ramularia collo-cygni* verursachten sehr ähnlich und sind am besten mikroskopisch gegen diesen Pathogenbefall abzugrenzen. Daher wurden im Verlauf der hier diskutierten Experimente immer wieder Proben gezogen und mit konfokaler Laser scanning Mikroskopie hinsichtlich Pathogenbefall untersucht. Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die ersten Schäden am Blatt beobachtet wurden, keine Erreger von *Ramularia collo-cygni* gefunden werden konnten. Erst wenn sich die Pflanzen schon in einem geschwächten Zustand befanden, waren sie anfällig für diese Parasiten und wurden zusätzlich zu der eigentlichen Blatterkrankung geschädigt. Diese Ergebnisse bestätigten die Untersuchungen von SCHNITZLER, (1998) und WU & v. TIEDEMANN (2001). Die NBV konnte bei den Bonituren klar gegen *mlo*-Blattflecken oder Schäden, hervorgerufen durch *Drechslera teres*, unterschieden werden (s. 3.2, Abb. 3.6). BEHN (2003) fand anhand der Auswertungen der Landessortenversuche der Jahre 1998 - 2002 keinen Zusammenhang zwischen NBV und anderen Blatterkrankungen wie Zwergrost und *Rhynchosporium secalis*. Bei der Aufstellung von Korrelationen zwischen agronomischen Merkmalen und der NBV fand BEHN (2003) einen Zusammenhang zwischen starker NBV-

Symptomausprägung und einer *mlo*-Resistenz. Hierbei handelt es sich um eine Resistenz gegenüber Mehltau, die bei den Kultivaren zu unterschiedlich starken Blattschäden, den sogenannten *mlo*- oder Resistenzflecken, führen kann (s. 3.2, Abb. 3.6, **D**, **F**). Die gegenüber Mehltau überempfindliche Pflanzen reagieren durch ein lokales Absterben der Befallsstellen auf den Erreger *Erysiphe graminis*. Durch die Mehltau-bedingten Nekrosen kommt es zu einer effektiven Hemmung der Vermehrung der Erreger, indem dem Pilz die Lebensgrundlage genommen wird. Allerdings fehlt den Pflanzen die hierfür aufgebrauchte Energie bei der Einkörnung, wodurch es zu geringeren Kornerträgen kommen kann (LfL, 2002).

BEHN (2003) konnte in weiteren Versuchen nicht klären, ob es sich bei dem NBV- und *mlo*-Locus um den gleichen Genort oder um eine Kopplung der beiden Merkmale handelte. Ausgehend von einem gleichen Locus könnte das *mlo*-Gen als Induktor einer Stresskaskade gesehen werden, der unter den unterschiedlichsten Stressbedingungen aktiviert wird. PIFFANELLI ET AL, 2002, räumt dem *mlo*-Gen noch weitere Funktionen ein. So sieht er die Rolle des *mlo*-Allels unter anderem in der Beschleunigung der Seneszenz, wie er den Zelltod im Mesophyll von vollentwickelten Blättern von *mlo*-Pflanzen beschreibt. Diese Tatsache könnte die Entstehung und Ausprägung der NBV zu einem bestimmten Entwicklungsstadium noch verstärken. Zumindest weisen die gefundenen Korrelationen darauf hin.

An der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) wurden regelmäßig mikrobiologische Untersuchungen an geschädigten Blättern durchgeführt, die alle keinen Hinweis auf ein Pathogen als Verursacher der NBV gaben (BEHN, mündl. Mitteilung). Um eine Pathogenbeteiligung weiterhin auszuschließen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit molekularbiologische Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die Genexpressionen pathogeninduzierter ESTs untersucht. Die Experimente wurden an den Proben aus den Freilandversuchen der Jahre 2001 und 2002 durchgeführt. Von den neun ausgewählten ESTs, darunter die putative β -1,3-Glukanase, die Chitinase, die s-Adenosylmethionin Synthase und das Hydroxyprolinreiche Glykoprotein, zeigte keines in den beiden Versuchsjahren eine Induktion, die auf eine pathogene Ursache hätte schließen lassen. Zwar lag im Jahr 2001 die Expression des Chitinase-ESTs bei *cv. Ricarda* signifikant höher als bei IPZ 24727, aber die vermeintliche Induktion war lange vor den ersten NBV-Symptomen zu beobachten. Ein Zusammenhang zwischen Pathogenbefall und NBV-Erkrankung wurde ausgeschlossen. Auch WU, 2001, fand keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Entstehen der NBV und einem Pathogenbefall. Mit der Zusammenführung aller Untersuchungen zum Thema

parasitärer Befall als Auslöser für die NBV kann eine Pathogenbeteiligung als Ursache der Erkrankung ausgeschlossen werden.

4.2 Strahlung als primärer Faktor für die Induktion der NBV

Ein weiterer Faktor, der als Ursache für die Entstehung nichtparasitär bedingter Blattverbräunungen diskutiert wird, ist die Strahlung. Wie auch in der globalen Entwicklung der UV-Strahlung (MADRONICH ET AL., 1998) hat nach TREPTE & WINKLER, 2002, die UV-Bestrahlungsstärke in Bayern in den vergangenen Jahren durch die Reflexion an Wolken und durch die Abnahme der stratosphärischen Ozonschicht stark zugenommen. Daher lag es nahe, eine Ursache der Blattschäden in den veränderten Strahlungsbedingungen, an die sich die Pflanzen anpassen müssen, zu suchen.

Da es bei Experimenten mit UV-Strahlung wichtig ist, die Bedingungen so zu wählen, dass das UV-B/UV-A/PAR Verhältnis auf die Physiologie der Pflanzen abgestimmt ist (CALDWELL & FLINT, 1994) wurde in dem durchgeführten Klimakammerexperiment 1 versucht, einen Sonnen- und einen Schlechtwettertag, nach im Freiland gemessenen Daten, zu simulieren. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der NBV zwischen den beiden Behandlungen festgestellt, sowohl in der resistenten als auch in der empfindlichen Sorte. Die Verteilung der Superoxidanion-Radikale, welche anhand der NBT-Anfärbung ermittelt wurde, zeigte hingegen nur einen tendenziellen Unterschied zwischen den zwei Bestrahlungsvarianten, wobei der Sortenunterschied in beiden Varianten deutlich ausgeprägt war. In den Freilandstudien konnten diese sortenspezifischen Unterschiede in der Superoxidanion-Radikal-Verteilung nicht im gleichen Maße wie in den Klimakammerexperimenten beobachtet werden. Während in den Kammerexperimenten die Ausprägung der NBT-Anfärbung eindeutig auf eine Ungleichverhältnis der Sorten hinwies, konnte dies in den Freilandversuchen nur in einem Jahr belegt werden. Auffällig waren auch die hohen Fehlerraten in den Freilandexperimenten, die zu großen Schwankungen in den Auswertungen führten. Tendenziell lagen die Radikal-Verteilungen aber auch dort im Trend der Empfindlichkeiten der Sorten. Die Selektivität der NBT-Färbung auf Superoxidanion-Radikale, die als Nebenprodukt der Photosynthese entstehen, wurde durch die Anwendung der NBT-Methode an Nachtproben überprüft. Hierfür wurden im Jahr 2002 zu BBCH 51, 52

und 55 (Zeit des Ährenschiebens) zwischen 2:00 und 3:00 Uhr nachts Proben gezogen. Die geernteten Blätter zeigten im Vergleich zu den bei Tag genommenen Blättern nur sehr geringe Radikal-Verteilungen ($< 20\%$ NBT-Anfärbung). Hinsichtlich der Strahlung konnten die Nachtproben als Nullstandard betrachtet werden. Neben der Radikal-Anfärbung wurden auch die Antioxidantien und die Cu/Zn-SOD-Aktivität untersucht. Die Antioxidantien zeigten den gleichen Unterschied der Konzentrationen zwischen den Tag- und Nachtproben wie die Proben der Licht- und Schattenblätter, die im Feldversuch im Jahr 2000 geerntet worden waren. Für die Nachtproben wurden Ascorbatkonzentrationen gefunden, die ca. $1 \mu\text{mol mg}^{-1}$ FG niedriger lagen als die Tagproben, was den Werten entsprach, die bei der Untersuchung der Licht- und Schattenblätter gefunden wurden. Die Glutathionkonzentrationen lagen bei den Tagproben im Mittel bis zu $0.2 \mu\text{mol mg}^{-1}$ FG höher als bei den Nachtproben, was ebenfalls die Ergebnisse aus dem Freilandversuch des Jahres 2000 bestätigte. Im Gegensatz dazu konnte im Klimakammerexperiment 1, in dem ein Sonnen- bzw. Schattentag simuliert worden war, kein Unterschied zwischen den Antioxidantienkonzentrationen der verschiedenen Behandlungsvarianten gefunden werden. Auch die Cu/Zn-SOD-Aktivität zeigte zwischen den Tag- und Nachtproben einen signifikanten Unterschied. Es wurden jeweils höhere Aktivitäten in IPZ 24727 als in *cv. Ricarda* gemessen, was sich auch in den anderen Versuchen für die Entwicklungsstadien zwischen BBCH 45-56 bestätigen ließ. Lediglich das Kammerexperiment 1 ergab abweichende Ergebnisse. Diese festgestellte Konstellation von Radikal-Verteilung und SOD-Aktivität würde für die Entstehung der NBV bedeuten, dass die resistenten Gerstenkultivare zu Beginn des Ährenschiebens, also beim Übergang von der vegetativen in die generative Phase, besser auf die Entgiftung von Superoxidanion-Radikalen eingestellt sind und so eine Schädigung des Zellgewebes, verursacht durch ROS, verhindern können. Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss von Strahlung und Cu/Zn-SOD-Aktivität auf die Ausprägung der NBV gaben die Ergebnisse des ersten Freilandversuches, in dem vom F-1 Blatt Licht- und Schattenblätter (s.o.) geerntet worden waren. Die Cu/Zn-SOD-Aktivität der Lichtblätter lag bei den resistenten Sorten mit bis zu 6 units mg^{-1} FG signifikant über den Aktivitäten der Schattenblättern. Bei den NBV-anfälligen Sorten unterschieden sich die Aktivitäten in den Licht- und Schattenblätter nicht, in *cv. Ricarda* lag die SOD-Aktivität der Lichtblätter sogar unterhalb der Aktivität der Schattenblätter. Die Probennahme der Blätter fand zu BBCH 45 statt, kurz vor Beginn des Ährenschiebens.

Um den Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Blattschäden zu untersuchen, wurden an der LfL Versuche mit UV-B durchlässiger und UV-B undurchlässiger Folie im Freiland durchgeführt. Die Experimente lieferten keinen Hinweis, dass UV-B-Strahlung einen Einfluss auf die Ausprägung der NBV hat (OBST & BAUMER, 1998). Auch KOLB, 2003, fand keinen Zusammenhang zwischen UV-B-Strahlung und NBV. In ihrer Arbeit stellt sie fest, dass die epidermale Abschirmung bei den gegenüber NBV unterschiedlich-sensitiven Gerstensorten nicht signifikant verschieden ist. In der vorliegenden Arbeit ergab sich anhand von Untersuchungen der Expressionen von ESTs aus dem Phenylpropanoid- und Flavonoid-Stoffwechsel wie Phenylalaninammonium Lyase, 4-Cumarat CoA Ligase oder Dihydroflavonol 4-Reduktase kein Hinweis auf eine unzureichende epidermale Abschirmung bei den verschiedenen Kultivaren. Anhand von Chlorophyllfluoreszenzmessungen in Versuchen an der LfL konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (BEHN, 2003).

In früheren Experimenten war aufgefallen (BAUMER ET AL., 2001), dass die Schäden besonders nach langen Schlechtwetterperioden und plötzlichen Wetterwechseln mit abrupten Änderungen der Bestrahlungsstärken, auftraten. Diese Beobachtung deutete auf eine schlechte Anpassungsfähigkeit der empfindlichen Sorte auf wechselnde Umweltbedingungen hin. In den Klimakammerexperimenten wurden diese Feststellungen unterstützt. Die sensiblere Gerstensorte *cv. Ricarda* war nicht so adaptionsfähig gegen höhere Strahlungsstärken wie der Zuchtstamm IPZ 24727. Bei einem Versuch mit unterschiedlichen UV-Filtern, die direkt auf den Blättern angebracht worden waren, konnte beobachtet werden, dass die Blätter der IPZ 24727 bereits nach einer Woche das Muster der Filter angenommen hatten. *Cv. Ricarda* zeigte nach einer Woche am grünen Blatt keine Veränderung. Am mit NBT angefärbten Blatt konnte im Vergleich zu IPZ 24727 nur ein schwaches Abbild des Filters bei *cv. Ricarda* festgestellt werden (Abb. 4.1). IPZ 24727 hatte sich in relativ kurzer Zeit den geänderten Lichtverhältnissen angepasst, das Chlorophyll offensichtlich an den bedeckten Flächen abgebaut und die Photosynthese reduziert. In Abb. 4.1 sind F-1 Blätter beider Kultivare, eine bzw. zwei Wochen nach Anbringung der Filter, dargestellt, die mit NBT angefärbt wurden. An den Blattstellen, an denen das Chlorophyll abgebaut war, fand keine Formazan-Bildung mittels NBT statt, d.h. hier wurden keine Superoxidanion-Radikale generiert. Eine quantitative Auswertung des Versuches hinsichtlich der Filter (+ UV-B / - UV-B / Kontrolle) erfolgte, aufgrund schlecht reproduzierbarer Ergebnisse, nicht.



Abb. 4.1: NBT Anfärbung von F-1 Blättern der Sorten IPZ 24727 und *cv. Ricarda* eine bzw. zwei Wochen nach Anbringung von UV-Filtern auf die Blätter. Deutlich zu sehen ist das Muster der Drahtmaske, auf welcher die Filter befestigt waren

Bei einem anderen hier nicht aufgeführten Versuch mit hohem PAR Anteil (1500 μE) und hohen Temperaturen (30°C) konnte beobachtet werden, dass IPZ 24727 nach zwei Wochen Behandlung hellgrüne Blätter bekam, während *cv. Ricarda* das Aussehen der Blätter nicht veränderte. WATANABE, 1998, beobachtete Ähnliches bei Pflanzen, die mit Trockenstress und hoher Strahlung behandelt wurden. Durch den Abbau an Chlorophyll wurden die Blätter hellgrün, die Photosyntheseleistung wurde vermindert und die Blätter waren offenbar durch eine reduzierte Produktion an Photooxidantien einem geringeren oxidativen Stress ausgesetzt. Aus allen bisher erhaltenen Ergebnissen kann man davon ausgehen, dass die Bestrahlung eine ausschlaggebende Rolle für die Entstehung der NBV hat. Die Anpassungsfähigkeit der Sorten und das Entwicklungsstadium der Pflanzen, in dem der rasche Wechsel von Schwach- zu Starklichtgeschehen erfolgt, dürften eine entscheidende Rolle in der komplexen Ursachenfolge der NBV darstellen.

4.3 Interaktion mit Ozon

Bei den mikroskopischen Arbeiten zur Untersuchung der Pathogenbeteiligung fiel auf, dass die Schäden sich oft von den Spaltöffnungen ausgehend ausbreiteten und von dort aus die Mesophyllzellen zerstörten. Diese Beobachtungen wurden als Hinweis darauf gedeutet, dass neben Strahlung auch Luftschadstoffe eine Rolle als Ursache der NBV spielen. Besonders Ozon ist bekannt dafür, Blattschäden ähnlicher Art hervorzurufen (KANGASJÄRVI ET AL., 1994, LANGEBARTELS ET AL., 2000). Ozon kann durch die Stomata der Blätter in den Interzellularraum eintreten und wird dort in sekundäre ROS abgebaut, wie z. B. Superoxidanion-Radikale, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff (HEATH & TAYLOR, 1997; MUDD, 1997). Um die Auswirkungen von Ozon auf die unterschiedlich sensitiven Kultivare IPZ 24727 und *cv.* Ricarda zu untersuchen, wurden in einem Klimakammerexperiment ein Sommertag mit hohen Ozonwerten von bis zu 110 ppb in der Mittagszeit simuliert. Die Pflanzen wurden zu einem Entwicklungsstadium in die Kammern eingestellt (BBCH 45, Fahnenblatt voll entwickelt, kurz vor Ährenschieben), zu dem erfahrungsgemäß die ersten NBV Schäden auftreten. Während nach einer Woche in der behandelten Variante noch eine niedrigere Radikal-Verteilung als in der Kontrolle festgestellt wurde, konnte nach zwei Wochen Ozonbehandlung sowohl in den F als auch in den F-1 Blättern der behandelten Varianten eine vermehrte Superoxidanion-Radikal-Verteilung durch NBT-Anfärbung beobachtet werden. Dies kann entweder mit dem Entwicklungsstadium der Pflanzen oder mit der Behandlungsdauer in Zusammenhang gebracht werden. Es konnte keine eindeutige Auswirkung der Ozonbehandlung auf das nichtenzymatische antioxidative System wie bei SCHITTENHELM ET AL., 1993, beschrieben, festgestellt werden. Dies kann an den niedrigeren Ozonwerten, 110 ppb maximal gegenüber 600 ppb, und der Behandlungsdauer, zwei gegenüber vier Wochen, liegen. Nach einer Woche Versuchsdauer stiegen die Glutathion-Konzentrationen in den F-1 Blättern der behandelten Pflanzen leicht an, zeigten aber in der zweiten Behandlungswoche keine Unterschiede zwischen den Varianten mehr. Im F Blatt konnte keine Reaktion des Glutathiongehalts auf die Ozonbehandlung beobachtet werden. Die Cu/Zn-SOD- und die Gesamt-SOD-Aktivität zeigten im F-1 Blatt einen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Behandlungsvarianten. So wurden bei den Kontrollpflanzen bis zu 5 units mg^{-1} Prot mehr SOD-Aktivität gemessen als bei den behandelten Varianten. Dies stimmt mit den von WU, 2002 erzielten Ergebnissen überein, der

nach drei Tagen Ozonbehandlung in der behandelten Variante ebenfalls niedrigere SOD-Aktivitäten als in der behandelten gemessen hat. LANGEBARTELS ET AL., 2000 beschreibt in seinem Review, dass zwar die Pflanzen sehr wohl zu hohe ROS-Konzentrationen regulieren können (FOYER ET AL., 1997, KANGASJÄRVI ET AL., 1994). Die Mehrheit der antioxidativen Enzyme reagiere aber nur mit sehr kleinen Amplituden auf oxidativen Stress, wie er von den hier simulierten Ozongeschehen hervorgerufen wird. Nur wenige Isoformen der Enzyme reagieren signifikant auf Ozon-Stress. Diese Reaktionsfähigkeit der Pflanzen gegenüber dem künstlich induzierten Stress beschreiben auch YUN & LAURENCE, 1999. Sie hatten festgestellt, dass Kurzzeitbegasungen mit hohen Ozonkonzentrationen schwerwiegendere Folgen hatten als Langzeitbegasungen mit niedrigen Ozonkonzentrationen. Dies könnte mit ein Grund dafür sein, dass keine Reaktionen auf die Behandlung mit Ozon bei der Gerste festgestellt werden konnte, im Gegensatz zu WU, 2001, der bis zu 250 ppb (7h/d) Ozon als Behandlungsdosis angewandt hat und damit Schäden im F-5 Blatt induzieren konnte. Es ist aber ein vom Tabak her bekanntes Phänomen, dass typische Ozonschäden eher an mittelalten Blättern zu beobachten sind (GUDERIAN, 1985, HEGGESTAD, 1991). Auch hier wird, wie bei WU, ein Zusammenhang mit Seneszenzverhalten diskutiert. Untersuchungen von stressrelevanten Genen haben gezeigt, dass Ozon für die Induktion der mRNA Level verschiedener Gene verantwortlich sein kann (SHARMA & DAVIS, 1994, ECKEY-KALTENBACH ET AL., 1994, KANGASJÄRVI ET AL., 1994). Hierzu gehören PR-Proteine, wie β -1,3-Glukanase, Chitinase, aber auch Glutathion-s-Transferase, Phenylalaninammonium Lyase, Superoxiddismutase und Peroxidasen. In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei Freilandversuchen die Expressionen dieser stresstypischen Gene während des Wechsels der Pflanzen von der vegetativen in die generative Phase untersucht. Im ersten Versuchsjahr konnte für die Chitinase über die gesamte Beprobung (BBCH 39-61), für die Ascorbat Peroxidase zwischen BBCH 39 und 41 und für die Glutathion-s-Transferase zu BBCH 58 und 59 signifikant höhere Expressionen in der empfindlicheren Sorte *cv. Ricarda* gefunden werden. Die β -1,3-Glukanase, und PAL waren bei beiden Sorten gleich exprimiert, die Cu/Zn-SOD im resistenten Kultivar IPZ 24727 zu BBCH 39 und 41 höher als in *cv. Ricarda*. Im zweiten Versuchsjahr konnten diese Ergebnisse nur teilweise bestätigt werden. Die Chitinase, die im Vorjahr bei der empfindlichen Sorte stetig höher induziert war als bei der resistenten, lag im Folgejahr zu BBCH 35 und 39 bei *cv. Ricarda* unterhalb von IPZ 24727, danach bei gleichen Werten wie die resistente Sorte. Die Ascorbat Peroxidase war im zweiten

Jahr bei IPZ 24727 von BBCH 35 – 51 höher exprimiert als bei cv. Ricarda und die Glutathion-S-Transferase zeigte gleiche Werte für beide Sorten, wie auch die PAL und β -1,3-Glukanase. Bei der Cu/Zn-SOD zeigte die resistente Sorte IPZ 24727 wiederum höhere Expressionen wie im Vorjahr. Alle Ergebnisse zusammen betrachtet erlauben keine eindeutige Aussage darüber, ob die Induktionen der untersuchten ESTs auf Ozon zurückzuführen sind und ob sie im Zusammenhang mit dem Schadbild, das in beiden Jahren gleichstark ausgeprägt war, gesehen werden können. Ozon wurde aufgrund dieser Ergebnisse als allein induzierender Faktor ausgeschlossen. Vielmehr sind die auslösenden Bedingungen der NBV in einem komplexen Verhältnis verschiedener Parameter zu suchen, zu denen wahrscheinlich auch Ozon gehört.

4.4 Auftreten der NBV in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium – NBV und Seneszenz – Eine Frage der Photoperiode?

Auffällig war während aller Experimente, dass die NBV nie vor dem Entwicklungsstadium BBCH 51, d.h. vor dem Beginn des Ährenschiebens in nennenswerten Größenordnungen zu beobachten war. Erst wenn die Pflanzen von der vegetativen in die reproduktive Phase wechselten, stieg schlagartig die Entwicklung der Blattschäden in den empfindlichen Sorten an. Dies war Anlass für die Hypothese, dass die Entstehung der NBV eng verbunden ist mit der Induktion der Seneszenz. Für diese Hypothese spricht auch die Feststellung, dass Gerstensorten, die eine *mlo*-Resistenz zeigen empfindlicher gegenüber NBV sind als mehltauanfällige Pflanzen (s.o. BEHN, 2003). Wie bei PIFFANELLI ET AL., 2002, beschrieben, werden *mlo*-Pflanzen früher seneszent. Unter der Annahme, dass die untersuchten Kultivare unterschiedliches Seneszenzverhalten zeigen, könnte ein Auslöser für die NBV, die meist mit dem Wechsel von der vegetative in die reproduktive Phase auftritt, eine mit der Seneszenz verbundene Empfindlichkeit gegenüber abiotischen Stress sein. Die Kultivare hätten somit nicht nur oxidativen Stress durch die unter Umständen extremen Umweltbedingungen, sondern würden durch die physiologischen Veränderungen, die während der Umstellung von der vegetativen in die generative Phase erfolgen, geschwächt.

Die NBT-Anfärbung zeigte zwischen BBCH 51 und 55 etwa die halbe Intensität der ursprünglichen Anfärbung wie zu BBCH 39, wenn das Fahnenblatt gerade voll entwickelt ist

und die Pflanze anfängt, sich auf das Ährenschieben vorzubereiten. Das bedeutet, dass die Photosyntheseleistung schon reduziert war und weniger Superoxidation-Radikale generiert wurden. Parallel dazu nahmen die Konzentrationen der Antioxidantien zu BBCH 55, wenn die NBV einsetzte, ab. Es wurde davon ausgegangen, dass die schädigenden Defizite der empfindlichen Sorten im antioxidativen Stoffwechsel vor dem Auftreten der ersten NBV-Symptome zu suchen sind, also etwa zwischen BBCH 39 und BBCH 51. Hier zeigte vor allem die Aktivität und Expression der Cu/Zn-SOD signifikante Unterschiede zwischen den Kultivaren. Im zweiten Jahr wurden auch bei der Ascorbat-Peroxidase höhere Expressionen der ESTs bei der unempfindlicheren Gerstensorte IPZ 24727 gefunden.

Die im ersten Untersuchungsjahr beobachtete höhere Expression der Chitinase-ESTs bei *cv.* Ricarda könnte unter dem Aspekt des oxidativen Stresses anstelle der diskutierten Pathogenbeteiligung gesehen werden. D.h. die Induktion der Chitinase-ESTs wäre durch einen oxidativen Stress, der mit der einsetzenden Seneszenz einherging, ausgelöst worden und nicht durch einen Pathogenbefall. All diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Kultivare, die empfindlicher bezüglich NBV sind, aufgrund einer höheren Sensibilität gegenüber der Photoperiode eine verfrühte Seneszenz zeigen und in diesem Entwicklungsstadium empfindlicher auf abiotischen Stress reagieren. Die zu einem früheren BBCH einsetzende Blattalterung würde bewirken, dass den Blättern verfrüht Nährstoff entzogen wird, um die Blütenbildung zu forcieren. Dadurch wird das antioxidative System geschwächt, die Blätter sind nicht mehr so gut gegen ROS geschützt und anfällig für Blatterkrankungen wie die NBV.

4.5 Bedeutung des Antioxidativen Stoffwechsels für die Kultivarempfindlichkeit – Rolle der Cu/Zn SODs

Bei Betrachtung des antioxidativen Stoffwechsels der verschiedenen Gerstenkultivare zeigten die nichtenzymatischen Systeme keinen Hinweis auf eine Schwachstelle. In den verschiedenen Experimenten konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von Ascorbat und Glutathion zwischen den Sorten festgestellt werden. In dem Klimakammerexperiment, in welchem ein Sonnen- und ein Schattentag simuliert wurde, verhielten sich Ascorbat und Glutathion unauffällig. Bei den Untersuchungen des Einflusses

von Ozon auf die Antioxidantien der Kultivare konnte eine altersabhängige Abnahme der Konzentrationen beim Vergleich der F mit den F-1 Blättern beobachtet werden. Die Ergebnisse, welche bei den Ozon-Behandlungen gefunden wurden, entsprechen zum Teil denen von SCHITTENHELM ET AL., 1993, der auch keine Auswirkung von Ozon auf Glutathion fand, aber sehr wohl auf Ascorbat. Allerdings waren die Versuchsbedingungen bei SCHITTENHELM auch wesentlich extremer als in der vorliegenden Arbeit, 600 ppb gegenüber 110 ppb Ozon.

In den Freilandversuchen konnte ein Einfluss der Bestrahlungsstärke auf Ascorbat und Glutathion festgestellt werden. So wurden in den bestrahlten Blatteilen in allen untersuchten Kultivaren im Jahr 2000 höhere Antioxidantien-Konzentrationen gefunden, als in den beschatteten Blatteilen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gerstensorten wurde zu BBCH 45 im F-1 Blatt in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit gegenüber NBV festgestellt. Auch bei der Untersuchung der Antioxidantien der Tag- und Nachtproben wurden unterschiedliche Konzentrationen ermittelt. Die Nachtproben wiesen signifikant niedrigere Ascorbat- bzw. Glutathionkonzentrationen als die Tagproben auf. Mit zunehmenden Alter gleichen sich die Antioxidantien-Konzentrationen der Tag- und Nachtproben aber wieder an, d.h. zu BBCH 55, während des Ährenschiebens, waren praktisch keine Differenzen zwischen Tag und Nacht mehr feststellbar.

Dass abiotischer Stress einen Einfluss auf die Höhe der Antioxidantien-Konzentrationen hat, ist in der Literatur vielfach beschrieben (POLLE & RENNENBERG, 1994; LARCHER, 1994). Im Halliwell-Asada-Zyklus (Abb. 1.7) sind die Zusammenhänge zwischen ROS und antioxidativem System beschrieben. Die Superoxiddismutase spielt hier eine entscheidende Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Enzym besonders untersucht, um festzustellen, ob die unterschiedlichen Sensitivitäten der Kultivare gegenüber NBV auf einer reduzierten Entgiftung der ROS beruhen. Bei der Auswertung der Ergebnisse des Ozonversuches in den Klimakammern der GSF und beim LSV 2001 konnte festgestellt werden, dass die Sorten, die hohe SOD-Aktivitäten zeigten, geringere Superoxidanion-Radikal Verteilungen aufwiesen. Weiterhin zeigten die Untersuchungen der Licht- und Schattenblätter im Jahr 2000, dass die resistenten Sorten signifikant höhere Cu/Zn-SOD-Aktivitäten in den lichtzugewandten Blatteilen aufwiesen. VAN CAMP ET AL., 1994, hat für Pflanzen mit höheren SOD-Level gefunden, dass diese Pflanzen toleranter gegenüber durch Lichtstress hervorgerufener Photoinhibition des Photosystem II (PS II) sind, was die hier vorliegenden Ergebnisse

unterstützt. Bei den empfindlichen Kultivaren wurden gleich hohe oder niedrigere Aktivitäten in den lichtzugewandten gegenüber den beschatteten Blattteilen gefunden.

Die Bestimmung der Cu/Zn-SOD-Aktivität in den Proben, die zur Untersuchung der altersabhängigen Entwicklung des antioxidativen Systems geerntet wurden, zeigte, dass die SOD im Stadium BBCH 35 in der unempfindlichen Gerstensorte größer war als in der empfindlichen Sorte. Mit zunehmenden Alter verschwand der Unterschied in der Enzymaktivität. CASANO ET AL, 1994 hat herausgefunden, dass die Reaktion der SOD-Aktivität auf unterschiedliche Lichtstärken altersabhängig ist. Er hat junge und seneszente Blätter unterschiedlichem Lichtstress ausgesetzt und die SOD-Aktivitäten und Transkriptions-Niveaus der stressinduzierten Gene untersucht. Die älteren Blätter zeigten deutlich geringere Sensitivität gegenüber oxidativem Stress als die jungen Blätter.

Bei TSANG ET AL, 1991, ist beschrieben, dass die Mn- und Fe-SOD nach Behandlung mit Methylviologen, als Auslöser für oxidativen Stress, in unterschiedlichen Lichtverhältnissen anders als die Cu/Zn-SOD reagierte. Die Cu/Zn-SOD-Aktivität stieg sowohl bei Pflanzen, die im Licht gezogen wurden, als auch bei solchen, die in Dunkelheit wuchsen, an. Ansteigende Mn- und Fe-SOD-Aktivitäten hingegen wurden nur bei Pflanzen gefunden, die im Licht standen, in der Dunkelheit verändern sich die Aktivitäten der SODs nicht. Ob diese Beobachtung bei verschiedenen Kultivaren unterschiedlich sein kann, wurde nicht beschrieben. Für weitergehende Untersuchungen an der Gerste könnten diese Ergebnisse ein Ansatzpunkt sein, um die Rolle der Mn- und Fe-SOD hinsichtlich der Ausprägung der NBV einzuordnen.

Bei der Auswertung der Superoxidanion-Radikal Verteilungen im Zusammenhang mit den SOD-Aktivitäten könnte ein gegenläufiger Trend gefunden werden. Relativ zueinander wurden bei der empfindlicheren Sorte niedrigere SOD-Aktivitäten und höhere Radikal-Verteilungen, bei der resistenten Gerstensorte höhere SOD-Aktivitäten und niedrigere Radikal-Verteilungen gefunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Blattschädigungen durch NBV eher auf eine unzureichenden Entgiftung der Radikale durch zu geringe Enzymaktivitäten zurückzuführen sind.

Die Untersuchungen zu den altersabhängigen Entwicklungen der antioxidativen Schutz-Systeme und der ROS, ergaben ein einheitliches Bild. Es war ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Entwicklungsstadium und Stärke der NBT-Anfärbung festzustellen. So wurden im Freiland vor BBCH 39 (Fahnenblatt voll entwickelt) nahezu 100 % der Blattflächen durch

NBT angefärbt. Mit zunehmenden Entwicklungsstadium nahm die Radikal Verteilung in den Blättern ab. Ab einem Stadium von BBCH 45-47 (Fahnenblattscheide öffnet sich) konnte man eine Sortenabhängigkeit der Radikal Verteilung erkennen. Die NBT-Anfärbung der Blätter zeigte, dass Superoxidanion-Radikale mit zunehmender Seneszenz vermindert gebildet wurden. In gleichem Maße nahmen die Konzentrationen von Ascorbat und Glutathion ab. Für die Cu/Zn-SOD konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, im ersten Untersuchungsjahr war eine entwicklungsabhängige Abnahme der Enzymaktivität zu verzeichnen. Im zweiten Jahr wurden insgesamt wesentlich geringere Aktivitäten als im ersten Jahr gefunden, eine Abnahme der SOD konnte nicht festgestellt werden. Allerdings wird in der Literatur auch für die Superoxiddismutase eine altersabhängige Reduktion der Enzymaktivität beschrieben (WU, 2001).

4.6 Ausblick

Dass die Schäden an den Blättern der Gerstenkultivare nicht durch Pathogene hervorgerufen werden, ist zweifelsohne belegt worden. Weiterhin kann man sagen, dass es sich bei der Ursache um ein komplexes Geschehen handelt, indem die Strahlung eine entscheidende Rolle spielt. Weder Ozon noch UV-Strahlung allein sind als Faktoren für die Entstehung von NBV identifiziert worden, aber es wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und erhöhtem Auftreten der NBV gefunden. Um die Komplexität der Ursache für die NBV genauer zu erforschen, sollten noch längere und differenziertere Klimakammerexperimente durchgeführt werden, in denen Faktoren wie z.B. Temperatur, Tautropfenbildung aber auch Entwicklung der verschiedenen Sorten in Hinblick auf die Photoperiode untersucht werden könnten. Solche Studien könnten den Zusammenhang zwischen Seneszenz und NBV bestätigen und die Anfälligkeit empfindlicher Kultivare gegenüber abiotischem oxidativem Stress, wenn sie verfrüht seneszent werden. Wie dieser oxidative Stress genau ausgelöst wird und warum manche Sorten der Sommergerste darauf besser reagieren können als andere konnte leider nicht eindeutig geklärt werden. Versuche, in denen oxidativer Stress künstlich induziert wird, z. B. mit Methylviologen, könnten hier weitere Informationen bringen. Es konnte gezeigt werden, dass die Cu/Zn-SOD-Aktivität eine entscheidende Rolle spielt und die Empfindlichkeit der Sorten mit der Verfügbarkeit an SOD

mit Wechsel der Pflanzen vom vegetativen in den generativen Zustand zusammenhängt. Es wurde nicht untersucht, welche Rolle die Mn- und Fe-SOD in der sortenabhängigen Ausprägung der NBV spielt, hier könnten weitere Versuche Aufschluss geben. Eine Frage, die während den Experimenten immer wieder auftrat, die aber noch nicht bearbeitet werden konnte, war, inwieweit die verschiedenen Kultivare mit unterschiedlichen Blatttemperaturen umgehen können. Aus der Literatur (BURKE & OLIVER, 1992) ist bekannt, dass die SOD-Aktivität temperaturabhängig ist und mit steigenden Temperaturen sinkt. In weiteren Untersuchungen könnte ein Ansatzpunkt sein, ob und welche Rolle die HR-Proteine spielen und wie die einzelnen Kultivare auf künstlich induzierten oxidativen Stress zu BBCH 45 reagieren. Auch die Fragestellung, inwieweit es sich bei den durch NBV hervorgerufenen Blattschäden um Apoptose handelt, und über welche Mechanismen dies in den Pflanzen induziert wird, lässt Spielraum für weitere Forschung. Einen weiten Raum für Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene lässt die Feststellung, dass *mlo*-resistente Pflanzen zu einer stärkeren NBV-Ausprägung neigen, zu. So könnte eine differentielle Expressionsanalyse unterschiedlich empfindlicher Gerstensorten Aufschluss über die Zusammenhänge zwischen NBV und Mehltaresistenz geben.

5. Literatur

- AICHELE, D., SCHWEGLER, H.-W., (1991), Unsere Gräser, *Kosmos Naturführer*, 10.Auflage
- ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L., (2002), Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J Exper Bot*, **53** (372), 1331-1341
- ASADA, K., TAKAHASHI, M., (1987), Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, *Photoinhibition* (KYLE, D. J., ET AL, eds), Amsterdam: Elsevier, 227-287
- BAKER, N.R., BOWYER, J.R., (1994), eds. Photoinhibition of photosynthesis. From molecular mechanisms to the field, *Oxford: Bios Scientific Publishers*
- BANNISTER, J.V., BANNISTER, W.H., ROTILIO, G., (1987), Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **22**, 111-180
- BARNES, P.W., FLINT, S.D., CALDWELL, M.M., (1990), Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation, *Amer J Bot*, **77** (10), 1354-1360
- BAUMER, M., BEHN, A., DOLESCHEL, P., FINK, K., WYBRANIETZ, J., (2001), Notreife durch nichtparasitäre Blattverbräunung, *Getreide*, **2**, 92 - 98
- BEAUCHAMP, C.O., FRIDOVICH, I., (1973), Isozymes of Superoxide dismutase from wheat germ, *Biochem. Biophys. Acta*, **317**, 50-64
- BEHN, A., (2003), Molekulargenetische Charakterisierung und Lokalisierung der Widerstandsfähigkeit gegen die nichtparasitäre Blattverbräunung bei Sommergerste, Dissertation an der Technischen Universität München
- BEHN, A., SCHWEITZER, G., WENZEL, G., BAUMER, M., (2002), Ein neuer abiotischer Stress bei Gerste: Entwicklung molekularer Marker zur Selektion von Gersten mit Resistenz gegen die nichtparasitäre Blattverbräunung (NBV), *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **54**: 307-310
- BEAUCHAMP, C.O., FRIDOVICH, I., (1973), Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ, *Biochem. Biophys. Acta*, **317**, 50-64
- BJÖRN, L.O., (1996), Effects of ozone depletion and increased UV-B on terrestrial plants, *J. Environ. Sci.*, **51**, 217-243
- BORNMAN, J., SUNDBY-EMANUELSSON, C., CEN, Y., ALENIOUS, C., (1994), UV-B radiation und the photosynthetic progress, *NATO ASI series*, **118**, 345 - 348
- BORNMAN, J., TERAMURA, A.H., (1993), Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants, *Environmental UV Photobiology*, *Plenum Press. New York*, 427-471

- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D., (1992), Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.*, **43**, 83-116
- BOWLER, C., SLOOTEN, L., VANDENBRANDEN, S., DE RYCKE, R., BOTTERMAN, J., SYBESMA, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D., (1991), Manganese superoxides dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants, *EMBO J*, **10** (7), 1723-1732
- BOLWELL, G.P., WOJTASZEK, P., (1997), Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective, *Physiol. and Mol. Plant Path.*, **51**, 347 - 366
- BRADFORD, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Biochemistry* **72**, 248 – 254
- BURKE, J.J., OLIVER, M.J., (1992), Differential Temperature Sensitivity of Pea Superoxide Dismutases, *Plant Physiol.* **100**, 1595-2598
- CALDWELL, M.M., FLINT, S.D., (1994), Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems, *Climate Change*, **28**, 375 - 394
- CALDWELL, M.M., FLINT, S.D., (1994a), Solar ultraviolet radiation and ozone layer change: Implications for crop plants, In: *Physiology and Determination of Crop Yield*, Boote, K. Bennett, J.M., Sinclair, T.R. and Paulsen, G.M. (eds.) ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, 487-507
- CASANO, L.M., MARTIN, M., SABATER, B.,(1994), Sensitivity of Superoxide Dismutase Transkript Levels and Activities to Oxidative Stress Is Lower in Mature-Senescent Than in Young Barley Leaves, *Plant Physiol*, **106**, 1033-1039
- CHANG, S., PURYEAR, J., CAIRNEY, J., (1993), A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol Repr*, **11**, 113-116
- CHEN, G.-X., ASADA, K., (1989), Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties, *Plant Cell Physiol.*, **30** (7), 987-998
- CHRISTENSEN, J.J., (1934), Nonparasitic leaf spots of barley, *Phytopathology*, **24**, 726-742
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F., (2000), Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57** (5), 779-795
- DÖHRING, T., KÖFFERLEIN, M., THIEL, ST., SEIDLITZ, H.K., PAYER, H.D., (1994), UV-Filters for Artificial Lighting of Plants, *Lighting in Controlled Enviroments, Lighting Workshop 27-30 March 1994*

- DÖHRING, T., KÖFFERLEIN, M., THIEL, ST., SEIDLITZ, H., (1996), Spectral Shaping of Artificial UV-B Irradiation for Vegetation Stress Research, *J.Plant Physiol.*, **148**, 115 - 119
- DOKE, N., MIURA, Y., SANCHEZ, L.M., PARK, H.-J., NORITAKE, T., YOSHIOKA, H., KAWAKITA, K., (1996), The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence – a review, *Gene*, **179**, 45-51
- ECKEY-KALTENBACH, H., GROSSKOPF, E., SANDERMANN, H., ERNST, D., (1994), Induction of pathogen defence genes in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plant by ozone. In: CRAWFORD, R.M.M., HENDRY, G.A.F., GOODMAN, B.A., (eds.), Oxygen and Environmental Stress in Plants. *Proc Royal Soc Edinburgh, Section B*, **102**, 63-74
- ELLIS, R.P., FORSTER, B.P., ROBINSON, D., HANDLEY, L.L., GORDON, D.C., RUSSELL, J.R., POWELL, W., (2000), Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *J. Exp. Bot.*, **51**, 9-17
- ERNST, D., GRIMMIG, B., HEIDENREICH, B., SCHUBERT, R., SANDERMANN, H. Jr., (1999), Ozone-induced genes: Mechanisms and biotechnological applications. In: *Plant responses to Enviromental Stress*, SMALLWOOD, M.F., CALVERT, C.M., BOWLES, D.J., (eds.), BIOS Scientific Publishers, Oxford, 33-41
- FAHEY, R.C., NEWTON, G.L., DORIAN, L., KOSOWO, E.M., (1981), Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* **111**, 357-365
- FOYER, C.H., HALLIWELL, B., (1976), The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, **133**, 21-25
- FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F., SCOTT, I.M., (1997), Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiol Plant*, **100**, 241-254
- FRANKE, W., (1992), *Nutzpflanzenkunde*, Thieme Verlag, 5.Auflage
- FRANZEN, J., GLATZLE, D., BAUSCH, J., WAGNER, E., (1991), Age dependent accumulation of vitamin E in spruce needles, *Phytochemistry*, **30** (7), 2147-2150
- FRANZEN, J., GLATZLE, D., BAUSCH, J., WAGNER, E., (1991), Distribution of vitamin E in spruce seedling and mature tree organs, and within the genus, *Phytochemistry*, **30** (1), 147-151
- FRANZEN, J., PIATEK, K.B., TRIBUKAIT-PIPES, F., GROSS, K., WAGNER, E., (1990), Die Bedeutung des Lichtes für die Entwicklung und die Pigmentsynthese beim Austrieb der Fichte, *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 161 (9), 165-169

- FRIDOVICH, I., (1995), Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97-112
- GRESSEL, J., GALUN, E., (1994), Genetic controls of photooxidants tolerance. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants* (Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M., eds). Boca Raton, CRC Press, pp. 237 -273
- GUDERIAN, R., (1985), Air pollution by photochemical oxidants. Formation, transport, control and effects on plants. In *Ecol Studies*, **52**, Springer, Berlin
- HABERMEYER, J., SCHIEDER, A., BRISKINA, O., (2002), Stobis lindern Sonnenbrand, *DLZ*, **2**, 20 - 25
- HEATH, R.L., TAYLOR, G.E., (1997), Physiological processes and plant responses to ozone exposure, in SANDERMANN, H., WELLBURN, A.R., HEATH, R.L., (eds.), *Ozone and forest decline: A comparison of controlled chamber and field experiments. Ecol Studies* vol. **127**, Springer, Berlin, 317-368,
- HEGGESTAD, H.E., (1991), Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone , *Environ Pollut*, **74**, 264-291
- HEGGESTAD, H.E., MIDDELTON, J.T., (1959), Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. *Science*, **129**, 208-210
- HELDT, H.W., (1996), Pflanzenbiochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Oxford, Berlin
- HOLLEMANN, A.F., WIBERG, N., (1985), Lehrbuch der Anorganischen Chemie, de Gruyter Verlag
- HOSSAIN, M., NAKANO, K., ASADA, K., (1984), Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in the regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant Cell Physiol.*, **61**, 385-395
- JABS, T., (1996), Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, **273**, 1853-1856
- JOCELYN, P.C., (1972), Biochemistry of the SH-Group, *Academic Press*, London
- KANGASJÄRVI, J., TALVINEN, J., UTRAINEN, M., KARJAKAINEN, R., (1994), Plant defence systems induced by ozone, *Plant Cell Environ*, **17**, 783-794
- KIEFER, E., HELLER, W., ERNST, D., (2000), A Simple and Efficient Protocol for Isolation of Functional RNA from Plant Tissue Rich in Secondary Metabolites, *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**, 33-39

- KLAPHECK, S., ZIMMER, I., COSSE, H., (1990), Glutathione and ascorbate participate in hydrogen peroxide degradation in germinating Castor bean endosperm. In: H. Rennenberg, L. DeKok, C. Brunold, I. Stulen, eds. *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, SPB Academic, The Hague, 199-203
- KNIGHT, H., KNIGHT M.R., (2001), Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.*, **6**, 262-267
- KÖPKE, P., (2000), Auswirkungen atmosphärischer Spurenstoffe auf Strahlung und Klima, in: Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie, Band 1 B, Atmosphäre: Aerosol/Multiphasenchemie, Ausbreitung und Deposition von Spurenstoffen, Auswirkungen auf Strahlung und Klima, (Guderian, R., (ed.)), Springer Verlag, Berlin
- KOLB, CH., (2003), Untersuchungen zur Erfassung und Bewertung der UV-Abschirmung bei Kulturvarietäten verschiedener Nutzpflanzenarten. Dissertation des Lehrstuhls für Botanik II der Universität Würzburg.
- 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**, 2101-2108
- KROMIDAS, S., (2000), Handbuch der Validierung, Wiley-VCH, 1.Auflage, Weinheim
- LANGEBARTELS, CH., SCHRAUDNER, M., HELLER, W., ERNST, D., SANDERMANN Jr., H., 2000, Oxidative Stress and Defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation, in *Oxidative stress in plants*, INZE, D., VAN MONTAGU, M., eds., Harwood, Amsterdam
- LAYMANN, B., (2001), Einfluss natürlicher UV-Strahlung auf die Ultrastruktur der Chloroplasten in *Hordeum vulgare* L. Mutante Ant 287 im Vergleich zur Ultrastruktur der nichtparasitären Blattverbräunung bei *Hordeum vulgare* L. cv. Ricarda. Zulassungsarbeit der Bayerischen Maximilian-Universität in Würzburg.
- LfL, (2002), Sortenblatt Sommergerste, Sortenspezifische Anbauhinweise, Herausgeber: LfL, Freising
- LfL, (2002), Gerstenkrankheiten, Diagnose- und Entscheidungshilfen zum Gerstenmodell Bayern, Herausgeber: LfL, Freising
- LfL, (2003), Integrierter Pflanzenschutz, Gerstenkrankheiten, Herausgeber: LfL, Institut für Pflanzenschutz, Freising, 8.geänderte Auflage
- LfL, (1993), Integrierter Pflanzenschutz, Getreideschädlinge, Herausgeber: LfL, Institut für Pflanzenschutz, Freising, 5.geänderte Auflage
- LIN, J.-N., KAO, C.H., (1998), Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **39**, 161-165

- LOIS, R., BUCHANAN, B.B., (1994), Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation II. Mechanism of UV-resistance in *Arabidopsis*, *Planta*, **194**, 504-509
- MADRONICH, S., MCKENZIE, R.L., BJORN, L.O., CALDWELL, M.M., (1998), Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **46**, 5-19
- MANNING, W.J., TIEDEMANN, v. A., (1995), Climate change: Potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases, *Enviro. Pol.*, **88**, 219-245
- MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A., MAESTRI, M., (2001), Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress, *Plant Science*, **160**, 505-515
- MAZZA, C.A., BATTISTA, D., ZIMA, A.M., SZWARCBERG-BRACCHITTA, M., GIORDANO, C.V., ACEVEDO, A., SCOPEL, A.L., BALLARE, C.L., (1999), The effect of solar ultraviolet-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses, *Plant Cell and Environment*, **22**, 61-70
- MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I., (1969), Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055
- MEHDY, M.C., (1994), Active oxygen species in plant defense against pathogens, *Plant Physiol.*, **105**, 467-472
- MEHDY, M.C., SHARMA, Y.K., SATHASIVAN, K., BAYS, N.W., (1996), The role of activated oxygen species in plant disease resistance, *Physiol. Plant.*, **98**, 365-374
- MITTLER, R., (2002), Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Plant Science*, **7** (9), 405-410
- MOLDAU, H., (1998), Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiol. Plant*, **104**, 617-622
- MORAN, J.F., BECANA, M., ITURBE-ORMAETXE, I., FRECHILLA, S., KLUCAS, R.V., APARICIO-TEJO, P., (1994), Drought induces oxidative stress in pea plants, *Planta*, **194**, 346-352
- MUDD, J.B., (1997), Biochemical basis for toxicity of ozone, in YUNUS, M., IQBAL, M., (eds.), *Plant responses to air pollution*, Wiley, New York, 267-284
- MUNNE-BOSCH, S., ALEGRE, L., (2002), Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts, *Planta*, **214**, 608-615
- NIETZSCHE, FRIEDRICH, Nietzsche für Gestrebte, Insel taschenbuch, 1997

- OBATA, H., KAWAMURA, S., SHIMOYAMA, A., SENOO, K.; TANAKA, A., (2001), free radical injury in rice leaf under Zn deficiency, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **47** (1), 205-211
- OBERLEY, L.W., (1999), Antioxidant Enzymes, Sunrise Free Radical School, Oxygen Society Annual Meeting, New Orleans, LA, Nov 19-21
- OBST, A., BAUMER, M., SCHNITZLER, J.-P., (2001), Teerflecken bei der Gerste, *DLG – Mitteilungen*, **2**, 36-39
- OBST, A., BAUMER, M., (1998) Nichtparasitär bedingte Blattverbräunungen an Gerste und anderen Getreidearten, *Getreide*, **4. Jg**, **2**, 56-61
- OBST, A., BAUMER, M., (1998), Ursachen der nicht parasitär bedingten Blattverbräunung bei der Gerste, *Abschlußbericht Projekt U 13.1*, Bayrischer Forschungsverbund Klimaforschung
- OBST, A., HUBER, G., (1996), Flecken geben noch Rätsel auf, *DLG-Mitteilungen*, **3**, 58-61
- OBST, A., BAUMER, M., HUBER, G., (1995), Nichtparasitär bedingte Blattverbräunungen bei Gerste – ein neues Problem von gelegentlich großer wirtschaftlicher Bedeutung, *Gesunde Pflanzen*, **8**, 308-314
- PELL, E.J., SCHLAGNHAUFER, C.D., ARTECA, R.N., (1997), Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction, *Physiol. Plant.*, **100**, 264-273
- PFANNSCHMIDT, TH., (2003), Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes, *Trends Plant Sci*, **8**, 33-41
- PIFFANELLI, P., ZHOU, F., CASAIS, C., ORME, J., SCHAFFRATH, U., COLLINS, N., PANSTRUGA, R., SCHULZE-LEFERT, P., (2002), The barley MLO modulator of defence and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol*, **129**, 1076-1085
- POLLE, A., (2001), Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis, *Plant Physiol.*, **126**, 445-462
- POLLE, A., CHAKRABARTI, K., SCHÜRMAN, W., RENNENBERG, H., (1990), Composition and Properties of Hydrogen Peroxide Decomposing Systems in Extracellular and Total Extracts from Needles of Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst), *Plant Physiol.*, **94**, 312-319
- POLLE, A., CHAKRABARTI, K., CHAKRABARTI, S., SEIFERT, F., SCHRAMMEL, P., RENNENBERG, H., (1992), Antioxidants and Manganese Deficiency in Needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.) Trees, *Plant Physiol.*, **99**, 1084-1089
- POLLE, A., RENNENBERG, H., (1992), Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. II. Defence systems against oxidative stress in needles. *New Phytol.*, **121**, 635-642

- POLLE, A., RENNENBERG, H., (1994), Entgiftung von Peroxiden in Fichtennadeln (*Picea abies* L.) am Schwerpunktstandort „Kalkalpen (Wank)“, *IFU Schriftenreihe*, Band **31**, Frankfurt/M.: Wiss.-Verlag Maraun
- RAO, M.V., DAVIS, K.R., (2001), The physiology of ozone induced cell death, *Planta*, **213**, 682-690
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E., (2000), Biologie der Pflanzen, De Gruyter, Berlin
- ROZEMA, J., VAN DE STAAIJ, J., BJÖRN O. L., CALDWELL, M., (1997), UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation, *Tree*, **12**, 1, 22-28
- RUNECKLES, V.C., KRUPA, S.V., (1994), The impact of UV-B radiation and ozone on terrestrial vegetation, *Environmental pollution*, **83**, 191-213
- SACHS, E., (2000), Das Auftreten der *Ramularia*-Blattfleckenkrankheit an Gerste in Bayern 1999, verursacht durch *Ramularia collo-cygni*, Sutton & Waller, *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **52** (7), 160-163
- SAIRAM, R.K., SAXENA, D.C., (2000), Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible Mechanism of water stress resistance, *J. Agronomy & Crop Science*, **184**, 55-61
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., (1989), Molecular Cloning – a laboratory manual, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, ed.2, New York
- SANDERMANN, H., WELLBURN, A.H., HEATH, R.L., (1997), Forest decline and ozone. A comparison of controlled chamber and field experiments. In *Ecol. Studies*, **127**, Springer Berlin
- SCANDALIOS, J.G., (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutase, *Plant Physiol.*, **101**, 7-12
- SCHITTENHELM, J., WESTPHAL, S., TODER, S., WAGNER, E., (1993), Das antioxidative System der Fichte: Einfluss von verschiedenen Stressfaktoren, *Forstw. Cbl.*, **112**, 240-250
- SCHNITZLER, J.P., (1998), Pflanzenphysiologische Begleitungen über die Ursachen nichtparasitärer Blattverbräunungen bei der Gerste, Projekt U 13.2, Bayrischer Forschungsverbund Klimaforschung
- SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H., (1996), Plant defence systems and ozone, *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 456-461
- SCHRAUDNER, M., MOEDER, W., WIESE, C., VAN CAMP, W., INZE, D., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H., (1998), Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3, *Plant Journal*, **16** (2), 235-245

- SCHUPP, R., (1991), Untersuchungen zur Schwefelernährung der Fichte (*Picea abies* L.): Die Bedeutung der Sulfatassimilation und des Transportes von Thiolen, *Schriftenreihe des Fraunhofer-Institutes für Atmosphärische Umweltforschung*, Band 1, Frankfurt/M.: Wiss.-Verlag Maraun
- SHARMA, Y.K., DAVIS, K.R., (1994), Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **105**, 1089-1096
- SPITZWEG, CARL, (1979), Und abends tu ich dichten, *Hrgb. Grunewald, E., dtv*, 59
- TEVINI, M., (1996), Erhöhte UV-B-Strahlung: Ein Risiko für Nutzpflanzen? *Biologie in unserer Zeit*, **4**, 245-254
- TEVINI, M., (1995), UV-Wirkungen auf Pflanzen, *Kurzfassung des Vortrages am 30.03.1995*
- TEVINI, M., TERAMURA, A.H., (1989), UV-B effects on terrestrial plants, *Photochem. Photobiol.*, **50**, 479-487
- THIEL, ST., DÖHRING, T., KÖFFERLEIN, M., KOSAK, A., MARTIN, P., SEIDLITZ, H.K., (1996), A Phytotron for Plant Stress Research: How Far Can Artificial Lighting Compare to Natural Sunlight?, *J.Plant Physiol.*, **148**, 456-463
- THIEL, ST., (1999), Einfluss von Bewölkung auf die UV-Strahlung an der Erdoberfläche und ihre ökologische Bedeutung, *Berichte des Meteorologische Institutes der Universität Freiburg*, **Nr.3**
- THOME, O.W., (1885), Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz in Wort und Bild für Schule und Haus, Gera, Deutschland
- TIEDEMANN, A. v., WU, Y.W., (2001), Physiologische Effekte von Azolen und Strobilurinen bei Weizen und Gerste, *Getreide*, **7**, 78-82
- TIEDEMANN, A. v., WU, Y.W., (2001), Sauerstoffstress in Blättern, *DLG-Mitteilungen*, **2**, 40-42
- TREPTE, S., WINKLER, P., (2002), Langfristige Veränderungen von relevanten meteorologischen Parametern mit Bezug zur solaren Strahlung am Hohenpeißenberg, Offenbach: *Deutscher Wetterdienst, Arbeitsergebnisse Nr. 73*
- TSANG, E.W.T., BOWLER, C., HEROURART, D., VAN CAMP, W., VILLARROEL, R., GENETELLO, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D., (1991), Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell*, **3**, 783-792
- UDILOVA, N., (1999), Vergleichende Untersuchungen von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen, *Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität Berlin*

- VAN CAMP, W., WILLEKENS, H., BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H., (1994), Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage, *Biotechnology* **12**, 165-168
- VANACKER, H., CARVER, T.L.W., FOYER, C.H., (1998), Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves, *Plant Physiol.*, **117**, 1103-1114
- VRANOVA, E., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F., (2002), Signal transduction during oxidative stress, *J. Exp. Bot.*, **53** (372), 1227-1236
- WARNECK, P., (1988), Chemistry of the Natural Atmosphere. *International geophysics series. Academic Press, New York.*
- WATANABE, N., (1998), Reduced antenna size of Photosystem II in cereals for high light environment. Garab, G., (ed.), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands Vol. III*, 2187-2190
- WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D., VAN CAMP, W., (1997), Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J*, **16**, 4806-4816
- WITZENBERGER, A., VAN DEN BOOM, T., HACK, T., (1989), Erläuterungen zum BBCH-Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides – mit Abbildungen. *Gesunde Pflanzen*, **41**, 384-388
- WOJTASZEK, P., (1997), Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem. J.*, **322**, 681-692
- WU, Y.X., (2001) Impact of modern fungicides on the oxidative/antioxidant status in wheat and barley: potential role in senescence, environmental stress tolerance and unspecific necroses. Dissertation der Universität Rostock.
- WU, Y.X., TIEDEMANN, A. v., (2002), Evidence of oxidative stress in physiological leaf spot formation in spring and winter barley. *Phytopathology*, **97**, 145-155
- WU, Y.X., TIEDEMANN, A. v., (2002), Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution*, **116**, 37-47

6. Anhang

6.1 Einteilung der Entwicklungsstadien bei Getreide nach BBCH

BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien von Getreide nach
WITZENBERGER ET AL., 1989

Makrostadium 0: Keimung

- 00 Trockener Samen
- 01 Beginn der Samenquellung
- 03 Ende der Samenquellung
- 05 Keimwurzel aus dem Samen ausgetreten
- 06 Keimwurzel streckt sich, Wurzelhaare und / oder Seitenwurzeln sichtbar
- 07 Keimscheide (Koleoptile) aus dem Samen ausgetreten
- 09 Auflaufen: Keimscheide durchbricht Bodenoberfläche; Blatt an der Spitze der Koleoptile gerade sichtbar

Makrostadium 1: Blattentwicklung

- 10 Erstes Blatt aus der Koleoptile ausgetreten ^{1,2}
- 11 1-Blatt-Stadium: 1. Laubblatt entfaltet, Spitze des 2. Blattes sichtbar
- 12 2-Blatt-Stadium: 2. Laubblatt entfaltet, Spitze des 3. Blattes sichtbar
- 13 3-Blatt-Stadium: 3. Laubblatt entfaltet, Spitze des 4. Blattes sichtbar
- 1. Stadien fortlaufend bis...
- 19 9 und mehr Laubblätter entfaltet

Makrostadium 2: Bestockung ³

- 20 Keine Bestockung
- 21 Erster Bestockungstrieb sichtbar: Beginn der Bestockung
- 22 2 Bestockungstriebe sichtbar
- 23 3 Bestockungstriebe sichtbar
- 2. Stadien fortlaufend bis...
- 29 Ende der Bestockung: Maximale Anzahl der Bestockungstriebe erreicht

Makrostadium 3: Schossen (Haupttrieb)

- 30 Beginn des Schossens: Haupttrieb und Bestockungstriebe stark aufgerichtet, beginnen sich zu strecken. Ährenspitzen mind. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt.

¹ Ein Blatt gilt als entfaltet, wenn seine Ligula oder die Spitze des nächsten Blattes sichtbar ist.

² Bestockung kann ab Stadium 13 erfolgen; in diesem Fall ist auf Stadium 21 überzugehen.

³ Das Schossen kann schon vor Ende der Bestockung einsetzen; in diesem Fall ist auf Stadium 30 überzugehen.

Makrostadium 3: Schossen (Haupttrieb)

- 31 1-Knoten-Stadium: 1. Knoten dicht über der Bodenoberfläche wahrnehmbar, mind. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt.
- 32 2-Knoten-Stadium: 2. Knoten wahrnehmbar, mind. 2 cm vom 1. Knoten entfernt.
- 33 3-Knoten-Stadium: 3. Knoten mind. 2 cm vom 2. Knoten entfernt.
- 3. Stadien fortlaufend bis...
- 37 Erscheinen des letzten Blattes (Fahnenblatt); letztes Blatt noch eingerollt.
- 39 Ligula (Blatthäutchen)-Stadium: Blatthäutchen des Fahnenblattes gerade sichtbar, Fahnenblatt voll entwickelt.

Makrostadium 4: Ähren- / Rispenschwellen

- 41 Blattscheide des Fahnenblattes verlängert sich.
- 43 Ähre / Rispe ist im Halm aufwärts geschoben.
- 45 Blattscheide des Fahnenblattes geschwollen.
- 47 Blattscheide des Fahnenblattes öffnet sich.
- 49 Grannenspitzen: Grannen werden über der Ligula des Fahnenblattes sichtbar.

Makrostadium 5: Ähren- / Rispenschieben

- 51 Beginn des Ähren- / Rispenschiebens: Die Spitze der Ähre / Rispe tritt heraus oder drängt seitlich aus der Blattscheide.
- 52 20 % der Ähre / Rispe ausgetreten.
- 53 30 % der Ähre / Rispe ausgetreten.
- 54 40 % der Ähre / Rispe ausgetreten.
- 55 Mitte des Ähren- / Rispenschiebens: Basis noch in der Blattscheide.
- 56 60 % der Ähre / Rispe ausgetreten.
- 57 70 % der Ähre / Rispe ausgetreten.
- 58 80 % der Ähre / Rispe ausgetreten.
- 59 Ende des Ähren- / Rispenschiebens: Ähre / Rispe vollständig sichtbar.

Makrostadium 6: Blüte

- 61 Beginn der Blüte: Erste Staubgefäße werden sichtbar.
- 65 Mitte der Blüte: 50 % reife Staubgefäße.
- 69 Ende der Blüte.

Makrostadium 7: Fruchtentwicklung

- 71 Erste Körner haben die Hälfte ihrer endgültigen Größe erreicht. Korninhalt wässrig.
- 73 Frühe Milchreife
- 75 Mitte Milchreife: Alle Körner haben ihre endgültige Größe erreicht. Korninhalt milchig, Körner noch grün.
- 77 Späte Milchreife.

Makrostadium 8: Frucht- und Samenreife

- 83 Fröhe Teigreife
- 85 Teigreife: Korninhalt noch weich aber trocken. Fingernageleindruck reversibel
- 87 Gelbreife: Fingernageleindruck irreversibel
- 89 Vollreife: Korn ist hart, kann aber nur schwer mit dem Daumnagel gebrochen werden.

Makrostadium 9: Absterben

- 92 Totreife: Korn kann nicht mehr mit dem Daumnagel eingedrückt bzw. nicht mehr gebrochen werden.
- 93 Körner lockern sich tagsüber.
- 97 Pflanze abgestorben, Halme brechen zusammen.
- 99 Erntegut

6.2 Bonitur: Klassifizierung der Blattschäden

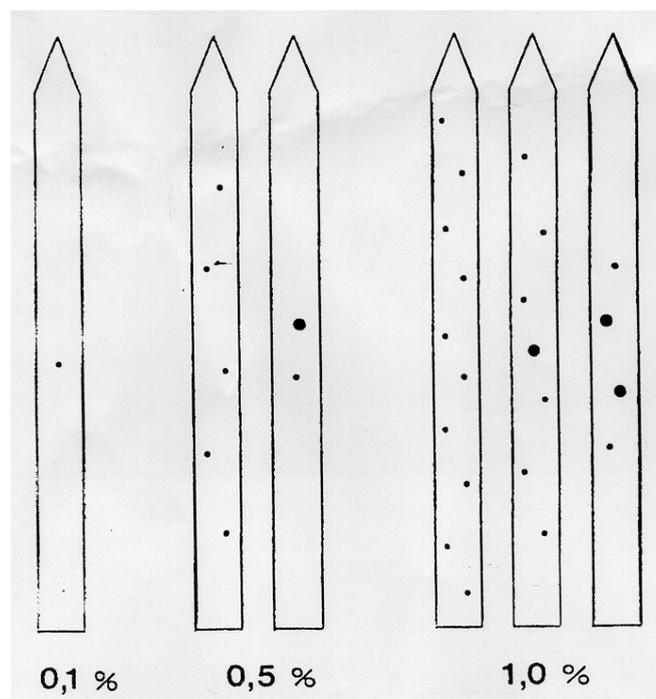


Abb. 6.1: Einschätzung des Krankheitsbildes bei geringem Schaden nach Olofsson und Qvarnström, 1986: 0.1%, 0.5% bzw. 1.0% der Blattfläche ist befallen.

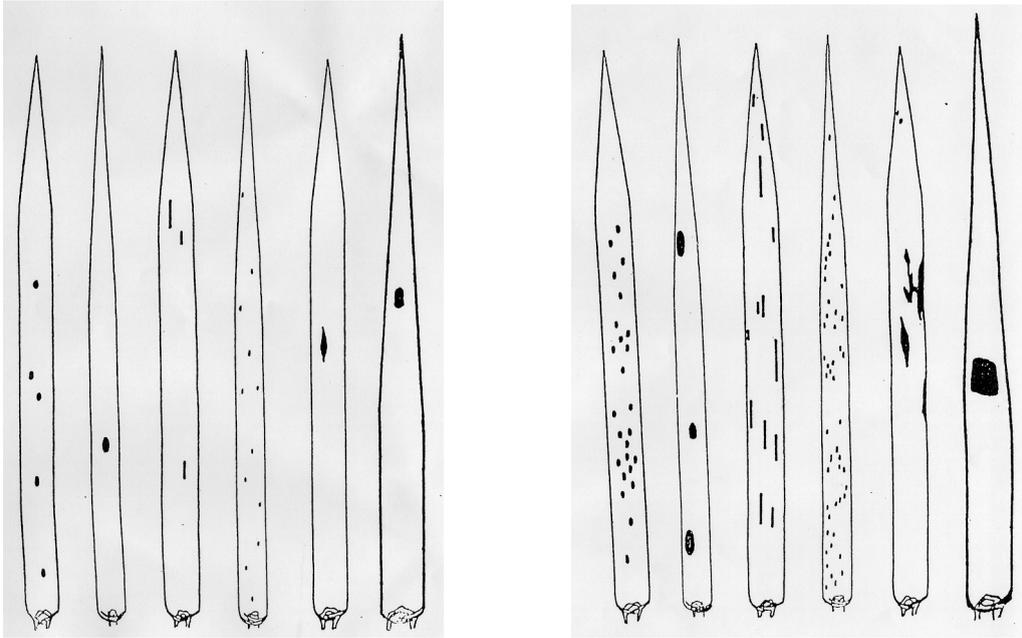


Abb. 6.2: Linke Seite: 1 Prozent der Blattfläche ist befallen bzw. geschädigt, rechte Seite: 5 Prozent des Blattes sind geschädigt, nach Brooks, 1969.

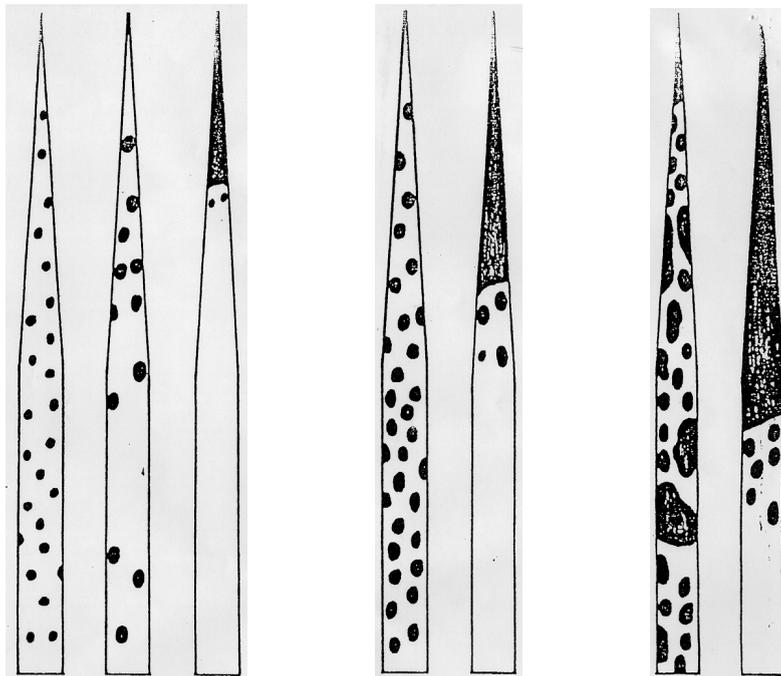


Abb. 6.3: Links: 10 Prozent der Blattfläche, Mitte: 25 Prozent, Rechts: 50 Prozent der Blattfläche ist befallen bzw. geschädigt, nach Brooks, 1969.

6.3 RNA-Isolierung mit Nucleon PhytoPure Extraction Kit, nach KIEFER ET AL., 2000 und nach CHANG ET AL., 1993

Folgende Methoden wurden ausgetestet:

- 1) Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe des Nucleon PhytoPure Extraction Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- 2) Modifizierung des Amersham Protokolls nach KIEFER ET AL., 2000
- 3) Methode nach CHANG ET AL., 1993

1) Für die Isolierung der RNA nach der Testvorschrift des Nucleon PhytoPure Kit for Plant DNA Extraction (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden 100 mg unter Stickstoff homogenisierten Blattmaterials in ein Probengefäß eingewogen und mit 600 µl Reagenz 1 gut gemischt. In den Herstellerangaben wurde darauf hingewiesen, dass die Proben nicht mit einem mechanischen Probenmischer geschüttelt werden sollten, um eine Zerstörung der RNA zu vermeiden. Alle Mischschritte wurden daher von Hand, bzw. mit der Pipette durchgeführt. Zu dem Ansatz wurden 200 µl Reagenz 2 zugegeben und die Probe solange gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Nach 10 min Inkubation bei 65°C unter Schütteln, wurde die Probe auf Eis für 10 min abgekühlt und anschließend mit 500 µl eisgekühltem Chloroform und 100 µl Nucleon PhytoPure DNA Extraktionsharz versetzt. Der Ansatz wurde gut durchmischt, 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 5 min bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß dekantiert, mit einem Volumenanteil kaltem Isopropanol (4°C) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 4°C und 20000 g wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 17.5 µl DEPC-H₂O_{bidest} resuspendiert. Zur Entfernung der DNA wurde 2.0 µl DNase Puffer und 0.5 µl DNase zugegeben und die Probe 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dem Ansatz wurden zwei Volumenanteile kaltes Isopropanol (4°C) zugegeben und anschließend wurde erneut 2 min bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde mit 1.0 ml 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen und abermals bei 5 min, 4°C und 20000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment an der Luft getrocknet und mit 50 µl DEPC-H₂O_{bidest} resuspendiert. Die gewonnene RNA wurde auf Reinheit und Konzentration nach der Beschreibung unter 2.9.2 untersucht.

2) Die Methode nach KIEFER ET AL, 2000, beruhte auf einer Modifizierung des unter 1) beschriebenen Protokolls. Es wurden 50 mg in einem Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiertes Blattmaterial in 500 µl auf 65°C erwärmten Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 2 % (w/v) PVP, 0.5 % Spermidin (w/v), 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol) eingewogen, gut gemischt und für 10 min unter Schütteln bei 65°C inkubiert. Es wurden 250 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1, v/v) zugegeben und zum Binden der Proteine und Blattrückstände 100 µl Nucleon PhytoPure DNA Extraktionsharz. Die Probe wurde für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 5 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und zur Erhöhung der Reinheit der RNA nochmals mit 125 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1, v/v) versetzt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 20000 g und 4°C, wurde die Probe in ein neues Gefäß dekantiert und die RNA mit zwei Volumenanteilen kaltem Isopropanols (4°C) gefällt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde die RNA bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Um die DNA aus der Probe zu entfernen, wurde das gewonnene Sediment in 17.5 µl DEPC-H₂O_{bidest.} resuspendiert und 2.0 µl DNase buffer und 0.5 µl DNase I (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und dann mit zwei Volumenanteilen kaltem Isopropanol (4°C) versetzt. Die Probe wurde gut gemischt und bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde mit 1 ml 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C, 20000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment an der Luft getrocknet. Um die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA zu überprüfen wurden 50 µl DEPC-H₂O_{bidest.} zugegeben und die Analytik wie in 2.9.2 beschrieben durchgeführt.

3) Methode nach CHANG ET AL, 1993: Zu 150 mg unter Stickstoff homogenisiertem Blattmaterial wurden 735 µl auf 65°C temperierten Extraktionspuffer (2 % (w/v) CTAB, 2 % (w/v) PVP, 100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.5 g l⁻¹ Spermidine) und 15 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Die Probe wurde gut gemischt und unter Schütteln 10 min inkubiert. Es wurde ein Volumenanteil Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1, v/v) hinzugefügt und die Phasen durch Zentrifugation bei 20000 g, 4°C und 10 min getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt und mit einem viertel Volumenanteil 10 M LiCl versetzt. Der Ansatz wurde gut durchmischt und zum Fällern für 15 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach Zentrifugation bei 20000 g, 4°C und 20 min wurde das Sediment in 75 µl SSTE (1 M NaCl, 0.5 % (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) gelöst und in einem Volumenanteil Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1, v/v) erneut extrahiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C, 20000 g und 10 min wurde der Überstand in ein neues Probengefäß überführt und ein Volumenanteil eiskaltes Isopropanol (-80°C) zugegeben. Für die Fällung wurde die Probe auf Eis für 5 min inkubiert und anschließend 20 min bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Ethanol (75 %, (v/v)) gewaschen und nochmals zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment an der Luft getrocknet. Nach Resuspension in 50 µl DEPC-H₂O_{bidest.} wurde die Reinheit und Konzentration der RNA wie unter 2.9.2 beschrieben bestimmt.

Tag	LBP						Ric						Tag		
1	1,05	0,70	0,59	0,45	0,50	0,64	0,91	0,44	0,42	0,46	0,56	0,60	1		
2	0,45	0,32	0,25	0,33	0,37	0,38	0,26	0,20	0,18	0,28	0,32	0,43	2		
3	0,51	0,44	0,42	0,69	0,59	0,65	0,51	0,32	0,36	0,68	0,57	0,61	3		
4	0,40	0,29	0,31	0,40	0,61	0,54	0,32	0,19	0,20	0,45	0,55	0,53	4		
5	2,32	1,65	1,55	0,23	0,31	0,41	1,69	1,45	1,00	0,32	0,43	0,46	5		
6	0,97	0,70	0,88	0,27	0,30	0,44	1,09	0,73	0,69	0,30	0,47	0,41	6		
7	0,75	0,52	0,43	0,26	0,54	0,54	0,51	0,32	0,41	0,42	0,45	0,50	7		
8	0,18	0,13	0,08	0,24	0,24	0,31	0,11	0,11	0,09	0,22	0,26	0,25	8		
9	1,70	1,23	1,04	0,66	0,69	0,65	1,25	0,72	0,66	0,53	0,64	0,54	9		
10	2,88	1,71	1,00	0,71	1,04	0,80	1,54	0,74	0,61	0,57	0,59	0,47	10		
11	3,97	3,29	2,13	0,71	0,77	0,79	2,46	2,22	1,32	0,53	0,70	0,73	11		
12	0,78	0,40	1,45	0,31	0,32	0,46	0,67	0,38	0,47	0,33	0,42	0,42	12		
13	1,78	1,13	0,89	0,73	0,98	1,07	1,19	0,86	0,66	0,66	0,91	0,93	13		
14	1,23	0,83	0,86	0,56	0,55	0,59	0,91	0,54	0,69	0,49	0,52	0,50	14		
15	1,91	1,55	1,04	0,65	1,19	1,80	2,29	1,22	0,90	0,70	1,05	2,19	15		
16	0,73	0,52	0,35	0,41	0,53	0,55	0,53	0,34	0,33	0,51	0,44	0,48	16		
17	0,42	0,24	0,19	0,24	0,26	0,35	0,34	0,21	0,21	0,30	0,36	0,33	17		
18	0,50	0,28	0,29	0,51	0,58	0,60	0,39	0,49	0,39	0,52	0,79	0,76	18		
19	1,18	0,85	0,76	0,33	0,52	0,59	0,88	0,72	0,38	0,44	0,44	0,52	19		
20	0,42	0,26	0,33	0,35	0,48	0,78	0,35	0,27	0,30	0,45	0,54	0,54	20		
21	0,15	0,23	0,11	0,36	0,26	0,44	0,13	0,12	0,12	0,31	0,32	0,32	21		
22	9,94	5,44	3,42	0,50	0,70	0,75	6,62	3,42	2,87	0,58	0,68	0,68	22		
23	5,11	3,33	1,60	1,22	2,04	2,06	4,23	2,35	1,54	1,54	1,34	1,70	23		
24	0,31	0,29	0,25	0,21	0,25	0,34	0,23	0,23	0,19	0,26	0,32	0,31	24		
25	0,12	0,07	0,04	0,07	0,09	0,11	0,07	0,04	0,02	0,07	0,12	0,08	25		
26	3,10	2,71	1,75	0,54	0,56	0,66	1,94	2,24	1,37	0,59	0,49	0,50	26		
27	0,59	0,46	0,46	0,52	0,43	0,58	0,47	0,33	0,33	0,51	0,45	0,42	27		
28	1,81	0,99	1,47	0,95	1,11	1,89	1,78	0,98	0,96	1,41	1,32	1,35	28		
29	0,86	0,70	0,81	1,01	0,78	0,96	0,93	0,68	0,59	0,90	0,82	0,92	29		
30	6,82	3,41	2,08	1,23	1,67	1,37	5,06	2,74	2,09	1,03	1,20	1,12	30		
31	2,87	3,44	2,11	1,23	0,89	0,79	2,88	2,74	2,13	1,04	0,67	0,68	31		
32	1,28	0,87	0,77	0,92	1,05	1,50	1,20	0,80	0,72	1,01	1,04	1,08	32		
33	0,34	0,32	0,26	0,29	0,32	0,34	0,23	0,21	0,22	0,35	0,34	0,32	33		
34	4,98	4,15	3,15	1,90	1,85	1,78	3,53	2,20	2,58	1,68	1,31	1,27	34		
35	0,51	0,41	0,45	0,49	0,52	0,50	0,53	0,45	0,53	0,65	0,65	0,49	35		
36	0,81	0,47	0,75	1,02	0,99	1,08	0,77	0,65	0,81	0,92	1,17	0,88	36		
37	0,34	0,24	0,34	0,55	0,48	0,57	0,30	0,23	0,25	0,49	0,54	0,39	37		
38	0,59	0,28	0,23	0,25	0,27	0,42	0,39	0,19	0,17	0,35	0,37	0,33	38		
39	0,02	0,00	0,13	0,56	0,52	0,56	0,00	0,00	0,00	0,54	0,69	0,77	39		
40	1,49	0,91	0,81	0,55	0,56	0,64	0,64	0,49	0,41	0,46	0,51	0,51	40		
41	1,89	1,04	0,99	1,37	1,57	1,89	1,14	0,76	0,70	1,35	1,37	1,32	41		
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	8	10	12
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	8	10	12

Abb. 6.5: Relative Genexpressionen der untersuchten Stoffwechselwege aus dem Freilandversuch im Jahr 2002: Gen 1-9 Phenylpropan- /Flavonoidstoffwechsel, Gen 10-21 Oxidativer Stress, Gen 22-23 Ethylenbiosynthese, Gen 24-32 „Pathogenesis related“ PR-Proteine, Gen 33-40 Signalübertragung, Gen 39-40 Photosynthese, Gen 41 DNA-Photoreparatur, siehe 2.9.3.1, Abb. 2.12