

Versuche mit (herbstlichen) Blattpigmenten Bunter Abfall

BRUNO P. KREMER



Gegen Ende der Vegetationsperiode inszeniert die heimische Gehölzflora ein beachtliches Farbspektakel: Vor dem herbstlichen Blattfall stellen die sommergrünen Sträucher und Bäume ihr Erscheinungsbild unübersehbar auf eine vielstufige farbliche Bandbreite zwischen verhaltenem Käsegelb und flammendem Karminrot um.

Die fast bis zur Aufdringlichkeit gesteigerte Farbigkeit mancher Gehölze bietet Anreiz, dies nicht nur als dekorative Beigabe der Herbstwochen und somit ausschließlich visuell zur Kenntnis zu nehmen, sondern auch unterrichtlich in einigen einfachen qualitativen Versuchen aufzugreifen. Dabei wäre auch der biologische Hintergrund der in der Phänologie der betreffenden Arten offensichtlich fest verankerten Umfärbereignisse und die Bedeutung der geradezu dramatischen, in vergleichsweise kurzer Zeit ablaufenden Veränderungen zu klären. Dieses Thema erweitert eine zunächst vielleicht nur als trivial empfundene Naturerfahrung um wesentliche Informationen und kann

diese erforderlichenfalls bis in die molekulare Dimension vertiefen. Außerdem bieten die hier vorgeschlagenen und ohne nennenswerten technischen Aufwand durchzuführenden Einzelexperimente in ihren Ergebnissen ebenso viel Vielfalt wie der Gegenstand der Betrachtung selbst. Schon allein aus diesem Grunde sollte gerade der Umgang mit pflanzlichen Pigmenten zum unverzichtbaren Standardrepertoire der Schulversuche gehören [1, 2, 8].

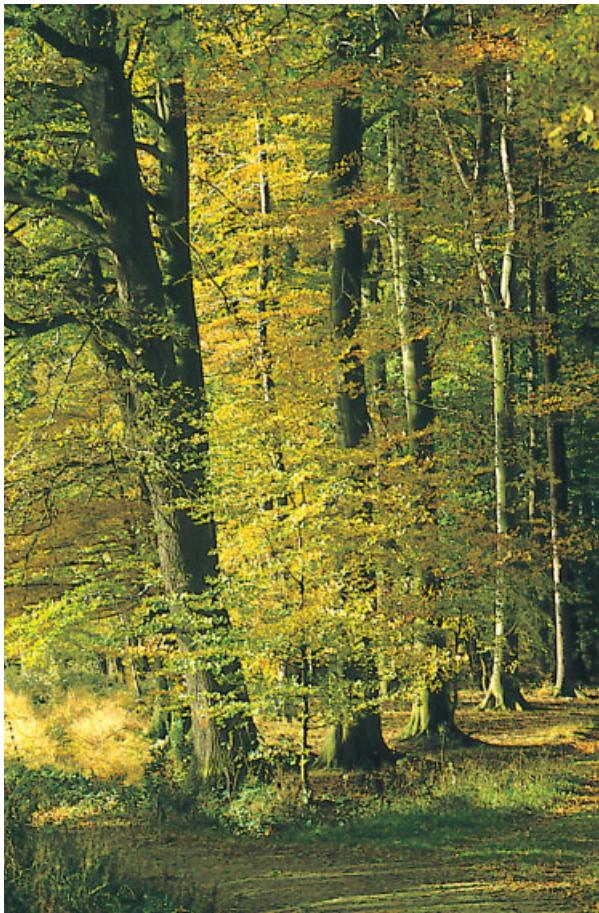
Planmäßige Inszenierung

Die enge zeitliche Koppelung der herbstlichen Laubfärbung mit dem Zeitpunkt des planmäßigen Blattabwurfs verdeutlicht, dass die Umfärbereignisse in den Blättern in ursächlichem Zusammenhang zu sehen sind mit dem Stoffwechsel der alternden und in absehbarer Zeit auszurangierenden Blattmasse [3]. Wichtiger Signalgeber dieser Ereignisfolge, die letztlich der rechtzeitigen Vorbereitung der Pflanzen auf die Winterruhe dient [4], ist die abnehmende Tageslänge, welche die photoreaktiven Pflanzenteile planmäßig unter Kurztagbedingungen setzt. Bei Laubgehölzen, die dagegen künstlich unter einem wirksamen Langtagregime verbleiben wie etwa einzelne Kronensegmente von Straßenbäumen im direkten Lichtkegel der Straßenbeleuchtung, bleibt das photoperiodisch vermittelte Schalt-

ABB. 1 Furioses Finale: Die herbstliche Laubfärbung ist eines der phänologisch auffälligsten Ereignisse im Jahresgang – hier im Bild der Spitz-Ahorn (*Acer platanoides*).

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar erklärt.

ABB. 2 Chloroplasten wandeln sich in Gerontoplasten um. Der Laubwald versinkt in Gelb.



ereignis aus. Die Blätter der betreffenden Zweigbereiche sind – sofern zuvor keine strengen Nachtfroste eintreten – auch noch bis weit in den Dezember grün und weisen dabei sogar photosynthetische Aktivität auf.

Allgemeiner Konsens in der Bewertung der herbstlichen Laufärbung ist, dass die winterkahlen Gehölze vor der endgültigen Verabschiedung ihrer sommerlichen Produktionsorgane eine Art Materialrecycling einleiten, dazu einen großen Teil an N- und P-Komponenten aus dem Stoffbestand der Mesophyllzellen exportieren und den Depots zuführen. Bei Gehölzen kommen dafür vor allem die parenchymatischen Markstrahlen in Betracht. Auffälliges

äußeres Zeichen dieser Rückrufaktion ist der innerhalb von wenigen Tage vollzogene Abbau von Chlorophyll, während die in den Chloroplasten als photosynthetische ▶ Antennenpigmente vorhandenen Carotenoide vor Ort verbleiben. Sie stellen jetzt den Pigmentbestand der Blattplastiden, die nunmehr als Gerontoplasten (früher: Chromoplasten) bezeichnet werden. Das Ergebnis sind gelb verfärbte Wälder (Abbildung 2). Die Logistik der Stoffverlagerung bildet sich im Blatt ab: Zunächst verfärben sich die Randbereiche, während die Säume entlang der Leitgewebeestränge (Blattnerven) zunächst noch grün bleiben (Abbildung 3). Bei diesem Ablauf sind bemerkenswerte Störfälle und Abweichungen zu beobachten (vgl. Diskussion in [6]). Andererseits begründet bei den Erlen (Gattung *Alnus*) die Wurzelsymbiose mit N-bindenden Bakterien offenbar eine besonders üppige Versorgung, die keine Sparmaßnahmen erfordert: Bei diesen Gehölzen fallen die Blätter immer grün ab.

Gelbe und rote Karte?

Rein quantitativ erklärt das Abzugsmanöver der grünen Blattfarbstoffe aber nur einen Teil des Erscheinungsbildes des Herbstlaubes vor allem der Lichtholzarten: Das prächtige Sattgelb etwa von Spitz-Ahorn, Rot-Buche oder Schwarz- beziehungsweise Hybrid-Pappel geht auf deutlich höhere Carotenoidmengen zurück, als zuvor im sommerlich grünen und photosynthetisch aktiven Blatt vorhanden waren. So ist die *Umfärbung* bereits bei den lipophilen Plastidenpigmenten zumindest anteilig auch eine Frage der *Ausfärbung* unter ergänzender Neusynthese. Ein besonderer physiologischer oder ökologischer Effekt dieser Ausfärbung ist kaum zu erkennen. Schattengehölze, die in ihrer C-Gesamtbilanz weniger begütert erscheinen, bauen auch die Kohlenwasserstoffskelette der Carotenoide ab und sehen, wie etwa die heimischen Holunder-Arten, im Herbst besonders blass aus.

Fallweise und zum Teil artspezifisch verfärbt sich das Herbstlaub indessen intensiv rot (Abbildungen 4 und 5). Dabei beladen sich die Vakuolen der Mesophyllzellen mit wasserlöslichen Pigmenten aus der Stoffklasse der Flavonoide, vor allem mit rötlichen Anthocyanten. Deren Kombination mit den Carotenoiden in den Gerontoplasten liefert auf der makroskopischen Ebene besonders leuchtende Farben zwischen Orange- und Flammenrot (vgl. Abbildungen 1 und 3).

Auch die Anthocyanbeladung der Vakuolen ist letztlich eine unnütze und Ressourcen verbrauchende Neusynthese. Im Unterschied zur Gelbfärbung durch (verbleibende) Carotenoide ist sie geradezu gegenläufig zur synchron stattfindenden Ausräumung der Blätter mit der Rettung recyclingfähiger N- und P-haltiger Baustoffe. Vermutlich stellt sie eine nicht mehr aufzuhaltende Überschussreaktion dar: Bei der Mobilisierung der gebundenen N-Reserven spielt das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase eine bedeutende Rolle, das offenbar gleichzeitig den ▶ Zimtsäureweg auf Touren bringt und diesen bis zur End-

ABB. 3 Schritt für Schritt: Die Hauptrouten für den Materialrücktransport bleiben am längsten funktionell.



station Anthocyan arbeiten lässt [9]. Andererseits antworten viele Pflanzen mit Anthocyan-Bildung auf besondere Stress-Situationen, etwa bei Parasitenbefall (viele Blattgallen sind kräftig rot) oder an Standorten intensiver Strahlungsbelastung bei gleichzeitiger Trockenheit, beispielsweise durch vorzeitiges Erröten der sukkulenten Blätter bei der Weißen Fetthenne (*Sedum album*) [3,4]. Bei den Herbstblättern könnte die zusätzliche Ausstattung der Mesophyllzellen mit Anthocyaneen einen gewissen Schutz der noch aktiven Chloroplasten und damit die Bewahrung ihrer photosynthetischen Restkapazität bedeuten – auffällig ist immerhin, dass die Blätter der exponierten äußeren Kronenbereiche eine ungleich intensivere Färbung zeigen als diejenigen im Kroneninneren oder an der Schattenflanke eines Baumes.

Bei der Bewertung des Phänomens ist jedoch außerdem zu berücksichtigen, dass Gehölze an Standorten mit vergleichsweise kalten Nächten bei hohem Strahlungsangebot während der Tage besonders lebhaft umfärben: Berg-Ahorn (*Acer pseudoplatanus*) oder Eberesche (*Sorbus aucuparia*) nahe der Baumgrenze in den Alpen bringen einen überaus kräftigen Farbakkord zu Stande, während sich das Laubwerk beider Arten im Tiefland eher unauffällig aus der Sommersaison ausklinkt.

Den mitteleuropäischen Gebirgsstandorten klimatisch vergleichbar sind die Laubwälder in den Neuenglandstaaten, wo das Pigmentaufgebot der Laubgehölze („indian summer“) jährlich einen beachtlichen Blattfärbungstourismus auslöst. Neben der Mitsteuerung der Verfärbung durch den aktuellen Witterungsverlauf ist daran sicherlich auch eine genetische Komponente beteiligt, denn als Parkgehölze in Mitteleuropa angepflanzte Baumarten wie Amerbaum (*Liquidambar styraciflua*), Tulpenbaum (*Liriodendron tulipifera*), Zucker-Ahorn (*Acer saccharum*) oder Rot-Eiche (*Quercus rubra*) zeigen generell eine ungleich prächtigere Gesamtfärbung als vergleichbare heimische Gehölzarten (Abbildung 6) [7].

Blattfarben im Schnelltest

Die nachfolgenden Versuchsanregungen thematisieren zwar die Färbung von grünen und umgefärbten Laubblättern im Herbst, lassen sich aber auch auf die Untersuchung von Blüten- sowie Fruchtpigmenten übertragen [8]. Sie orientieren rasch darüber, welche Komponenten der beiden Blattpigmentierungssysteme (lipochrome oder ▶ chymotrope Farbstoffe) am Erscheinungsbild einer Pflanze beteiligt sind (Abbildung 7) und beeinhalten insofern einfache quantitative Untersuchungen, die eine exakte stoffliche Analytik nicht ersetzen können.

Versuch 1

Trennung von Blattpigmenten im Zweiphasensystem

- Geräte

Reibschale (Mörser) mit Pistill, drei Reagenzgläser/ Reagenzglasständer, Faltenfilter, Glastrichter, Pipetten (2, 5, 10 ml), Peleusball



ABB. 4 Das intensive Karminrot im Blattwerk der Jungfernrebe (*Parthenocissus inserta*) ist kaum noch steigerungsfähig.



ABB. 6 Die aus Nordamerika stammende Rot-Eiche (*Quercus rubra*) bringt ungleich kräftigere Rottöne zu Wege als die heimischen *Quercus*-Arten.

- Chemikalien
96%iges Ethanol, Aceton, verdünnte Salzsäure (0,1 N HCl), Benzin (Feuerzeugbenzin), Quarzsand
- Versuchsobjekt
Kräftig grüne sowie bereits gelb-rötlich verfärbte Blätter beliebiger Laubholz-Arten
- Durchführung
Etwa 1-2 g Blattmaterial wird in der Reibschale zunächst trocken durch Zerreiben mit Quarzsand bis zur Pulverkonsistenz zerkleinert und anschließend mit 3-5 ml 96%igem Ethanol extrahiert. Die erhaltene Lösung (= Rohpigmentlösung) wird über einen Faltenfilter in ein trockenes, sauberes Reagenzglas filtriert. Sie sollte so konzentriert sein, dass sie tief dunkelgrün erscheint.

Herbstlich bunte Blätter beliebiger Arten (Vorschlag: Ahorn, Buche, Birke, Essigbaum, Felsenbirne, Jungfernrebe, Kirsche, Schneeball) zerkleinert man ebenfalls zuvor in der Reibschale und extrahiert sie dann jeweils in circa 5-10 ml der Mischung Ethanol (96%ig) - Aceton - 0,1 N HCl = 10 : 2 : 0,5.

Etwa 2 ml dieser Pigment-Lösung versetzt man in einem sauberen Reagenzglas mit circa 2 ml Benzin und schüttelt vorsichtig um, wobei eine Emulsion mit Tröpfchen-Feinstverteilung möglichst vermieden werden soll. Nach der gründlichen Vermischung gibt man aus der Spritzflasche rasch etwa 5 ml H₂O hinzu.

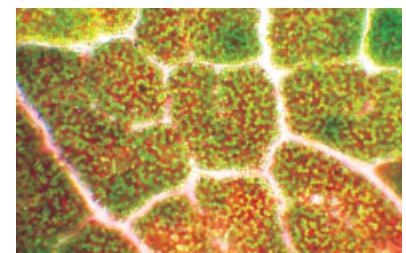
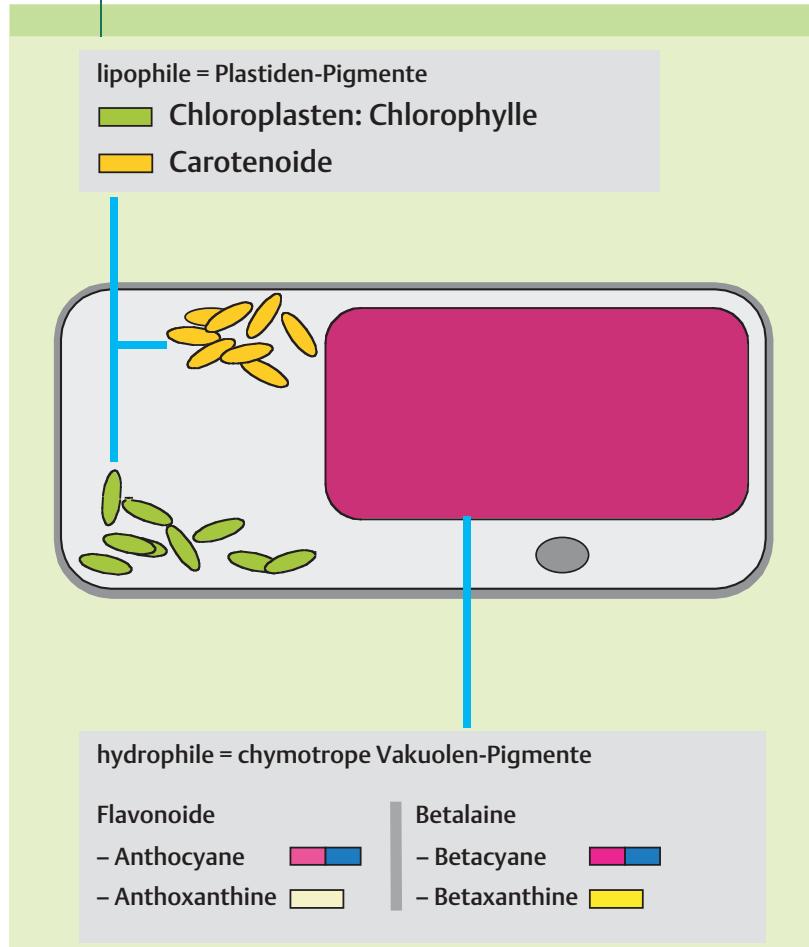


ABB. 5 Einzeln oder gruppenweise beladen sich die Vakuolen der dicht stehenden Mesophyllzellen im Palisadenparenchym mit Anthocyanaen.

ABB. 7 | VAKUOLEN-PIGMENTE



Das farbige Erscheinungsbild eines Pflanzenorgans bestimmen die lipochromen Plastidenpigmente in Chloroplasten und Chromo- beziehungsweise Gerontoplasten sowie die chymotropen Vakuolen-Pigmente, die entweder Flavonoide oder Betalaine darstellen. In der mitteleuropäischen Gehölzflora sind die letzteren Farbstoffe allerdings kaum und allenfalls in Blüten oder Früchten vertreten.

- Beobachtung
Sofort setzt im Reagenzglas nach erneutem Schütteln eine Phasentrennung in eine spezifisch leichtere Oberphase aus Benzin und eine schwere wässrige Unterphase (polar) ein. Damit einher geht eine Verteilung der Pigmente aus dem Rohextrakt (Abbildung 8). Die offensichtlich lipophilen (hydrophoben) Blattpigmente reichern sich innerhalb von Minuten in der apolaren Benzin-Oberphase an. Die wässrige und daher polare Unterphase bleibt wegen der eventuell nur unvollständig ablaufenden Entmischung vorerst noch milchig trüb.
Sofern herbstlich verfärbte Blätter extrahiert wurden, die größere Mengen an Anthocyanten enthalten, ist die wässrige Phase entsprechend intensiv rötlich verfärbt.
- Deutung und Auswertung
Wie ein Kontrollversuch sofort nachweist, lassen sich die an der Photosynthese beteiligten Plastidenfarbstoffe

aus normal grünen Blättern nicht wässrig extrahieren. Nach ihrem visualisierten Löslichkeitsverhalten sind sie somit lipophil (hydrophob) – sie liegen in den Chloroplasten grundsätzlich in Membranbindung und nicht als Vakuolenbestandteile vor.

Die aus den Vakuolen stammenden hydrophilen und chymotropen Blattpigmente wie die Anthocyane oder andere Flavonoide verbleiben dagegen nach der Phasenbildung ausschließlich in der Unterphase und färben diese intensiv rot. Je nach verarbeitetem Blattmaterial sind auch folgende Verteilungskonstellationen zu erwarten:

- Sofern die schon deutlich verfärbten Blätter während der Umfärbung noch restliche Chlorophylle enthalten, weist die lipophile Oberphase je nach Mengenanteil lichte oder kräftigere Grünnuancierungen auf, während die Unterphase die gesamte Fraktion der Vakuolenpigmente enthält („Grün/Rot-Koalition“, Abbildung 8 A).
- Viele Arten mit dramatischer Herbstfärbung kombinieren die Farbwirkung von plastidengebundenen Carotenoiden mit den Anthocyanten in den Vakuolen der gleichen oder benachbarter Zellen. In diesem Fall wird das Ergebnis der Zweiphasen-Trennung nach Ausschütteln eines Blattextraktes eine farbenfrohe „Gelb-/Rot-Koalition“ (Abbildung 8 B) sein.
- In der wässrigen Phase ist mit dieser Vorselektion der Blattpigmente allerdings nur die Gesamtheit aller Flavonoide zu erfassen. Eine Unterscheidung in rötliche Anthocyane und blassgelbe Anthoxanthine, denen die Ringsysteme der Flavone oder Flavonole zu Grunde liegen, ist auf diesem Wege nicht möglich. Gelb/blassgelb (Abbildung 8 C) gestufte Phasen zeigen sich allerdings bei Blättern, zu deren Stoffbestand auch wasserlösliche Anthoxanthine gehören, während Anthocyane fehlen. Solche Kombinationen sind vor allem bei Arten von Schattenstandorten zu erwarten.

Versuch 2

Zerlegung des Chlorophyll-Moleküls durch Verseifung

- Geräte
wie Versuch 1
- Chemikalien
konzentrierte methanolische Kalilauge (KOH) (= gesättigte KOH in 100%igem Methanol), Pigmentextrakt aus V1
- Durchführung
Die chlorophyllhaltige Oberphase aus der Schütteltrennung von Versuch 1 wird mit einer kleinkalibrigen Pipette (Pasteurpipette) vorsichtig abgenommen und in ein sauberes Reagenzglas überführt. Hier versetzt man sie anschließend mit etwa 1 ml methanolischer KOH und schüttelt kräftig durch.
Nachdem sich der Ansatz dabei kurzzeitig bräunlich verfärbt hat, kehrt innerhalb von etwa einer Minute

eine kräftige Grüntönung zurück – das kurzfristig gebildete ▶ Phaeophytin wird nun zum ▶ Chlorophyllid. Jetzt gibt man wiederum wie bei Versuch 1 etwa 3–5 ml H₂O aus der Spritzflasche hinzu.

- Beobachtung

Sofort erfolgt nach dieser Fraktionenmischung eine erneute Trennung in eine lipophile (hydrophobe) Ober- und eine hydrophile (lipophile) Unterphase ein. Im Unterschied zu Versuch 1 zeigt sich nunmehr als Versuchsergebnis, dass die aus Benzin bestehende Oberphase nur noch gelöste gelbliche Pigmente enthält, während die wässrige Unterphase kräftig hellgrün gefärbt ist (Abbildung 9).

- Deutung/Auswertung

Die fargebende Baugruppe der Chlorophyllmoleküle, das Tetrapyrrol- beziehungsweise Porphyrin-Ringsystem, verhält sich nach Abtrennung des langkettigen lipophilen Phyts durch Verseifung der Esterbindung mit dem Propionsäurerest von Ring III überraschend hydrophil und tritt daher bereitwillig in die wässrige Phase über (Abbildung 10). Der lipophile Bauteil Phyto, der unsichtbar in der Benzinphase verbleibt, dominiert das lipophile Verhalten des Chlorophyll-Gesamt moleküls und leistet im Wesentlichen seine Verankerung in der Lipidschicht der Thylakoidmembran sowie die Zusammenführung zu den Lichtsammelkomplexen der Photosysteme. Die Ringstruktur des Chlorophylls positioniert die Moleküle auf der hydrophilen Membranaußenseite (= Stromaseite) des Chloroplasten.

Die ebenfalls in der lipophilen Oberphase versammelten Carotenoide, die von der methanolischen KOH nicht verändert wurden, geben einen ersten Eindruck von den in normal grünen Blättern enthaltenen Mengen an Gelbpigmenten.

Versuch 3

Demonstration der Chlorophyll-Fluoreszenz

- Geräte

Diaprojektor (mit Halogenleuchte), Kantenprisma zur Spektralzerlegung von Licht, Auffangschirm aus weißem Karton, Stativmaterial

- Chemikalien

Blattextrakt aus Versuch 1

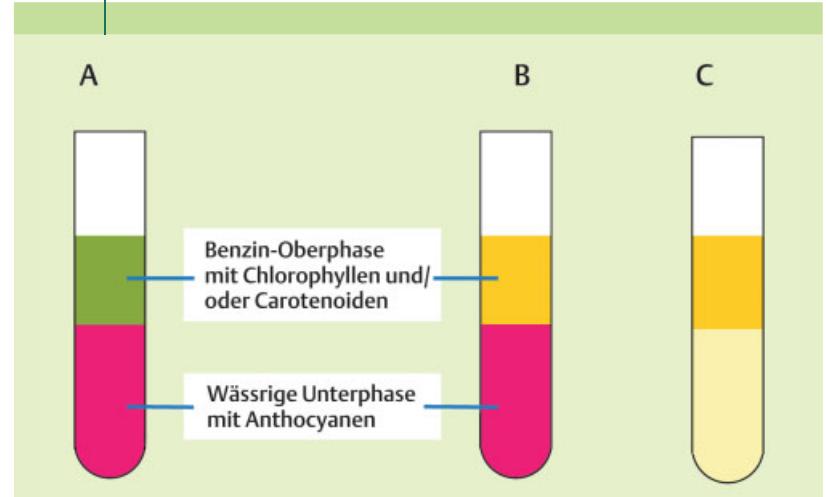
- Durchführung:

Etwa 2–3 ml der Pigmentlösung gibt man in ein sauberes und trockenes (!) Reagenzglas und verdünnt mit 96%igem Ethanol eventuell soweit, dass das Projektiorlicht hindurchtreten kann.

- Beobachtung

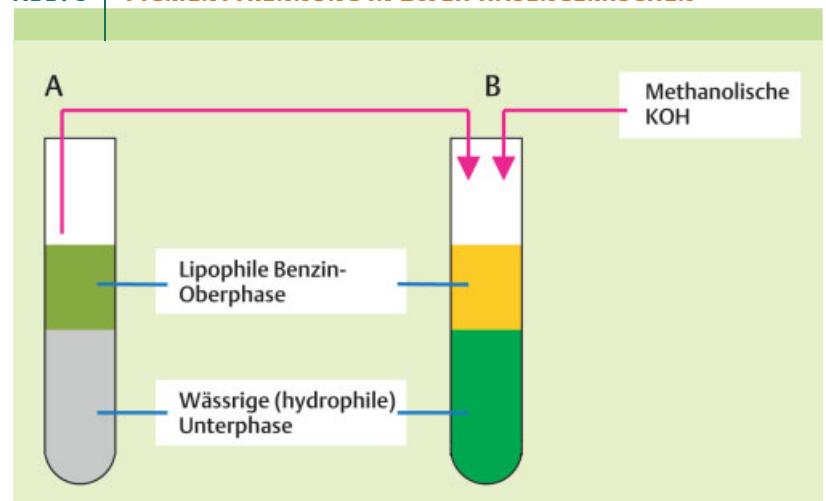
Im unveränderten Lichtkegel des Projektors (= Anregungslicht) ist bei seitlicher Betrachtung im abgedunkelten Raum eine eindrucksvolle Rotfluoreszenz der Chlorophylle zu erkennen. Der Effekt ist beträchtlich zu steigern, wenn man in den Strahlengang des Projek-

ABB. 8 | PIGMENTTRENNUNG IN ZWEIPHASENGEMISCHEN



A bei Anwesenheit restlicher intakter Chloroplasten neben Vakuolenpigmenten,
B nach Umwandlung der Chloroplasten zu Gerontoplasten und Vakuolenbeladung mit Anthocyanaen, **C** Gerontoplasten neben Anthoxanthinen in der Vakuole.

ABB. 9 | PIGMENTTRENNUNG IN ZWEIPHASENGEMISCHEN



A Ethanolischer Rohextrakt nach Ausschütteln mit Benzin, **B** lipophile Fraktion nach Behandlung mit methanolischer KOH (vgl. Versuche 1 und 2).

tors – etwa in den Diaschlitten – einen Blaufilter (Kobaltglas o.ä.) bringt.

Blaufilter schneiden bekanntlich den längerwelligen Anteil des Spektrums außerhalb ihrer Eigenfärbung durch Absorption weg. Das in der Chlorophyll-Lösung auftretende Rotsignal muss demnach seine Anregung aus dem eingestrahlten kurzweligen Wellenband beziehen.

- Deutung/Auswertung

Dieser Versuch verdeutlicht, dass die Lichtabsorption im lebenden Blatt der Energiebereitstellung für die nachgeschalteten Stoffumwandlungsreaktionen des ▶ Bassham-Calvin-Zyklus (CO₂-Bindung und -Reduktion) dient. Im Extrakt sind die Energie fortleitenden Struk-

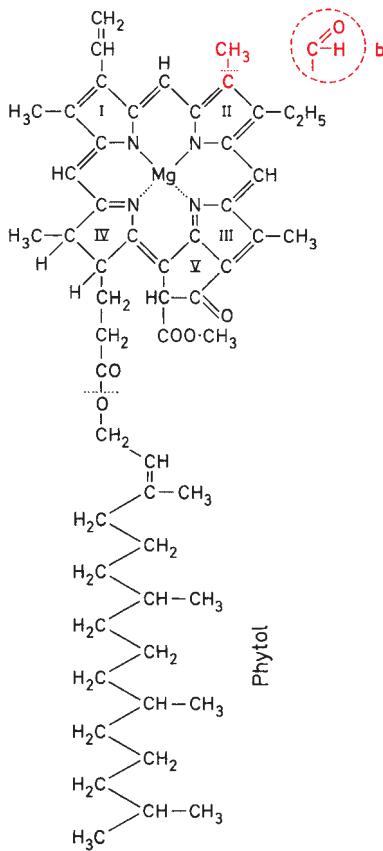


ABB. 10 Struktur der Chlorophylle a und b.

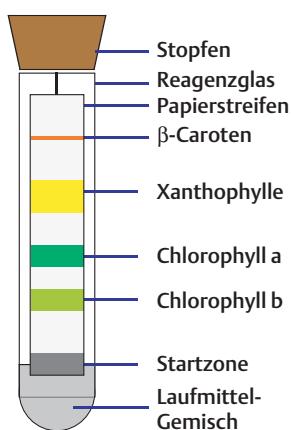


ABB. 11 Papierchromatographische Trennung lipophiler Blattpigmente im Reagenzglas (vgl. Versuch 4).

turen der Thylakoidmembran aufgrund der Extraktionsvorgänge zerstört. Einen Teil der nach wie vor absorbierbaren energiereichen (= kurzweligen) Anregungsstrahlung geben die gelösten Chlorophyll-Moleküle mit gewissem Energieverlust und deswegen als längerwelliges (= energieärmeres) Fluoreszenzlicht wieder ab. Desse Emissionsmaximum liegt bei 685 nm. Dieser Effekt fällt insbesondere bei sehr kurzwelliger Anregungsstrahlung so stark aus, dass man damit noch sehr geringe Chlorophyllmengen (beispielsweise bei kriminaltechnischen Untersuchungen) nachweisen kann.

- **Anschlussversuch**
Aus einer Pasteurpipette gibt man - während das Reagenzglas mit dem Blattrohextrakt im Strahlengang bleibt und seine prächtige Chlorophyllfluoreszenz zeigt - tropfenweise circa 1 ml H₂O hinzu. Sofort erlischt das Fluoreszenzsignal irreversibel (quenching effect): Die von den Pigmentmolekülen reemittierte Energie wird in nunmehr hydrophiler Umgebung von den Wasser-Dipolen als Wärme dissipiert.

Versuch 4

Papierchromatographische Trennung lipophiler Blattpigmente

- **Geräte**
Stativmaterial, großes Reagenzglas (50 ml) mit Korkstopfen und hakenförmig aufgebogener Büroklammer, Chromatographie-Papier (Whatman No. 1 oder Schleicher & Schüll 2043b Mgl), auf Streifen von circa 12 × 1,5 cm zugeschnitten, Becherglas (25 ml)
- **Chemikalien**
Trenngemisch (Laufmittel): Petrolether (Siedebereich 40–60 °C) : Petrolether (Siedebereich 50–70 °C) : Aceton (100%ig) = 8 : 2 : 1,6; Pigmentgesamtextrakt aus Versuch 1
- **Durchführung**
Das 50 ml-Reagenzglas befestigt man an einem Stativ und hängt

den fertig zugeschnittenen Streifen Chromatographie-Papier mithilfe einer aufgebogenen Büroklammer an einem Korkstopfen auf. Am Reagenzglas markiert man mit Filzschreiber einen Füllstrich etwa 3 mm oberhalb der Papierunterkante – bis zu dieser Markierung füllt man nach Entnahme des Papierstreifens das benannte Trenngemisch ein.

Der von Versuch 1 verbliebene Blattrohextrakt wird nun in ein kleines Becherglas (10 ml) umgefüllt. Das Chromatographie-Papier taucht man nun kurz in diese Pigmentlösung, so dass eine etwa 10 mm breite Startzone entsteht. Nach kurzer Zwischentrocknung wird dieser Vorgang noch einmal wiederholt.

Der völlig trockene (!), pigmentbeladene Papierstreifen wird nun vorsichtig und ohne Kontakt zur Gefäßwand in das mit Trenngemisch beschickte Reagenzglas gehängt, dass die Startzone nur mit ihren unteren 2–3 mm in das Laufmittel reicht.

- **Beobachtung**

Synchron mit dem raschen Laufmittelaufstieg im Papierstreifen setzt die unmittelbar zu verfolgende Trennung des Blattextraktes ein. Diese benötigt nur wenige Minuten. Die Reihenfolge der deutlich erkennbaren Farbzonen wird im Versuchsprotokoll notiert.

- **Deutung/Auswertung**

Wie die deutlich getrennten Farbzonen auf dem Papierstreifen zu erkennen geben (Abbildung 11), sind im Rhextrakt der Blätter verschiedene Pigmentgruppen enthalten. Das hier gewählte Trennsystem sortiert sie auf dem Chromatographiepapier nach dem Grad ihrer Lipophilie: Reine Kohlenwasserstoffe wie das in geringen Mengen immer vorhandene β-Caroten laufen mit der Laufmittelfront. In deutlichem Abstand folgen die sauerstoffhaltigen Xanthophylle (wie etwa Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin u.a.), die in diesem System nicht weiter zu trennen sind. Die Trennbarkeit der beiden farblich unterschiedlichen Chlorophylle (blaugrünes Chlorophyll a und gelbgrünes Chlorophyll b) beruht nur auf einem einzigen Sauerstoffatom in einer funktionalen Gruppe am Ring I. Etwaige im Extrakt vorhandene hydrophile Blattfarbstoffe wie die Anthocyane verharren jeweils in der Startzone.

Versuch 5

Dünnenschichtchromatographie lipophiler Blattpigmente

- **Geräte**
DC-Platten (mit Kieselgel beschichtet, beispielsweise Merck Nr. 5721 oder Riedel-de Haen Nr. 37600), Trennkammer für DC-Platten im Format 20 × 20 cm, Glaskapillaren oder Pipettenspitzen aus Kunststoff
- **Chemikalien**
Trenngemisch (Laufmittel): Benzin (= Petrolether, Siedebereich 100–140 °C) – 2-Propanol – Chloroform – Wasser = 90 : 10 : 70 : 0,3 (2-Propanol und H₂O zuerst mischen!)



ABB. 12 Farnpflanzen mit sommergrünen Megaphyllen zeigen im Allgemeinen keine betonte Herbstfärbung. Der Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) ist eher eine Ausnahme.

- Durchführung

Die Blattextrakte von Versuch 1 werden in 2 cm Abstand vom unteren Plattenrand mit einer Mikropipette oder Kapillare streifenförmig auftragen, ohne dass die ▶ Sorptionsschicht dabei nennenswert zerstört wird. Für den Direktvergleich von Pigmentextrakten aus unterschiedlichem Pflanzenmaterial wählt man strichförmige Auftragungen von etwa 3–5 cm Breite.

Die Trenndauer der Kieselgel-Platten im beschriebenen Laufmittelsystem nimmt etwa 60 min in Anspruch.

- Beobachtung

Die mit klarem Abstand zueinander aufgetrennten Farbstoffzonen lassen sich den benannten Pigmentklassen aus den Versuchen 1 und 4 zuordnen, wobei in diesem Fall zusätzlich eine Unterscheidung verschiedener Xanthophylle (ohne weitere Detailcharakterisierung) möglich ist.

- Anschlussversuch

Dieses Verfahren eignet sich hervorragend zur scharfbandigen Auf trennung auch von Blüten- oder Fruchtextrakten, die sehr zahlreiche Carotenoide beziehungsweise ihre Derivate (Glykoside) enthalten. Als besonders eindrucksvoll erweisen sich die so genannten Sekundärkarotenoide in Aceton-Extrakten aus küchenüblichem Paprikapulver oder getrockneten Tomaten. Ferner kann man die beschriebenen Trennungen im Halbmikromästab auch an Objektträgern durchführen, die mit Kieselgel G (beispielsweise Merck Nr. 7736) nach dem Eintauchverfahren beschichtet wurden.



ABB. 13 Die in der heimischen Flora seltene, allerdings in Zierteichen häufige Wassernuss (*Trapa natans*) zieht zum Saisonende alle farblichen Register.

Versuch 6

Dünnschichtchromatographie hydrophiler Blattpigmente

- Geräte

DC-Platten (mit Cellulose beschichtet, beispielsweise Macherey & Nagel MN 300), Trennkammer für DC-Platten im Format 20 × 20 cm oder 5 × 20 cm, Glaskapillaren oder Pipettenspitzen aus Kunststoff

- Chemikalien

Trenngemisch (Laufmittel): n-Butanol – Essigsäure – H₂O = 90 : 15 : 30

- Durchführung

Die aus der Vorreinigung eines Gesamtextraktes durch Zweiphasen-Gemische (Versuch 1) gewonnene Fraktion der Vakuolenfarbstoffe wird in 2 cm Abstand vom unteren DC-Plattenrand mit einer Mikropipette oder Kapillare streifenförmig auftragen. Nach Antrocknung der aufgetragenen Pigmentextrakte stellt man die DC-

GLOSSAR

Antennenpigmente: Komponenten der Lichtsammelzentren („Antennen“) in den Chloroplasten zur Absorption und Weiterleitung von Lichtenergie.

Bassham-Calvin-Zyklus: reduktiver Pentosephosphat-Zyklus, Reaktionsfolge mit Einbau von CO₂ in ein Akzeptormolekül und anschließender Reduktion zum Kohlenhydrat und Regeneration des CO₂-Akzeptors.

Chlorophyllid: Nach der hydrolytischen (in vivo durch Chlorophyllase katalysierten) Abspaltung der Phytol-Seitenkette an Ring IV aus dem Chlorophyllmolekül hervorgegangener Rest.

chymotrop: Chymotrope Farbstoffe (= Chymochrome) sind die im Zellsaft (Vakuole) gelösten Vertreter der Flavonoide und Betalaine.

Phaeophytin: Durch Abspaltung des Mg-Zentralatoms entstandenes Abbauprodukt des Chlorophylls.

R_f-Werte: In der Chromatographietechnik verwendete Maßzahl zur Kennzeichnung der Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes, meist angegeben als Quotient aus der Distanz Startlinie-Laufmittelfront : Startlinie-Substanzposition.

Sorptionsschicht: Stationäre Phase (poröse, trennende Schicht) in der Dünnschichtchromatographie.

Zimtsäureweg: Zimtsäure (= einfachste aromatische Monocarbonsäure, leitet sich von der Aminosäure Phenylalanin ab) ist die biosynthetische Vorstufe zahlreicher pflanzlicher Phenolverbindungen, darunter auch von Bauteilen des Flavonoid-Grundgerüstes.

Platte in das angegebene Laufmittelgemisch. Die Trenndauer in diesem System nimmt etwa 1-2 Stunden in Anspruch.

- Beobachtung

Die hydrophilen Herbstblattpigmente trennen sich je nach Herkunft in mehrere Farbstoffzonen, aber häufig mit nur einer Hauptkomponente auf, deren genauere Charakterisierung im Rahmen dieser Versuchsvorschläge keine Rolle spielt. Ebenso bleiben hier die eventuell vorhandenen Anthoxanthine unberücksichtigt. Im Rohextrakt vorhandene lipophile Pigmente verbleiben auf der Startzone.

- Deutung/Auswertung

Sollten Blätter von Pflanzen mit der Betalain-Alternative der Vakuolenbeladung ausgewählt worden sein (beispielsweise Blattstiele beziehungsweise Blatthauptrippen der Rote Bete (*Beta vulgaris*), ist mit diesem DC-Verfahren eine zuverlässige Unterscheidung zu den Anthocyanaen möglich: Während diese Flavonoide durchweg größere R_f -Werte aufweisen und auf der DC-Platte weit aufsteigen, bewegen sich die Betalaine nur wenige Millimeter von der Startzone weg. Unter den heimischen oder häufig angepflanzten Gehölzen finden sich keine Arten, die in ihren Laubblättern Betalaine führen.

Die vergleichende Umschau unter den Pflanzen im Herbst orientiert darüber, dass saisonal bedingte Blattverfärbungen nicht ausschließlich auf die Gehölze beschränkt sind, auch wenn diese landschaftsphysiognomisch am wirksamsten sind. Wenige Farne wie der Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) wandeln ihren Plastidenbestand in fahlgelbe Gerontoplasten um (Abbildung 12), während auch ungewöhnliche Stauden wie die Wassernuss (*Trapa natans*) eine lebhafte Herbstfärbung mit vollem Pigmentprogramm zeigen (Abbildung 13).

Zusammenfassung

Das imposante herbstliche Farbspektakel unmittelbar vor dem Blattfall fordert geradezu zu einer genaueren Beschäftigung mit den auffälligen Pigmentierungsphänomenen heraus. In vergleichsweise einfachen und wenig aufwändigen Versuchen zur Extraktion und Trennung ist eine sortierende Kennzeichnung der beteiligten Pigmentklassen (Chlorophylle, Carotenoide, Anthocyane und Betalaine) möglich.

Literatur

- [1] B. P. Kremer, M. Keil (Hrsg.), Experimente aus der Biologie. VCH, Weinheim 1993.
- [2] F. Hoffmann, S. Hoffmann-Tsay, Das Experiment. Ein Spiel mit Blütenfarben. BIUZ 1994, 24, 139–143.
- [3] P. Schopfer, A. Brennicke, Pflanzenphysiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1999.
- [4] W. Larcher, Ökophysiologie der Pflanzen, 5. Aufl. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart 1994.
- [5] S. Gan, R. M. Amasino, Making sense of senescence. Plant Physiology 1997, 113, 313–319.
- [6] T. Kleber-Janke, B. P. Kremer, Abschied auf Raten. Grüne Inseln im bunten Herbstlaub. BIUZ 1997, 27, 369–374.
- [7] B. P. Kremer, Bäume Mitteleuropas. Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart 1998, sowie: Bäume, Mosaik-Verlag, München 2001.
- [8] H. Bannwarth, B. P. Kremer, D. Massing, Stoffe und Stoffwechsel. Grundlagen, Abläufe, Experimente. Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden 1996.
- [9] H. W. Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996.

Der Autor

Bruno P. Kremer ist den BIUZ-Lesern bekannt.

Anschrift

Dr. Bruno P. Kremer, Universität zu Köln, Institut für Biologie und ihre Didaktik/Botanik, Albertus-Magnus-Platz 1, D-50923 Köln
E-mail: bruno.kremer@uni-koeln.de

