

Purpurweizen - geht's noch bunter?

Steigerung des Anthocyangehaltes in Blaukorn-×Purpurweizen Kreuzungen

Increase of the total amount of anthocyanins in progenies of blue aleurone×purple pericarp wheat crosses

Johanna Baron¹, Susanne Siebenhandl-Ehn², Sharifah Nabihah Binti Syed Jaafar³,
Stefan Böhmdorfer³, Thomas Rosenau³ und Heinrich Grausgruber^{1*}

Abstract

Anthocyanins in wheat grains are expressed either in the pericarp (purple pericarp) or aleurone layer (blue aleurone). Due to their antioxidant activity anthocyanins are of increasing interest for nutritionists, food scientists and plant breeders. Previous studies revealed that different anthocyanins are present in wheat varieties carrying genes either for the purple pericarp or the blue aleurone trait. It was hypothesized that the total concentration of anthocyanins could be increased by combining the different genes for purple pericarp and blue aleurone. Progenies from one-, three- and four-way crosses between red, purple and blue grained varieties were selected over several cycles by visual scoring of seed colour. In 2011 bulks were evaluated for their total anthocyanin content by UV-VIS spectrophotometry. The results showed that the majority of the progenies were within the range of the purple and blue grained check varieties, however, single bulks were identified with increased anthocyanin concentration. Further studies (e.g. HPLC-MS) are ongoing to confirm the combination of anthocyanins in these progenies and to test the environmental stability of the pigmentation.

Keywords

Anthocyanins, antioxidant capacity, blue aleurone, purple pericarp, *Triticum aestivum*

Einleitung

Anthocyane gehören zu den pflanzlichen Sekundärmetaboliten. In der Klasse der Flavonoide bilden sie die größte Gruppe der wasserlöslichen Pigmente. Ihr Farbspektrum reicht von rot über blau bis hin zu violett und schwarz (ANTAL et al. 2003). In Pflanzen haben Anthocyane zwei wesentliche Funktionen. Zum einen sind sie als Blütenfarbstoff für die Anlockung von Bestäubern verantwortlich, zum anderen haben sie antioxidative Eigenschaften (ESCRIBANO-BAILÓN et al. 2004). Die antioxidative Eigenschaft ist auch

für die menschliche Ernährung interessant. *In vitro* Versuche zeigten im Vergleich zu Vitamin C und E wesentlich höhere antioxidative Kapazitäten. Weitere ernährungsphysiologische Bedeutung erhalten die Anthocyane durch ihre antikanzerogene, antimikrobielle, entzündungshemmende und antithrombotische Wirkung. Sie erhöhen desweiteren das HDL Cholesterin, beeinflussen den Blutdruck und Blutzucker und können die Dunkeladaptation des menschlichen Auges verbessern. Zu den bisher durchgeführten Studien ist allerdings anzumerken, dass es sich vielfach um *in vitro* Versuche handelte und die Konzentration der Anthocyane oftmals über der physiologisch verwertbaren lag. Dies ist vor allem auf die geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane zurückzuführen. Die ernährungsphysiologischen Effekte der Anthocyane können deshalb derzeit nicht sicher bewertet werden (WATZL et al. 2002, ANTAL et al. 2003).

Getreide ist eines der Hauptnahrungsmittel der Welt. Aufgrund der positiven Eigenschaften der Anthocyane und der immer größer werdenden Bedeutung gesunder Ernährung, werden blau- oder violettkörnige Weizen immer interessanter. Erstmals wurde blaukörniger Weizen wahrscheinlich in einem Brief mit Probenmaterial von Georg Kattermann, Freising, an Erich Tschermak von Seysenegg, Wien, erwähnt (KATTERMANN 1929). Ob diese Probe Ausgangsmaterial für die genetische Ressource Tschermaks Blaukorn war ist ungeklärt. Violette Weizenkörner wurden bereits zuvor vom Forschungsreisenden Johann Maria Hildebrandt von der Küste des Roten Meeres nach Europa gebracht.

Diese wurden 1879 der Öffentlichkeit vorgestellt, konnten jedoch aufgrund ihres schlechten Zustands nicht mehr ausgesät werden. Der violettkörnige Hartweizen wurde als *Triticum durum* var. *arraseita* klassifiziert (WITTMACK 1906, ZEVEN 1991). Erste züchterische Arbeiten wurden 1913 in Cambridge durchgeführt mit Material, welches 1905 aus Abessinien eingeführt wurde (CAPORN 1918). Durch mehrmalige Rückkreuzungen mit einer adaptierten Sorte in Neuseeland entsteht aus diesem Material 1981 die erste zugelassene hexaploide Purpurweizensorte Konini (COPP 1965, GRIFFIN 1987).

¹ Universität für Bodenkultur, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung für Pflanzenzüchtung, Konrad Lorenz Str. 24, A-3430 TULLN

² Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Inst. für Lebensmitteltechnologie, Muthgasse 18, A-1190 WIEN

³ Universität für Bodenkultur, Department für Chemie, Abteilung für Organische Chemie, Holz-, Zellstoff- und Faserchemie, Konrad Lorenz Straße 24, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Heinrich GRAUSGRUBER, heinrich.grausgruber@boku.ac.at



Bei den blaukörnigen Varietäten liegen die Anthocyane in der Aleuronschicht. Im Gegensatz dazu sind sie bei violettkörnigem Weizen in der Samenschale zu finden. Für die Ausprägung des blauen Aleurons (*blue aleurone*) sind zwei Gene verantwortlich (*Ba1* und *Ba2*). *Ba1* hat seinen Ursprung in der Quecke (*Agropyron* sp.); das Gen liegt in Chromosomentranslokationen (4BS·4EL oder 4BS·4BL-4EL) vor. *Ba2* stammt aus dem (wilden) Einkorn (*T. monococcum/boeoticum*) und ist als Chromosomensubstitution, (4A)4A^m bzw. (4B)4A^m, vorhanden (JAN et al. 1980, ZELLER et al. 1990, MORRISON et al. 2004). Für die violette Samenschale (*purple pericarp*) sind mehrere Gene beschrieben: *Pp1*, *Pp3a* und *Pp3b* (ehemals als *Pp2* bezeichnet). Die Gene liegen auf den Chromosomen 2A und 7B (DOBROVLSKAYA et al. 2006). Von PIECH und EVANS (1978) und LI et al. (2010) wurde auch ein Gen auf Chromosom 3A lokalisiert.

Die Merkmale blaues Aleuron bzw. violette Samenschale wurden zunächst hauptsächlich als genetische Marker verwendet. So kamen sie beispielsweise in der Hybridzüchtung zum Einsatz (BARABÁS 1992, ZHOU et al. 2006), zur Bestimmung der Auskreuzungsrate (GRIFFIN 1987, HUCL und MATUS-CÁDIZ 2001, MATUS-CÁDIZ et al. 2004, HANSON et al. 2005, LAWRIE et al. 2006) oder zur Trennung verschiedener Weizenqualitäten (JENSEN et al. 1962, ST PIERRE et al. 1980). MORRISON et al. (2004) entwickelten auch ein Protokoll zur Auffindung von Apomixis in Weizen. Innovative Lebensmittel aus violettkörnigen Weizen wurden erstmals in Neuseeland auf den Markt gebracht (LINDLEY und LARSEN 1997). Seit 2006 gibt es mit der Marke PurPur auch in Österreich Vollkornprodukte aus Purpurweizen (GRAUSGRUBER et al. 2006a, BACKALDRIN 2008).

ABDEL-AAL et al. (2006) und GRAUSGRUBER et al. (2006b) zeigten mit HPLC, dass die vorhandenen Anthocyane von blau- und violettkörnigen Weizen unterschiedlich sind. Eine Steigerung des Gesamtanthocyangehaltes durch gezielte Kombination unterschiedlicher Anthocyanenetik sollte somit möglich sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob diese Hypothese in ausgewählten Nachkommenschaften von Blaukorn-×Purpurweizen Kreuzungen bestätigt werden kann.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Es wurden 15 Standardsorten (10 Purpur, 5 Blaukorn) sowie 76 Linien aus Einfach-, Dreiwege- und Doppelkreuzungen (Tabelle 1) untersucht. Bei Eltern und Nachkommenschaften handelte es sich sowohl um Winter- als auch Sommerweizen. Alle Proben stammten aus der Ernte 2011 vom Standort Raasdorf der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf der Universität für Bodenkultur.

Chemische Analysen

Für die Extraktion der Anthocyane wurde das Probenmaterial mit einer Zyklonmühle (Modell Twister, Retsch, Haan) bei 12000 U·min⁻¹ und einem 1 mm Siebeinsatz vermahlen. Bis zur Extraktion wurde das Vollkornmehl bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Untersuchte Kreuzungskombinationen von violett- (Pp), blau- (Ba) und rotkörnigen (R) Weizen (reziproke Kombinationen nicht extra ausgewiesen)

Table 1: Analysed cross combinations of purple (Pp), blue (Ba) and red (R) grained wheat (reciprocal crosses are not indicated separately)

Einfachkreuzung	Dreiwegekreuzung	Doppelkreuzung
<i>R×Ba</i>	$(R×R)×Pp$	$(R×Ba)×(Ba×Pp)$
<i>R×Pp</i> ¹	$(R×Ba)×Pp$	$(R×Pp)×(R×Pp)$
<i>Ba×Pp</i>	$(R×Pp)×Ba$	$(R×Pp)×(Ba×Ba)$
	$(R×Pp)×Pp$	
	$(Ba×Ba)×Pp$	
	$(Ba×Pp)×R$	

¹inkl. einer tetraploiden Kreuzung

Die Anthocyanextraktion wurde mit leichten Veränderungen wie bei ABDEL-AAL und HUCL (1999) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde 1 g Vollkornmehl in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon™-Typ) eingewogen und 8 ml Lösungsmittel (MeOH:1 M HCl, 85:15, v/v, pH 0,95±0,05) hinzugefügt. Die Lösung wurde am Vortex Schüttler und anschließend auf einem Schüttler bei 150 U·min⁻¹ für 30 min inkubiert. Zur Trennung des Überstandes vom Feststoff wurden die Proben 5 min bei 4000 U·min⁻¹ zentrifugiert (Centrifuge 5810, Eppendorf AG, Hamburg). Die Überstände wurden in einem 25 ml Messkolben gesammelt und nach dreimaliger Extraktion auf das Endvolumen mit Lösungsmittel aufgefüllt.

Der Gehalt der Anthocyane wurde spektrophotometrisch bestimmt. Für die Kalibrierung des Spektrophotometers (U-1100, Hitachi Ltd., Tokyo) wurde das Standardpigment Cyanidin-3-glukosid (Extrasynthese, Genay) verwendet. Die Extrakte wurden bei einer Wellenlänge von 525 nm gegen das reine Lösungsmittel gemessen. Der Gesamtanthocyangehalt (TAC) in mg C-3-glc-Äquivalente·100 g⁻¹ Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$TAC = \frac{\Delta E + 0,0556}{0,0761} \times \frac{\text{Extraktvolumen (mL)}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1}{\text{Einwaage (g)}} \times \frac{100}{TM (\%)}$$

Die gesamte TAC Variationsbreite wurde in neun Klassen aufgeteilt und die Frequenz der Kreuzungslinien in den entsprechenden Anthocyanklassen bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Ein Großteil der Kreuzungslinien haben Anthocyangehalte, die im Bereich der violett- bzw. blaukörnigen Standardsorten liegen (Abbildung 1). Es gibt jedoch auch Nachkommen, die höhere Anthocyangehalte als die *Ba* und *Pp* Standardsorten aufweisen, sowie weissekörnige (*r*) Nachkommen mit Gehalten niedriger als die rotkörnigen (*R*) Sorten. Der Gesamtgehalt an Anthocyanen konnte somit tatsächlich in manchen Linien durch die gezielte Kombination der *blue aleurone* und *purple pericarp* Genetik gesteigert werden. Eine weitere Steigerung des Anthocyangehaltes dürfte durchaus noch möglich sein, da die Pigmentierung der analysierten Proben (Ramsche mehrerer Ähren) teilweise noch nicht ganz einheitlich war. Die Linien sind hinsichtlich der Kornfarbe noch nicht vollständig homogen.

Ob die erhöhten Anthocyangehalte tatsächlich auf eine Kombination der Anthocyanenspektren von blau- und vio-

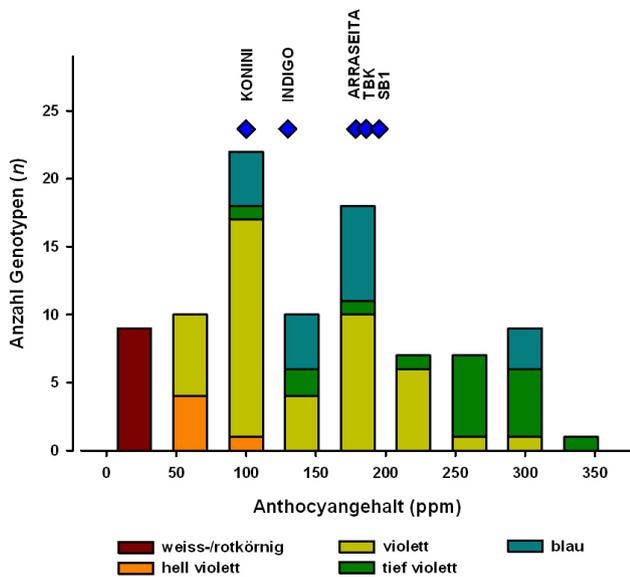


Abbildung 1: Anthocyangehalt (ppm) ausgewählter Standard-sorten und der Kreuzungslinien (Anzahl Linien in entsprechenden Anthocyan-Klassen; Kornfarbe entsprechend visueller Bonitur)

Figure 1: Total anthocyanin content (ppm) of selected check varieties and offspring (frequency of breeding lines in anthocyan classes; seed colour according to visual scoring)

lett-körnigen Weizen zurückzuführen ist wird derzeit mittels HPLC-MS überprüft. Erste Ergebnisse bestätigen die Kombination verschiedener Anthocyane für einzelne Genotypen die auf Grund der visuellen Kornbonituren (Abbildung 2) als tief violett eingestuft wurden. Die Selektion durch die visuelle Bonitur der Kornfarbe ist allerdings nur bedingt erfolgreich: zwar besitzt die Mehrheit der Genotypen mit hohen Gehalten eine tiefviolette Kornfarbe, es wurden aber auch Genotypen identifiziert die nur als violett bzw. blau eingestuft wurden und dennoch sehr hohe Anthocyangehalte zeigten. Umgekehrt wurden vereinzelt Genotypen als tief violett bonitiert deren Anthocyangehalt nur durchschnittlich ist (Abbildung 1). Neben den bekannten Hauptgenen dürfte die Intensität der Kornfarbe auch von Umwelteinflüssen und dem genetischen Hintergrund (pleiotropische bzw. epista-



Abbildung 2: Unterschiedliche Intensitäten der Kornfarbe: weiss, rot, hell violett, tief violett, blau, violett (im Uhrzeigersinn von links oben)

Figure 2: Different intensities of seed colour: white, red, light purple, dark purple, blue, purple (clockwise from top left)

tische Effekte) abhängig sein (DOBROVOLSKAYA et al. 2006, McINTOSH et al. 2008). Eine sichere Identifizierung der unterschiedlichen Gene wäre auch mit Hilfe molekularer Marker möglich, allerdings sind bisher nur für einige Gene molekulare Marker beschrieben (DUBCOVSKY et al. 1996, DOBROVOLSKAYA et al. 2006, SINGH et al. 2007, KHLESTKINA et al. 2010, LI et al. 2010).

Wie bereits erwähnt wird die Anthocyan-Biosynthese neben der Genetik auch von der Umwelt beeinflusst. Umwelteinflüsse die die Anthocyan-Biosynthese steigern können sind z.B. erhöhte UV-B Einstrahlung, kalte Temperaturen, Trockenstress und Ozonbelastung (CHALKER-SCOTT 1999). Durch das Auffinden optimaler Produktionsgebiete für die einzelnen Genotypen könnte somit ebenfalls eine höhere Konzentration an Anthocyanen erreicht werden.

Danksagung

Der Dank geht an Robert Metzger (OSU, Corvallis), Harold Bockelman (USDA-ARS, Aberdeen), Andreas Börner (IPK, Gatersleben), Zdenek Stehno (RICP, Praha), Wolfgang Kainz (AGES, Linz) und Michael Mackay (AWCC, Tamworth) für die Bereitstellung von Ausgangsmaterial.

Literatur

- ABDEL-AAL ESM, HUCL P, 1999: A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem* 76: 350-354.
- ABDEL-AAL ESM, YOUNG JC, RABALSKI I, 2006: Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J Agric Food Chem* 54: 4696-4704.
- ANTAL DS, GÁRBAN G, GÁRBAN Z, 2003: The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *Ann Univ Dunarea de Jos Galati VI - Food Technol* 26: 106-115.
- BACKALDRIN, 2008: PURPUR-ne Geheimnisse. Presseinformation, Backaldrin Österreich - The Kornspitz Company GmbH, Asten.
- BARABÁS Z, 1992: A new era in the production of hybrid varieties? *Hung Agric Res* 1 (3): 17-21.
- CAPORN ASC, 1918: On a case of permanent variation in the glume lengths of extracted parental types and the inheritance of purple colour in the cross *Triticum polonicum \times *T. eloboni*. *J Genet* 7: 259-280.*
- CHALKER-SCOTT L, 1999: Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Phytochem Photobiol* 70: 1-9.
- COPP LGL, 1965: Purple grain in hexaploid wheat. *Wheat Inf Serv* 19-20: 18.
- DOBROVOLSKAYA O, ARBUZOVA VS, LOHWASSER U, RÖDER MS, BÖRNER A, 2006: Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 150: 355-364.
- DUBCOVSKY J, LUO MC, ZHONG GY, BRANSTEITTE R, DESAI A, KILIAN A, KLEINHOF A, DVORAK J, 1996: Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics* 143: 983-999.
- ESCRIBANO-BAILÓN T, SANTOS-BUELGA C, RIVAS-GONZALO JC, 2004: Anthocyanins in cereals. *J Chromatography A* 1054: 129-141.
- GRAUSGRUBER H, SIEBENHANDL S, ETICHA F, BERGHOFER E, 2006a: Farbenspiel der Natur - Purpurgetreide. *Der fortschrittliche Landwirt* 9/2006: 60-61.
- GRAUSGRUBER H, SIEBENHANDL S, ETICHA F, BERGHOFER E, 2006b: Carotenoids and anthocyanins in wheat (*Triticum* sp.). *Vortr Pflanzenzüchtg* 69: 117-125.

- GRIFFIN WB, 1987: Outcrossing in New Zealand wheats measured by occurrence of purple grain. *NZ J Agric Res* 30: 287-290.
- HANSON BD, MALLORY-SMITH CA, SHAFII B, THILL DC, ZEMETRA RS, 2005: Pollen-mediated gene flow from blue aleurone wheat to other wheat cultivars. *Crop Sci* 45: 1610-1617.
- HUCL P, MATUS-CÁDIZ MA, 2001: Isolation distances for minimizing out-crossing in spring wheat. *Crop Sci* 41: 1348-1351.
- JAN CC, DVOŘÁK J, QUALSET CO, SOLIMAN KM, 1980: Selection and identification of a spontaneous alien chromosome translocation in wheat. *Genetics* 98: 389-398.
- JENSEN NF, TYLER LJ, DRISCOLL CJ, 1962: Markers for wheats of feed quality. *Ann Wheat Newsl* 8: 57-58.
- KATTERMANN G, 1929: Brief vom 17. Oktober an Professor Tschermak. Nachlass Erich Tschermak von Seysenegg, Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien.
- KHLESTKINA EK, RÖDER MS, BÖRNER A, 2010: Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). *Euphytica* 171:65-69.
- LAWRIE RG, MATUS-CÁDIZ MA, HUCL P, 2006: Estimating out-crossing rates in spring wheat cultivars using the contact method. *Crop Sci* 46: 247-249.
- LI XP, LAN SQ, ZHANG YL, LIU YP, 2010: Identification of molecular markers linked to the genes for purple grain color in wheat (*Triticum aestivum*). *Genet Resour Crop Evol* 57: 1007-1012.
- LINDLEY TN, LARSEN NG, 1997: Cereal processing in New Zealand. Inversion, diversification, innovation, management. In: Campbell GM, Webb C, McKee SL (Eds.), *Cereals - Novel uses and processes*, pp. 273-279. Plenum Press, New York.
- MATUS-CÁDIZ MA, HUCL P, HORAK MJ, BLOMQUIST LK, 2004: Gene flow in wheat at the field scale. *Crop Sci* 44: 718-727.
- McINTOSH RA, YAMAZAKI Y, DUBCOVSKY J, ROGERS J, MORRIS C, SOMERS DJ, APPELS R, DEVOS KM, 2008: Catalogue of gene symbols for wheat. [Internet: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/2008/>; verifiziert 20 Feb 2012]
- MORRISON LA, METZGER RJ, LUKASZEWSKI AJ, 2004: Origin of the blue-aleuron gene in Sebesta Blue wheat genetic stocks and protocol for its use in apomixis screening. *Crop Sci* 44: 2063-2067.
- PIECH J, EVANS LE, 1978: Monosomic analysis of purple grain colour in hexaploid wheat. *Z Pflanzenzüchtg* 82: 212-217.
- SINGH K, GHAI M, GARG M, CHHUNEJA P, KAUR P, SCHNURBUSCH T, KELLER B, DHALIWAL HS, 2007: An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* \times *T. monococcum* RIL population. *Theor Appl Genet* 115: 301-312.
- ST PIERRE CA, GAUTHIER FM, PELLETIER GJ, BASTIEN D, 1980: Le blé de printemps Laval-19. *Can J Plant Sci* 60: 723-725.
- WATZL B, BRIVIBA K, RECHKEMMER G, 2002: Anthocyane. *Ernährungs-Umschau* 49: 148-150.
- WITTMACK L, 1906: Violette Weizenkörner. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* 1906 (4): 103-108.
- ZELLER FJ, CERMEÑO MC, MILLER TE, 1990: Cytological analysis on the distribution and origin of the alien chromosome pair conferring blue aleurone color in several European common wheat (*Triticum aestivum* L.) strains. *Theor Appl Genet* 81: 551-558.
- ZEVEN AC, 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica* 56: 243-258.
- ZHENG Q, LI B, LI H, LI Z, 2009: Utilization of blue-grained character in wheat breeding derived from *Thinopyrum ponticum*. *J Genet Genomics* 36: 575-580.
- ZHOU K, WANG S, FENG Y, LIU Z, WANG G, 2006: The 4E-*ms* system of producing hybrid wheat. *Crop Sci* 46: 250-255.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.