

4. Ergebnisse

Dieses Kapitel ist in drei Teile untergliedert: Der Erste Teil fasst die Ergebnisse zur PPK-Expression in den transgenen Tabakpflanzen auf zwei Ebenen (mRNA und Protein) zusammen. Der zweite Teil gibt eine Übersicht über den Einfluss des Stickstoffangebots auf die Wachstumsparameter (Sprosslänge, Frischgewicht und Blattfläche), die Metabolitenkonzentration (Protein, Aminosäuren und Chlorophyll), den Samenertrag und die Expression bestimmter Enzyme, die in Verbindung mit der CO₂-Fixierung stehen. Im dritten Abschnitt folgen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Al-Toleranz (Inhibition des Wurzelwachstums, Ausscheidung von organischen Säuren aus den Wurzeln und Al-Akkumulation in Wurzelgewebe).

4.1. Überprüfung der PPK-Überexpression in den transgenen Tabakpflanzen

Im Rahmen der Doktorarbeit von A. Sheriff, 1994 (Linien 35S und Δ 35S) und der Diplomarbeit von R. Stenzel, 1997 (Linien B33 und Δ B33) wurden die transgenen Tabaklinien, die in den weiteren Versuchen benutzt wurden, hergestellt. Der Phänotyp der Tabakpflanzen, die die PPK überexprimieren, zeigt keine deutlichen Unterschiede im Habitus im Vergleich zum Wildtyp.

Zur Überprüfung des Vorhandenseins des *ppdk*-Transkriptes bzw. des PPK-Proteins in den transgenen Tabakpflanzen wurden Northern und Western Blots mit Wurzelgewebe durchgeführt. Die Keimlinge waren 7 Tage alt und sie wurden täglich mit einer Hoagland-Lösung (Hewitt, 1966) gegossen.

Für die Northern-Analyse wurde Gesamt-RNA aus den transgenen Tabakpflanzen, dem Wildtyp (negative Kontrolle) und *M. crystallinum* (positive Kontrolle) in einer Konzentration von 30 µg/Bahn eingesetzt. Ein Fragment von 1,3 kb der PPK-cDNA wurde als cDNA-Sonde genommen. Dieses Fragment ist von der *Pst*I-Restriktionschnitt-Stelle flankiert, d. h. zwischen den Positionen 993 und 2296 downstream des ATG-Start-Codons. Die steady-state Niveaus von überexprimierter *ppdk* mRNA aus *Mesembryanthemum crystallinum* in Tabakpflanzen als auch der

Kontrolle sind in der [Abb. 4-1A](#) dargestellt. Die mRNA Niveaus der transgenen Linien waren unterschiedlich und im Wildtyp wurde kein Signal entdeckt.

Bei der Western Blot Analyse wurden gleiche Proteinmengen (3 μg) eingesetzt, erster Antikörper war Anti-PPDK (Schmitt *et al.*, 1989). Alle untersuchten Pflanzen exprimierten das PPDK-Protein ([Abb. 4-1B](#)), die Signalintensität im Wildtyp war sehr schwach. Wenngleich das PPDK-Protein in den transgenen Tabakpflanzen überexprimiert war, gab es Unterschiede im PPDK-Niveau zwischen den transgenen Linien. Mit den Ergebnissen von densitometrischen Analysen der Signale wurde der Korrelationsgrad zwischen Protein und Transkript mittels linearer Regression bestimmt ([Abb. 4-1C](#)). Die steady-state Niveaus des PPDK-Polypeptids und des Transkripts korrelierten positiv in den transgenen Pflanzen (ca. $r^2 = 0,70$).

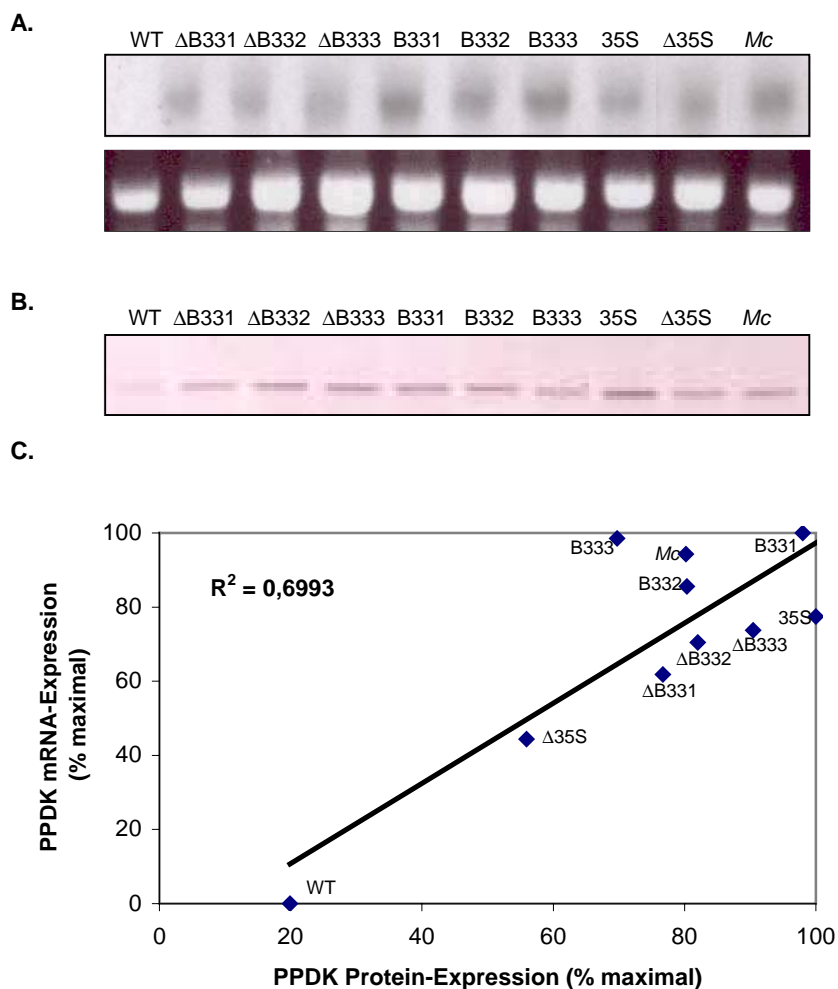


Abb. 4-1: Expressionsniveau des *M. crystallinum ppdk*-Gens in transgenen Tabakpflanzen (transkriptional und translational).

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

A. Northern-Blot Autoradiographie der Expression des *ppdk*-Gens aus *M. crystallinum* in Tabakpflanzen. Unter der Autoradiographie der *ppdk*-Transkriptanalyse ist ein Ausschnitt eines ethidiumbromidgefärbten Agarosegels mit rRNA zur Abschätzung der RNA-Gesamtmenge dargestellt. 30 µg RNA/Spur. B. Western-Blot mit Anti-PPDK-Antikörper. Darstellung des von transgenen Tabakpflanzen exprimierten PPDK-Proteins. 3 µg Protein/Spur. C. Korrelation der Expression der *M. crystallinum* PPDK auf Transkript- und Translations-Niveau. Die Linie entspricht einer linearen Regression der Daten.

WT: Wildtyp (negative Kontrolle), ΔB33 (von 1 bis 3) und B33 (von 1 bis 3): transgene Linien mit Überexpression der PPDK mit dem wurzelspezifischen B33-Promotor in Cytosol beziehungsweise in Plastiden. Δ35S und 35S: Linien mit PPDK-Überexpression mit dem konstitutiven 35S-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden, Mc: *M. crystallinum* (positive Kontrolle).

4.2. Stickstoff-Düngeversuche

Das für die Pflanzen verfügbare Stickstoffangebot ist einer der wichtigen Produktivitätsfaktoren. Es ist verständlich, dass sich eine mangelnde N-Versorgung auf das gesamte Stoffwechselgeschehen der Pflanze negativ auswirken muss. Außerdem bringt die N-Assimilation zahlreiche komplexe biochemische Reaktionen mit sich, die einen hohen energetischen Bedarf haben. Nitrat und Ammonium sind die wichtigsten Formen des Stickstoffs, denn sie sind direkt für die Pflanzen über die Wurzel verfügbar (Mengel, 1991).

Im folgenden Abschnitt ist der Einfluss der Stickstoffformen und der suboptimalen N-Lieferung auf Parameter wie die Samenproduktivität und den Stoffwechsel in Tabakpflanzen dargestellt. Auf diese Weise soll das Verhältnis zwischen Stickstoff und PPDK gezeigt und ein Verständnis der Rolle der PPDK im Stoffwechsel der Pflanze definiert werden.

4.2.1. Einfluss der Stickstoffform auf das Pflanzenwachstum

Für die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Tabakpflanzen wurden Bestimmungen der Sprosslängen sowie der Blattflächen und Frischgewichte durchgeführt. Die Zunahme der Sprosslänge ist ein geeignetes Maß für das

Wachstum höherer Pflanzen (Mohr und Schopfer, 1992). Andererseits steht die Blattfläche in einem engen Zusammenhang mit der Stickstoffdüngung, die eine Zunahme der Blattfläche bei den meisten Kulturen verursacht (McCullough *et al.*, 1994) und demzufolge auch das Frischgewicht beeinflusst. Besonders in Tabakpflanzen bringt ein N-Defizit eine starke Reduzierung der Biomasseproduktion und der Blattanzahl mit sich (Balachandran *et al.*, 1997).

4.2.1.1. Wachstum des Sprosses

Im allgemeinen zeigten die Tabakpflanzen drei Wachstumsmuster, die abhängig von der Größe in drei Gruppen unterteilt werden können. Das geringste Wachstum wurde in den Wildtyp-Pflanzen und in der Linie $\Delta 35S$ beobachtet. Mittleres Wachstum zeigen alle Pflanzen mit PPDK-Überexpression im Cytosol, mit dem Promotor B33. Größtes Wachstum weisen alle Pflanzen auf, die die PPDK in den Plastiden mit dem beiden Promotoren (35S und B33) überexprimieren.

Die WT-Pflanzen erreichten die maximale Größe mit der Kombination von Nitrat und Ammonium in der Nährlösung. Bei Fehlen des Stickstoff und bei Nitraternahrung haben die WT-Pflanzen ähnliche Größen erreicht. Bei Angebot von Ammonium als einziger Stickstoffquelle wurde eine drastische Reduktion des Wachstum beobachtet (ca. 16 % niedriger als bei der N-defizienten Lösung) (Abb. 4-2).

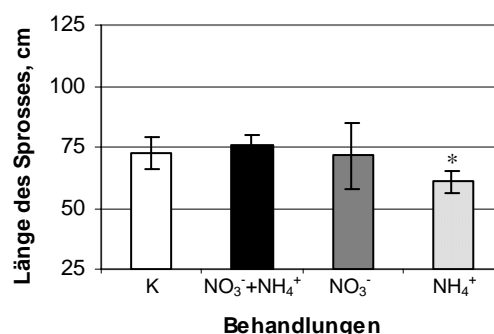


Abb. 4-2: Länge des Sprosses von WT-Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der N-Zusammensetzung in den Nährmedien.

Kontrolle: 3 mM NO₃⁻. NO₃⁻+NH₄⁺: 13 mM NO₃⁻ + 2 mM NH₄⁺. NO₃⁻: 15 mM. NH₄⁺: 15 mM.
[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) in Bezug auf die Kontrolle].

Das Ergebnis zur Ammoniumernährung stimmt mit dem Bericht von Walch-Liu *et al.*, (2000) überein. Sie berichten, dass WT-Tabakpflanzen hoch empfindlich sind, wenn Ammonium als einzige N-Quelle angeboten wird.

Die [Abb. 4-3](#) stellt das Wachstum der WT-Tabakpflanzen vor, das bei unterschiedlichen Stickstoffbehandlungen beobachtet wurde.



Abb. 4-3: Entwicklung des Sprosses bei den WT-Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Stickstoffform.

NH_4^+ : 15 mM. NO_3^- : 15 mM. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

In der [Abb. 4-4](#) ist das Wachstum des Sprosses von den $\Delta 35\text{S}$ - und 35S -Linie dargestellt. Unabhängig von der Behandlung zeigte die 35S -Linie (PPDK-Überexpression in Plastiden) größtes Wachstum als die $\Delta 35\text{S}$ -Linie (PPDK-Überexpression im Cytosol). Die $\Delta 35\text{S}$ -Linie zeigte das geringste Wachstum von allen transgenen Linien ([Abb. 4-4A](#)). Sie zeigte ähnliche Sprosslängen wie die WT-Tabakpflanzen (s. [Abb. 4-2](#)) und das Längewachstum ist nicht durch die Stickstoffzugabe positiv beeinflusst worden. Trotz der gezeigten Ähnlichkeiten mit dem WT gab es keine Reduzierung im Längenwachstum bei Ammoniumzugabe als einzige Stickstoffform. In gleicher Weise wie die $\Delta 35\text{S}$ -Linie, war die 35S -Linie nicht eindeutig von der Stickstoffzugabe beeinflusst (keine signifikanten Unterschiede). Bei einer Ammoniumbehandlung wurde keine Reduktion des Wachstums beobachtet. Im Durchschnitt war das Wachstum bei der Behandlung mit Nitrat und Ammonium etwas besser, aber der Unterschied in der Länge des Sprosses

zwischen diese Behandlung und der Kontrolle (N-Defizit) betrug ca. 5 % (Abb. 4-4B).

Die Abb. 4-5 zeigt das Wachstum in den $\Delta 35S$ und 35S Linien, die die PPDK in Plastiden mit dem Promotor 35S im Cytosol beziehungsweise in Plastiden überexprimieren.

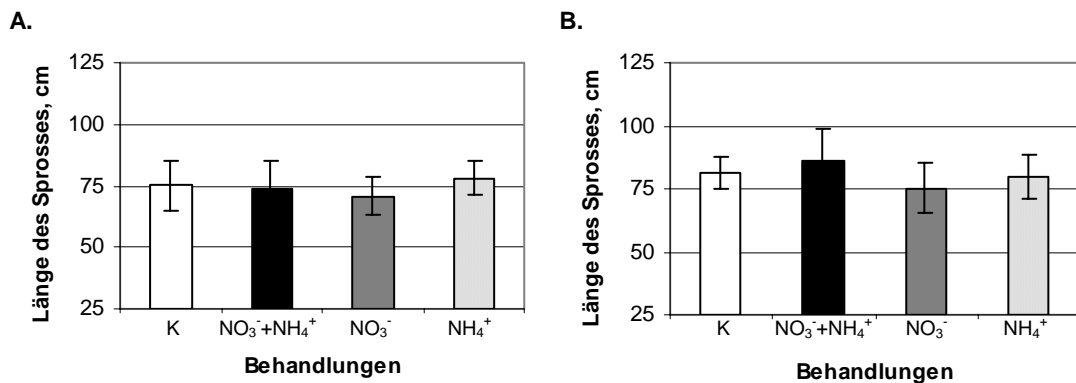


Abb. 4-4: Länge des Sprosses von transgenen Tabakpflanzen, die die PPDK mit dem 35S-Promotor überexprimieren, bei unterschiedlichen Stickstoffformen in der Nährmedien.

A. $\Delta 35S$ -Linie (PPDK-Überexpression im Cytosol). B. 35S-Linie (PPDK-Überexpression in Plastiden).

Kontrolle: 3 mM NO_3^- . $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . NO_3^- : 15 mM. NH_4^+ : 15 mM. [n=4, \pm SD].

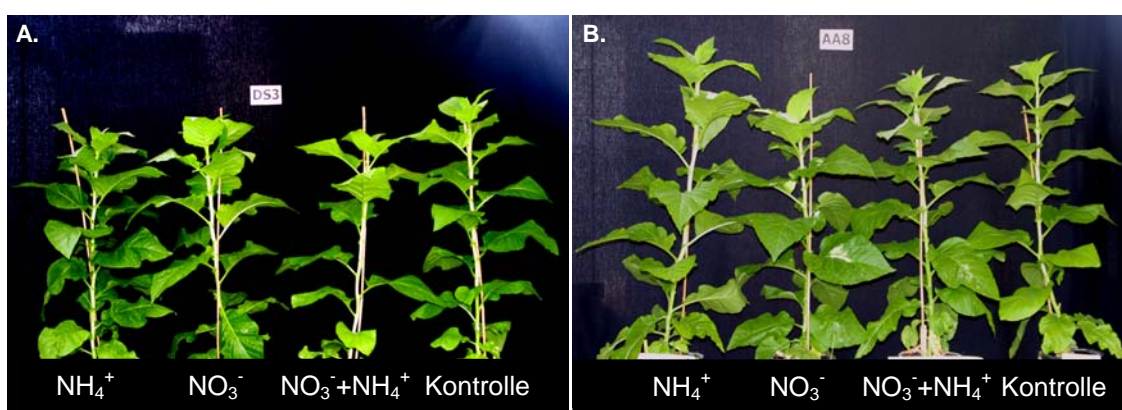


Abb. 4-5: Entwicklung des Sprosses bei transgenen Tabakpflanzen mit PPDK-Überexpression mit dem 35S-Promotor in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle.

A. $\Delta 35S$ -Linie (PPDK-Überexpression im Cytosol). B. 35S-Linie (PPDK-Überexpression in Plastiden).

NH_4^+ : 15 mM. NO_3^- : 15 mM. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

Die Sprosslänge der transgenen Linien mit PPDK-Überexpression unter der Kontrolle der B33-Promotor sind in der [Abb. 4-6](#) dargestellt. Die plastidäre B33-Linien ([Abb. 4-6D](#) bis [4-6F](#)) waren unabhängig von der Behandlung in Bezug auf die Sprosslängen größer als die cytosolischen Δ B33-Linien ([Abb. 4-6A](#) bis [4-6C](#)). Diese Tendenz wurde auch bei der PPDK-Überexpression mit dem konstitutiven Promotor 35S beobachtet. Beide Arten von transgenen Linien reagierten empfindlicher auf N-Defizit als die Δ 35S- und 35S-Linie.

Wie die [Abb. 4-6I](#) zeigt, reagierten die Δ B33-Linien im Allgemeinen positiv empfindlich auf das Stickstoffangebot. Im Besonderen zeigte Ammonium eine positive Wirkung auf das Sprosswachstum, sowohl als einzige N-Form in der Nährlösung als auch in Kombination mit Nitrat (hoch statistische Signifikanz). Bei Nitratzugabe gab es eine Verkürzung des Sprosswachstums um 8 % im Vergleich zu den mit Ammonium behandelten Pflanzen.

Die B33-Linien reagierten ebenso positiv auf Ammoniumzugabe. Als Ammonium in Kombination mit Nitrat geliefert wurde, gab es eine Zunahme des Wachstums um 15 % in Vergleich zur Kontrolle (N-defizitäre Lösung) (statistische Signifikanz). Während Ammonium als einzige N-Quelle sogar eine hoch statistische Signifikanz ergab. Die B33-Linien zeigten auch ein geringeres Wachstum bei Nitratzugabe ([Abb. 4-6II](#)).

Das Wachstum von Δ B33- und B33-Linien mit den unterschiedliche N-Behandlungen ist in der [Abb. 4-7](#) dargestellt.

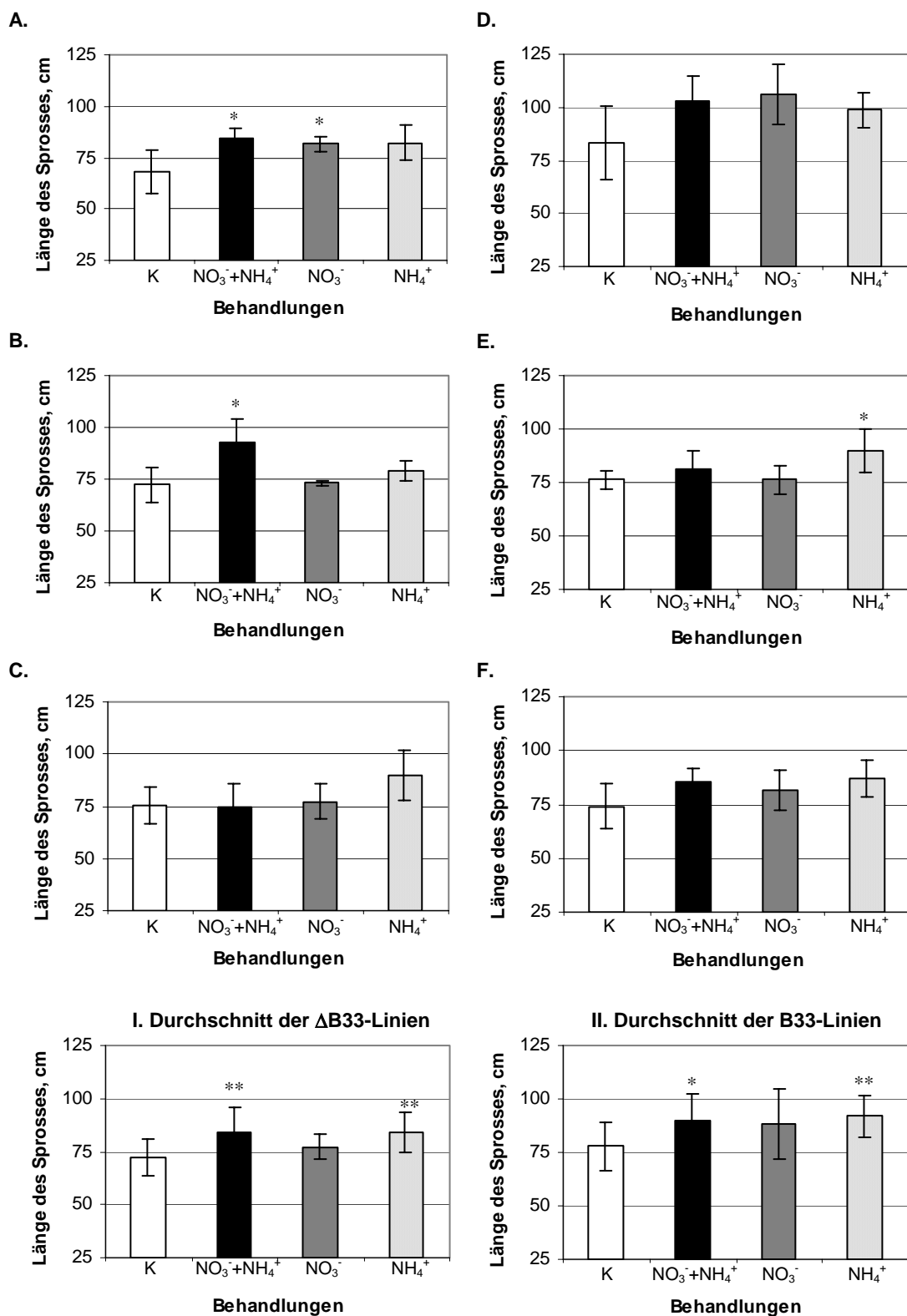


Abb. 4-6: Länge der Sprosse von transgenen Tabakpflanzen, die die PPDK mit dem B33-Promotor überexprimieren, bei unterschiedlichen Stickstoffformen in der Nährmedien.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

A bis C. Die einzelnen Δ B33-Linien (PPDK-Überexpression im Cytosol). D bis F. Die einzelnen B33-Linien (PPDK-Überexpression in Plastiden). [n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P 0,05) in Bezug auf die entsprechende Kontrolle].

I. Durchschnitt der Δ B33-Linien. II. Durchschnitt der B33-Linien. [n=12, \pm SD, t-Student: * signifikant (P 0,05) und ** höchst signifikant (P 0,01) in Bezug auf die Kontrolle].

NH_4^+ : 15 mM. NO_3^- : 15 mM. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

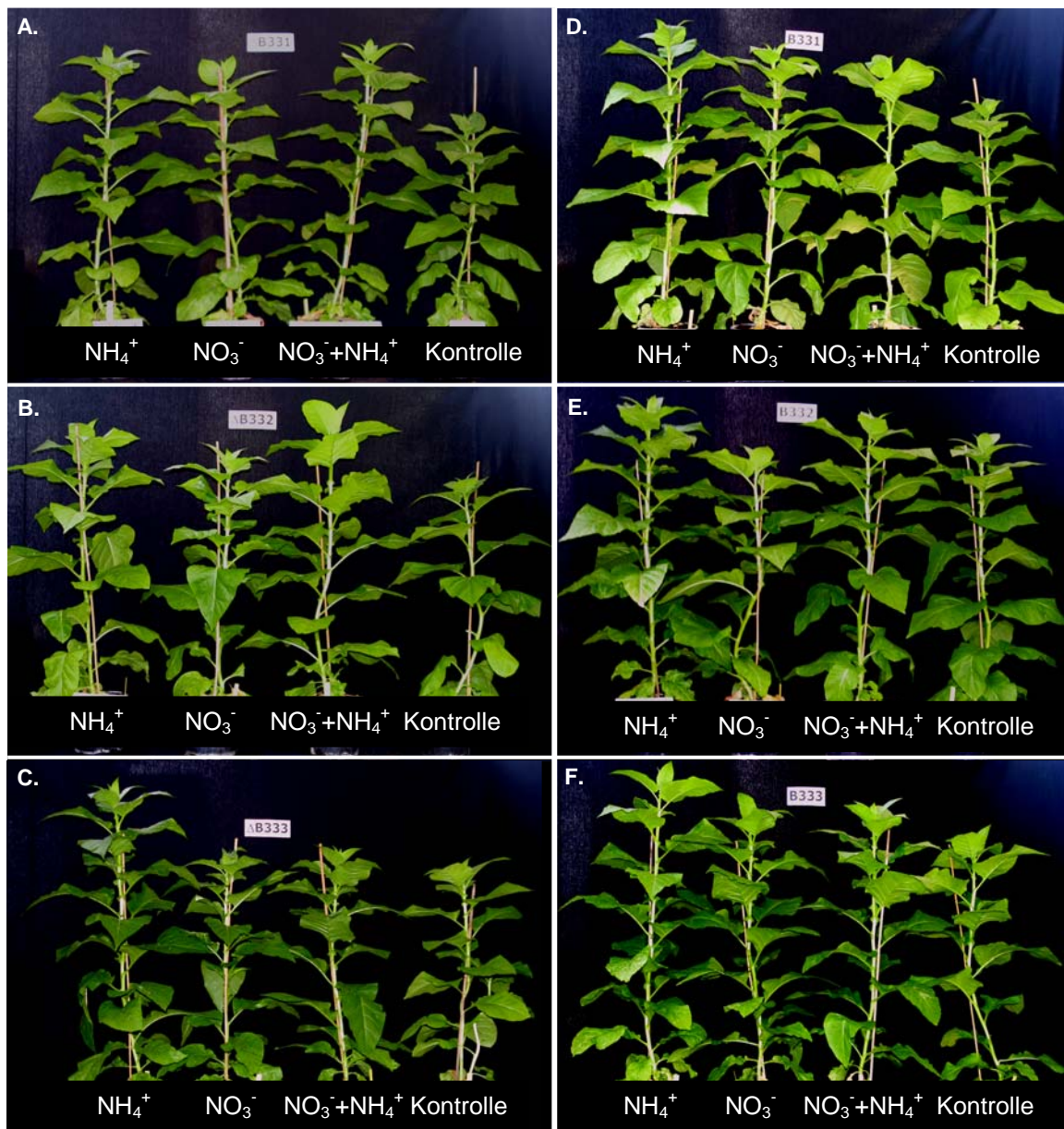


Abb. 4-7: Entwicklung der Sprosse bei den transgenen Tabakpflanzen mit PPDK-Überexpression mit dem B33-Promotor in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle.

A bis C. Die einzelnen Δ B33-Linien (PPDK-Überexpression im Cytosol). D bis F. Die einzelnen B33-Linien (PPDK-Überexpression in Plastiden).

NH_4^+ : 15 mM. NO_3^- : 15 mM. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

4.2.1.2. Frischgewicht

Das Stickstoffangebot hat einen unmittelbaren stoffwechselphysiologischen Einfluss auf das Frischgewicht der Pflanze. Das Frischgewicht wird messbar von der Blattfläche, von der Dicke der Blätter, von der Gestaltung des Sprosses und von dem Wasserstatus im Moment der Bestimmung beeinflusst.

In diesem Experiment ist die Bestimmung des Frischgewichtes bedeutend, da es als Indikator der Stickstoffaufnahmeeffizienz genommen werden kann. Die Ergebnisse zur Bestimmung des Frischgewichtes sind in der [Abb. 4-8](#) dargestellt. Nach Stenzel korrelieren die Daten von Trocken- und Frischgewichte in den transgenen Tabakpflanzen miteinander (persönliche Mitteilung).

Bei der Behandlung mit der N-defizitären Lösung waren die transgenen Pflanzen negativ beeinflusst, sie zeigten in diesem Fall die geringste Frischgewichtsmenge. Einer sehr unzureichenden Stickstoffmenge folgt stets eine niedrige Biomasseproduktion (Lawlor, 2002).

Der Wildtyp zeigte bei Ammoniumzugabe das geringste Frischgewicht. Ammonium als einzige Stickstoffquelle hat einen negativen Effekt auf das Wachstum und die Morphogenese verschiedener Spezies (Raab und Terry, 1994; Walch-Liu *et al.*, 2000). Interessanterweise waren die transgenen Tabakpflanzen beim Ammoniumangebot nicht negativ beeinflusst. Drei plastidäre (B331-, B332- und 35S-Linie) und zwei cytosolische Linien (Δ B332 und Δ 35S) zeigten bei Ammoniumbehandlung die maximal gemessenen Frischgewichte.

Bei einem Nitratangebot erbrachten der Wildtyp, die Δ B331-, die Δ B333- und die B333-Linie hohe Frischgewichtsmengen.

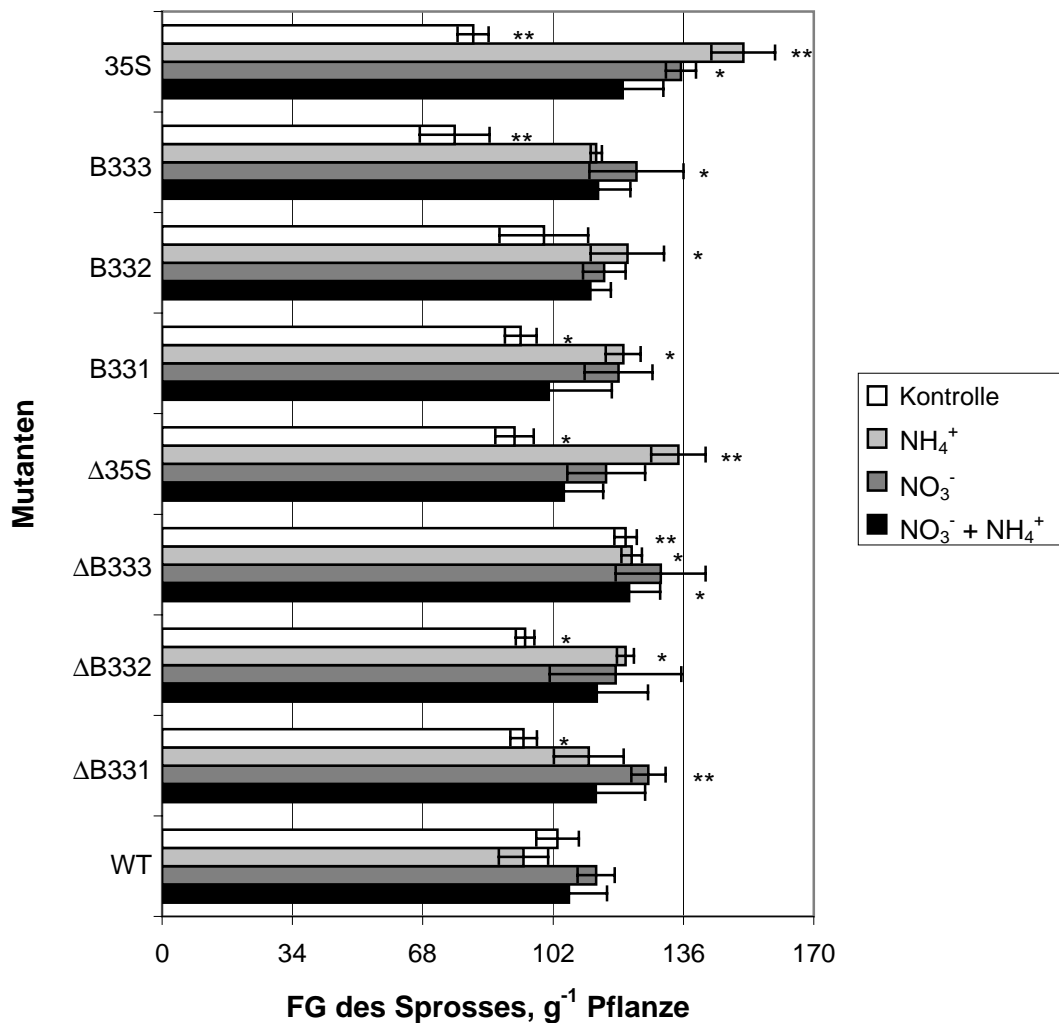


Abb. 4-8: Frischgewichte der Sprosse in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot im Nährmedium.

NH₄⁺: 15 mM. **NO₃⁻:** 15 mM. **NO₃⁻+NH₄⁺:** 13 mM NO₃⁻ + 2 mM NH₄⁺. **Kontrolle:** 3 mM NO₃⁻.

[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.1.3. Blattfläche

Normalerweise definiert die Blattfläche die photosynthetische Kapazität der Pflanze, zudem sind auch die interaktiven Effekte der Illumination und der Stickstofflieferung relevant (Sims *et al.*, 1998). [Abb. 4-9](#) zeigt die Werte der Blattfläche der

untersuchten Pflanzen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Stickstoffquellen im Nährmedium.

Bei der Ammoniumzugabe war die Blattfläche des Wildtypes um ca. 11 % gegenüber einer Nitrat/Ammonium-Düngung reduziert. Beim Wildtyp korrelierten in positiver Weise die Ergebnisse des Sprosswachstums, des Frischgewichts und der Blattfläche.

Bei allen Behandlungen mit Stickstoff zeigten die $\Delta B33$ -Linien bei Zufuhr von Nitrat die kleinste Blattfläche. Ammonium als einzige N-Quelle in der Nährlösung erhöhte die Blattfläche in den Linien $\Delta B331$ und $\Delta B333$ um 52 % beziehungsweise 42 %, im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (Lösung mit suboptimaler N-Menge), während die $\Delta B332$ -Linie eine moderate Erhöhung der Blattfläche von 21 % zeigte.

Die B33-Linien wiesen eine größere Blattfläche als der Wildtyp auf, wenn Ammonium in der Nährlösung enthalten war, sowohl als einzige Stickstoffquelle als auch in Kombination mit Nitrat.

Die transgenen Tabakpflanzen mit dem Promotor 35S ($\Delta 35S$ - und 35S-Linie) zeigten trotz unterschiedlicher N-Quellen eine geringe Variabilität in der Blattfläche.

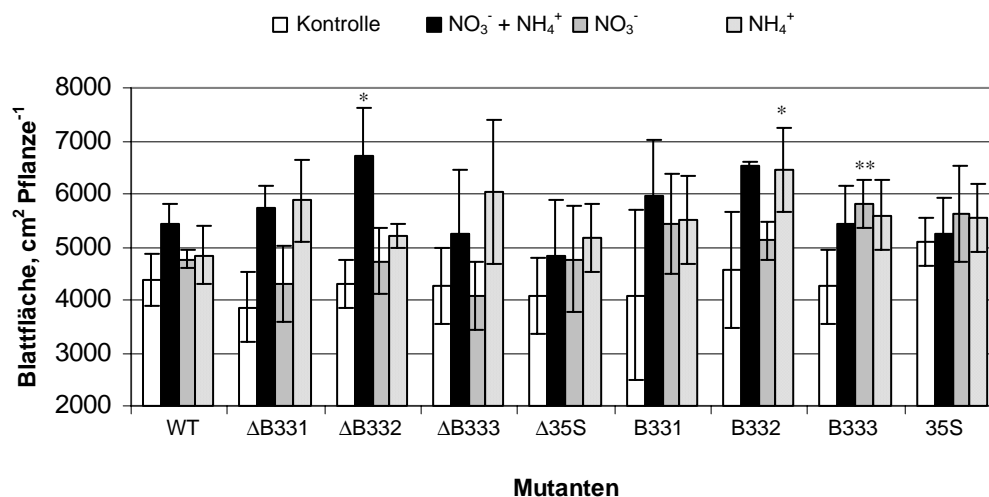


Abb. 4-9: Blattfläche der Tabakpflanzen nach Behandlungen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.

Kontrolle: 3 mM NO₃⁻. NO₃⁻+NH₄⁺: 13 mM NO₃⁻ + 2 mM NH₄⁺. NO₃⁻: 15 mM. NH₄⁺: 15 mM.

[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.1.4. Überblick über die Wachstumsparameter

Um eine Integration der Wachstumsparameter zu erhalten und im Folgenden die Effekte der Stickstoffbehandlungen auf die transgenen Tabakpflanzen und den Wildtyp zu interpretieren, wurden die Sprosslänge, das Frischgewicht und die Blattfläche in der [Tab. 4-1](#) dargestellt. Die genannte Tab. zeigt eine Grauskala, bei der Farbstärke und Farbhelligkeit die größten bzw. geringsten Werte der Parameter darstellt. Aus der Tabelle sind folgende relevante Punkte eindeutig festzustellen:

- Die transgenen Tabakpflanzen reagierten empfindlicher auf das N-Defizit als der Wildtyp. Bei N-Defizit (Kontrolle) erhielt man das niedrigste Frischgewicht.
- Ammonium als einzige Stickstoffquelle beeinflusste nur die Wachstumsparameter des Wildtyps negativ (niedrigste Sprosslänge und Frischgewicht).
- Allgemein wirkte das Ammonium positiv auf die Wachstumsparameter in den transgenen Tabakpflanzen, nicht nur in Kombination mit Nitrat sondern auch als einzige Stickstoffquelle.

Tab. 4-1: Wachstumsparameter in Abhängigkeit von Mutanten und Behandlungen

Parameter des Wachstums	WT	Δ B33-Linien	B33-Linien	Δ 35S-Linie	35S-Linie
Sprosslänge	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-
	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+
Frischgewicht	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-
	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+
Blattfläche	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-	NO_3^-
	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+

■ höchster Wert; ■ mittlerer Wert; ■ niedriger Wert; □ sehr niedriger Wert

4.2.2. Einfluss des Stickstoffs auf einige Metaboliten des N-Stoffwechsels.

Innerhalb des Stickstoff-Stoffwechsels kommen komplexe Wechselwirkungen vor. Beispiele dafür sind die Assimilation und der Transport des Stickstoffs, die Biosynthese von Aminosäuren, die Proteinsynthese und die Bildung des Chlorophylls (Stitt *et al.*, 2002). Diese Stoffwechselvorgänge stehen in enger Verbindung mit dem Kohlenstoff-Stoffwechsel, in dem das Enzym PPDK vermutlich durch die Versorgung des Enzyms PEPC mit Substrat eingreift. Aus diesem Grund wurden einige diesen Stoffwechselbetreffenden Parameter bestimmt. Unter anderem werden die freie Aminosäurenkonzentration und der Proteingehalt im Blatt und in der Wurzel bestimmt. Des Weiteren gibt die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in den Blättern Aufschluss über die zu untersuchenden Stoffwechselbeziehungen.

4.2.2.1. Chlorophyllgehalt

Der Abbau des Chlorophylls gilt als ein allgemeines Kriterium der Blattseneszenz in grünen Pflanzen und ist ein Maß für die abnehmende Photosynthesekapazität (Oberhuber *et al.*, 2003; Kaufman *et al.*, 1989). Beim Photosyntheseprozess der grünen Pflanzen erfolgt die Absorption des Lichtes in erster Linie durch die Chlorophylle. Nur Chlorophyll a ist ein Bestandteil der photosynthetischen Reaktionszentren und kann als zentrales Photosynthesepigment angesehen werden. Bei Ammoniumgabe in Kohlpflanzen sind gegensätzlichen Ergebnisse berichtet, Ammonium erhöhte den Chlorophyllgehalt und reduzierte das Verhältnis Chl a/Chl b (Blanke *et al.*, 1996). Weiterhin kann das Verhältnis Chl a/b ein nützlicher Indikator der inneren Stickstoffverteilung des Blattes sein, weil dieses Verhältnis in einer positiven Weise mit dem Verhältnis im Photosystem II (PSII) des Core-Komplex zu dem Lichtsammelkomplex (engl. Light harvesting complexes, LHC) korreliert. (Terashima und Hikosaka, 1995).

In der [Abbildung 4-10](#) ist der Gehalt von Chlorophyll a der untersuchten Tabakblätter dargestellt. Dabei zeigte sich, dass der Gehalt von Chlorophyll a der transformierten Pflanzen unabhängig vom der N-Quelle im Nährmedium etwas

niedriger lag als die entsprechenden Werte des Wildtyps. Die Wildtyppflanzen zeigten den höchsten Chl-a-Gehalt in den Nährlösungen mit der Kombination Nitrat/Ammonium und mit Nitrat als einzige Stickstoffquelle (Abb. 4-10A und 4-10B). Speziell bei der Nitraternährung wurden in den meisten Fällen statistisch signifikante Veränderungen zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp beobachtet. Bei der Kontrolle (N-defizitäre Lösung) und bei einem Ammoniumangebot als einziger Stickstoffquelle sind die Chlorophyll a Mengen im Wildtyp stark reduziert (Abb. 4-10C und 4-10D). Signifikante Reduktionen des Chlorophyll-a-Gehalts traten bei einem N-Defizit nur bei Pflanzen auf, die das Enzym PPDK überexprimieren. Diese Verminderung ist ganz offensichtlich in der cytosolischen 35S-Linie ($\Delta 35S$) (Abb. 4-10D).

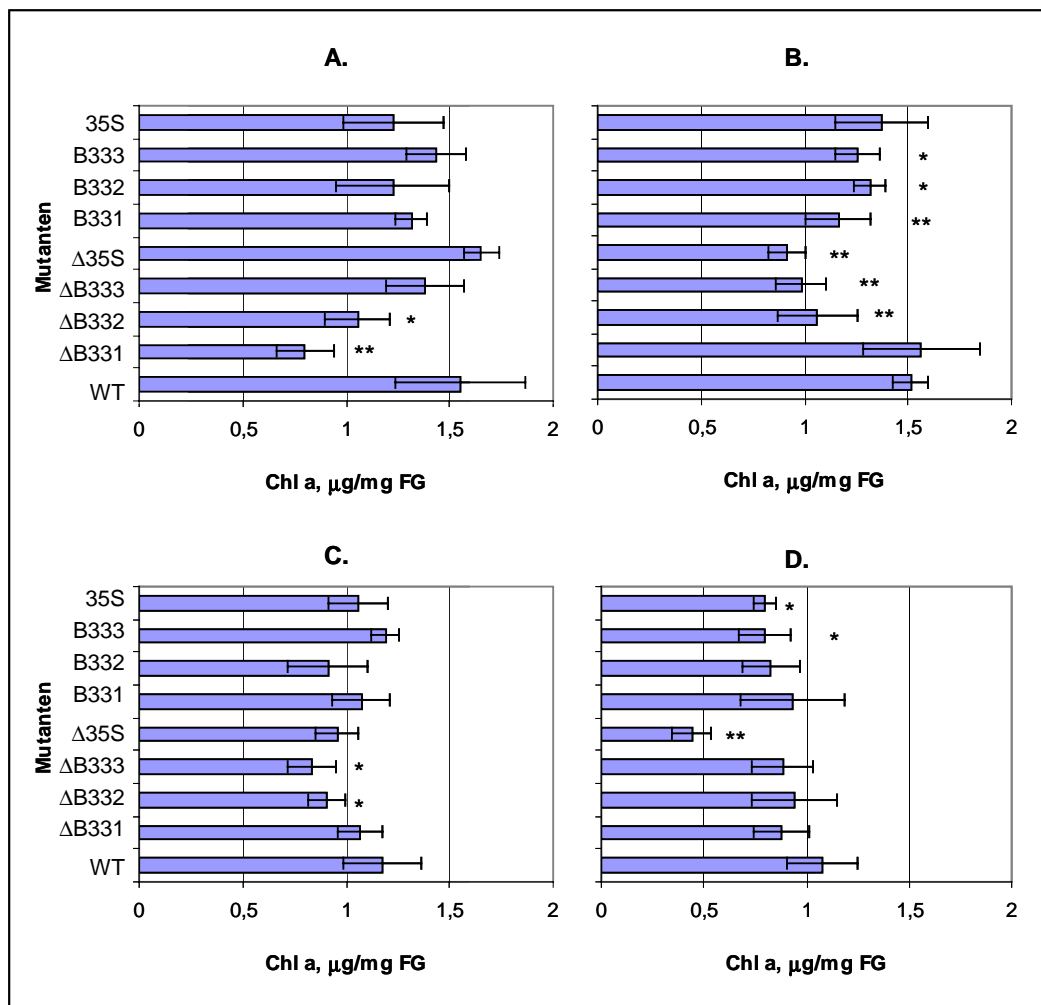


Abb. 4-10: Gehalt von Chlorophyll a in Blättern von transgenen Tabakpflanzen bei Düngung mit unterschiedlichen Stickstoffformen.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P = 0,05) und ** höchst signifikant (P = 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

In der [Abbildung 4-11](#) sind die Ergebnisse der Bestimmung von Chlorophyll b dargestellt. Die Werte sind, wie erwartet, niedriger als die für Chlorophyll a. Im Allgemeinen zeigten beide Bestimmungen dieselbe Tendenz. Die Chlorophyll-b-Werte waren in den transgenen Pflanzen tendenziell niedriger als im Wildtyp.

Der Wildtyp hatte einen ähnlichen Chlorophyll-b-Gehalt bei den Behandlungen mit Ammonium und einem defizitären N-Angebot. Den höchsten Chlorophyll-b-Gehalt erzielte man, wenn das Nährmedium nur Nitrat enthielt.

Als Antwort auf geringere Mengen von Stickstoff (Kontrolle) wurde die Konzentration von Chlorophyll b, sowie von Chlorophyll a, in den transgenen Pflanzen sehr stark reduziert. Andererseits wirkte Ammonium auch negativ auf die Chlorophyll-b-Menge in den transgenen Pflanzen, besonders in den cytosolischen Linien.

Ähnlich wie bei Chlorophyll a, zeigten die Ergebnisse von Chlorophyll b signifikante statistische Veränderungen bei Nitratangebot.

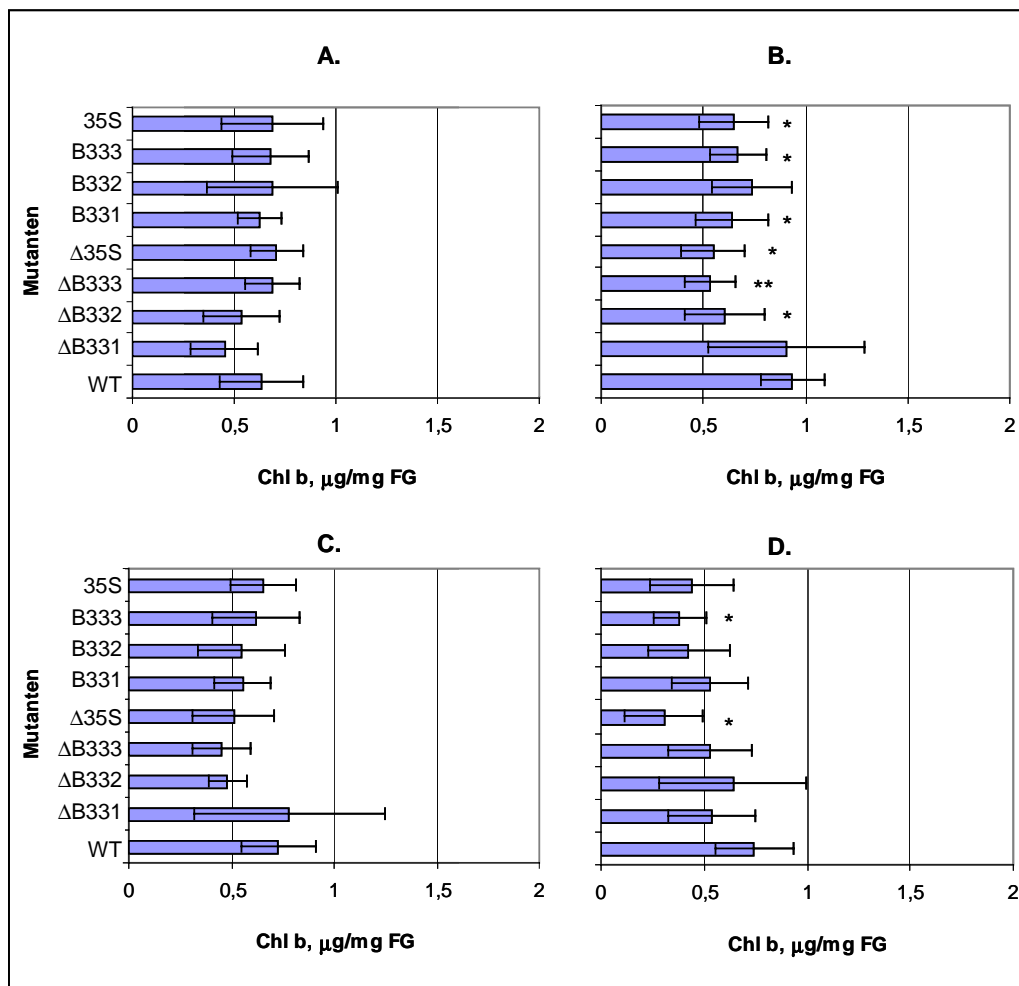


Abb. 4-11: Gehalt von Chlorophyll b in Blättern von transgenen Tabakpflanzen bei Düngung mit unterschiedlichen Stickstoffformen.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P \leq 0,05) und ** höchst signifikant (P \leq 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

In Pflanzen beträgt das Verhältnis Chl a zu Chl b etwa drei zu eins (Heldt, 1999).

Die Verhältnisse zwischen Chlorophyll a und b wurden berechnet (Abb. 4-12). Die Unterschiede waren aufgrund der großen Standardabweichung jedoch nicht statistisch signifikant.

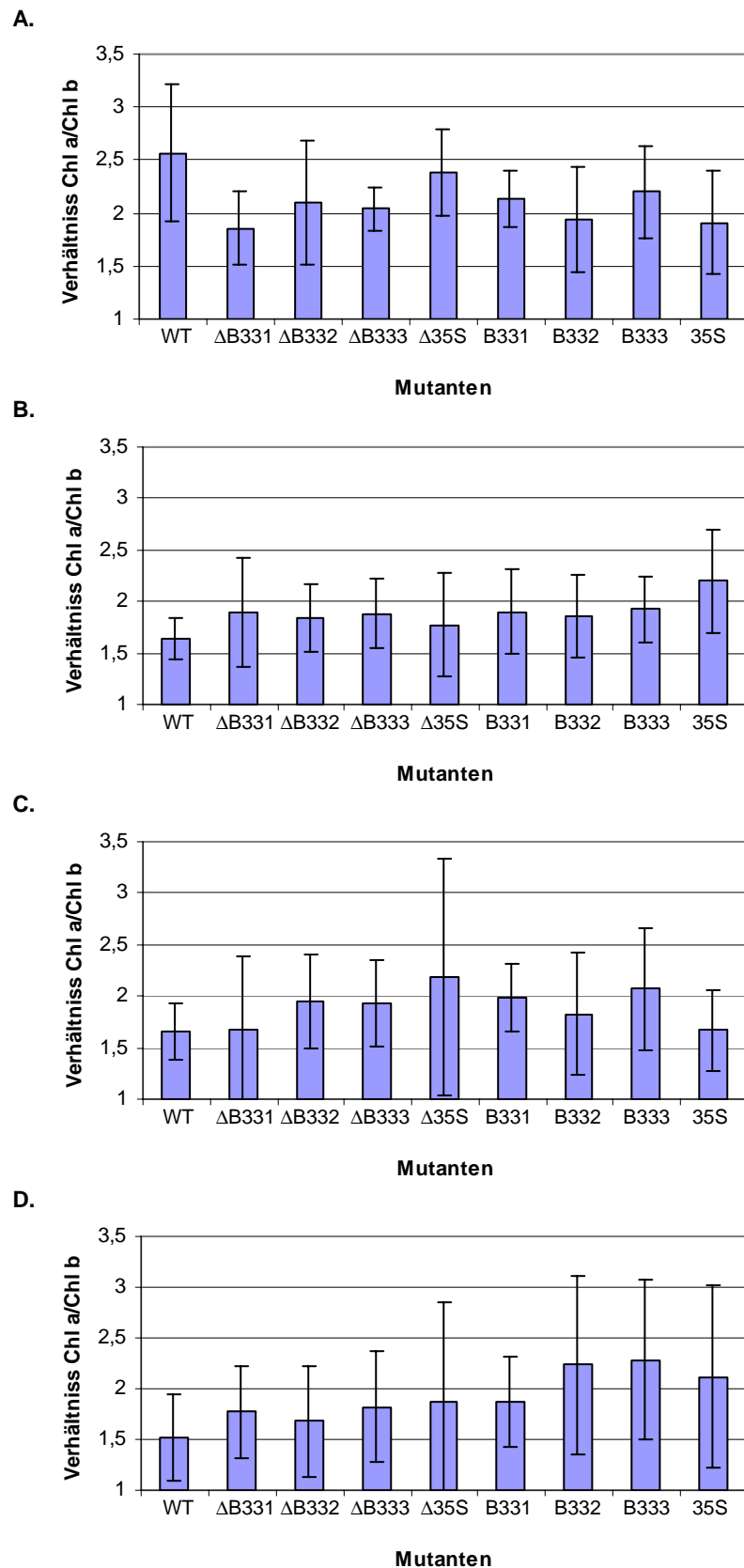


Abb. 4-12: Verhältnisse von Chlorophyll a/b in Blättern transgener Tabakpflanzen bei Behandlung mit Nährmedien mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.
(Fortsetzung siehe nächste Seite)

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, ± SD].

Bei einer Mischung aus Nitrat und Ammonium in den Nährmedien wurde das höchste Verhältnis im Wildtyp beobachtet. Bei den restlichen Behandlungen wurde dieses Verhältnis stark reduziert, speziell bei einem Ammoniumangebot und bei einem Stickstoff-Defizit (Kontrolle).

Die cytosolische 35S-Linie zeigte eine ähnliche Tendenz wie der Wildtyp. Sie weist auch bei Zugabe von Nitrat und Ammonium eine beträchtliche Erhöhung des Verhältnisses Chl a/Chl b auf. Trotz der Ähnlichkeit, zeigte sie eine Veränderung beim Ammoniumangebot, dort wurde das höchste Verhältnis in der cytosolischen 35S-Linie und das niedrigste im Wildtyp errechnet. Es ist wichtig festzuhalten, dass der Wildtyp und die cytosolische 35S Linie ein langsames und schlechteres Wachstum bei der erwähnten Behandlung zeigten.

Auffällige Ergebnisse erhielt man in den plastidären Linien bei einem Stickstoff-Defizit, wo die Verhältnisse Chl a/Chl b erhöht wurden, während die cytosolischen Linien bei dieser Behandlung in geringerem Maße reduziert waren.

4.2.2.2. Konzentration von freien Aminosäuren in Blättern und Wurzeln

Den größten Teil der leicht löslichen organischen N-Verbindungen in der Pflanze stellen die Aminosäuren, die Amide und Amine dar. Für das Stoffwechselgeschehen kommt den Aminosäuren die herausragendste Bedeutung zu, da sie die Bausteine der Proteine sind (Mengel, 1991) und ihre Konzentration stark von dem Stickstoff-Versorgung abhängig ist (Knop, 1998).

Die [Abb. 4-13](#) stellt die Aminosäurekonzentrationen in Blättern von Tabakpflanzen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen dar.

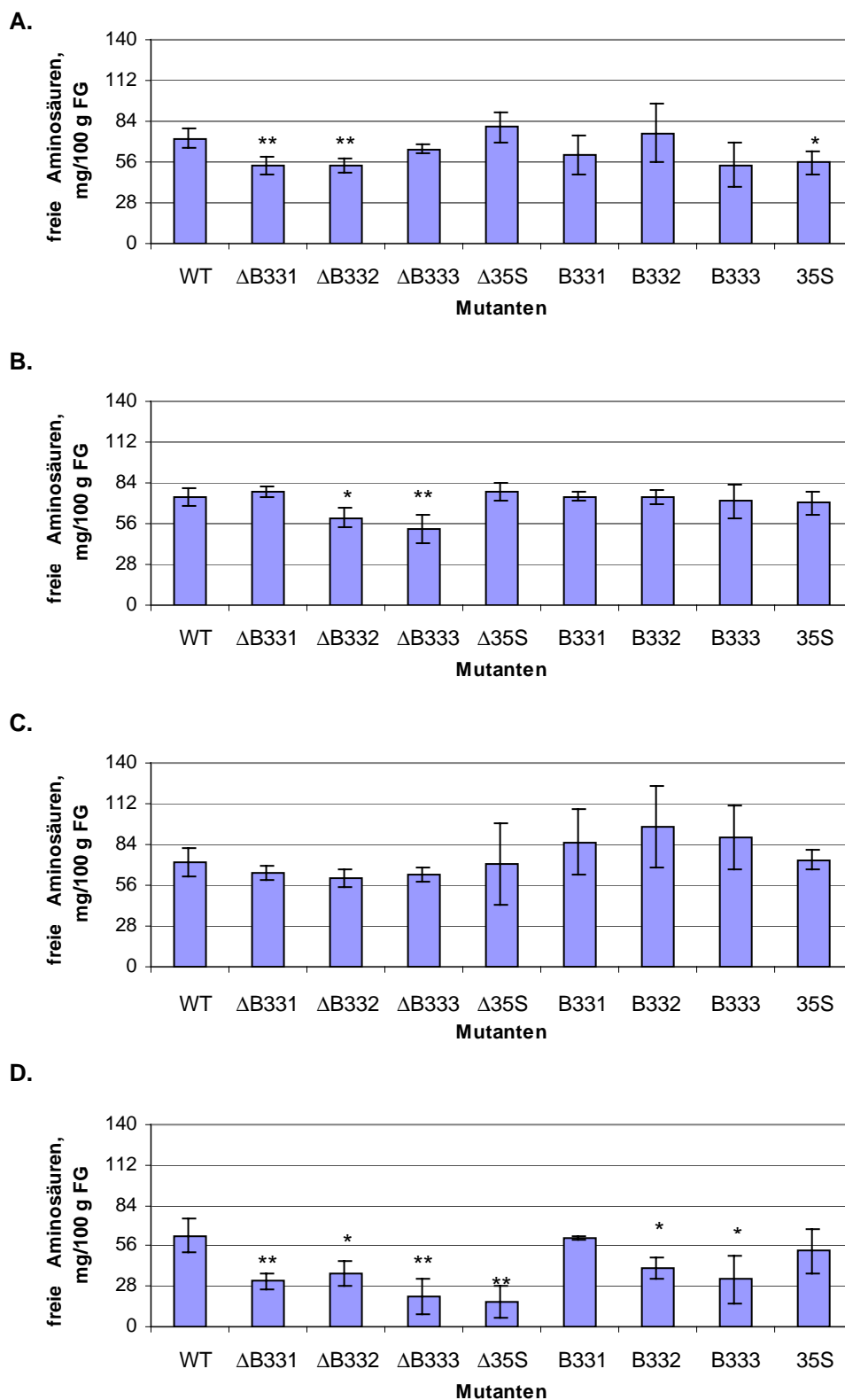


Abb. 4-13: Einfluss der Stickstoffform auf die freien Aminosäuren von Tabakblättern.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

Unabhängig von der Behandlung zeigten die Δ B33-Linien (cytosolische Linien) geringere Aminosäuremengen als der Wildtyp, besonders bei der Kontrolle (N-defizitäre Lösung). Mit Ammonium als einzige Stickstoffquelle in den Nährmedien, war die freie Aminosäuremenge in den plastidiären B33-Linien erhöht. Alle cytosolischen Linien, sowohl mit dem Promotor B33 als auch mit dem konstitutiven Promotor 35S, reagierten auf N-Defizit (Kontrolle) sehr empfindlich. Die Aminosäurekonzentrationen waren in diesem Fall beträchtlich. Im Fall des Wildtypes hatte die Stickstoffdüngung keinen Einfluss auf die Konzentration freier Aminosäuren.

Die Menge an freien Aminosäuren in den Wurzeln wurde bestimmt, da es einen Austausch von ihnen zwischen den Wurzeln und den Sprossen gibt. Dieses Verhältnis gibt Aufschluss über den Stickstoffstatus in der gesamten Pflanze und schließlich über den Transport freier Aminosäuren in die Wurzeln (Tillard, *et al.*, 1998). Die Aminosäure-Gehalte in den Wurzeln sind in der [Abb. 4-14](#) dargestellt. Unabhängig von der Behandlung war die Aminosäurekonzentration in den Wurzeln halb so hoch wie die in den Blättern. Hier war der Unterschied der Ergebnisse beim Wildtyp und den transgenen Pflanzen nicht sehr beträchtlich. Wenn die Wurzeln mit einer Mischung aus Nitrat und Ammonium behandelt wurden, gab es keinen Unterschied in der Aminosäurekonzentration zwischen transgenen Pflanzen und dem WT. Bei Nitraternährung zeigten die Wurzeln der transgenen Pflanzen die geringste Menge an Aminosäuren, besonders die Linien B33, sowohl für die cytosolische als auch die plastidäre Linien. Diese Resultate sind vergleichbar mit denen bei der Kontrolle (N-Defizit). Die Wurzeln des Wildtypes zeigten bei fast allen Behandlungen einen ähnlichen Aminosäuregehalt wie in den Blättern. Ausnahme war eine bedeutende Erhöhung der Aminosäurekonzentration bei Ammoniumgabe, bei der sich die Konzentration verdoppelte. In diesem Fall zeigten alle transgenen Linien statistisch signifikante oder stark signifikante Veränderungen im Vergleich

zum Wildtyp. Folglich zeigt sich mit Ammoniumbehandlung ein entgegengesetztes Ergebnis in den Wurzeln im Vergleich zu den untersuchten Blättern.

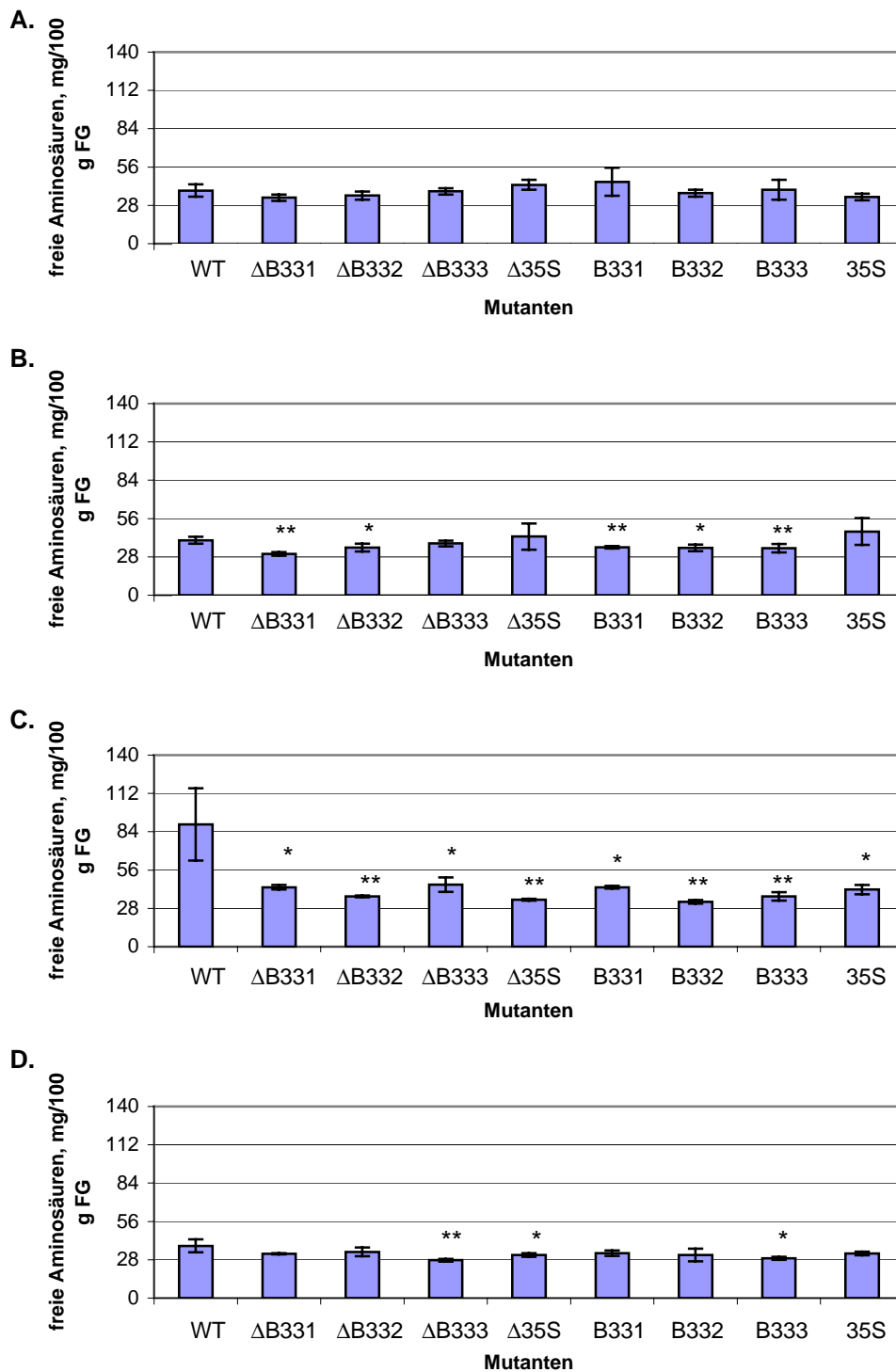


Abb. 4-14: Einfluss der Stickstoffquelle auf die freien Aminosäuren in den Tabakwurzeln.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P = 0,05) und ** höchst signifikant (P = 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.2.3. Proteingehalt in Blättern und Wurzeln

In Pflanzen ist der Stickstoff hauptsächlich für die Proteinsynthese verantwortlich, sowohl strukturell als auch enzymatisch. Enzyme sind nicht nur für die Synthese von anderen Proteinen, sondern auch für die Aufrechterhaltung aller metabolischen Wege notwendig. Zudem sind sie Bestandteile zellulärer Strukturen und sind an der Speicherung von Kohlenhydraten, Fetten und Pigmenten beteiligt (Lawlor *et al.*, 2001).

Die Fraktion von löslichen Proteinen stellt im Allgemeinen eine große Stickstoffreserve der Pflanze dar. Im Gegensatz zu den Aminosäuren (die erste Art von Verbunden, die zu der Phloem- oder Xylem-Gefäße transportiert sind) bleiben die Protein-Reserve normalerweise nur teilweise verdünnt. Die großen Unterschiede in den Proteingehalten zwischen den Pflanzen rührt daher, dass neben externen Faktoren auch zahlreiche physiologische Prozesse abhängig vom Alter und Pflanzenart an der Proteinsynthese Einfluss nehmen (Ourry *et al.*, 2001).

Abb. 4-15 zeigt den Protein-Gehalt in Tabakblättern in Abhängigkeit unterschiedlicher Stickstoffbehandlungen. Mit Nitrat und Ammonium in der Nährlösung hatten die transgenen Linien allgemein eine höhere Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4-15A). Im Gegensatz dazu zeigte der Wildtyp die größte Proteinmenge bei Nitraternährung (Abb. 4-15B). Bei den B33-Linien (PPDK-Überexpression in Plastiden) war die Proteinmenge der Blätter beim Ammoniumangebot erhöht. Die Proteingehalte der $\Delta 35\text{S}$ - und 35S Linien waren bei dieser Behandlung stark verringert, sogar stärker als bei der Kontrolle (N-Defizit) (Abb. 4-15C). Stark signifikante statistische Veränderungen zwischen dem Wildtyp und den restlichen Linien erhielt man bei N-Defizit (Kontrolle), d. h. die transgenen Linien haben einen doppelt so hohen Protein-Gehalt wie der Wildtyp (Abb. 4-15D).

Die [Abb. 4-16](#) stellt die Proteinkonzentrationen in den Wurzeln von Tabakpflanzen dar. Bei Stickstoffangebot, unabhängig von der Quelle, zeigte der Wildtyp eine höhere Proteinmenge im Vergleich zu den transgenen Linien. Es gab keinen großen Unterschied zwischen den Proteinmengen der transgenen Linien ([Abb. 4-16A](#), [4-16B](#) und [4-16C](#)). Bei der Kontrolle (N-defizitäre Lösung) ([Abb. 4-16D](#)), der Nährstoffstress für die Pflanzen bedeutet, haben die Wurzeln der Δ B33-Linien, der Δ 35S-Linie und der 35S-Linie die Proteinmenge des Wildtypes um ca. 23, 75 beziehungsweise 4 % übertroffen. Die B33-Linien (PPDK-Überexpression in Plastiden) zeigten im Durchschnitt ungefähr 5 % weniger Protein-Gehalt in Wurzeln als der Wildtyp ([Abb. 4-16D](#)).

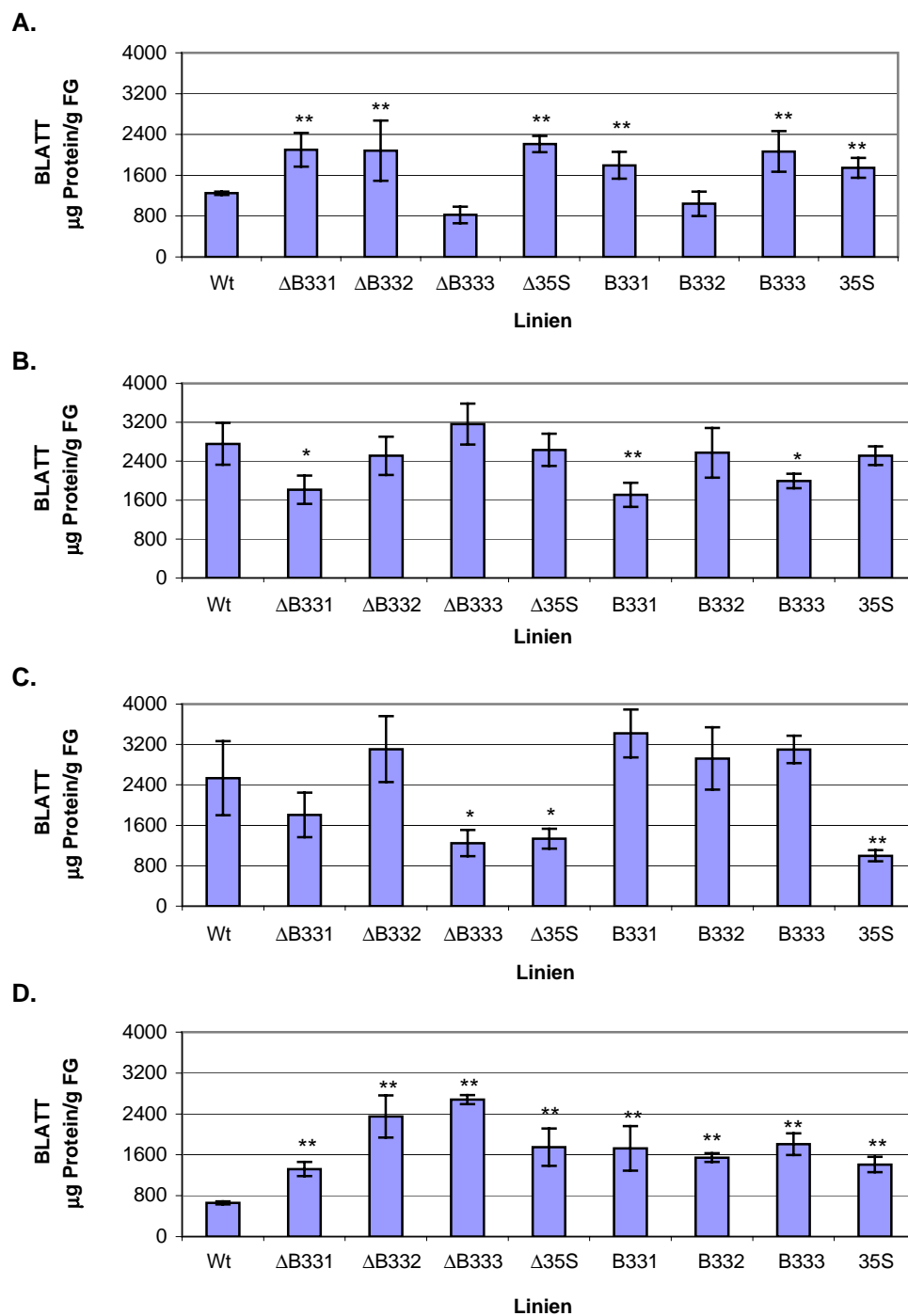
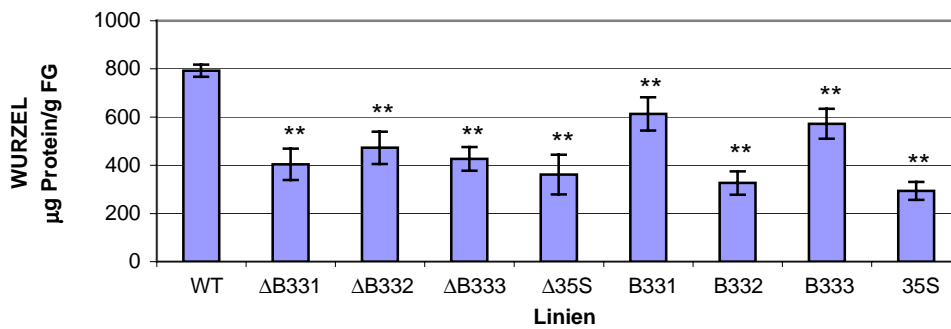


Abb. 4-15: Proteinkonzentration in den Blättern von Tabakpflanzen bei Düngung mit Nährlösung mit unterschiedlichen N-Quellen.

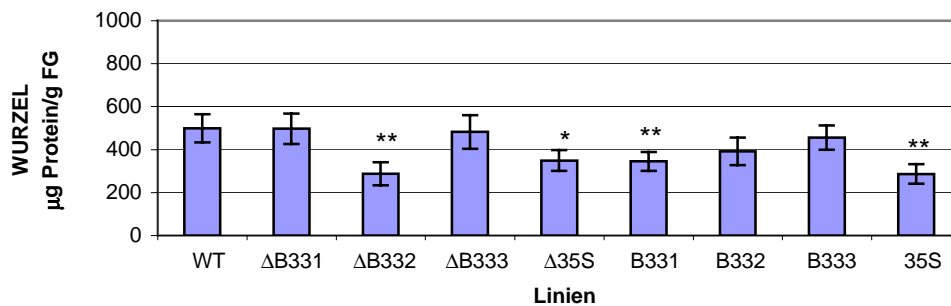
A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P = 0,05) und ** höchst signifikant (P = 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

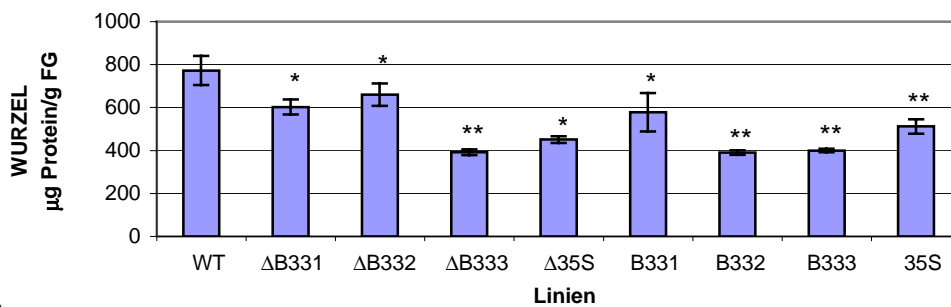
A.



B.



C.



D.

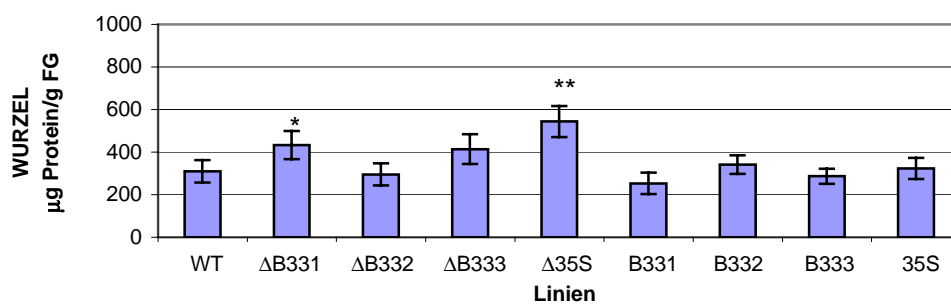


Abb. 4-16: Proteinkonzentration in den Wurzeln von Tabakpflanzen bei Düngung mit Nährlösungen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant ($P < 0,05$) und ** höchst signifikant ($P < 0,01$) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.3. Einfluss der Stickstoffquelle auf Enzyme der CO₂-Fixierung

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Western-Blot Analyse zur Untersuchung der Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) und Ribulose-1,5-Biphosphat Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO), dargestellt. Die Stärke der Signale wurde mittels densitometrischer Analyse bestimmt.

RUBISCO und PEPC sind bei Pflanzen von großer Bedeutung. Zum Beispiel in C₃-Pflanzen ist die RUBISCO an der photosynthetischen Kohlendioxydfixierung beteiligt, während die PEPC den Zitronensäure-Zyklus auffüllt, um die Synthese von organischen Säuren und Aminosäuren zu ermöglichen. Eine Trennung der Carboxylierungsprozesse in CAM-Pflanzen, die zwischen PEPC und RUBISCO stattfindet, optimiert ihre photosynthetische Leistung und Kohlenstoffzuwachs unter begrenzenden Umweltfaktoren (Borland und Taybi, 2004).

4.2.3.1. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC)

Das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.31) ist als cytosolisches Enzym in der Pflanze beschrieben. Seine bekannte Funktion ist die photosynthetische Primärfixierung des Kohlenstoffes in C₄- und CAM-Pflanzen (Vidal und Chollet, 1997). Die PEPC nimmt an der Regulation des pH-Wertes im Cytosol (Andreo *et al.*, 1987), an der Katalyse des anaplerotischen Flusses von Kohlenstoff (Turpin und Weger, 1990) und an der Versorgung mit Kohlenstoffskeletten für die Ammoniumassimilation (Rosendahl *et al.*, 1990) teil.

[Abb. 4-17](#) zeigt die immunologischen Nachweise des Enzyms PEPC im Blattgewebe bei unterschiedlichen Stickstoffbehandlungen. Die Signale von WT und von $\Delta 35S$ bei Nitratgabe beziehungsweise bei der Kontrolle (N-Defizit) sind beträchtlich.

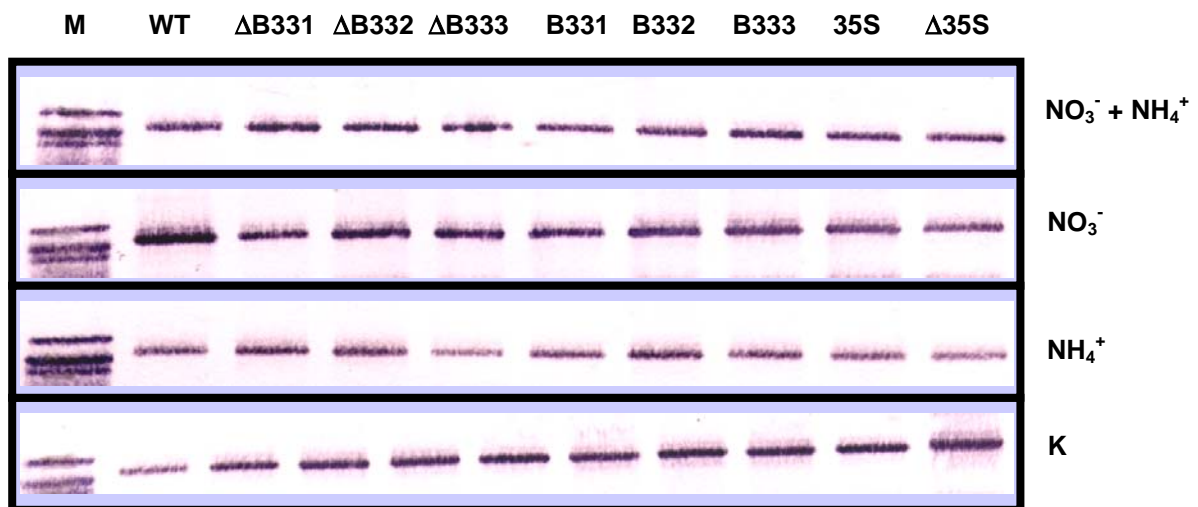


Abb. 4-17: PEPC-Proteinspiegel (ca. 100 kDa) in Blättern von transgenen Tabakpflanzen.

Anti-PEPC 1:3000, Inkubationszeit: 16 h. Anti-GAR-AP 1:1000, Inkubationszeit 4 h. Proteinmenge: 3 μ g.

M: Proteinmarker, WT: Wildtyp, Δ B33 (von 1 bis 3) und B33 (von 1 bis 3): transgene Linien mit Überexpression der PPKK mit dem wurzelspezifischen B33-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden, 35S und Δ 35S: Linien mit PPKK-Überexpression mit dem konstitutiven 35S-Promotor in Plastiden beziehungsweise Cytosol.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

Die densitometrische Analyse der Signale ist in der [Abb. 4-18](#) dargestellt. Bei der Kombination von Nitrat und Ammonium wurde die niedrigste Variation zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen gefunden. Nitrat als einzige Stickstoffquelle verstärkte auch die PEPC-Signale in den transgenen Pflanzen. Die transgenen Tabakblätter hatten die schwächsten PEPC-Signale bei Ammoniumgabe, der Wildtyp bei N-Defizit (Kontrolle).

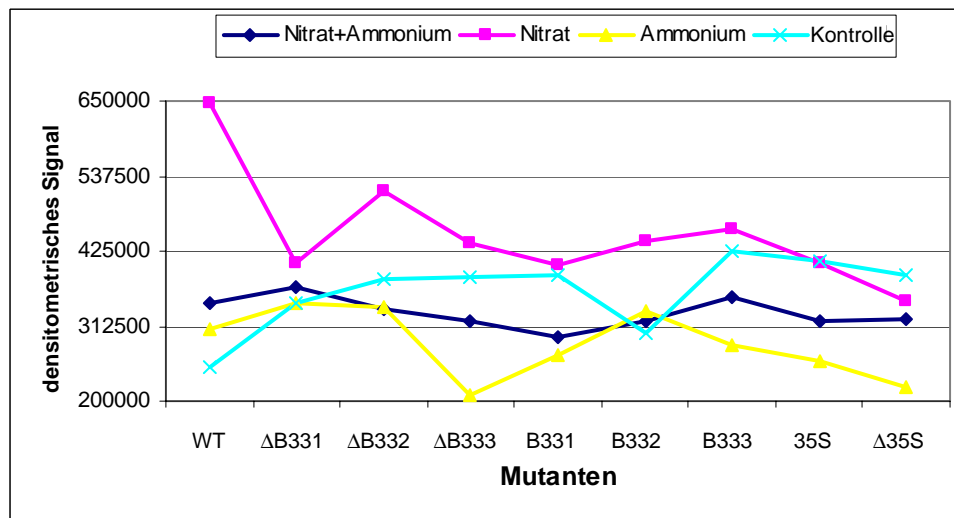


Abb. 4-18: Densitometrisches Signal der PEPC in Tabakblättern.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

4.2.3.2. Ribulose-1,5-Biphosphat Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO)

Die Ribulose-1,5-Biphosphat Carboxylase/Oxygenase (EC 4.1.1.39) ist ein bifunktionales Schlüsselenzym der Regulation der photosynthetischen CO_2 -Assimilierung (He *et al.*, 1997). Die Carboxylase-Aktivität leitet den als Calvin-Zyklus bezeichneten reduktiven C_3 -Zyklus ein. Im Calvin-Zyklus findet die eigentliche Assimilierung von Kohlenstoff durch Anlagerung von CO_2 an Ribulose-1,5-Biphosphat statt (Tolbert, 1997). RUBISCO kann auch Ribulose-1,5-Biphosphat zur Bildung eines Moleküls PGA und eines Moleküls Phosphoglykolat oxygenieren. Die relativen Raten von Carboxylierung und Oxygenierung der Rubisco sind die hauptsächlichen Faktoren zur Bestimmung der photosynthetischen Wirksamkeit (Mott, 1998). Das Enzym RUBISCO der höheren Pflanzen ist ein komplex aufgebautes Hexadecamer mit einer Molekularmasse von 550 kDa, das aus 8 großen (50-55 kDa, eng. „large subunit“ (LSU)) und 8 kleinen (12-18 kDa, eng.

„small subunit“ (SSU)) Untereinheiten zusammengesetzt ist (Spreitzer und Salvucci, 2002).

Die Signale von der großen Untereinheit (eng. LSU) der RUBISCO in Tabakblättern sind in der [Abb. 4-19](#) dargestellt.

Bei Ammoniumbehandlung sind die Signale sowohl beim Wildtyp als auch bei den transgenen Linien verstärkt, was auch für die Behandlung von Ammonium-Nitrat-Mischung gilt.

Die RUBISCO repräsentiert ca. 50 % der löslichen Proteine in Blättern (d.h. hohe Stickstoffmenge) bei den meisten Pflanzen (Masclaux *et al.*, 2000). Deswegen waren bei N-Defizit (Kontrolle) die RUBISCO-Signale besonders schwach ebenso auffällig in den transgenen Linien.

Die Schätzung der RUBISCO-Signale mittels densitometrischer Analyse ist in der [Abb. 4-20](#) dargestellt.

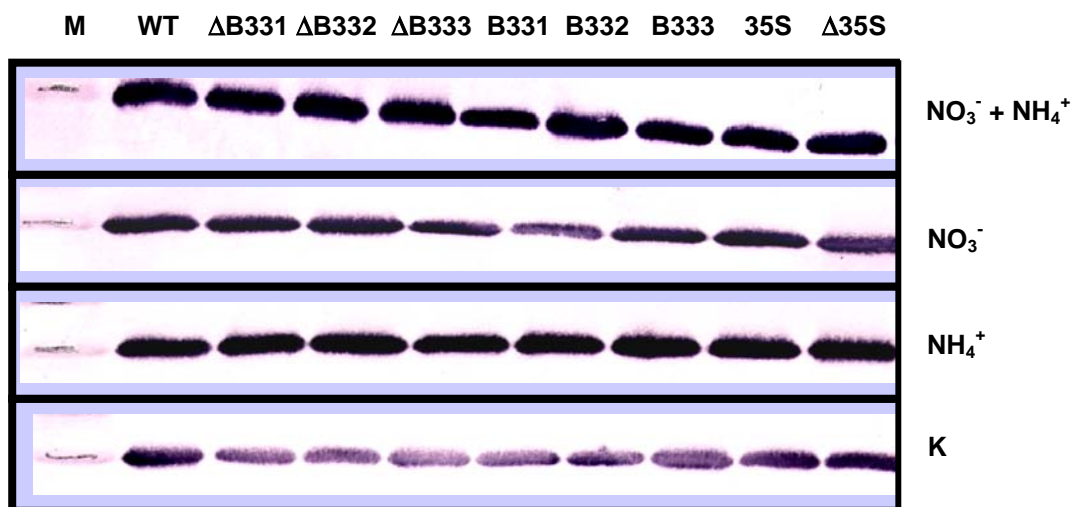


Abb. 4-19: RUBISCO-Proteinspiegel (LSU 50-55 kDa) in Blättern von transgenen Tabakpflanzen.

Anti-RUBISCO 1:3000, Inkubationszeit: 16 h. GAR-AP 1:1000, Inkubationszeit 4 h. Proteinmenge: 3 µg.

M: Proteinmarker, WT: Wildtyp, Δ B33 (von 1 bis 3) und B33 (von 1 bis 3): transgene Linien mit Überexpression der PPK mit dem wurzelspezifischen B33-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden, 35S und Δ 35S: Linien mit PPK-Überexpression mit dem konstitutiven 35S-Promotor in Plastiden beziehungsweise Cytosol.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

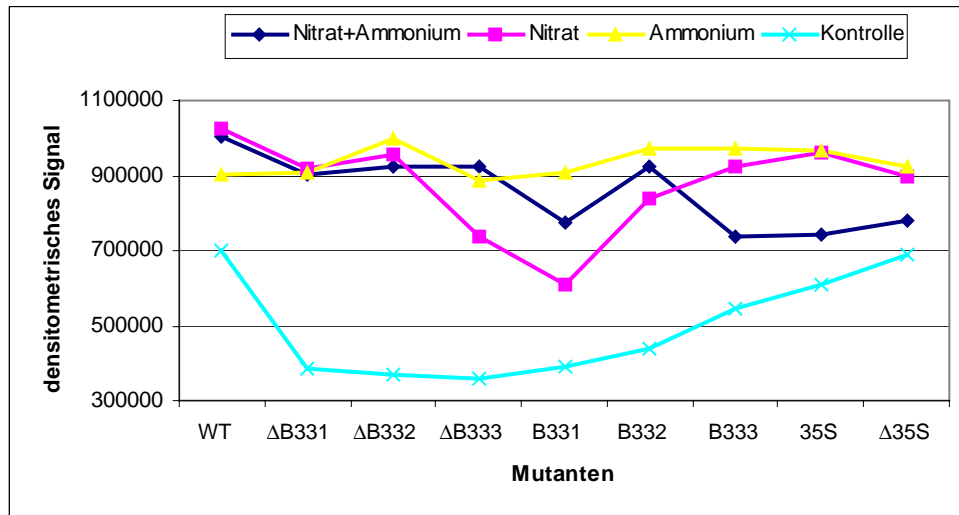


Abb. 4-20: Densitometrisches Signal der RUBISCO (LSU) in Tabakblättern.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

4.2.3.3. Verhältnis RUBISCO/PEPC

Den Unterschied im Verhältnis RUBISCO/PEPC repräsentiert Änderungen in den photosynthetischen Wegen (Matsuoka *et al.*, 2001). Da die PPDK als ein Enzym von C_4 - und CAM-Stoffwechsel charakterisiert ist, und in einer C_3 -Pflanze (Tabak) überexprimiert wurde, wurde in diesem Versuch die Bestimmung des Verhältnisses RUBISCO/PEPC durchgeführt. Zusätzlich steht die PPDK in engem Zusammenhang mit der PEPC.

Normalerweise wird dieses Verhältnis an Hand der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme berechnet, z. B. wurden die Werte des Verhältnisses RUBISCO/PEPC für *Spinacea oleracea* (Stoffwechsel C_3) mit 16 und für *Zea mays* (Stoffwechsel C_4) mit 0,5 angegeben (Keeley, 1999). Hier wurden die Werte aus den densitometrischen Analysen dazu benutzt, das Verhältnis von RUBISCO zu PEPC zu bestimmen.

Die hier erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Ranjith *et al.* (1995) und Saliendra *et al.* (1996) überein. Sie fanden bei einer Abnahme der

Stickstoff-Düngung und bei Trockenstress eine Erhöhung des Verhältnisses der Aktivitäten PEPC/RUBISCO.

Die Verhältnisse der RUBISCO/PEPC-Signale in Tabakpflanzen sind in der [Abb. 4-21](#) dargestellt.

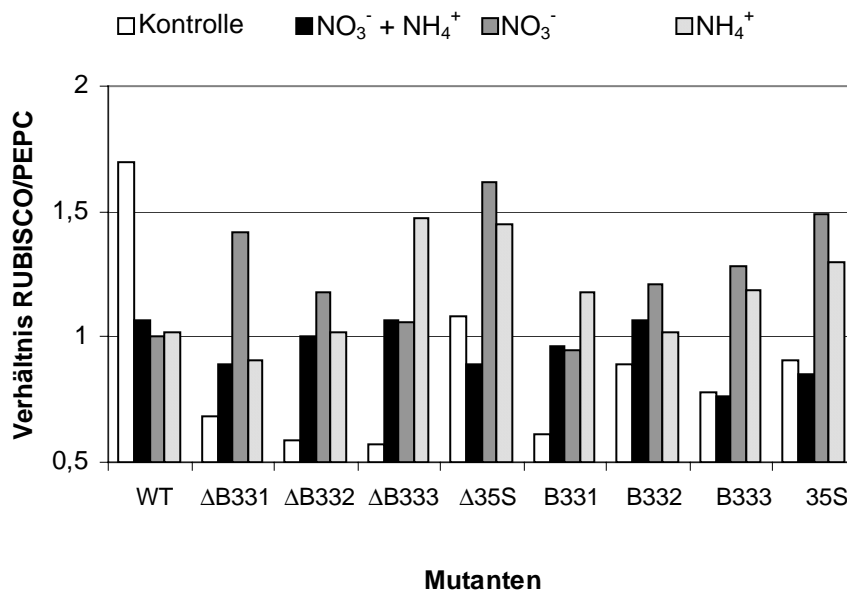


Abb. 4-21: Verhältnis zwischen Proteinsignalen von RUBISCO und PEPC (RUBISCO/PEPC) in transgenen Tabakpflanzen mit unterschiedlichen Stickstoffbehandlungen.

A. NO₃⁻+NH₄⁺: 13 mM NO₃⁻ + 2 mM NH₄⁺. **B.** NO₃⁻: 15 mM. **C.** NH₄⁺: 15 mM. **D.** Kontrolle: 3 mM NO₃⁻.

Bei Stickstoffbehandlung, unabhängig von der Stickstoffquelle, waren die Werte dieses Verhältnisses nicht sehr unterschiedlich, weder im Wildtyp noch in transgenen Pflanzen. Ausnahme war Nitratgabe, die allgemein in den transgenen Pflanzen das Verhältnis RUBISCO/PEPC erhöht.

Interessanterweise wurde bei der Kontrolle (Nährstoff-Stress) das Verhältnis im Wildtyp stark erhöht, während es in den transgenen Tabakpflanzen reduziert wurde, mit Ausnahme der Δ35S-Linie, welche außerdem ein schlechtes Wachstum und niedrige Samenproduktion zeigte.

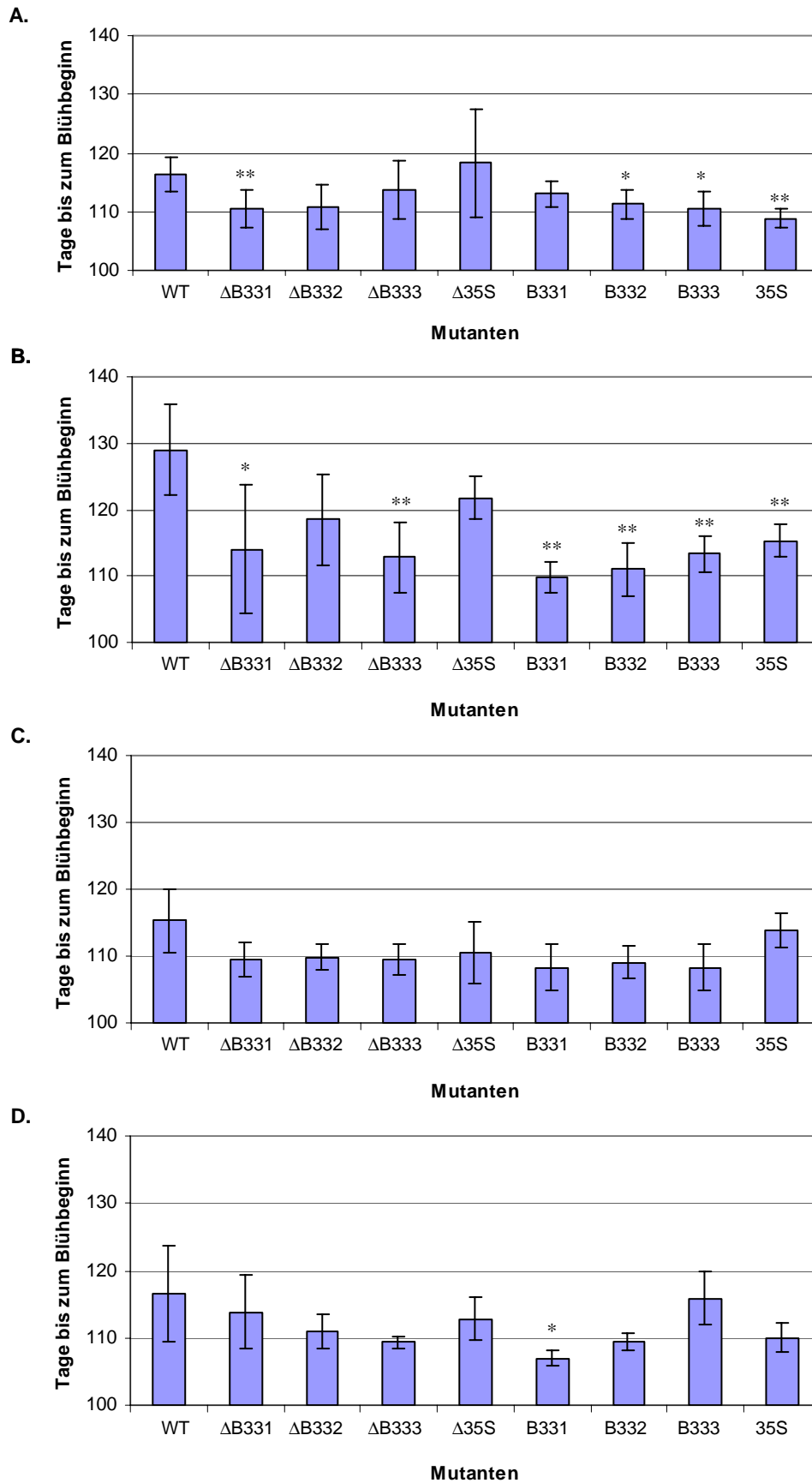
4.2.4. Blühbeginn

Der Lebenszyklus des Wildtyps und der unterschiedlichen transgenen Tabakpflanzen wurde in indirekter Weise bestimmt. Dafür wurde der Blühbeginn als Anhaltspunkt genommen, was in [Abb. 4-22](#) dargestellt ist.

Unabhängig von der Behandlung war der Beginn der Blühzeit in den WT-Pflanzen verzögert. Bei Nitratbehandlung wurde eindeutig beobachtet, dass der Blühbeginn eine Verzögerung um ca. 13 Tage im Vergleich zu den restlichen Behandlungen zeigte.

Ammoniumgabe beschleunigte die Blühzeiten von transgenen Pflanzen, besonders der Linien mit PPK-Überexpression mit dem wurzelspezifischen Promotor (Δ B33- und B33-Linien).

Bei der Kontrolle (N-defizitäre Lösung) und bei einer Kombination von Nitrat und Ammonium wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und transgenen Pflanzen beobachtet.



(Fortsetzung siehe nächste Seite)

Abb. 4-22: Anzahl der Tage bis zum Blühbeginn der Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle im Nährmedium.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . **B.** NO_3^- : 15 mM. **C.** NH_4^+ : 15 mM. **D.** Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P = 0,05) und ** höchst signifikant (P = 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.5. Ertrag

Bei der Ertragsbewertung wurden die Kapselproduktion, Gewicht der individuellen Samen und die gesamte Samenproduktion pro Pflanze bestimmt.

4.2.5.1. Kapselproduktion

Die Anzahl der Kapseln pro Pflanze wurde bestimmt und ist in [Abb. 4-23](#) gezeigt. Ammonium hatte sowohl einzeln als auch in Kombination mit Nitrat eine positive Wirkung auf die Kapselproduktion, besonders in den transgenen Pflanzen. Bei Behandlung mit Nitrat wurde die Kapselproduktion im Wildtyp und in den transgenen Pflanzen reduziert. Die geringste Kapselanzahl wurde in allen Fällen bei der Kontrolle (N-Defizit) beobachtet, im Durchschnitt ca. 35, 33, 35, 40 und 34 Kapseln im Wildtyp, Δ B33-Linien, Δ 35S-Linie, B33-Linien beziehungsweise 35S-Linie.

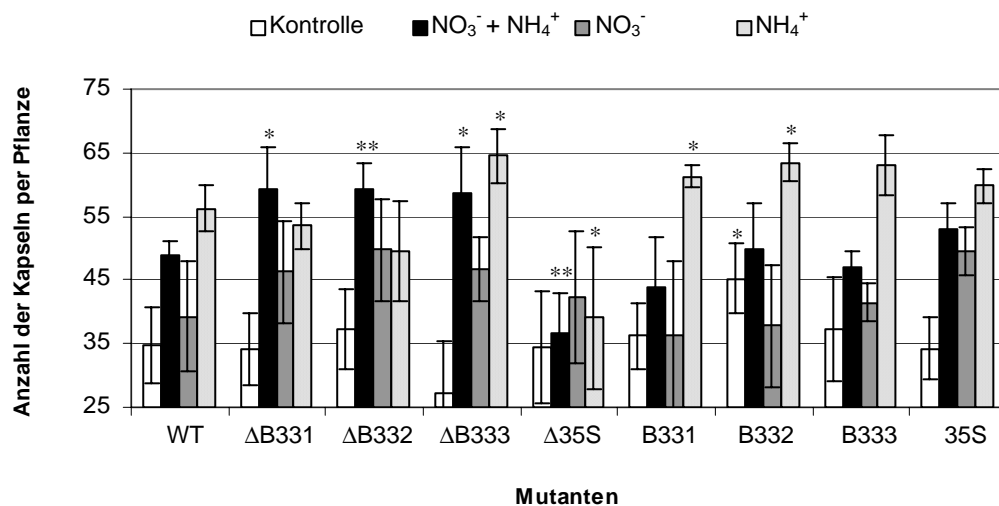


Abb. 4-23: Anzahl der Kapseln pro Tabakpflanze nach unterschiedlichen Stickstoffbehandlungen.

Kontrolle: 3 mM NO₃⁻. NO₃⁻+NH₄⁺: 13 mM NO₃⁻ + 2 mM NH₄⁺. NO₃⁻: 15 mM. NH₄⁺: 15 mM.

[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.5.2. Samengewicht

Zur Schätzung des individuellen Samengewichts wurde das 1000-Samen-Gewicht bestimmt und das Gewicht durch 1000 dividiert.

Das individuelle Samengewicht wurde nicht signifikant von der Stickstoffquelle beeinflusst, während bei der Kontrolle (N-defizitäre Lösung) das Gewicht der Samen reduziert war, besonders in den ΔB33-Linien und im Wildtyp ([Abb. 4-24](#)).

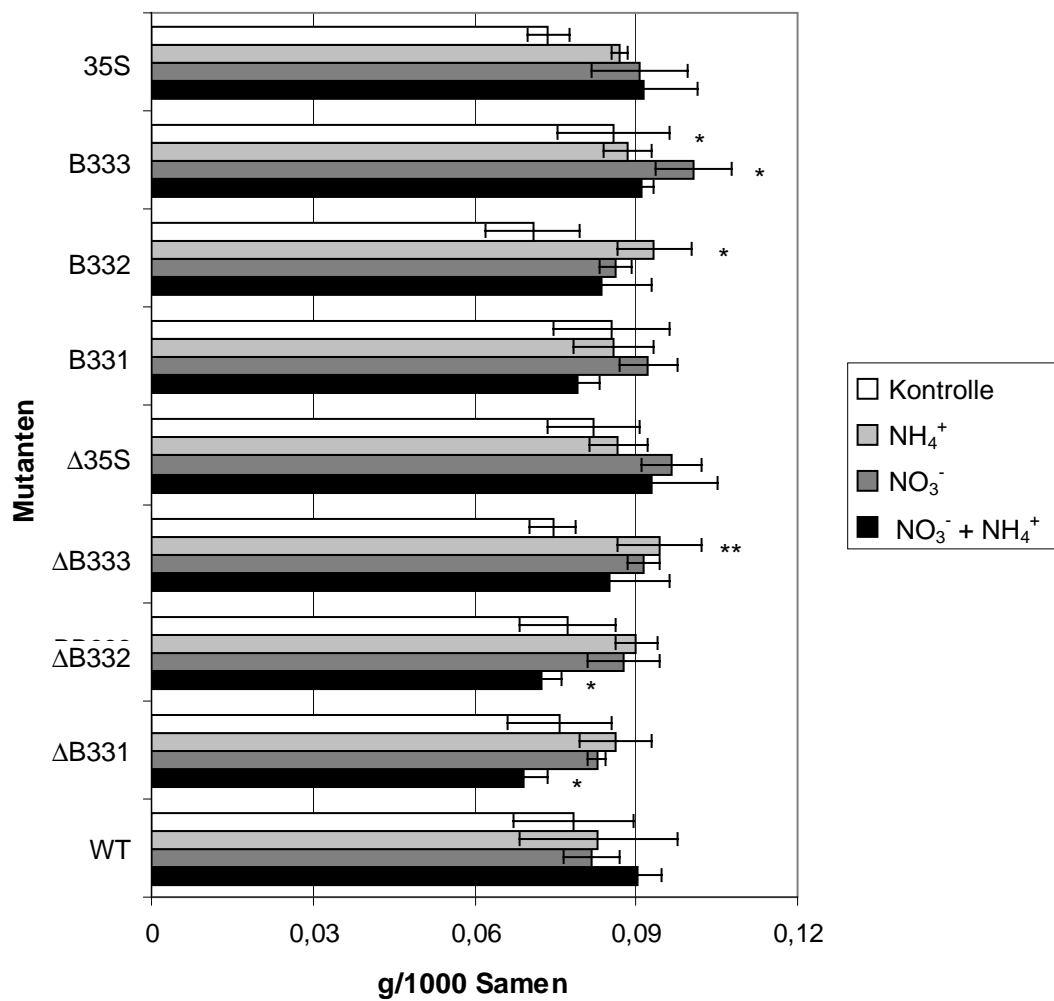


Abb. 4-24: Tausendsamengewicht in Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Stickstoffbehandlung.

Kontrolle: 3 mM NO₃⁻. NO₃⁻+NH₄⁺: 13 mM NO₃⁻ + 2 mM NH₄⁺. NO₃⁻: 15 mM. NH₄⁺: 15 mM.

[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.2.5.3. Samenertrag

Der Wildtyp zeigte ungefähr die gleichen Erträge unabhängig von den Stickstoffquellen, die ihm angeboten wurden. Bei der Kontrolle (N-Defizit) war die Samenproduktion im Vergleich zu den Stickstoffbehandlungen um 15 % reduziert. Nitratgabe hatte eine negative Wirkung auf die Erträge der transgenen Tabakpflanzen, besonders in den plastidären Linien (B33-Linien und 35S-Linie). Die entgegengesetzte Tendenz wurde bei Ammoniumbehandlung der transgenen Linien beobachtet, im Durchschnitt haben die Δ B33-Linien, B33-Linien und die 35S-Linie den Wildtyp um 25, 27 beziehungsweise 37 % übertroffen. Ausnahme war die Δ 35S-Linie, die stark empfindlich auf Ammonium als einzige Stickstoffform reagierte. Sie hatte ca. 42 % weniger Samengewicht als der Wildtyp.

Bei der Kontrolle (N-defiziente Lösung) waren interessanterweise die Erträge von fast allen transgenen Pflanzen niedriger als der Ertrag des Wildtyps. Nochmals zeigte in diesem Fall die Δ 35-Linie eine unterschiedliche Antwort, da sie hier den maximalen Ertrag erreichte ([Abb. 4-25](#)).

Im Allgemeinen hat der Samenertrag den transgenen Tabakpflanzen mit den Länge des Sprosses und mit der Proteinkonzentration in den Blättern korreliert. Eine negative Korrelierung wurde zwischen dem Samenertrag und der Proteinkonzentration in den Wurzeln beobachtet, d. h. bei niedriger Proteinkonzentration in den Wurzeln wurden höhere Samenerträge erhalten.

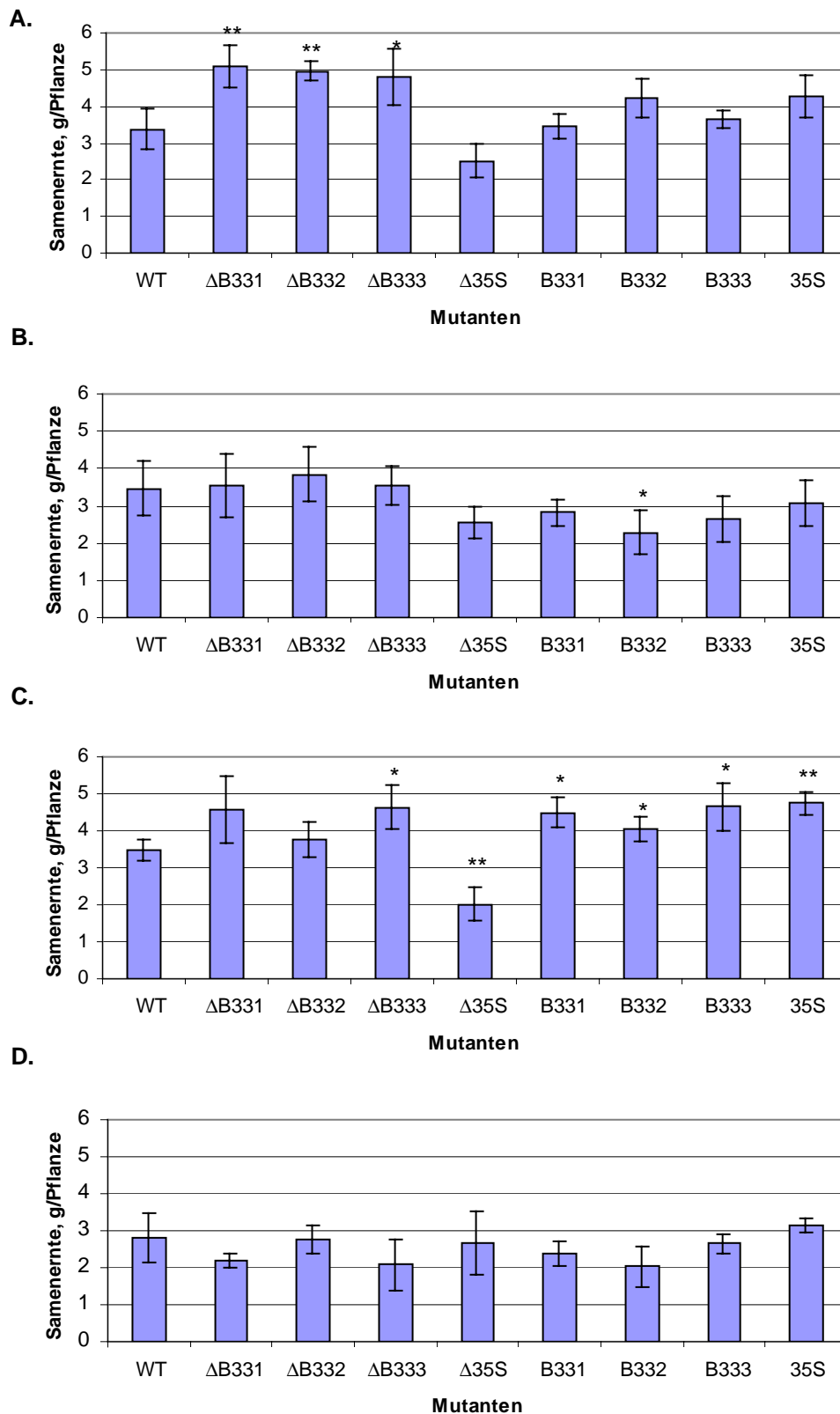


Abb. 4-25: Einfluss der Stickstoffquelle auf den Samenertrag von Tabakpflanzen.

A. $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$: 13 mM NO_3^- + 2 mM NH_4^+ . B. NO_3^- : 15 mM. C. NH_4^+ : 15 mM. D. Kontrolle: 3 mM NO_3^- .

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.3. Versuche zur Aluminium-Toleranz

Aluminium ist kein Nährelement, sondern ein toxisches Agens, wenn es zum Beispiel in pflanzliches Gewebe eindringt. Aluminium begrenzt die Produktivität der Pflanzen auf ca. 30 % der gesamten Weltfläche (Piñeros und Kochian, 2001). Das Aluminium liegt je nach pH-Wert in unterschiedlicher Form vor. Besonders gut löslich ist Aluminium in Form von Al^{3+} wie es bei niedrigem pH-Wert vorliegt ($\text{pH} < 4,5$) (Abb. 4-26). Insbesondere solche positiv geladenen monomeren Al-Spezies führen unter diesen Bedingungen zu toxischen Effekten und zur Schädigung der Pflanzenwurzeln (Kinraide und Parker 1990, Mengel, 1991).

Die hier verwendeten Aluminiumlösungen hatten einen pH-Wert von 4,3, damit Aluminium in der Form Al^{3+} bleiben kann, da die Pflanzen durch diese Form des Aluminiums am meisten gestresst werden (Marschner, 2002).

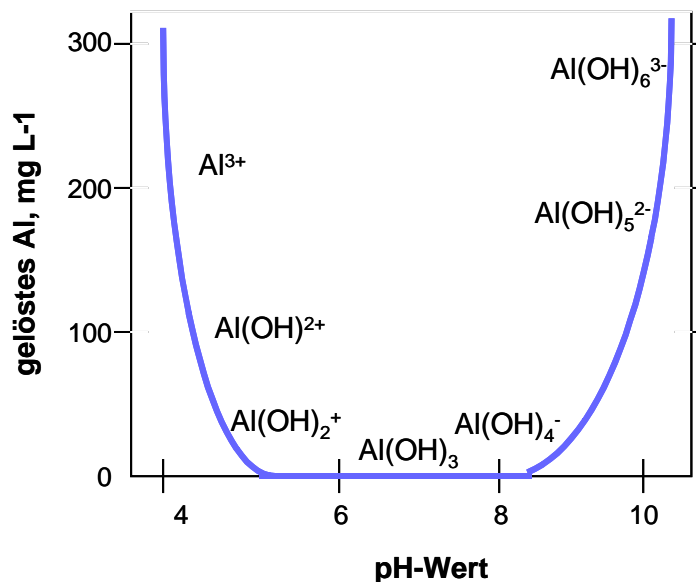


Abb. 4-26: Löslichkeit von Al-Oxiden und -Hydroxiden in Abhängigkeit vom pH-Wert (Mengel, 1991).

Obwohl aus zahlreichen Versuchen bekannt ist, dass die primären Effekte der Aluminiumtoxizität in der Pflanze die Wurzeln betreffen, wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss des Aluminiums auf das Wachstum des Sprosses untersucht. In den Wurzeln wurde die Bestimmung der Proteinmenge durchgeführt, die Inhibition des Wurzelwachstums und die Extrusion von organischen Säuren aus den Wurzeln als Indikator der Aluminiumtoleranz ermittelt. Außerdem wurden die Wurzeln auch mit Eriochrome Cyanine-R gefärbt, als Indikator von Aluminiumpräsenz in den Wurzelgeweben.

4.3.1. Wachstum der Pflanzen mit Aluminiumbehandlung

Die ersten visuellen Aluminium-Überschuss-Symptome bei Pflanzen sind die Inhibition des Wurzelwachstums, braune Wurzeln, kleine Blätter, kurze und dicke Internodien, und die ältesten Blätter sind gelblich und zerbrechlich (Bennett, 1993). In diesem spezifischen Versuch wurde nur der Einfluss des Aluminiums auf das Wachstum des Sprosses ermittelt.

Man beobachtete keine eindeutige Inhibition des Wachstums in den Sprossen der transgenen Pflanzen ([Abb. 4-27](#)). Aber es wurde sowohl in den transgenen Tabakpflanzen als auch im Wildtyp beobachtet, dass sie bleichsüchtig sind, besonders die Basalblätter. Dies wird durch Mangel an Nährstoffen in den Nährmedien hervorgerufen.

Ab einer Behandlung mit 100 μM Aluminium haben die Wildtyp-Pflanzen einige leichte Symptome von Al-Toxizität gezeigt. Die Internodien waren in spezifischer Weise verkürzt und verdickt.



Abb. 4-27: Entwicklung des Sprosses der WT- und der transgenen Tabakpflanzen in Abhängigkeit der Aluminium-Behandlungen.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

Behandlungen: 0 μM Al, 50 μM , 100 μM und 200 μM Al als $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in einer Lösung mit pH-Wert 4,3. Das Versuch wurde in Vermikulit für zwei Wochen durchgeführt. Jeder Topf wurde täglich mit 100 mL der entsprechenden Lösung gegossen (50 mL morgens und 50 mL abends).

WT: Wildtyp (negative Kontrolle), ΔB33 (von 1 bis 3) und B33 (von 1 bis 3): transgene Linien mit Überexpression der PPK mit dem wurzelspezifischen B33-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden. Δ35S und 35S: Linien mit PPK-Überexpression mit dem konstitutiven 35S-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden, *Mc*: *M. crystallinum* (positive Kontrolle).

4.3.2. Proteinbestimmung in den Wurzeln unter Aluminium-Behandlung

Es wurde der Einfluss unterschiedlicher Aluminiumkonzentrationen in den Nährmedien auf die Proteinmenge in den Wurzeln untersucht. Die Wurzeln wurden mittels Hydrokultur 24 h mit unterschiedlichen Aluminiumkonzentrationen behandelt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in der [Abb. 4-28](#) dargestellt.

Es wurde beobachtet, dass der Wildtyp die höchste Proteinmenge hat, wenn das Nährmedium die niedrigste Aluminium-Konzentration bzw. keine Al enthält (Kontrolle). Bei Erhöhung der Al-Konzentration hatten die Wurzeln des Wildtyps keine Kapazität Protein zu speichern. Die Menge an Protein war in diesen Fällen sehr stark reduziert, (zwischen 60 und 75 % im Vergleich zur Kontrolle). Bei den Kontrollen (ohne Al-Behandlung) zeigte der Wildtyp die größte Menge an Protein. Im Allgemeinen zeigten die Wurzeln der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp eine entgegengesetzte Antwort auf die Aluminium-Inkubation. Bei Behandlung mit 50 μM und 100 μM Al war die Proteinmenge in den Wurzeln größer als in der Kontrolle (ohne Al-Behandlung), nur bei 200 μM Al war die Proteinmenge in den ΔB33 - und B33-Linien im Vergleich zur Kontrolle (ohne Al-Behandlung) niedriger. Trotz dieser Verminderung zeigten die transgenen Pflanzen mit der höchsten Al-Behandlung eine höhere Proteinkonzentration als der Wildtyp.

Die transgenen Linien mit dem konstitutiven Promotor 35S (Überexpression sowohl in den Plastiden als auch im Cytosol), zeigten eine interessante Tendenz. Diese beiden Linien hatten keine Reduktion der Proteinmenge bei 200 μM Al-Behandlung. In diesem Fall hatten sie ungefähr die selbe Menge an Protein wie bei der Behandlung mit 50 μM Al. Die cytosolische Linie (Δ35S) zeigte bei der Behandlung

mit 200 μM Al die höchste Proteinmenge im Vergleich zu den restlichen Mutanten und zum Wildtyp.

Die Ergebnisse von Proteinkonzentration in Wurzeln aus dem Stickstoffdüngungsversuch sind nicht mit den hier erhaltenen Ergebnissen vergleichbar, da die Pflanzen ein unterschiedliches Alter und verschiedene Versuchsbedingungen hatten.

Die Proteinspeicherung in den Wurzeln unter Stressbedingung wurde in einigen Arbeiten berichtet, zum Beispiel als Folge des Salzstress in Tomatenwurzeln (Chen und Plant, 1999) und des Dürrestresses in Wurzelkeimlingen von *Pinus banksiana* (Mayne *et al.*, 1994).

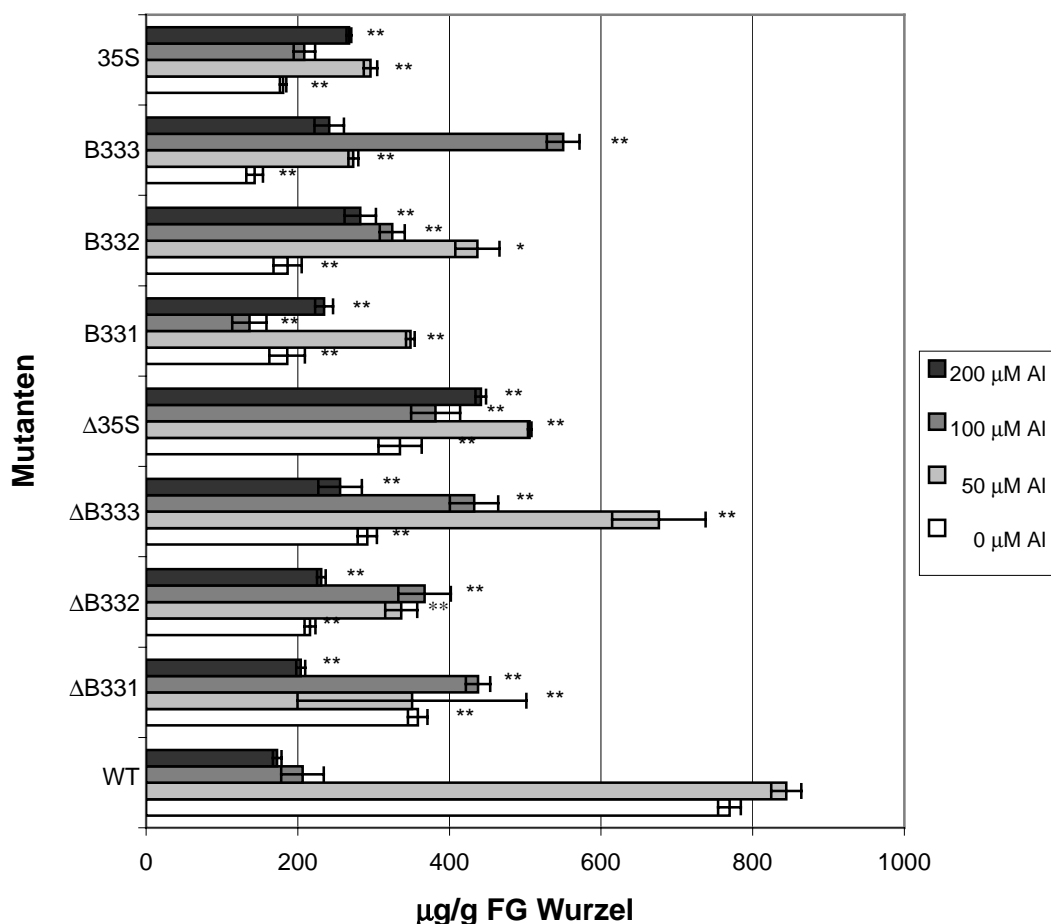


Abb. 4-28: Proteinkonzentration in Wurzeln von Tabakpflanzen bei Inkubation mit unterschiedlichen Aluminium-Konzentrationen.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

Behandlungen: 0 μM Al, 50 μM , 100 μM und 200 μM Al als $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in einer Lösung mit pH-Wert 4,3. Das Versuch wurde in Hydrokultur durchgeführt. Nach 24 Stunden Al-Behandlungen wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

WT: Wildtyp (Kontrolle), ΔB33 (von 1 bis 3) und B33 (von 1 bis 3): transgene Linien mit Überexpression der PPDK mit dem wurzelspezifischen B33-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden, Δ35S und 35S: Linien mit PPDK-Überexpression mit dem konstitutiven 35S-Promotor in Cytosol beziehungsweise Plastiden, *Mc*: *M. crystallinum* (positive Kontrolle).

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P 0,05) und ** höchst signifikant (P 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.3.3. Ermittlung der Inhibition des Wurzelwachstums bei Aluminiumbehandlung

Die auffälligste Antwort der Pflanze auf die Al-Toxizität ist die Reduktion des Wurzelwachstums (Foy, 1992). Auf welche Weise Aluminium die Zellteilungsaktivität inhibiert ist bis heute allerdings unklar.

Die Wurzeln wurden in Petri-Schalen mit MS-Medium ohne Al und mit 100 μM Al behandelt. Das Experiment hatte eine Dauer von 10 Tagen. Das Wurzelwachstum wurde täglich bestimmt.

Es gab eine Inhibition des Wurzelwachstums sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten, aber das Wurzelwachstum des Wildtyps wurde deutlich höher inhibiert. Bei Al-Behandlung im Wildtyp wurde auch die Entwicklung der Wurzelhaare unterbrochen (Abb. 4-29). Jones *et al.* (1998) berichteten eine Inhibition im Wachstum der Wurzelhaare unter Al-Behandlungen in Al-empfindlichen Mutanten von *Arabidopsis thaliana*.

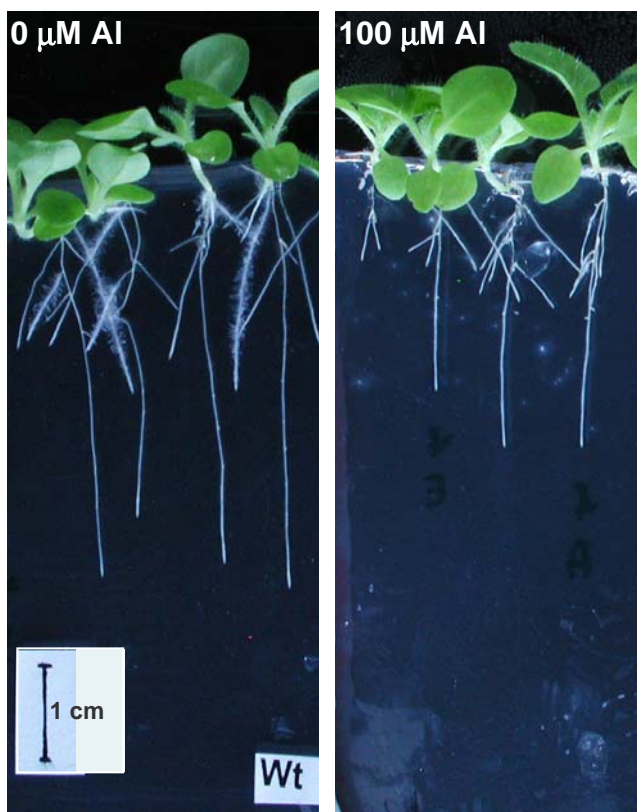


Abb. 4-29: Wurzelwachstum von Keimlingen der WT-Tabakpflanzen in MS-Medium ohne Al-Behandlung und mit 100 μM Al-Behandlung.

Fotoaufnahme nach 10 Tage Al-Behandlung im MS-Medium. Alte der Keimlinge: 20 Tage.

Die Inhibition des Wurzelwachstums begann beim Wildtyp nach 2 Tagen der Al-Behandlung ([Abb. 4-30](#)), während es in den transgenen Linien mit dem Promotor B33 (ΔB33 - und B33-Linien) erst nach 3 oder 4 Tagen zu beobachten war ([Abb. 4-31](#)).

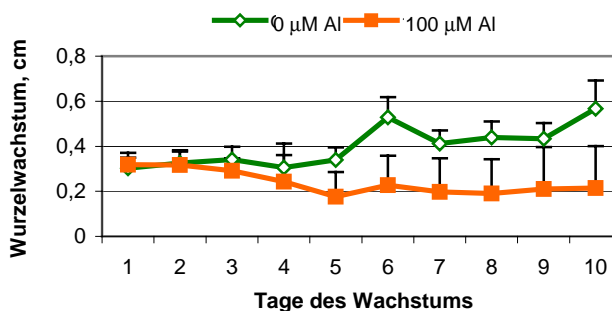


Abb. 4-30: Einfluss der Al-Behandlung auf das Wurzelwachstum in Keimlingen von WT-Tabakpflanzen.

[n=10, \pm SD].

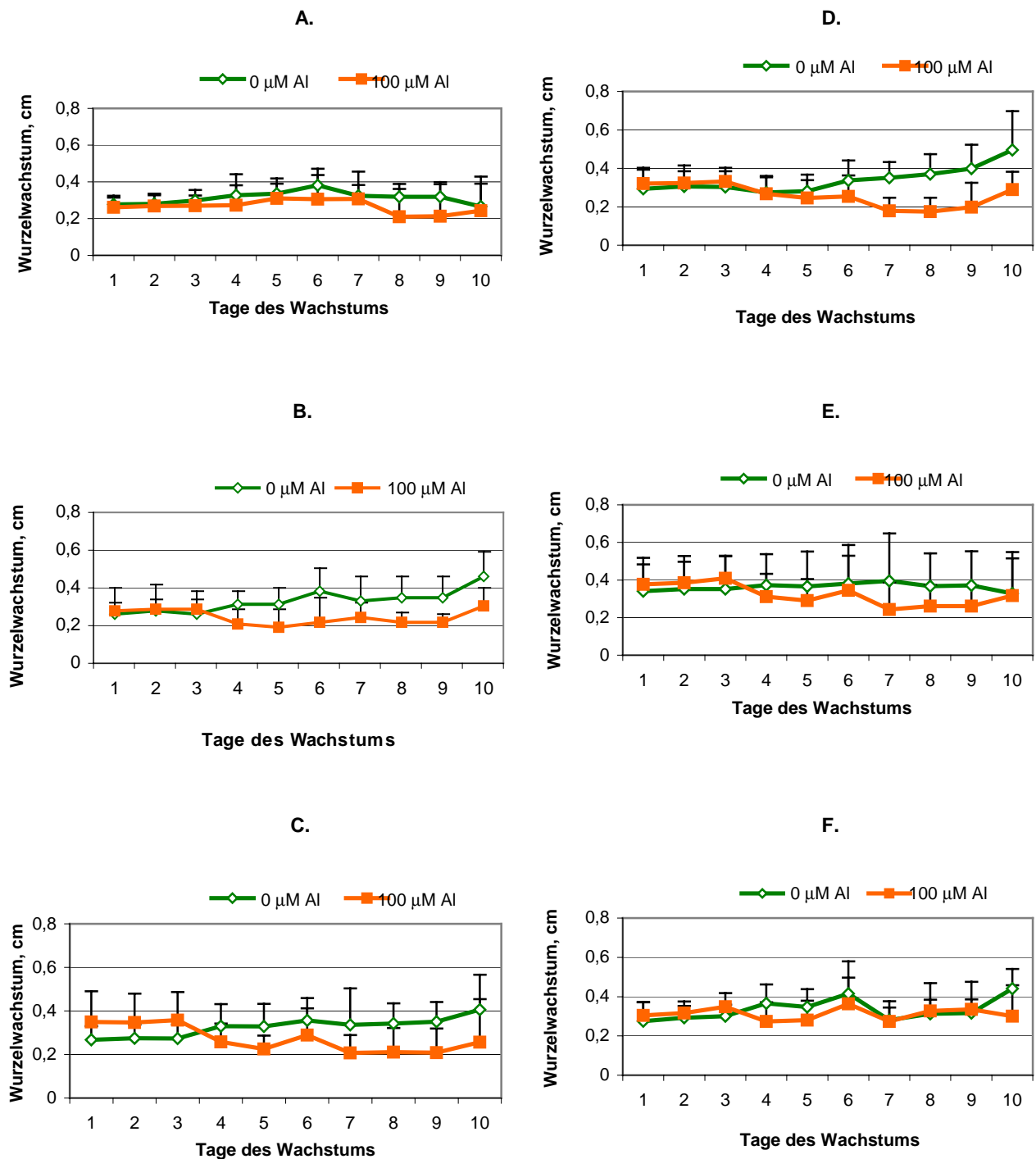


Abb. 4-31: Einfluss der Al-Behandlung auf das Wurzelwachstum in transgenen Tabakkeimlingen, die die PPK mit dem B33-Promotor überexprimieren.

A. bis C.: Die einzelnen Δ B33-Linien, D. bis F.: Die einzelnen B33-Linien.

[n=10, \pm SD].

Man konnte auch beobachten, dass die Linien mit Überexpression der PPDK in den Plastiden unter dem B33-Promotor weniger Unterschied im Wachstumsmuster zwischen behandelten und nicht behandelten Wurzeln zeigten. Daraus ergibt sich eine höhere Al-Toleranz (Abb. 4-31).

Eine höhere Al-Toleranz wurde auch in den Linien mit dem konstitutiven 35S-Promotor beobachtet, dies gilt sowohl für die cytosolische Linie als auch für die plastidäre Linie (Abb. 4-32). In beiden Fällen gab es eine geringere Reduktion des Wachstums von Wurzeln als Folge des Al-Gehalts im MS-Medium.

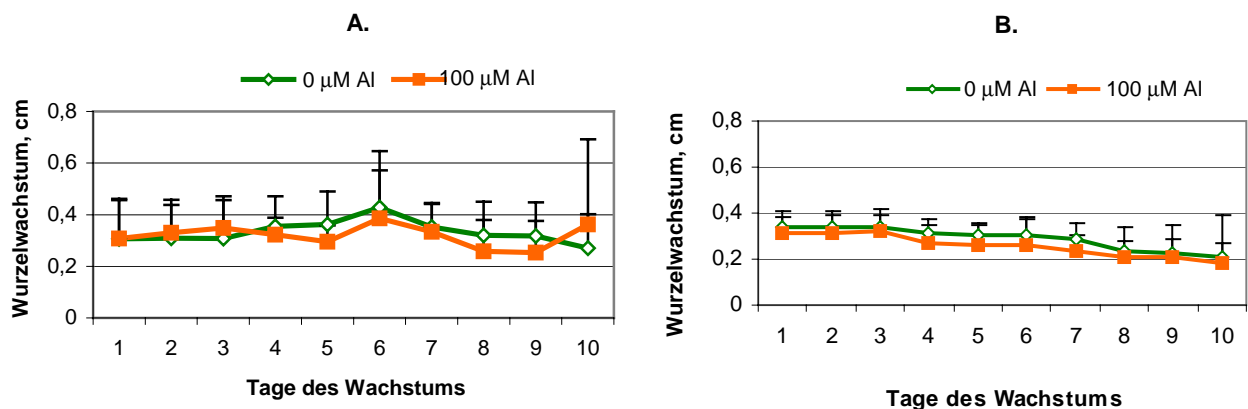


Abb. 4-32: Einfluss der Al-Behandlung auf das Wurzelwachstum in Keimlingen von transgenen Tabakpflanzen, die die PPDK mit dem 35S-Promotor überexprimieren.

A. 35S-Linie, B. Δ 35S-Linie.

[n=10, \pm SD].

In Abb. 4-33 ist die relative Elongation der Wurzel von transgenen und WT-Tabakpflanzen dargestellt.

Die Al-behandelten Wurzeln von WT-Pflanzen reduzierten ihr Wachstum um 49 %, während die transgenen Linien mit dem wurzelspezifischen Promotor im Durchschnitt eine Verringerung der Elongation nur um 13% zeigten. Zwischen den Δ B33-Linien und den B33-Linien (Überexpression im Cytosol beziehungsweise Plastiden) gab es einen geringeren Unterschied. Mit Aluminium-Behandlung wurde das Wurzelwachstum in den Linien Δ 35S und 35S nur um 11 % beziehungsweise um 13 % verringert.

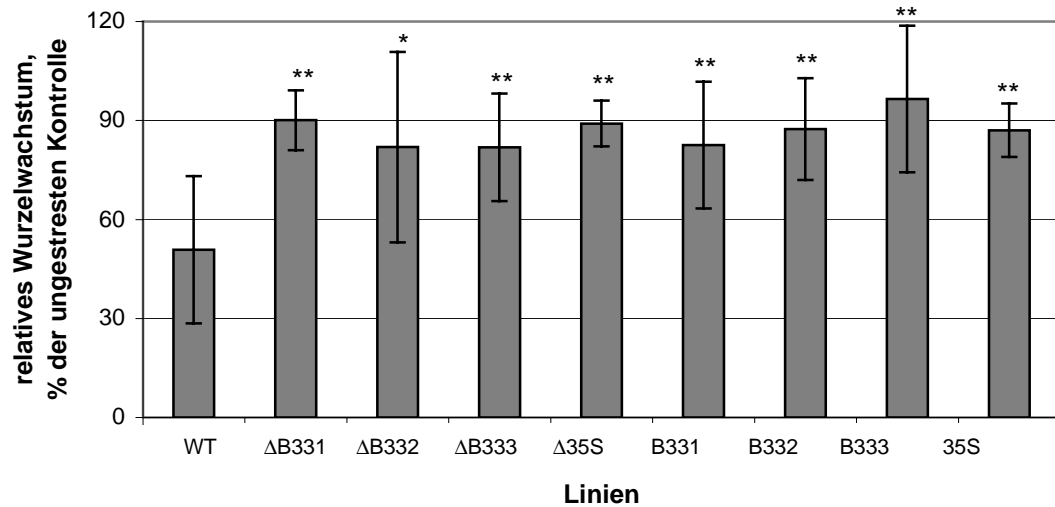


Abb. 4-33: Relatives Wurzelwachstum von transgenen und WT-Tabakpflanzen mit Behandlung mit 100 μ M Aluminium.

[n=10, \pm SD, t-Student: * signifikant (P = 0,05) und ** höchst signifikant (P = 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

4.3.4. Extrusion von organischen Säuren aus den Wurzeln von Tabakpflanzen

Wenn Aluminium im Boden oder in der Nährlösung anwesend ist, bedeutet die Extrusion von organischen Säuren aus den Wurzeln einen der wichtigsten Toleranzmechanismen der Pflanze. Von unterschiedlichen Pflanzen wurde berichtet, dass Ausscheidung von organischen Säuren und die Aluminiumresistenz in einer direkten Weise korrelieren. Abhängig von der Pflanzenart sind Äpfelsäure, Oxalat und Zitronensäure als die hauptsächlichen organischen Anionen in den Exsudaten von Wurzeln nach Aluminiumbehandlung identifiziert worden (Miyasaka *et al.*, 1991; Delhaize *et al.*, 1993; Basu *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1995; Kochian, 1995; und Jones, 1998).

Die organischen Säuren, die hier untersucht wurden, waren Äpfelsäure und Zitronensäure. Die Bestimmung erfolgte in Exsudaten, die aus Hydrokultur von behandelten Wurzeln mit und ohne Aluminium-Behandlung gewonnen wurden.

Die Al-Präsenz im Nährmedium beeinflusste den Gehalt der organischen Säuren. Das Zitronensäureniveau war eindeutig niedriger als das Niveau der Äpfelsäure. (Abb. 4-34 und 4-35).

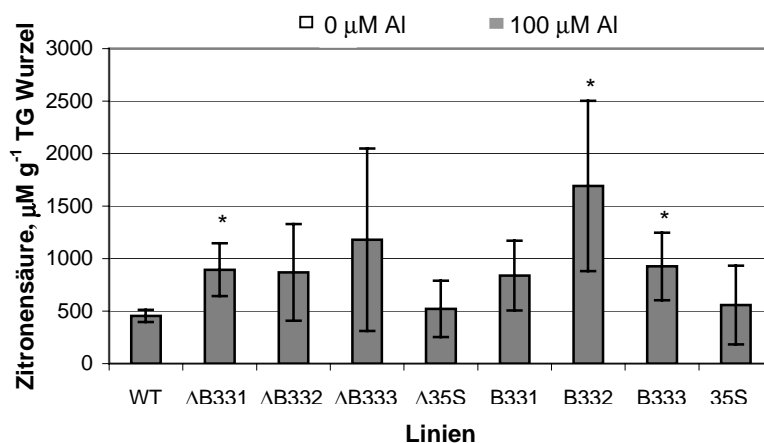


Abb. 4-34: Ausscheidung von Zitronensäure aus Tabakwurzeln mit und ohne Aluminium-Inkubation.

In Abwesenheit von Aluminium wurde kein Zitronensäure gefunden.

[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) in Bezug auf den Wildtyp].

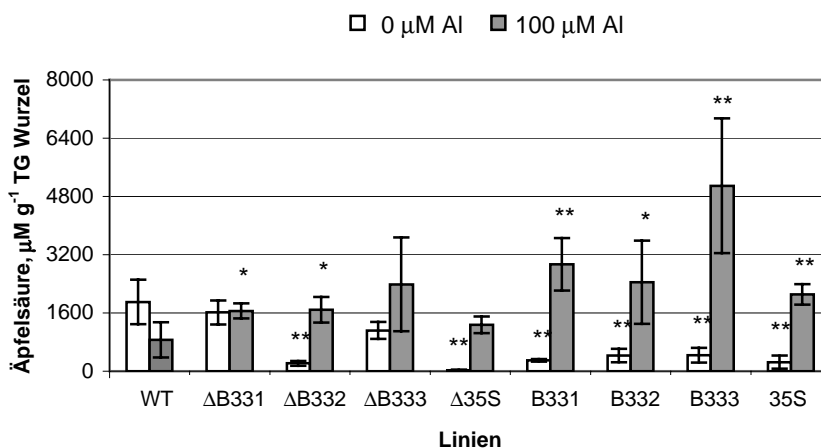


Abb. 4-35: Ausscheidung von Äpfelsäure aus Tabakwurzeln mit und ohne Aluminium-Inkubation.

[n=4, ± SD, t-Student: * signifikant (P < 0,05) und ** höchst signifikant (P < 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].

Bei Abwesenheit von Al im Medium wurde Zitronensäure nicht detektiert, weder beim Wildtyp noch bei den transgenen Pflanzen. Bei Behandlung der Keimlinge mit Aluminium schieden die Wurzeln von transgenen Pflanzen eine große Zitronensäuremenge aus. Ausnahme war die Linie $\Delta 35S$, die weniger Ausscheidung von Zitronensäure als der Wildtyp zeigte ([Abb. 4-34](#)).

Bei Aluminiumbehandlung stieg die Extrusion von Äpfelsäure in den Wurzeln von transgenen Pflanzen eindeutig an. Ausnahme war die Linie $\Delta B33-1$, die eine ähnliche Extrusion mit und ohne Aluminiumbehandlung zeigte. Bei den cytosolischen Linien $\Delta B332$ und $\Delta B333$ war die Ausscheidung von Äpfelsäure acht beziehungsweise zwei Mal höher als bei der entsprechenden Kontrolle (ohne Al-Behandlung). Unter allen transgenen Pflanzen schied die cytosolische $\Delta 35S$ -Linie bei Al-Behandlung auch die geringste Menge an Äpfelsäure aus.

Man konnte eindeutig beobachten, dass die B33-Linien die größte Äpfelsäuremenge ausschieden. Bei Al-Behandlung ist die Äpfelsäurekonzentration der Linien B331 und B332 gegenüber der Kontrolle 10-fach bzw. 6-fach erhöht. Bei der Linie B333 ist die Äpfelsäurekonzentration sogar um das 12-fache erhöht. Die Ausscheidung von Äpfelsäure der 35S-Linie ist vergleichbar mit der Ausscheidung der $\Delta B33$ -Linien. Im Gegensatz zu den transgenen Pflanzen zeigte der Wildtyp eine niedrigere Ausscheidung von Äpfelsäure bei Al-Behandlung. ([Abb. 4-35](#)).

4.3.5. Wurzelfärbung mit Eriochrome Cyanine-R

Ich führte dieses Experiment durch, um das Aluminium im Wurzelgewebe nachzuweisen. Es wurde eine starke Färbung in der Wurzelspitze des Wildtyps beobachtet, was auf Al-Absorption hinweist ([Abb. 4-36A](#)). Hier hat die Färbung die Übergangszone zwischen Wurzel und Spross erreicht, d. h. entlang der gesamten Hauptachse der Wurzel. Auch in den transgenen Keimlingen gab es eine Färbung, aber in niedriger Intensität und nur im Apex lokalisiert. Die Abbildung [4-36B](#) ist repräsentativ für die Mehrzahl der Wurzeln der transgenen Pflanzen.

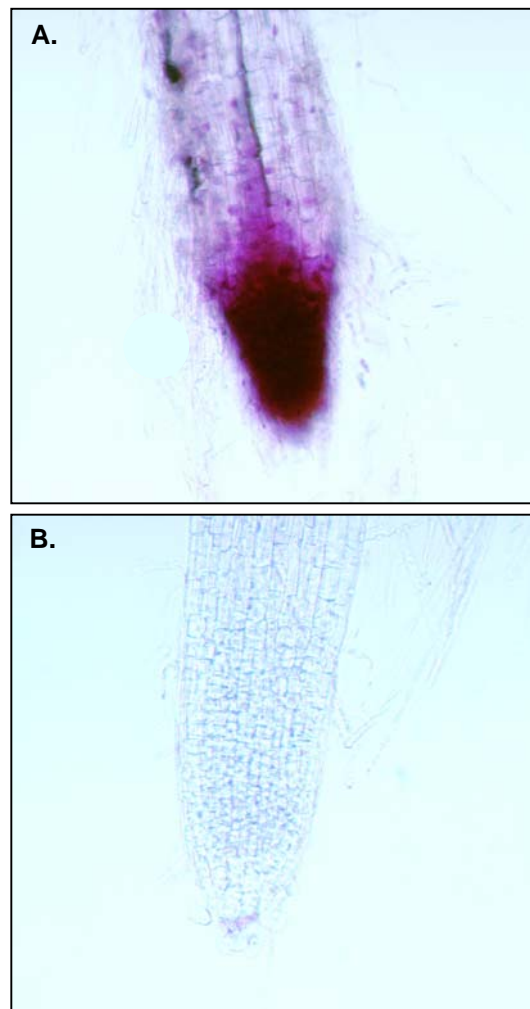


Abb. 4-36: Färbung mit Eriochrome Cyanine-R von Al-behandelten Tabakwurzeln.
A. Wurzel vom WT. B. Wurzel von transgenen Keimlingen.

Beim Wildtyp wurden ungefähr 90 % der Wurzeln mit ECR gefärbt. Bei den Linien Δ B33-Linien, Δ 35S-Linie, B33-Linien und 35S-Linie dagegen im Durchschnitt nur 28, 25, 26 beziehungsweise 12 % ([Abb. 4-37](#)).

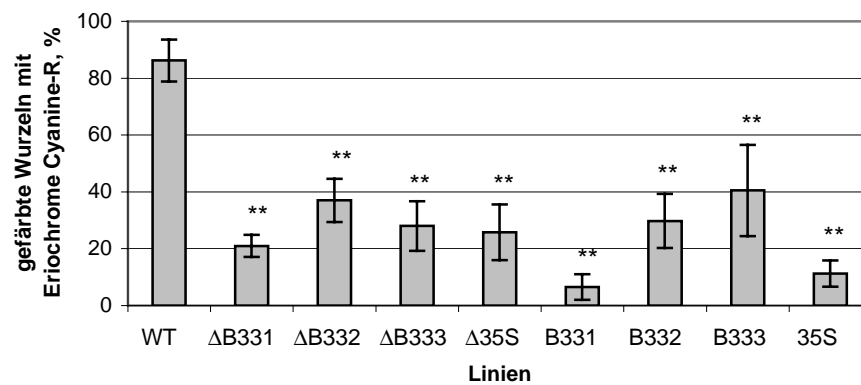


Abb. 4.37: Anteil von gefärbten Wurzeln mit ECR in den transgenen und WT-Tabakpflanzen.

[n=4, \pm SD, t-Student: * signifikant (P 0,05) und ** höchst signifikant (P 0,01) in Bezug auf den Wildtyp].