

**Konsequenzen der Expression eines
Transportproteins des Kartoffelblattrollvirus
in transgenen Kartoffelpflanzen
(*Solanum tuberosum* L.)**

Physiologische, strukturelle
und morphogenetische Auswirkungen
eines einzigen Gens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich
Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Siegbert Günther

Gießen 2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Aart J. E. van Bel gilt mein ganz besonderer Dank für die Initiierung des Projekts. Ferner bedanke ich mich für die fruchtbaren Denkanstöße während der Planung der Experimente, den regen Gedankenaustausch bei der Interpretation der Ergebnisse und für die Geduld, die er mir in ergebnisarmen Zeiten entgegenbrachte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts ganz herzlich bedanken. Dr. Michael Knoblauch hat mich in die Arbeitsweise des „Confocals“ eingewiesen und zu allen Fragen über dieses Thema Antworten gewusst. Dr. Katrin Ehlers hat mich gründlich in die Geheimnisse der Elektronenmikroskopie eingeführt. Außerdem hat sie wertvolle Anregungen geliefert, die mithalfen, die Ergebnisse dieser Arbeit in einen größeren Zusammenhang zu stellen. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Petra Stutz, die bei zahlreichen Laborarbeiten mitgeholfen hat. Bei allen anderen Mitgliedern der AG van Bel, die nicht extra genannt wurden, möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und das gute Betriebsklima bedanken. Gleiches gilt für die anderen Mitarbeiter des Botanischen Instituts.

Ganz besonders dankbar bin ich Dr. Youqun Wang (Agricultural University, Peking, China), der an den Untersuchungen zur Differenzierung des Xylems beteiligt war und bei der Bestimmung der Plasmodesmenfrequenz einen wesentlichen Beitrag geliefert hat.

Dr. Godfrey Wafula Netondo (Maseno University, Kenia) danke ich für die Mitarbeit an den Salzstressexperimenten. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Martin Hardt (Zentrale Biotechnische Betriebseinheit, Justus-Liebig-Universität Gießen) für die engagierte Unterstützung bei der Arbeit am Flammen-Atomabsorptionsspektrometer und am Elektronenmikroskop. Mit Herrn Dr. Hans-Werner Koyro (Institut für Pflanzenökologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) habe ich fruchtbare Diskussionen geführt. Zudem hat er mich bei der Installation des Hydrokultursystems beraten und sein HPLC-System zur Analyse der Aminosäuren zur Verfügung gestellt. Bei ihm und bei seinem Mitarbeiter, Herrn Gerhard Mayer, der die Arbeiten an der HPLC durchgeführt hat, möchte ich mich herzlich bedanken. Ebenso bei dem bärtigen und gleichsam geistreichen Gärtnermeister Dietmar Haffer. Durch seine zunehmende Fürsorge waren alle meine Kartoffelpflanzen stets frei von Schädlingen.

Außerdem bedanke ich mich bei dem Mitinitiator des Projekts, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rohde vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln) und bei Herrn Dr. Eckard Tacke von der Firma Bioplant GmbH (Ebster) für die Bereitstellung der transgenen Pflanzen.

Nicht zu vergessen sind die Korrekturleserinnen und Korrekturleser: Emma Argüello Montserrat, Dietmar Haffer, Claudia Hanakam und Dr. Katrin Ehlers. Vielen Dank für die kritischen Anmerkungen und die sachdienlichen Hinweise auf diesen oder jenen Tüpfel!

Meine Freundin Emma hat mir die vorübergehend innige Beziehung zu meinem Computer nie verübelt und immer für mein seelisches Wohlbefinden gesorgt. Dafür danke ich ihr ganz herzlich.

Gießen, Januar 2004

Siegbert Günther

Abkürzungen

BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Blumenkohlmosaikvirus)
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (konfokales Laser Scanning Mikroskop)
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i> (Gurkenmosaikvirus)
Da	Dalton
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure, DNS)
FG	Frischgewicht
Fru	Fruktose
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (ein fluoreszierendes Markerprotein, dessen Gen aus dem Genom der Tiefseequalle <i>Aequorea victoria</i> isoliert wurde)
Glu	Glukose
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MP	<i>Movement protein</i> (virales Transportprotein)
MP17N	Transportprotein des PLRV mit einer N-terminalen Verlängerung
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
PD	Plasmodesmos
Pi	<i>Inorganic phosphate</i> (anorganisches Phosphat)
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i> (Kartoffelblattrollvirus)
PPU	<i>Pore/plasmodesma-unit</i> (Pore/Plasmodesmos-Einheit), spezieller Plasmodesmos zwischen Siebelement und Geleitzelle
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure, RNS)
Sac	Saccharose
SE/GZ	Siebelement/Geleitzelle
SEL	<i>Size exclusion limit</i> (Ausschlussdurchmesser)
TG	Trockengewicht
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> (Tabakmosaikvirus)
TMV-MP	Transportprotein des TMV
vDNA	Virale DNA
vRNA	Virale RNA

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINFÜHRUNG	4
2.1	ÜBERBLICK	4
2.2	PFLANZENVIREN	5
2.2.1	Infektion einer Pflanze und die Folgen für den Kohlenhydratmetabolismus	5
2.2.2	Das Kartoffelblattrollvirus	5
2.2.3	Zell-zu-Zell-Transport und Langstreckentransport von Pflanzenviren	6
2.3	ZELL-ZU-ZELL-TRANSPORT VON MAKROMOLEKÜLEN DURCH PLASMODESMEN	7
2.4	PLASMODESMEN UND ZELLDIFFERENZIERUNG	10
2.5	BEZIEHUNGEN ZWISCHEN VIRALEN TRANSPORTPROTEINEN, KOHLENHYDRATMETABOLISMUS UND SIGNALÜBERMITTLUNG	11
2.5.1	Einfluss viraler Transportproteine auf den Kohlenhydratmetabolismus	11
2.5.2	Regulation der Assimilatverteilung	14
2.5.3	Die Rolle von Zuckern als Signalmoleküle	15
2.6	POTENZIELLE TOLERANZ MP17N-TRANSGENER PFLANZEN GEGEN SALZSTRESS	16
2.7	ZIELE DIESER ARBEIT	18
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	PFLANZEN	20
3.2	KULTURBEDINGUNGEN	21
3.2.1	Pflanzenanzucht	21
3.2.2	Sterilkulturen	21
3.2.3	Hydrokultursystem	21
3.3	GASWECHSELMESSUNGEN	23
3.4	SACCHAROSE-EXPORT AUS SOURCE-BLÄTTERN	24
3.5	GEWEBEANALYTIK	25
3.5.1	Vorbereitungen der Gewebeproben	25

3.5.2	Kohlenhydrate	25
3.5.2.1	Extraktion der löslichen Zucker und der Stärke	25
3.5.2.2	Kohlenhydratanalysen mit UV-Testkombinationen	26
3.5.2.3	Bestimmung von Saccharose, Glukose und Fruktose	27
3.5.2.4	Stärkebestimmung	28
3.5.2.5	Analyse der löslichen Zucker mit einem Chromatographiesystem (HPAE-PAD)	28
3.5.3	Bestimmung von Mineralstoffen (Kationen)	29
3.5.4	Bestimmung des osmotischen Potenzials von Blattpress-Säften	29
3.5.5	Bestimmung von Aminosäuren	30
3.6	PROTEINANALYTIK	30
3.6.1	Proteinextraktion	30
3.6.2	Protein-Bestimmung nach Bradford	30
3.6.3	Gelelektrophorese	31
3.6.4	Western Blotting	32
3.6.5	Immunodetektion	32
3.7	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	33
3.7.1	Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie	33
3.8	MAZARATION DES XYLEMS	34
3.9	PLASMODESMENFREQUENZ IN DEN DERIVATEN DES CAMBIUMS IN DER SPROSSACHSE	34
3.10	MIKROINJEKTIONEN	35
3.10.1	Vorbereitung der Pflanzen	35
3.10.2	Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	35
3.10.3	Mikroinjektionen	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	PHÄNOTYPISCHE MERKMALE DER MP17N-EXPRIMIERENDEN TOMENSA-PFLANZEN	36
4.2	EINFLUSS DES MP17N AUF WACHSTUM UND KOHLENHYDRATMETABOLISMUS	38
4.2.1	Ansatz 1 (Frühling): Pflanzen direkt aus der Sterilkultur, Ernte vor Knollenbildung (30 Tage)	38
4.2.1.1	Vorbemerkung	38
4.2.1.2	Wachstumsanalyse der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen	38
4.2.1.3	Einfluss des MP17N auf Photosynthese und Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern	40

4.2.1.4	Auswirkungen des MP17N auf den Kohlenhydratgehalt in Petiolen von Source-Blättern, in der Sprossachse und in Sink-Blättern	43
4.2.2	Ansatz 2 (Herbst): Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Ernte nach Knollenbildung (46 Tage)	49
4.2.2.1	Vorbemerkungen	49
4.2.2.2	Biomasseproduktion und Kohlenhydratverteilung in MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen	50
4.2.2.3	Einfluss des MP17N auf Photosynthese, Transpiration und Kohlenhydratmetabolismus in Source-Blättern	50
4.2.3	Ansatz 3 (Herbst): Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Ernte vor Knollenbildung (17 Tage)	55
4.2.3.1	Vorbemerkungen	55
4.2.3.2	Wachstumsanalyse der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen	56
4.2.4	Ansatz 4 (Frühling): Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Ernte vor Knollenbildung (17 Tage)	58
4.2.4.1	Vorbemerkung	58
4.2.4.2	Wachstumsanalyse der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen	58
4.2.5	Ansatz 5 (Klimakammer): Einfluss der Lichtintensität auf den Kohlenhydratmetabolismus	60
4.2.5.1	Vorbemerkung	60
4.2.5.2	Einfluss der unterschiedlichen Lichtintensitäten auf Wachstum und Kohlenhydratgehalt	60
4.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Ansätzen 1 bis 5	62
4.3	AUSWIRKUNGEN DER EXPRESSION DES MP17N AUF DIE ULTRASTRUKTUR DER ZELLEN	64
4.4	AUSWIRKUNGEN DER EXPRESSION DES MP17N AUF DIE DIFFERENZIERUNG DES XYLEMS	66
4.5	EINFLUSS DES MP17N AUF DIE PLASMODESMENFREQUENZ IM CAMBIUM DER SPROSSACHSE	71
4.6	MIKROINJEKTIONSEXPERIMENTE	73
4.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR SALZTOLERANZ	76
4.7.1	Auswahl der Pflanzen	76
4.7.2	Vorversuch mit MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen der Sorte Linda	76
4.7.2.1	Phänotypische Merkmale der MP17N-exprimierenden Linda-Pflanzen unter Standardbedingungen	76
4.7.2.2	Auswirkungen von 100 mM NaCl auf MP17N-transgene Linda-Pflanzen	77
4.7.3	Untersuchungen zur Salztoleranz an Tomensa-Pflanzen (Ansatz 1 und Ansatz 2)	80
4.7.3.1	Auswirkungen von 100 mM NaCl auf den Phänotyp der Pflanzen	80
4.7.3.2	Auswirkungen von 100 mM NaCl auf die Ultrastruktur der Zellen	82
4.7.3.3	Biomasseproduktion der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen unter 100 mM NaCl	84
4.7.3.4	Photosynthese und Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen	85
4.7.3.5	Auswirkungen des MP17N auf die Aminosäurezusammensetzung	91

4.7.3.6	Auswirkungen des MP17N auf den Kationengehalt in Source-Blättern	93
4.7.3.7	Osmotisches Potenzial des Zellsaftes	95
4.7.4	Zusammenfassung der Salzstress-Experimente	96
5	DISKUSSION	98
5.1	ÜBERSICHT	98
5.2	VORBEMERKUNG ZU DEN VERSUCHSANSÄTZEN	99
5.3	EINFLUSS DES MP17N AUF DEN KOHLENHYDRATMETABOLISMUS	100
5.3.1	Kohlenhydratakkumulation als Folge einer Exporthemmung von Photoassimilaten?	100
5.3.2	Wird der symplasmatische Transport von Photoassimilaten blockiert?	102
5.3.3	Wirkt sich das MP17N auf die Phloembeladung aus?	103
5.3.4	Struktur von Plasmodesmen und Phloembeladung	104
5.3.5	Einfluss des MP17N auf die Signalübermittlung?	104
5.4	GIBT ES EINEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN EXPORTHEMMUNG UND WACHSTUMSREDUKTION?	105
5.5	EINFLUSS DES MP17N AUF DAS WACHSTUM	106
5.5.1	Reduktion des Wachstums	106
5.5.2	Reduktion der Photosyntheseleistung	107
5.5.3	Direkter Einfluss des MP17N auf das Wachstum?	107
5.5.4	Einfluss auf meristematische Entwicklung?	108
5.5.5	Verringerte Photosyntheseleistung und Kohlenhydratakkumulation als Folge reduzierten Wachstums?	110
5.6	ABHÄNGIGKEIT DER MP17N-BEDINGTEN EFFEKTE VOM ENTWICKLUNGSZUSTAND	110
5.7	ERKLÄRUNGSMODELLE	112
5.8	FAZIT	116
5.9	UNTERSUCHUNGEN ZUR SALZTOLERANZ	119
5.9.1	Vorversuch mit MP17N-transgenen Linda-Pflanzen	119
5.9.2	Salzstress-Experimente an MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen	119
5.9.3	Fazit	121
5.10	AUSBLICK	122

6	LITERATUR	125
7	ANHANG	135
7.1	CHEMIKALIEN	135
7.2	ZUSAMMENSETZUNGEN DER LÖSUNGEN	136
7.2.1	Kohlenhydratanalysen	136
7.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	136
7.2.3	Gelelektrophorese	137
7.2.4	Western-Blot und Immunodetektion	138
7.2.5	Filmentwicklung und Fixierung	138
7.2.6	Elektronenmikroskopie	138
7.2.7	Mikroinjektionsexperimente	139
7.3	EICKURVEN	140
7.3.1	Kohlenhydratanalyse	140
7.3.2	Kationenanalyse	141
7.4	STATISTIK UND FEHLERRECHNUNG	141

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufklärung der Funktion viraler Gene in transgenen Pflanzen hat gezeigt, dass Pflanzenviren über spezielle Proteine verfügen, die deren Zell-zu-Zell-Transport ermöglichen. Diese Transportproteine (MPs, *movement proteins*) nutzen dabei einen pflanzeneigenen Mechanismus für den Transport von Makromolekülen durch Plasmodesmen (Kragler *et al.* 2000, Itaya *et al.* 2002). Werden MPs in transgenen Pflanzen exprimiert, führt das zu Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus, in der Verteilung der Biomasse zwischen Wurzel und Spross und im Wachstum der Pflanzen. Als Ursache für diese physiologischen Veränderungen werden hauptsächlich zwei Hypothesen diskutiert. Nach der ersten verursacht die Produktion von MPs eine Hemmung des Exports von Photoassimilaten aus den Photosynthese betreibenden Blättern, wodurch die beobachtete Kohlenhydratakkumulation, die Wachstumsreduktion und die Veränderung der Kohlenhydratpartitionierung verursacht wird. Eine zweite, umfassendere Hypothese geht davon aus, dass MPs wegen ihrer Fähigkeit makromolekularen Transport durch Plasmodesmen zu ermöglichen, mit einem pflanzeneigenen Signalmechanismus interferieren, der die Allokation der Photoassimilate zu den verschiedenen Organen reguliert. Danach hätte die Expression von MPs in transgenen Pflanzen eine Vielzahl von Konsequenzen. Die meisten Studien hierüber wurden mit dem MP des Tabakmosaikvirus (TMV, *tobacco mosaic virus*) sowohl in transgenen Tabak- als auch in transgenen Kartoffelpflanzen durchgeführt.

Auch das MP des phloem-limitierten Kartoffelblattrollvirus (PLRV, *potato leafroll virus*) wurde bereits in zwei Studien untersucht. Diese wurden allerdings an transgenen Tabakpflanzen und nicht am natürlichen Wirt, der Kartoffelpflanze, durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher geklärt werden, welche Konsequenzen die konstitutive Expression des PLRV-MPs (MP17N) in transgenen Kartoffelpflanzen hat.

Dabei zeigte sich, dass das MP17N auf vielen Ebenen in physiologische Prozesse eingreift, die zum Teil vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängen. So war das Wurzel/Spross-Verhältnis bei entwicklungsphysiologisch älteren transgenen Pflanzen zugunsten des Sprosses verschoben, während es bei den entwicklungsphysiologisch jungen Pflanzen unverändert blieb. Auch der Einfluss des MP17N auf den Kohlenhydratgehalt hing vom Entwicklungszustand der Pflanzen ab. Nur die entwicklungsphysiologisch jungen MP17N-transgenen Pflanzen akkumulierten im Vergleich zur Kontrollpflanze beträchtliche Mengen an Kohlenhydraten in ihren Source-Blättern, woraus sich schließen lässt, dass die Kohlenhydratakkumulation nicht mit der auch in anderen Studien beobachteten Verschiebung des Wurzel/Spross-Verhältnisses in Verbindung steht.

Diese Ergebnisse können auf unterschiedliche Weise interpretiert werden. Zum einen deuten einige Befunde dieser Arbeit tatsächlich auf eine Hemmung des Exports von Photoassimilaten hin. Die Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern bei den entwicklungsphysiologisch jungen transgenen Pflanzen könnte beispielsweise so erklärt werden. Die Abhängigkeit dieser Veränderung im Kohlenhydrathaushalt vom Entwicklungszustand der Pflanze spricht dagegen eher für einen Einfluss des MP17N auf die pflanzeigene Signalübermittlung, die die Verteilung der Biomasse reguliert. Es lassen sich also Belege für beide oben genannten Hypothesen finden.

Die Tatsache, dass in allen Experimenten sowohl die Biomasse der transgenen Pflanzen als auch deren Photosyntheserate reduziert waren, deutet jedoch auf ein weiteres Erklärungsmodell hin. Dieses geht davon aus, dass das Wachstum der transgenen Pflanzen durch den Einfluss des MP17N generell beeinträchtigt wird und dass dies nicht notwendigerweise die Folge von Veränderungen im Kohlenhydrathaushalt sein muss. Die beobachtete Verdopplung der Gefäßelemente im sekundären Xylem der Sprossachse und die veränderte Plasmodesmenfrequenz im Sprosscambium wären nach dieser Vorstellung direkte Auswirkungen des MP17N auf die Differenzierung des Cambiums.

Die in der Literatur beschriebene Akkumulation von löslichen Zuckern in Blättern MP-transgener Pflanzen führte zu der Annahme, dass solche Pflanzen aufgrund des dadurch erhöhten osmotischen Potenzials resistent gegen Salzstress sein könnten. Deshalb wurden parallel zu den Untersuchungen zum Kohlenhydratmetabolismus Salzstressexperimente (100 mM NaCl) durchgeführt. Die in einer Voruntersuchung verwendeten MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen der Sorte Linda und eine der drei eingehender untersuchten transgenen Tomensa-Pflanzen hielten dem Salzstress tatsächlich einige Tage länger stand, was sich darin zeigte, dass die unteren Blätter deutlich später mit der Ausbildung der für Salzstress typischen Symptome begannen. Bei zwei weiteren Tomensa-Pflanzen war nur eine sehr leichte Verbesserung gegenüber der Kontrollpflanze zu erkennen. Es zeigte sich, dass die verbesserte NaCl-Toleranz nicht mit einer höheren Konzentration löslicher Zucker erklärt werden kann. Vielmehr scheint hierfür die MP17N-induzierte Wachstumsreduktion verantwortlich zu sein, die bereits bei der Kultivierung unter Standardbedingungen ohne Zugabe von NaCl auftritt und eine typische Reaktion von Pflanzen auf Salzstress ist. Zudem wirkt sich wahrscheinlich die in fast allen Experimenten beobachtete MP17N-bedingte Verschiebung des Wurzel/Spross-Verhältnisses zugunsten des Sprosses vorteilhaft für die transgenen Pflanzen aus, weil dadurch die relative Wurzeloberfläche für die NaCl-Aufnahme verringert wird.

Die hier vorgestellten Ergebnisse illustrieren, auf welcher vielfältigen Weise sich die Integration eines einzigen Gens (MP17N) in das Genom einer Kartoffelpflanze auswirkt. Der Grund für diese Komplexität liegt vermutlich in der speziellen Eigenschaft des MP17N, mit einem endogenen Zell-zu-Zell-Transportsystem zu interagieren, das bei Differenzierungsprozessen und bei der Signalübermittlung eine wichtige Rolle spielt.

2 EINFÜHRUNG

2.1 Überblick

Die systemische Infektion einer Wirtspflanze durch ein Pflanzenvirus ist ein komplexer Vorgang, der die Replikation in den verschiedenen Geweben und den Transport viraler Nucleinsäure umfasst (Cheng *et al.* 2000). Da alle Pflanzenzellen von einer Zellwand umgeben sind, die für die meisten viralen Partikel eine unüberwindbare Barriere darstellt, müssen Pflanzenviren so genannte Plasmodesmen (PDs) passieren, um von Zelle zu Zelle wandern zu können (Oparka *et al.* 1999). Plasmodesmen sind cytoplasmatische Kanäle (2-5 nm im funktionellen Durchmesser, Ding *et al.* 1992a), die benachbarte Zellen verbinden (Ehlers & Kollmann 2001). Dieser Zell-zu-Zell-Transport erfordert einen speziellen Mechanismus, da der funktionelle Durchmesser der Plasmodesmen mit 2-5 nm für den Durchtritt viraler Partikel oder viraler Nucleinsäure zu klein ist. Die meisten Pflanzenviren verfügen über ein spezielles Protein, das MP, das den Transport viraler RNA (vRNA) oder DNA (vDNA) durch die Plasmodesmen ermöglicht. Um diese Transportvorgänge zu untersuchen, wurden transgene Pflanzen erzeugt, die das MP-Gen des TMV exprimieren (Deom *et al.* 1987, Wolf *et al.* 1989, Deom *et al.* 1990, Atkins *et al.* 1991, Ding *et al.* 1992b; Citovsky *et al.* 1993). Es hat sich gezeigt, dass das TMV-MP vielfältige Veränderungen im Stoffwechsel der Pflanzen hervorruft, die nicht im direkten Zusammenhang mit dem Virustransport stehen (Lucas *et al.* 1993a, Balachandran *et al.* 1995, Olesinski *et al.* 1995, Olesinski *et al.* 1996, Almon *et al.* 1997). Wahrscheinlich beeinflussen MPs in den transgenen Pflanzen die Signalübermittlung, die für die Verteilung der Photoassimilate verantwortlich ist, was vielfältige Konsequenzen für den Stoffwechsel und die Entwicklung der Pflanze bzw. derer Gewebe zur Folge haben kann. Es ist ebenfalls denkbar, dass das MP direkt in physiologische Prozesse eingreift, wie etwa die Beladung des Phloems mit Photoassimilaten oder die meristematische Differenzierung von Pflanzenorganen.

Am Beispiel transgener Kartoffelpflanzen, die ein verändertes MP (MP17N) des Kartoffelblattrollvirus (PLRV) exprimieren, soll in dieser Arbeit gezeigt werden, wie sich die Integration eines MP-Gens in das pflanzliche Genom auf den Kohlenhydratstoffwechsel, die Verteilung der Photoassimilate und auf die Differenzierung auswirkt. Zudem soll untersucht werden, ob die Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel zur Resistenz gegen Salzstress beitragen können.

2.2 Pflanzenviren

2.2.1 Infektion einer Pflanze und die Folgen für den Kohlenhydratmetabolismus

Wird eine Pflanze von einem Virus befallen, führt das zu drastischen Veränderungen im Wirtsmetabolismus. Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass virale Infektionen neben ihrem direkten Einfluss auf den Elektronentransport des Photosystems II (Reinero & Beachy 1989, Balachandran *et al.* 1997a) auch den Kohlenhydratmetabolismus bzw. die Kohlenhydratpartitionierung zwischen den verschiedenen Pflanzenorganen beeinträchtigen. Ein Beispiel hierfür sind Erbsen-Pflanzen (*Pisum sativum*), die mit dem *Red clover mottle virus* (RCMV) infiziert sind und als Folge davon eine lethale Nekrose im Sprossapex entwickeln. Die autotrophen Source-Blätter (netto Photoassimilate exportierende Blätter) zwischen dem infizierten Blatt und der Sprossspitze akkumulieren Stärke, obwohl diese selbst virusfrei sind (Técsi *et al.* 1992). In diesem Fall ist die Stärkeakkumulation eine indirekte Folge der Virusinfektion, weil mit dem Sprossapex das Sink-Gewebe (netto Photoassimilate importierendes Gewebe) abstirbt. Den gleichen Effekt erzielten Técsi *et al.* nämlich bei nicht-infizierten Pflanzen durch Abschneiden der Sprossspitze. Bei Tabakpflanzen, die mit dem TMV-Stamm TMV-PV-230 infiziert sind, reduziert sich das Wurzel/Spross-Verhältnis (zusammengefasst von Balachandran *et al.* 1997a).

In einigen Fällen wird die Veränderung im Kohlenhydratmetabolismus infizierter Pflanzen phänotypisch sichtbar. Werden Hafer-Pflanzen (cv. Coast Black) mit *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) infiziert, färben sich die Blätter zum Beispiel rot, was durch die vermehrte Bildung von Anthocyanen als Folge einer Kohlenhydratakkumulation erklärt wird (Livingston *et al.* 1998, Jeannette *et al.* 2000). In diesem Fall geht man davon aus, dass durch die virusbedingte Zerstörung des Phloems der Export der Photoassimilate aus den Blättern blockiert wird (Esau 1957, Jensen 1968). In einer anderen Studie wurde das gegenteilige Phänomen festgestellt. Die Infektion von Melonenpflanzen (*Cucumis melo*) mit *Cucumber mosaic virus* (CMV) führte zu einem drastischen Anstieg von Saccharose im Phloemsaft, was mit einem erhöhten Export aus den Blättern erklärt wurde (Shalitin & Wolf 2000a).

2.2.2 Das Kartoffelblattrollvirus

Das Kartoffelblattrollvirus (PLRV) gehört zu den Luteoviridae (lat. *luteus* „goldgelb“). In dieser Gruppe werden Pflanzenviren zusammengefasst, die bei infizierten Pflanzen das

nach oben gerichtete Einrollen der Blätter und deren Vergilbung verursachen. Die Blattrollkrankheit zählt zu den am weitesten verbreiteten Kartoffelvirosen (Schick & Klinkowski 1962). Luteoviren sind die kleinsten bekannten Pflanzenviren; ihre isodiametrischen Partikel haben einen Durchmesser von nur 24 bis 27 nm (Takanami *et al.* 1979). Das Genom des Kartoffelblattrollvirus besteht aus RNA und ist etwa 6 kb groß (Mayo *et al.* 1989).

Charakteristisch für alle Luteoviren ist die Besonderheit, dass sie anders als viele andere Viren ausschließlich auf das Phloem beschränkt sind (Mayo & Ziegler-Graff 1996). PLRV-Partikel wurden in Geleitzellen, in Siebelementen und, seltener, in Vakuolen von Phloemparenchymzellen gefunden, nicht aber außerhalb des Leitgewebes (Shepardson *et al.* 1980, Schmitz *et al.* 1997). Luteoviren können also weder die Grenze zwischen Phloem und Bündelscheide im Blatt passieren, noch können sie im sich entwickelnden Spross oder in der Wurzel das Procambium verlassen. Offensichtlich kann das PLRV ausschließlich durch die speziellen Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle, die PPU (*pore plasmodesma unit*) (van Bel & Kempers 1997) wandern. Trotzdem verfügt das PLRV über ein MP (MP17), das viele Homologien zu MPs von anderen Viren aufweist, die mit diesen Proteinen durch die Mesophyll-Plasmodesmen transportiert werden können (Tacke *et al.* 1991, Tacke *et al.* 1993). Für die Funktion des MP17 im Zusammenhang mit dem Zell-zu-Zell-Transport sprechen auch die Beobachtungen, dass dieses Protein mit Plasmodesmen assoziiert ist (Schmitz *et al.* 1997) und wie das TMV-MP (Citovsky *et al.* 1993, Waigmann *et al.* 2000) durch membrangebundene Protein-Kinasen phosphoryliert wird (Sokolova *et al.* 1997). Außerdem ist das MP17 wie MPs anderer Pflanzenviren in der Lage, den Durchmesser von Mesophyll-Plasmodesmen für den Zell-zu-Zell-Transport zu vergrößern, obwohl das PLRV normalerweise nicht im Mesophyll vorkommt (Hofius *et al.* 2001).

2.2.3 Zell-zu-Zell-Transport und Langstreckentransport von Pflanzenviren

Für die Strecke von der infizierten Stelle zum Phloem, und von dort wieder zu gesundem Gewebe müssen Viren durch Plasmodesmen von Zelle zu Zelle wandern (Lucas & Gilbertson 1994, Carrington *et al.* 1996). Davon zu unterscheiden ist der systemische Langstreckentransport über die Siebelemente des Phloems¹ (Séron & Haenni 1996, Nelson & van Bel 1998, Derrick & Nelson 1999, Oparka & Santa Cruz 2000). Da Viren theoretisch ausschließlich über den langsamen Zell-zu-Zell-Transport in entfernte Organe gelangen können, bevorzugen einige Autoren anstelle des Begriffs Langstrecken-

¹ In einigen Fällen werden Viren über das Xylem transportiert; das gilt vor allem für Viren, die von Käfern übertragen werden (Gergerich *et al.* 1988).

transport die Bezeichnung vaskulärer Transport, um deutlich zu machen, dass der Weg und der Mechanismus dieser Form des Transports in entfernte Pflanzenorgane sich deutlich vom Zell-zu-Zell-Transport unterscheiden (Séron & Haenni 1996).

Einige Viren wandern durch Plasmodesmen, indem sie die Struktur dieser Kanäle permanent modifizieren. Sie bilden tubuläre Proteinstrukturen, die längs durch die Plasmodesmen verlaufen. Viren aus der Comoviren-Gruppe, wie *Cowpea mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) oder *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) wandern als ganze Virionen durch diese Tubuli (Storms *et al.* 1995, Kasteel *et al.* 1996, Ward *et al.* 1997, Zheng *et al.* 1997). Auch *Potato virus X* (PVX) oder *Tobacco etch virus* (TEV) wandern als ganze Virionen durch strukturell veränderte Plasmodesmen, sie produzieren jedoch keine Tubuli (Santa Cruz *et al.* 1998).

Die meisten Pflanzenviren, wie zum Beispiel die Tobamoviren, wandern jedoch in Form eines linearen Ribonucleoprotein-Komplexes durch Plasmodesmen. Die Erforschung dieses Zell-zu-Zell-Transportes hat das Wissen über die Funktionsweise von Plasmodesmen erheblich voran gebracht (Creager *et al.* 1999, Lazarowitz 1999). Denn diese Viren haben sich im Laufe ihrer Coevolution mit Pflanzen einen Transportmechanismus zu Eigen gemacht, den Pflanzen für ihren eigenen Transport von Makromolekülen durch Plasmodesmen entwickelt haben (Lucas & Gilbertson 1994, Carrington *et al.* 1996, Jackson 2000, Roberts & Oparka 2003). Diese Viren, zu denen das TMV gehört, verfügen über spezielle Proteine, die MPs, die diesen Zell-zu-Zell-Transport durch Plasmodesmen ermöglichen (Kragler *et al.* 1998a; Peremyslov *et al.* 1999, Soellick *et al.* 2000, vgl. Kapitel 2.3). Manche Viren wie zum Beispiel CMV benötigen zusätzlich zum MP auch ihr Hüllprotein (*coat protein*, CP) für den Zell-zu-Zell-Transport (Canto *et al.* 1997, Blackman *et al.* 1998, Nagano *et al.* 2001).

2.3 Zell-zu-Zell-Transport von Makromolekülen durch Plasmodesmen

Bei dieser Form des Transports, der Ähnlichkeiten mit dem makromolekularen Transport durch den Kernporenkomplex aufweist (Lee *et al.* 2000), wird der Durchmesser der Plasmodesmen (SEL, *size exclusion limit*) für den Transit von Makromolekülen vorübergehend vergrößert (Wolf *et al.* 1989, Deom *et al.* 1992, Ding *et al.* 1992b, Citovsky *et al.* 1993, Fujiwara *et al.* 1993, Noueir *et al.* 1994, Lucas & Gilbertson 1994, Waigmann *et al.* 1994, Lucas 1995, Carrington *et al.* 1996, Oparka *et al.* 1997, Lazarowitz & Beachy 1999, Boyko *et al.* 2000, Chen *et al.* 2000, Roberts & Oparka 2003). Hierbei werden zwei

Transport-Formen unterschieden: Proteintransport und Ribonucleoproteintransport (Ghoshroy *et al.* 1997, Lucas *et al.* 2001).

Nach einem Modell von Lucas *et al.* (2001) binden Chaperone an das zu transportierende Protein (ABBILDUNG 2-1 A). Dieser Protein/Chaperon-Komplex wird dann mithilfe eines PD-Dockingproteins zu einem PD-Rezeptor geführt. Dabei sind möglicherweise das Cytoskelett und/oder das endoplasmatische Reticulum (ER) beteiligt (Heinlein *et al.* 1995, McLean *et al.* 1995, Reichel *et al.* 1999, Mas & Beachy 2000, Boyko *et al.* 2000, Ploubidou & Way 2001, vgl. aber Gillespie *et al.* 2002). Das PD-Dockingprotein interagiert mit einem SEL-Erkennungsprotein, worauf der Durchmesser der Plasmodesmen für den Durchtritt des Protein/Chaperon-Komplexes vergrößert wird.

Der Ribonucleoproteintransport verläuft ähnlich, hier binden zunächst Proteine an die zu transportierende RNA. ABBILDUNG 2-1 (B) illustriert dies am Beispiel des Transports von vRNA mithilfe von MPs. Letztere binden vRNA (Citovsky *et al.* 1990, Tacke *et al.* 1991) und bilden einen so genannten Ribonucleoprotein-Komplex (vRNA/MP-Komplex), an den ein pflanzeigenes Chaperon bindet. Dieser vRNA/MP/Chaperon-Komplex wird von einem PD-Dockingprotein zu den Plasmodesmen geführt. Wie beim Proteintransport interagiert der Komplex am Eingang des PDs mit einem SEL-Erkennungsprotein, wodurch der Durchmesser des Mikrokanals für den Transport vergrößert wird (Kragler *et al.* 1998a, Jackson 2000, Lucas *et al.* 2001, Haywood *et al.* 2002).

Dabei handelt es sich offensichtlich um einen gerichteten Transport (Crawford & Zambryski 2000, Zambryski & Crawford 2000) zu ganz bestimmten Plasmodesmen, denn das TMV-MP, das PLRV-MP und das CMV-MP akkumulieren ausschließlich in verzweigten Plasmodesmen (Ding *et al.* 1992b, Itaya *et al.* 1998, Hofius *et al.* 2001).

In den vergangenen Jahren wurden einige Beispiele für den Proteintransport durch Plasmodesmen beschrieben. So wandert etwa ein Protein namens RPP13-1, ein Thio-redoxin h, das im Phloemsaft von Reis vorkommt, durch Mesophyll-Plasmodesmen von Tabakpflanzen (Ishiwatari *et al.* 1998). Auch das im Phloemsaft von *Cucurbita maxima* vorkommende Hitzeschockprotein Hsc70, ein Chaperon, gelangte in benachbarte Zellen, nachdem es in eine Mesophyllzelle von Kürbispflanzen injiziert wurde (Aoki *et al.* 2002).

Die im Modell von Lucas *et al.* (2001) erwähnten PD-Docking-, PD-Rezeptor- und SEL-Erkennungsproteine wurden zwar noch nicht identifiziert. Dass es sich beim makromolekularen Transport durch Plasmodesmen aber tatsächlich um einen komplexen Vorgang handelt, an dem mehrere Proteine beteiligt sind, illustrierten Escobar *et al.* (2003), die mithilfe eines neu entwickelten Screening-Verfahrens zwölf Proteine in *Nicotiana benthamiana* identifizierten, die mit Plasmodesmen interagieren.

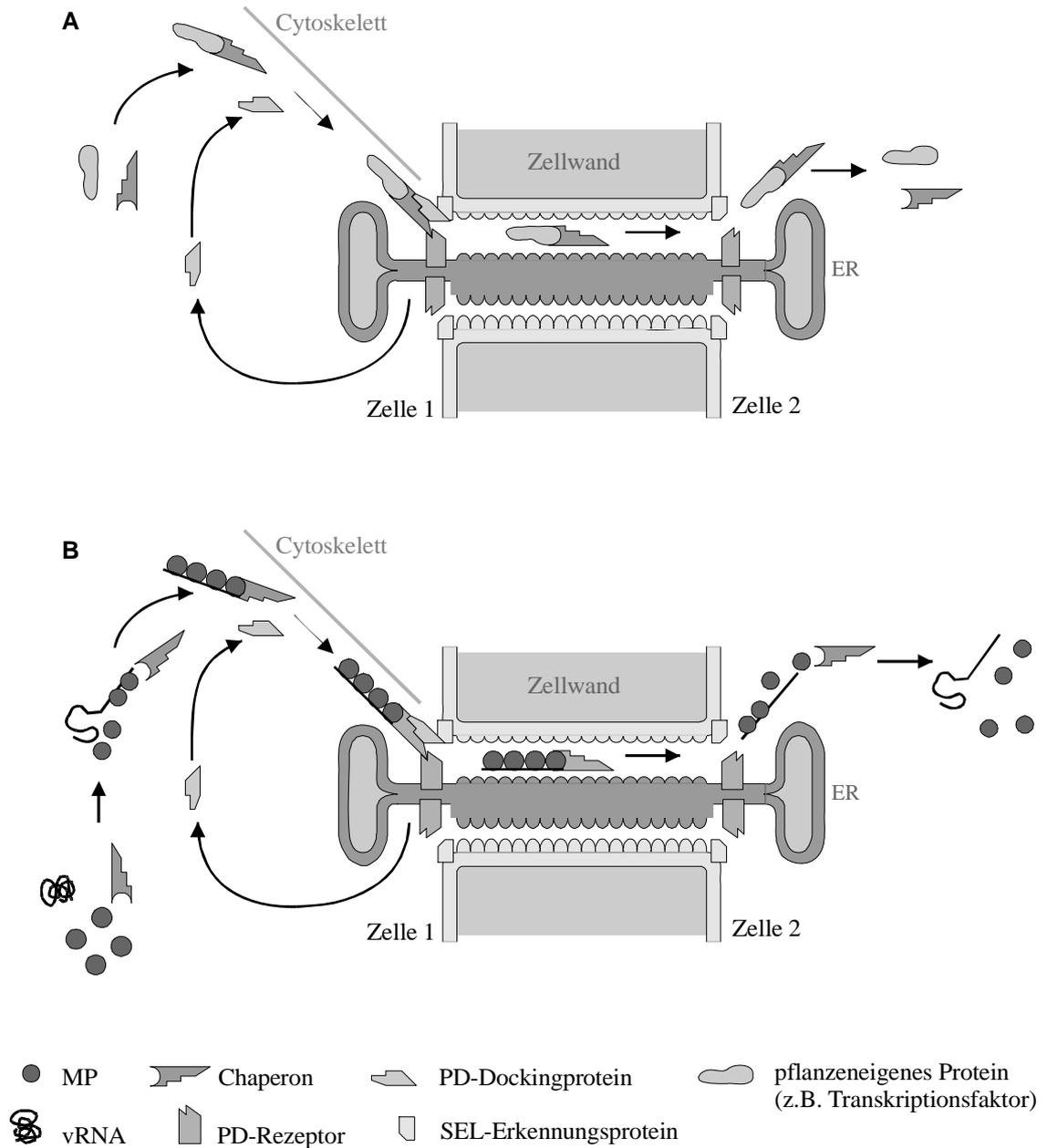


ABBILDUNG 2-1. Modell für den Transport von Makromolekülen durch Plasmodesmen (nach Lucas *et al.* 2001, verändert). **A** Proteintransport: Das für den Transport bestimmte Protein bindet an ein Chaperon im Cytoplasma von Zelle 1. Ein PD-Dockingprotein vermittelt den Transport des Protein/Chaperon-Komplexes zum PD-Rezeptor. Dabei ist möglicherweise das Cytoskelett beteiligt. Die Interaktion des PD-Dockingproteins mit einem SEL-Erkennungsprotein führt zur Dilatation des Mikrokanals und ermöglicht die Translokation des Protein/Chaperon-Komplexes durch den PD in Zelle 2. **B** Ribonucleoproteintransport: MPs binden vRNA und bilden einen Ribonucleoprotein-Komplex, an den ein pflanzeneigenes Chaperon bindet. Die anschließenden Schritte laufen wie beim Proteintransport ab. Zu beachten ist hierbei, dass dies ein Modell für den Transport durch Mesophyll-Plasmodesmen ist. Die speziellen Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle, die PPU, unterscheiden sich strukturell und möglicherweise auch funktionell von diesen Plasmodesmen. ER, Endoplasmatisches Retikulum; PD, Plasmodesmos; SEL, Ausschlussdurchmesser (*size exclusion limit*).

2.4 Plasmodemesmen und Zelldifferenzierung

Plasmodemesmen spielen bei der Differenzierung von Geweben eine wichtige Rolle (Jackson & Hake 1997, Ding 1998, Kragler *et al.* 1998b, Lucas 1999, Heinlein 2002). Sie ermöglichen den Transport von Informationsmolekülen und schaffen so beispielsweise die Voraussetzungen für eine koordinierte Genexpression innerhalb einer symplasmatischen Domäne (Lucas *et al.* 1993b, Ehlers & van Bel 1999, Ehlers & Kollmann 2001). Solche Domänen bilden eine funktionelle Einheit, an deren Grenze entweder keine Plasmodemesmen vorkommen oder die vorhandenen Plasmodemesmen verschlossen sind (Oparka & Roberts 2001). Ein Beispiel hierfür ist die Desynchronisation der Mitose in Gewebekulturzellen von *Solanum nigrum* L., die durch symplasmatische Isolierung der entsprechenden Zellen erreicht wird (Ehlers & Kollmann 2000). Auch bei der Elongation der Baumwollfasern, die bis zu 2 mm pro Tag wachsen können, werden die Plasmodemesmen vorübergehend geschlossen, wodurch das osmotische Potenzial der Faserzellen aufrecht erhalten wird (Pflugler & Zambryski 2001).

Plasmodemesmen sind auch bei der Koordinierung von Entwicklungsprozessen in Meristemen beteiligt. Zellteilungen führen zum Beispiel im Sprossapikalmeristem zur Entstehung verschiedener Zellschichten, aus denen im weiteren Verlauf der Entwicklung die unterschiedlichen Gewebe entstehen (van der Schoot & Rinne 1999a, 1999b). Dazu müssen sowohl Zellteilung als auch Zelldifferenzierung perfekt abgestimmt werden, was den Austausch von Signalmolekülen wie Phytohormonen und Transkriptionsfaktoren erfordert (Haywood *et al.* 2002).

Das Homöoboxprotein KN1 von *Zea mays* liefert hierfür ein Beispiel. Dieser im Sprossapikalmeristem vorkommende Transkriptionsfaktor (Jackson *et al.* 1994) wurde sowohl im Corpus als auch in den Zellschichten der Tunica detektiert. Die entsprechende *kn1*-mRNA war dagegen auf das Corpus beschränkt (Lucas *et al.* 1995, Jackson 2002). In Mikroinjektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass KN1 selbst den Transport von *kn1*-mRNA durch Plasmodemesmen zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen ermöglicht, also in Zellen, in denen es normalerweise nicht exprimiert wird (Lucas *et al.* 1995). KN1 hat demnach ähnliche Eigenschaften wie virale MPs. Auch der an der Blütenbildung in *Anthirrhinum majus* beteiligte Transkriptionsfaktor DEF wurde in Zellen nachgewiesen, in denen die entsprechende *def*-RNA abwesend war (Perbal *et al.* 1996). Gleiches gilt für den Transkriptionsfaktor LFY von *Arabidopsis thaliana*, der homöotische Gene in Blüten aktiviert (Sessions *et al.* 2000).

2.5 Beziehungen zwischen viralen Transportproteinen, Kohlenhydratmetabolismus und Signalübermittlung

2.5.1 Einfluss viraler Transportproteine auf den Kohlenhydratmetabolismus

Neben ihrer Fähigkeit mit Plasmodesmen zu interagieren, um den Transport von vRNA zu ermöglichen, greifen MPs auch in Mechanismen des pflanzlichen Stoffwechsels ein. Untersuchungen an transgenen Pflanzen, die das TMV-MP exprimieren, haben gezeigt, dass dieses Protein einen erheblichen Einfluss auf den Kohlenhydrathaushalt ausübt. Die Expression von TMV-MP führt zu einem Anstieg des Gehalts an löslichen Zuckern und Stärke in Blättern von transgenen Tabakpflanzen (Lucas *et al.* 1993a). Diese Veränderung im Kohlenhydratmetabolismus ist jedoch nur auf einige Source-Blätter beschränkt (Blätter Nr. 5 und 6, wobei das erste Blatt, dessen Spreite eine Länge von 5 cm besaß, als Nr. 1 definiert wurde); in jüngeren Blättern (Nr. 2 und 3) und alten Blättern (Nr. 7 und 8) gibt es keine Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und Kontrollpflanzen. Obwohl sich die Gesamtbioasse der TMV-MP-exprimierenden Tabakpflanzen nicht von der Kontrollpflanze unterscheidet, ist die Zuteilung der Photoassimilate zum unteren Sprossabschnitt und zur Wurzel reduziert, was zu einer Verringerung des Wurzel/Spross-Verhältnisses führt (je nach Alter der Pflanzen 35 oder 43%). Auch Blätter von Tabakpflanzen, die ein aminoterminal verlängertes Transportprotein des PLRV (MP17N) exprimieren, akkumulieren lösliche Zucker und Stärke in ihren Source-Blättern, während der Saccharosegehalt in den Mittelrippen sinkt (Herbers *et al.* 1997). Dies wurde mit einer MP17N-induzierten Hemmung des Exports von Photoassimilaten begründet. Als Folge des gehemmten Exports aus den Blättern sinkt die Photosyntheseaktivität und das Wachstum der transgenen Pflanzen verringert sich erheblich. In dieser Studie wurde nicht zwischen Blättern unterschiedlichen Alters unterschieden und das Wurzel/Spross-Verhältnis wurde nicht untersucht.

Weitere Studien zeigten, dass der Einfluss von MPs auf den Kohlenhydrathaushalt nicht im direkten Zusammenhang mit dem Erweitern des Durchmessers von Plasmodesmen steht. Bei transgenen Tabakpflanzen, die ein TMV-MP exprimieren, dessen SEL-Domäne deletiert wurde, ist das Wurzel/Spross-Verhältnis reduziert, obwohl das MP durch die genetische Veränderung nicht mehr in der Lage ist mit Plasmodesmen zu interagieren (Balachandran *et al.* 1995). Das Wurzel/Spross-Verhältnis verringert sich auch bei gepfropften Pflanzen, die aus einer genetisch unveränderten Unterlage und dem Pfropfreis einer TMV-MP-transgenen Pflanze bestehen (Balachandran *et al.* 1995). Bei einer umgekehrten Pfropfung ist das Verhältnis von Wurzelmasse zu Sprossmasse nicht ver-

ändert und entspricht einer Pfropfung zweier Kontrollpflanzen. Das bedeutet, dass das Signal für die Veränderung der Kohlenhydratpartitionierung vom Spross ausgeht.

Ein ähnliches Ergebnis erzielten Olesinski *et al.* (1995) mit einem anderen Versuchsansatz. Transgene Tabakpflanzen, die eine temperatursensitive Deletionsmutante des TMV-MP exprimieren, akkumulieren unter nicht-permissiven Bedingungen (32-34 °C) sowohl Stärke als auch lösliche Zucker in den Source-Blättern, obwohl sich das SEL der Mesophyll-Plasmodesmen bei diesen Temperaturen nicht verändert.

Aus diesen Ergebnissen wurde ein Modell entwickelt, nach dem das TMV-MP mit Elementen eines suprazellulären Kommunikationssystems interferiert, das Signalmoleküle zwischen den verschiedenen Pflanzenorganen transportiert (Lucas *et al.* 1996, Jorgensen *et al.* 1998, Lucas & Wolf 1999, Lucas *et al.* 2001). Im Phloemsaft von *Cucurbita pepo* und *Cucumis melo* wurden kürzlich Proteine entdeckt, die sowohl mit dem TMV-MP als auch mit dem CMV-MP interagieren (Shalitin & Wolf 2000b). Weil diese Proteine im Phloemsaft gefunden wurden, vermuten die Autoren, dass es sich hierbei um Elemente eines endogenen „Langstrecken-Signalnetzwerkes“ handelt. Die Verschiebung des Wurzel/Spross-Verhältnisses bei transgenen Pflanzen (z. B. Lucas *et al.* 1993a, Shalitin *et al.* 2002) soll eine Konsequenz dieser gestörten Signalübermittlung sein (Lucas & Wolf 1999).

Dass das Vorhandensein eines viralen Transportproteins alleine noch nicht unbedingt zur Akkumulation von Kohlenhydraten in Source-Blättern führen muss, haben Hofius *et al.* (2001) in einer Studie an mehreren unabhängigen Linien PLRV-MP17-transgener Tabakpflanzen demonstriert.¹ Der Hexosengehalt in den Blättern korrelierte mit dem Expressionsniveau des MP17. Mit zunehmender Menge an MP17 stieg auch der Gehalt an Hexosen in den Blättern. War das Expressionsniveau niedriger, blieb die Zuckermenge im Vergleich zur Kontrollpflanze unverändert und bei Pflanzen, die noch geringere Mengen an MP17 produzierten, sank der Hexosengehalt sogar unter den der Kontrollpflanze.

Fasst man alle Untersuchungen über die Auswirkungen viraler Transportproteine auf das Wachstum und den Kohlenhydrathaushalt transgener Pflanzen zusammen, stellt man fest, dass die Ergebnisse nicht immer konsistent sind (TABELLE 2-1). Während das TMV-MP zum Beispiel in transgenen Tabakpflanzen zu keiner Verringerung der Gesamtbio-masse führt (Lucas *et al.* 1993a), ist diese bei TMV-MP-transgenen Kartoffelpflanzen (Almon *et al.* 1997) und bei PLRV-MP17N-transgenen Tabakpflanzen (Herbers *et al.* 1997) stark reduziert. In transgenen Tabakpflanzen führt das TMV-MP zu einer Erhöhung

¹ Im Gegensatz zum MP17N, das in der Studie von Herbers *et al.* (1997) untersucht wurde und Gegenstand dieser Arbeit ist, besaß das von Hofius *et al.* (2001) verwendete MP17 keine aminoterminaler Verlängerung.

des Stärkegehalts (Lucas *et al.* 1993a, Olesinski *et al.* 1995), während das CMV-MP in transgenen Tabakpflanzen zu einer verminderten Stärkebildung in den Blättern führt (Shalitin *et al.* 2002). Trotz dieses prinzipiellen Unterschieds ist in beiden Fällen wie auch in den anderen untersuchten Systemen das Wurzel/Spross-Verhältniss zugunsten des Sprosses verschoben (TABELLE 2-1).

TABELLE 2-1. Zusammenfassung einiger Ergebnisse aus Studien über die Auswirkungen viraler Transportproteine auf Biomasse, Kohlenhydratverteilung und Gehalt an löslichen Zuckern und Stärke. BM, Biomasse der Pflanze; Exp, Export aus Blättern (Exsudate oder radioaktive Markierung von CO₂); KH, Kohlenhydrat; LZ, Lösliche Zucker; MP, Movement Protein; PD, Plasmodesmen; PS, Photosynthese; R, Referenz; St, Stärke; W/S, Wurzel/Spross-Verhältnis. ↑ = deutlicher Anstieg, ↗ = leichter Anstieg, → = unverändert, ↘ = leichter Rückgang ↓ = deutlicher Rückgang.

MP	Pflanze	BM	St	LZ	PS	Exp	W/S	Bemerkungen	R
TMV-MP	<i>Nicotiana tabacum</i>	→	↑	↑	↘		↓	Nur in ausdiff. Source-Blättern.	1
TMV-MP (Deletionsmutante)	<i>Nicotiana tabacum</i>						↓ ^a	Einfluss auf W/S ist <i>unabhängig</i> von MP-PD-Interaktion.	2
TMV-MP (temperatursensitive Mutante)	<i>Nicotiana tabacum</i>		↑	↑		↓ ^b		Einfluss auf KH-Akkumulation ist <i>unabhängig</i> von MP-PD-Interaktion.	3
TMV-MP	<i>Nicotiana tabacum</i>								4
	Standardbed.:	↓				→	↓		
	Wasserstress:	↓				→	→		
TMV-MP	<i>N. tabacum</i>					↓		Kein Einfluss auf photochemische Komponenten	5
TMV-MP	<i>Solanum tuberosum</i>							Kein Einfluss des MP auf Entw.: Trotz signifikanter Unterschiede in der BM gleiche Anzahl von Blättern.	6
	Expression in Blättern: ^e	↓	↓ ^c → ^d	↓ ^c → ^d	↓	↑			
	in Knollen:	→	→	→					
TMV-MP	<i>Solanum tuberosum</i>	↑	↑	↑	→	↓	↓	Phloemspezifische Expression!	7
PLRV-MP17N	<i>Nicotiana tabacum</i>	↓	↑	↑	↓				8
PLRV-MP17	<i>Nicotiana tabacum</i>								9
	viel MP17:	↓	↑	↑					
	wenig MP17:	→	↓	↓					
CMV-MP	<i>Nicotiana tabacum</i>	↓	↓	↓			↓		10
CMV-MP-GFP	<i>Nicotiana tabacum</i>	↓	↓	↓			↓		
CMV-MP oder TMV-MP	<i>Cucumis melo</i> ^f					↑		Expression mittels eines Virus-Vektor-Systems (ZYMV)	

^a Vorhandensein des TMV-MP lediglich im Mesophyll ist ausreichend für die Veränderung des W/S-Verhältnisses; Expression ausschl. im Phloem hat keine Konsequenzen. ^b Aus voll ausdifferenzierten Source-Blättern und jungen, expandierenden Source-Blättern. ^c Nach 52 Tagen: bei Saccharose deutliche, bei Glukose nur sehr geringe, bei Fruktose keine Reduktion. ^d Nach 38 Tagen. ^e Vorhandensein des MP im Spross reicht aus für die Wirkung auf Kohlenstoffmetabolismus bzw. -partitionierung. ^f Diese Pflanze gehört zu den symplasmatischen Phloembeladern (Tabak- und Kartoffelpflanze gehören zu den apoplasmatischen Phloembeladern, van Bel & Gamalei 1992).
1: Lucas *et al.* 1993a, 2: Balachandran *et al.* 1995, 3: Olesinski *et al.* 1995, 4: Balachandran *et al.* 1997b, 5: Wolf & Millantiner 2000, 6: Olesinski *et al.* 1996, 7: Almon *et al.* 1997, 8: Herbers *et al.* 1997, 9: Hofius *et al.* 2001, 10: Shalitin *et al.* 2002

2.5.2 Regulation der Assimilatverteilung

Photoassimilate werden in den meisten Pflanzen in Form von Saccharose aus den Source-Blättern über das Phloem zu den heterotrophen Teilen einer Pflanze transportiert, also zu Sinks wie zum Beispiel Sprossmeristeme, sich entwickelnde Blätter, Wurzeln, Speichergewebe (Sjolund 1997, Lalonde *et al.* 2003, van Bel 2003). Die Koordination dieser Assimilatpartitionierung ist entscheidend für Wachstum und Produktivität einer Pflanze (Frommer & Sonnewald 1995). Dabei spielen Zuckertransporter eine wichtige Rolle (Kühn *et al.* 1996, Bush 1999, Williams *et al.* 2000).

Inzwischen sind eine Reihe von Saccharose- und Hexose-Transportern genauer charakterisiert worden (Aoki *et al.* 2003, Kühn 2003). In der Reispflanze (*Oryza sativa*) gibt es beispielsweise fünf Saccharose-Transporter, die zu einer Gen-Familie gehören, die wiederum Homologien zu Gen-Familien anderer Arten aufweist (Kühn *et al.* 1999, Williams *et al.* 2000, Aoki *et al.* 2003). In Siebelementen von Source-Blättern, Petiolen, der Sprossachse und in der Wurzel der drei Solanaceae *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Lycopersicon esculentum* wurden H⁺/Saccharose-Cotransporter (StSUT1, NtSUT1 und LeSUT1) gefunden, deren Gene in den benachbarten Geleitzellen exprimiert werden (Kühn *et al.* 1997). NtSUT1 ist essentiell für den Zuckerexport aus Source-Blättern von Tabakpflanzen (Bürkle *et al.* 1998). Für eine neue Familie von Saccharose-Transportern, SUT4, wurde gezeigt, dass sie ausschließlich in Siebelementen von Source-Blättern von *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* und *Nicotiana tabacum* vorkommen (Weise *et al.* 2000). Zur Versorgung der Pollen von Tabakpflanzen wird der pollen-spezifische Saccharose-Transporter NtSUT3 aktiviert (Lemoine *et al.* 1999). Wie wichtig solche Transporter für die Partitionierung der Assimilate sind, illustriert eine Untersuchung von Riesmeier *et al.* (1994) an transgenen Kartoffelpflanzen, die das Antisense-Konstrukt des für die Phloembeladung erforderlichen Saccharose-Transporters StSUT1 exprimieren. In solchen Pflanzen wird die Expression des Transporters inhibiert, was zu einer deutlich verringerten Phloembeladung und folglich zu einer Akkumulation von Kohlenhydraten in den entsprechenden Source-Blättern führt.

Anders als Saccharose-Transporter kommen Hexose-Transporter hauptsächlich in Sink-Geweben vor (Sauer & Stadler 1993). Sie sorgen dafür, dass die aus der Saccharose-Spaltung durch apoplastische Invertasen entstehenden Glukose- und Fruktosemoleküle in die Zellen aufgenommen werden. Auch diese Transporter spielen bei der Partitionierung von Photoassimilaten eine wichtige Rolle. Die Inaktivierung eines Hexosetransporters führte in Tabakpflanzen zu einer drastischen Wachstumsreduktion (Leterrier *et al.* 2003).

Pflanzen sind in der Lage, die Assimilatpartitionierung abhängig vom Entwicklungszustand oder aufgrund von äußeren Einflüssen neu einzustellen. So wird zum Beispiel durch Nährstoff- und Wassermangel ein größerer Anteil von Photoassimilaten zur Wurzel umgeleitet, um durch verstärktes Wurzelwachstum die Kapazität für die Nährstoff- und Wasseraufnahme zu erhöhen (Wardlaw 1990). Bei der Aktivierung der Saccharose-Transporter spielt Phosphorylierung wahrscheinlich eine Rolle (Roblin *et al.* 1998). Proteinkinasen, die für die Phosphorylierung in Siebelementen verantwortlich sein könnten, wurden im Phloemsaft von Reispflanzen gefunden (Nakamura *et al.* 1995).

Es wurde vermutet, dass die „Sink-Stärke“, d.h. die Kapazität des Gewebes fixierten Kohlenstoff zu verarbeiten, die Verteilung der Photoassimilate bestimmt (für eine Diskussion siehe Minchin & Thorpe 1996, Henton *et al.* 2002, Minchin *et al.* 2002). Viel wahrscheinlicher ist es allerdings, dass Wachstum und Entwicklung dieser Gewebe wenigstens teilweise von Prozessen außerhalb der Sinks kontrolliert werden, wobei der Langstreckentransport von Signalmolekülen über das Phloem eine bedeutende Rolle spielt (Lucas & Wolf 1999, Oparka & Turgeon 1999, Thompson & Schulz 1999, Ruiz-Medrano *et al.* 2001).

2.5.3 Die Rolle von Zuckern als Signalmoleküle

Saccharose ist in höheren Pflanzen nicht nur der wichtigste Transportzucker für Photosynthetisch assimilierten Kohlenstoff (Kühn *et al.* 1999). Dieser Zucker dient zusätzlich auch als Signalmolekül, das die Expression von Genen sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene zu regulieren scheint (Thomas & Rodriguez 1994, Koch 1996, Jang & Sheen 1997, Smeekens & Rook 1997, Farrar *et al.* 2000, Williams *et al.* 2000, Smeekens 2000, Rolland *et al.* 2002, van Bel *et al.* 2004). Darunter befinden sich auch Gene von Saccharose-Transportern, die je nach Bedarf im Sink- oder im Source-Gewebe exprimiert werden (Lalonde *et al.* 1999) oder Gene von sink-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Rook *et al.* 1998).

Die Aktivität des H⁺/Saccharose-Transporters von *Beta vulgaris* (BvSUT1) wird zum Beispiel durch Saccharose reguliert (Chiou & Bush 1998). In abgeschnittenen Source-Blättern, die 24 h in Saccharose-Lösung (100 mM oder 250 mM) gehalten werden, wird die Expression des H⁺/Saccharose-Cotransporters reprimiert. Nach dem Transfer der Blätter in ein Saccharose-freies Kontrollmedium erhöht sich die Menge der entsprechenden mRNA und die Aktivität des Transporters steigt wieder, d.h. die Genexpression wird durch Saccharose auf Transkriptionsebene reguliert (Vaughn *et al.* 2002).

Es wird vermutet, dass Saccharose-Transporter selbst an der Signaltransduktion beteiligt sind (Lalonde *et al.* 1999). Kürzlich wurde ein durch Saccharose induzierbares Saccharose-Transporter-ähnliches Protein beschrieben, SUT2, das die Aktivität von SUT1 und SUT4 reguliert (Barker *et al.* 2000). Dabei handelt es sich um ein Protein, das in Sink-Geweben und in der Sprossachse viel stärker exprimiert wird als in Source-Blättern. Wie die anderen Saccharose-Transporter (SUT1, SUT3 und SUT4) enthält es 12 Transmembran-Domänen. Es besitzt aber zusätzlich cytoplasmatische Domänen, die mit C-terminalen Verlängerungen der Hefe-Glukosesensoren SNF3 und RGT2 verwandt sind. Letztere sind für die Signalübermittlung zuständig (Özcan *et al.* 1998, Vagnoli *et al.* 1998).

Ein Beispiel für eine Saccharose-spezifische Regulation auf Translationsebene liefert der *Arabidopsis thaliana*-Transkriptionsfaktor ATB2 (Rook *et al.* 1998). Er wird in verschiedenen Sink-Geweben (Leitbündelbereich der Kotyledonen, Leitbündelbereich der ersten Blätter 6 Tage alter Keimlinge, Wurzelspitze) exprimiert und wird durch extrazelluläre Saccharose im physiologischen Bereich (über 25 mM Saccharose) konzentrationsabhängig reprimiert. Saccharose-Konzentrationen von 0 bis 25 mM führen dagegen zu einer Stimulation der Translation. Interessanterweise ist bei 25 mM Saccharose das Wachstum des Keimlings maximal.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass Saccharose als Signalmolekül bei der Regulation der Kohlenhydratpartitionierung zwischen Source und Sink eine Rolle spielt (Hellmann *et al.* 2000).

2.6 Potenzielle Toleranz MP17N-transgener Pflanzen gegen Salzstress

Wie oben beschrieben, führt die Expression des TMV-MP zur Akkumulation von Stärke und von osmotisch wirksamen löslichen Zuckern in den Blättern von Tabakpflanzen (Lucas *et al.* 1993a, Olesinski *et al.* 1995, Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001) und Kartoffelpflanzen (Almon *et al.* 1997). Bei transgenen Tabakpflanzen, die eine apoplastische Hefe-Invertase exprimierten, stiegen unter Salzstress (300 mM NaCl) die Konzentrationen von Saccharose, Glukose und Fruktose in den Blättern gegenüber der Kontrollpflanze um 75% an, was zu einer verbesserten Salztoleranz führte (Fukushima *et al.* 2001).

Es ist also denkbar, dass eine MP-bedingte höhere Konzentration löslicher Zucker und ein damit verbundener Anstieg des osmotischen Potentials die Wasserverfügbarkeit in Blättern MP-transgener Pflanzen, die unter salinen Bedingungen wachsen, verbessert. Das wäre aus landwirtschaftlicher Sicht im Fall der MP17N-exprimierenden Kartoffelpflan-

zen besonders interessant, weil diese durch die genetische Veränderung bereits gegen Viren wie PVX oder PLRV resistent sind (Herbers *et al.* 1997, Tacke *et al.* 1996).

Bodenversalzung ist einer der wichtigsten Faktoren, die die landwirtschaftliche Produktivität weltweit limitieren (Neumann 1997, Holmberg & Bülow 1998, Hasegawa *et al.* 2000). Hohe Salzkonzentrationen im Boden führen zur Dehydrierung von Zellen. Auf diesen Wasserstress reagieren viele Pflanzen mit der Akkumulation von organischen Osmolyten. Dazu gehören Verbindungen mit geringer Molekülmasse wie zum Beispiel lösliche Zucker und Aminosäuren wie Prolin (Bohnert *et al.* 1995, Ingram & Bartels 1996, Yokoi *et al.* 2002). Hierbei handelt es sich um so genannte kompatible Substanzen oder *osmoprotectants*. Sie sind wasserlöslich und interferieren nicht mit dem Zellmetabolismus. Oft bewirken sie eine osmotische Anpassung der Zellen an das durch den Wasserstress erniedrigte Wasserpotenzial des Außenmediums (Ingram & Bartels 1996, Bohnert & Jensen 1996, Hare *et al.* 1998, Shen *et al.* 1999). Daneben stabilisieren sie die hydratisierten Proteinstrukturen, wodurch die Aktivität von Enzymen auch unter salinen Bedingungen gewährleistet bleibt (Papageorgiou *et al.* 1991). Außerdem wird die Integrität von Thylakoid- und Plasmamembranen aufrecht erhalten, wie es zum Beispiel für Glycinbetain gezeigt wurde (Rhodes & Hanson, 1993). Eine weitere Funktion der *osmoprotectants* ist die Beseitigung freier Sauerstoffradikale (Zhu 2001).

In den vergangenen Jahren wurden durch gentechnische Verfahren transgene Pflanzen erzeugt, deren Toleranz gegen Salzstress und andere abiotische Faktoren wie Trockenheit und Temperaturextreme durch diese genetischen Veränderungen erhöht wurde (Tarczyński *et al.* 1993, Bohnert *et al.* 1995, Bray 1997, Sheveleva *et al.* 1998, Holmberg & Bülow 1998, Cushman & Bohnert 2000, Apse & Blumwald 2002, Abebe *et al.* 2003). Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit einem Gen für eine Cholin-Oxidase führte zum Beispiel zur Toleranz gegen Salz- und Kältestress durch die Akkumulation von Glycinbetain (Hayashi *et al.* 1997).

2.7 Ziele dieser Arbeit

Die Expression von MPs in transgenen Pflanzen führt zu Veränderungen im Wachstum, im Kohlenhydratmetabolismus und in der Verteilung der Photoassimilate zwischen den verschiedenen Pflanzenorganen (vgl. TABELLE 2-1, S. 13). In welche Mechanismen diese Proteine eingreifen, ist nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass sie aufgrund ihrer Funktion als Transportprotein die makromolekulare Signalübermittlung durch Plasmodesmen beeinträchtigen und so die Kontrolle entwicklungsbiologischer und physiologischer Prozesse wie die Assimilatverteilung stören (Lucas & Wolf 1999). Weil in vielen Fällen Kohlenhydrate in den Source-Blättern akkumulieren, besteht außerdem die Möglichkeit, dass der Transport von Photoassimilaten vom Mesophyll zum Phloem behindert wird (Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001). Die Interpretation der Ergebnisse aus den verschiedenen Studien über MPs wird dadurch erschwert, dass sie nicht konsistent sind; dies gilt vor allem für die Frage, ob die Reduktion des Wachstums durch eine Hemmung des Exports von Photoassimilaten verursacht wird (vgl. TABELLE 2-1, S. 13). Mögliche Ursachen hierfür liegen zum einen in der Auswahl unterschiedlicher Pflanzen zur Untersuchung eines bestimmten MPs, zum anderen in unterschiedlichen Expressionsniveaus der MPs (Hofius *et al.* 2001). Die beiden Studien über den Einfluss des PLRV-MP (MP17) wurden beispielsweise an transgenen Tabakpflanzen durchgeführt (Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001); der natürliche Wirt des PLRV ist jedoch die Kartoffelpflanze. Beim PLRV muss außerdem berücksichtigt werden, dass dieses Pflanzenvirus im Gegensatz zum TMV ausschließlich im Phloem vorkommt.

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass virale MPs einschließlich des MP17 das SEL von Mesophyll-Plasmodesmen erweitern (vgl. Kapitel 2.3, S. 7). Da das PLRV jedoch ausschließlich im Phloem vorkommt, stellt sich die Frage, ob das MP17N auch das SEL von PPU's vergrößern kann.

Nach einer Hypothese von Lucas & Wolf (1999) konkurrieren MPs mit pflanzeigenen Makromolekülen (Proteine und RNA), die durch Plasmodesmen transportiert werden. Darunter befinden sich auch Transkriptionsfaktoren (z. B. KN1), die bei der Differenzierung des Sprossapex eine Rolle spielen (Lucas *et al.* 1995). Es könnte also sein, dass das MP17N die Entwicklung der Gewebe direkt beeinflusst, indem es mit der Signalübermittlung in Meristemen interferiert.

Transgene Pflanzen, die aufgrund ihrer genetischen Veränderung lösliche Zucker in ihren Blättern akkumulieren, sind zudem aus landwirtschaftlicher Sicht interessant, denn

die Akkumulation der Zucker kann zur osmotischen Anpassung der Pflanzen beitragen (Fukushima *et al.* 2001). Da die Expression von MPs in transgenen Pflanzen zur Akkumulation von Kohlenhydraten führte, wurde vermutet, dass diese Pflanzen besser auf salinen Böden gedeihen könnten.

Mithilfe transgener Kartoffelpflanzen, die das MP17N exprimieren, sollen in dieser Arbeit deshalb folgende Fragen beantwortet werden: (1) Führt das MP17N in allen Entwicklungsstadien einer Pflanze zur Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern? (2) Ist ausschließlich limitierter Export von Photoassimilaten die Ursache hierfür? (3) Wird auch der Kohlenhydratgehalt der Sprossachse und der Sink-Blätter beeinflusst? (4) Beeinflusst das MP17N die Verteilung der Biomasse zwischen Spross und Wurzel? (5) Wirkt sich die Expression des MP17N auch direkt auf das Wachstum der transgenen Pflanzen aus? (6) Lässt sich eine Beeinträchtigung der Meristementwicklung feststellen? (7) Verändert das MP17N den Durchmesser der PPU, der speziellen Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle? (8) Bewirkt das MP17N eine Veränderung der Struktur von Plasmodesmen im Blatt? (9) Führt die Expression des MP17N in transgenen Kartoffelpflanzen zu einer verbesserten Salztoleranz? (10) Ist eine erhöhte Konzentration löslicher Zucker hierfür verantwortlich?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Pflanzen

Die für diese Arbeit verwendeten transgenen Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) wurden von der Fa. Bioplant GmbH, Ebstorf, bereitgestellt. Sie exprimieren ein modifiziertes Transportprotein (MP17N) des Kartoffelblattrollvirus (PLRV). Es enthält eine hydrophile N-terminale Verlängerung von 2 kDa (ABBILDUNG 3-1) (Tacke *et al.* 1996).

Für eine Voruntersuchung wurden transgene Pflanzen der Sorte Linda verwendet. Sie tragen die Bezeichnungen L-7 oder L-8; die Kontrollpflanze wird mit L-K bezeichnet. Alle weiteren Experimente wurden mit transgenen Pflanzen der Sorte Tomensa durchgeführt. Sie werden mit T-18, T-19, T-20 und T-K für die Kontrollpflanze bezeichnet.

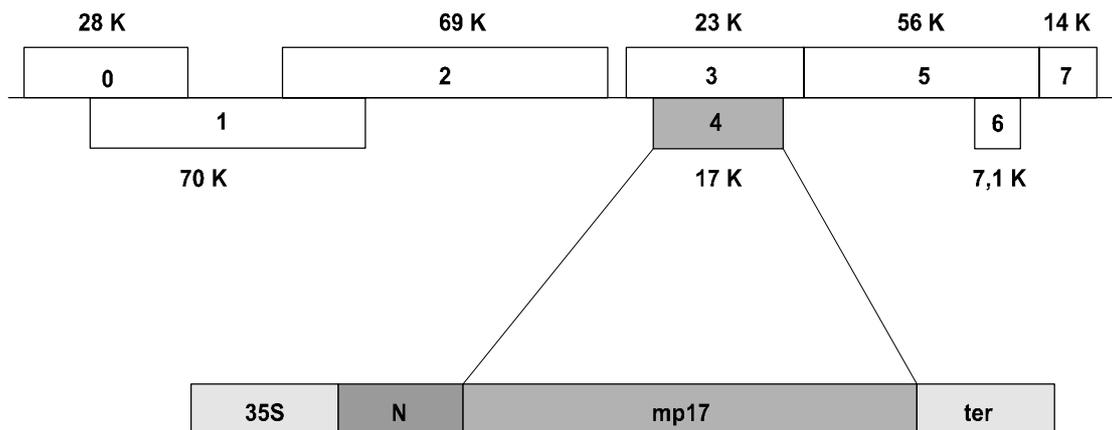


ABBILDUNG 3-1. Genomstruktur des PLRV (nach Jaag *et al.* 2003) und in das Genom der Kartoffelpflanzen integriertes Gen-Konstrukt (Tacke *et al.* 1996), bestehend aus dem CaMV 35S-Promotor, einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung, dem eigentlichen Gen des viralen Transportproteins mp17 und einer Terminationssequenz (ter). Das Genom besteht aus 8 offenen Leserastern (open reading frames, ORF 0 – ORF 7). ORF 4 kodiert für das 17 kDa MP (MP17).

3.2 Kulturbedingungen

3.2.1 Pflanzenanzucht

Während der Dauer der Experimente wurden im Gewächshaus stets Pflanzen in Erde kultiviert, um frisches Pflanzenmaterial und Knollen vorrätig zu haben. Nach 2 bis 3 Monaten wurden diese Pflanzen mittels Stecklingen vermehrt. Die Pflanzen wurden zusätzlich zum Tageslicht mit Pflanzenlampen (Philips SON-T Agro, 400 W) bestrahlt (ca. $150 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 14 h Tag/10 h Nacht).

3.2.2 Sterilkulturen

Die sterilen Tomensa-Pflanzen wurden zu je 10 bis 20 Stück in einem Agar-Medium (TABELLE 3-1) in der Klimakammer kultiviert (bei ca. $300 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 14 h Tag/10 h Nacht, $20^\circ/15^\circ\text{C}$). Als Lichtquelle dienten Pflanzenlampen (Philips SON-T Agro, 400 W). Alle 2 bis 3 Wochen wurden Stecklinge von diesen Pflanzen in ein frisches Kulturmedium übertragen. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell eine ca. 2 cm lange Spross-Spitze der 5-7 cm großen Pflanzen abgeschnitten und mit einer Pinzette vorsichtig in das gelartige Medium gesteckt (TABELLE 3-1).

TABELLE 3-1. Nährmedium für Sterilkulturen (nach Murashige & Skoog 1962). Das Medium wurde gekocht und anschließend in Kulturgläser mit Glasdeckel gegossen. Diese wurden dann autoklaviert.

Menge	Substanz
20 g	Saccharose
4,3 g	M&S Fertigmedium
100 mg	Inositol
1 ml	Vitaminlösung
750 ml	H ₂ O, pH mit NaOH auf 5.8 eingestellt
7,5 g	Agar-Agar mit H ₂ O auf 1000 ml aufgefüllt

3.2.3 Hydrokultursystem

Die eigentlichen Experimente zum Einfluss des MP17N auf Wachstum, Kohlenhydratmetabolismus, Zelldifferenzierung und zur Untersuchung der Auswirkungen von Salzstress wurden an transgenen Pflanzen durchgeführt, die in einem Hydrokultursystem

mit automatischem Nährlösungsdurchfluss angezogen wurden (ABBILDUNG 3-2). Die Nährlösung (TABELLE 3-2) wurde mittels Zeitschaltuhr einmal pro Stunde fünfzehn Minuten lang aus einem 60 l-Vorratsbehälter in die Töpfe gepumpt, von wo sie durch Abflüsse wieder zurück in den Behälter floss. Da im Laufe der Kultur Wasser durch Evaporation und Transpiration verloren ging und sich der pH-Wert der Nährlösung änderte (ABBILDUNG 3-3), wurde die Nährlösung einmal pro Woche erneuert. Dadurch wurde außerdem gewährleistet, dass die Mineralstoffe stets in optimaler Konzentration zur Verfügung standen (ABBILDUNG 3-4). Zwei solcher Systeme mit jeweils 16 Töpfen wurden installiert. Im ersten wurden die Pflanzen entsprechend der Angaben in TABELLE 3-2 unter **Standardbedingungen** kultiviert; im zweiten System wurde zusätzlich zu den Mineralstoffen noch **100 mM NaCl** hinzugegeben. Mit der NaCl-Zufuhr wurde begonnen, nachdem die Pflanzen zwei Wochen alt waren und eine Höhe von etwa 15–25 cm erreicht hatten. 4 Liter Nährlösung wurden hierzu aus dem Behälter entnommen und 350,64 g NaCl darin gelöst. Diese Lösung wurde dann mit einer Pumpe innerhalb von 3 Tagen tropfenweise in den Behälter zurückgepumpt. Bei einem Nährlösungsvolumen von 60 l ergibt sich daraus eine NaCl-Endkonzentration von 100 mM.



ABBILDUNG 3-2. Hydrokultursystem. Die Nährlösung wurde in regelmäßigen Intervallen (15 min je Stunde) aus einem Nährlösungsbehälter in die Töpfe gepumpt, von wo sie über eine Abflussleitung wieder zurück in den Behälter floss (nach Koyro & Huchzermeyer 1999).

TABELLE 3-2. Zusammensetzung der Nährlösung für das Hydrokultursystem (nach Krauss *et al.* 1978).

Makroelemente	mM	Mikroelemente	μM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,25	FeNa-EDTA	17,90
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	0,25	MnSO_4	3,60
KNO_3	1,00	CuSO_4	1,60
MgSO_4	0,50	ZnSO_4	1,50
KH_2PO_4	1,00	H_3BO_3	55,50
		MoO_3	1,00

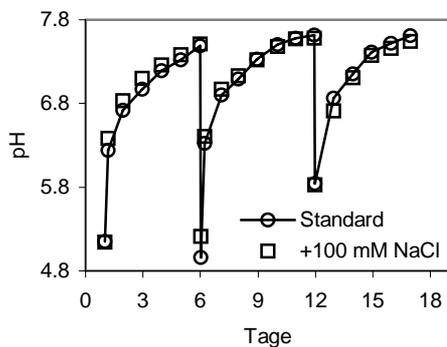


ABBILDUNG 3-3. Zeitliche Veränderung des pH-Wertes in der Hydrokultur, die wahrscheinlich auf Ionenaustauscher-Effekten des verwendeten Tongranulats beruht. Der Kurvenverlauf ist unabhängig davon, ob in dem Hydrokultursystem Pflanzen kultiviert werden oder nicht. Durch wöchentliche Erneuerung der Nährlösung wurde sichergestellt, dass der pH-Wert stets im physiologischen Bereich blieb.

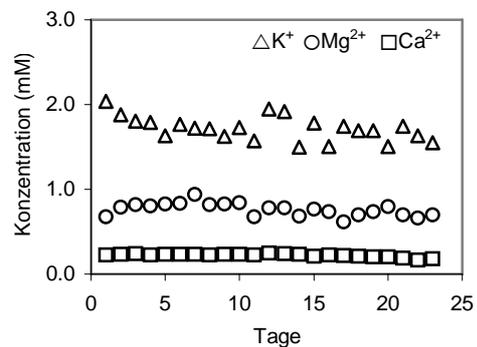


ABBILDUNG 3-4. Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} in der Nährlösung. In diesem Vorversuch wurde die Nährlösung nach 12 Tagen erneuert. Man erkennt, dass die K^+ -Konzentration in den ersten Tagen und nach der Erneuerung der Nährlösung leicht abnimmt. Die Schwankungen kommen durch Verdunstung und anschließendes Nachfüllen demineralisierten Wassers zustande.

3.3 Gaswechsellmessungen

Photosyntheseaktivität und Transpiration wurden mit dem Leaf Chamber Analyser, Type LCA-4 (ADC Analytical Development Company Ltd., Hoddesdon, UK) bestimmt. Das LCA-4 wird zusammen mit einer Blattkammer (portable leaf chamber, PLC) betrieben, in welche das Blatt einer Pflanze so eingespannt wird, dass der Gaswechsel auf einer Fläche von $6,25 \text{ cm}^2$ gemessen werden kann. Luft aus der Umgebung wird angesaugt und in das Gerät geleitet, wo sowohl die Kohlendioxidkonzentration als auch der Wassergehalt der Luft infrarotspektrometrisch gemessen werden. Die Luft strömt dann weiter zur

Blattkammer. Dort wird durch die im Blatt ablaufende Photosynthese CO_2 verbraucht und durch Transpiration H_2O in die Blattkammer abgegeben. Nachdem die Luft die Blattkammer passiert hat, strömt sie wieder zurück in das Analysegerät, wo die Konzentrationen von CO_2 und H_2O erneut gemessen werden, bevor die Luft in die Umgebung abgegeben wird („offenes System“). Aus den Differenzen Δc (CO_2) und Δe (H_2O) werden dann die Photosyntheseaktivität ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und die Transpirationsrate ($\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) berechnet. Alle Gaswechselfmessungen wurden im Lichtsättigungsbereich durchgeführt ($1400 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Das LCA-4 verfügt über einen Datenspeicher, der es ermöglicht, die Messungen in einem bestimmten Zeitintervall automatisch abzuspeichern. Diese Daten wurden dann auf einen PC übertragen und ausgewertet.

3.4 Saccharose-Export aus Source-Blättern

Um den Saccharose-Export aus den Source-Blättern zu bestimmen, wurde das Phloem-Exsudat aus Petiolen von abgeschnittenen Blättern gesammelt. Ein Blatt wurde dazu mit einer Rasierklinge abgeschnitten und die Petiole sofort in eine Petrischale mit 10 mM EDTA (pH 7) eingetaucht, das das Verschließen der Siebporen in den Siebelementen verhindert. Von dem in dieser Lösung eingetauchten Ende der Petiole wurde ein etwa 3–4 mm langes Stück abgeschnitten. So wurde gewährleistet, dass keine Verschlussreaktionen in den Siebelementen an der Schnittfläche der Petiole auftraten. Bei dieser Methode können jedoch auch die löslichen Zucker aus den verletzten Parenchymzellen an der Schnittfläche in die Exsudationslösung gelangen und das Ergebnis verfälschen. Deshalb wurde das Blatt zunächst eine halbe Stunde lang in ein Gefäß mit 10 mM EDTA gestellt, um diese Zucker zu entfernen.

Erst danach begann die eigentliche Probennahme der Exsudate. Dazu wurden 2 ml-Eppendorf-Gefäße mit 1,5 ml 10 mM EDTA (pH 7) gefüllt und mit Parafilm verschlossen. Mit einer Nadel wurde eine kleine Öffnung in diese Abdeckung gestochen. Dann wurden die Petiolen der Blätter zügig in diese Gefäße gesteckt. Um die Transpiration zu verhindern wurde das Experiment im Schüttel-Wasserbad durchgeführt, das mit einer Glasplatte abgedeckt wurde. Die Blätter wurden mit einer Pflanzenlampe (Philips SON-T, 400 W) bestrahlt. Nach vier Stunden wurde die Exsudation gestoppt und die Flächen der Blätter bestimmt. Dazu wurden die Umrisse der Blätter auf einem Karton nachgezeichnet und ausgeschnitten. Dieser Kartonausschnitt wurde gewogen. Außerdem wurde eine definierte Fläche aus dem Karton ausgeschnitten und gewogen. Daraus wurde dann mittels

Dreisatz die Fläche der Blätter berechnet. Die Saccharosekonzentration in der Exsudationslösung wurde mit einem Chromatographiesystem ermittelt (vgl. Kapitel 3.5.2.5).

3.5 Gewebeanalytik

3.5.1 Vorbereitungen der Gewebeproben

Das Pflanzenmaterial (Blätter, Petiolen oder Internodien) wurde sofort nach dem Entfernen von der Pflanze in Kunststofftüten gepackt und für den Transport in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben. Die spätere Aufbewahrung der Proben erfolgte in der Gefriertruhe bei -20 °C . Zur Homogenisierung wurden die Gewebeproben unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Je nach Verwendungszweck wurden unterschiedliche Mengen eingewogen (TABELLE 3-3). Das restliche Probenmaterial wurde als Reserve in 2 ml-Eppendorfgefäßen aufbewahrt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

TABELLE 3-3. Einwaagen der unter flüssigem Stickstoff homogenisierten Proben für die Gewebeanalytik (Lagerung bei -20 °C).

Verwendungszweck	Einwaage (mg)	Gefäß
Kohlenhydratanalyse	80-120	2 ml-Eppendorfgefäß
Mineralstoffanalyse (Kationen)	~100	5 ml-Kryoröhrchen mit Schraubverschluss
Aminosäuren	200-400	10 ml-Röhrchen mit Schraubverschluss
Proteine (Western-Blot, Kapitel 3.6)	~300	2 ml-Eppendorfgefäß

3.5.2 Kohlenhydrate

3.5.2.1 Extraktion der löslichen Zucker und der Stärke

Die tiefgefrorenen homogenisierten Proben (TABELLE 3-3) wurden auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurde eine Spatelspitze (ca. 30 mg) Polyklar AT gegeben. Diese Substanz bindet phenolische Verbindungen, die sich nachteilig auf die enzymatischen Reaktionen bei der Kohlenhydratbestimmung auswirken könnten. Außerdem wird nach dem späteren Zentrifugieren das Pellet durch die Zugabe von Polyklar AT fester, wodurch das Abpipettieren des Überstandes erleichtert wird. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes demin. Wasser zupipettiert, gevortext und die Proben 10 min lang bei mindestens 95 °C erhitzt, um Enzyme zu inaktivieren. Damit kein Wasserdampf entwich, wurde durch eine Halte-

vorrichtung sichergestellt, dass die Eppendorfggefäße fest verschlossen blieben. Die Proben wurden dann 1 h lang geschüttelt, bevor sie mit einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit (~6000 g) 10 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Eppendorfggefäß pipettiert und zu den Pellets wurden 0,75 ml demin. Wasser pipettiert. Anschließend wurde wieder gevortext, geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Die Extraktionslösung (1,75 ml) wurde entweder sofort analysiert oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die im Pellet befindliche Stärke wurde mit Amyloglucosidase verdaut (vgl. Anhang 7.2.1, S. 136). Um noch eventuell vorhandene lösliche Glukose vollständig zu entfernen, wurden die Pellets zunächst gewaschen. Dazu wurde zu jeder Probe 1 ml demin. Wasser pipettiert, gevortext, geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, nachdem durch einige Testmessungen bestätigt wurde, dass keine nennenswerten Glukosemengen mehr vorhanden waren. Zu jeder Probe wurden dann 0,75 ml Amyloglucosidase-Lösung (vgl. Anhang 7.2.1, S. 136) pipettiert und durch Vortexen das Pellet resuspendiert. Die Gefäße wurden mit Parafilm dicht verschlossen und über Nacht im Schüttelwasserbad bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße pipettiert. Um sämtliche Glukosemoleküle herauszulösen, wurde die Extraktion mit 0,75 ml demin. Wasser wiederholt und die beiden Überstände vereinigt. Die resultierende Extraktionslösung (1,5 ml) wurde sofort analysiert oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.5.2.2 Kohlenhydratanalysen mit UV-Testkombinationen

Sowohl der Gehalt von Saccharose, Glukose und Fruktose als auch die Stärkemenge wurden mit modifizierten UV-Testkombinationen (vgl. Anhang 7.1, S. 135) bestimmt. Das Verfahren beruht auf der Umsetzung von D-Glukose zu D-Glukose-6-phosphat und weiter zu D-Glukonat-6-phosphat, wobei NADP^+ zu $\text{NADPH}+\text{H}^+$ reduziert wird. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glukose-Menge äquivalent und wird aufgrund ihrer Absorption bei 340 nm bestimmt (Microplate Reader, Modell 680, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). D-Glukose wird direkt gemessen; Fruktose nach anschließender enzymatischer Umwandlung zu D-Glukose-6-phosphat und Saccharose nach enzymatischer Hydrolyse zu D-Glukose und D-Fruktose; die gebildete Menge Glukose entspricht der Saccharosemenge. Um eine größere Anzahl an Proben analysieren zu können, wurden die Lösungen zur enzymatischen Umsetzung von D-Glukose zu D-Glukonat-6-phosphat und von Fruktose zu D-Glukonat-6-phosphat abweichend von der Anleitung des Herstellers 1:10 in 0,1%iger BSA-Lösung verdünnt (vgl. *Lösung 3* und

Lösung 4 im Pipettierschema in TABELLE 3-4 und *Lösung 2* im Pipettierschema in TABELLE 3-5). Da zur Analyse abweichend von den Angaben des Herstellers anstelle von 1 ml-Küvetten Mikroplatten (96 Wells) mit einem Volumen von nur 300 µl je Well eingesetzt wurden, konnte so die Anzahl der zu messenden Proben von 20 auf 200 erhöht werden.

3.5.2.3 Bestimmung von Saccharose, Glukose und Fruktose

Für jeden Zucker wurde eine Eichkurve erstellt (vgl. Anhang, ABBILDUNG 7-1, S. 140). Mithilfe der Faktoren aus der Regressionsanalyse wurden dann die Zuckerkonzentrationen in der Extraktionslösung ermittelt und daraus die Zucker- bzw. die Stärkemengen pro Gramm Frischgewicht berechnet.

In manchen Proben waren die löslichen Zucker so gering konzentriert, dass das Probenvolumen von 40 auf 60 µl erhöht werden musste; das Volumen des Wassers wurde dann von 100 auf 50 µl reduziert (TABELLE 3-4). Wegen des daraus resultierenden abweichenden Gesamtvolumens wurden für diesen Fall separate Eichkurven erstellt (nicht gezeigt).

TABELLE 3-4. Pipettierschema für die Bestimmung von Saccharose, Glukose und Fruktose. Jede Probe wurde doppelt pipettiert und später der Mittelwert der Extinktionen berechnet. In manchen Fällen wurde das Probenvolumen auf 60 µl erhöht und das Wasservolumen auf 50 µl reduziert.

Substanz	Volumen (µl)	
	Saccharose	Glukose/Fruktose
Probe	40 (60)	40 (60)
Lösung 1	20	-
→ 2 s schütteln, 5 min warten		
Lösung 2	100	100
H ₂ O	100 (50)	100 (50)
→ 2 s schütteln, 5 min warten, E1 messen		
Lösung 3 (1:10 verdünnt in 0,1% BSA)	20	20
→ 2 s schütteln, 15 min warten, E2 messen		
Lösung 4 (1:10 verdünnt in 0,1% BSA)	-	20
→ 2 s schütteln, 15 min warten, E3 messen		

3.5.2.4 Stärkebestimmung

Nach dem β -Amyloglucosidase-Verdau (vgl. Kapitel 3.5.2.1, S. 25) liegt die Stärke in Form von Glukose-Molekülen vor. Diese wurden wie die löslichen Zucker mit der UV-Testkombination (vgl. Anhang 7.1, 135) gemessen (TABELLE 3-5). Mithilfe des Faktors aus der Regressionsanalyse (vgl. Anhang, ABBILDUNG 7-1, S. 140) wurde dann die Glukosemenge berechnet. Die Stärkemenge wird demnach in Form von Glukoseäquivalenten angegeben.

TABELLE 3-5. Pipettierschema für die Stärkebestimmung.

Substanz	Volumen (μ l)
Lösung 1	100
Probe	50
H ₂ O	100
→ 2 s schütteln, 3 min warten, E1 messen	
Lösung 2 (1:10 verdünnt in 0,1% BSA)	20
→ 2 s schütteln, 15 min warten, E2 messen	

3.5.2.5 Analyse der löslichen Zucker mit einem Chromatographiesystem (HPAE-PAD)

Die löslichen Zucker eines Teils der Proben wurden mit dem Chromatographie-System DX500 der Firma Dionex (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA) bestimmt (Hoffmann-Thoma *et al.* 2000). Die Trennung der Kohlenhydrate erfolgte mithilfe der Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (*high performance anion exchange columns and pulsed amperometric detection*, HPAE-PAD). Die Extraktionslösungen wurden dazu im Verhältnis 1:3 bis 1:5 in demin. Wasser verdünnt. Das System wurde mit Standardlösungen kalibriert, die zu Beginn des Analyselaufs und nach jeder zehnten Probe gemessen wurden. Bei der Analyse der Exsudationslösungen (vgl. Kapitel 3.4, S. 24) wurde nach jeder Probe eine Standardlösung gemessen. Dadurch konnte die Verkürzung der Retentionszeiten verhindert werden, die durch das EDTA in der Exsudationslösung hervorgerufen wird. In der TABELLE 3-6 sind die wichtigsten Komponenten des Chromatographie-Systems, sowie die Eluenten und deren Durchflussrate zusammengefasst.

TABELLE 3-6. Chromatographie-System Dionex DX500.

Gradientenpumpe	Typ GP40
elektrochemischer Detektor	ED40
Autosampler	AS40
Injektor	LC10
Vorsäule	CarboPac PA-10 Guard-Dolumn
Trennsäule	CarboPac PA-10
Steuerung des Systems/ Datenerfassung	Softwarepaket PeakNet 4.1 (Windows 3.11)
Eluenten	H ₂ O (demin. und entgast) und 200 mM NaOH (in demin. und entgastem H ₂ O)
Flussrate der Eluenten	0,8 ml/min

3.5.3 Bestimmung von Mineralstoffen (Kationen)

Die Kationen (K⁺, Na⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺) in den vorbereiteten Gewebeproben (TABELLE 3-3, S. 25) wurden über Nacht mit 4 ml 0,5 % HNO₃ bei 90 °C im Wasserbad extrahiert und nach Verdünnung (1:100 bzw. 1:10 für die Na⁺-Analyse bei Pflanzen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden) in demin. Wasser mit dem Flammen-Atomabsorptionsspektrometer (Modell 3300, PerkinElmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim) analysiert. Für jedes Kation wurde vorher eine Eichkurve erstellt und die Faktoren aus der Regressionsanalyse für die Berechnungen der Kationenkonzentrationen herangezogen (vgl. Anhang, ABBILDUNG 7-2, S. 141).

3.5.4 Bestimmung des osmotischen Potentials von Blattpress-Säften

Zur Abschätzung des osmotischen Potentials in den Mesophyllzellen wurden Blatt-Press-Säfte hergestellt. Ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß wurde mit frischem Blattmaterial gefüllt. Zur Inaktivierung von Enzymen wurde die Probe 10 min bei 90 °C erhitzt. Anschließend wurde das Blattmaterial mit einer Pinzette in ein folgendermaßen vorbereitetes Eppendorfgefäß gegeben: Mit einer dünnen Nadel wurde in den Boden eines 1,5-ml-Eppendorfgefäßes ein Loch gestochen. Anschließend wurde feines Papiertuch fest in das Gefäß gestopft, so dass es bis zu etwa einem Viertel damit gefüllt war. Das so vorbereitete und mit hitzebehandeltem Blattmaterial gefüllte Gefäß wurde auf ein zweites geöffnetes 1,5-ml-Eppendorfgefäß gesteckt und 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der so gewonnene Press-Saft wurde mit einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) analysiert.

3.5.5 Bestimmung von Aminosäuren

Die Bestimmung der Aminosäuren macht es erforderlich, die in den Gewebeproben vorhandenen Proteine zu entfernen. Dazu wurden die homogenisierten Proben (TABELLE 3-3) in 4 ml 4% Sulfosalicylsäure, die als internen Standard 28,4 μM β -Thienylalanin enthält, extrahiert. Zur Proteinfällung wurden die Proben ca. 1 h auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie mit 0,545 ml 2 N NaOH neutralisiert. Wenn für die Analyse nur kleine Mengen an Blattmaterial zur Verfügung standen, wurde in nur 2 ml Sulfosalicylsäure extrahiert; zur Neutralisierung wurde dann entsprechend weniger NaOH hinzugegeben. Danach wurden die Proben zentrifugiert (4 °C, 13000 g, 20 min.) und der Überstand durch einen 0,45 μm Cellulose-Acetat-Filter filtriert. Für die Analyse mit der HPLC (Reversed-Phase-Chromatographie) wurden die Proben 1:10 in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,4 - 8,5) verdünnt.

3.6 Proteinanalytik

3.6.1 Proteinextraktion

Zu den homogenisierten Proben (TABELLE 3-3) wurden 800 μl Laemmli-Puffer (vgl. Anhang 7.2.2, S. 136) gegeben. Danach wurden sie 10 min gekocht und 1 h geschüttelt (300 U/min). Anschließend wurde 3 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und 600 μl des Überstandes in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 1,2 ml Aceton (100%) wurden die Proben zur Fällung der Proteine über Nacht bei -20 °C aufbewahrt.

Die Proben wurden nur kurz zentrifugiert, damit das Pellet nicht zu fest wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Aceton (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde es in 100 μl 6M Urea (inkl. 5% Essigsäure) resuspendiert und die Proben 30 min auf den Schüttler gestellt. Diese Proben wurden ein weiteres Mal bei höchster Drehzahl zentrifugiert und der proteinhaltige klare Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert.

3.6.2 Protein-Bestimmung nach Bradford

Damit bei der Gelelektrophorese von allen Proben die gleiche Gesamtproteinmenge aufgetragen werden konnte, wurden zunächst die Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976) (vgl. Anhang 7.2.2, S. 136) photospektrometrisch bei 595 nm bestimmt (Microplate Reader, Modell 680, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) (TABELLE 3-7). Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe einer Eichkurve mit BSA (nicht gezeigt) ermittelt.

Die Proben wurden dann in 6M Urea (inkl. 5% Essigsäure) so verdünnt, dass in allen Proben die gleiche Proteinkonzentration vorlag.

TABELLE 3-7. Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976).

Substanz	Volumen (μ l)
Probe	10
Färbereagenz	200
→ 2 s schütteln, 5 min warten	
→ Messung bei 595 nm	

3.6.3 Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt (TABELLE 3-8 und TABELLE 3-9). Die Elektrophorese wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers des Gelelektrophorese-Systems (Mini-PROTEAN 3-System, BioRad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) durchgeführt (40 mA, max. 130 V). Als Größenmarker wurde ein vorgefärbter Proteinstandard von BioRad verwendet (Precision Plus Protein[®] Standards, All Blue, Nr. 161-0373). Die Zusammensetzungen der erforderlichen Lösungen sind im Anhang 7.2.2 (S. 136) aufgeführt.

TABELLE 3-8. Zusammensetzung eines 15%igen Trenngels. Ein Gelansatz ist ausreichend für die Herstellung von 2 Gelen (0,75 mm) des Mini-PROTEAN 3-Systems.

Komponente	Volumen (ml)
H ₂ O	1,740
30% (w/v) Acrylamidlösung	3,760
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,900
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	0,112
TEMED	0,005

TABELLE 3-9. Zusammensetzung des Sammelgels (5 % Acrylamid).

Komponente	Volumen (ml)
H ₂ O	2,000
Acrylamidlösung (30 %)	0,888
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,600
10 % Ammoniumpersulfat	0,056
TEMED	0,005

3.6.4 Western Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden mit dem Elektrophorese-System von BioRad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geblottet. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die erforderlichen Lösungen sind im Anhang 7.2.4 (S. 138) aufgeführt. Der erfolgreiche Blot wurde durch den vorgefärbten Proteinmarker angezeigt.

3.6.5 Immunodetektion

Um die freien Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde diese zunächst für 1 h in 5 % Milchpulver (in TBS-Tween, vgl. Anhang 7.2.4, S. 138) überführt. Anschließend wurde die Membran 1 h mit dem primären Antikörper (Rabbit-anti-MP17; IPK, Gatersleben) in 5% Milchpulver (1:5000) inkubiert, dreimal je 20 min in 5% Milchpulver gewaschen und dann 2 h lang mit dem 2. Antikörper (ImmunoPure[®] Goat Anti-Rabbit IgG, H+L, Peroxidase Conjugated, PIERCE, Rockford, Illinois, USA) inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder wie beschrieben gewaschen.

Die Immunodetektion wurde mit einem Detektions-Kit von PIERCE durchgeführt (SuperSignal[®] West, PIERCE, Rockford, Illinois, USA). Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die hierfür notwendigen Puffer sind im Anhang 7.2.4 (S. 138) aufgeführt.

Zur Detektion des Lumineszenzsignals wurde der Blot auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) exponiert (ca. 10 s). Der Film wurde nach der Exposition sofort in eine Schale mit der Entwicklungslösung (Rodinal[®], Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie., Deutschland, 1:10 verdünnt) gelegt. Dabei wurde durch gleichmäßiges Bewegen der Schale sichergestellt, dass der Film stets von Lösung umspült war. Sobald die Banden gut sichtbar wurden (nach etwa 5 bis 10 s)

wurde der Film in eine Schale mit Fixierlösung (vgl. Anhang 7.2.5, S. 138) gelegt (ca. 2-5 min), wobei ebenfalls auf gleichmäßiges Umspülen des Films geachtet wurde. Anschließend wurde der Film in einer Schale mit Leitungswasser gewaschen.

3.7 Elektronenmikroskopie

3.7.1 Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden an MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen aus dem Ansatz 1 durchgeführt, und zwar sowohl an Pflanzen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, als auch solchen, die 100 mM NaCl ausgewetzt wurden. Dazu wurden Source-Blätter und Internodien des oberen Sprossabschnitts von den unter Standardbedingungen kultivierten Pflanzen in einer Mischung aus Paraformaldehyd (PFA, 1,5%) und Glutardialdehyd (GA, 3%) in 0,05M Cacodylat-Puffer (vgl. Anhang 7.2.6, S. 138) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler fixiert (5 Stunden). Bei den Proben der salzgestressten Pflanzen wurde das Mischungsverhältnis von PFA (3,5%) und GA (3,68%) verändert, um die Fixierlösung an die durch den Salzstress veränderte Osmolarität des Gewebes anzupassen.

Die nachfolgenden Inkubationen wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Proben wurden viermal in Natrium-Cacodylatpuffer gewaschen (jeweils 20 min) und danach über Nacht mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert.

Anschließend wurden die Proben viermal 15 min lang mit Wasser (4 °C) gewaschen und mit eisgekühlter Uranylacetat-Lösung 2,5 h kontrastiert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 30, 50, 70, 90, 96 und 100% (v/v) Ethanol jeweils für 30 min¹. Ab der Verdünnungsstufe 96% wurde wieder bei Raumtemperatur gearbeitet. Danach erfolgten ein Entwässerungsschritt für 90 min in 100% Ethanol, das über einem Molekularsieb (Sikkon, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) getrocknet wurde und ein weiterer Schritt (60 min) in 100% getrocknetem Propylenoxid.

Dann wurden die Proben über 5 Stufen in Epoxyharz (nach Spurr 1969) überführt: Propylenoxid/Epoxyharz im Verhältnis 5:1, 3:1, 1:1, 1:3 und 1:5 für jeweils 2,5 h (der dritte Schritt im Verhältnis 1:1 wurde über Nacht durchgeführt). Abschließend wurden die Proben zweimal jeweils 1 h in reinem Epoxyharz inkubiert und über Nacht auf dem Schüttler gelassen.

¹ Der Entwässerungsschritt in 70% Ethanol wurde nicht 30 min lang sondern über Nacht durchgeführt.

Für eine nochmalige Inkubation (2 h) in Epoxyharz und die anschließende Einbettung in Gelatinekapseln oder Flacheinbettungsformen wurde frisches Epoxyharz angesetzt. Die Polymerisation des Harzes erfolgte im Trockenschrank bei 68 °C für 24 h.

3.8 Mazeration des Xylems

MP17N-exprimierende Tomensa-Pflanzen wurden 4 Wochen im Gewächshaus kultiviert. Für die Mazeration des Xylems wurden 2 cm lange Internodienabschnitte im oberen Bereich der Pflanze (Sink-Blätter), im mittleren Bereich (junge Source-Blätter) und etwa 3 cm über dem Boden (ältere Source-Blätter) herausgeschnitten. Die äußeren Gewebe um den Xylemzylinder wurden entfernt. Anschließend wurden die Xylemzylinder längs durchgeschnitten, um auch das Mark zu entfernen (van der Schoot & van Bel 1989). Von den Xylemabschnitten wurde der mittlere Teil (1 cm) verwendet.

Die Gewebestücke wurden bei 60 °C zwei Tage in 30% H₂O₂ und 70% Essigsäure (1:1) mazeriert. Um die einzelnen Zellen voneinander zu lösen, wurden die Proben mindestens eine Stunde lang vibriert. Nach wiederholtem Waschen in Wasser und Zentrifugieren (bei höchstens 500 g) wurden die Proben in Kaisers Gelatine (vgl. Anhang 7.1, S. 135) auf einem Objektträger fixiert. Die Xylemelemente wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt und fünf Hauptgruppen (Parenchym, Fasern, Gefäßelemente, Tracheiden und Elemente des Protoxylems) zugeordnet.

Zur Abschätzung des Gesamtvolumens der Gefäßelemente wurden für jede Linie die Durchmesser und die Längen von etwa 160 Gefäßelementen ermittelt und daraus das durchschnittliche Leitungsvolumen berechnet.

3.9 Plasmodiesmenfrequenz in den Derivaten des Cambiums in der Sprossachse

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Plasmodiesmenfrequenzen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM, Philips EM300) wurden am Mikrotom mit einem Diamantmesser (Diatome Ltd., Biel, Schweiz) ultradünne Längsschnitte von der Sprossachse (ca. 60 nm dick) angefertigt. Davon wurden 10 Stück zufällig ausgewählt. Diese Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Am TEM wurden die Plasmodiesmen in den tangentialen und longitudinalen Querwänden der Cambiumzellen und deren Derivate (Xylem und Phloem) gezählt. Dabei wurden die Plasmodiesmen folgenden Gruppen zugeordnet: 1–0 (PD nur in der Zellwand einer Zelle), 1–1 (PD durchgehend von einer Zelle zur benachbarten), 2–1 (Y-förmiger PD), 2–2 (H-

förmiger PD). Die Anzahl der Plasmodesmen wurde auf die Zellwandfläche bezogen. Dazu wurden die Längen der Zellwände bestimmt. Aus 10 untersuchten Schnitten (60 nm) ergab sich eine Breite von 0,6 μm . Die Plasmodesmenfrequenzen werden in Anzahl pro μm^2 angegeben.

3.10 Mikroinjektionen

3.10.1 Vorbereitung der Pflanzen

Die Mikroinjektionsexperimente wurden an Blättern von intakten Pflanzen durchgeführt. Dazu wurden auf der Blattunterseite mit einer frischen Rasierklinge einige corticale Zellschichten der Mittelrippe abgetragen, und zwar so, dass das darunter liegende Phloem nicht verletzt wurde. Die Zellen wurden sofort mit dem gelösten Fluoreszenzfarbstoff RH-160 (vgl. Anhang 7.2.7, S. 139) überschichtet, der die Membranen in etwa 15 min anfärbt.

3.10.2 Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Die Mikroinjektionsexperimente wurden unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Typ TCS 4D, Leica, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Der injizierte Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (LYCH) wurde mit der 488 nm-Linie des Argon/Krypton-Lasers (Omnichrome, Chino, California, USA) angeregt. Das emittierte Licht wurde durch einen Fluorescein-Bandpass-Filter zum Detektor geleitet. RH-160 wurde mit der 564 nm-Linie des Lasers angeregt, hier wurde ein 590 nm-Langpass-Filter verwendet.

3.10.3 Mikroinjektionen

Die Mikroinjektionskapillaren wurden aus Borosilikatglaskapillaren (1 mm äußerer Durchmesser, 0,58 mm innerer Durchmesser) mit internem Filament (Clark Electro-medical Instruments, Reading, UK) hergestellt. Dazu wurde ein Laser Puller (Modell 2000, Sutter Instruments, Novato, California, USA) verwendet.

Die Mikroinjektionskapillaren wurden mithilfe eines Joystick-Mikromanipulators (4 Achsen, Modell MMW-204; Narishige, Tokyo, Japan) gesteuert, der direkt am Mikroskopisch des konfokalen Laser Scanning Mikroskops befestigt war. Sie wurden über das innere Filament mit LYCH gefüllt und das Restvolumen anschließend mit dünnflüssigem Silikonöl (vgl. Anhang 7.1, S. 135) aufgefüllt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mithilfe eines hydraulischen Druckmanipulators injiziert (Kempers *et al.* 1999).

4 ERGEBNISSE

4.1 Phänotypische Merkmale der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen

In dieser Arbeit wurden mehrere Experimente (Kapitel 4.2 bis 4.7) mit MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen durchgeführt (ABBILDUNG 4-1). Alle untersuchten transgenen Pflanzen exprimierten das MP17N konstitutiv unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (ABBILDUNG 3-1, S. 20). In ihrem Wachstum unterschieden sich diese Pflanzen jedoch erheblich. Es war bei der Linie T-18 so stark eingeschränkt, dass ihr Phänotyp in allen Experimenten von dem der anderen Pflanzen unterschieden werden konnte. Die Linie T-19 ähnelte in ihrem Phänotyp der Kontrollpflanze (T-K), war aber in allen Experimenten deutlich kleiner als diese. Die Linie T-20 war dagegen phänotypisch nicht von der Kontrollpflanze zu unterscheiden; einige Individuen dieser Linie erreichten sogar eine etwas größere Höhe als Pflanzen aus der Kontrollgruppe. Darüber hinaus waren die Source-Blätter der Linie T-18 oft eben ausgebreitet, während jene der anderen transgenen Pflanzen sowie der Kontrollpflanze seitlich leicht eingerollt waren (vgl. ABBILDUNG 4-4, S. 39). Diese phänotypischen Merkmale traten in allen Experimenten auf, und zwar unabhängig davon, ob die Pflanzen in Erde oder im Hydrokultursystem wuchsen. Auch die Jahreszeit und die Lichtintensität bei der Kultur in der Klimakammer hatten bei der Ausprägung der beschriebenen Merkmale keinen Einfluss.

Trotz der erheblichen Wachstumsreduktion waren Entwicklungsprozesse offensichtlich nicht gestört, denn in allen Experimenten entwickelten die transgenen Pflanzen genauso viele Blätter wie die Kontrollpflanzen, mit dem Unterschied, dass sie kleiner waren als jene der Kontrollpflanzen. Auch im Zeitpunkt der Blütenbildung oder dem Beginn der Knollenbildung gab es keine Unterschiede.

In allen Experimenten wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt und die Expression des MP17N in den transgenen Pflanzen nachgewiesen (ABBILDUNG 4-2). Das Protein MP17N wurde ausnahmslos in allen transgenen Linien exprimiert, unabhängig davon, ob die Pflanzen aus der Sterilkultur stammten oder als Stecklinge bzw. durch Knollen vermehrt wurden. Gleiches gilt für die Experimente unter 100 mM NaCl. Bei der Linie T-18 wurde stets eine stärkere Bande gefunden als bei den beiden Linien T-19 und T-20 (ABBILDUNG 4-2). Das Protein (17 kDa) wanderte mit einem apparenten Molekulargewicht von 24 kDa, was auf die aminoternale Verlängerung des Proteins und auf post-

translationale Modifikationen wie Phosphorylierung zurückgeführt wird (Schmitz *et al.* 1997, Herbers *et al.* 1997).

Bei den physiologischen Messungen wurde zwischen Source- und Sink-Blättern unterschieden. Das oberste Blatt an der Sprossspitze mit einer Länge von einem Zentimeter wurde als Blatt Nr. 1 definiert. Sink-Blätter waren danach nicht ausdifferenzierte Blätter mit den Nummern 1–4, diese waren stets kleiner als 10 cm. Als Source-Blätter wurden Blätter mit den Nummern >7 bezeichnet.



ABBILDUNG 4-1. Phänotypen der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und der Kontrollpflanze (T-K links, rechts daneben die transgenen Linien T-18, T-19 und T-20). Diese Pflanzen sind zweieinhalb Wochen alt. Sie wurden aus Knollen angezogen; deshalb unterscheidet sich die Anzahl der Sprosse pro Topf. Die nachfolgenden Experimente wurden stets mit Stecklingen (aus der Hydrokultur oder aus der Erdkultur) durchgeführt, um so gleiche Startbedingungen zu gewährleisten.

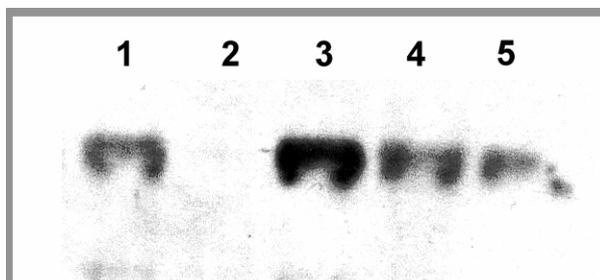


ABBILDUNG 4-2. Typische Western Blot-Analyse des MP17N in Source-Blättern der transgenen Tomensa-Pflanzen, die das MP17N-Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren.

1 Positiv-Kontrolle (Tacke *et al.* 1996); 2 T-K, 3–5 die transgene Linien T-18, T-19 und T-20.

4.2 Einfluss des MP17N auf Wachstum und Kohlenhydratmetabolismus

4.2.1 Ansatz 1 (Frühling): Pflanzen direkt aus der Sterilkultur, Ernte vor Knollenbildung (30 Tage)

4.2.1.1 Vorbemerkung

Für den ersten Versuchsansatz wurden Stecklinge aus der Sterilkultur herangezogen. Sie wurden nach 3 Wochen aus dem Nähragar in das Hydrokultursystem übertragen. Zu diesem Zeitpunkt (Tag 1 des Experiments) waren die Pflanzen etwa 7 ± 2 cm groß. Das Experiment dauerte 30 Tage.

4.2.1.2 Wachstumsanalyse der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen

Das Wachstum der Linien T-18 und T-19 war relativ stark reduziert, während sich die Linie T-20 phänotypisch nicht von der Kontrollpflanze unterschied (ABBILDUNG 4-3). Linie T-18 hob sich nicht nur wegen ihrer geringeren Höhe von den anderen Pflanzen ab, sie ließ sich auch immer an ihren Source-Blättern erkennen. Diese waren im Gegensatz zu jenen aller anderen Pflanzen niemals seitlich nach unten eingerollt sondern stets eben ausgebreitet (ABBILDUNG 4-4). Die Blattunterseiten der transgenen Tomensa-Pflanzen, vor allem die der Linie T-18, waren in der Regel sehr stark rot gefärbt, was vermutlich durch Anthocyanbildung zu erklären ist (Riesmeier *et al.* 1994, Russin *et al.* 1996, Livingston *et al.* 1998, Jeannette *et al.* 2000).

Zur Bestimmung der Biomasse und für die Gewebeanalysen wurden die Pflanzen nach 30 Tagen geerntet, noch bevor sich Knollen oder Blüten gebildet hatten. Die Gesamtbiomasse der transgenen Linien war geringer als die der Kontrollpflanzen. Bei der Linie T-18 reduzierte sie sich um 68,8% und bei den Linien T-19 und T-20 um 23,5 bzw. 8,9% (TABELLE 4-1). Im Gegensatz zu den TMV-MP-exprimierenden Tabakpflanzen (Lucas *et al.* 1993a) veränderten sich die Wurzel/Spross-Verhältnisse der transgenen Linien gegenüber den Kontrollpflanzen jedoch nicht (TABELLE 4-1). Ein Vergleich mit MP17N- oder MP17-exprimierenden Tabakpflanzen war nicht möglich, da das Wurzel/Spross-Verhältnis in den Untersuchungen von Herbers *et al.* (1997) und Hofius *et al.* (2001) nicht bestimmt wurde; aber auch bei diesen transgenen Pflanzen war die Gesamtbiomasse reduziert.



ABBILDUNG 4-3. Phänotypen der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (T-K). Die Pflanzen sind drei Wochen alt. Sie wurden direkt aus den Sterilkulturen in die Hydrokultur eingepflanzt. Die Linie T-20 erreichte oft die gleiche Höhe wie die Kontrollpflanze (Ansatz 1).



ABBILDUNG 4-4. Source-Blatt einer Kontrollpflanze (T-K, links) im Vergleich zu dem der transgenen Linie T-18 (rechts). Die Blätter der Kontrollpflanzen aber auch die der Linien T-19 und T-20 waren seitlich leicht nach unten eingerollt, während jene der Linie T-18 stets eben waren (Ansatz 1).

TABELLE 4-1. Wachstumsanalyse der MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 1). Die Pflanzen wurden direkt aus Sterilkulturen in das Hydrokultursystem übertragen und vor dem Beginn der Knollenbildung geerntet (nach 30 Tagen). Sp, Spross; Wu, Wurzel; Kno, Knolle(n).

Linie	TG (g)	Sp (%)	Wu (%)	Kno (%)	Wu/Sp-Verhältn.	Abnahme Biomasse (%)
T-K	10,2±2,8	82,5	17,5	–	0,21±0,02	–
T-18	3,2±0,4	81,3	18,7	–	0,22±0,01	68,8%
T-19	7,8±0,2	84,6	15,4	–	0,19±0,01	23,5%
T-20	9,3±3,3	83,9	16,1	–	0,20±0,06	8,9%

4.2.1.3 Einfluss des MP17N auf Photosynthese und Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern

Photosyntheseaktivität und Transpiration von mittleren Source-Blättern (Blatt Nr. 10 bis 14) wurden einmal nach einer Woche und ein zweites Mal nach drei Wochen gemessen (TABELLE 4-2). Die Photosyntheseaktivität der transgenen Linien war gegenüber der Kontrollpflanze leicht reduziert, wobei die Unterschiede zu Beginn des Experiments (13–23%) deutlicher hervortraten als am Ende (5–14%). Bei den Transpirationsraten gab es keine einheitlichen Veränderungen (TABELLE 4-2).

Die MP17N-bedingten Verringerungen der Photosyntheseraten können nicht vollständig die zum Teil drastischen Abnahmen der Gesamtbiomassen bei den Linien T–18 und T–19 erklären. Deshalb wurde untersucht, ob eine erhöhte Dunkelatmung für das geringere Wachstum verantwortlich war. Die MP17N-exprimierenden Pflanzen hatten eine zum Teil deutlich höhere Dunkelatmung als die Kontrollpflanze (TABELLE 4-3). Gegenüber der Kontrollpflanze stieg sie um 35% bei der Linie T–18 und um 50% bzw. 14% bei den Linien T–19 und T-20. Die Messung wurde jedoch lediglich an einem Tag durchgeführt. Man kann daher nicht sicher sagen, ob die Dunkelatmung während der gesamten Dauer des Experiments erhöht war und ob sie tatsächlich zu der Verringerung der Biomasse beigetragen hat.

Ein wahrscheinlicherer Grund für die geringere Biomasseproduktion sind die kleineren Blattflächen der transgenen Linien T–18 und T–19 (TABELLE 4-4). Berücksichtigt man bei einer Modellrechnung die verringerten Photosyntheseraten und die Blattflächen, erhält man Werte für die Abnahme der Biomasseproduktion, die relativ gut mit den tatsächlich gemessenen übereinstimmen (vgl. TABELLE 4-1, S. 39 und TABELLE 4-8, S. 52 mit TABELLE 4-4).

Um den Einfluss des MP17N auf den Kohlenhydratgehalt von Source-Blättern zu untersuchen, wurden sowohl Stärke als auch die löslichen Zucker Saccharose, Glukose und Fruktose in den Blättern Nr. 7–11 bestimmt (ABBILDUNG 4-5). Der Stärkegehalt war bei den transgenen Linien drei- bis viermal höher als bei der Kontrollpflanze. Die Saccharosemenge verdoppelte sich, der Glukosegehalt stieg um das drei- bis vierfache und der Fruktosegehalt war bei den transgenen Linien fünf- bis siebenmal höher als bei der Kontrollpflanze.

Es ist bekannt, dass die Photosynthese durch Feedback-Inhibition herabreguliert wird, wenn Photoassimilate in den Blättern akkumulieren (Goldschmidt & Huber 1992, Krapp & Stitt 1995, Herbers *et al.* 1997, Paul & Foyer 2001). Die Akkumulation von Kohlen-

hydraten war also möglicherweise der Grund für die Verringerung der Photosyntheserate (TABELLE 4-2).

TABELLE 4-2. Photosyntheseaktivitäten und Transpiration der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen (Ansatz 1) nach einer Woche (A) und nach drei Wochen (B). Es wurden jeweils voll ausdifferenzierte Source-Blätter (Nr. 7–11) gemessen. In Klammern sind jeweils die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		Transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
A nach einer Woche				
T-K	14,4±1,7		3,0±0,9	
T-18	12,5±3,1	(-13%)	3,1±1,0	(+3%)
T-19	12,6±2,5	(-13%)	2,5±1,1	(-17%)
T-20	11,1±3,1	(-23%)	3,1±1,3	(+3%)
B nach drei Wochen				
T-K	14,6±1,9		3,1±1,1	
T-18	13,7±1,8	(-6%)	2,0±1,2	(-35%)
T-19	12,6±2,1	(-14%)	3,0±0,6	(-3%)
T-20	13,9±2,0	(-5%)	3,4±1,1	(+10%)

TABELLE 4-3. Dunkelatmung von Source-Blättern (Blatt Nr. 7–11) der MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 1). Die Messung wurde nach zwei Wochen durchgeführt. In Klammern sind jeweils die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Dunkelatmung ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
T-K	1,4±0,7	
T-18	1,9±0,7	(+35%)
T-19	2,1±0,6	(+50%)
T-20	1,6±0,5	(+14%)

TABELLE 4-4. Modellrechnung für die Abnahme der Biomasseproduktion bei verringerter Photosyntheseleistung und unter Berücksichtigung der Blattfläche von Tomensa-Pflanzen. Für die Ermittlung der Blattfläche wurden jeweils 6 Source-Blätter der Pflanzen aus dem Ansatz 1 ausgemessen. Bei den Photosynthesewerten handelt es sich um Mittelwerte aus den beiden Messungen an Source-Blättern. In Klammern sind die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Blattfläche (cm^2)	Reduktion der Blattfläche	Berechnete Abnahme der Biomasse	Tatsächliche Reduktion der Biomasse (vgl. TABELLE 4-1)
T-K	14,2	27±5			
T-18	12,5 (-9,7%)	14±3	48%	53%	68,8%
T-19	12,6 (-13,1%)	23±4	15%	26%	23,5%
T-20	11,1 (-13,8%)	27±4	±0	14%	8,9%

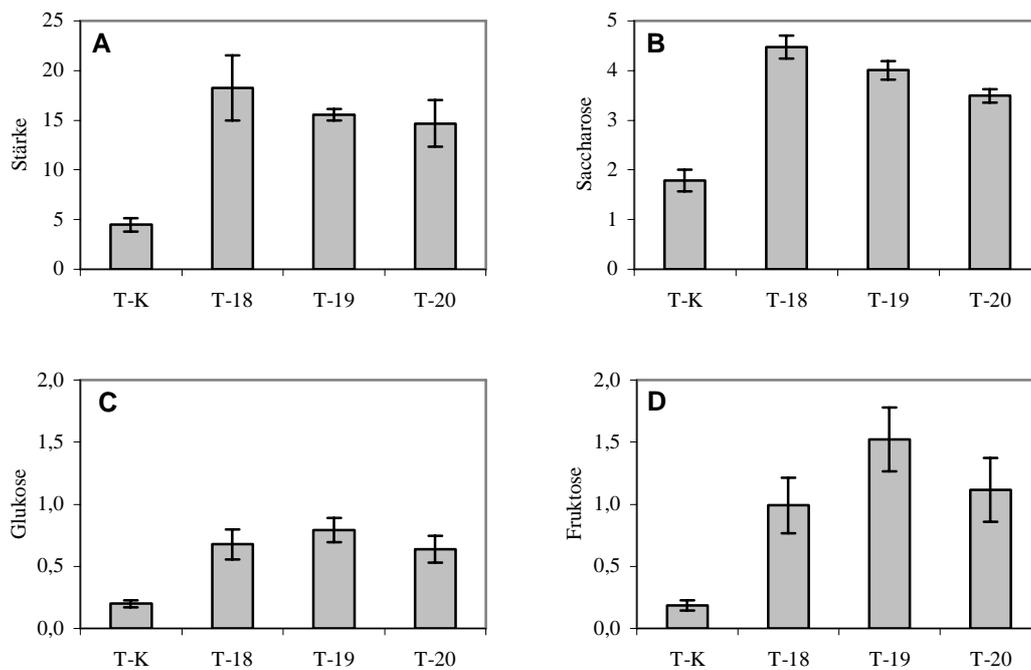


ABBILDUNG 4-5. Kohlenhydratanalyse von Source-Blättern (Nr. 7–11) der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Ansatz 1).

A Stärkegehalt. **B–D** Gehalt von Saccharose, Glukose und Fruktose. Die Pflanzen wurden nach 30 Tagen geerntet, noch bevor die Knollenbildung begonnen hatte. Stärke in mg Glukose/g FG, lösliche Zucker in mg/g FG.

4.2.1.4 Auswirkungen des MP17N auf den Kohlenhydratgehalt in Petiolen von Source-Blättern, in der Sprossachse und in Sink-Blättern

Bei MP17N-exprimierenden Tabakpflanzen (Herbers *et al.* 1997) korrelierte der Anstieg an Kohlenhydraten in Source-Blättern mit einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern in den Mittelrippen der entsprechenden Blätter, was als Folge eines gehemmten Exports interpretiert wurde. Da auch die MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen in diesem Ansatz Kohlenhydrate in ihren Source-Blättern akkumulierten, wurde untersucht, ob ein eventuell verringerter Export zu einer Reduktion der Kohlenhydratmengen in den Petiolen und den Sprossachsen aus dem Bereich der Source-Blätter führt. Da der Trockengewichtsanteil der Petiolen und der Sprossachsen bei den transgenen Linien T-18 und T-19 ($12,8 \pm 2,9\%$ bzw. $12,0 \pm 3,4\%$) etwas höher war als bei der Kontrollpflanze und der Linie T-20 ($10,2 \pm 2,6\%$ bzw. $9,6 \pm 2,3\%$), wurden die Stärke- und Zuckermengen nicht, wie bei den Blättern, auf das Frischgewicht sondern auf das Trockengewicht bezogen.

In den Petiolen gab es bezüglich der Stärke und der löslichen Zucker keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze (TABELLE 4-5). Im Gegensatz dazu war der Saccharosegehalt in den Sprossachsen der transgenen Linien gegenüber der Kontrollpflanze reduziert (ABBILDUNG 4-6 A). Auch Glukose und Fruktose lagen in den Sprossachsen der transgenen Linien in etwas geringeren Mengen vor (ABBILDUNG 4-6 A). Interessanterweise gab es bezüglich des Stärkegehaltes kein einheitliches Ergebnis. Während die Linien T-19 und T-20 deutlich weniger Stärke in der Sprossachse aufwiesen als die Kontrollpflanze, war bei der Linie T-18 der Stärkegehalt gegenüber der Kontrollpflanze sogar leicht erhöht (ABBILDUNG 4-6 B).

Die Tatsache, dass die löslichen Zucker in den Source-Blättern akkumulierten, während sie in der Sprossachse im Vergleich zur Kontrollpflanze in geringeren Mengen vorlagen, könnte bedeuten, dass bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen dieses Ansatzes tatsächlich der Export von Photoassimilaten aus den Source-Blättern gehemmt war. Es ist daher denkbar, dass als Folge hiervon auch der Kohlenhydratstatus in den Sink-Blättern beeinflusst wurde.

Daher wurden auch die Sink-Blätter (Blatt Nr. 1–4) bezüglich ihrer Kohlenhydrate analysiert. Zusätzlich wurden nochmals Source-Blätter auf ihren Kohlenhydratgehalt hin untersucht, diesmal aber auch ältere Source-Blätter (bis Blatt Nr. 20), die in der vorangegangenen Analyse nicht berücksichtigt wurden. Die älteren Source-Blätter wurden untersucht, weil in der Studie von Lucas *et al.* (1993a) der Kohlenhydratgehalt in TMV-MP-exprimierenden Tabakpflanzen lediglich in mittleren Source-Blättern anstieg. Die Bestim-

mung der löslichen Zucker wurde diesmal mit Hilfe der HPLC durchgeführt, die es ermöglichte, neben Saccharose, Glukose und Fruktose auch Raffinose zu analysieren. Da sich die Trockengewichtsanteile von Source- und Sink-Blättern unterschieden (TABELLE 4-6), wurden die Ergebnisse auf das jeweilige Trockengewicht umgerechnet.

ABBILDUNG 4-7 (A) bestätigt die bereits gezeigte Akkumulation von Saccharose, Glukose und Fruktose in Source-Blättern. Dieses Ergebnis illustriert jedoch zusätzlich, dass die MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen in allen Source-Blättern Kohlenhydrate akkumulieren und nicht nur in solchen eines bestimmten Alters (die entsprechenden Werte wurden gemittelt, da es zwischen alten und jungen Source-Blättern keine wesentlichen Unterschiede gab). Außerdem wird deutlich, dass in den Source-Blättern der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen auch Raffinose in größeren Mengen vorlag.

Die Sink-Blätter der transgenen Pflanzen enthielten dagegen weniger lösliche Zucker als die Kontrollpflanze, wobei der Unterschied zwischen der Linie T-18 und der Kontrollpflanze nicht so deutlich ausfiel wie der zwischen den Linien T-19 bzw. T-20 und der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-7 B).

Der Stärkegehalt in den Sink-Blättern wurde ebenfalls bestimmt und mit dem in Source-Blättern verglichen. Auch bei der Stärkeanalyse wurden hier die älteren Source-Blätter berücksichtigt. Wie schon bei den löslichen Zuckern fiel auf, dass sich die Linie T-18 von den Linien T-19 und T-20 unterschied. Erstere enthielt wie bei der Sprossachse mehr Stärke in den Sink-Blättern als die Kontrollpflanze, bei den Linien T-19 und T-20 war der Stärkegehalt im Vergleich zur Kontrollpflanze reduziert (ABBILDUNG 4-8 B). Die Linie T-18 hob sich also von den beiden anderen transgenen Linien dadurch ab, dass sie sowohl in der Sprossachse als auch in den Sink-Blättern einen höheren Stärkegehalt aufwies als die Kontrollpflanze.

Um die Veränderungen im Kohlenhydratgehalt zwischen den Source- und Sinkblättern besser vergleichen zu können, wurden die Sink/Source-Verhältnisse der einzelnen Kohlenhydrate berechnet (ABBILDUNG 4-9). Zum einen geht daraus hervor, dass Glukose und Fruktose in den Sink-Blättern der Kontrollpflanze in größeren Mengen vorlagen als in den Source-Blättern (Sink/Source-Verhältnisse >1), während dies bei Saccharose und Stärke umgekehrt war. In den Sink-Blättern der transgenen Linien war weder die Stärke noch ein löslicher Zucker höher konzentriert als in den Source-Blättern (Sink/Source-Verhältnisse <1). Einzige Ausnahme war das Sink/Source-Verhältnis von Raffinose bei der Linie T-20 (ABBILDUNG 4-9 D). Es lag mit 1,16 aber sehr nahe bei 1 und zeigt, dass auch dieser Zucker in den Sink-Blättern nicht wesentlich höher konzentriert war als in den Source-Blättern. Das Sink/Source-Verhältnis des Transportzuckers

Saccharose war bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen besonders niedrig (ABBILDUNG 4-9 B). Es war bei allen transgenen Linien etwa um den Faktor 10 geringer als bei der Kontrollpflanze.

Außerdem wurden die Verhältnisse der Konzentrationen von Hexosen und Saccharose als auch die von Stärke und Saccharose berechnet, um Veränderungen im Kohlenhydratstatus besser vergleichen zu können (TABELLE 4-7). In den Source-Blättern der Kontrollpflanze lag das Verhältnis von Hexosen zu Saccharose bei 0,85 (TABELLE 4-7). Die entsprechenden Werte der transgenen Linien waren etwas niedriger. Bei der Linie T-18 betrug das Verhältnis 0,75 und bei den Linien T-19 und T-20 0,84 bzw. 0,71. Dieser tendenziell niedrigere Wert bei den transgenen Linien deutet auf einen Rückstau von Saccharose hin. Noch deutlicher wurde dies beim Vergleich der Stärke/Saccharose-Verhältnisse. Bei der Kontrollpflanze betrug das Verhältnis von Stärke zu Saccharose 2,2, während es bei den MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen etwa doppelt so groß war (4 bis 4,5). Die Akkumulation von Saccharose führte bei den transgenen Linien also offensichtlich zur vermehrten Bildung von Stärke.

In den Sink-Blättern war bei allen Pflanzen der Gehalt an Hexosen gegenüber der Saccharose erhöht. Im Vergleich zur Kontrollpflanze, bei der das Verhältnis von Hexosen zu Saccharose bei 7,7 lag, war das entsprechende Verhältnis bei den transgenen Linien jedoch deutlich stärker angestiegen (14,3, 12,5 und 10,0 bei den Linien T-18, T-19 und T-20) (TABELLE 4-7). Da die absolute Konzentration der Hexosen in den Sink-Blättern der transgenen Linien geringer war als bei der Kontrollpflanze, bedeutet der höhere Quotient aus Hexosen und Saccharose, dass die Konzentration des Transportzuckers Saccharose stark reduziert war.

Auch das Verhältnis von Stärke zu Saccharose war in den Sink-Blättern aller Pflanzen kleiner als in den Source-Blättern. In den Sink-Blättern der Linie T-18 war das Verhältnis von Stärke zu Saccharose jedoch mehr als doppelt so groß (1,4) wie bei der Kontrollpflanze (0,6). Auch bei den Linien T-19 und T-20 war das Stärke/Saccharose-Verhältnis gegenüber der Kontrollpflanze tendenziell erhöht (0,7 bei T-19 und 0,9 bei T-20).

Um zu überprüfen, ob bei den MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen der Export von Saccharose aus den Source-Blättern gehemmt war, wurden Exsudationsexperimente durchgeführt. Bei der Kontrollpflanze war der Saccharose-Export aus den Source-Blättern tatsächlich größer als bei den transgenen Linien (ABBILDUNG 4-10). Vor allem bei den Linien T-18 und T-19, die das geringste Wachstum aufwiesen, war der Saccharose-Export aus der Petiole gegenüber der Kontrollpflanze reduziert.

TABELLE 4-5. Stärkegehalt (mg Glukose/g TG) und Gehalt an löslichen Zuckern (LZ, mg/g TG) in Petiolen von Source-Blättern (Nr. 7–11) bei MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 1).

Linie	Stärke	Saccharose	Glukose	Fruktose	Summe LZ
T-K	3,9±1,5	5,5±1,8	4,2±1,2	4,5±1,1	14±2
T-18	3,6±0,8	5,0±2,2	5,0±1,2	6,3±2,5	16±5
T-19	3,6±1,0	5,4±2,7	4,2±1,0	4,3±1,0	14±2
T-20	3,4±0,8	5,9±2,9	3,3±1,4	3,3±1,5	13±6

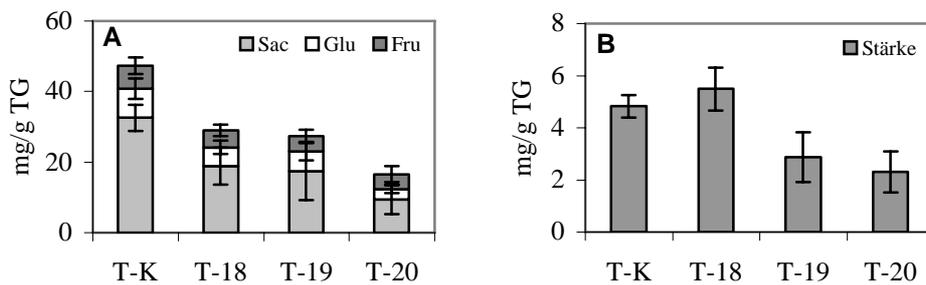


ABBILDUNG 4-6. Kohlenhydratgehalt in der Sprossachse MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 1). **A** Gehalt löslicher Zucker. **B** Stärkegehalt. Der Sprossachsenabschnitt stammt aus dem Bereich der Source-Blätter Nr. 7–11. Beachte die unterschiedliche Skalierung der beiden Diagramme.

TABELLE 4-6. Anteil des Trockengewichts an der Gesamtmasse bei Source- und Sink-Blättern der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und der Kontrollpflanzen (Ansatz 1).

Linie	Anteil des Trockengewichts (%)	
	Source-Blätter	Sink-Blätter
T-K	10,7±0,7	15,0±1,3
T-18	10,7±1,2	15,3±0,9
T-19	10,8±1,0	14,8±1,2
T-20	10,1±0,7	14,9±1,2

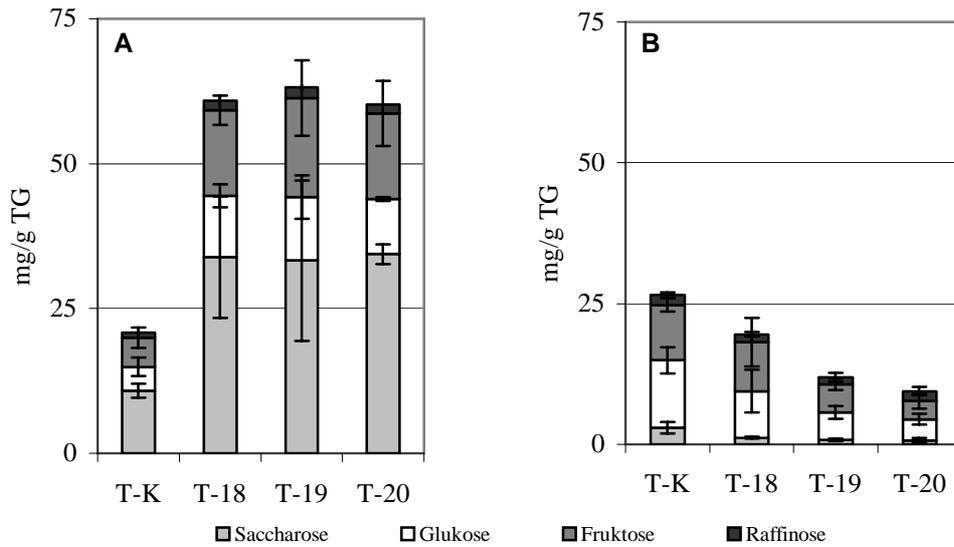


ABBILDUNG 4-7. Gehalt löslicher Zucker in Source- (A) und Sink-Blättern (B) von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 1). In dieser Analyse wurden auch ältere Source-Blätter (Nr. 7–20) berücksichtigt.

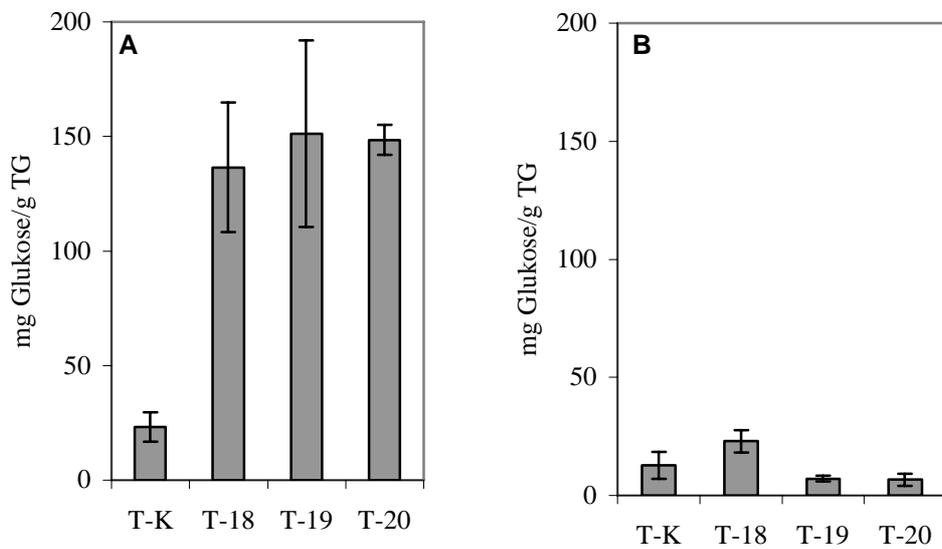


ABBILDUNG 4-8. Stärkegehalt in Source- (A) und Sink-Blättern (B) von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 1). In dieser Analyse wurden auch ältere Source-Blätter (Nr. 7–20) berücksichtigt.

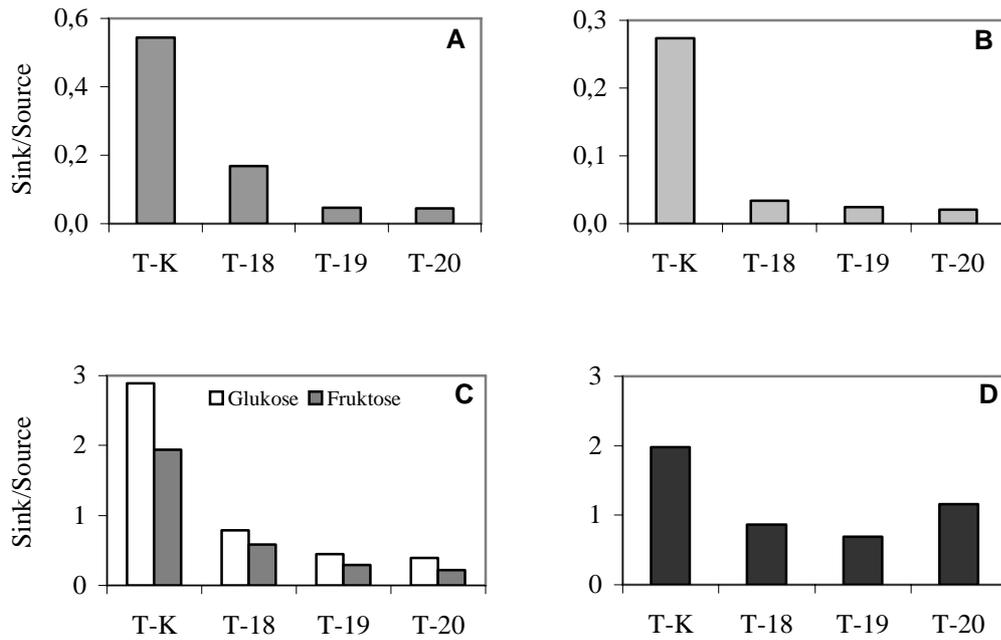


ABBILDUNG 4-9. Sink/Source-Verhältnisse von Stärke (A), Saccharose (B), Glukose und Fruktose (C) und von Raffinose (D) in MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 1).

TABELLE 4-7. Verhältnisse von Hexosen (Hex) zu Saccharose (Sac) und von Stärke (St) zu Saccharose in Source- und Sink-Blättern von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 1).

Linie	Source-Blätter		Sink-Blätter	
	Hex/Sac	St/Sac	Hex/Sac	St/Sac
T-K	0,85	2,2	7,7	0,6
T-18	0,75	4,0	14,3	1,4
T-19	0,84	4,5	12,5	0,7
T-20	0,71	4,3	10,0	0,9

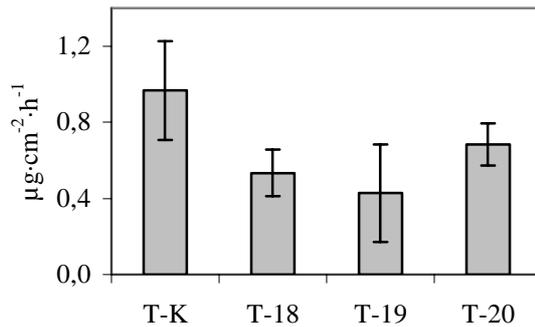


ABBILDUNG 4-10. Export von Saccharose aus Petiolen von Source-Blättern der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und der Kontrollpflanze (Ansatz 1). Zur Kontrolle wurden bei einigen Blättern von der Linie T-K vor der Exsudation die Fiederblätter entfernt. Der Saccharose-Export betrug dann nur 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

4.2.2 Ansatz 2 (Herbst): Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Ernte nach Knollenbildung (46 Tage)

4.2.2.1 Vorbemerkungen

Bei der Untersuchung der Auswirkungen von MPs auf den Kohlenhydratgehalt in transgenen Pflanzen muss deren Entwicklungszustand beachtet werden. In ihrer Studie über den Einfluss des TMV-MP auf den Kohlenhydratmetabolismus in transgenen Kartoffelpflanzen (cv. Desiree), zeigten Olesinski *et al.* (1996), dass der Effekt auf den Kohlenhydrathaushalt in den Blättern erst nach der Initiation der Knollenbildung auftrat. Diese Pflanzen waren 52 Tage alt. In jüngeren Pflanzen (38 Tage), die noch keine Knollen bildeten, unterschieden sich die transgenen Pflanzen und die Kontrollpflanzen hinsichtlich des Kohlenhydratgehaltes nicht.

Die MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen akkumulierten dagegen bereits vor der Knollenbildung erhebliche Mengen an löslichen Zuckern und Stärke in ihren Source-Blättern. Deshalb wurde ein weiteres Experiment durchgeführt (Ansatz 2), um zu untersuchen, ob sich auch nach dem Beginn der Knollenbildung Veränderungen im Kohlenhydratgehalt in den Source-Blättern ergeben.

Für dieses Experiment wurden keine Pflanzen aus der Sterilkultur verwendet. Stattdessen wurden Stecklinge von ca. 4 Wochen alten Pflanzen hergestellt, die im Gewächshaus in Erde kultiviert wurden. Zu diesem Zeitpunkt hatten diese Pflanzen weder geblüht noch Knollen gebildet. Nach 3 Wochen hatten die Stecklinge ausreichend Wurzel-

masse gebildet; sie wurden dann in das Hydrokultursystem übertragen (Tag 1 des Experiments). Die Pflanzen wurden für die physiologischen Analysen erst nach dem Beginn der Knollenbildung geerntet (nach 46 Tagen). Zu diesem Zeitpunkt hatten die Pflanzen bereits geblüht.

4.2.2.2 *Biomasseproduktion und Kohlenhydratverteilung in MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen*

So wie im ersten Ansatz, waren die Biomassen aller transgenen Linien gegenüber der Kontrollpflanze reduziert (TABELLE 4-8). Sie variierten innerhalb einer Linie allerdings relativ stark, was in den großen Standardabweichungen zum Ausdruck kommt. Betrachtet man jedoch die Verteilung der Biomasse zwischen Wurzel und Spross, so zeigt sich ein viel klareres Bild. Diese verschob sich bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen abweichend zum ersten Ansatz, aber übereinstimmend mit anderen Studien an MP-transgenen Pflanzen (Lucas *et al.* 1993a, Almon *et al.* 1997, Shalitin *et al.* 2002) zugunsten des Sprosses. Während der Sprossabschnitt bei der Kontrollpflanze nur 71,9% der Gesamtbiomasse ausmachte, erhöhte sich dieser Teil bei den transgenen Linien auf etwas über 77% (TABELLE 4-8). Entsprechend reduzierte sich der Wurzelanteil von 17,9% bei der Kontrollpflanze auf 13,2%, 13,3% bzw. 11,7% bei den Linien T-18, T-19 und T-20. Das entspricht einer Reduktion des Wurzel/Spross-Verhältnisses um 32% (T-18), 28% (T-19) bzw. 40% (T-20). Interessanterweise gab es aber kaum Unterschiede bei der Zuteilung von Kohlenhydraten zu den Knollen. Zwar war deren absolute Masse bei den transgenen Linien geringer als bei der Kontrollpflanze; betrachtet man aber die relative Verteilung zwischen Spross, Wurzel und Knolle, so zeigt sich, dass bei allen untersuchten Pflanzen etwa 10% der Biomasse in die Knollenbildung investiert wurde (TABELLE 4-8).

4.2.2.3 *Einfluss des MP17N auf Photosynthese, Transpiration und Kohlenhydratmetabolismus in Source-Blättern*

Da die Photosyntheseaktivität eines Blattes von dessen Alter abhängt, wurden Photosynthese und Transpiration sowohl von jungen Source-Blättern (Nr. 7–11) aus dem oberen Drittel des Sprosses (TABELLE 4-9) als auch von alten Source-Blättern (Nr. 14–18) aus dem unteren Sprossachsenabschnitt gemessen (TABELLE 4-10 A). Nach drei Wochen war bei den transgenen Linien die Photosyntheserate der jungen Source-Blätter etwas geringer (17% bei der Linie T-18, und 5% bzw. 8% bei den Linien T-19 und T-20) als bei den entsprechenden Blättern der Kontrollpflanze (TABELLE 4-9 A). Zwei Wochen später war die Photosyntheseleistung derselben (inzwischen älteren) Blätter insgesamt niedriger. Bei der Linie T-18 verringerte sich die Photosynthese gegenüber der Kontrollpflanze um 15%

und bei den Linien T-19 und T-20 um 18% bzw. 6% (TABELLE 4-9 B). Im Gegensatz zum ersten Ansatz sank hier parallel zur Photosynthese auch die Transpiration (TABELLE 4-9). Die Abnahmen der Photosyntheseraten bei den transgenen Linien lassen sich daher mit einer Verringerung des Gasaustausches durch die Spaltöffnungen erklären (TABELLE 4-9). Einzige Ausnahme war die Linie T-19, bei der sich die Transpirationsrate nach drei Wochen nicht von der Kontrollpflanze unterschied (TABELLE 4-9 A). In diesem Fall war aber auch die Photosynthese nur um 5% niedriger.

Die Photosyntheseleistung war in alten Source-Blättern aus dem unteren Sprossabschnitt deutlich geringer als in den oberen Blättern (TABELLE 4-10 A, vgl. TABELLE 4-9). Es gab aber keine einheitlichen Veränderungen zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze. Auffallend war allerdings die höhere Photosyntheserate bei der Linie T-18.

Zusätzlich wurden auch die Photosyntheseaktivitäten und Transpirationsraten von Sink-Blättern gemessen. Diese Blätter haben generell die höchsten Photosyntheseraten (TABELLE 4-10 B). Es gab aber keine deutlichen Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze, es war allenfalls eine leichte Tendenz zu einer höheren Photosyntheserate bei den transgenen Linien zu erkennen.

Die Dunkelatmung wurde an zwei Tagen gemessen. Eine erste Messung drei Wochen nach Beginn des Experiments lieferte keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze (TABELLE 4-11). Bei einer weiteren Messung eine Woche später wurde bei den Linie T-18 und T-19, deren Biomasse gegenüber der Kontrollpflanze besonders stark reduziert war, tatsächlich eine erhöhte Abgabe von CO₂ (67% bzw. 33%) gemessen. Bei der Linie T-20 nahm der entsprechende Wert allerdings um 11% ab (TABELLE 4-11). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass die transgenen Pflanzen während der gesamten Wachstumsperiode eine erhöhte Dunkelatmung hatten.

Um zu untersuchen, ob die MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen nach der Initiation der Knollenbildung verstärkt Kohlenhydrate akkumulieren, wurden Saccharose, Glukose, Fruktose und Stärke in den Source-Blättern (Nr. 7-11) bestimmt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze gefunden (ABBILDUNG 4-11). Bei der Linie T-18 war allenfalls eine leichte Tendenz zu einem höheren Stärkegehalt zu erkennen.

Die Analyse der Kohlenhydrate in der Sprossachse ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze; es fiel aber auf, dass die Konzentration löslicher Zucker bei der Linie T-18 niedriger war als bei den anderen Pflanzen (ABBILDUNG 4-12). Ein ähnliches Bild lieferte die Untersuchung der

Kohlenhydrate in den Sink-Blättern (ABBILDUNG 4-13). Wieder fiel die Linie T-18 auf, die gegenüber der Kontrollpflanze sowohl eine geringere Konzentration löslicher Zucker als auch einen geringeren Stärkegehalt aufwies.

Auch in diesem Ansatz wurden Exsudationsexperimente durchgeführt. Zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze waren keine Unterschiede im Saccharose-Export aus den Petiolen zu erkennen (ABBILDUNG 4-14). Lediglich bei der Linie T-18 war der Saccharose-Efflux gegenüber den anderen Linien geringfügig niedriger. Gegenüber den Blättern von Pflanzen aus dem ersten Ansatz war hier der Saccharose-Efflux insgesamt deutlich geringer (vgl. ABBILDUNG 4-10, S. 49).

TABELLE 4-8. Wachstumsanalyse der MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 2). Die Pflanzen wurden 46 Tage nach dem Transfer der 3 Wochen alten Stecklinge in die Hydrokulturanlage geerntet.

	TG (g)	Spross (%)	Wurzel (%)	Knollen (%)	Wu./Sp.- Verhältn.	Abnahme Biomasse (%)
T-K	30,5±12,0	71,9	17,9	10,1	0,25±0,03	–
T-18	15,8±5,1	77,4	13,2	9,4	0,17±0,03	48,4
T-19	19,2±1,3	77,1	13,3	9,6	0,18±0,04	37,2
T-20	24,3±7,9	77,3	11,7	10,9	0,15±0,04	20,6

TABELLE 4-9. Photosyntheseaktivität und Transpiration von mittleren Source-Blättern MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 2) nach drei Wochen (A) und nach fünf Wochen (B). In Klammern sind jeweils die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		Transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
A nach drei Wochen				
T-K	14,5±1,9		2,0±0,3	
T-18	12,1±1,5	(-17%)	1,5±0,3	(-24%)
T-19	13,8±0,7	(-5%)	2,0±0,1	(±0)
T-20	13,3±1,1	(-8%)	1,8±0,1	(-8%)
B nach fünf Wochen				
T-K	11,8±1,7		1,9±0,4	
T-18	10,0±1,7	(-15%)	1,5±0,4	(-20%)
T-19	9,6±1,7	(-18%)	1,6±0,4	(-16%)
T-20	11,4±1,6	(-6%)	1,9±0,2	(-2%)

TABELLE 4-10. Photosyntheseaktivität und Transpiration von alten Source-Blättern (Nr. 14–18) aus dem unteren Sprossachsenabschnitt (A) und Sink-Blättern (B) MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 2). Die Messungen wurden 43 Tage nach Beginn des Experiments durchgeführt. In Klammern sind jeweils die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		Transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
	A alte Source-Blätter (Nr. 14–18)			
T-K	7,0±0,6		1,7±0,2	
T-18	8,2±0,9	(+17%)	1,8±0,1	(+6%)
T-19	7,4±1,1	(+6%)	1,6±0,2	(-6%)
T-20	6,6±0,5	(-6%)	1,7±0,1	(±0)
B Sink-Blätter (Nr. 4)				
T-K	15,3±2,0		2,8±0,6	
T-18	15,8±2,2	(+3,1%)	2,9±0,7	(+7,1%)
T-19	15,7±2,0	(+2,3%)	2,6±0,3	(-6,6%)
T-20	16,4±1,6	(+7,0%)	3,0±0,5	(+8,9%)

TABELLE 4-11. Dunkelatmung von mittleren Source-Blättern MP17N-exprimierender Kartoffelpflanzen und Kontrollpflanzen (Ansatz 2). Die Messungen wurden einmal nach drei Wochen (links) und einmal nach vier Wochen (rechts) durchgeführt.

Linie	Dunkelatmung ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen
T-K	1,6±0,4	0,9±0,2
T-18	1,3±0,3	1,5±0,6
T-19	1,3±0,3	1,2±0,3
T-20	1,6±0,4	0,8±0,3

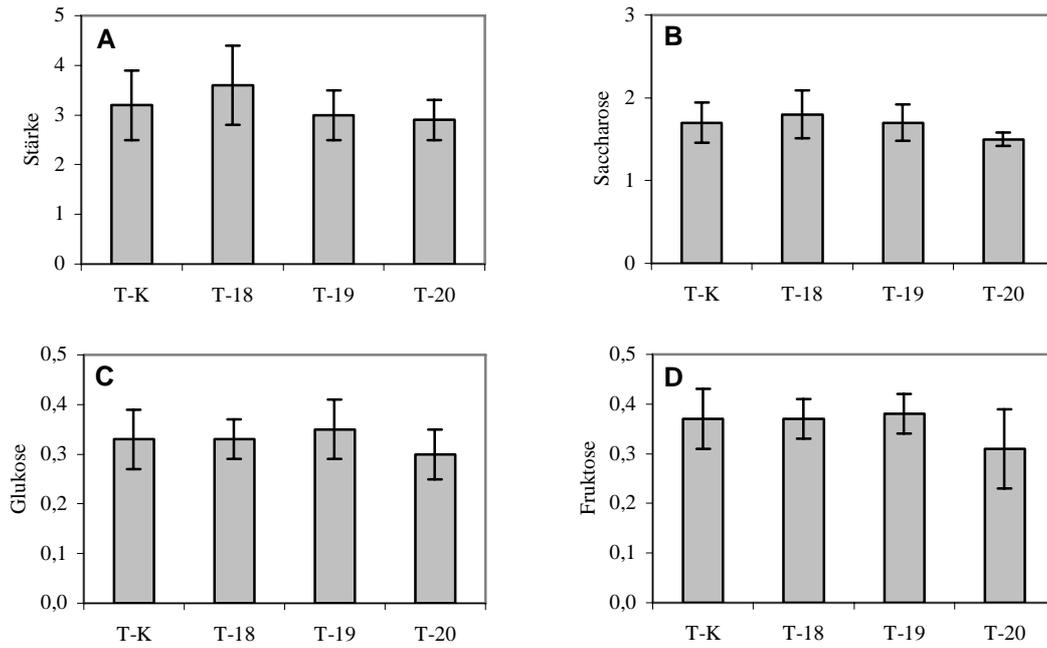


ABBILDUNG 4-11. Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern (Nr. 7–11) der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze. **A** Stärkegehalt (mg Glukose/g FG). **B–D** Gehalt von Saccharose, Glukose und Fruktose (mg/g FG). Die Blätter wurden nach Beginn der Knollenbildung geerntet (Ansatz 2).

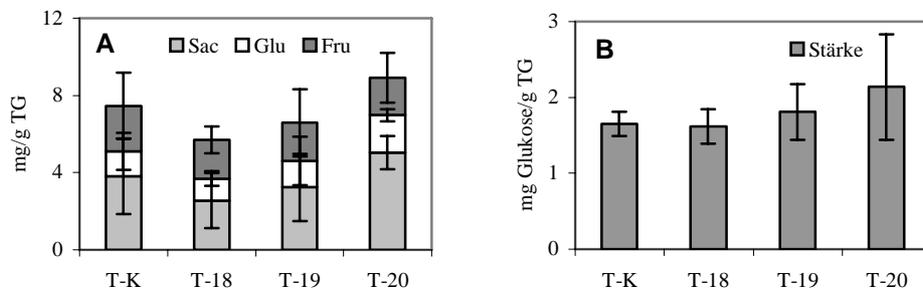


ABBILDUNG 4-12. Gehalt an löslichen Zuckern (**A**) und Stärke (**B**) in der Sprossachse MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 2). Der Sprossachsenabschnitt stammt aus dem Bereich der Source-Blätter Nr. 7–11.

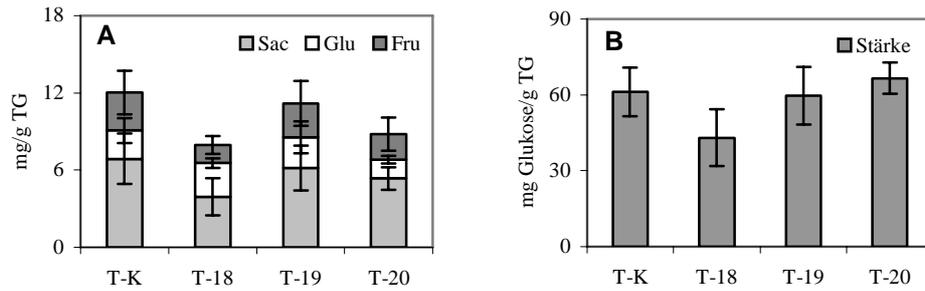


ABBILDUNG 4-13. Gehalt an löslichen Zuckern (A) und Stärke (B) in den Sink-Blättern MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 2).

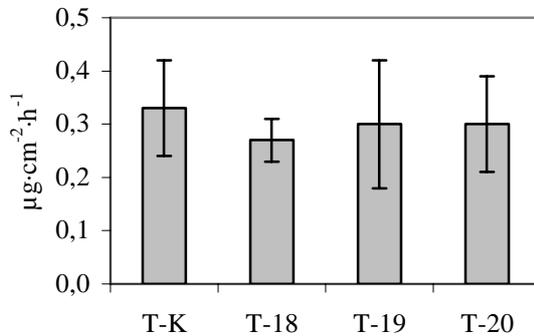


ABBILDUNG 4-14. Export von Saccharose aus Petiolen von Source-Blättern der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und der Kontrollpflanze (Ansatz 2).

4.2.3 Ansatz 3 (Herbst): Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Ernte vor Knollenbildung (17 Tage)

4.2.3.1 Vorbemerkungen

Im ersten Ansatz akkumulierten die MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen sowohl Stärke als auch lösliche Zucker in ihren Source-Blättern, während sich das Wurzel/Spross-Verhältnis nicht veränderte. Der zweite Ansatz lieferte ein gegenteiliges Bild. Das Wurzel/Spross-Verhältniss reduzierte sich bei den transgenen Pflanzen; es trat aber keine Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern der transgenen Pflanzen auf.

Die unterschiedlichen Ergebnisse können nicht einfach auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die Pflanzen im zweiten Ansatz bereits mit der Bildung von Knollen be-

gonnen hatten, denn die Anfangsvoraussetzungen der beiden Experimente waren nicht gleich. Die Ansätze 1 und 2 wurden in unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt. Zudem kamen im ersten Ansatz die Stecklinge direkt aus der Sterilkultur, während im zweiten Ansatz Stecklinge von ausdifferenzierten Pflanzen verwendet wurden. Es musste deshalb überprüft werden, ob Pflanzen, wie sie für den zweiten Ansatz verwendet wurden, eventuell vor der Initiation der Knollenbildung Kohlenhydrate in ihren Blättern akkumulieren.

Das Experiment des zweiten Ansatzes wurde daher unter den gleichen Bedingungen wiederholt; die Blätter zur Kohlenhydratanalyse wurden jedoch bereits nach 17 Tagen geerntet, also bevor die Pflanzen mit der Knollenbildung begonnen hatten.

4.2.3.2 *Wachstumsanalyse der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen*

Wie im zweiten Ansatz waren bei den transgenen Linien die Gesamtbiomasse und das Wurzel/Spross-Verhältnis reduziert (TABELLE 4-12). Abweichend von den vorangegangenen Experimenten war die Abnahme der Biomasse bei den drei transgenen Linien mit 35,1% (T-18), 34,5% (T-19) und 35,9% (T-20) fast identisch. Zusätzlich wurde auch das Verhältnis von Internodienmasse zu Blattmasse bestimmt. Dieses war bei den transgenen Linien zugunsten der Blätter verschoben (TABELLE 4-12). Interessant ist hierbei, dass der prozentuale Anteil der Internodien an der Gesamtbiomasse bei den transgenen Linien und bei der Kontrollpflanze etwa gleich war (32,3 bis 34,5 %), während die prozentualen Anteile der Blätter bei den transgenen Linien größer und die der Wurzeln kleiner als bei der Kontrollpflanze waren. Dieses Ergebnis illustriert, dass das MP17N spezifisch die Verteilung der Photoassimilate zwischen Blättern und Wurzeln beeinflusst.

Ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten waren die Photosyntheseaktivitäten und die Transpirationsraten bei den transgenen Linien gegenüber der Kontrollpflanze reduziert (TABELLE 4-13). Die Source-Blätter der MP17N-exprimierenden Pflanzen akkumulierten allerdings keine Kohlenhydrate (ABBILDUNG 4-15). Bei den Linien T-18 und T-19, also den beiden Linien, deren Biomasse gegenüber der Kontrollpflanze besonders stark reduziert war, war allenfalls eine leichte Tendenz zu einem etwas höheren Gehalt an Stärke und löslichen Zuckern zu erkennen.

TABELLE 4-12. Wachstumsanalyse der MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 3). Die Pflanzen wurden vor Beginn der Knollenbildung geerntet (17 Tage). Bl. = Blätter, Int. = Internodien, Wu. = Wurzel, Sp. = Spross, Verh. = Verhältnis.

Linie	TG (g)	Bl. (%)	Int. (%)	Wu. (%)	Int./Bl.-Verh. (%)	Wu./Sp.-Verh.	Abnahme Biomasse (%)
T-K	2,36±0,64	48,5	34,1	17,4	0,70±0,11	0,22±0,08	-
T-18	1,53±0,31	52,0	32,3	15,8	0,62±0,10	0,19±0,04	35,1
T-19	1,55±0,19	52,3	34,5	13,2	0,66±0,04	0,15±0,02	34,5
T-20	1,51±0,36	51,6	33,5	14,9	0,65±0,05	0,18±0,01	35,9

TABELLE 4-13. Photosyntheseaktivität und Transpiration von Source-Blättern MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen nach 14 Tagen, also drei Tage vor der Ernte für die Kohlenhydratanalyse (Ansatz 3). In Klammern sind jeweils die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
T-K	14,7±1,4	2,0±0,3
T-18	12,9±1,4 (-12%)	1,5±0,3 (-25%)
T-19	13,4±0,5 (-9%)	1,8±0,1 (-10%)
T-20	11,9±0,7 (-19%)	1,5±0,1 (-25%)

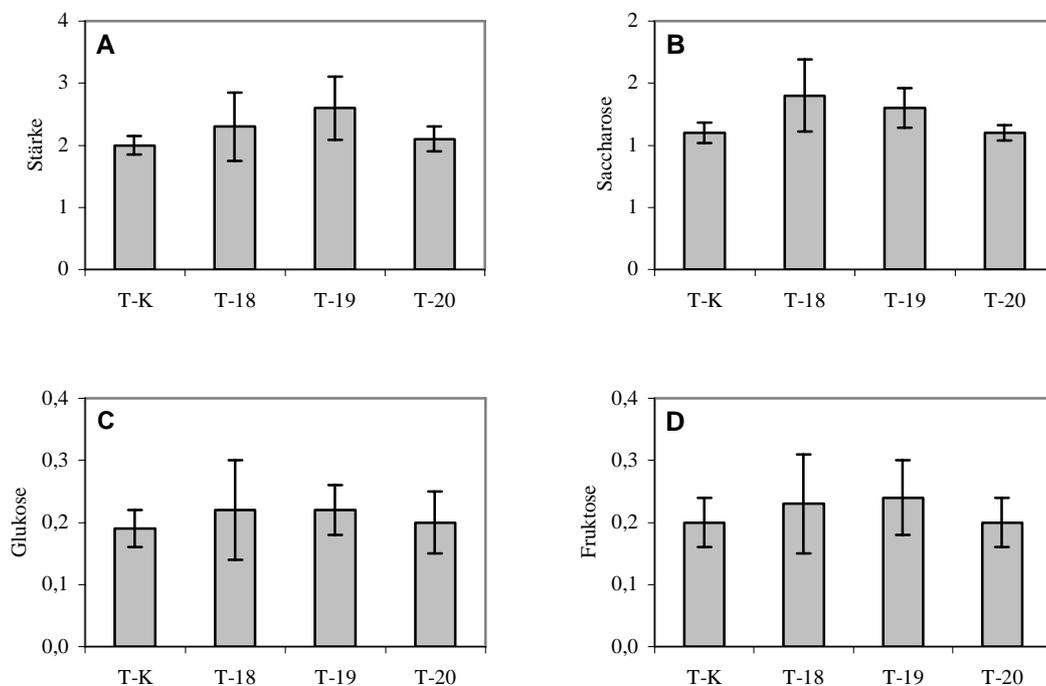


ABBILDUNG 4-15. Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern (Nr. 7–11) der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Ansatz 3). **A** Stärkegehalt (mg Glukose/g FG). **B–D** Gehalt von Saccharose, Glukose und Fructose (mg/g FG). Die Blätter wurden geerntet, bevor die Knollenbildung begonnen hatte.

4.2.4 Ansatz 4 (Frühling): Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Ernte vor Knollenbildung (17 Tage)

4.2.4.1 Vorbemerkung

Das vorangegangene Experiment wurde im Frühling des nächsten Jahres wiederholt, um einen möglichen jahreszeitlichen Effekt auf die Wirkung des MP17N auf den Kohlenhydratmetabolismus zu untersuchen. Das heißt, es wurden wieder Stecklinge von ausdifferenzierten Pflanzen im Hydrokultursystem kultiviert und nach 17 Tagen geerntet.

4.2.4.2 Wachstumsanalyse der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen

Dieses Experiment lieferte keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zum dritten Ansatz. Auch hier war bei den transgenen Linien die Gesamtbiomasse und das Wurzel/Spross-Verhältnis reduziert, während die Internodienmasse bei allen Pflanzen einschließlich der Kontrollpflanze etwa 33 bis 34% ausmachte (TABELLE 4-14).

Auch die Ergebnisse der Gaswechselfmessungen entsprechen in etwa denen des vorangegangenen Ansatzes (TABELLE 4-15).

In den Source-Blättern der transgenen Linien akkumulierten weder lösliche Zucker noch Stärke. Wieder war allenfalls eine leichte Tendenz zu einem höheren Kohlenhydratgehalt zu erkennen (ABBILDUNG 4-16).

TABELLE 4-14. Wachstumsanalyse der MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze (Ansatz 4). Die Pflanzen wurden vor Beginn der Knollenbildung geerntet (17 Tage). Bl. = Blätter, Int. = Internodien, Wu. = Wurzel, Sp. = Spross, Verh. = Verhältnis.

Linie	TG (g)	Bl. (%)	Int. (%)	Wu. (%)	Int./Bl.- Verh. (%)	Wu./Sp.- Verh.	AbnahmeBi- omasse (%)
T-K	2,71±0,54	47,5	33,9	18,6	0,71±0,17	0,23±0,07	-
T-18	1,63±0,37	52,9	33,1	14,0	0,63±0,12	0,16±0,05	39,9
T-19	1,72±0,21	51,6	33,9	14,5	0,66±0,09	0,17±0,03	36,5
T-20	1,94±0,42	50,9	34,4	14,7	0,68±0,07	0,17±0,04	28,4

TABELLE 4-15. Photosyntheseaktivität und Transpiration von Source-Blättern MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen nach 14 Tagen, also drei Tage vor der Ernte für die Kohlenhydratanalyse (Ansatz 4). In Klammern sind jeweils die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze angegeben.

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		Transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
T-K	15,1±1,3		1,9±0,4	
T-18	13,4±1,3	(-11%)	1,6±0,3	(-13%)
T-19	13,7±0,8	(-9%)	1,7±0,2	(-10%)
T-20	13,6±1,1	(-10%)	1,7±0,3	(-8%)

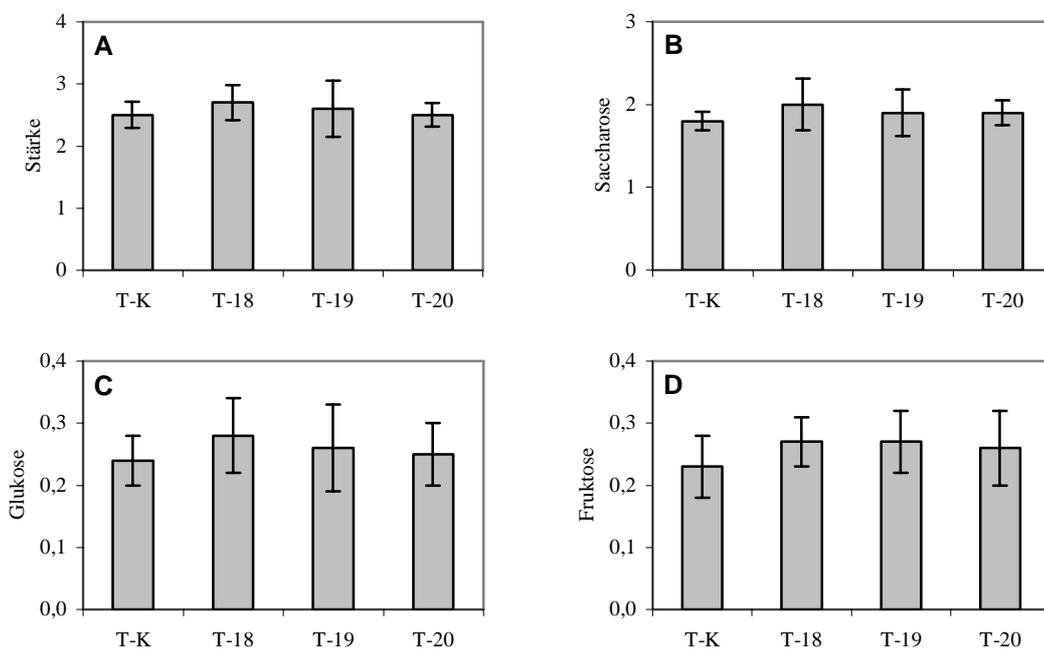


ABBILDUNG 4-16. Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern (Nr. 7–11) der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Ansatz 4). **A** Stärkegehalt (mg Glukose/g FG). **B–D** Gehalt von Saccharose, Glukose und Fruktose (mg/g FG). Die Blätter wurden geerntet, bevor die Knollenbildung begonnen hatte.

4.2.5 Ansatz 5 (Klimakammer): Einfluss der Lichtintensität auf den Kohlenhydratmetabolismus

4.2.5.1 Vorbemerkung

Die vorangegangenen Experimente wurden in unterschiedlichen Jahreszeiten im Gewächshaus durchgeführt. Trotz der zusätzlichen Beleuchtung mit Pflanzenlampen (vgl. Kapitel 3.2, S. 21) waren die Pflanzen wechselnden Lichtintensitäten ausgesetzt. Es ist denkbar, dass eine MP17N-induzierte Akkumulation von Kohlenhydraten nur dann auftritt, wenn die transgenen Pflanzen einer sehr hohen Lichtintensität ausgesetzt sind.

Um zu untersuchen, wie die MP17N-exprimierenden Pflanzen reagieren, wenn sie permanent einer geringen bzw. einer hohen Lichtintensität ausgesetzt werden, wurde ein weiteres Experiment in der Klimakammer durchgeführt (16 h hell/8 h dunkel). Drei Wochen alte Stecklinge wurden dazu in Erde in Töpfen mit 12 cm im Durchmesser kultiviert.

Die Pflanzen wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Die Pflanzen der ersten Gruppe (A) wurden zwei Wochen lang einer Lichtintensität von ca. $180 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ausgesetzt und die der zweiten Gruppe (B) einer Lichtintensität von $800 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Um untersuchen zu können, wie die MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen auf eine abrupte Veränderung der Lichtintensität reagieren, wurden die Pflanzen der dritten Gruppe (C) am Morgen des 14. Tages aus dem Bereich mit geringer Lichtintensität in den Bereich mit hoher Lichtintensität überführt; sie waren also nur ca. 6 Stunden lang der erhöhten Strahlung ausgesetzt.

4.2.5.2 Einfluss der unterschiedlichen Lichtintensitäten auf Wachstum und Kohlenhydratgehalt

Nach Ablauf der zwei Wochen hatten die Pflanzen der Gruppen A und C durch ausgeprägtes Streckungswachstum eine Höhe von ca. 35 bis 40 cm erreicht. Bei den Pflanzen der Gruppe B war das Streckungswachstum wegen der hohen Lichtintensität stark unterdrückt. Die Pflanzen waren maximal 15 cm groß und die Blattunterseiten aller Pflanzen, also einschließlich der Kontrollpflanzen, waren rot gefärbt, wofür vermutlich Anthocyanbildung verantwortlich war. Bei keiner der Behandlungen kam es jedoch zu einem so drastischen Anstieg von Kohlenhydraten in den Source-Blättern der transgenen Pflanzen, wie es im ersten Versuchsansatz der Fall war (vgl. ABBILDUNG 4-5, S. 42). Die Mengen an Stärke und löslichen Zuckern waren bei allen Pflanzen der Gruppe A in etwa gleich (TABELLE 4-16 A). Wurden die Pflanzen der höheren Lichtintensität ausgesetzt, stieg

in den Blättern aller untersuchten Pflanzen die Menge an Kohlenhydraten. Vor allem Stärke und Saccharose lagen in größeren Mengen vor (TABELLE 4-16 B). Bei den transgenen Linien kam es dann tendenziell zu einem höheren Gehalt an löslichen Zuckern als bei den Kontrollpflanzen.

Deutlichere Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze traten erst dann hervor, als die an die geringe Lichtintensität angepassten Pflanzen nur 6 Stunden lang der intensiveren Strahlung ausgesetzt wurden (TABELLE 4-16 C). Der Gehalt an löslichen Zuckern stieg gegenüber der Kontrollpflanze um 10 bis 15% an. Auch der Stärkegehalt war gegenüber der Kontrollpflanze erhöht, und zwar um 33% bzw. 35% bei den Linien T-19 und T-20 und sogar um 98% bei der Linie T-18.

TABELLE 4-16. Gehalt an Stärke und löslichen Zucker in Source-Blättern MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen, die unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt waren (Ansatz 5; 16 Stunden Tag/8 Stunden Nacht; LZ, Summe der löslichen Zucker).

Linie	Stärke	Saccharose	Glukose	Fruktose	LZ
A 14 Tage 180 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
T-K	11,4 \pm 2,4	2,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4	4,2 \pm 0,4
T-18	11,7 \pm 2,5	2,5 \pm 0,8	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	4,3 \pm 0,9
T-19	13,9 \pm 2,5	2,9 \pm 0,5	0,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3
T-20	11,2 \pm 5,6	2,9 \pm 0,7	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	4,5 \pm 0,7
B 14 Tage 800 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
T-K	18,4 \pm 3,4	4,1 \pm 0,7	0,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4	5,8 \pm 1,0
T-18	20,7 \pm 5,7	5,1 \pm 0,7	0,6 \pm 0,1	1,0 \pm 0,5	6,7 \pm 0,6
T-19	19,0 \pm 6,5	5,1 \pm 0,5	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	6,2 \pm 0,8
T-20	17,9 \pm 3,1	4,0 \pm 1,0	0,9 \pm 0,2	1,3 \pm 0,5	6,3 \pm 1,3
C 13 Tage 180, 6 h 800 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
T-K	10,2 \pm 2,8	3,2 \pm 0,7	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	5,1 \pm 0,7
T-18	20,2 \pm 4,3	3,9 \pm 1,1	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	5,6 \pm 1,0
T-19	13,5 \pm 3,5	4,2 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	5,9 \pm 0,4
T-20	13,7 \pm 4,3	4,0 \pm 0,8	0,9 \pm 0,4	1,0 \pm 0,4	5,9 \pm 0,9

4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Ansätzen 1 bis 5

In der TABELLE 4-17 sind die wichtigsten Ergebnisse aus den 5 Ansätzen zusammengefasst. Danach akkumulierten lediglich die transgenen Pflanzen, die direkt aus der Sterilkultur kamen, erhebliche Mengen an löslichen Zuckern und Stärke in ihren Source-Blättern. In allen folgenden Experimenten unterschieden sich die transgenen Pflanzen hinsichtlich des Kohlenhydratgehalts nicht von der Kontrollpflanze. Aber nur bei diesen Pflanzen war das Wurzel/Spross-Verhältnis zugunsten des Sprosses verschoben. Demgegenüber waren das Wachstum und die Photosyntheseaktivität der transgenen Pflanzen in allen Versuchsansätzen gegenüber der Kontrollpflanze reduziert.

Im fünften Ansatz erhöhte sich die Konzentration der löslichen Zucker und der Stärkegehalt leicht gegenüber der Kontrollpflanze, wenn die an geringe Lichtintensität adaptierte Pflanzen für sechs Stunden einer über vierfach erhöhten Lichtintensität ausgesetzt wurden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es generelle Effekte des MP17N gibt, nämlich Reduktion des Wachstums und der Photosynthese und Effekte, die vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängen, und zwar der Einfluss auf den Kohlenhydrathaushalt bzw. die Kohlenhydratpartitionierung.

TABELLE 4-17. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Ansätzen 1 bis 5.

BM, Biomasse; St, Stärkegehalt in Source-Blättern; LZ, Lösliche Zucker in Source-Blättern; PS, Photosynthese; W/S, Wurzel/Spross-Verhältnis. Die Pfeile geben die Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze wieder. ↑ = deutlicher Anstieg, ↗ = leichter Anstieg, → = unverändert, ↘ = leichter Rückgang, ↓ = deutlicher Rückgang. Besonders starke Veränderungen sind durch zwei Pfeile gekennzeichnet.

Linie	BM	St	LZ	PS	W/S
Ansatz 1 (Pflanzen aus Sterilkultur, Frühling)					
T-18	↓↓	↑↑	↑↑	↓	→
T-19	↓	↑↑	↑↑	↓	→
T-20	↘	↑↑	↑↑	↓	→
Ansatz 2 (Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Herbst, Knollenbildung)					
T-18	↓↓	→	→	↓	↓
T-19	↓	→	→	↓	↓
T-20	↘	→	→	↓	↓
Ansatz 3 (Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Herbst, keine Knollenbildung)					
T-18	↓	→	→	↓	↓
T-19	↓	→	→	↓	↓
T-20	↓	→	→	↓	↓
Ansatz 4 (Durch Stecklinge vermehrte Pflanzen, Frühling, keine Knollenbildung)					
T-18	↓	→	→	↓	↓
T-19	↓	→	→	↓	↓
T-20	↓	→	→	↓	↓
Ansatz 5					
geringe Lichtintensität					
T-18		→	→		
T-19		→	→		
T-20		→	→		
hohe Lichtintensität					
T-18		→	↗		
T-19		→	→		
T-20		→	→		
von geringer zu hoher Lichtintensität					
T-18		↑	↗		
T-19		↗	↗		
T-20		↗	↗		

4.3 Auswirkungen der Expression des MP17N auf die Ultrastruktur der Zellen

Um zu überprüfen, ob sich die Expression des MP17N auf die Ultrastruktur von Zellen auswirkt, wurden Proben von Source-Blättern der Kontrollpflanze und der transgenen Linie T-18 aus dem ersten Ansatz elektronenmikroskopisch untersucht (ABBILDUNG 4-17). Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob strukturelle Veränderungen von Plasmodemesmen bei den transgenen Pflanzen auftreten; denn bei jungen MP17N-transgenen Tabakpflanzen wurde elektronendichtes Material in den Plasmodemesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle gefunden (Herbers *et al.* 1997).

In den Plasmodemesmen zwischen Phloemparenchym- und Bündelscheidenzellen wurde ebenfalls häufig eine elektronendichte Substanz beobachtet. Diese trat aber sowohl bei der Kontrollpflanze als auch bei der Linie T-18 auf (ABBILDUNG 4-17 A, B) und steht daher nicht im Zusammenhang mit der Expression des MP17N. Wie auch von Herbers *et al.* (1997) beschrieben, wurden keine Unterschiede in der Struktur von Mesophyll-Plasmodemesmen festgestellt (ABBILDUNG 4-17 C, D). Bei der Linie T-18 traten jedoch im Vergleich zur Kontrollpflanze vermehrt Vesikel auf. Diese wurden sowohl in Mesophyllzellen als auch in anderen Zellen wie zum Beispiel der Geleitzelle gefunden und enthielten oft weitere Membranen (ABBILDUNG 4-17 D, E, F).

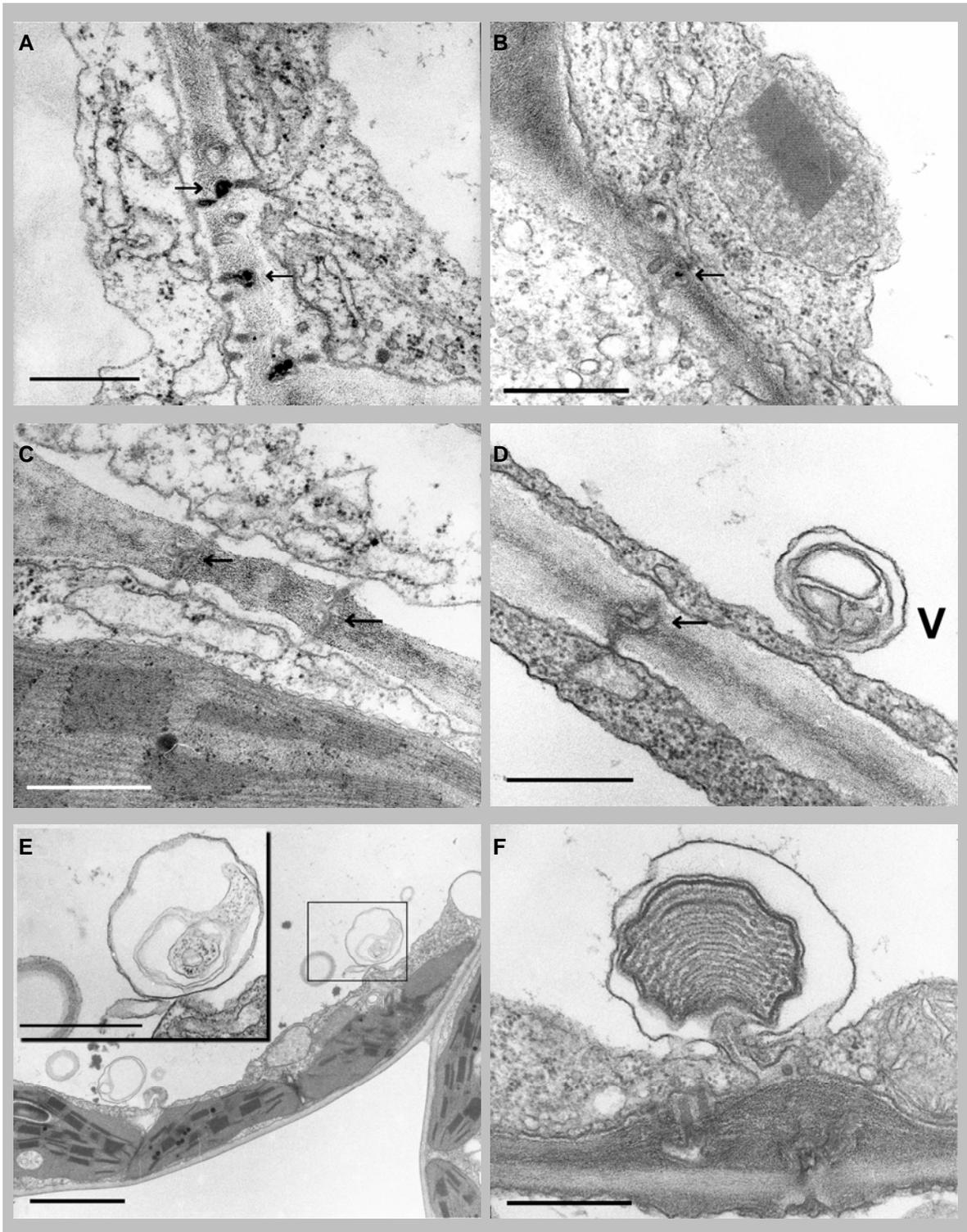


ABBILDUNG 4-17. Ultrastruktur von Zellen der MP17N-exprimierenden Linie T-18 und der Kontrollpflanze (Ansatz 1).

A, B Plasmodesmen zwischen Bündelscheidenzelle und Phloemparenchymzelle der Kontrollpflanze T-K (A) und der Linie T-18 (B). In den Plasmodesmen ist eine elektronendichte Substanz zu erkennen (Pfeile). Maßstab: 0,5 μ m.

C, D Plasmodesmen zwischen Mesophyllzellen. Die Plasmodesmen der Kontrollpflanze T-K (C) unterscheiden sich nicht von denen der Linie T-18 (D). In den Zellen der Linie T-18 wurden vermehrt Vesikel (V) beobachtet. Maßstab: 0,5 μ m

E Mehrere Vesikel in einer Mesophyllzelle der Linie T-18, zum Teil mit zusätzlichen Membranen. Der markierte Vesikel ist in der Inbox vergrößert dargestellt. Maßstab: 3 μ m; Inbox 1 μ m.

F Vesikel in einer Geleitzelle der Linie T-18 unmittelbar neben einem PPU. Maßstab: 0,5 μ m.

4.4 Auswirkungen der Expression des MP17N auf die Differenzierung des Xylems

Die Expression des MP17N verursachte bei den transgenen Linien eine zum Teil drastische Verringerung des Wachstums. Nach der Hypothese von Lucas & Wolf (1999) beeinträchtigen MPs den Verkehr von makromolekularen Signalmolekülen durch Plasmodesmen. Dies könnte sich bereits auf die Entwicklung von Meristemen auswirken. Vor allem bei der Linie T-18 fiel neben der geringen Wuchshöhe der relativ geringe Durchmesser der Sprossachse auf. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die terminalen als auch die axialen Meristeme in ihrer Entwicklung beeinträchtigt sind.

Deshalb wurde untersucht, ob die Expression des MP17N in den transgenen Linien die Entwicklung bzw. die Differenzierung von Geweben beeinflussen kann. Experimentell leicht zugänglich ist das Xylem der Sprossachse. Verschieden alte Sprossachsenabschnitte wurden mazeriert, um die Zusammensetzung des Xylems zu analysieren (ABBILDUNG 4-18). Außerdem wurden von den Gefäßen des unteren Sprossachsenabschnitts die Längen und Durchmesser ermittelt, um das Leitungsvolumen des Xylems ermitteln zu können.

Für dieses Experiment wurden Kartoffelpflanzen aus Knollen angezogen (ABBILDUNG 4-1, S. 37). Hierbei ist zu beachten, dass die Sprossachsen der transgenen Pflanzen, vor allem die der Linien T-18 und T-19, durch das MP17N-bedingte verringerte Wachstum und durch die daraus resultierenden kleineren Knollen dünner waren als die der Kontrollpflanze. Eventuelle Abweichungen in der Zusammensetzung des Xylems oder der Größe der Tracheen bei den transgenen Pflanzen könnten auf das reduzierte Wachstum zurückzuführen sein und genauso bei einer Kontrollpflanze auftreten, die sich aus einer sehr kleinen Knolle entwickelt hat. Aus diesem Grund wurden für die Mazeration zum einen dünne Sprossachsen der Linien T-18 und T-19 verwendet und zum anderen kräftige Sprossachsen der Linie T-20. Letztere hatten ungefähr den gleichen Durchmesser wie die der Kontrollpflanze. Dadurch ist es möglich festzustellen, ob Veränderungen im Xylem tatsächlich auf die Expression des MP17N zurückzuführen sind und nicht etwa auf unterschiedliches Wachstum, das durch verschieden große Knollen hervorgerufen wird.

Für eine statistische Analyse wurden die Xylemzellen gezählt und den Hauptkategorien Parenchymzellen, Fasern, Gefäßelemente, Tracheiden und Protoxylemgefäße zugeordnet (TABELLE 4-18). Auffälligstes Ergebnis dieser Untersuchung war die Erhöhung der Anzahl der Gefäßelemente, die sich bei den Linien T-18 und T-20 bereits im jungen Sprossabschnitt abzeichnete (TABELLE 4-18 A) und im mittleren Sprossachsenabschnitt

noch deutlicher hervortrat (TABELLE 4-18 B). Im unteren Sprossachsenabschnitt hatte sich die Anzahl der Gefäßelemente bei allen MP17N-exprimierenden Pflanzen etwa verdoppelt (TABELLE 4-18 C). Während die Gefäßelemente bei der Kontrollpflanze 5,7% des Xylems ausmachten, lagen die Anteile der transgenen Linien bei 11,0% (T-18), 9,6% (T-19) bzw. 11,6% (T-20). Daraus ergäbe sich etwa eine Verdoppelung der Wasserleitungskapazität des Xylems für den Fall, dass das Volumen der Gefäßelemente bei allen untersuchten Pflanzen gleich ist.

Um dies zu klären, wurden die Gefäßelemente aus dem unteren Sprossachsenabschnitt nach der Länge und dem Durchmesser in Gruppen aufgeteilt. In allen Pflanzen wurden Gefäßelemente verschiedener Größe gefunden, die im Mittel aber vergleichbare Dimensionen besaßen (ABBILDUNG 4-19). Bei den langen Gefäßelementen ($>400 \mu\text{m}$) gab es geringfügige, aber nicht signifikante Abweichungen zwischen den einzelnen Linien, die sich mit zum Teil sehr langen Protoxylemgefäßelementen erklären lassen, die bei dieser Untersuchung ebenfalls mit berücksichtigt wurden. Aus der ABBILDUNG 4-19 geht jedoch nicht hervor, wie sich die verschieden großen Gefäßelemente auf das Xylem verteilen. Daher wurden die Gefäßelemente nach dem Durchmesser sechs Größenklassen zugeordnet und als Häufigkeitsverteilung grafisch dargestellt (ABBILDUNG 4-20). Alle untersuchten Pflanzen wiesen in etwa die gleiche Verteilung auf. Lediglich die Linie T-19 besaß etwas mehr Gefäßelemente mit geringerem Durchmesser als die anderen Pflanzen. Bei der Linie T-20 und der Kontrollpflanze hatten einige Gefäßelemente einen größeren Durchmesser als bei den Linien T-18 und T-19. Dies betraf jedoch nur sehr wenige Elemente (vgl. ABBILDUNG 4-20).

Da der Anteil der Gefäßelemente im unteren Sprossachsenabschnitt bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen etwa doppelt so groß war wie bei der Kontrollpflanze (TABELLE 4-18 C), die Größen der einzelnen Gefäßelemente sich aber nur geringfügig unterschieden (ABBILDUNG 4-19, ABBILDUNG 4-20), lässt sich schließen, dass das Leitungsvolumen des sekundären Xylems bei den transgenen Linien größer war als bei der Kontrollpflanze.

Bestätigt wurde diese Annahme durch die Berechnung der Leitungsvolumina der Gefäßelemente (ABBILDUNG 4-21). Die durchschnittlichen Volumina der Gefäßelemente unterschieden sich nicht signifikant zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze. Bei letzterer betrug das durchschnittliche Volumen $1,41 \text{ mm}^3/1000$ Gefäßelemente. Das der Linien T-18 und T-19 war etwas geringer ($1,11$ bzw. $1,13 \text{ mm}^3/\text{Gefäßelemente}$) und jenes der Linien T-20 lag mit $1,75 \text{ mm}^3/1000$ Gefäßelemente sogar über dem Wert der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-21 A). Berücksichtigt man nun die Tatsache, dass der Anteil der Gefäßelemente am Xylem bei den transgenen Linien etwa doppelt so groß war (TA-

BELLE 4-18), ergibt sich gegenüber der Kontrollpflanze eine Zunahme der Wasserleitungs-kapazität des Xylems um 53% bei der Linie T-18, 39% bei der Linie T-19 und 155% bei der Linie T-20 (ABBILDUNG 4-21 B).

Interessanterweise war der Anteil der Gefäßelemente bei den MP17N-exprimierenden Linien aber nicht in allen Sprossabschnitten höher als bei der Kontrollpflanze. Im oberen Sprossachsenabschnitt gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen und der Kontrollpflanze (TABELLE 4-18 A) und im mittleren Abschnitt war der Anteil der Gefäßelemente bei den transgenen Pflanzen gegenüber der Kontrollpflanze zwar erhöht, aber nicht so stark wie im unteren Bereich der Sprossachse. Der Einfluss des MP17N auf die Xylemdifferenzierung scheint demnach auf das sekundäre Dickenwachstum beschränkt gewesen zu sein.

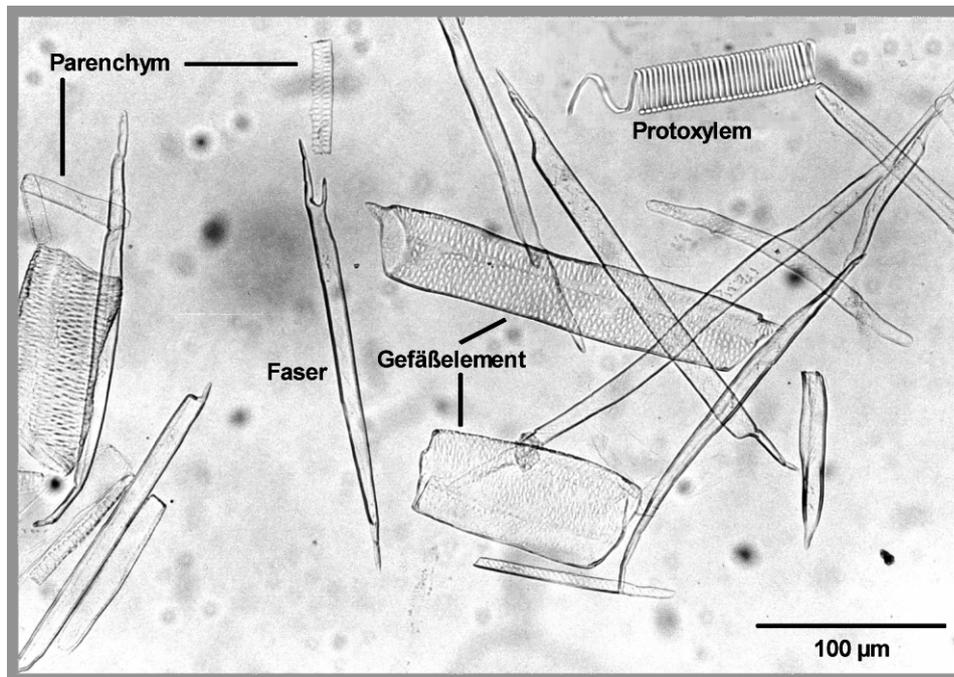


ABBILDUNG 4-18. Zelltypen im Xylem der Sprossachse von Kartoffelpflanzen, wie man sie nach der Mazeration des Gewebes erhält.

TABELLE 4-18. Zusammensetzung des Xylems verschieden alter Sprossachsenabschnitte. Die mazerierten Zellen wurden den fünf wichtigsten Kategorien zugeordnet (Angaben in Prozent; N, Anzahl gezählter Zellen).

Linie	Parenchym	Fasern	Gefäß- element	Tracheide	Protoxylem	N
A junger Sprossachsenabschnitt						
T-K	48,1±3,8	39,6±9,7	6,4±2,0	1,8±1,4	4,2±3,8	2579
T-18	42,9±0,7	43,6±4,6	8,1±0,7	2,2±0,8	3,2±2,4	1944
T-19	48,4±2,5	39,3±1,9	5,4±0,3	2,8±0,5	4,0±0,5	1378
T-20	43,9±6,5	41,3±3,4	8,7±3,5	1,1,±0,2	5,1±4,1	2398
B mittlerer Sprossachsenabschnitt						
T-K	56,2±2,8	33,2±0,6	8,3±2,4	1,6±0,7	0,8±0,2	3683
T-18	57,4±6,3	26,5±4,0	14,2±2,9	0,9±0,4	1,0±0,6	1883
T-19	54,7±3,1	31,9±2,7	9,9±1,8	1,5±0,8	0,8±0,3	1645
T-20	54,4±2,4	32,9±3,1	10,5±1,2	1,5±0,9	0,7±0,6	2337
C unterer Sprossachsenabschnitt						
T-K	43,2±2,3	48,9±2,5	5,7±0,8	1,6±0,2	0,6±0,4	5223
T-18	42,4±4,4	43,8±6,6	11,0±1,4	2,5±0,8	0,4±0,2	5404
T-19	35,2±3,7	52,4±2,7	9,6±0,8	1,8±0,7	0,9±0,5	3701
T-20	29,5±3,1	55,6±0,4	11,6±2,2	2,0±0,9	1,3±0,4	1845

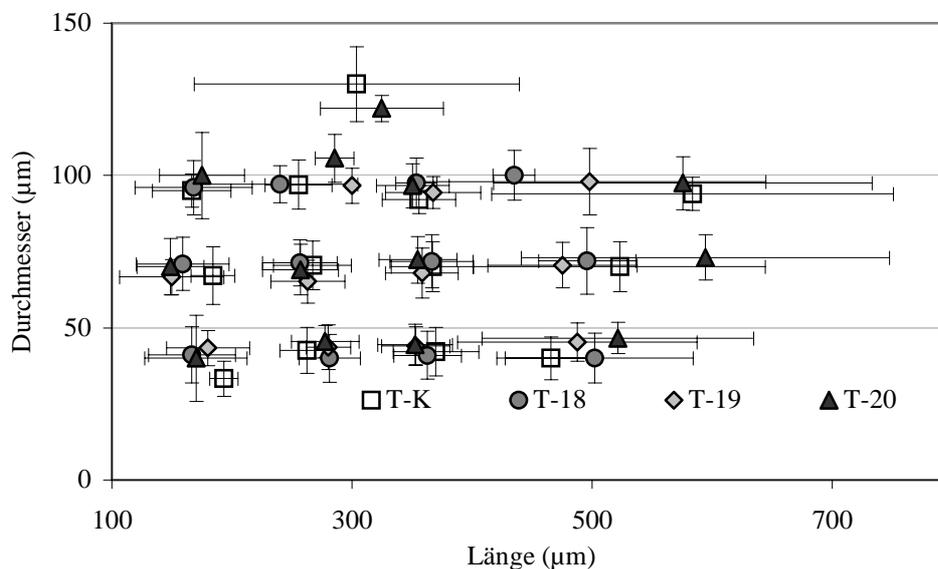


ABBILDUNG 4-19. Länge und Durchmesser der Gefäßelemente aus dem unteren Sprossachsenabschnitt von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen. Die Gefäßelemente wurden nach dem Durchmesser in vier Gruppen eingeteilt (30 bis 50 µm, 60-80 µm, 90-110 µm und über 120 µm) und diese in vier verschiedene Längengruppen (bis 200 µm, 210 bis 300 µm, 310 bis 400 µm, über 410 µm). Nur die Kontrollpflanze und die Linie T-20 besaßen Gefäßelemente mit einem Durchmesser über 120 µm. N = 123 (T-K), 133 (T-18), 162 (T-19) und 153 (T-20).

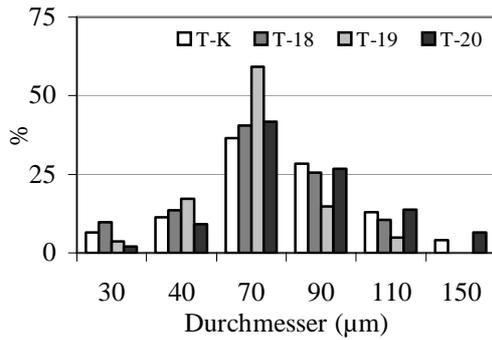


ABBILDUNG 4-20. Häufigkeitsverteilung von Gefäßelementen des unteren Sprossachsenabschnittes. Sie wurden nach dem Durchmesser in sechs Größenklassen eingeteilt.

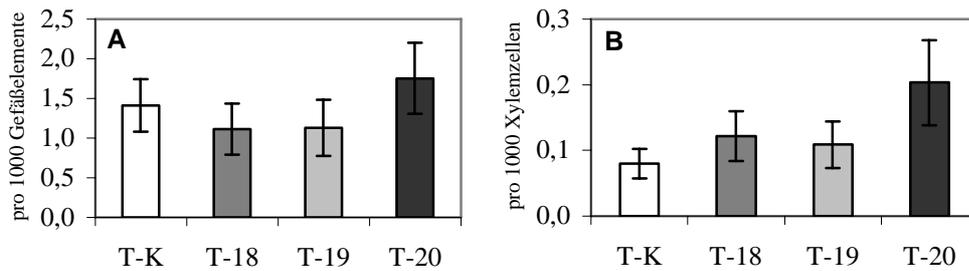


ABBILDUNG 4-21. Leitungsvolumen (mm³) der Gefäßelemente im Xylem von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen. **A** Durchschnittliches Volumen von 1000 Gefäßelemente. **B** Leitungsvolumen bezogen auf 1000 Xylemzellen, d.h. es wurde berücksichtigt, dass bei den transgenen Linien der prozentuale Anteil der Gefäßelemente am Xylem etwa verdoppelt war.

4.5 Einfluss des MP17N auf die Plasmodesmenfrequenz im Cambium der Sprossachse

Dieser Teil der Arbeit entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Youqun Wang von der Agricultural University, Peking, China.

Plasmodesmen spielen bei der Gewebsdifferenzierung eine wichtige Rolle (vgl. Kapitel 2.4, S. 10). Da sich das MP17N tatsächlich auf meristematische Entwicklungsprozesse auszuwirken scheint (vgl. Kapitel 4.6, S. 72), wurde untersucht, ob dies mit Veränderungen in der Plasmodesmenfrequenz in Cambiumzellen und deren Derivaten in Verbindung steht. Hierbei wurden lediglich die Linien T-18 und T-20 berücksichtigt, also eine Linie mit stark verringertem Wachstum und eine Linie, die sich phänotypisch nicht von der Kontrollpflanze unterschied.

Bei der Kontrollpflanze nahm die Plasmodesmenfrequenz in den tangentialen Längswänden der Cambiumderivate in beiden Richtungen zu, das heißt, im Laufe der Differenzierung von Xylem und Phloem wurden zusätzliche Plasmodesmen angelegt (ABBILDUNG 4-22). Dies deckt sich mit einer Studie an der Sprossachse der verwandten Art *Lycopersicon esculentum*; auch die absoluten Zahlen liegen in einem vergleichbaren Bereich (Ehlers, persönliche Kommunikation).

Sowohl bei der Linie T-18 als auch bei der Linie T-20 fiel auf, dass sie im Cambium eine höhere Plasmodesmenfrequenz (2,63 bzw. 2,43 PD/ μm^2 und 0,81 PD/ μm^2) aufwiesen als die Kontrollpflanze (0,40 bzw. 0,43 PD/ μm^2) (ABBILDUNG 4-22). Trotzdem unterschieden sich die Linien T-18 und T-20 erheblich, denn auf der Phloemseite entwickeln sich die Plasmodesmenfrequenzen gegensätzlich. Bei der Linie T-20 schien lediglich die Zahl der Plasmodesmen in den Wänden der Cambiumzellen und deren Derivaten gegenüber der Kontrollpflanze erhöht zu sein. Dies wird besonders anschaulich, wenn die PD-Frequenz der verschiedenen Zellen grafisch dargestellt wird (ABBILDUNG 4-23). Im Unterschied zur Kontrollpflanze und zur Linie T-20 nimmt die PD-Frequenz bei der Linie T-18 in den Cambiumderivaten auf der Phloemseite jedoch stetig ab.

	T-K	T-18	T-20
	1,70	0,30	5,56
X3	1,66	0,30	5,57
	1,21	3,07	4,12
X2	1,21	3,10	4,09
	0,86	2,49	3,76
X1	0,85	2,45	3,76
	0,50	2,82	3,11
Cam	0,48	2,84	3,13
	0,43	2,43	0,81
Cam	0,40	2,63	0,81
	0,52	1,19	1,45
P1	0,54	1,16	1,43
	1,48	0,61	2,00
P2	1,48	0,56	2,02
	1,37	0,17	2,67
P3	1,41	0,17	2,67
	1,70	0,15	3,99
	1,64 (N=665)	0,11 (N=915)	3,96 (N=2050)

ABBILDUNG 4-22. Plasmodesmenfrequenz in tangentialen Längswänden von Cambiumzellen und deren Derivaten von MP17N-exprimierenden Kartoffelpflanzen und der Kontrollpflanze (T-K). Cam, Cambiumzelle; P1, P2, P3, Cambiumderivate, die sich zu Phloemzellen entwickeln; X1, X2, X3, Cambiumderivate, die sich zu Xylemzellen entwickeln.

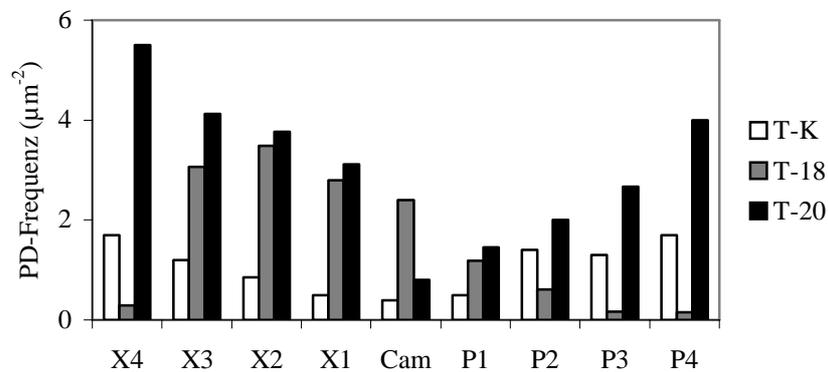


ABBILDUNG 4-23. Grafische Darstellung der Plasmodesmenfrequenz in tangentialen Längswänden der Cambiumzellen und deren Derivaten.

4.6 Mikroinjektionsexperimente

Da das PLRV natürlicherweise auf das Phloem beschränkt ist (vgl. Kapitel 2.2.2, S. 5), wurde vermutet, dass das MP17N den Transport viraler RNA durch die Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle, die PPU, ermöglicht. Da MPs allgemein den Durchmesser von Plasmodesmen erweitern (vgl. Kapitel 2.3, S. 7), lag es nahe zu überprüfen, ob dies auch für die PPU gilt. Deshalb sollten Mikroinjektionsexperimente mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlichen Molekulargewichts durchgeführt werden. Das SEL der PPU von *Vicia faba* ist bereits unter normalen physiologischen Bedingungen sehr groß; der molekulare Ausschlussdurchmesser beträgt wenigstens 10 kDa gegenüber ca. 1 kDa bei Mesophyll-Plasmodesmen (Kempers & van Bel 1997, Imlau *et al.* 1999). Die Mikroinjektionsexperimente sollten erstens klären, ob dies auch bei Kartoffelpflanzen der Fall ist und zweitens, ob sich bei den MP17N-transgenen Pflanzen eine Veränderung gegenüber der Kontrollpflanze ergibt.

Anders als Mesophyll- oder Epidermiszellen, die sich relativ gut für Mikroinjektionsexperimente eignen, reagieren Siebelemente bei Verletzung sofort mit einer Wundreaktion, in deren Folge die Siebplatten und die PPU verschlossen werden (Knoblauch & van Bel 1998). Intakte Zellen sind unter dem Lichtmikroskop jedoch nicht immer leicht von verletzten Zellen zu unterscheiden. Deshalb wurden die Mikroinjektionsexperimente unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Nachdem das Gewebe mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff RH-160 gefärbt wurde, sind intakte Zellen unschwer von zerstörten Zellen zu unterscheiden. Bei ersteren sind ausschließlich die Zellmembranen gefärbt, der Rest der Zellen erscheint schwarz (ABBILDUNG 4-24, ABBILDUNG 4-25 A).

Bei dem Versuch, Fluoreszenzfarbstoffe in Siebelemente zu injizieren, wurde die Wundreaktion ausgelöst, sobald die Injektionskapillare die Zellmembran durchstochen hat. Deutlich wurde dies zum einen dadurch, dass der zu injizierende Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow nicht in die benachbarten Zellen wanderte. Zum anderen aber auch durch sichtbar werdende fädige Strukturen innerhalb des Siebelements (ABBILDUNG 4-25 B). Dabei handelt es sich um filamentöse Phloemproteine, die für den Verschluss der Zellkontakte verantwortlich sind (Cronshaw & Sabnis 1990). ABBILDUNG 4-26 zeigt, wie sich diese Proteine auf die Stelle in der unmittelbaren Umgebung der Verletzung konzentrieren und sich außerdem bis zur Siebplatte fortsetzen. Der Versuch, den Fluoreszenzfarbstoff in die Geleitzelle zu injizieren führte zum gleichen Ergebnis.

Durch diese Wundreaktion war es nicht möglich, das SEL der PPU's zu bestimmen, da bereits Lucifer Yellow mit einer Molekülmasse von nur 521 Da nicht in die benachbarten Zellen wanderte, weder durch die PPU's noch durch die Siebplatten.

Dass das MP17 in der Lage ist, den Durchmesser von Mesophyll-Plasmodesmen zu erweitern, haben Hofius *et al.* (2001) demonstriert.

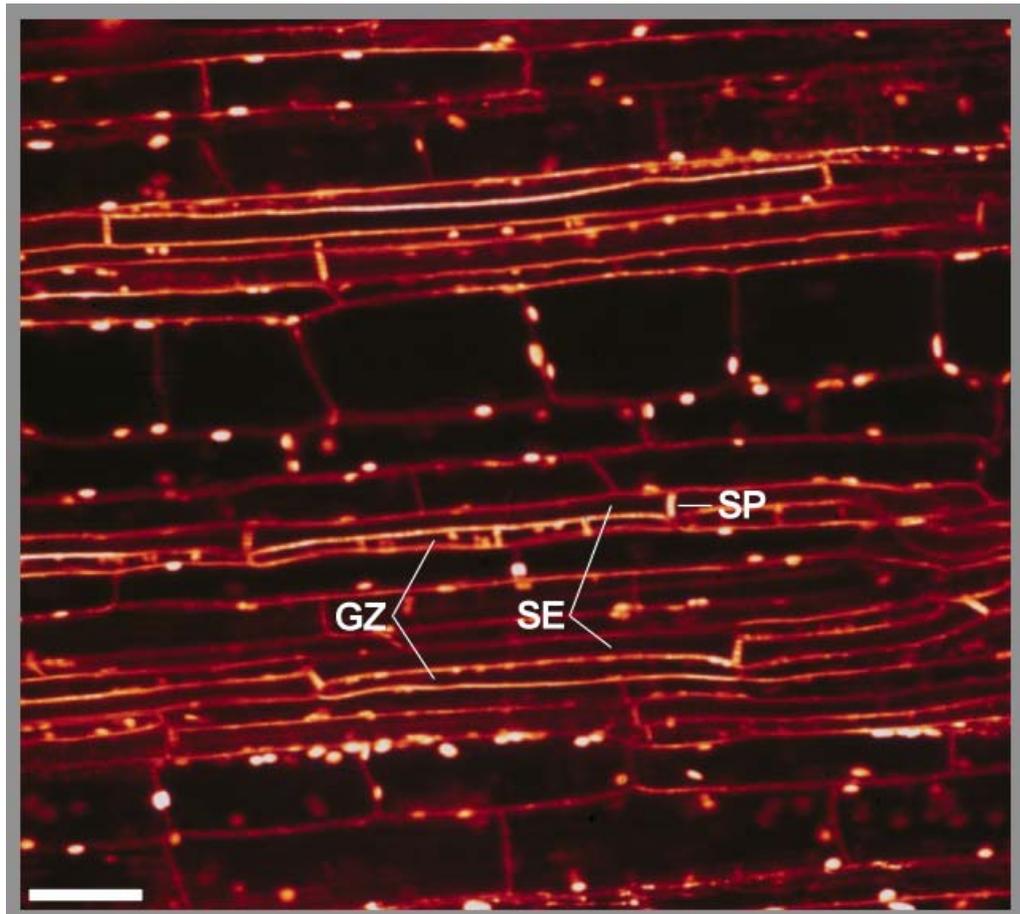
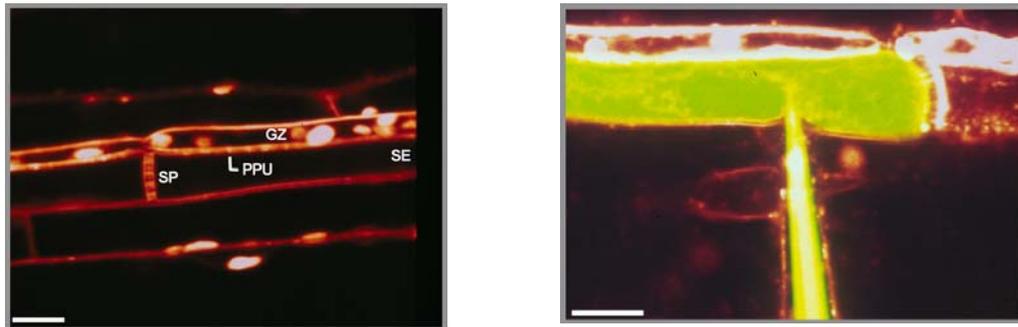


ABBILDUNG 4-24. CLSM-Aufnahme des Phloems der Mittelrippe eines Source-Blattes der Kartoffelpflanze. Sind die Zellen intakt, dann sind nur die gefärbten Membranen (Fluoreszenz-Farbstoff RH-160) und die autofluoreszierenden Chloroplasten zu erkennen (Maßstab 50 µm). GZ, Geleitzelle; SE, Siebelement; SP, Siebplatte.

ABBILDUNG 4-25. CLSM-Aufnahmen zweier intakter SE/GZ-Komplexe (A) und Mikroinjektion von Lucifer Yellow in ein Siebelement (B). **A** Zu erkennen sind die Siebplatte (SP) zwischen den Siebelementen und die PPU's zwischen Siebelement und Geleitzelle. **B** Die Verletzung des Siebelements mit der Mikroinjektionskapillare führt sofort zum Verschluss der Siebplatte und der PPU's; der Fluoreszenzfarbstoff bleibt in der Zelle (Maßstab 15 µm).



den Siebelementen und die PPU's zwischen Siebelement und Geleitzelle. **B** Die Verletzung des Siebelements mit der Mikroinjektionskapillare führt sofort zum Verschluss der Siebplatte und der PPU's; der Fluoreszenzfarbstoff bleibt in der Zelle (Maßstab 15 µm).

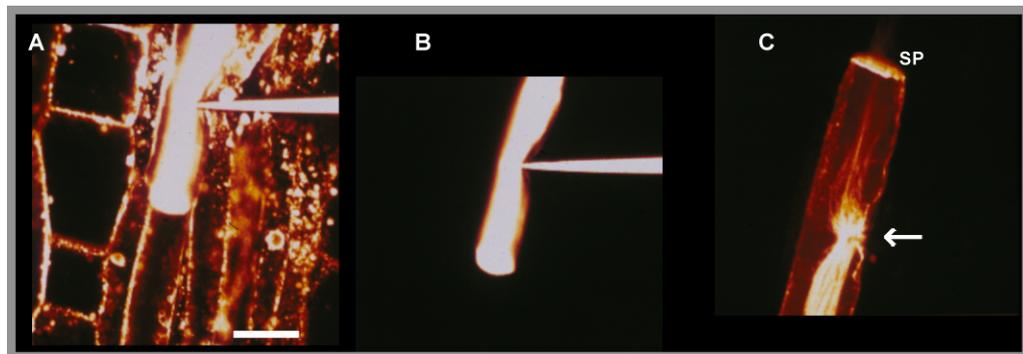


ABBILDUNG 4-26. Mikroinjektion von Lucifer Yellow in ein Siebelement. **A** Übersichtsaufnahme. **B** Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes (Kanal 1). Es wird deutlich, dass der Farbstoff ausschließlich im injizierten Siebelement bleibt. **C** Siebelement aus einem weiteren Injektionsversuch. An der Stelle, die durch die Mikroinjektionskapillare (Pfeil) verletzt wurde, ist die Folge der Wundreaktion zu erkennen. Filamentöse Phloemproteine führen zum Verschluss des Siebelements. Einzelne Fäden ziehen sich bis zur Siebplatte (SP). Hier sind sowohl der Fluoreszenzfarbstoff (Kanal 1) und die Zellen (Kanal 2) in gleicher Farbe dargestellt (Maßstab 15 µm).

4.7 Untersuchungen zur Salztoleranz

4.7.1 Auswahl der Pflanzen

Viele MP-transgene Pflanzen akkumulieren neben Stärke auch Saccharose, Glukose und Fruktose (Lucas *et al.* 1993a, Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001). Da Pflanzen bekanntermaßen mit der Akkumulation von so genannten kompatiblen Substanzen (z.B. lösliche Zucker, Aminosäuren) auf Wasserstress reagieren, führte dies zu der Annahme, dass MP-transgene Pflanzen tolerant gegen abiotischen Stress wie Trockenheit, Hitze oder Salz sein könnten. Weil zu Beginn der vorliegenden Arbeit auch bei den MP17N-exprimierenden Kartoffelpflanzen eine generelle Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern vermutet wurde, wurden diese auf eine mögliche Salztoleranz hin untersucht.

In einem Vorversuch wurden MP17N-exprimierende Kartoffelpflanzen (cv. Linda) untersucht. An diesen Pflanzen wurden keine ausführlichen physiologischen Messungen durchgeführt. Das Experiment diente lediglich dazu, Auswirkungen auf das Wachstum zu studieren und um festzustellen, ob die MP17N-transgenen Linien anders auf Salzstress reagieren als die Kontrollpflanze.

Die physiologischen Analysen zu einer möglichen Salztoleranz wurden dann in zwei Versuchsansätzen mit Tomensa-Pflanzen parallel zu den Ansätzen 1 und 2 (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) durchgeführt. Das heißt, die Source-Blätter der transgenen Pflanzen im ersten Ansatz akkumulierten unter Standardbedingungen (ohne NaCl) lösliche Zucker und Stärke (Kapitel 4.2.1, S. 38), während sie im zweiten Ansatz im Vergleich zu den Kontrollpflanzen weder mehr Stärke noch einen höheren Gehalt an löslichen Zuckern aufwiesen (Kapitel 4.2.2, S. 49). Die Pflanzen aus den Ansätzen 3 und 4 wurden hier nicht berücksichtigt, da sie lediglich für Kontrollexperimente bei den Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel benötigt wurden.

4.7.2 Vorversuch mit MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen der Sorte Linda

4.7.2.1 *Phänotypische Merkmale der MP17N-exprimierenden Linda-Pflanzen unter Standardbedingungen*

Drei Wochen alte Stecklinge von Linda-Pflanzen wurden in das Hydrokultursystem übertragen (Tag 1 des Experiments). Eine Woche später wurde bei der Hälfte der Pflanzen mit der langsamen Zufuhr der konzentrierten NaCl-Lösung (vgl. Kapitel 3.2.3, S. 21) begonnen, so dass nach zwei weiteren Tagen die NaCl-Konzentration in der Nährlösung

bei 100 mM lag. Nach sechs Wochen, also fünf Wochen nach Beginn der NaCl-Zufuhr, wurden die Pflanzen geerntet.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus einer Studie über die Auswirkungen des MP17N an transgenen Tabakpflanzen (Herbers *et al.* 1997) und mit den Ergebnissen an Tomensa-Pflanzen der vorliegenden Arbeit war das Wachstum der MP17N-exprimierenden Linda-Pflanzen unter Standardbedingungen stark gehemmt, wie aus dem geringeren Längenzuwachs ersichtlich wird (ABBILDUNG 4-27 A). Während das Frischgewicht der Kontrollpflanzen nach Abschluss des Experiments etwa 88 g betrug, lagen die entsprechenden Werte bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen bei 40 bzw. 32 g (ABBILDUNG 4-27 B).

4.7.2.2 *Auswirkungen von 100 mM NaCl auf MP17N-transgene Linda-Pflanzen*

Neben spezifischen Stoffwechselbelastungen verursacht NaCl im Boden eine Verminderung des Wasserpotenzials im Wurzelraum. Pflanzen reagieren auf vielfältige Weise auf diesen Wasserstress, wie zum Beispiel mit verlangsamtem Wachstum (Munns 1993, Zhu 2001). So reagierten auch die Pflanzen in diesem Experiment, und zwar sowohl die transgenen Linien als auch die Kontrollpflanzen. Unter salinen Bedingungen waren die Längenzuwächse deutlich geringer als unter Standardbedingungen (ABBILDUNG 4-27 A). Interessanterweise unterschieden sich die transgenen Pflanzen bezüglich des Wachstums kaum noch von der Kontrollpflanze. Nach der NaCl-Zugabe ins Nährmedium war der Längenzuwachs bei allen Pflanzen etwa gleich (ABBILDUNG 4-27 A). Das wirkt sich in der Folge auch auf die Gesamtbiomasse der Pflanzen aus. Unter Standardbedingungen war diese bei der Kontrollpflanze erheblich größer als bei den MP17N-exprimierenden Linda-Pflanzen (ABBILDUNG 4-27 B). Durch den Salzstress verringerte sich die Biomasseproduktion zwar bei allen Pflanzen, das Ausmaß dieser Reduktion war bei der Kontrollpflanze mit 75% aber besonders stark ausgeprägt. Bei der Linie L-7 betrug die Reduktion 53% und bei der Linie L-8 sogar nur 19%; dies hatte zur Folge, dass sich die Frischgewichte der transgenen Pflanzen kaum noch von dem Frischgewicht der Kontrollpflanze unterschieden (ABBILDUNG 4-27 B).

Eine bekannte Folge von Wassermangel ist die Bildung kleinerer Blätter, um durch die verringerte Blattoberfläche Wasserverlust durch Transpiration zu vermeiden (Koyro *et al.* 1999). Alle hier untersuchten Linien reagierten in dieser Weise auf Salzstress. Unter 100 mM NaCl entwickelten alle Pflanzen in etwa gleich große Blätter (ABBILDUNG 4-28). Das bedeutet, dass die prozentuale Verringerung der Blattflächen bei der Kontrollpflanze besonders stark war. Bezogen auf die Blattfläche war das Frischgewicht der Blätter, die sich

unter Salzstress entwickelten, jedoch größer als jenes der Blätter von Pflanzen aus der Kontrollgruppe (TABELLE 4-19). Unter Standardbedingungen betrug das Frischgewicht bei der Kontrollpflanze 15,7 g/cm² und stieg unter Salzstress auf 18,3 g/cm². Bei der Linie L-7 stieg es von 14,8 auf 17,9 g/cm² und bei der Linie L-8 von 15,8 auf 18,2 g/cm². Die MP17N-exprimierenden Pflanzen unterschieden sich diesbezüglich also nicht von der Kontrollpflanze.

Die transgenen Linien hielten dem Salzstress jedoch länger stand als die Kontrollpflanze. Vier Wochen nach dem Beginn der Salzbehandlung waren die unteren Blätter der Kontrollpflanzen bereits völlig verwelkt, während jene der Linien L-7 und L-8 noch immer intakt aussahen (ABBILDUNG 4-29).

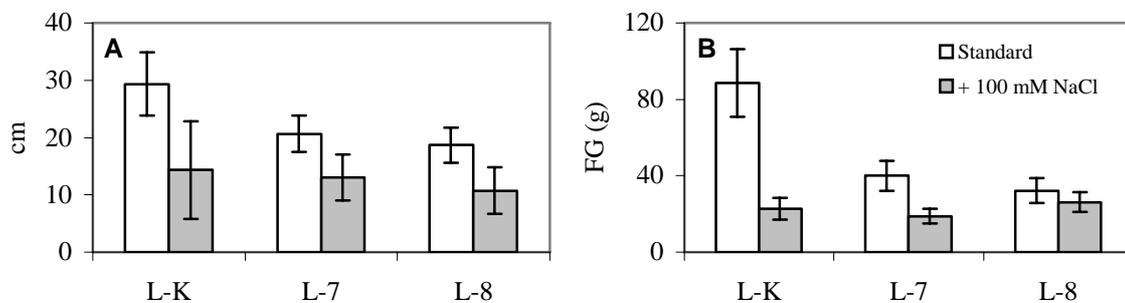


ABBILDUNG 4-27. Längenzuwächse und Biomassen der MP17N-exprimierenden Lindapflanzen und der Kontrollpflanzen, die unter Standardbedingungen und unter 100 mM NaCl kultiviert wurden. **A** Längenzuwächse innerhalb der letzten zwei Wochen des Experiments. **B** Biomasse. Das Experiment dauerte sechs Wochen.

TABELLE 4-19. Frischgewicht pro Blattfläche (g/cm²) der MP17N-exprimierenden Linda-Pflanzen und Kontrollpflanzen unter Standardbedingungen und unter Salzstress (100 mM NaCl).

Linie	Standardbedingungen	100 mM NaCl
L-K	15,7±1,1	18,3±1,6
L-7	14,8±1,1	17,9±1,5
L-8	15,8±1,1	18,2±1,1



ABBILDUNG 4-28. Einfluss von 100 mM NaCl auf die Größe von Source-Blättern bei MP17N-exprimierenden Linda-Pflanzen (L-7 und L-8) und Kontrollpflanzen (L-K). Die Blätter der NaCl-behandelten Pflanzen befinden sich jeweils rechts. Das Blatt der Kontrollpflanze (L-K, links) unter Standardbedingungen ist 30 cm lang.



ABBILDUNG 4-29. Untere Blätter von Pflanzen vier Wochen nach Beginn der Behandlung mit 100 mM NaCl. **A** Kontrollpflanze L-K. **B, C** Die transgenen Linien L-7 und L-8.

4.7.3 Untersuchungen zur Salztoleranz an Tomensa-Pflanzen (Ansatz 1 und Ansatz 2)

4.7.3.1 Auswirkungen von 100 mM NaCl auf den Phänotyp der Pflanzen

Alle Untersuchungen zum Einfluss des MP17N auf den Kohlenhydratmetabolismus und auf die Biomasseverteilung zwischen Spross und Wurzel wurden an transgenen Tomensa-Pflanzen durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2). Um diese Ergebnisse mit denen aus den Salzstress-Experimenten vergleichen zu können, wurde auf die Linda-Pflanzen verzichtet und stattdessen die MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen verwendet.

Die beiden Salzstress-Experimente wurden parallel zu den Ansätzen 1 und 2 aus dem ersten Teil der Arbeit durchgeführt, das heißt, im ersten Experiment wurden Pflanzen aus der Sterilkultur verwendet und im zweiten Pflanzen, die als Stecklinge von ausdifferenzierten Pflanzen vermehrt wurden. Mit der NaCl-Zufuhr wurde jeweils zwei Wochen nach dem Transfer der Pflanzen in das Hydrokultursystem begonnen.

Alle Tomensa-Pflanzen einschließlich der Kontrollpflanze reagierten in beiden Ansätzen in der gleichen Weise auf den Salzstress wie zuvor die Linda-Pflanzen, d.h. das Wachstum wurde stark eingeschränkt und die Blattflächen verringerten sich erheblich. Um zwischen Source-Blättern, die bei Beginn der Salzbehandlung bereits voll ausdifferenziert waren und solchen, die sich erst danach entwickelten, unterscheiden zu können, werden erstere im Folgenden *Kategorie I-Blätter* genannt, letztere *Kategorie II-Blätter*.

Die Kontrollpflanze und die transgenen Linien T-19 und T-20 aus dem ersten Ansatz hatten neun Tage nach Beginn der Salzbehandlung nekrotische Bereiche zwischen den Venen der Kategorie I-Blätter entwickelt, wobei diese Symptome bei der Kontrollpflanze am stärksten ausgeprägt waren. Sie kamen bei den Linien T-19 und T-20 mit einer kurzen Verzögerung von ein bis zwei Tagen zum Vorschein. Bei der Linie T-18 waren diese Symptome dagegen nicht zu sehen (ABBILDUNG 4-30); sie schien dem Salzstress tatsächlich länger standzuhalten.

Der zweite Ansatz bestätigte die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Experiment. Hier hoben sich die transgenen Linien bezüglich der Symptomausprägung sogar noch deutlicher von der Kontrollpflanze ab als im ersten Ansatz. Wieder fiel die Linie T-18 auf, bei der zwei Wochen nach Beginn der NaCl-Behandlung die Kategorie I-Blätter phänotypisch noch immer völlig intakt waren, während jene der Kontrollpflanze und die der Linien T-19 und T-20 bereits komplett verwelkt waren (ABBILDUNG 4-31).

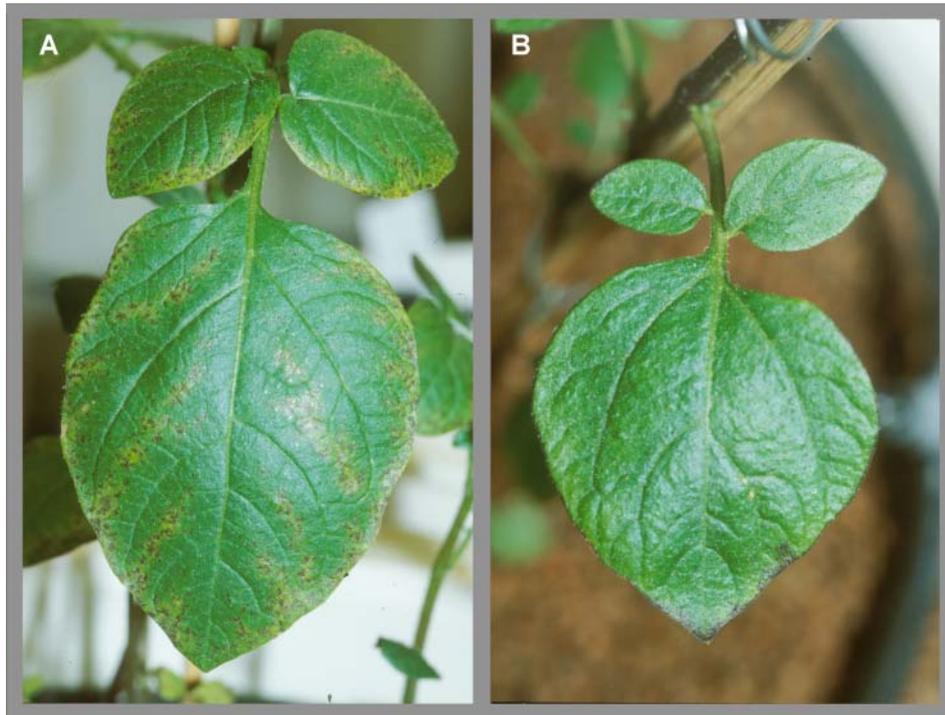


ABBILDUNG 4-30. Kategorie I-Blätter 9 Tage nach Zugabe von 100 mM NaCl ins Nährmedium (Ansatz 1). **A** Kontrollpflanze (T-K); **B** MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanze (T-18). Die Linien T-19 und T-20 entwickelten die gleichen Symptome wie die Kontrollpflanze, sie traten aber mit einer Verzögerung von ein bis zwei Tagen auf.



ABBILDUNG 4-31. Kategorie I-Blätter 14 Tage nach Zugabe von 100 mM NaCl ins Nährmedium (Ansatz 2). **A** Kontrollpflanze (T-K); **B** MP17N-exprimierende Tomensa-Pflanze (T-18). Das Blatt der transgenen Linie T-18 war noch intakt, während jenes der Kontrollpflanze aber auch jene der transgenen Linien T-19 und T-20 abgestorben waren.

Da die Pflanzen aus den Ansätzen 1 und 2 für weitere Analysen jeweils recht früh geerntet wurden (nach 30 bzw. 46 Tagen), war es nicht möglich zu beobachten, wie die Pflanzen reagieren, wenn diese dem Salzstress längere Zeit ausgesetzt sind. Deshalb wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Tomensa-Pflanzen über zwei Monate der hohen NaCl-Belastung ausgesetzt. Die transgenen Linien unterschieden sich dann nicht mehr von der Kontrollpflanze. Die unteren Blätter aller Pflanzen vergilbten und starben schließlich ab. Der einzige Unterschied zwischen den MP17N-exprimierenden Pflanzen und den Kontrollpflanzen war der, dass die Symptome bei den ersteren mit einer Verzögerung von 2 bis 5 Tagen auftraten.

4.7.3.2 *Auswirkungen von 100 mM NaCl auf die Ultrastruktur der Zellen*

Um mögliche Veränderungen in der Ultrastruktur der Zellen feststellen zu können, wurden Blattproben von Pflanzen aus dem ersten Ansatz elektronenmikroskopisch untersucht. Unter Standardbedingungen waren die Thylakoide von Chloroplasten der Mesophyllzellen völlig intakt, die Granastapel waren deutlich ausgeprägt (ABBILDUNG 4-32 A, B). Obwohl die Blattproben vormittags entnommen wurden, war außerdem zu erkennen, dass bei der transgenen Linie T-18 bereits mehr Stärke vorlag als bei der Kontrollpflanze (vgl. Kapitel 4.2.1). Der Salzstress verursachte eine drastische Veränderung der Chloroplastenstruktur. Durch die Behandlung mit 100 mM NaCl schollen die Thylakoidmembranen an (ABBILDUNG 4-32 C, D). In einigen Fällen wurden durch den Salzstress sogar die Granastapel zerstört. Eine weitere Folge des Salzstressses war die vermehrte Bildung von Vesikeln (ABBILDUNG 4-32 E, F). Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Studien über die Auswirkungen von Salzstress auf die Ultrastruktur von Zellen (Koyro 2002). Es wurden diesbezüglich jedoch keine Unterschiede zwischen den MP17N-transgenen Linien und der Kontrollpflanze gefunden.

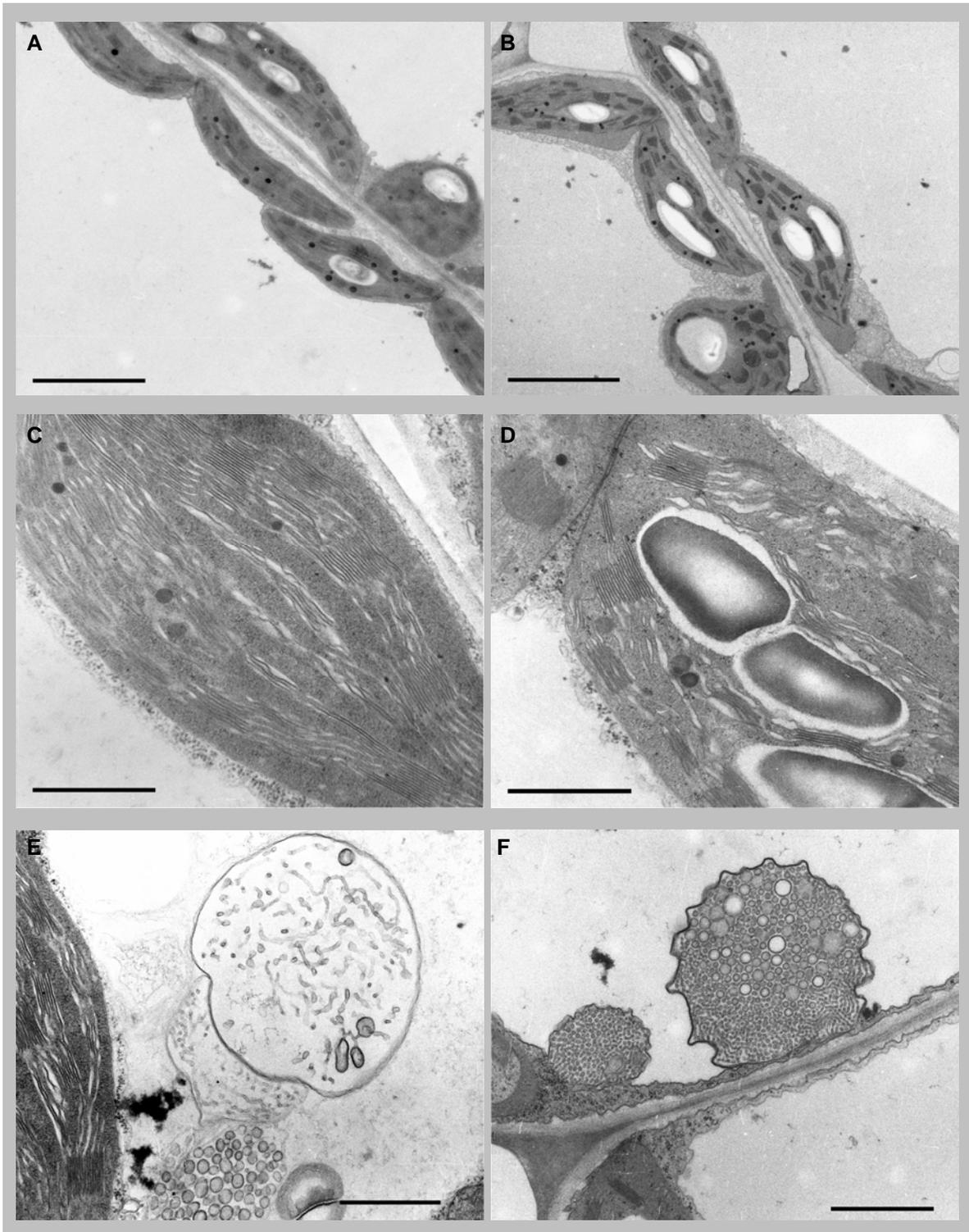


ABBILDUNG 4-32. Ultrastruktur von Zellen der MP17N-exprimierenden Linie T-18 und der Kontrollpflanze unter Standardbedingungen (A, B) und unter 100 mM NaCl (C-F) (Ansatz 1).

A, B Chloroplasten aus dem Palisadenparenchym der Kontrollpflanze (A) und der transgenen Linie T-18 (B) unter Standardbedingungen. Die Thylakoide sind intakt, die Granastapel sind gut zu erkennen. Maßstab: 5 μ m.

C, D Einfluss von 100 mM NaCl auf Chloroplasten des Palisadenparenchym der Kontrollpflanze (C) und der transgenen Linie T-18 (D). Durch den Salzstress wird die Struktur der Thylakoidmembransysteme zerstört. In einigen Fällen waren die Granastapel völlig verschwunden. Maßstab: 1 μ m

E, F Multivesikuläre Körper in Palisadenparenchymzellen. Solche oder auch einfache Vesikel traten sowohl in den Zellen der Kontrollpflanze (E) als auch in jenen der transgenen Linie T-18 (F) auf, d.h. bezüglich der Vesikelbildung unter Salzstress gab es zwischen der Kontrollpflanze und der Linie T-18 keine Unterschiede.

4.7.3.3

Biomasseproduktion der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen unter 100 mM NaCl

Am Ende des ersten Experiments (Ansatz 1) hatte sich die Biomasse der Kontrollpflanze durch den Salzstress um 77,7% reduziert (TABELLE 4-20). Bei den transgenen Linien lagen die entsprechenden Werte bei 53,3% (T-18), 72,9% (T-19) und 63,0% (T-20). Die geringe prozentuale Verringerung bei der Linie T-20 führte dazu, dass die Biomasse dieser Linie am Ende des Salzstress-Experiments sogar größer war als die der Kontrollpflanze. Die Biomasse der Linie T-19 entsprach in etwa der Kontrollpflanze, während die Linie T-18 auch unter Salzstress am wenigsten Biomasse produzierte (TABELLE 4-20).

Ähnlich verhielt es sich auch im zweiten Ansatz. Bei den transgenen Linien verringerte sich die Gesamtbiomasse um 52,5% (T-18), 34,9% (T-19) und 46,9% (T-20); bei der Kontrollpflanze war die Reduktion mit 60,6% am größten. Das führte in diesem Fall dazu, dass am Ende des Experiments mit Ausnahme der Linie T-18 alle Pflanzen in etwa die gleiche Biomasse aufwiesen.

Bei den transgenen Linien fiel auf, dass die Biomassereduktionen in den beiden Ansätzen nicht einheitlich waren. Im ersten Experiment verringerte sich die Biomasse bei der Linie T-19 um 72,9%, während sie sich im zweiten Ansatz nur um 34,9% verringerte; bei der Linie T-20 liegen diese Werte bei 63,0% im ersten und 46,9% im folgenden Experiment. Lediglich bei der Linie T-18 unterschieden sich die Werte aus den beiden Experimenten kaum (53,3% bzw. 52,5%).

Unter Standardbedingungen verursachte die Expression des MP17N in den transgenen Pflanzen im ersten Ansatz keine Verschiebung der Biomasse zugunsten des Sprosses; im zweiten Ansatz (und in den Ansätzen 3 und 4) wurde dagegen eine signifikante Verringerung des Wurzel/Spross-Verhältnisses beobachtet (vgl. Kapitel 4.2). Bei den beiden parallel durchgeführten Salzstress-Experimenten verhielt es sich genauso (TABELLE 4-20). Dennoch unterschieden sich die beiden Salzstress-Experimente bezüglich der Biomasseverteilung zwischen Spross und Wurzel von den Experimenten unter Standardbedingungen. Im ersten Ansatz verringerte sich bei den untersuchten Pflanzen einschließlich der Kontrollpflanze das Wurzel/Spross-Verhältnis durch die NaCl-Behandlung nicht (TABELLE 4-20). Beim zweiten Ansatz kam es durch die NaCl-Behandlung dagegen bei allen Pflanzen (einschließlich der Kontrolle) zu einer relativ starken Verringerung des Wurzel/Spross-Verhältnisses, wobei die transgenen Linien aber weiterhin ein geringeres Wurzel/Spross-Verhältnis hatten als die Kontrollpflanze. Der Grund dafür, dass das Wurzel/Spross-Verhältnis im zweiten Ansatz bei allen Pflanzen reduziert wurde und im

ersten nahezu unverändert blieb, waren vermutlich die unterschiedlich langen Zeitspannen der NaCl-Applikation. Im ersten Ansatz wurden die Pflanzen nur 16 Tage lang dem Salzstress ausgesetzt, im zweiten dagegen 32 Tage.

TABELLE 4-20. Wachstumsanalysen der MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze unter 100 mM NaCl (rechte Seite, grau unterlegt). Die Pflanzen im Ansatz 1 wurden 30 Tage nach dem Transfer der Stecklinge in das Hydrokultursystem geerntet, jene im Ansatz 2 46 Tage nach dem Transfer. Die Pflanzen waren 16 Tage (Ansatz 1) bzw. 32 Tage (Ansatz 2) dem Salzstress ausgesetzt. Um die Daten besser vergleichen zu können, sind in den ersten drei Ergebnisspalten die Resultate aus den jeweiligen Experimenten unter Standardbedingungen angegeben. Red, Reduktion ; TG, Trockengewicht; W/S-Verh., Wurzel/Spross-Verhältnis.

	TG (g)	Red. d. MP17N (%)	W/S-Verh.	TG (g)	Red. d. Salzstress (%)	Spross (%)	Wurzel (%)	W/S-Verh.
	Standardbedingungen			+100 mM NaCl				
Ansatz 1 (Pflanzen aus Sterilkultur, Frühling, vgl. Kapitel 4.2.1, S. 38)								
T-K	10,2±2,8	–	0,21±0,02	2,3±0,7	–77,7	81,3	18,7	0,22±0,06
T-18	3,2±0,4	–69,6	0,22±0,01	1,5±0,3	–53,3	81,4	18,6	0,23±0,05
T-19	8,3±0,2	–24,8	0,19±0,01	2,0±0,1	–72,9	80,5	19,5	0,24±0,05
T-20	9,3±3,3	–11,5	0,20±0,06	3,5±0,8	–63,0	80,0	20,0	0,23±0,03
Ansatz 2 (Pflanzen als Stecklinge vermehrt, Herbst, vgl. Kapitel 4.2.2, S. 49)								
T-K	30,5±12,0	–	0,25±0,03	12,0±4,0	–60,6	87,5	12,5	0,15±0,02
T-18	15,8±5,1	–48,4	0,17±0,03	7,5±1,9	–52,5	92,0	8,0	0,09±0,04
T-19	19,2±1,3	–37,2	0,18±0,04	12,5±3,3	–34,9	91,2	8,8	0,10±0,01
T-20	24,3±7,9	–20,6	0,15±0,04	12,9±3,3	–46,9	87,6	12,4	0,13±0,03

4.7.3.4 Photosynthese und Kohlenhydratgehalt in Source-Blättern der MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen

Im ersten Ansatz wurden an zwei Tagen die Gaswechselfmessungen an Source-Blättern durchgeführt, die sich unter Salzstress entwickelt hatten (Kategorie II-Blätter). Die erste Messung erfolgte bereits 3 Tage nach Beginn der NaCl-Behandlung. Die Photosyntheseaktivität der transgenen Linien war etwas geringer als die der Kontrollpflanze (TABELLE 4-21 A). Bei der zweiten Messung nach zwei Wochen war die Photosyntheserate der Kontrollpflanze noch immer höher als bei den transgenen Linien, die Unterschiede waren jedoch deutlich geringer (TABELLE 4-21 C).

Die Photosyntheseaktivitäten der Kategorie I-Blätter, die bereits vor dem Beginn der NaCl-Behandlung ausdifferenziert waren, wurden zwei Wochen nach Beginn der NaCl-Applikation gemessen. Die Linien T-19 und T-20 unterschieden sich in ihrer Photosyntheseaktivität nicht von der Kontrollpflanze. Abweichend davon hatten die entsprech-

enden Blätter der Linie T-18 eine ca. 40% höhere Photosyntheseaktivität (TABELLE 4-21 C), was die phänotypischen Beobachtungen widerspiegelt, nämlich dass diese Blätter bei der Linie T-18 offensichtlich länger dem Salzstress stand hielten als die der anderen transgenen Linien und der Kontrollpflanze (vgl. ABBILDUNG 4-31, S. 81).

Im zweiten Ansatz wurde der zeitliche Verlauf der Photosyntheseleistung und der Transpiration von Kategorie II-Blättern nach Applikation des Salzes gemessen. Zu Beginn, also noch unter Standardbedingungen, unterschieden sich die Photosyntheseraten zwischen der Kontrollpflanze und den transgenen Linien etwa in dem Maße, wie es auch bei den Untersuchungen unter Standardbedingungen (Kapitel 4.2) der Fall war, d.h. die Photosyntheserate der transgenen Linien war etwas niedriger als bei der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-33 A). In den folgenden Tagen stieg die Photosyntheseleistung bei allen Pflanzen leicht an. Danach hielt sie sich bei den Linien T-19, T-20 und T-K bei etwa 13 bis 16 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, während sie bei der Linie T-18 stetig abnahm. Der Verlauf der Transpirationsrate der Linie T-18 entsprach dem der Photosyntheserate (ABBILDUNG 4-33 C). Die Kategorie II-Blätter der Linie T-18 verringerten also offensichtlich durch das Schließen der Stomata die Transpiration, was ein Absenken der Photosyntheserate zur Folge hatte. Bei den anderen Pflanzen nahm die Transpirationsrate erst etwa eine Woche später ab.

Bei den Kategorie I-Blättern, die bei NaCl-Zugabe bereits ausdifferenziert waren, zeigte sich ein anderes Bild (ABBILDUNG 4-33 B, D). Drei Tage nach Beginn der Salzbehandlung lag die Photosyntheserate dieser Blätter bei etwa 7 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Etwas über eine Woche später nahm die Photosyntheserate der Kontrollpflanzen um ca. 13% ab (ABBILDUNG 4-33 B). Im weiteren Verlauf sank die Photosyntheseleistung weiter von 6,1 über 4,2 auf 1,5 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Bei den entsprechenden Blättern der transgenen Linien reduzierte sich die Photosyntheseleistung in der gleichen Weise, allerdings mit einer Verzögerung von 2 bis 5 Tagen. Auch bei diesen Blättern korrelierte die Photosynthese mit der Transpiration (ABBILDUNG 4-33 B, D).

Diese Ergebnisse spiegeln zum Teil die phänotypischen Beobachtungen wider. Die Blätter, die sich erst nach der NaCl-Applikation entwickelten, konnten sich bei der Kontrollpflanze und bei den Linien T-19 und T-20 an die hohe Salzkonzentration im Nährmedium anpassen, während die bereits ausdifferenzierten, unteren Blätter nekrotisch wurden und schließlich abstarben. Die Blätter dieser Linien sind nicht resistent gegen Salzstress, sie tolerieren ihn allenfalls ein paar Tage länger. Eine Ausnahme bildet die Linie T-18. Hier bleiben die Kategorie I-Blätter zwar am längsten intakt; die Photosyntheseleistung

der Kategorie II-Blätter verringerte sich aber im weiteren Verlauf des Experiments deutlich gegenüber den anderen Pflanzen (ABBILDUNG 4-33 A).

TABELLE 4-21. Photosyntheseraten und Transpiration von MP17N-exprimierenden Pflanzen und Kontrollpflanzen, die 100 mM NaCl ausgesetzt waren (Ansatz 1). Kategorie II-Blätter wurden nach 16 Tagen (A) und nach 21 Tagen (B) gemessen, Kategorie I-Blätter nach 21 Tagen (C).

Linie	Photosynthese ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
A Kategorie II-Blätter nach 3 Tagen		
T-K	15,9±1,2	2,7±0,6
T-18	14,7±0,6	2,9±0,9
T-19	12,9±2,8	1,8±0,5
T-20	13,6±2,8	1,4±0,4
B Kategorie II-Blätter nach 2 Wochen		
T-K	12,6±0,7	2,3±0,3
T-18	10,4±0,6	2,0±0,5
T-19	10,1±0,9	1,9±0,4
T-20	11,9±1,0	2,1±0,7
C Kategorie I-Blätter nach 2 Wochen		
T-K	3,2±1,2	1,1±0,2
T-18	4,5±1,4	0,9±0,3
T-19	3,2±0,0	0,9±0,1
T-20	3,5±0,0	0,5±0,0

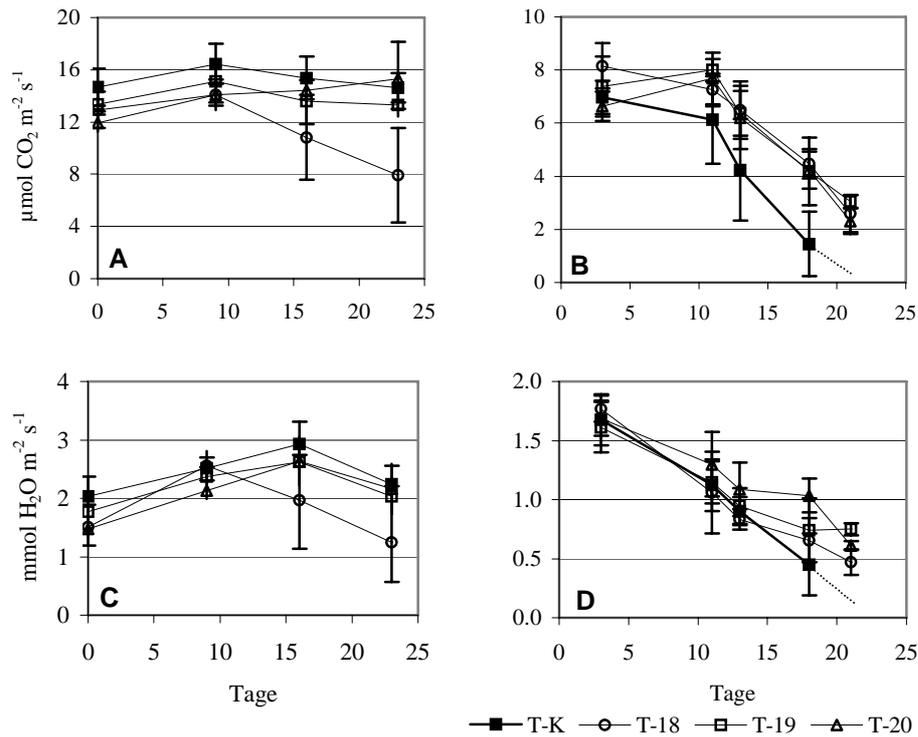


ABBILDUNG 4-33. Zeitlicher Verlauf der Photosynthese- (A, B) und Transpirationsraten (C, D) von MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen (Ansatz 2). **A** und **C** Kategorie II-Blätter. **B** und **D** Kategorie I-Blättern.

Bei den Untersuchungen zum Kohlenhydrathaushalt der MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen unter Standardbedingungen (Kapitel 4.2) bestand der wesentliche Unterschied zwischen dem ersten und dem zweiten Ansatz darin, dass ausschließlich im ersten eine sehr deutliche Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern auftrat. Ähnlich verhielt es sich, als die entsprechenden Pflanzen Salzstress ausgesetzt waren. Im ersten Ansatz unter salinen Bedingungen akkumulierten die transgenen Linien im Vergleich zur Kontrollpflanze sowohl Stärke als auch die löslichen Zucker Saccharose, Glukose und Fruktose in ihre Source-Blättern (Kategorie II), wobei die Linie T-18 in allen Fällen die größten Mengen aufwies (ABBILDUNG 4-34, A-D).

Interessanterweise war im zweiten NaCl-Versuch (Ansatz 2) die Linie T-18 die einzige transgene Pflanze, die einen höheren Kohlenhydratgehalt in den Source-Blättern (Kategorie II) aufwies als die Kontrollpflanze. Die beiden anderen MP17N-transgenen Linien unterschieden sich nur geringfügig von der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-34 E-H).

Um die Auswirkungen von Salzstress auf den Kohlenhydratgehalt besser vergleichen zu können, wurden in der TABELLE 4-22 die NaCl-bedingten Veränderungen im Gehalt der

Stärke und der löslichen Zucker gegenüber den entsprechenden Werten aus den Experimenten unter Standardbedingungen zusammengefasst. Daraus wird ersichtlich, dass im ersten Ansatz der Stärkegehalt in allen Fällen deutlich abnahm. Zwar akkumulierten alle Pflanzen mehr Saccharose als unter Standardbedingungen. Dieser Anstieg fiel bei den transgenen Linien jedoch relativ gering aus, was dadurch erklärt werden kann, dass sie bereits unter Standardbedingungen große Mengen an Saccharose (und Hexosen sowie Stärke) akkumulierten (vgl. ABBILDUNG 4-5, S. 42). Aus dem gleichen Grund kam es bei den transgenen Linien zu keiner ausgeprägten Steigerung des Gehaltes an Glukose und Fruktose, während diese Zucker bei der Kontrollpflanze um 115,2% (Glu) bzw. 101,9% (Fru) anstiegen.

Deutlich anders waren die NaCl-bedingten Veränderungen im zweiten Ansatz (TABELLE 4-22). Alle Pflanzen reagierten mit der Akkumulation vor allem von Saccharose auf den Salzstress. Der Anstieg des Glukosegehaltes war weniger stark ausgeprägt und der Fruktosegehalt ging bei der Kontrollpflanze und den beiden Linien T-19 und T-20 sogar leicht zurück. Auch hier wich die Linie T-18 deutlich von den anderen Pflanzen ab. Sowohl der Stärkegehalt als auch die Menge der löslichen Zucker Saccharose, Glukose und Fruktose waren bei ihr gegenüber den entsprechenden Werten aus dem Experiment unter Standardbedingungen stark angestiegen. Es fiel weiterhin auf, dass die Kontrollpflanze nach der NaCl-Behandlung weniger Stärke (-18,8%) in ihren Blätter aufwies als die transgenen Linien. Bei diesen war der Stärkegehalt angestiegen, und zwar um 3,4% (T-20), 16,7% (T-19) bzw. 55% (T-18).

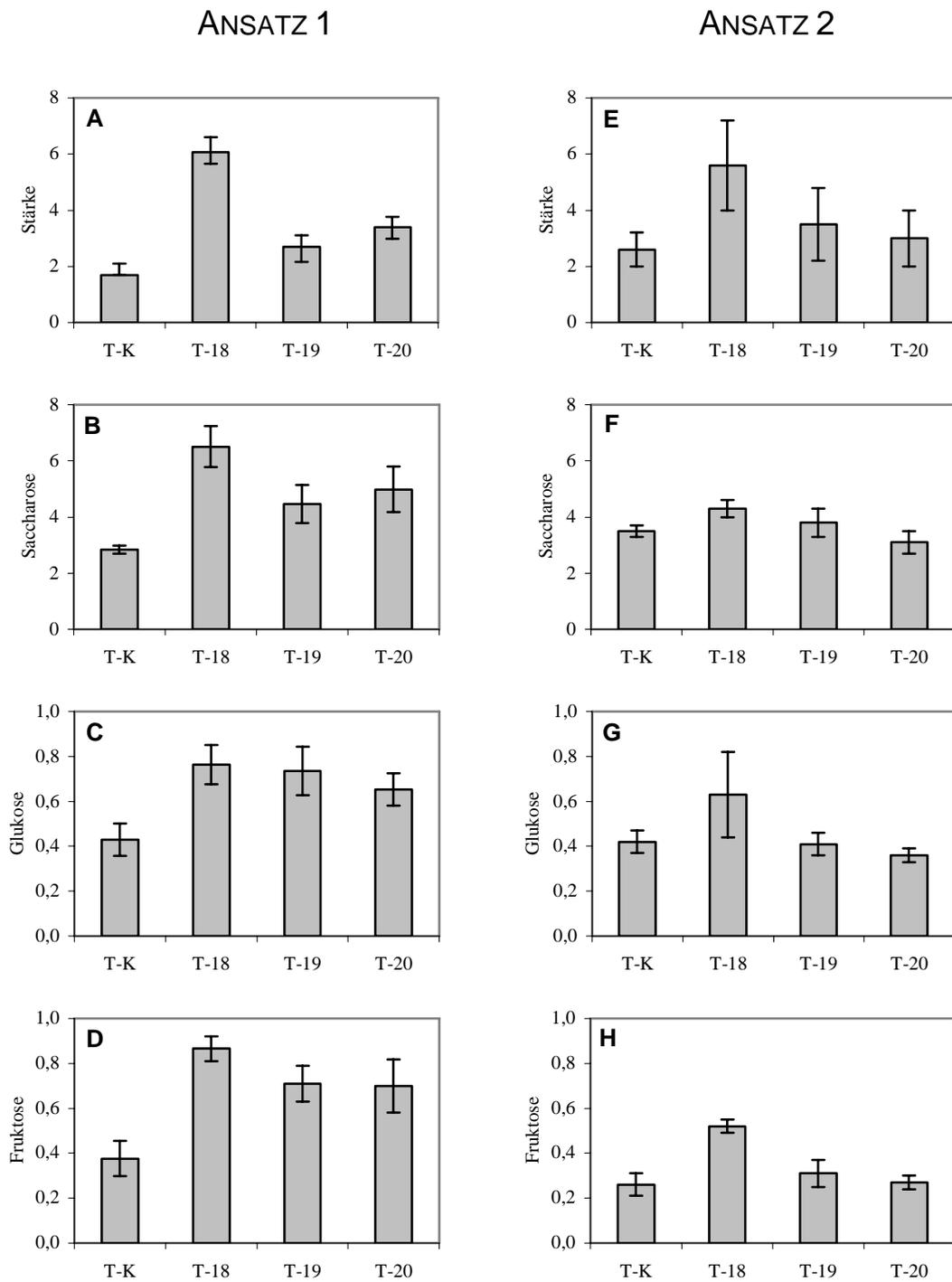


ABBILDUNG 4-34. Stärkegehalt (mg Glukose/ g FG) und Saccharose-, Glukose- und Fruktosegehalt (mg/g FG) in Kategorie II-Blättern von MP17N-exprimierenden Tomensapflanzen, die 100 mM NaCl ausgesetzt wurden. Auf der linken Seite (A, B, C, D) sind die Ergebnisse aus dem ersten Ansatz dargestellt, auf der rechten (E, F, G, H) die des zweiten Ansatzes.

TABELLE 4-22. Durch 100 mM NaCl verursachte Veränderungen im Gehalt an Stärke, Saccharose (Sac), Glukose (Glu) und Fruktose (Fru) in Kategorie II-Blättern MP17N-exprimierender Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen. LZ, Gesamtheit der löslichen Zucker (Angaben in %).

	Stärke	Sac	Glu	Fru	LZ
Ansatz 1 (Pflanzen aus Sterilkultur, Frühling, vgl. Kapitel 4.2.1, S. 38)					
T-K	-62,4	+58,7	+115,2	+101,9	+67,6
T-18	-66,8	+45,4	+12,6	-12,5	+32,5
T-19	-82,7	+11,3	-7,3	-53,4	-6,6
T-20	-76,9	+42,6	+2,4	-37,3	+20,7
Ansatz 2 (Pflanzen als Stecklinge vermehrt, Herbst, vgl. Kapitel 4.2.2, S. 49)					
T-K	-18,8	+105,9	+27,3	-29,7	+74,2
T-18	+55,6	+138,9	+90,9	+40,5	+118,0
T-19	+16,7	+123,5	+17,1	-18,4	+86,0
T-20	+3,4	+106,7	+20,0	-12,9	+76,8

4.7.3.5 Auswirkungen des MP17N auf die Aminosäurezusammensetzung

Es ist bekannt, dass Pflanzen auf Salzstress mit einer gesteigerten Produktion von so genannten kompatiblen Substanzen reagieren (Hasegawa *et al.* 2000). Kartoffelpflanzen akkumulieren unter salinen Bedingungen beispielsweise Prolin (Martinez *et al.* 1996, Heuer & Nadler 1998). Deshalb wurden die Aminosäuren in den Kategorie II-Blättern der Pflanzen untersucht. Wie bei den Untersuchungen zum Kohlenhydratmetabolismus, unterschieden sich die Ergebnisse aus den zwei Ansätzen. Bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen aus dem ersten Ansatz war die Summe der Aminosäuren unter Standardbedingungen nur bei der Linie T-18 größer als bei der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-35 A). Bei den Linien T-19 und T-20 war kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Trotzdem war bei allen transgenen Linien die Prolinkonzentration deutlich höher bei der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-35 C). Die relativ große Gesamtsumme bei der Linie T-18 könnte durch einen überdurchschnittlich hohen Gehalt von γ -Aminobuttersäure (GABA) erklärt werden, der bei einigen Proben gemessen wurde (Daten nicht gezeigt). Die einzelnen Messwerte variierten jedoch relativ stark. Da dies zudem nur in diesem Experiment und lediglich bei einer der transgenen Linien auftrat, wurde die Ursache hierfür nicht weiter untersucht.

Durch die NaCl-Behandlung stieg die Summe der Aminosäuren bei den transgenen Linien gegenüber der Kontrollpflanze deutlich an (ABBILDUNG 4-35 B). Dieser Anstieg ist vor allem auf den höheren Prolingehalt zurückzuführen (ABBILDUNG 4-35 D). Durch die NaCl-

Behandlung verdoppelt sich dieser bei den transgenen Pflanzen, während er bei der Kontrollpflanze um das 7-fache zunimmt. Da er bei den transgenen Linien jedoch bereits unter Standardbedingungen vierzehn- bis fünfzehnfach höher ist als bei der Kontrollpflanze, ist er auch unter salinen Bedingungen wesentlich höher als bei der Kontrollpflanze.

Im zweiten Ansatz gab es unter Standardbedingungen bezüglich der Aminosäuren weder im Gesamtgehalt noch im Prolingehalt Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-36 A, C). Durch die NaCl-Behandlung stieg die Gesamtkonzentration der Aminosäuren bei allen Pflanzen leicht an (ABBILDUNG 4-36 B), während sich der Prolingehalt etwa vervierfachte (ABBILDUNG 4-36 D).

Demnach steht der erhöhte Prolingehalt bei den transgenen Pflanzen aus dem ersten Ansatz sehr wahrscheinlich mit dem erhöhten Kohlenhydratgehalt in Verbindung.

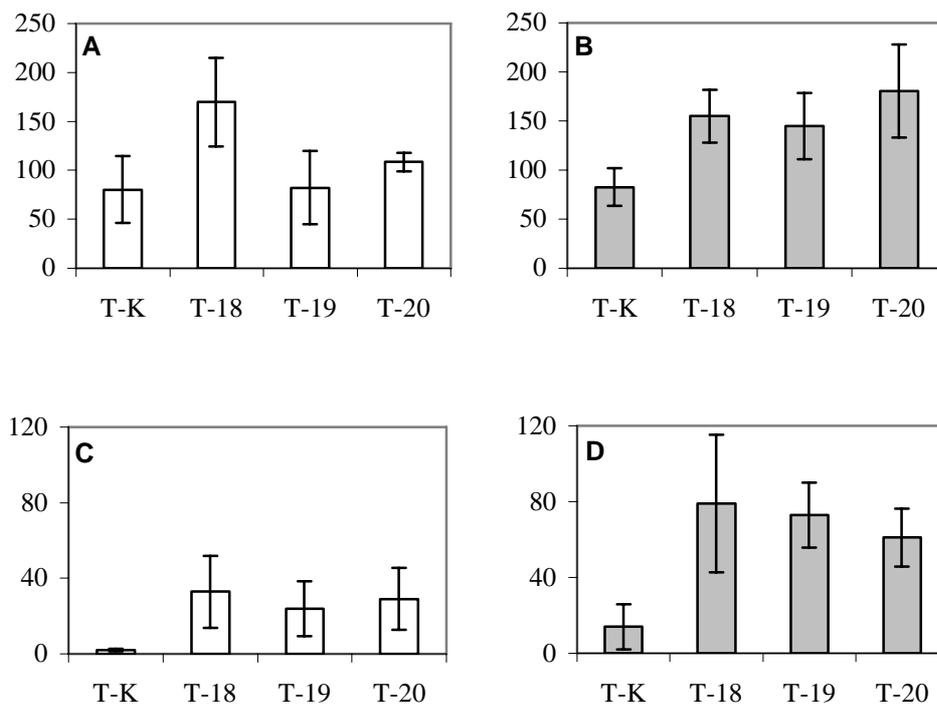


ABBILDUNG 4-35. Gesamtgehalt an Aminosäuren (A, B) und der Prolingehalt (C, D) in Source-Blättern (Kategorie II) von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen aus dem Ansatz 1, die unter Standardbedingungen (A, C) und unter 100 mM NaCl (B, D) kultiviert wurden. Angaben in $\mu\text{mol/g TG}$.

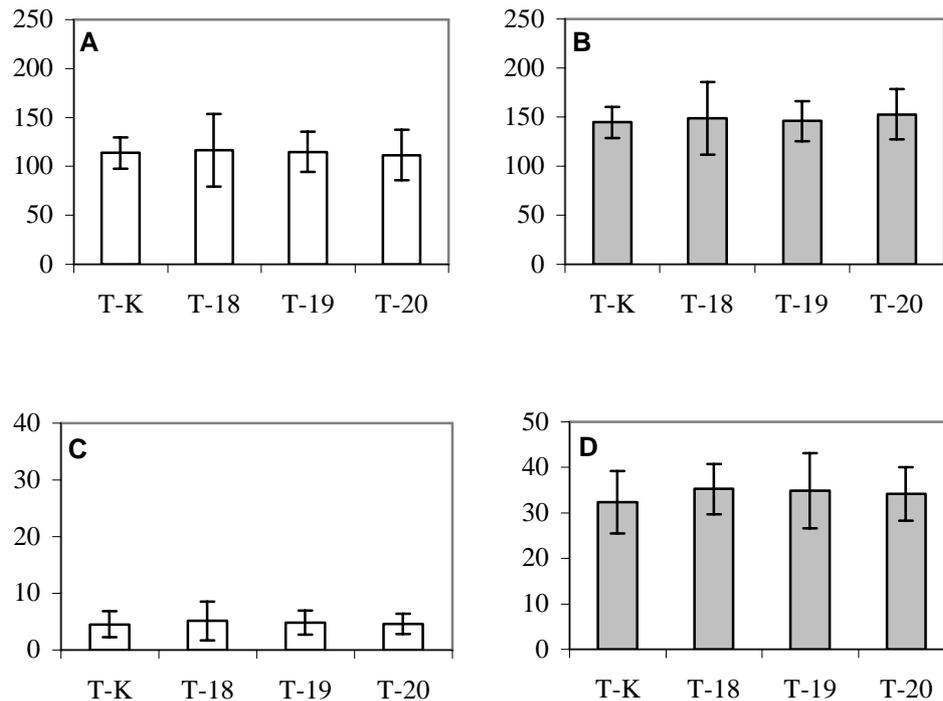


ABBILDUNG 4-36. Gesamtgehalt an Aminosäuren (A, B) und der Prolingehalt (C, D) in Source-Blättern (Kategorie II) von MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und Kontrollpflanzen aus dem Ansatz 2, die unter Standardbedingungen (A, C) und unter 100 mM NaCl (B, D) kultiviert wurden. Angaben in $\mu\text{mol/g TG}$.

4.7.3.6 Auswirkungen des MP17N auf den Kationengehalt in Source-Blättern

Der Gehalt an Kationen wurde in Source-Blättern der Kategorie II gemessen. Beim Vergleich des Kaliumgehaltes der Pflanzen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden (TABELLE 4-23, linke Seite), fiel auf, dass sich die Messwerte zwischen den MP17N-transgenen Linien und der Kontrollpflanze nur im ersten Ansatz unterschieden. Der Gehalt der Kaliumionen war bei den transgenen Pflanzen unter Standardbedingungen deutlich höher als bei der Kontrollpflanze. Der Magnesium- und der Calciumgehalt war bei den transgenen Linien dagegen tendenziell etwas geringer als bei der Kontrollpflanze. Im Gegensatz dazu gab es im zweiten Ansatz bezüglich der Kationen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze. Magnesium scheint in den Blättern der transgenen Linien in etwas geringerer Konzentration vorzuliegen als in denen der Kontrollpflanze.

Wurden die Pflanzen unter salinen Bedingungen (100 mM NaCl) kultiviert (TABELLE 4-23, rechte Seite), ergab sich folgendes Bild. Die Blätter der Pflanzen aus dem ersten

Ansatz enthielten mehr als doppelt so viel Natrium wie die der Pflanzen aus dem zweiten Ansatz. Das liegt vermutlich daran, dass für die Analyse im zweiten Ansatz etwas jüngere Blätter verwendet wurden und Pflanzen bekanntlich NaCl zunächst in den älteren Blättern „entsorgen“ (Koyro, persönliche Kommunikation). Im ersten Ansatz war der Natriumgehalt in den Blättern der MP17N-transgenen Pflanzen gegenüber der Kontrollpflanze etwas erhöht, aber hier variierten die einzelnen Messwerte sehr stark. Im zweiten Ansatz akkumulierte die Linie T–18 etwas weniger Natrium in ihren Kategorie II-Blättern als die anderen Versuchspflanzen einschließlich der Kontrollpflanze (TABELLE 4-23).

In beiden NaCl-Experimenten war der Kaliumgehalt in den Blättern der transgenen Pflanzen tendenziell höher als in denen der Kontrollpflanze. Das galt vor allem für die Linie T–18 im zweiten Ansatz, bei der eine etwas geringere Natriumkonzentration in den Kategorie II-Blättern festgestellt wurde. Allerdings variierten die einzelnen Messwerte sehr stark, was in den relativ großen Standardabweichungen zum Ausdruck kam.

Im ersten Ansatz war der Magnesium-Gehalt in den Kategorie II-Blättern bei den transgenen Linien etwas höher als in den entsprechenden Blättern der Kontrollpflanze. Im zweiten Ansatz unterschieden sich die Blätter der transgenen Linien und der Kontrollpflanzen bezüglich des Magnesiumgehaltes nicht (TABELLE 4-23, rechte Seite). Ähnlich verhielt es sich mit dem Calciumgehalt in den Kategorie II-Blättern. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die Standardabweichungen zum Teil sehr groß waren.

TABELLE 4-23. Kationengehalt (mmol/kg FG) in Kategorie II-Blättern von MP17N-exprimierenden Pflanzen und Kontrollpflanzen, die unter Standardbedingungen und unter 100 mM NaCl kultiviert wurden.

Linie	Standardbedingungen				+100 mM NaCl			
	K ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
Ansatz 1 (Frühling, vgl. Kapitel 4.2.1, S. 38)								
T–K	148±13	–	50±13	43±12	91±14,7	127±41,4	27±4,1	20±15,2
T–18	192±26	–	45±3,0	41±8,7	118±18,6	141±13,4	30±4,8	32±7,7
T–19	162±21	–	42±10	37±13	112±20,3	144±14,8	40±9,5	43±11,9
T-20	176±26	–	44±9,8	39±16	119±9,0	143±40,1	42±2,6	52±15,4
Ansatz 2 (Herbst, vgl. Kapitel 4.2.2, S. 49)								
T–K	135±15	–	63±8,8	27,5±5,6	101±17,1	54±16,4	35±9,1	16±3,1
T–18	133±5	–	57±5,8	27,5±6,8	136±18,8	44±15,9	30±9,4	15±4,4
T–19	130±4	–	59±7,1	26,2±8,0	115±36,0	59±28,5	29±10,5	14±4,0
T-20	129±10	–	56±4,5	28,3±6,3	112±11,8	54±21,3	29±3,0	15±1,4

4.7.3.7 Osmotisches Potenzial des Zellsaftes

Werden Pflanzen Salzstress ausgesetzt, müssen deren Zellen für die Aufrechterhaltung der Homöostase einen ausreichenden osmotischen Druck erzeugen. Dieser muss mit steigender Osmolarität der Nährlösung zunehmen.

Die Differenzen zwischen dem osmotischen Druck des Zellsaftes von Pflanzen, die unter Standardbedingungen wuchsen und dem von Pflanzen, die 100 mM NaCl ausgesetzt waren, betragen im ersten Ansatz 147 mOsmol/kg bei der Kontrollpflanze und 189, 150 und 133 bei den transgenen Linien T-18, T-19 bzw. T-20 (TABELLE 4-24). Diese Werte spiegeln nicht ganz den erwarteten Unterschied von 200 mosmol/kg (100 mM NaCl) wider.

Im zweiten Ansatz lagen die entsprechenden Differenzen bei 193 (T-K), 250 (T-18), 204 (T-19) und 189 mosmol/kg (T-20) (TABELLE 4-24). Diese Werte reflektieren ungefähr den Anstieg der Osmolarität in der Nährlösung (200 mOsmol/kg). Bei der Linie T-18 stieg die Konzentration osmotisch wirksamer Substanzen jedoch überproportional an. Dazu passt, dass der Kationengehalt nur bei dieser Linie nach der NaCl-Behandlung höher war als bei den anderen Pflanzen (TABELLE 4-23).

Die osmotischen Potenziale der Blatt-Press-Säfte der NaCl-behandelten Pflanzen des ersten Ansatzes stimmen recht gut mit denen des zweiten Ansatzes überein. Bei den Blättern der Pflanzen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, unterschieden sich dagegen die Ergebnisse zwischen dem ersten und dem zweiten Ansatz. Das osmotische Potenzial war zwar auch hier jeweils bei der Linie T-18 am größten. Vergleicht man allerdings die einzelnen Messwerte unter Standardbedingungen des ersten Ansatzes mit den entsprechenden Werten des zweiten Ansatzes, ergibt sich ein Unterschied von 71 mosmol/kg bei der Kontrollpflanze und von 83, 68 und 72 mOsmol/kg bei den transgenen Linien T-18, T-19 bzw. T-20 (TABELLE 4-24).

Für eine vollständige Analyse der osmotischen Verhältnisse in den transgenen Pflanzen müssten auch die Konzentrationen der Anionen wie Chlorid und Nitrat bestimmt werden. Da die Integration des *mp17n*-Gens in das Genom der Kartoffelpflanzen aber zu keiner wirklichen Toleranz gegen Salzstress geführt hat, wurde dies nicht weiter verfolgt.

TABELLE 4-24. Osmotisches Potenzial (mOsmol/kg) von Press-Säften der Kategorie II-Blätter von MP17N-transgener Tomensa-Pflanzen und der Kontrollpflanze unter Standardbedingungen und nach der Behandlung mit 100 mM NaCl (Ansatz 1 u. 2).

Linie	Standardbedingungen	100 mM NaCl	Differenz
Ansatz 1 (Frühling, vgl. Kapitel 4.2.1, S. 38)			
T-K	332±27,0	479±72,6	147
T-18	379±53,5	568±57,7	189
T-19	333±24,4	483±46,3	150
T-20	336±46,1	469±73,1	133
Ansatz 2 (Herbst, vgl. Kapitel 4.2.2, S. 49)			
T-K	261±14,5	454±16,8	193
T-18	296±10,3	546±34,1	250
T-19	265±5,7	469±18,6	204
T-20	264±13,5	453±26,2	189

4.7.4 Zusammenfassung der Salzstress-Experimente

In der TABELLE 4-25 sind die wichtigsten Ergebnisse der Salzstressexperimente zusammengefasst. Die Expression des MP17N in den transgenen Linien führt allenfalls zu einer leichten Toleranz gegenüber Salzstress, die dazu führt, dass die Kategorie I-Blätter der transgenen Pflanzen unter salinen Bedingungen zwei bis fünf Tage nach der Kontrollpflanze mit der Ausprägung der typischen Symptome beginnen. Dies steht jedoch nicht im Zusammenhang mit einer erhöhten Konzentration löslicher Zucker in den Source-Blättern. Auch die im ersten Ansatz beobachtete erhöhte Prolinkonzentration kommt als Erklärung nicht in Frage. Vor allem die Linie T-18, bei der die Expressionsrate des MP17N am höchsten war und deren Wachstum am stärksten reduziert war, scheint der hohen NaCl-Konzentration in der Nährlösung besser standzuhalten. Bei dieser Linie verringerte sich im Verlauf des Experiments jedoch die Photosyntheseleistung in den Kategorie II-Blättern, also jenen, die sich unter salinen Bedingungen entwickelten.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Expression des MP17N in den transgenen Pflanzen zu keiner echten Toleranz führt.

TABELLE 4-25. Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Salzstress-Experimenten mit den MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und den Kontrollpflanzen. Die Pfeile geben bei den NaCl-Experimenten die Veränderungen gegenüber den Standardbedingungen bzw. gegenüber der Kontrollpflanze wider.

BM, Biomasse; St, Stärke; LZ, Lösliche Zucker; PS, Photosynthese; W/S, Wurzel/Spross-Verhältnis).

↑ = deutlicher Anstieg, ↓ = deutlicher Rückgang, ↗ = leichter Anstieg, → = unverändert, ↘ = leichter Rückgang. Besonders starke Veränderungen sind durch zwei Pfeile hervorgehoben. + = leicht erhöhte NaCl-Toleranz, ++ = erhöhte Toleranz gegenüber T-K.

Linie	BM	St	LZ	Prolin	PS	W/S	
Einfluss von 100 mM NaCl auf alle Pflanzen gegenüber den Standardbedingungen							
Ansatz 1							
T-K	↓↓	↓	↑	↑	↓	→	
T-18	↓	↓	↑	↑	↓	→	
T-19	↓	↓	→	↑	↓	→	
T-20	↓	↓	↑	↑	↓	→	
Ansatz 2							
T-K	↓↓	↓	↑	↑	↓	↓	
T-18	↘	↑	↑	↑	↓↓	↓	
T-19	↓	↑	↑	↑	↓	↓	
T-20	↓	→	↑	↑	↓	↓	
Veränderungen bei MP17N-exprimierenden Pflanzen gegenüber der Kontrollpflanze (T-K) unter Einfluss von 100 mM NaCl							
							NaCl-Toleranz (Kategorie I-Blätter)
Ansatz 1							
T-18	↓↓	↑	↑	↑	↓	↘	++
T-19	→	↑	↑	↑	↓	↘	+
T-20	↗	↑	↑	↑	↓	↘	+
Ansatz 2							
T-18	↓	↑	↗	→	→	↓↓	++ ^a
T-19	→	→	→	→	→	↓	+
T-20	→	→	→	→	→	↓	+

^a Kategorie I-Blätter im unteren Sprossachsenabschnitt verwelkten später als bei den anderen Pflanzen einschließlich der Kontrollpflanze, die Photosyntheseleistung der Kategorie II-Blätter verringerte sich jedoch stark.

5 DISKUSSION

5.1 Übersicht

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Expression des MP17N in vielfacher Weise auf die transgenen Kartoffelpflanzen auswirkt. Dabei wurde deutlich, dass die Auswirkungen auf den Kohlenhydrathaushalt bzw. die Kohlenhydratpartitionierung offensichtlich vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängen. Entwicklungsphysiologisch junge transgene Pflanzen (Ansatz 1), die beträchtliche Mengen an Kohlenhydraten in ihren Source-Blättern akkumulierten, hatten das gleiche Wurzel/Spross-Verhältnis wie die Kontrollpflanzen. Umgekehrt war bei entwicklungsphysiologisch älteren Pflanzen (Ansätze 2 bis 4) das Wurzel/Spross-Verhältnis um bis zu 40% reduziert, während in den Source-Blättern dieser transgenen Pflanzen keine Kohlenhydrate akkumulierten. Die Gesamtbiomasse der transgenen Pflanzen und deren Photosyntheseraten waren dagegen in allen Experimenten reduziert, also unabhängig vom Entwicklungszustand.

Diese Ergebnisse können anhand verschiedener Erklärungsmodelle gedeutet werden. Die Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern entwicklungsphysiologisch junger Pflanzen könnte zum Beispiel die Folge der Hemmung des Exports von Photoassimilaten sein. Alternativ dazu wäre es jedoch denkbar, dass das MP17N direkt das meristematische Wachstum der transgenen Kartoffelpflanzen beeinträchtigt und deshalb Photoassimilate in den Source-Blättern akkumulieren. Am Beispiel der Plasmodesmenfrequenz in Cambiumzellen des Sprosses und der Zusammensetzung des sekundären Xylems der Sprossachse wurde gezeigt, dass sich die MP17N-Expression tatsächlich auf die Differenzierung von Meristemen auswirken kann. Es bleibt aber unklar, ob dies ein direkter Effekt des MP17N auf das Cambium ist. Es könnte sich ebenso um die Konsequenzen einer mangelnden Versorgung des Sprosscambiums handeln, mit denen die transgenen Pflanzen versuchen, den Import von Photoassimilaten in die Cambiumzellen und die Versorgung der Pflanze mit Wasser zu verbessern.

Die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, wonach die Expression von MPs in transgenen Pflanzen zur Akkumulation von löslichen Zuckern in Source-Blättern führt (Lucas *et al.* 1993a, Olesinski *et al.* 1995, Almon *et al.* 1997, Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001), war die Arbeitshypothese für die Experimente zu einer möglichen Salztoleranz. Zwar hielten die transgenen Linien, vor allem die Linie T-18, dem Salzstress (100 mM NaCl) einige Tage länger stand als die Kontrollpflanze. Dies konnte jedoch nicht ausschließlich mit einem höheren Gehalt an löslichen Zuckern in Verbindung gebracht

werden. Zudem muss beachtet werden, dass bei der Linie T-18 die Photosyntheserate der Source-Blätter, die sich nach dem Beginn der Salzbehandlung entwickelten, stark reduziert war.

5.2 Vorbemerkung zu den Versuchsansätzen

Zur Untersuchung der Auswirkungen des MP17N auf den Kohlenhydrathaushalt der transgenen Pflanzen wurden 5 Experimente (Ansätze 1 bis 5) durchgeführt. Nur im ersten Ansatz akkumulierten die transgenen Pflanzen erhebliche Mengen an Kohlenhydraten in ihren Source-Blättern. Und nur in den Ansätzen 2 bis 4 trat eine Verschiebung des Wurzel/Spross-Verhältnisses auf; in Ansatz 5 wurde dies nicht untersucht. Wie lassen sich diese scheinbar widersprüchlichen Resultate erklären?

Obwohl in den Ansätzen 2 bis 4 Pflanzen sowohl vor als auch nach der Knollenbildung geerntet wurden, ist nicht auszuschließen, dass sich diese Pflanzen physiologisch in derselben „späten“ Entwicklungsphase befanden. Denn nach dem Abschneiden der Spross-Spitze zur Herstellung der Stecklinge kam es häufig zur Ausbildung von Blüten (die dann immer entfernt wurden) noch bevor sich eine richtige Wurzel gebildet hatte. Nicht selten wurde sogar direkt an der unterirdischen Sprossachse ebenfalls noch vor der Bildung der Wurzel eine Knolle ausgebildet (die ebenfalls zu Beginn des Experiments entfernt wurde). Daraus folgt, dass ausschließlich die Pflanzen aus der Sterilkultur (Ansatz 1) physiologisch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium waren. Solange diese kleinen Pflanzen unter sterilen Bedingungen auf dem Nähragar kultiviert werden und alle zwei bis vier Wochen Stecklinge davon in neue Medien übertragen werden, bleiben sie in der frühen Entwicklungsphase. Zu Beginn des Experiments hatten diese Pflanzen definitiv noch nicht geblüht und auch noch keine Knollen gebildet. Zudem wurden sie vor der Blüten- und Knollenbildung geerntet.

Demnach repräsentieren die Experimente aus dem Ansatz 1 und jene aus den Ansätzen 2 bis 4 zwei unterschiedliche Entwicklungsstadien: Pflanzen, bei denen noch keine Blüten- und Knollenbildung induziert wurde und Pflanzen, bei denen dies bereits geschehen war. Letztere waren also entwicklungsphysiologisch älter als die Pflanzen, die im ersten Ansatz verwendet wurden. In beiden Fällen kamen Auswirkungen des MP17N zum Ausdruck, wie sie bereits in anderen Studien über den Einfluss von MPs beschrieben wurden.

5.3 Einfluss des MP17N auf den Kohlenhydratmetabolismus

5.3.1 Kohlenhydratakkumulation als Folge einer Exporthemmung von Photoassimilaten?

Wie der Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze zeigt, scheint der Einfluss auf den Kohlenhydrathaushalt bzw. auf die Kohlenhydratpartitionierung vom Entwicklungsstand der Pflanzen abzuhängen. Die Expression des MP17N in den transgenen Pflanzen führte lediglich in entwicklungsphysiologisch jungen Pflanzen (Ansatz 1) zu einer Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern. Im Vergleich zur Kontrollpflanze akkumulierten die transgenen Pflanzen dieses Ansatzes erhebliche Mengen an Stärke und den löslichen Zuckern Saccharose, Glukose, Fruktose und Raffinose in ihren Source-Blättern (ABBILDUNG 4-5, S. 42). Im Gegensatz zum Wachstum, dessen Reduktion offensichtlich vom Expressionsniveau des MP17N abhing (vgl. ABBILDUNG 4-1 und ABBILDUNG 4-2, S. 37), war der Kohlenhydratgehalt bei allen transgenen Linien jedoch auf etwa den gleichen Wert gestiegen. Nach der Studie von Hofius *et al.* (2001) gibt es einen Zusammenhang zwischen Expressionsniveau und Kohlenhydratakkumulation. Möglicherweise war bei den hier untersuchten Pflanzen ein bestimmter Schwellenwert der MP17N-Expression überschritten, so dass bei allen drei Linien maximale Akkumulation auftrat. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass es sich beim Einfluss des MP17N auf das Wachstum und auf den Kohlenhydrathaushalt um zwei voneinander unabhängige Phänomene handelt.

Die Kohlenhydratakkumulation wird in der Literatur als Folge eines gehemmten Exports von Photoassimilaten aus den Source-Blättern beschrieben (Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001). Mehrere Ergebnisse des ersten Versuchsansatzes sprechen ebenfalls für eine Exporthemmung. Zunächst war bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen der Efflux von Saccharose aus den Petiolen gegenüber der Kontrollpflanze reduziert (ABBILDUNG 4-14, S. 55). Außerdem war das Verhältnis von Stärke zu Saccharose bei den transgenen Linien etwa doppelt so groß wie bei der Kontrollpflanze, d.h. der Stärkegehalt stieg in größerem Maße als der Saccharosegehalt (TABELLE 4-7, S. 48). Dies kann erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass durch einen gehemmten Export der Saccharosegehalt in den Mesophyllzellen steigt und in der Folge die Stärkesynthese intensiviert wird. Dieses Ergebnis widerspricht allerdings den Befunden aus der Studie an MP17N-transgenen Tabakpflanzen (Herbers *et al.* 1997). In den Source-Blättern dieser Pflanzen war durch die Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus das Verhältnis von Stärke zu löslichen Zuckern zugunsten der löslichen Zucker verschoben; über mögliche Ursachen für dieses atypische Verhalten wurden jedoch keine Angaben gemacht.

Durch Feedback-Inhibition aufgrund des Rückstaus von Photoassimilaten sollte sich die Photosyntheseleistung verringern (Goldschmidt & Huber 1992, Herbers *et al.* 1997), was tatsächlich beobachtet wurde (TABELLE 4-2, S. 41). Eine derartige Reduktion der Photosyntheserate durch Feedback-Hemmung muss sich nicht zwangsläufig auf die Transpirationsrate auswirken. Das ist möglicherweise der Grund dafür, dass im ersten Ansatz bei den transgenen Linien die Photosyntheserate gegenüber der Kontrollpflanze nicht in gleichem Maße abnahm wie die Transpirationsrate. In allen folgenden Ansätzen war letztere jedoch genauso wie die Photosyntheserate reduziert, woraus sich schließen lässt, dass die transgenen Pflanzen im Vergleich zur Kontrollpflanze ihre Spaltöffnungen weniger weit geöffnet hatten. Dies deutet darauf hin, dass die verringerte Photosyntheserate die Folge einer reduzierten CO₂-Aufnahme ist (vgl. Kapitel 5.5.2, S. 107).

Es ist denkbar, dass bei den Kohlenhydrate akkumulierenden transgenen Pflanzen des ersten Ansatzes überschüssige lösliche Zucker in die Vakuole transportiert wurden; das würde das osmotische Gleichgewicht zwischen Cytoplasma und Vakuole stören. Dass die Prolinkonzentration in den Source-Blättern der transgenen Linien gegenüber der Kontrollpflanze deutlich erhöht war (ABBILDUNG 4-35 C, S. 92), könnte bedeuten, dass die Pflanzen mit der Synthese von osmotisch wirksamen Substanzen dieses Gleichgewicht wieder hergestellt haben. Es sind allerdings auch andere Gründe für die erhöhte Konzentration dieser Aminosäure denkbar. Bei der Synthese von Prolin wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert. Dies ist für die Pflanze von Vorteil, wenn die bei der Lichtreaktion der Photosynthese produzierten Reduktionsäquivalente aufgrund der Akkumulation von Kohlenhydraten und der daraus resultierenden Feedback-Hemmung der Stärke- und Saccharosesynthese nicht verbraucht werden können (Hare & Cress 1997). Die Prolinsynthese stellt außerdem einen Weg dar, die überschüssigen Photoassimilate in die Bildung von Substanzen zu investieren, die den Stoffwechsel der Pflanzen nicht stören und als Stickstoffspeicher dienen können. Zu den kompatiblen Substanzen gehören neben Prolin auch lösliche Zucker wie Raffinose, deren Konzentration bei den transgenen Pflanzen des ersten Ansatzes ebenfalls deutlich höher war als bei der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-7 A, S. 47). Gleiches gilt für die Bildung von Anthocyanen. Diese wurden zwar nicht direkt gemessen; die Rotfärbung der Blattunterseiten bei den transgenen Linien im ersten Ansatz deutet aber auf die Synthese dieses Stoffes hin, von dem bekannt ist, dass er mit der Akkumulation von Kohlenhydraten in Blättern in Verbindung steht (Russin *et al.* 1996; Livingston *et al.* 1998, Jeannette *et al.* 2000). Anthocyane reduzieren die Photoinhibition, die auftritt, wenn bei geringem Bedarf an ATP und NADPH (siehe oben)

die Pigmentsysteme übermäßig aktiviert werden ohne dass Excitonen abfließen (Steyn *et al.* 2002, Hoch *et al.* 2003).

Die Beobachtung, dass in den Zellen (Mesophyll, aber auch in Geleitzellen) der Linie T-18 vermehrt Vesikel vorkamen (ABBILDUNG 4-17, S. 65) könnte auch auf eine allgemeine Stressantwort hindeuten (Levine 2002), in deren Folge die Prolin- und Anthocyansynthese erhöht wird. Da letzteres jedoch ausschließlich in Blättern von Pflanzen beobachtet wurde, die Kohlenhydrate akkumulierten, ist davon auszugehen, dass die Prolin- und Anthocyansynthese nicht im direkten Zusammenhang mit der MP17N-Expression steht sondern eine Folge der Kohlenhydratakkumulation ist.

Die Tatsache, dass der Gehalt an löslichen Zuckern in der Sprossachse (ABBILDUNG 4-6 A, S. 46) und in den Sink-Blättern (ABBILDUNG 4-7 B, S. 47, ABBILDUNG 4-9, S. 48) gegenüber der Kontrollpflanze reduziert war, deutet ebenfalls auf einen gehemmten Export von Photoassimilaten aus Source-Blättern hin. Das verringerte Wachstum der transgenen Pflanzen könnte demnach durch mangelnde Versorgung der Sinks mit Photoassimilaten aufgrund eines verringerten Exports aus den Source-Blättern erklärt werden (vgl. Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001).

Hier stellt sich die Frage, in welcher Weise das MP17N dies bewirkt. Blockieren MPs den Transport von Assimilaten durch funktionsfähige Plasmodesmen? Verhindern sie den plasmodesmalen Transport von Saccharose-Transportern bzw. deren mRNA, die für die Phloembeladung benötigt werden? Verändern sie die Struktur von Plasmodesmen irreversibel? Beeinträchtigen sie die makromolekulare Signalübermittlung zwischen Source- und Sinkgeweben? Oder liegen die Ursachen tiefer, etwa in einer Hemmung der Entwicklungs- bzw. Differenzierungsvorgänge in Meristemen?

5.3.2 Wird der symplasmatische Transport von Photoassimilaten blockiert?

Kartoffelpflanzen gehören zur Gruppe der apoplasmatischen Phloembelader (van Bel & Gamalei 1992), das heißt Saccharose wird symplasmatisch vom Mesophyll zum Phloem transportiert, wo es in den Apoplasten gelangt und von dort aktiv mithilfe von H⁺/Saccharose-Cotransportern in die SE/GZ-Komplexe aufgenommen wird (van Bel 1993). Auf diesem Weg müssen verschiedene Zellgrenzen passiert werden, zunächst die Plasmodesmen zwischen den Mesophyllzellen, anschließend jene zwischen Mesophyll und Bündelscheide. Theoretisch gibt es also mehrere mögliche Stellen, an denen der symplasmatische Saccharose-Transport blockiert werden könnte.

Das MP17N könnte zum Beispiel die normale Funktionsfähigkeit von Plasmodesmen beeinträchtigen, weil es eine Affinität zu bestimmten plasmodesmalen Bestandteilen hat (Ding *et al.* 1992b). Da das MP17N bzw. das MP17 stets mit Plasmodesmen assoziiert zu sein scheint (Schmitz *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001), ist es denkbar, dass der symplasmatische Transport durch überexprimiertes MP17N im Mesophyll blockiert ist. Da dieses Protein das SEL dieser Plasmodesmen in Tabakpflanzen jedoch unabhängig vom Expressionsniveau vergrößert, wie Mikroinjektionsexperimente mit makromolekularen Fluoreszenzfarbstoffen ergaben (Hofius *et al.* 2001), scheidet diese Möglichkeit sehr wahrscheinlich aus. Ein größeres SEL müsste im Gegenteil zu einer erhöhten Exportrate führen. Es sei denn, man geht davon aus, dass überexprimiertes MP17N zusätzlich zur Vergrößerung des SEL der Plasmodesmen durch „indirekte metabolische Effekte“ (Hofius *et al.* 2001) einen Anstieg von Kohlenhydraten im Mesophyll bewirkt.

Ob das SEL der Plasmodesmen der Bündelscheidenzellen von MPs verändert wird, wurde noch nicht untersucht. Ein MP17:GFP-Fusionsprotein wurde auch in den Zellwänden zwischen Bündelscheidenzellen, zwischen Bündelscheidenzellen und vaskulären Parenchymzellen und zwischen Bündelscheidenzellen und Geleitzellen detektiert (Hofius *et al.* 2001), was darauf schließen lässt, dass es mit den Plasmodesmen dieser Zellgrenzen interagiert. Das bedeutet aber nicht notwendigerweise, dass das SEL dieser Plasmodesmen auch vergrößert wird. Denn die Bündelscheide ist gerade die Grenze, die von Luteoviren nicht passiert werden kann. Möglicherweise wird also gerade an dieser Stelle der symplasmatische Weg blockiert, weil das MP17N zwar mit Plasmodesmen assoziiert ist, aber nicht durch diese transportiert werden kann. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass in den Ansätzen 2 bis 4 keine Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern auftrat (vgl. aber Kapitel 5.10, S. 122).

5.3.3 Wirkt sich das MP17N auf die Phloembeladung aus?

Theoretisch ließe sich ein gehemmter Export von Photoassimilaten auch durch eine indirekte Wirkung des MP17N erklären, und zwar dort, wo die eigentliche (apoplasmatische) Beladung von Saccharose in die Siebelemente stattfindet. Anders als beim TMV-MP (Ding *et al.* 1992b) liegt die natürliche Funktion des PLRV-MP (MP17 bzw. MP17N) darin mit PPUs zu interagieren, denn das PLRV kommt im Gegensatz zum TMV natürlicherweise ausschließlich im Phloem von befallenen Pflanzen vor (Schmitz *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001). Hierbei ist interessant, dass in jungen MP17N-transgenen Tabakpflanzen, bei denen erhebliche Mengen an Kohlenhydraten in Source-Blättern akkumulierten, die PPUs von Source-Blättern strukturell verändert waren, während solche

im Mesophyll nicht von der Kontrollpflanze zu unterscheiden waren (Herbers *et al.* 1997, vgl. aber Kapitel 5.6, S. 110). Sollte diese strukturelle Veränderung funktionelle Auswirkungen haben, könnte hier die Ursache für eine Beeinträchtigung der Phloembeladung liegen. Der Saccharose-Transporter SUT1 kommt in Kartoffelpflanzen (aber auch in Tabak- und Tomatenpflanzen) ausschließlich in der Membran von Siebelementen vor, während die entsprechende *sut1*-mRNA auch in den Geleitzellen zu beobachten ist (Kühn *et al.* 1997). Offensichtlich wird SUT1 oder die *sut1*-mRNA durch die speziellen Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle, die PPU, transportiert. Die Interaktion des überexprimierten MP17N mit Proteinen, die an diesem makromolekularen Zell-zu-Zell-Transport beteiligt sind (z. B. die postulierten Chaperone, PD-Dockingproteine oder PD-Rezeptoren, vgl. ABBILDUNG 2-1, S. 9), könnte dazu führen, dass aufgrund kompetitiver Hemmung weniger SUT1-Transporter in der Membran der Siebelemente eingebaut werden. Die Folge wäre eine verminderte Beladungskapazität und damit ein verringerter Export. Einen ähnlichen Effekt erzielten Riesmeier *et al.* (1994) mit transgenen Kartoffelpflanzen, die ein Antisense-Konstrukt des SUT1 exprimierten. Die so verhinderte Expression des für die Phloembeladung erforderlichen Saccharose-Transporters führte zu einer Akkumulation von Kohlenhydraten in den entsprechenden Source-Blättern.

5.3.4 Struktur von Plasmodesmen und Phloembeladung

Die ultrastrukturellen Untersuchungen der Pflanzen des ersten Ansatzes lieferten keine Hinweise auf strukturelle Veränderungen von Plasmodesmen, die durch das MP17N hervorgerufen werden (vgl. Kapitel 4.3, S. 64). Es wurden keine modifizierten Plasmodesmen oder PPU gefunden, wie sie von Herbers *et al.* (1997) in jungen MP17N-transgenen Tabakpflanzen beobachtet wurden. Zwar war in einigen Plasmodesmen zwischen Bündelscheiden- und Phloemparenchymzellen eine elektronendichte Substanz zu erkennen (ABBILDUNG 4-17, S. 65), dies trat aber sowohl bei der untersuchten Linie T-18 als auch bei der Kontrollpflanze auf (siehe auch Kapitel 5.6, S. 110).

5.3.5 Einfluss des MP17N auf die Signalübermittlung?

Der Vergleich der unterschiedlichen Ansätze zeigt, dass mehrere MP17N-induzierte Effekte unterschieden werden müssen. Die Resultate aus dem ersten Ansatz lassen sich mit einer Hemmung des Exports von Photoassimilaten erklären, wie es zum Beispiel für die MP17N-transgenen Tabakpflanzen beschrieben wurde (Herbers *et al.* 1997). Für die folgenden Ansätze trifft dies allerdings nicht zu. Die transgenen Pflanzen der Ansätze 2 bis 4 akkumulierten keine Kohlenhydrate in ihren Source-Blättern, stattdessen war das

Wurzel/Spross-Verhältnis zugunsten des Sprosses verschoben. Dies wurde interessanterweise in allen Studien an MP-transgenen Pflanzen festgestellt, wenn die Verteilung der Biomasse zwischen den verschiedenen Organen untersucht wurde (vgl. TABELLE 5-1, S. 118). Aus diesen Studien weiß man, dass der Einfluss auf das Wurzel/Spross-Verhältnis nicht im Zusammenhang mit der Interaktion von MPs mit Plasmodesmen steht (Balachandran *et al.* 1995, Olesinski *et al.* 1996). Daraus wurde die Hypothese formuliert, dass MPs in die Signalübermittlung zwischen verschiedenen Organen eingreifen und so die veränderte Allokation der Photoassimilate bewirken (Lucas *et al.* 1996, Lucas *et al.* 2001, vgl. Kapitel 2.5, S. 11). Dies könnte auch auf die MP17N-transgenen Pflanzen aus den Ansätzen 2 bis 4 zutreffen, was bedeuten würde, dass dieser Effekt vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängt (vgl. Kapitel 5.6, S. 110).

5.4 Gibt es einen Zusammenhang zwischen Exporthemmung und Wachstumsreduktion?

Nach der Studie von Hofius *et al.* (2001) gibt es bei MP17-transgenen Tabakpflanzen eine strikte Korrelation von Expressionsniveau, Kohlenhydratgehalt und Wachstumsreduktion. Je mehr MP17-Expression, desto höher der Gehalt an Kohlenhydraten in den Source-Blättern und desto geringer das Wachstum der Pflanze. Ein solcher Zusammenhang zwischen Kohlenhydratgehalt und Biomasseproduktion besteht jedoch nicht bei den MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen der vorliegenden Arbeit. Im ersten Ansatz akkumulierten alle transgenen Linien in etwa gleich viel Stärke und auch die gleichen Mengen an löslichen Zuckern, während sich die Biomasse bei der Linie T-18 um 68,8% verringerte, bei der Linie T-19 um 23,5% und bei der Linie T-20 sogar nur um 8,9%. Im zweiten Ansatz gab es zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze keine Unterschiede im Kohlenhydratgehalt und trotzdem war das Wachstum um 48,4% (T-18), 37,2% (T-19) bzw. 20,6% (T-20) reduziert und das Wurzel/Spross-Verhältnis verschoben. Ähnliche Resultate lieferten die Ansätze 3 und 4. Die Exsudationsexperimente ergaben zudem, dass lediglich die Source-Blätter der transgenen Pflanzen aus dem ersten Ansatz weniger Saccharose exportierten; im zweiten Ansatz gab es diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze.

Diese Ergebnisse sprechen gegen die Vermutung, dass das reduzierte Wachstum die Folge einer Exporthemmung von Photoassimilaten aus Source-Blättern ist. Dies lässt sich auch aus einer Studie an transgenen Kartoffelpflanzen schließen, die das TMV-MP unter der Kontrolle des ST-LS1-Promotors exprimieren. Deren Wachstum war stark reduziert,

obwohl der Export von Photoassimilaten aus den Source-Blättern verbessert war (Olesinski *et al.* 1996, vgl. auch Kapitel 5.6, S. 110). Dazu passt außerdem eine kürzlich durchgeführte Studie an CMV-MP-transgenen Tabakpflanzen (Shalitin *et al.* 2002). Bei diesen Pflanzen war nicht nur der Kohlenhydratgehalt in den Source-Blättern reduziert sondern auch das Wachstum um bis zu 44,6%. Leider liefern die Autoren der Studie keine Erklärung für diese sich widersprechenden Ergebnisse. Der geringere Kohlenhydratgehalt wurde zwar mit einem verbesserten Export von Photoassimilaten aus den Source-Blättern erklärt. Verbesserter Export aus Source-Blättern kann aber nicht die Ursache für reduziertes Wachstum von Sink-Geweben sein.

Diese Befunde, zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, sprechen für die Annahme, dass es auch generelle MP-bedingte Auswirkungen auf das Wachstum gibt, die nicht im Zusammenhang mit den Veränderungen im Kohlenhydrathaushalt bzw. im Wurzel/Sprossverhältnis der transgenen Pflanzen stehen.

5.5 Einfluss des MP17N auf das Wachstum

5.5.1 Reduktion des Wachstums

Die generelle Wachstumsreduktion, wie sie auch bei vielen anderen MP-transgenen Pflanzen beobachtet wurde (Olesinski *et al.* 1996, Balachandran *et al.* 1997b, Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001, Shalitin *et al.* 2002) trat sowohl bei den Tomensa-Pflanzen aus den Ansätzen 1 bis 5 auf als auch bei den transgenen Linda-Pflanzen, die in der Voruntersuchung zu den Salzstress-Experimenten verwendet wurden. Letztere hoben sich von der Kontrollpflanze besonders deutlich durch die kleineren Blattflächen ab (ABBILDUNG 4-28, S. 79). Auch die transgenen Tomensa-Pflanzen hatten kleinere Blätter, wobei der Unterschied zur Kontrollpflanze nicht so stark ausgeprägt war wie bei den Linda-Pflanzen.

Die Wachstumsreduktion der transgenen Linien korrelierte offensichtlich mit dem Expressionsniveau des MP17N. Bei der Linie T-18, die das geringste Wachstum aufwies, war die Expression des MP17N am stärksten (vgl. ABBILDUNG 4-1 und ABBILDUNG 4-2, S. 37). Das Wachstum der Linien T-19 und T-20 war ebenfalls reduziert. Diese Pflanzen waren phänotypisch jedoch nur schwer von der Kontrollpflanze zu unterscheiden, hatten allerdings auch ein deutlich geringeres Expressionsniveau des MP17N als die Linie T-18. Diese Befunde decken sich nur zum Teil mit der Studie von Hofius *et al.* (2001). Danach war das Wachstum MP17-transgener Tabakpflanzen zwar auch abhängig vom Expressionsniveau reduziert. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen korrelierte dies aber zusätzlich mit dem Gehalt an Kohlenhydraten in den Source-Blättern.

Hierbei ist interessant, dass die ebenfalls von Hofius *et al.* (2001) untersuchten transgenen Tabakpflanzen, die das Fusionsprotein MP17:GFP exprimieren, von den Kontrollpflanzen phänotypisch nicht zu unterscheiden waren und der Vergleich mit einer im Wachstum stark beeinträchtigten MP17N-exprimierenden Tabakpflanze (Herbers *et al.* 1997) tatsächlich zeigte, dass letztere wesentlich mehr MP17N exprimierte als die anderen Pflanzen das MP17:GFP-Fusionsprotein.

5.5.2 Reduktion der Photosyntheseleistung

Bei den transgenen Tomensa-Pflanzen war die Photosyntheseleistung geringer als bei der Kontrollpflanze, und zwar unabhängig davon, ob sie Kohlenhydrate in ihren Source-Blättern akkumulierten oder nicht (TABELLE 4-9, S. 52, TABELLE 4-10, S. 53, TABELLE 4-13, S. 57, TABELLE 4-15, S. 59). Der Phosphat-(Pi)-Gehalt in den Blättern wurde in dieser Arbeit nicht gemessen. Ein reduzierter Pi-Gehalt könnte aber verantwortlich für die geringere Photosyntheseaktivität sein; denn Phosphat spielt bei deren Regulation eine wichtige Rolle. Die Phosphatkonzentration ist zudem ein Schlüsselfaktor bei der Regulation des Calvin-Zyklus und bei der Partitionierung von Kohlenstoff zwischen Saccharose- und Stärkesynthese (Stitt *et al.* 1990). In TMV-MP-transgenen Pflanzen wurde tatsächlich ein reduzierter Pi-Gehalt festgestellt und es konnte gezeigt werden, dass die externe Applikation von Pi bei abgeschnittenen Blättern die photosynthetische Elektronentransferrate auf das Niveau von Kontrollpflanzen anheben konnte (Wolf & Millatiner 2000). Die Autoren vermuten, dass das TMV-MP mit Elementen eines suprazellulären Kommunikationsnetzwerkes interferiert, die den Transport von Signalmolekülen zwischen verschiedenen Pflanzenorganen kontrollieren (Lucas *et al.* 1996, Jorgensen *et al.* 1998, Lucas *et al.* 2001). Eine Folge davon könnte die Inhibierung der Phosphataufnahme und/oder des Phosphattransportes sein (Wolf & Millatiner 2000).

Eine Modellrechnung ergab, dass die verringerte Biomasseproduktion relativ gut mit der reduzierten Photosyntheseleistung bei gleichzeitig reduzierter Blattfläche in Übereinstimmung gebracht werden kann (TABELLE 4-4, S. 42). Damit ist aber noch nicht geklärt, ob die geringere Photosyntheseleistung die Ursache für das verringerte Wachstum oder dessen Folge ist.

5.5.3 Direkter Einfluss des MP17N auf das Wachstum?

Vorausgesetzt, das MP17N wirkt sich nicht direkt auf das Wachstum aus, dann sollten die transgenen Pflanzen normales Wachstum zeigen, wenn ausreichend Photoassimilate zur Verfügung stehen. Bei den transgenen Linien aus dem ersten Ansatz war die Kohlen-

hydratkonzentration in allen Source-Blättern gegenüber der Kontrollpflanze deutlich erhöht, also auch in jenen, die noch nicht ihre volle Größe erreicht hatten. Wenn diese Blätter Photoassimilate im Überschuss haben, dann sollte man erwarten, dass deren Wachstum gefördert wird. Das Gegenteil ist aber der Fall, die Blätter der transgenen Pflanzen waren stets kleiner als die der Kontrollpflanze. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des MP17N in den transgenen Pflanzen das Wachstum direkt beeinflusst.

Zum selben Ergebnis führt die Analyse der Kohlenhydrate in den Sink-Blättern bei den Pflanzen des ersten Ansatzes. Zwar ist die Konzentration der löslichen Zucker in den Sink-Blättern der transgenen Linien geringer als bei der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-7, S. 47), was theoretisch mit einer Exporthemmung aus den Source-Blättern erklärt werden kann, in deren Folge das Wachstum der transgenen Pflanzen reduziert wird. Wenn die Mangelversorgung aber tatsächlich die Ursache für das reduzierte Wachstum ist, dann sollten die transgenen Pflanzen keine Stärke mehr in ihren Sink-Blättern speichern. Aber gerade bei der Linie T-18, deren Wachstum besonders stark reduziert war, ist der Stärkegehalt in den Sink-Blättern höher als bei der Kontrollpflanze (ABBILDUNG 4-8, S. 47). Diese Pflanze investiert die importierten Photoassimilate also nicht in Wachstum (Baustoffwechsel) sondern in die Speicherung von Stärke (Speicherstoffwechsel). Genauso verhält es sich mit der Sprossachse. Auch hier ist bei der Linie T-18 der Stärkegehalt gegenüber der Kontrollpflanze erhöht (ABBILDUNG 4-6 B, S. 46). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass das MP17N auch direkt das Wachstum der transgenen Linien beeinträchtigt.

5.5.4 Einfluss auf meristematische Entwicklung?

Wegen der offensichtlich generellen Wachstumsreduktion der transgenen Linien kann man vermuten, dass das MP17N bereits die meristematische Entwicklung beeinflusst. Dafür spricht auch die veränderte Zusammensetzung des sekundären Xylems bei den transgenen Tomensa-Pflanzen (vgl. Kapitel 4.3, S. 64). Ob es sich bei der Verdoppelung der Anzahl der Gefäßelemente (TABELLE 4-18, S. 69) um einen direkten Effekt auf die Xylemdifferenzierung handelt oder um einen sekundären Effekt, ist unklar. Da MPs aber bekanntermaßen mit Plasmodesmen interagieren und die Plasmodesmenfrequenz im Cambium der MP17N-transgenen Pflanzen verändert war (vgl. Kapitel 4.4, S. 66), ist es wahrscheinlich, dass das MP17N in meristematische Entwicklungsprozesse eingreift.

Bei der Entwicklung von Geweben spielt der Transport regulatorischer (Makro-)Moleküle durch Plasmodesmen eine wichtige Rolle (Ehlers & Kollmann 2001). Lucas *et al.* (1995) haben beispielsweise gezeigt, dass ein Transkriptionsfaktor (KN1) aus der L2-

Schicht im Sprossapikalmeristem von Mais durch Plasmodesmen in die L1-Schicht transportiert wird. Da KN1 ähnliche Eigenschaften besitzt wie MPs (vgl. auch Kapitel 2.4, S. 10), könnte die Überexpression des PLRV-MP17N in den transgenen Kartoffelpflanzen etwa den pflanzeigenen Transport regulatorischer Makromoleküle wie Transkriptionsfaktoren in den Meristemen beeinflussen. Dies könnte dadurch geschehen, dass das MP17N mit Proteinen interagiert, die am makromolekularen Transport durch Plasmodesmen beteiligt sind, zum Beispiel die postulierten PD-Rezeptor-/PD-Docking-Proteine oder Chaperone (vgl. ABBILDUNG 2-1, S. 9). Eine kompetitive Hemmung des Transports der für die Entwicklung erforderlichen Transkriptionsfaktoren könnte die Ursache für das reduzierte Wachstum sein. Dies würde auch erklären, warum das Wachstum bei der Linie T-18 am stärksten eingeschränkt ist, denn bei dieser Pflanze war auch das Expressionsniveau des MP17N am höchsten. Diesen Zusammenhang zwischen Expressionsniveau und Wachstumsreduktion haben auch Hofius *et al.* (2001) gefunden.

Genauso ist es denkbar, dass der Transport anderer Makromoleküle beeinträchtigt ist. Für KN1 wurde etwa gezeigt, dass dieses Protein auch die entsprechende *kn1*-RNA durch Plasmodesmen transportiert. Welche Bedeutung der KN1-vermittelte Transport der *kn1*-RNA hat, ist nicht bekannt. Man muss jedoch davon ausgehen, dass RNA-Transport bei Entwicklungsprozessen eine Rolle spielt, wobei RNA als Signalmolekül fungiert (Lucas *et al.* 1995, Jorgensen *et al.* 1998, Lucas *et al.* 2001). Auch MPs, wie das CMV-MP, sind in der Lage, den *kn1*-RNA-Transport durch Plasmodesmen zu bewerkstelligen, was daran liegt, dass MPs RNA unspezifisch binden können (Lucas *et al.* 1995). Letzteres gilt auch für das MP17N (Tacke *et al.* 1991). Wenn das MP17N die für den makromolekularen Transport durch Plasmodesmen bestimmte RNA bindet, kann sich dies ebenfalls in der Art einer kompetitiven Hemmung auf die meristematische Entwicklung der Pflanze auswirken.

Theoretisch wäre es auch möglich, dass das MP17N endogene Signalmoleküle in andere als die vorgesehenen Zellen transportiert, was erhebliche Konsequenzen für Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse hätte. Dagegen spricht allerdings der normale histologische Bau der transgenen Pflanzen. Die Expression des MP17N scheint solche Prozesse also nicht grundsätzlich zu stören, denn die transgenen Linien unterschieden sich weder in der Anzahl der Blätter von der Kontrollpflanze noch im Zeitpunkt der Blüten- bzw. Knollenbildung (Daten nicht gezeigt).

5.5.5 Verringerte Photosyntheseleistung und Kohlenhydratakkumulation als Folge reduzierten Wachstums?

Geht man davon aus, dass die Expression des MP17N tatsächlich Wachstumsprozesse direkt beeinflusst, dann ist die reduzierte Photosyntheseaktivität möglicherweise die Folge des verringerten Wachstums der transgenen Pflanzen in allen Ansätzen und nicht dessen Ursache. Es ist denkbar, dass die Photosyntheserate gesenkt wird, da aufgrund des gehemmten Wachstums weniger Photoassimilate benötigt werden. Dies würde auch erklären, warum im Ansatz 5 die an die niedrige Lichtintensität angepassten transgenen Pflanzen, die sechs Stunden lang einer mehr als vierfach erhöhten Lichtintensität ausgesetzt wurden, gegenüber der Kontrollpflanze einen leicht erhöhten Stärkegehalt in ihren Source-Blättern aufwiesen (TABELLE 4-16 C, S. 61). Die plötzliche Erhöhung der Lichtintensität führte zu einer drastischen Steigerung der Photosyntheseaktivität. Wegen der Adaptation der Pflanzen an eine geringe Lichtintensität und wegen des verringerten Wachstums der MP17N-transgenen Pflanzen konnten die zusätzlichen Photoassimilate nicht in gleichem Maße wie bei der Kontrollpflanze in zusätzliche Biomasseproduktion investiert werden, was zu einem Rückstau an Photoassimilaten führte. Die Folge ist der beobachtete erhöhte Stärkegehalt in den Blättern.

5.6 Abhängigkeit der MP17N-bedingten Effekte vom Entwicklungszustand

Wie bei den hier untersuchten transgenen Pflanzen wurde auch bei den transgenen Kartoffelpflanzen, die das TMV-MP unter der Kontrolle des ST-LS1-Promotors exprimieren, eine Abhängigkeit des MP-Effektes auf den Kohlenhydratgehalt vom Entwicklungszustand der Pflanzen festgestellt (Olesinski *et al.* 1996). Bei diesen Pflanzen war nach der Induktion der Knollenbildung der Export von Photoassimilaten aufgrund der gewebsspezifischen Expression des TMV-MP in grünem Blattgewebe erhöht und der Kohlenhydratgehalt in den Source-Blättern folglich gegenüber der Kontrollpflanze reduziert (TABELLE 5-1, S. 118). Vor der Knollenbildung unterschieden sich die transgenen Pflanzen diesbezüglich nicht von der Kontrollpflanze. Daraus schlossen die Autoren, dass die Mesophyllplasmodesmen erst durch den erhöhten Bedarf an Photoassimilaten aufgrund der Knollenproduktion zum limitierenden Faktor beim symplasmatischen Saccharosetransport zum Phloem werden. Nach dieser Interpretation führte die TMV-MP-induzierte Erweiterung des Durchmessers der Plasmodesmen dann zu den verbesserten Exportraten. Bei den älteren transgenen Pflanzen war der Export von Photoassimilaten aus den Source-Blättern also gegenüber den jüngeren Pflanzen erhöht.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen sich zum Teil auf ähnliche Weise interpretieren. Im zweiten Ansatz hatten die Versuchspflanzen bei der Ernte bereits mit der Knollenbildung begonnen (TABELLE 4-8, S. 52). Es bestand also ein höherer Bedarf an Photoassimilaten. Da auch das MP17N offensichtlich in der Lage ist, das SEL von Mesophyll-Plasmodesmen zu vergrößern (vgl. Hofius *et al.* 2001), ist es vorstellbar, dass bei den MP17N-exprimierenden Kartoffelpflanzen der symplasmatische Saccharosetransport zum Phloem verbessert war. Dies könnte der Grund dafür sein, dass es bei den transgenen Pflanzen im zweiten Ansatz im Gegensatz zum ersten Ansatz zu keiner Akkumulation von Kohlenhydraten mehr kam (vgl. ABBILDUNG 4-5, S. 42 und ABBILDUNG 4-11, S. 54).

Dieses Modell kann aber weder die generelle Wachstumsreduktion der TMV-MP-transgenen (Olesinski *et al.* 1996, vgl. Kapitel 5.4, S. 105) noch die der MP17N-transgenen Kartoffelpflanzen erklären. Denn die Ansätze 3 und 4 zeigen, dass bei den MP17N-exprimierenden Pflanzen auch ohne Knollenproduktion der Kohlenhydratgehalt gegenüber den transgenen Pflanzen aus dem ersten Ansatz gesunken ist (vgl. ABBILDUNG 4-15, S. 57 und ABBILDUNG 4-16, S. 59 mit ABBILDUNG 4-5, S. 42). Für die vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängigen Effekte auf den Kohlenhydratgehalt muss es daher eine andere Ursache geben.

Möglicherweise steht sie mit Modifikationen von Phloem-Plasmodesmen in Verbindung. Es ist interessant, dass neun von zehn Studien über MPs an transgenen Pflanzen aus der Familie der *Solanaceae* durchgeführt wurden, nämlich an Tabak- und Kartoffelpflanzen (TABELLE 5-1, S. 118). Kürzlich wurde bei einer weiteren *Solanaceae*, der Tomatenpflanze (*Lycopersicon esculentum*), gezeigt, dass abhängig vom Entwicklungszustand strukturelle Veränderungen in Plasmodesmen des so genannten internen Phloems auftreten (Ehlers, persönliche Kommunikation). Bei *Solanaceae* gibt es die anatomische Besonderheit, dass zusätzlich zum externen Phloem außerhalb des Cambiums auch interne Phloemstränge innerhalb des Xylemzylinders verlaufen (Metcalf & Chalk 1957). Es wird vermutet, dass das interne Phloem vor allem für die Versorgung der apikalen Organe mit Photoassimilaten verantwortlich ist, während das externe Phloem den Transport in basaler Richtung übernimmt und auch die lateralen Achsengewebe entlang des Transportweges versorgt (Bonnemain 1970, Ait-Hskiko 2002).

Bei jungen Tomatenpflanzen, die noch nicht geblüht haben, trat in den Geleitzellen des internen Phloems eine stark elektronendichte Substanz auf, die sich in den PPU's und in den Plasmodesmen zwischen benachbarten Geleitzellen ablagerte. Im externen Phloem wurde diese Substanz nicht beobachtet und nachdem die Pflanzen geblüht

hatten, wurde sie auch nicht mehr im internen Phloem gefunden¹ (Ehlers, persönliche Kommunikation). Welche Funktion dies entwicklungsabhängige Modifikation hat ist nicht bekannt. Diese Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Blühinduktion bei *L. esculentum* mit Veränderungen der Struktur und eventuell der Funktionsfähigkeit von symplasmatischen Verbindungen im internen Phloem einhergeht. Da MPs mit Plasmodemen interagieren und das Phloem integraler Bestandteil des postulierten suprazellulären Kommunikationsnetzwerkes ist (Jorgensen *et al.* 1998, Lucas *et al.* 2001, Ruiz-Medrano *et al.* 2001), ist es vorstellbar, dass MP-induzierte Auswirkungen wie zum Beispiel die Reduktion des Wurzel/Spross-Verhältnisses (vgl. Lucas & Wolf 1999) oder die Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus (vgl. Olesinski *et al.* 1996) nur in bestimmten Entwicklungsstadien auftreten.

5.7 Erklärungsmodelle

Für die MP-induzierten Effekte auf den Kohlenhydratmetabolismus, die Kohlenhydratpartitionierung und auf das Wachstum werden entweder ein gehemmter Export von Photoassimilaten aus den Source-Blättern (Herbers *et al.* 1997) oder eine veränderte Allokation von Photoassimilaten zu den verschiedenen Pflanzenorganen verantwortlich gemacht (Lucas & Wolf 1999). Bei den hier untersuchten transgenen Kartoffelpflanzen wurden Belege für beide Hypothesen gefunden. Die vorliegenden Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass je nach Entwicklungszustand der Pflanzen entweder der Export gehemmt (Ansatz 1, vgl. Kapitel 4.2.1, S. 38) oder das Wurzel/Spross-Verhältnis reduziert war (Ansätze 2 bis 4, vgl. Kapitel 4.2.2, S. 49 bis Kapitel 4.2.4, S. 58). Beides kann zur Wachstumsreduktion geführt haben. Es ist aber auch denkbar, dass das MP17N direkt das Wachstum der transgenen Linien beeinflusst hat (vgl. Kapitel 5.3.5, S. 107). Die Kohlenhydratakkumulation (Ansatz 1) und die Veränderung im Wurzel/Spross-Verhältnis (Ansätze 2 bis 4) wären demnach indirekte Folgen der MP17N-Expression. Im folgenden werden daher zwei Modelle gegenübergestellt, die dies illustrieren (ABBILDUNG 5-1, S. 115).

¹ Bei den „aufgeblasenen“ Phloem-Plasmodemen in jungen MP17N-transgenen Tabakpflanzen, die von Herbers *et al.* (1997) beschrieben wurden, handelt es sich um PPU's (vgl. Kapitel 5.3.3, S. 103). Diese PPU's scheinen ebenfalls von einer elektronendichten Substanz „verstopft“ zu sein, so wie es im internen Phloem von *L. esculentum* zu sehen ist. Aus den Erläuterungen dazu geht allerdings nicht hervor, ob es sich hierbei um internes oder externes Phloem handelt.

Modell 1. Dieses Modell erklärt die beobachteten MP17N-induzierten Phänomene anhand der bereits in der Literatur beschriebenen Vorstellungen, wobei zwei Entwicklungsstadien unterschieden werden. Bei den entwicklungsphysiologisch jungen transgenen Pflanzen (Ansatz 1, blau) ist der Export von Photoassimilaten gehemmt, was zur erhöhten Stärkesynthese, zur Reduzierung der Photosyntheserate und damit zur Wachstumsreduktion führt. Die Konsequenz hieraus ist außerdem eine mangelnde Versorgung der Meristeme mit Photoassimilaten. Darauf reagieren die transgenen Pflanzen mit der Erhöhung der Plasmodesmenfrequenz im Sprossscambium und dessen Derivaten (Kapitel 4.4, S. 66) um die Versorgung der Zellen mit Photoassimilaten zu optimieren. Die Erhöhung der Plasmodesmenfrequenz wäre demnach eine indirekte Folge der MP17N-Expression.

Das MP17N beeinflusst bei den entwicklungsphysiologisch älteren transgenen Pflanzen (Ansätze 2 bis 4, grün) die Signalübermittlung, die die Allokation der Photoassimilate zu den verschiedenen Organen reguliert, was zur Reduktion des Wurzel/Spross-Verhältnisses führt (Lucas & Wolf 1999). Dadurch ist die Versorgung des Sprosses mit Wasser beeinträchtigt, weil die relative Oberfläche der Wurzel kleiner geworden ist. Als Reaktion darauf verkleinern die transgenen Pflanzen den Öffnungsgrad der Stomata, um die Transpirationsrate zu reduzieren. Die Folge hiervon ist eine verminderte CO₂-Aufnahme, was die geringere Photosyntheserate und damit das verringerte Wachstum erklärt.

Es ist denkbar, dass die älteren transgenen Pflanzen aufgrund des durch die relativ kleineren Wurzeln bedingten Wassermangels die Leitungskapazität für Wasser erhöhen. Nach dieser Vorstellung wäre die Verdoppelung der Anzahl an Gefäßelementen (Kapitel 4.4, S. 66) keine direkte Folge der MP17N-Expression auf Wachstums- bzw. Differenzierungsprozesse sondern eine Reaktion der Pflanze auf Wassermangel. Dazu passt auch, dass eine deutliche Zunahme der Anzahl der Gefäßelemente gegenüber der Kontrollpflanze erst im sekundären Xylem auftrat.

Modell 2. Primärer Effekt der MP17N-Expression ist der Einfluss auf das Wachstum der transgenen Pflanzen. Das MP17N wirkt sich zudem direkt auf Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse in den Meristemen aus. Der Grund hierfür liegt in der speziellen Eigenschaft des MP17N (und anderer MPs), mit einem endogenen Zell-zu-Zell-Transportsystem zu interagieren, das bei Wachstumsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Ein höheres Expressionsniveau des MP17N verstärkt dabei die Effekte, wie der Vergleich der Linien T-18 und T-20 zeigt.

Die veränderten Plasmodesmenfrequenzen im Sprosscambium der transgenen Pflanzen sind ein Beispiel für einen direkten vom Expressionsniveau abhängigen, MP17N-induzierten Effekt auf Differenzierungsprozesse. Die Plasmodesmenfrequenz im Cambium war bei der Linie T-18 wie das Expressionsniveau wesentlich höher als bei der Linie T-20.

Auch die Verdopplung der Anzahl der Gefäßelemente in der Sprossachse der transgenen Pflanzen könnte eine direkte Folge des MP17N auf Differenzierungsvorgänge sein. Dies trat jedoch erst im sekundären Xylem auf, was bedeutet, dass die Differenzierung der primären Sprossachse diesbezüglich nicht betroffen ist. Außerdem korrelierte die Veränderung in der Anzahl der Gefäßelemente im Gegensatz zur Plasmodesmenfrequenz im Cambium offensichtlich nicht mit dem Expressionsniveau des MP17N.

Aufgrund der MP17N-bedingten generellen Wachstumsreduktion verringert sich der Bedarf an Photoassimilaten, weswegen die Photosyntheserate gesenkt wird. Bei den entwicklungsphysiologisch jungen Pflanzen (Ansatz 1, blau) wirkt sich der verringerte Bedarf an Photoassimilaten auch auf den Export aus und führt zur Akkumulation von Stärke (und löslichen Zuckern) in den Source-Blättern, was ebenfalls zur Reduktion der Photosyntheserate beigetragen haben kann.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass bei den entwicklungsphysiologisch jungen transgenen Pflanzen zusätzlich der Export von Photoassimilaten aus den Source-Blättern gehemmt ist, was die im Modell 1 beschriebenen Konsequenzen hätte.

Die entwicklungsphysiologisch älteren Pflanzen (Ansätze 2 bis 4, grün) vergrößern durch bevorzugte Investition von Assimilaten in den Spross die photosynthetisierende Oberfläche, um so die Wachstumshemmung zu kompensieren. Dadurch verschiebt sich das Wurzel/Spross-Verhältnis zugunsten des Sprosses. Auch hier ist nicht auszuschließen, dass es (zusätzlich?) einen direkten Effekt des MP17N auf die Signalübermittlung gibt, der, wie im Modell 1 beschrieben, zur Verschiebung des Wurzel/Spross-Verhältnisses geführt hat.

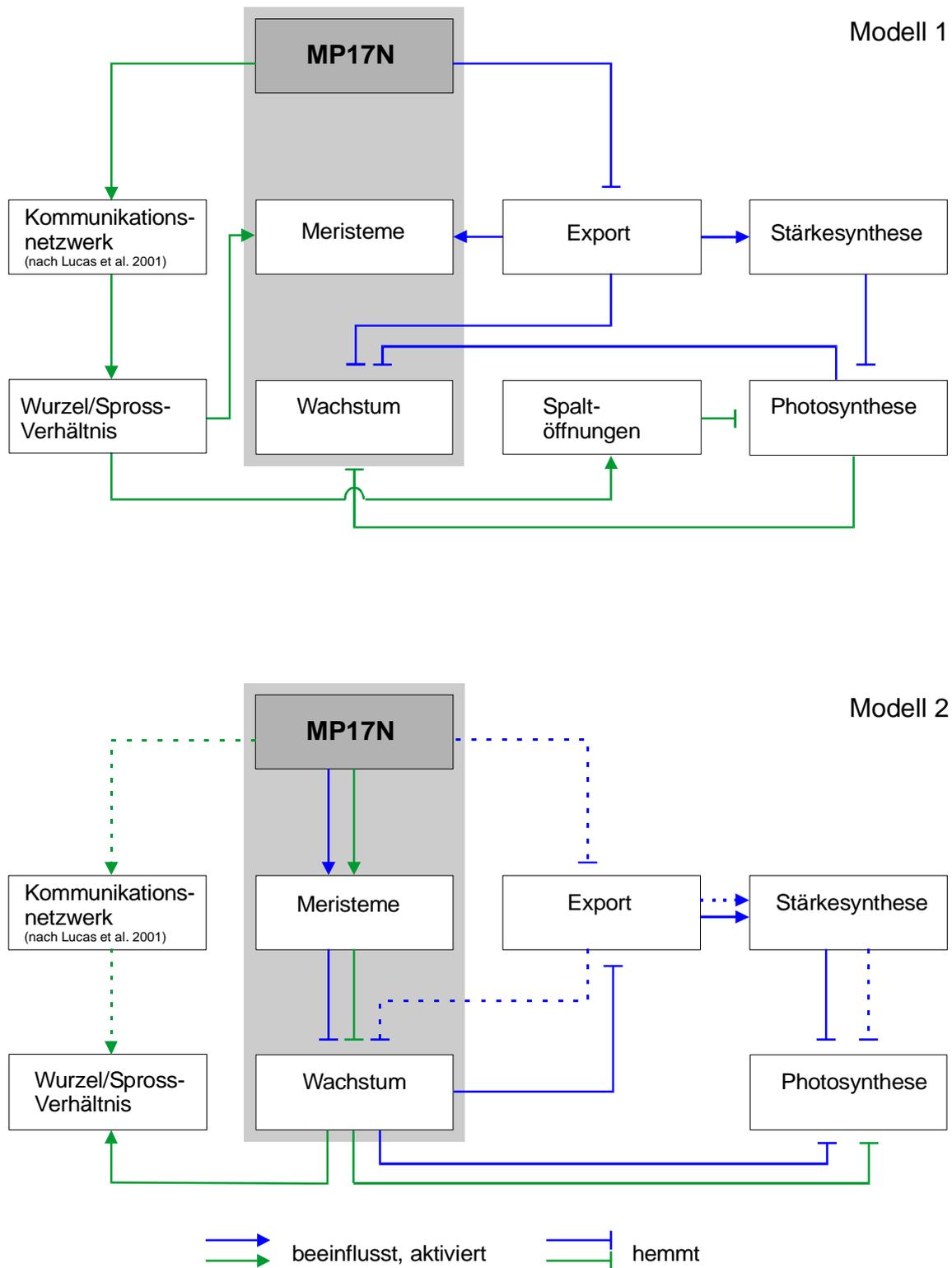


ABBILDUNG 5-1. Gegenüberstellung zweier Modelle, die die Effekte der MP17N-Expression auf das Wachstum der transgenen Pflanzen erklären können. Dabei wird zwischen entwicklungsphysiologisch jungen (blau) und entwicklungsphysiologisch alten (grün) Pflanzen unterschieden. Erläuterungen im Text. PDs, Plasmodesmen.

5.8 Fazit

Die Expression des MP17N in den transgenen Linien führte zu zahlreichen physiologischen oder strukturellen Veränderungen: (1) Generelle Wachstumsreduktion bei allen MP17N-exprimierenden Tomensa-Pflanzen und auch bei den Linda-Pflanzen. (2) Generelle Reduktion der Photosynthese- und Transpirationsrate. (3) Drastische Erhöhung des Kohlenhydratgehalts in Source-Blättern nur bei entwicklungsphysiologisch jungen Pflanzen, die direkt aus der Sterilkultur kamen. (4) Reduktion des Wurzel/Spross-Verhältnisses nur bei den entwicklungsphysiologisch älteren Pflanzen. (5) Erhöhung der Plasmodenfrequenz im Cambium und dessen Derivaten. (6) Verdopplung der Anzahl an Gefäßelementen im sekundären Xylem.

Einige dieser Ergebnisse wurden bereits in der Literatur als Folge der Expression von MPs beschrieben. Diese Studien über die Effekte von MPs sind jedoch nicht konsistent (TABELLE 5-1, S. 118), was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Hierfür gibt es eine Reihe von möglichen Ursachen. Lediglich in einer Arbeit wurde konsequent das Expressionsniveau berücksichtigt (Hofius *et al.* 2001). Auch der Entwicklungszustand wurde bisher nur in einer Studie berücksichtigt (Olesinski *et al.* 1996). Außerdem wurden MPs von Viren in transgenen Pflanzen untersucht, die nicht den natürlichen Wirt repräsentieren (Herbers *et al.* 1997, Hofius *et al.* 2001). Zudem wurden die MPs zum Teil unter der Kontrolle gewebsspezifischer Promotoren exprimiert (Olesinski *et al.* 1996, Almon *et al.* 1997).

Die eigentliche Funktion von MPs nach einem Virenbefall ist der Transport von vRNA. Zu diesem Zweck interagieren MPs mit Komponenten eines endogenen Zell-zu-Zell-Transportsystems (vgl. ABBILDUNG 2-1, S. 9). Die Integration des *mp17n*-Gens in das Genom der Pflanze darf jedoch nicht mit einem natürlichen Virenbefall verglichen werden. Durch die konstitutive Expression unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors liegt das MP17N von Beginn an in allen Geweben der transgenen Pflanzen vor. Bei einer natürlichen Virusinfektion wird dagegen eine bereits ausdifferenzierte Pflanze befallen und im speziellen Fall des PLRV bleibt das Virus auf das Phloem beschränkt.

Da MPs allgemein mit pflanzlichen Komponenten des Zell-zu-Zell-Transportsystems interagieren und dieses System eine wesentliche Rolle bei Differenzierungsprozessen und bei der Signalübermittlung spielt (vgl. Kapitel 2.4 und 2.5), sind eine Vielzahl von entwicklungsbiologischen und physiologischen Konsequenzen denkbar. Dies ist vermutlich der Grund für die enorme Komplexität der Auswirkungen des MP17N (und anderer MPs) in den transgenen Pflanzen.

Die Tatsache, dass bei den hier untersuchten Pflanzen eine generelle Wachstumsreduktion beobachtet wurde und dies auch in den meisten anderen Studien festgestellt wurde (TABELLE 5-1), deutet darauf hin, dass durch die konstitutive Expression von MPs Wachstumsprozesse direkt beeinflusst werden können und viele physiologische Veränderungen als indirekte Folge dieses primären Effektes gedeutet werden können. Unterstützt wird diese neue Hypothese durch den Befund, dass durch die Expression des MP17N die Plasmodesmenfrequenz im Cambium und dessen Derivaten verändert (Kapitel 4.5, S. 71) und die Anzahl der Gefäßelemente verdoppelt wird (Kapitel 4.4, S. 66). Es sind jedoch weitere Experimente nötig, um auszuschließen, dass es sich bei den beiden letztgenannten Beobachtungen um indirekte Folgen der MP17N-Expression handelt.

TABELLE 5-1. Zusammenstellung der Studien an MP-transgenen Pflanzen (vgl. Einleitung), ergänzt um die Ergebnisse dieser Arbeit. BM, Biomasse der Pflanze; Exp, Export aus Blättern (Exsudate oder radioaktive Markierung von CO₂); KH, Kohlenhydrat; LZ, Lösliche Zucker; MP, Movement Protein; PD, Plasmodesmen; PS, Photosynthese; R, Referenz; St, Stärke; W/S, Wurzel/Spross-Verhältnis. ↑ = deutlicher Anstieg, ↗ = leichter Anstieg, → = unverändert, ↘ = leichter Rückgang ↓ = deutlicher Rückgang.

MP	Pflanze	BM	St	LZ	PS	Exp	W/S	Bemerkungen	R
TMV-MP	<i>Nicotiana tabacum</i>	→	↑	↑	↘		↓	Nur in ausdiff. Source-Blättern.	1
TMV-MP (Deletionsmutante)	<i>Nicotiana tabacum</i>						↓ ^a	Einfluss auf W/S ist <i>unabhängig</i> von MP-PD-Interaktion.	2
TMV-MP (temperatursensitive Mutante)	<i>Nicotiana tabacum</i>		↑	↑		↓ ^b		Einfluss auf KH-Akkumulation ist <i>unabhängig</i> von MP-PD-Interaktion.	3
TMV-MP	<i>Nicotiana tabacum</i>								4
	Standardbed.:	↓				→	↓		
	Wasserstress:	↓				→	→		
TMV-MP	<i>N. tabacum</i>					↓		Kein Einfluss auf photochemische Komponenten	5
TMV-MP	<i>Solanum tuberosum</i>							Kein Einfluss des MP auf Entw.: Trotz signifikanter Unterschiede in der BM gleiche Anzahl von Blättern.	6
	Expression in Blättern: ^e	↓	↓ ^c → ^d	↓ ^c → ^d	↓	↑			
	in Knollen:	→	→	→					
TMV-MP	<i>Solanum tuberosum</i>	↑	↑	↑	→	↓	↓	Phloem-spezifische Expression!	7
PLRV-MP17N	<i>Nicotiana tabacum</i>	↓	↑	↑	↓				8
PLRV-MP17	<i>Nicotiana tabacum</i>								9
	viel MP17:	↓	↑	↑					
	wenig MP17:	→	↓	↓					
CMV-MP	<i>Nicotiana tabacum</i>	↓	↓	↓			↓		10
CMV-MP-GFP	<i>Nicotiana tabacum</i>	↓	↓	↓			↓		
CMV-MP oder TMV-MP	<i>Cucumis melo</i> ^f					↑		Keine transgene Pflanze, Expression mittels eines Virus-Vektor-Systems (ZYMV)	
PLRV-MP17N	<i>Solanum tuberosum</i>								11
	„jung“	↓ ^g	↑	↑	↓ ^g	↓	→		
	„alt“	↓ ^g	→	→	↓ ^g	→	↓		

^a Vorhandensein des TMV-MP lediglich im Mesophyll ist ausreichend für die Veränderung des W/S-Verhältnisses; Expression ausschl. im Phloem hat keine Konsequenzen. ^b Aus voll ausdifferenzierten Source-Blättern und jungen, expandierenden Source-Blättern. ^c Nach 52 Tagen: bei Saccharose deutliche, bei Glukose nur sehr geringe, bei Fruktose keine Reduktion. ^d Nach 38 Tagen. ^e Vorhandensein des MP im Spross reicht aus für die Wirkung auf Kohlenstoffmetabolismus bzw. -partitionierung. ^f Diese Pflanze gehört zu den symplasmatischen Phloembeladern (Tabak- und Kartoffelpflanze gehören zu den apoplasmatischen Phloembeladern, van Bel & Gamalei 1992). ^g Allen Experimenten gemein war lediglich das reduzierte Wachstum und die verringerte Photosyntheseleistung.

1: Lucas *et al.* 1993a, 2: Balachandran *et al.* 1995, 3: Olesinski *et al.* 1995, 4: Balachandran *et al.* 1997b, 5: Wolf & Millantiner 2000, 6: Olesinski *et al.* 1996, 7: Almon *et al.* 1997, 8: Herbers *et al.* 1997, 9: Hofius *et al.* 2001, 10: Shalitin *et al.* 2002, 11: Diese Arbeit.

5.9 Untersuchungen zur Salztoleranz

5.9.1 Vorversuch mit MP17N-transgenen Linda-Pflanzen

Es wurde vermutet, dass die transgenen Kartoffelpflanzen tolerant gegen Salzstress sein könnten, wenn sie aufgrund der Expression des MP17N lösliche Zucker in ihren Blättern akkumulieren und dadurch einen osmotischen Ausgleich zwischen dem Zellinneren und dem Außenmedium erreichen (Fukushima *et al.* 2001, Rohde *et al.* 2000). Bestätigt wurde diese Idee durch die Voruntersuchungen an MP17N-transgenen Linda-Pflanzen, die 100 mM NaCl ausgesetzt wurden. Die Kategorie I-Blätter dieser Pflanzen hielten dem Salzstress tatsächlich länger stand (ABBILDUNG 4-29, S. 79). Bereits in diesem Experiment fiel jedoch auf, dass sich die transgenen Pflanzen phänotypisch kaum noch von der Kontrollpflanze unterschieden. Nach der NaCl-Applikation waren bei allen untersuchten Pflanzen sowohl deren Längenzuwächse als auch deren Biomasse etwa gleich groß (ABBILDUNG 4-27, S. 78). Die NaCl-Belastung hemmte das Wachstum also so stark, dass die MP17N-bedingten Unterschiede in der Biomasse nicht mehr zum Ausdruck kamen. Dies erklärt die besonders starke Wachstumsreduktion der Kontrollpflanze durch den Salzstress (73% gegenüber 53% und 19% bei den Linien L-7 und L-8, vgl. ABBILDUNG 4-27 B, S. 78). Letzteres wird besonders gut durch den Vergleich der Blattgrößen illustriert (ABBILDUNG 4-28, S. 79). Zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze wurden keine Unterschiede in der Stomatadichte gefunden (Daten nicht gezeigt). Es ist also möglich, dass die transgenen Pflanzen allein aufgrund der bereits unter Standardbedingungen kleineren Blattflächen besser an Salzstress „angepasst“ waren als die Kontrollpflanzen.

5.9.2 Salzstress-Experimente an MP17N-transgenen Tomensa-Pflanzen

Auch die transgenen Tomensa-Pflanzen hielten dem Salzstress länger stand als die Kontrollpflanzen, wenn auch nicht so deutlich wie die in der Voruntersuchung getesteten transgenen Linda-Pflanzen. Bei den Tomensa-Pflanzen hob sich phänotypisch lediglich die Linie T-18 deutlich von der Kontrollpflanze ab (ABBILDUNG 4-30, ABBILDUNG 4-31, S. 81). Die Kategorie I-Blätter der Linie T-18 waren nach zwei Wochen noch völlig intakt, während jene der Kontrollpflanze bereits völlig verwelkt waren. Bei den Linien T-19 und T-20 war dies deutlich weniger ausgeprägt, aber auch sie tolerierten den Salzstress einige Tage länger als die Kontrollpflanze, wie an den etwas besseren Photosyntheseleistungen der Kategorie I-Blätter zu erkennen ist (ABBILDUNG 4-33 B, S. 88).

Interessanterweise wurde diese leicht verbesserte NaCl-Toleranz in beiden Experimenten (Ansatz 1 und Ansatz 2) beobachtet, wobei der Vorteil der transgenen Linien gegenüber der Kontrollpflanze im zweiten Ansatz größer zu sein schien. Der in Bezug auf die Ausgangshypothese wesentliche Unterschied zwischen diesen Ansätzen war, dass die Pflanzen unter Standardbedingungen, also ohne Zugabe von 100 mM NaCl, einmal Kohlenhydrate akkumulierten und einmal nicht. Bei den transgenen Linien, die unter Standardbedingungen Kohlenhydrate akkumulierten (Ansatz 1), war der Kohlenhydratgehalt gegenüber der Kontrollpflanze auch nach der NaCl-Behandlung erhöht (ABBILDUNG 4-34 A–D, S. 90). Bei den entsprechenden Pflanzen, die unter Standardbedingungen keine Kohlenhydrate akkumulierten (Ansatz 2), waren auch nach der NaCl-Behandlung keine deutlichen Unterschiede zwischen der Kontrollpflanze und den transgenen Linien zu beobachten (ABBILDUNG 4-34 E–H, S. 90). Hier bildet die Linie T–18 allerdings eine Ausnahme. Unter Salzstress waren bei ihr sowohl der Gehalt an Stärke, als auch der Glukose- und Fruktosegehalt gegenüber der Kontrollpflanze erhöht, jedoch nicht so stark wie im ersten Ansatz. Beim Saccharosegehalt war dagegen nur ein sehr geringer, nicht signifikanter, Anstieg zu erkennen.

Damit stellt sich die Frage, ob der Anstieg des Gehalts an löslichen Zuckern wirklich verantwortlich für die beobachtete Toleranz ist.

Für diese Vermutung sprechen die Ergebnisse, die mit der Linie T–18 erzielt wurden. In allen Salzstress-Experimenten hob sich diese Linie besonders deutlich von den anderen Pflanzen ab, indem nur bei ihr die Kategorie I-Blätter deutlich später die NaCl-bedingten Symptome zeigten. Und nur diese Linie hatte in beiden Experimenten einen höheren Gehalt an löslichen Zuckern in ihren Source-Blättern als die Kontrollpflanze. Zudem war nur bei der Linie T–18 in beiden NaCl-Ansätzen das osmotische Potenzial in den Blättern gegenüber der Kontrollpflanze (und gegenüber den Linien T–19 und T–20) erhöht, und zwar jeweils um ca. 90 mosmol/kg (TABELLE 4-24, S. 96), dies entspricht einer Zunahme gegenüber der Kontrollpflanze um ca. 20%. Es ist aber fraglich, ob diese Veränderungen alleine durch einen Anstieg im Gehalt löslicher Zucker hervorgerufen wurden. Denn erstens reicht der geringfügig höhere Zuckergehalt nicht aus, um das höhere osmotische Potenzial der Linie T–18 zu erklären und zweitens war das osmotische Potenzial auch bereits unter Standardbedingungen um etwa 14% gegenüber der Kontrollpflanze erhöht. Das heißt, das höhere osmotische Potenzial in den Blättern der Linie T–18 steht nicht notwendigerweise alleine mit einem höheren Gehalt löslicher Zucker in Zusammenhang.

Wie bei anderen Pflanzen der Gattung *Solanum* (Martinez *et al.* 1996) führte der Salzstress zu einem Anstieg des Prolingehalts in den Blättern der untersuchten Pflanzen. Dieser war jedoch nicht verantwortlich für die beobachtete NaCl-Toleranz der transgenen Tomensa-Pflanzen. Zwar war im ersten Ansatz der Gehalt dieser Aminosäure bei den transgenen Linien auch unter 100 mM NaCl gegenüber der Kontrollpflanze deutlich erhöht (ABBILDUNG 4-35 D, S. 92). Diese verstärkte Prolinsynthese scheint aber kein genereller Effekt der MP17N-Expression zu sein sondern ausschließlich mit der Akkumulation von löslichen Zuckern dieser Pflanzen in Verbindung zu stehen; denn bei den transgenen Pflanzen, die keine löslichen Zuckern akkumulierten (Ansatz 2), war auch unter Salzstress gegenüber der Kontrollpflanze kein erhöhter Prolingehalt festzustellen (ABBILDUNG 4-36 D, S. 93).

Auch die Kationenanalyse lieferte keine Hinweise, die die leichte Salztoleranz der transgenen Pflanzen erklären könnte. Die transgenen Pflanzen, die unter Standardbedingungen Kohlenhydrate in ihren Source-Blättern akkumulierten, hatten auch einen höheren Kaliumgehalt (Ansatz 1). Entsprechend war bei diesen Pflanzen unter Salzstress der Gehalt an Kalium- und Natriumionen höher (TABELLE 4-23, S. 94). Im zweiten Ansatz gab es diesbezüglich jedoch keine einheitlichen Unterschiede. Der höhere Kationengehalt steht demnach offensichtlich mit einem höheren Kohlenhydratgehalt in Verbindung.

5.9.3 Fazit

Die beobachtete Verzögerung bei der Ausprägung der für Salzstress typischen Symptome scheint mit der MP17N-induzierten Wachstumsreduktion in Verbindung zu stehen. Geringeres Wachstum ist eine allgemeine Folge von Salzstress auf nicht-resistente Pflanzen (Larcher 1994). Die daraus resultierenden kleineren Blattoberflächen haben für die salzgestressten Pflanzen den Vorteil, dass so der Wasserverlust durch Transpiration reduziert wird. Bei Beginn der NaCl-Applikation war dieser Zustand bei den transgenen Pflanzen bereits erreicht, während die Kontrollpflanze erst im weiteren Verlauf des Experiments kleinere Blätter bildete (vgl. ABBILDUNG 4-28, S. 79). Die Verschiebung des Wurzel/Spross-Verhältnisses zugunsten des Sprosses bei den Pflanzen aus dem zweiten Ansatz begünstigt möglicherweise zusätzlich die transgenen Pflanzen, denn so wird die Oberfläche der Wurzeln relativ zum Spross reduziert, wodurch relativ weniger Na⁺- und Cl⁻-Ionen aufgenommen werden.

Die Expression des MP17N in den transgenen Kartoffelpflanzen führt jedoch nicht zu einer generellen Salztoleranz. Denn es hat sich gezeigt, dass sich die transgenen Pflanzen nicht mehr von der Kontrollpflanze unterscheiden, wenn die Pflanzen über einen

längeren Zeitraum als in den Ansätzen 1 und 2 der hohen NaCl-Belastung (100 mM) ausgesetzt werden (vgl. Kapitel 4.7.3.1, S. 80). Gerade die Linie T-18, bei der die NaCl-bedingten Symptome bei den Kategorie I-Blättern deutlich später auftraten als bei den anderen untersuchten Pflanzen, hatte in allen Experimenten die geringsten Wachstumsraten. Zudem war bei dieser Linie unter Salzstress die Photosyntheseleistung der neu entwickelten Blätter (Kategorie II) stark reduziert. Da aus landwirtschaftlicher Sicht nur Pflanzen in Betracht kommen, die auch einen hohen Ertrag versprechen (vgl. Pitman & Läuchli 2002), sind die MP17N-exprimierenden Kartoffelpflanzen für den Anbau auf salinen Böden eher ungeeignet.

5.10 Ausblick

Wie in der Diskussion angeführt, greifen MPs vermutlich in mehrere voneinander unabhängige physiologische Prozesse ein. Die Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanzen, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, deutet zudem darauf hin, dass Interaktionen mit pflanzeigenen Faktoren bei der Ausprägung der MP-induzierten Phänomene eine Rolle spielen. Die Frage, ob vor allem eine Exporthemmung von Photoassimilaten aus Source-Blättern für das reduzierte Wachstum der MP17N-transgenen Pflanzen (z. B. Herbers et al. 1997) verantwortlich ist oder eine Störung in der Signalübermittlung, die die Zuteilung von Photoassimilaten zu den verschiedenen Pflanzenorganen kontrolliert (Lucas et al. 1999), konnte nicht geklärt werden. Vielmehr lassen die vorliegenden Ergebnisse eine weitere Interpretationsmöglichkeit zu, nämlich die, dass durch das MP17N Wachstumsprozesse direkt beeinflusst werden. Die Hemmung des Wachstums könnte also sowohl die Ursache als auch die Folge der Kohlenhydratakkumulation bzw. der Veränderung im Wurzel/Spross-Verhältnis sein (vgl. ABBILDUNG 5-1, S. 115).

Im folgenden werden einige Experimente skizziert, die dazu beitragen könnten, die möglichen Ursachen für die beobachteten Phänomene weiter einzugrenzen.

Die Vermehrung der Versuchspflanzen durch Stecklinge oder durch Knollen hat den Nachteil, dass zu Beginn des Experiments bei den transgenen Pflanzen bereits eine Wachstumsreduktion stattgefunden hat, die Anfangsvoraussetzungen also nicht gleich sind. Es wäre daher besser, in einer Folgestudie das Wachstum der MP17N-transgenen Pflanzen an auskeimenden Samen zu untersuchen. Ultrastrukturelle Untersuchungen wie zum Beispiel die Bestimmung von Plasmodesmenfrequenzen in verschiedenen Zellen der Apikalmeristeme dieser Keimlinge könnten etwa die Frage beantworten, ob es sich bei

dem Einfluss des MP17N auf die Plasmodemenfrequenz um einen primären Effekt handelt (vgl. Kapitel 4.5, S. 71).

Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob bei den MP17N-transgenen Pflanzen tatsächlich der symplasmatische Transport von Photoassimilaten beeinträchtigt ist. Wichtige Zellgrenzen, die bisher noch nicht untersucht wurden, sind die Schnittstellen zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen sowie zwischen Bündelscheiden- und Phloemparenchymzellen. Dies ist von besonderem Interesse bei MPs von Pflanzenviren, die wie das PLRV ausschließlich im Phloem vorkommen. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der hier vorhandenen Plasmodemen könnten Mikroinjektionsexperimente mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlichen Molekulargewichts durchgeführt werden.

Bei den Pflanzen aus den Ansätzen 2 bis 4 kam es zu keiner Akkumulation von Kohlenhydraten, woraus sich schließen ließe, dass der symplasmatische Transport nicht behindert war. Es ist aber denkbar, dass eine Hemmung des Exports zu einem Ungleichgewicht der Saccharosekonzentration zwischen Phloemsaft und Apoplasten führt, ohne dass sich dies in einer Akkumulation von Kohlenhydraten in den Source-Blättern niederschlägt. Die Aphiden-Technik erlaubt es, gezielt Phloemsäfte von Pflanzen zu gewinnen (Kehr *et al.* 1999, Kehr 2003). Aus Blattproben lässt sich die apoplastische Flüssigkeit extrahieren (vgl. Lohaus *et al.* 1995). Eine Verschiebung des Verhältnisses von apoplastischer Saccharose zu Saccharose im Phloemsaft zugunsten der apoplastischen Saccharose bei den transgenen Pflanzen würde auf eine limitierte Phloembeladung hindeuten.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass der Transport von Saccharose-Transportern oder deren mRNAs von den Geleitzellen in die Siebelemente der transgenen Pflanzen behindert ist, was sich direkt auf die Phloembeladung auswirken könnte. Eine quantitative Analyse der Expression von Saccharose-Transportern wie zum Beispiel SUT1 könnte diese Frage klären. Dies könnte durch eine vergleichende Western-Blot-Analyse erreicht werden, bei der die Proteinbanden mit einem Image Analyser ausgewertet werden. Eine aufwendigere aber aussagekräftigere Methode wäre die statistische Auswertung von Immunlokalisierungen der Saccharose-Transporter. Dies hätte den Vorteil, dass gleichzeitig die zelluläre Lokalisation der Transporter überprüft werden könnte. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass weder Western-Blot-Analysen noch Immunlokalisierungen Aussagen über die tatsächliche Kapazität von Transportern zulassen.

Die häufig für die MP-Studien verwendeten *Solanaceae* wie *Solanum tuberosum* oder *Nicotiana tabacum* besitzen ein zweites Phloemsystem, das so genannte interne Phloem. Bei der *Solanaceae L. esculentum* hat sich gezeigt, dass es bei den PPU's im internen

Phloem der Sprossachse strukturelle Veränderungen gibt, die nur dann auftreten, wenn die Pflanzen noch nicht geblüht haben (vgl. Kapitel 5.6, S. 110). Zum einen könnte durch Immunlokalisierungen festgestellt werden, ob das MP17N mit diesen Plasmodesmen abhängig vom Entwicklungszustand der transgenen Pflanzen assoziiert ist. Zum anderen wäre es interessant zu prüfen, ob sich die Transportvorgänge in diesem Phloemsystem zwischen den transgenen Linien und der Kontrollpflanze unterscheiden. Hierzu wären Experimente mit 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA) geeignet. Dieser phloemmobile Fluoreszenzfarbstoff kann leicht auf angerauhten Blattoberflächen appliziert werden; er dringt in die Zellen ein und wird dort von Esterasen gespalten, wodurch er nicht mehr in der Lage ist Membranen zu passieren. So gelangt er auch ins Phloem und ist einige Zeit später in der Sprossachse nachweisbar. Experimente dieser Art an Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien könnten beispielsweise Erkenntnisse über entwicklungsabhängige Transportrichtungen der beiden Phloemsysteme in der Sprossachse liefern (vgl. Ait-Hsiko 2002).

Neuere Studien legen den Schluss nahe, dass MPs mit pflanzeigenen Proteinen interagieren (vgl. Kapitel 2.3, S. 7). Mithilfe der *Yeast-Two-Hybrid*-Technik (z. B. Desvoyes et al. 2002) könnten entsprechende Proteine der Kartoffelpflanze identifiziert werden. Von besonderem Interesse wäre es, Proteine zu untersuchen, die im Phloemsaft vorkommen und möglicherweise an der Signalübermittlung beteiligt sind. Zudem könnte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines MP17N-bindenden Proteins und dem Entwicklungszustand einer Pflanze gibt.

6 LITERATUR

- Ait-Hsiko L** (2002) Untersuchungen zur symplasmischen Organisation der Sprossachse von *Lycopersicon esculentum*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC** (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* **131**, 1748–1755.
- Almon E, Horowitz M, Wang H-L, Lucas WJ, Zamski E und Wolf S** (1997) Phloem-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. *Plant Physiology* **115**, 1599–1607.
- Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cázares B und Lucas WJ** (2002) A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 16342–16347.
- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfield PR und Furbank RT** (2003) The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiology* **44**, 223–232.
- Apse MP und Blumwald E** (2002) Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 146–150.
- Atkins D, Hull R, Wells B, Roberts K, Moore P und Beachy RN** (1991) The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *Journal of General Virology* **72**, 209–211.
- Balachandran S, Hull RJ, Vaadia Y, Wolf S und Lucas WJ** (1995) Alteration in carbon partitioning induced by the movement protein of tobacco mosaic virus originates in the mesophyll and is independent of change in the plasmodesmal size exclusion limit. *Plant, Cell and Environment* **18**, 1301–1310.
- Balachandran S, Hurry VM, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Seaton GGR und Sims DA** (1997a) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of Photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **100**, 203–213.
- Balachandran S, Hull RJ, Martins RA, Vaadia Y und Lucas WJ** (1997b) Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiology* **114**, 475–481.
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM und Frommer WB** (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *The Plant Cell* **12**, 1153–1164.
- Blackman LM, Boevink P, Santa Cruz S, Palukaitis P und Oparka KJ** (1998) The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* **10**, 525–537.
- Bohnert HJ und Jensen RG** (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**, 89–97.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG** (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**, 1099–1111.
- Bonnemain JL** (1970) Histogénèse du phloème interne et du phloème inclus des solanacées. *Revue Générale de Botanique* **77**, 5–51.
- Boyko V, Ferralli J und Heinlein M** (2000) Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *The Plant Journal* **22**, 315–325.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bray EA** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48–54.
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kühn C, Hirner B und Frommer WB** (1998) The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**, 59–68.
- Bush DR** (1999) Sugar transporters in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 187–191.

- Canto T, Prior DAM, Hellwald K-H, Oparka KJ und Palukaitis P** (1997) Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* **237**, 237–248.
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK und Schaad MC** (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell* **8**, 1669–1681.
- Chen M-H, Sheng J, Hind G, Handa AK und Citovsky V** (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal* **19**, 913–920.
- Cheng N-H, Su C-L, Carter SA und Nelson RS** (2000) Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* **23**, 349–362.
- Chiou T-J und Bush DR** (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 4784–4788.
- Citovsky V, Knorr D, Schuster G und Zambryski P** (1990) The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**, 637–647.
- Citovsky V, McLean BG, Zupan JR und Zambryski P** (1993) Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes & Development* **7**, 904–910.
- Crawford KM und Zambryski PC** (2000) Sub-cellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Current Biology* **10**, 1032–1040.
- Creager ANH, Scholthoff K-BG, Citovsky V und Scholthof HB** (1999) Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century. *The Plant Cell* **11**, 301–308.
- Cronshaw J und Sabnis DD** (1990) Phloem Proteins. In: Behnke H-D und Sjolund RD (Hrsg.) Sieve elements. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong, 257–283.
- Cushman JC und Bohnert HJ** (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 117–124.
- Deom CM, Oliver MJ und Beachy RN** (1987) The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* **227**, 389–394.
- Deom CM, Schubert KR, Wolf S, Holt CA, Lucas WJ und Beachy RN** (1990) Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**, 3284–3288.
- Deom CM, Lapidot M und Beachy RN** (1992) Plant virus movement proteins. *Cell* **69**, 221–224.
- Derrick PM und Nelson RS** (1999) Plasmodesmata and long-distance virus movement. In: van Bel AJE und van Kesteren WJP (Hrsg.) Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 315–339.
- Desvoyes B, Faure-Rabasse S, Chen M-H, Park J-W und Scholthof HB** (2002) A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiology* **129**, 1521–1532.
- Ding B** (1998) Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Molecular Biology* **38**, 279–310.
- Ding B, Turgeon R und Parthasarathy MV** (1992a) Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* **169**, 28–41.
- Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN und Lucas WJ** (1992b) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* **4**, 915–928.
- Ehlers K und Kollmann R** (2000) Synchronization of mitotic activity in protoplast-derived *Solanum nigrum* L. microcalluses is correlated with plasmodesmal connectivity. *Planta* **210**, 269–278.
- Ehlers K und Kollmann R** (2001) Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin und functioning. *Protoplasma* **216**, 1–30.
- Ehlers K und van Bel AJE** (1999) The physiological and developmental consequences of plasmodesmal connectivity. In: van Bel AJE und van Kesteren WJP (Hrsg.) Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 243–260.
- Esau K** (1957) Phloem degeneration in gramineae affected by the BYDW. *American journal of Botany* **44**, 245–251.

- Escobar NM, Haupt S, Thow G, Boevink P, Chapman S und Oparka K** (2003) High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *The Plant Cell* **15**, 1507–1523.
- Farrar J, Pollock C und Gallagher J** (2000) Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* **154**, 1–11.
- Frommer WB und Sonnewald U** (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *Journal of Experimental Botany* **46**, 587–607.
- Fujiwara T, Giesman-Cookmeyer Donna, Ding B, Lommel SA und Lucas WJ** (1993) Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the red clover necrotic mosaic virus movement protein. *The Plant Cell* **5**, 1783–1794.
- Fukushima E, Arata Y, Endo T, Sonnewald U und Sato F** (2001) Improved salt tolerance of transgenic tobacco expressing apoplastic yeast-derived invertase. *Plant Cell Physiology* **42**, 245–249.
- Gergerich RC und Scott HA** (1988) Evidence that virus translocation and virus infection of non-wounded cells are associated with transmissibility by leaf-feeding beetles. *Journal of General Virology* **69**, 2935–2938.
- Ghoshroy S, Lartey S, Sheng R, und Citovsky V** (1997) Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 27–50.
- Gillespie T, Boevink P, Haupt S, Roberts AG, Roth R, Valentine T, Chapman S und Oparka KJ** (2002) Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *The Plant Cell* **14**, 1207–1222.
- Goldschmidt EE und Huber SC** (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexose sugars. *Plant Physiology* **99**, 1443–1448.
- Hare PD und Cress WA** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79–102.
- Hare PD, Cress WA und van Staden J** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**, 535–553.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K und Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 463–499.
- Hayashi H, Alia Mustardy L, Deshniem P, Ida M und Murata N** (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *coda* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *The Plant Journal* **12**, 133–142.
- Haywood V, Kragler F und Lucas WJ** (2002) Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *The Plant Cell Supplement* **2002**, S303–S325.
- Heinlein M** (2002) Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 543–552.
- Heinlein M, Epel BL, Padgett HS, Beachy RN** (1995) Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983–1985.
- Hellmann H, Barker L, Funck D und Frommer WB** (2000) The regulation of assimilate allocation and transport. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 583–594.
- Henton SM, Greaves AJ, Piller GJ und Minchin PEH** (2002) Revisiting the Münch pressure-flow hypothesis for long-distance transport of carbohydrates: modelling the dynamics of solute transport inside a semipermeable tube. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1411–1419.
- Herbers K, Tacke E, Hazirezaei M, Krause K-P, Melzer M, Rohde W und Sonnewald U** (1997) Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced Photosynthetic capacity in source leaves. *The Plant Journal* **12**, 1045–1056.
- Heuer B und Nadler A** (1998) Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit. *Plant Science* **137**, 43–51.
- Hoch WA, Singsaas EL und McCown BH** (2003) Resorption Protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology* **133**, 1296–1305.

- Hoffmann-Thoma G, van Bel AJE und Ehlers K** (2000) Ultrastructure of minor-vein phloem and assimilate export in summer and winter leaves of the symplasmically loading evergreens *Ajuga reptans* L., *Aucuba japonica* Tunb. und *Hedera helix* L. *Planta* **212**; 231–242.
- Hofius D, Herbers K, Melzer M, Omid A, Tacke E, Wolf S und Sonnewald U** (2001) Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* **28**, 529–543.
- Holmberg N und Bülow L** (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science* **3**, 61–66.
- Imlau A, Truernit E und Sauer N** (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell* **11**, 309–322.
- Ingram J und Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377–403.
- Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H und Chino M** (1998) Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205**, 12–22.
- Itaya A, Woo Y-M, Masuta C, Bao Y, Nelson RS, Ding B** (1998) Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiology* **118**, 373–385.
- Itaya A, Ma F, Qi Y, Matsuda Y, Zhu Y, Liang G und Ding B** (2002) Plasmodesma-mediated selective protein traffic between “symplasmically isolated” cells probed by viral movement protein. *The Plant Cell* **14**, 2071–2083.
- Jaag HM, Kawchuk L, Rohde W, Fischer R, Emans N und Prüfer Dirk** (2003) An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll poliovirus replication-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**, 8939–8944.
- Jackson D** (2000) Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 394–399.
- Jackson D** (2002) Double labeling of *KNOTTED1* mRNA and protein reveals multiple potential sites of protein trafficking in the shoot apex. *Plant Physiology* **129**, 1423–1429.
- Jackson D und Hake S** (1997) Morphogenesis on the move: cell-to-cell trafficking of plant regulatory proteins. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 495–500.
- Jackson D, Veit B und Hake S** (1994) Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405–413.
- Jang J-C und Sheen J** (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* **2**, 208–214.
- Jeannette E, Reyss A, Gréforé N, Gantet P und Prioul J-L** (2000) Carbohydrate metabolism in heat-girdled maize source leaf. *Plant, Cell and Environment* **23**, 61–69.
- Jensen SG** (1968) Factors affecting respiration in barley yellow dwarf virus-infected barley. *Phytopathology* **58**, 438–443.
- Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RLS und Lucas WJ** (1998) An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279**, 1486–1487.
- Kasteel DTJ, Perbal MC, Boyer J-C, Wellink J, Goldbach RW, Maile AJ und van Lent JWM** (1996) The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *Journal of General Virology* **77**, 2857–2864.
- Kehr J** (2003) Single cell technology. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 617–621.
- Kehr J, Haebel S, Blechschmidt-Schneider S, Willmitzer L, Steup M und Fisahn J** (1999) Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch. by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* **207**, 612–619.
- Kempers R und van Bel AJE** (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kD. *Planta* **201**, 195–201.
- Kempers R, Prior DAM, Opark KJ, Knoblauch M, van Bel AJE** (1999) Integration of controlled pressure injection, iontophoresis and membrane potential measurements. *Plant Biology* **1**, 61–67.

- Knoblauch M und van Bel AJE** (1998) Sieve tubes in action. *The Plant Cell* **10**, 35–50.
- Koch KE** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 509–540.
- Koroleva OA, Farrar JF, Tomos AD und Pollock CJ** (1998) Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll, and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. *Plant Physiology* **118**, 1525–1532.
- Koyro HW** (2002) Ultrastructural effects of salinity in higher plants. In: Läubli A und Lüttge U (Hrsg.) *Salinity: Environment – Plants – Molecules*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 139–157.
- Koyro HW und Huchzermeyer B** (1999) Influence of high NaCl-salinity on growth, water and osmotic relations of the halophyte *Beta vulgaris* ssp. *Maritima*. – Development of a quick check –. In: Lieth H, Moschenko M, Lohmann M, Koyro H-W und Hamdy A (Hrsg.): *Halophyte uses in different climates I*. Backhuys, Leiden, 89–103.
- Koyro HW, Wegmann L, Lehmann H und Lieth H** (1999) Adaptation of the mangrove *Laguncularia racemosa* to high NaCl Salinity. In: Lieth H, Moschenko M, Lohmann M, Koyro H-W und Hamdy A (Hrsg.): *Halophyte uses in different climates I*. Backhuys, Leiden, 43–64.
- Kragler F, Lucas WJ und Monzer J** (1998a) Plasmodesmata: dynamics, domains and patterning. *Annals of Botany* **81**, 1–10.
- Kragler F, Monzer J, Shash K, Xoconostle-Cazares B und Lucas WJ** (1998b) Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant Journal* **15**, 367–381.
- Kragler F, Monzer J, Xoconostle-Cázares und Lucas WJ** (2000) Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *The EMBO Journal* **19**, 2856–2868.
- Krapp A und Stitt M** (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the "sink-regulation" of Photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* **195**, 313–323.
- Krauss A** (1978) Tuberization and abscisic acid content in *Solanum tuberosum* as affected by nitrogen nutrition. *Potato Research* **21**, 183–193.
- Kühn C** (2003) A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**, 215–232.
- Kühn C, Quick WP, Schulz A, Riesmeier JW, Sonnewald U und Frommer WB** (1996) Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1115–1123.
- Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R und Frommer WB** (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**, 1298–1300.
- Kühn C, Barker L, Bürkle L und Frommer WB** (1999) Update on sucrose transport in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **50**, 935–953.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB und Ward JM** (1999) The dual function of sugar carriers, Transport and sugar sensing. *The Plant Cell* **11**, 707–726.
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB und Patrick JW** (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment* **26**, 37–56.
- Larcher W** (1994) *Ökophysiologie der Pflanzen*. E. Ulmer, Stuttgart, Deutschland.
- Lazarowitz SG** (1999) Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 332–338.
- Lazarowitz SG und Beachy RN** (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell* **11**, 535–548.
- Lee J-Y, Yoo B-C und Lucas WJ** (2000) Parallels between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of information molecules. *Planta* **210**, 177–187.
- Lemoine R, Bürkle L, Barker L, Sakr S, Kühn C, Gaillard C, Delrot S und Frommer WB** (1999) Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* **454**, 325–330.

- Leterrier M, Atanassova R, Laquitaine L, Gaillard C, Coutos-Thévenot P und Delrot S** (2003) Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1193–1204.
- Levine A** (2002) Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 531–535.
- Livingston III DP, Gildow FE und Liu Shu-Yen** (1998) Barley yellow dwarf virus: effects on carbohydrate metabolism in oat (*Avena sativa*) during cold hardening. *The New Phytologist* **140**, 699–707.
- Lohaus G, Winter H, Riens B und Heldt HW** (1995) Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Botanica Acta* **108**, 270–275.
- Lucas WJ** (1995) Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 673–680.
- Lucas WJ** (1999) Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *Journal of Experimental Botany* **50**, 979–987.
- Lucas WJ und Gilbertson RL** (1994) Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 387–411.
- Lucas WJ und Wolf S** (1999) Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 192–197.
- Lucas WJ, Olesinski A, Hull RJ, Haudenshield JS, Deom CM, Beachy RN und Wolf S** (1993a) Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and Photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* **190**, 88–96.
- Lucas WJ, Ding B und van der Schoot C** (1993b) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytologist* **125**, 435–476.
- Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, Nguyen L, Baker L, Ding B und Hake S** (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980–1983.
- Lucas WJ, Balachandran S, Park J und Wolf S** (1996) Plasmodesmal companion cell-mesophyll communication in the control over carbon metabolism and phloem transport: insights gained from viral movement proteins. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1119–1128.
- Lucas WJ, Yoo B-C und Kragler F** (2001) RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Molecular Cell Biology* **2**, 849–857.
- Martinez CA, Maestri M und Lani EG** (1996) In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Science* **116**, 177–184.
- Mas P und Beachy RN** (2000) Role of microtubules in the intracellular distribution of tobacco mosaic virus movement protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 12345–12349.
- Mayo MA und Ziegler-Graff V** (1996) Molecular biology of luteoviruses. *Advances in Virus Research* **46**, 413–460.
- Mayo MA, Robinson DJ, Jolly CA und Hyman L** (1989) Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *Journal of General Virology* **70**, 1037–1051
- McLean BG, Zupan J und Zambryski PC** (1995) Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *The Plant Cell* **7**, 2101–2114.
- Metcalf CR und Chalk L** (1957) Anatomy of the dicotyledons. Leaves, stems, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. University Press, Oxford, 965–978.
- Minchin PEH und Thorpe MR** (1996) What determines carbon partitioning between competing sinks. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1293–1296.
- Minchin PEH, Thorpe MR, Farrar JF und Koroleva OA** (2002) Source-sink coupling in young barley plants and control of phloem loading. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1671–1676.
- Munns R** (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* **16**, 15–24.
- Murashige T und Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.

- Nagano H, Mise K, Furusawa I und Okuno T** (2001) Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *Journal of Virology* **75**, 8045–8053.
- Nakamura S, Hayashi H, Mori S und Chino M** (1995) Detection and characterization of protein kinases in rice phloem sap. *Plant and Cell Physiology* **36**, 19–27.
- Nelson RS und van Bel AJE** (1998) The mystery of viral trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progress in Botany* **59**, 476–533.
- Neumann P** (1997) Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment* **20**, 1193–1198.
- Noueiry AO, Lucas WJ und Gilbertson RL** (1994) Two proteins of a plant virus DNA coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell* **76**, 925–932.
- Olesinski AA, Lucas WJ, Galun E und Wolf S** (1995) Pleiotropic effects of tobacco-mosaic-virus movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. *Planta* **197**, 118–126.
- Olesinski AA, Almon E, Navot N, Perl A, Galun E, Lucas WJ und Wolf S** (1996) Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiology* **111**, 541–550.
- Oparka KJ und Turgeon R** (1999) Sieve elements and companion cells – traffic control centers of the phloem. *The Plant Cell* **11**, 739–750.
- Oparka KJ und Santa Cruz S** (2000) The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 323–347.
- Oparka KJ und Roberts AG** (2001) Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiology* **125**, 123–126.
- Oparka KJ, Prior DAM, Santa Cruz S, Padgett HS und Beachy RN** (1997) Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *The Plant Journal* **12**, 781–789.
- Oparka KJ, Roberts AG und Santa Cruz S** (1999) Use of GFP-tagged viruses in plasmodesmal research. In: van Bel AJE und van Kesteren WJP (Hrsg.) *Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 85–99.
- Özcan S, Dover J und Johnston M** (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **17**, 2566–2573.
- Papageorgiou GC, Fujimura Y, Murata N** (1991) Protection of the oxygen-evolving photosystem II complex by glycinebetaine. *Biochimica Biophysica Acta* **1057**, 361–366.
- Paul MJ und Foyer CH** (2001) Sink regulation of Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1383–1400.
- Perbal M-C, Haughn G, Saedler H und Schwarz-Sommer Z** (1996) Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* **122**, 3433–3441.
- Peremyslov VV, Hagiwara Y und Dolja VV** (1999) HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 14771–14776.
- Pitman MG und Läuchli A** (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Läuchli A und Lüttge U (Hrsg.) *Salinity: Environment – Plants – Molecules*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 3–20.
- Pfluger J und Zambryski PC** (2001) Cell growth: The power of symplastic isolation. *Current Biology* **11**, R436–R439.
- Ploubidou A und Way M** (2001) Viral transport and the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 97–105.
- Reichel C, Mas P und Beachy RN** (1999) The role of the ER and the cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends in Plant Science* **4**, 458–462.
- Reinero ARN und Beachy RN** (1989) Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Plant Physiology* **89**, 111–116.
- Rhodes D und Hanson AD** (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 357–384.
- Riesmeier JW, Willmitzer L und Frommer WB** (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal* **13**, 1–7.

- Roberts AG und Oparka KJ** (2003) Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment* **26**, 103–124.
- Roblin G, Sakr S, Bonmort J und Delrot S** (1998) Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Letters* **424**, 165–168.
- Rohde W, Jaag HM, Paap B, Tacke E, Schmitz J, Kierdorf M, Ashoub A, Günther S, van Bel AJE, Prüfer D** (2000) Genetic engineering of potato for tolerance to biotic and abiotic Stress. In: Arencibia AD (Hrsg.) *Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millennium*. Elsevier, Amsterdam London New York Tokyo, 177–181.
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* **14**, 185–205.
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P und Smeekens S** (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal* **15**, 253–263.
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B und Lucas WJ** (2001) The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 202–209.
- Russin WA, Evert RF, Vanderveer PJ, Sharkey TD und Briggs SP** (1996) Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export defective1 maize mutant. *The Plant Cell* **8**, 645–658.
- Santa Cruz S, Roberts AG, Prior DAM, Chapman S und Oparka KJ** (1998) Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: the role of virions. *The Plant Cell* **10**, 495–510.
- Sauer N und Stadler R** (1993) A sink-specific H⁺/monosaccharide cotransporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant Journal* **4**, 601–610.
- Schick R und Klinkowski M** (1962) Die Kartoffel. Ein Handbuch. Band 2. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin: 1054-1061.
- Schmitz J, Stuss-Garaud C, Tacke E, Prüfer D, Rohde W und Rohfritsch O** (1997) In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**, 311–322.
- Séron K und Haenni Anne-Lise** (1996) Vascular movement of plant viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 435–442.
- Sessions A, Yanovskiy MF und Weigel D** (2000) Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA 1. *Science* **289**: 779–781.
- Shalitin D und Wolf S** (2000a) Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiology* **123**, 597–604.
- Shalitin D und Wolf S** (2000b) Interaction between phloem proteins and viral movement protein. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 801–806.
- Shalitin D, Wang Y, Omid A, Gal-on A und Wolf S** (2002) Cucumber mosaic virus movement protein affects sugar metabolism and transport in tobacco and melon plants *Plant, Cell and Environment* **25**, 989–997.
- Shen B, Hohmann S, Jensen RG und Bohnert HJ** (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiology* **121**, 45–52.
- Shepardson S, Esau K und McCrum R** (1980) Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**, 379–392.
- Sheveleva E, Marquez S und Zegeer A** (1998) Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco: high sorbitol accumulation leads to necrotic lesions. *Plant Physiology* **117**, 831–839.
- Sjolund RD** (1997) The phloem sieve element: A river runs through it. *The Plant Cell* **9**, 1137–1146.
- Smeekens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 49–81.
- Smeekens S und Rook F** (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiology*, **115**, 7–13.
- Soellick TR, Uhrig JF, Bucher GL, Kellmann JW und Schreier PH** (2000) The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein und identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 2373–2378.
- Sokolova M, Prüfer D, Tacke E und Rohde W** (1997) The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Letters* **400**, 201–205.

- Spurr** (1969) A low-viscosity epoxyresin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* **26**, 31–43.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM und Jacobs G** (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* **155**, 349–361.
- Stitt M, von Schaewen A und Willmitzer L** (1990) Sink regulation of Photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease in the Calvin cycle enzymes and an increase in glycolytic enzymes. *Planta* **183**, 40–50.
- Storms MMH, Kormelink R, Peters D, van Lent JWM und Goldbach RW** (1995) The non-structural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* **214**, 485–493.
- Tacke E, Prüfer D, Schmitz J und Rohde W** (1991) The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *Journal of General Virology* **72**, 2035–2038.
- Tacke E, Schmitz J, Prüfer D und Rohde W** (1993) Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic α -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**, 274–282.
- Tacke E, Salamini F und Rohde W** (1996) Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotechnology* **14**, 1597–1601.
- Takanami Y** (1979) Enzyme assisted purification of two phloem limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. *Journal of General Virology* **44**, 153–159.
- Tarczynski MC, Jensen RG und ohnert HJ** (1993) Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**, 508–510.
- Técsi LI, Wang D, Smith AM, Leegood RC und Maule AJ** (1992) Red clover mottle virus infection affects sink-source relationships and starch accumulation in pea plants. *Journal of Experimental Botany* **43**, 1409–1412.
- Thomas BR und Rodriguez RL** (1994) Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiology* **106**, 1235–1239.
- Thompson GA und Schulz A** (1999) Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends in Plant Science* **4**, 354–360.
- Vagnoli P, Coons DM und Bisson LF** (1998) The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 31–36.
- van Bel AJE** (1993) Strategies of phloem loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 253–281.
- van Bel AJE** (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* **26**, 125–149.
- van Bel AJE und Gamalei YV** (1992) Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant, Cell and Environment* **15**, 265–270.
- van Bel AJE und Kempers R** (1997) The pore/plasmodesm unit; key element in the interplay between sieve element and companion cell. *Progress in Botany* **58**, 277–291.
- van Bel AJE, Gaupels F, Will T, Kogel KH** (2004) Phloem-mediated remote control by long-distance signals. *Progress in Botany* **65**, 372–393.
- van der Schoot C und van Bel AJE** (1989) Morphogram: A novel diagram to organize the transitive secondary xylem elements of basal tomato (*Solanum lycopersicum*) internodes. *American Journal of Botany* **76**, 475–486.
- van der Schoot und Rinne P** (1999a) Networks for shoot design. *Trends in Plant Science* **4**, 31–37.
- van der Schoot und Rinne P** (1999b) The symplasmic organization of the shoot apical meristem. In: van Bel AJE und van Kesteren WJP (Hrsg.) *Plasmodesmata: structure, function, role in cell communication*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 225–242.
- Vaughn MW, Harrington GN und Bush DR** (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 10876–10880.
- Wagmann E, Lucas WJ, Citovsky V und Zambryski P** (1994) Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 1433–1437.
- Wagmann E, Chen M-H, Bachmaier R, Ghoshroy S und Citovsky V** (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *The EMBO Journal* **19**, 4875–4884.

Ward BM, Medville R, Lazarowitz SG und Turgeon R (1997) The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. *Journal of Virology* **71**, 3726–3733.

Wardlaw IF (1990) The control of carbon partitioning of plants. *The New Phytologist* **134**, 341–381.

Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB und Ward JM (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell* **12**, 1345–1355.

Williams LE, Lemoine R und Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**, 283–290.

Wolf S und Millatiner A (2000) Effect of tobacco mosaic virus movement protein on Photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Physiology* **156**, 253–258.

Wolf S, Deom DM, Beachy RN und Lucas WJ (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**, 337–339.

Yokoi S, Bressan RA und Hasegawa PM (2002) Salt stress tolerance of plants. In: Genetic engineering of crop plants for abiotic stress. *JIRCAS Working Report*, Japan, 25–33.

Zambryski P und Crawford K (2000) Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 393–421.

Zheng H, Wang G und Zhang L (1997) Alfalfa mosaic virus movement protein induces tubules in plant protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 1010–1014.

Zhu J-K (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 66–71.

7 ANHANG

7.1 Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Hersteller
Acrylamid 30%	C_3H_5NO	Roth ^a
Agar-Agar		Roth
Ammoniumpersulfat	$(NH_4)_2S_2O_8$	Pharmacia Biotech ^b
β -Amyloclucosidase, 40 Units/mg		R-Biopharm ^c
Borsäure	BH_3O_3	Sigma ^d
Bromphenolblau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Roth
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Sigma
Calciumnitrat Tetrahydrat	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250		Roth
Eisessig	$C_2H_4O_2$	Sigma
Ethylendiamin-tetraessigsäure Eisen(III)-Natriumsalz Hydrat	$C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8$	Sigma
Fertigmedium M&S		Duchefa ^e
Glutardialdehyd-Lösung (25%)	$CH_2(CH_2CHO)_2$	Sigma
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Roth
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Sigma
Harnstoff	CH_4N_2O	Sigma
myo-Inositol	$C_6H_{12}O_6$	Duchefa
Kaisers Glyceringelatine		Merck ^f
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Sigma
Kaliumdisulfit	$K_2O_5S_2$	Sigma
Kaliumnitrat	KNO_3	Sigma
Kupferniträt	$Cu(NO_3)_2$	Sigma
Magnesiumnitrat Hexahydrat	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Sigma
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma
Mangansulfat Monohydrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	Sigma
β -Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Pharmacia Biotech
Molybdän(VI)-oxid	MoO_3	Sigma
Natriumcacodylat	$Na(CH_3)_2AsO_4 \cdot H_2O$	Plano ^g
Natriumchlorid	$NaCl$	Roth
Natriumdodecylsulfat	$C_{12}H_{25}O_4S \cdot Na$	Roth
Natriumthiosulfat-5-hydrat	$Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$	Sigma
Osmiumtetraoxid	OsO_4	Next Chimica ^h
Paraformaldehyd	$C(H_2O)_n \cdot H.OH$	Plano
Polyklar AT (unlösliche Form)		Serva ⁱ
RH-160 (N-(4-Sulfobutyl)-4-(4-(4-Dibutylamino)Butadienyl)Pyridin)		Molecular Probes ^k
5-Sulfosalicylsäure Dihydrat (2-Hydroxy-5-sulfobenzosäure)	$C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$	Sigma

Fortsetzung ...

Bezeichnung (Fortsetzung)	Formel	Hersteller
Silikonöl DS 200-50 cst		Serva
TEMED		Pharmacia Biotech
β -(2-Thienyl)-D-Alanin	$C_7H_9NO_2S$	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma
Tween 20		Pharmacia Biotech
Uranylacetat	$(CH_3COO)_2UO_2 \cdot 2H_2O$	Merck
UV-Testkombination D-Glukose		R-Biopharm
UV-Testkombination Saccharose/D-Glukose/D-Fruktose		R-Biopharm
Vitaminlösung		Duchefa
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	Sigma
Zinksulfat Heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma
Zitronensäure	$C_6H_8O_7$	Sigma

^a Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland; ^b Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden; ^c R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland; ^d Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland; ^e Duchefa Biochemie B.V., Niederlande; ^f Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; ^g PLANO W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland; ^h Next Chimica, Centurion, South Africa (Vertrieb Plano GmbH, Wetzlar); ⁱ Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland; ^k Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

7.2 Zusammensetzungen der Lösungen

7.2.1 Kohlenhydratanalysen

Zitronensäurepuffer (pH 4.6)

0.2 M Zitronensäure

Mit 5 M KOH auf pH 4.6 eingestellt. Aufbewahrung bei 4 °C.

Amyloglucosidase-Lösung für Stärkeverdau

Diese Lösung wurde vor jeder Stärkebestimmung frisch angesetzt. Für jede Probe wurden 0,75 ml Amyloglucosidase-Lösung benötigt. Die Amyloglucosidase wurde in einer Konzentration von 0.2 mg/ml Zitronensäurepuffer eingewogen.

7.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Färbereagenz

12.5 ml Ethanol (95%)
 25 mg Coomassie Brilliant Blue G250
 100 ml H_2O
 25 ml Phosphorsäure (85%)
 mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt

Die Lösung wurde ca. 1 Tag mit dem Magnetrührer gerührt und danach durch einen Faltenfilter filtriert. Sie wurde in eine dunkle Flasche gefüllt, die mit Alufolie lichtundurchlässig bedeckt wurde. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

7.2.3 Gelelektrophorese

Fixierlösung

- 40% (v/v) Ethanol (vergällt)
- 10% (v/v) Eisessig

Laemmli-Puffer, 2x

- 50 mM Tris-HCl
- 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
- 10 % (v/v) Glycerin
- 2 % (w/v) SDS (w/v)

Trenngel-Puffer (Separating gel buffer), 4x

- 18,17 g Tris base
- 4 ml 10% SDS

Mit HCl auf pH 8,8 eingestellt, anschließend H₂O bis zu einem Endvolumen von 100 ml zugegeben. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Ladegel-Puffer (Stacking gel buffer), 4x

- 6,06 g Tris base
- 4 ml 10% SDS

Mit HCl auf pH 6.8 eingestellt, anschließend H₂O bis zu einem Endvolumen von 100 ml zugegeben. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

SDS-Ladepuffer (SDS sample buffer), 2x

- 2,0 ml Glycerin
- 2,0 ml 10% (w/v) SDS
- 0,25 mg Bromphenolblau
- 2,5 ml Ladegel-Puffer
- 0,5 ml β -Mercaptoethanol

H₂O wurde bis zu einem Endvolumen von 10 ml zugegeben. Das β -Mercaptoethanol wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zupipettiert, d. h. es wurde mit H₂O bis zu einem Endvolumen von 9.5 ml aufgefüllt. Wenn weniger Proben gebraucht wurden, wurde ein entsprechend kleineres Volumen vorbereitet.

SDS-Laufpuffer (SDS polyacrylamide running buffer), 10x

- 30 g Tris base
- 144 g Glycin
- 100 ml 10% (w/v) SDS

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

7.2.4 Western-Blot und Immunodetektion

Tris-buffered saline (TBS), pH 7,6

2,42 g Tris base (20 mM)
8 g Natriumchlorid (137 mM)
3,8 ml 1 M HCl

Bis zu einem Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und pH geprüft.

TBS Tween (TBS-T)

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Blockingreagenz

5% (w/v) Milchpulver (fettarm) in TBS-T

Diese Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

7.2.5 Filmentwicklung und Fixierung

Fixierlösung

400 g Natriumthiosulfat-5-hydrat
40 g Kaliumdisulfit
2 l Leitungswasser

Die Fixierlösung kann mehrmals benutzt werden, nach Gebrauch wurde die Lösung wieder zurück in die Vorratsflasche gefüllt.

7.2.6 Elektronenmikroskopie

Natrium-Cacodylatpuffer (2x)

0,2 M $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
4mM CaCl_2
0,2 N HCl bis pH 8,43

Diese Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

Waschpuffer

1x Natrium-Cacodylatpuffer

Osmiumtetroxid (Nachfixierung)

1% (w/v) Osmiumtetroxid in 0,05 M Natrium-Cacodylatpuffer

Uranylacetat-Lösung (Kontrastierung)

0,5% (w/v) Uranylacetat in H_2O

Epoxyharz (Spurr's Medium A, Spurr 1969)

- 10 g ERL (Vinylcyclohexen-dioxid)
- 6 g DER (Diepoxid)
- 26 g NSA (Nonenylbersteinsäureanhydrid)
- 0,4 g S-12-Dimethylaminoethanol

Diese Lösung wurde sofort verwendet oder über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

7.2.7 Mikroinjektionsexperimente**Phloem-Medium**

- 10 mM KCl
- 10 mM CaCl₂
- 5 mM NaCl

Dieses Medium wurde nicht gepuffert.

Lucifer Yellow CH (LYCH), Kaliumsalz

- 7% (w/v) LYCH in demin. H₂O

Dieser Ansatz wurde für 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt, bis sich alle nichtgelösten Kristalle absetzten. Der Überstand wurde zur Füllung der Kapillaren verwendet.

RH-160

- 25 mg RH-160 (N-(4-Sulfobutyl)-4-(4-(4-Dibutylamino)Butadienyl)Pyridin)

wurden in 1 ml Ethanol (absolut) gelöst. 2 µl dieser Stammlösung wurde in 1 ml des Phloem-Mediums gelöst.

7.3 Eichkurven

7.3.1 Kohlenhydratanalyse

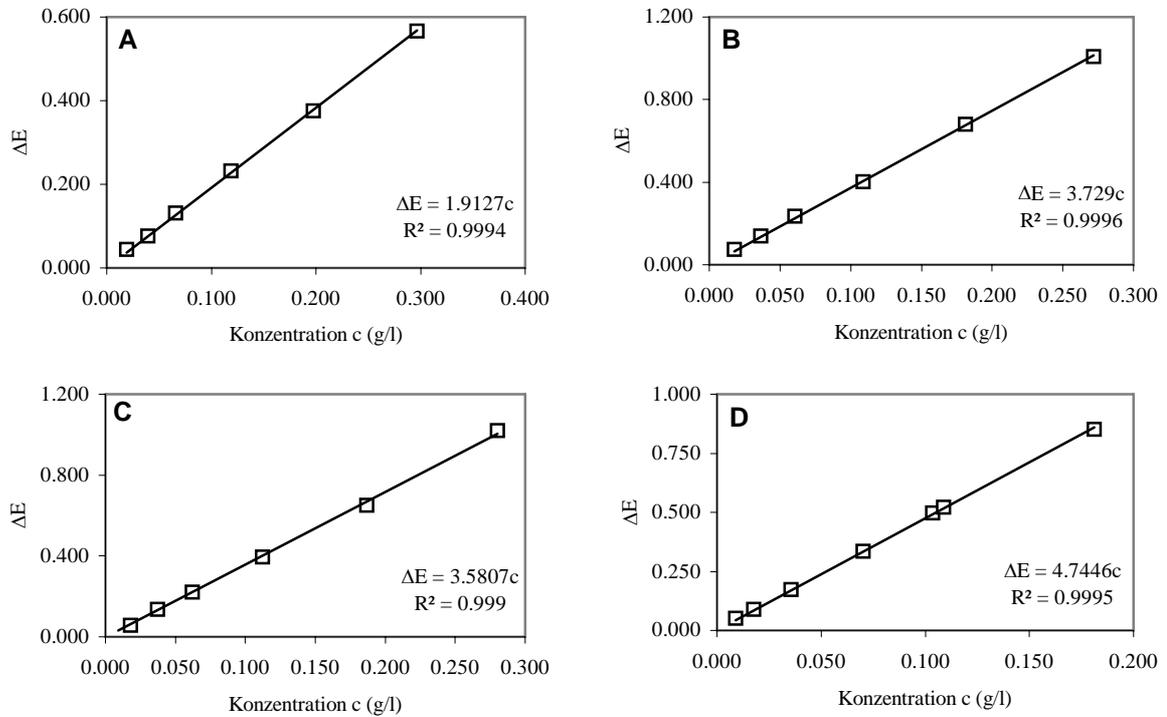


ABBILDUNG 7-1. Eichkurven für die photospektrometrische Bestimmung von Saccharose (A), Glukose (B), Fruktose (C) und Stärke (D).

7.3.2 Kationenanalyse

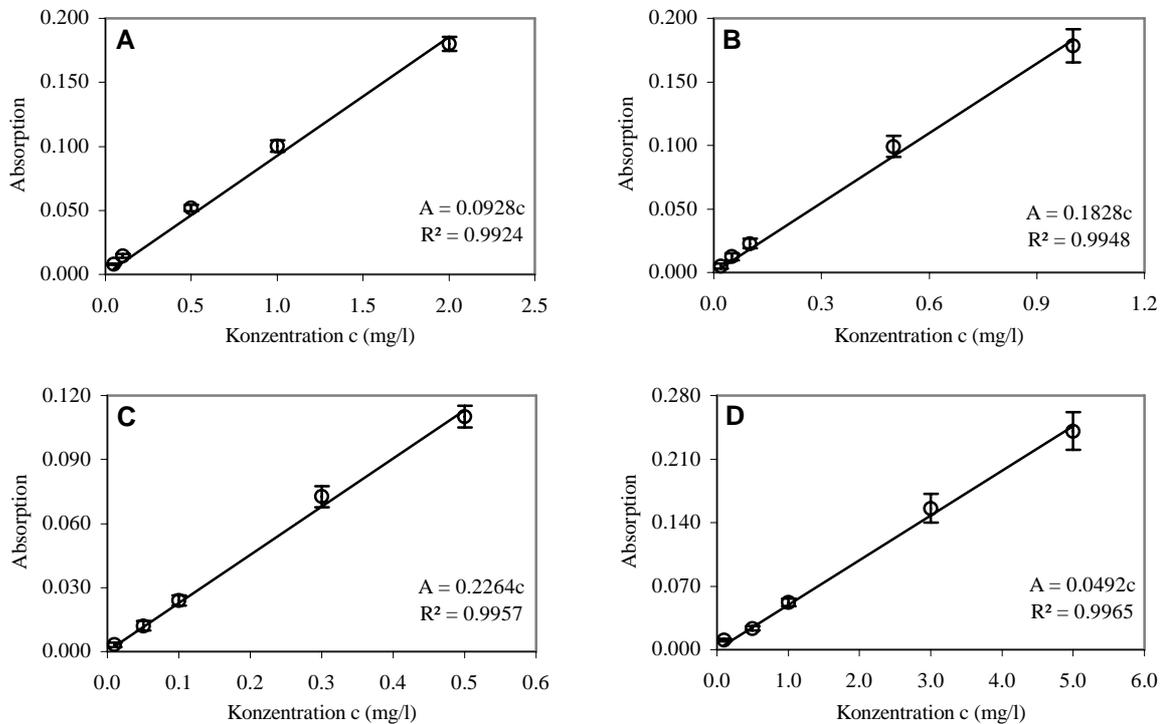


ABBILDUNG 7-2. Eichkurven für die Bestimmung von Kalium (A), Natrium (B), Magnesium (C) und Calcium (D).

7.4 Statistik und Fehlerrechnung

Alle Ergebnisse der Gewebeanalysen und Gaswechsellmessungen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. Bei den Gewebeanalysen wurden die Werte von jeweils mindestens 5 Proben, in einigen Fällen auch bis zu zehn Proben gemittelt. Bei den Gaswechsellmessungen wurden ebenfalls fünf bis zehn Blätter für die Mittelwertberechnung gemessen, wobei pro Blatt der Mittelwert von zehn Einzelmessungen berechnet wurde.

Die Leitungsvolumina (V) der Gefäßelemente wurden nach folgender Formel berechnet: $V = r^2 \cdot \pi \cdot l$, wobei r der halbe Außendurchmesser (μm) und l die Länge (μm) eines Gefäßelementes ist.

Bei der Berechnung der Sink/Source-Verhältnisse des Kohlenhydratgehalts, des Leitungsvolumens der Gefäßelemente und deren Leitungskapazität wurde der Fehler nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz von Gauß ermittelt:

$$\Delta F = \sqrt{\left(\frac{\partial F}{\partial x} \Delta \bar{x}\right)^2 + \left(\frac{\partial F}{\partial y} \Delta \bar{y}\right)^2 + \dots}$$

Im folgenden wird dies am Beispiel des Leitungsvolumens der Gefäßelemente (vgl. ABBILDUNG 4-21, S. 70) illustriert. Dabei wurde beim Objektmikrometer von einer Ableseungenaugigkeit von einem halben Skalenstrichabstand ($5\mu\text{m}$) ausgegangen. Entsprechend der Gauß'schen Formel wird der Fehler bei der Volumenbestimmung ($V = r^2 \cdot \pi \cdot l$) folgendermaßen berechnet:

$$\Delta V = \sqrt{\left(\frac{\partial V}{\partial r} \Delta \bar{l}\right)^2 + \left(\frac{\partial V}{\partial l} \Delta \bar{r}\right)^2}$$

Nach einsetzen der partiellen Ableitungen

$$\frac{\partial V}{\partial r} = 2r \cdot \pi \cdot l, \quad \frac{\partial V}{\partial l} = r^2 \cdot \pi \quad \text{erhält man}$$

$$\Delta V = \sqrt{(2r \cdot \pi \cdot l \cdot \Delta \bar{r})^2 + (r^2 \cdot \pi \cdot \Delta \bar{l})^2}$$

Entsprechend wurde auch bei der Bestimmung der Leitungskapazität des Xylems vorgefahren. Hier wurde berücksichtigt, dass die Gefäßelemente nur einen Teil aller Zellen des Xylems ausmachen. Bei der Berechnung des Fehlers wurde dann der oben ermittelte Fehler und die Standardabweichung aus der Bestimmung der prozentualen Verteilung der Zelltypen des Xylems berücksichtigt (vgl. TABELLE 4-18, S. 69).

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Gießen, im Januar 2004

Dipl.-Biol. Siegbert Günther