

**Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung in
transgenen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) durch
Manipulation der *source/sink*-Beziehung**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Claudia Jonik

aus Aachen

Köln 2011

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Dezember 2007 bis Januar 2011 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. U.-I. Flügge
Prof. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2011

„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.“

Werner von Siemens (1816 - 1892)

1	Einleitung	1
1.1	Die biotechnologische Bedeutung von Stärke	1
1.2	Der Stärkemetabolismus	2
1.2.1	Die Synthese von transitorischer Stärke in Blättern	5
1.2.2	Die Mobilisierung von transitorischer Stärke in Blättern	6
1.2.3	Die Saccharosesynthese im Cytosol von Mesophyllzellen	7
1.2.4	Die Phloembeladung und der Transport in die Knollen	9
1.2.5	Die Synthese von Speicherstärke in Amyloplasten von Knollen	11
1.3	Die Bedeutung von GPT und NTT für die Stärkesynthese in Knollen	12
1.4	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial und Geräte	17
2.1.2	Wasserqualität	17
2.1.3	Verwendete Antibiotika	17
2.1.4	Verwendete Vektoren	18
2.1.5	Verwendete Oligonukleotide	18
2.1.6	Verwendete Bakterienstämme	19
2.2	Arbeiten mit <i>Solanum tuberosum</i>	20
2.2.1	Anzucht	20
2.2.2	Transformation von Kartoffelblättern	22
2.2.3	Induktion von Kalli und Regeneration von Pflanzen	22
2.2.4	Probennahme	22
2.3	Mikrobiologische Methoden	23
2.3.1	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
2.3.2	Herstellung von elektrokompetenten Agrobakterien	23
2.3.3	Transformation von elektrokompetenten Agrobakterien	24
2.3.4	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	24

2.4	Molekularbiologische Methoden	25
2.4.1	Isolierung von RNA aus pflanzlichen Geweben	25
2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.4.3	Abschätzung der DNA-Konzentration in einem Agarose-Gel	27
2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.4.5	DNaseI Verdau von RNA-Präparationen	27
2.4.6	Reverse Transkription	28
2.4.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.4.8	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	29
2.4.9	Real-Time-PCR	30
2.5	Physiologische und biochemische Methoden	31
2.5.1	Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blatt- und Knollenproben	31
2.5.2	Bestimmung der Stärkegehalte in Blättern und Knollen	32
2.5.3	Bestimmung der Assimilation mittels Infrarotgasanalysen (IRGA)	33
2.5.4	¹⁴ CO ₂ -Pulsverfolgungsexperimente von Kartoffelblättern	34
2.5.4.1	Aufarbeitung der in Ethanol unlöslichen Fraktion	35
2.5.4.2	Aufarbeitung der löslichen Fraktion	35
2.5.5	Analyse der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen	35
2.5.6	Proteinbestimmung nach Bradford	36
2.5.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.5.8	Bestimmung der Aktivität der anorganischen PPase mit Hilfe eines Zymogramms	37
2.5.9	Messung der Enzymaktivität der PPase	39
2.5.10	Messung der Enzymaktivität der AGPase	40
2.5.11	Bestimmung des Amylose/Amylopektin-Verhältnisses	41
2.5.12	Metabolitanalyse mittels GC/MS	42
2.5.12.1	Extraktion und Probenvorbereitung	42
2.5.12.2	Gaschromatographie	42
2.5.12.3	Massenspektroskopie	43
2.5.12.4	Auswertung	43

2.6	Statistische Methoden und Berechnungen	44
2.6.1	Standardabweichung	44
2.6.2	Standardfehler	44
2.6.3	Signifikanztest	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Simultane Repression der <i>StAGPase</i> und Überexpression des <i>PsGPT</i> und <i>AtNTT1</i> in <i>Solanum tuberosum</i>	45
3.1.1	Hintergrund	45
3.1.2	Expressionsanalysen in transformierten Kartoffelpflanzen	46
3.1.3	AGPase-Aktivitätsmessungen in Kartoffelblättern	50
3.1.4	Untersuchungen der AGN-Kartoffelpflanzen aus Gewächshausanzuchten	51
3.1.4.1	Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile	51
3.1.4.2	Stärkegehalte in Kartoffelblättern	52
3.1.4.3	Zuckergehalte in Kartoffelblättern	54
3.1.4.4	Analyse der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen	56
3.1.4.5	Bestimmung der CO ₂ -Assimilation	59
3.1.4.6	Bestimmung der ¹⁴ CO ₂ -Aufnahme in die Blattstärke	62
3.1.4.7	GC/MS-Messungen von Kartoffelblättern	63
3.1.4.8	Analyse der Knollenerträge	65
3.1.4.9	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	66
3.1.4.10	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	68
3.1.4.11	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	69
3.1.5	Untersuchungen der AGN-Kartoffelpflanzen aus Beetanzuchten	70
3.1.5.1	Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile	71
3.1.5.2	Stärkegehalte in Kartoffelblättern	72
3.1.5.3	Zuckergehalte in Kartoffelblättern	73
3.1.5.4	Analyse der Knollenerträge	74
3.1.5.5	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	75
3.1.5.6	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	76
3.1.5.7	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	77
3.1.5.8	Amylosegehalte in Kartoffelknollen	78

3.1.6	Die AGN-Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien	79
3.1.6.1	Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile	80
3.1.6.2	Stärkegehalte in Kartoffelblättern	81
3.1.6.3	Zuckergehalte in Kartoffelblättern	83
3.1.6.4	AGPase-Aktivitätsmessungen in Kartoffelblättern	85
3.1.6.5	Analyse der Knollenerträge	86
3.1.6.6	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	88
3.1.6.7	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	90
3.1.6.8	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	90
3.1.7	Die AGN-Pflanzen im 24-h-Verlauf	93
3.1.7.1	Stärkegehalte in Blättern	93
3.1.7.2	Zuckergehalte in Blättern	95
3.1.7.3	AGPase-Aktivität in Blättern	97
3.1.8	Die AGN-Pflanzen in verlängerten Dunkelphasen	98
3.1.8.1	Stärkegehalte in Blättern	98
3.1.8.2	Zuckergehalte in Blättern	100
3.2	Simultane Überexpression der <i>EcPPase</i>, des <i>PsGPT</i> und <i>AtNTT1</i> in <i>Solanum tuberosum</i>	102
3.2.1	ntergrund	102
3.2.2	Expressionsanalysen in transformierten Kartoffelpflanzen	103
3.2.3	PPase-Aktivitätsmessungen in Kartoffelpflanzen	105
3.2.4	Untersuchungen der PGN-Pflanzen aus Gewächshausanzuchten	107
3.2.4.1	Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile	107
3.2.4.2	Stärkegehalte in Kartoffelblättern	109
3.2.4.3	Zuckergehalte in Kartoffelblättern	110
3.2.4.4	Analyse der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen	112
3.2.4.5	Bestimmung der CO ₂ -Assimilation	113
3.2.4.6	Bestimmung der ¹⁴ CO ₂ -Aufnahme in die Blattstärke	114
3.2.4.7	GC/MS-Messungen von Kartoffelblättern	115
3.2.4.8	Analyse der Knollenerträge	118
3.2.4.9	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	119
3.2.4.10	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	121

3.2.4.11	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	123
3.3	Ist dieser biotechnologische Ansatz auf andere Nutzpflanzen übertragbar?	125
3.3.1	Blattstärkeakkumulation in Nutzpflanzen während verlängerter Dunkelphasen	125
4	Diskussion	129
4.1	Die Auswirkungen einer erhöhten <i>source</i> und <i>sink</i> Kapazität auf Kartoffelpflanzen im Gewächshaus	129
4.1.1	Inhibierung der Stärkebiosynthese in Blättern von AGN- und PGN-Pflanzen	129
4.1.2	Erhöhte Zuckerexportkapazität in AGN- und PGN-Pflanzen	133
4.1.3	Gesteigerte photosynthetische Aktivität in AGN- und PGN-Pflanzen	134
4.1.4	Unbeeinflusstes Grüngewicht in AGN- und PGN-Pflanzen	135
4.1.5	Erhöhter Knollenertrag und Stärkegehalt in Knollen von AGN- und PGN-Pflanzen	136
4.1.6	Unveränderte Zuckergehalte in Knollen von AGN- und PGN-Pflanzen	139
4.1.7	Veränderter Entwicklungsprozess in AGN-Pflanzen	139
4.1.8	Eventuelle Nachteile der AGN-Pflanzen in verlängerten Dunkelphasen	142
4.2	Bestätigung des AGN-Phänotyps in einer Beetanzucht	144
4.2.1	Veränderte Stärkezusammensetzung in Knollen von AGN-Pflanzen	145
4.3	Die Besonderheit dieses biotechnologischen Ansatzes	146
4.4	Transfer der gewonnenen Erkenntnisse auf andere Nutzpflanzen	148
5	Fazit	151
6	Literaturverzeichnis	152
7	Abbildungsverzeichnis	161
8	Tabellenverzeichnis	165
9	Abkürzungsverzeichnis	166

10	Kurzzusammenfassung und Abstract	170
10.1	Kurzzusammenfassung	170
10.2	Abstract	172
11	Tagungsbeiträge	173
12	Danksagungen und Formalia	174
12.1	Danksagungen	174
12.2	Erklärung	176
12.3	Lebenslauf	177

1 Einleitung

1.1 Die biotechnologische Bedeutung von Stärke

In vielen höheren Pflanzen ist Stärke die Speicherform von Kohlenhydraten und kann z.B. in Kartoffelknollen bis zu 80% des Knollentrockengewichts ausmachen (Kruger, 1997). Stärke besteht aus den Glukosepolymeren Amylose und Amylopektin. Amylose setzt sich aus vielen α -Glukose-Einheiten zusammen, die in 1,4-glykosidischen Bindungen aneinander gereiht sind, was dem Polymer eine lineare, α -helikale Struktur gibt. Amylopektin weist ebenso Ketten von 1,4-glykosidisch verknüpften α -Glukose-Einheiten auf. Im Gegensatz zu Amylose verfügt es zusätzlich über Seitenketten, die über α -glykosidische 1,6-Bindungen verzweigt sind (Smith et al., 1997).

Stärke ist das vorherrschende Kohlenhydrat in der menschlichen Ernährung. In verschiedenen Formen wird Stärke als Verdickungs- und Bindemittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Bei der Stärkeverzuckerung wird die pflanzliche Stärke unter Einsatz industriell synthetisierter Enzyme vor allem in den Zucker Glukose zersetzt, die dann als Traubenzucker vermarktet wird (Biosicherheit, 2011).

Dieser universelle Rohstoff hat jedoch nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie einen hohen Stellenwert, sondern ist auch für die Chemie-, Papier- und Verpackungsindustrie als nachwachsender Rohstoff von großer Bedeutung. Es werden z. B. Papier, Kleister, Kleb-, Schmier-, Bau- und Kunststoffe hergestellt. In den letzten Jahren hat es verschiedene Produktentwicklungen auf Stärkebasis gegeben, wie z.B. biologisch abbaubarer Biokunststoff. Biokunststoffe werden bei der Fertigung von Tragetaschen und -tüten oder bei der Herstellung von Schalen für Lebensmittel eingesetzt (Biosicherheit, 2011). Es gibt ca. 600 industrielle Produkte, die ihren Ursprung in der Pflanzenstärke haben (Ball et al., 1996).

Da der Stellenwert der Stärke für die industrielle Verarbeitung immer größer wird, werden auch immer höhere Anforderungen an die Rohstoffpflanzen gestellt. Die Kartoffel ist neben Mais und Weizen insbesondere in Deutschland ein wichtiger Stärkelieferant, weil sie sehr hohe Erträge pro Hektar liefert. Für Kartoffeln erzielten die Landwirte im Jahr 2010 einen durchschnittlichen Ertrag von 372 Dezitonnen pro Hektar und für Getreidearten im Jahr 2009 72,1 Dezitonnen pro Hektar (BMELV, 2011). Eine Kartoffel sollte einen hohen Stärkegehalt, eine optimale Stärkezusammensetzung und von gleichmäßiger Qualität sein. Wie bereits erwähnt, sind Amylose und Amylopektin die beiden Stärkekomponenten. Für die industrielle Verarbeitung hat Amylopektin aufgrund der besseren Kleistereigenschaften einen höheren Stellenwert als Amylose. Die Trennung beider Komponenten ist jedoch sehr aufwändig, weshalb auf Rohstoffpflanzen zurückgegriffen wird, die einen höheren Amylopektingehalt haben. Mit Hilfe konventioneller Züchtungsmethoden ist es nicht einfach, eine Kartoffel zu

züchten, die bevorzugt Amylopektinstärke bildet, weil die Kartoffel tetraploid ist und ein kompliziertes Vererbungsmuster aufweist. Es ist daher sehr schwierig, eine oder sogar mehrere Erbeigenschaften einzukreuzen, da meist für eine Eigenschaft mehrere Gene zuständig sind. Durch die Gentechnik ist es jedoch möglich, die granulagebundene Stärkesynthase GBSS1, die für die Amylosesynthese zuständig ist, zu blockieren, wodurch die Stärkezusammensetzung gezielt verändert werden konnte. Dies erfolgte mit Hilfe der Antisense-Technologie, wodurch das Gen für die Stärkesynthase gezielt ausgeschaltet wurde. Auf diese Weise wurde die gentechnisch veränderte Kartoffel „Amflora“ von Forschern der BASF Plant Science produziert, die vorwiegend Amylopektin beinhaltet. Diese Pflanze wurde dreizehn Jahre nach dem ersten Zulassungsantrag und nach zahlreichen wissenschaftlichen Begutachtungen am 02.03.2010 in der EU für den Anbau zugelassen (Biosicherheit, 2011).

Mittlerweile ist es auch gelungen, durch Tilling (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) eine amylosefreie Kartoffel zu entwickeln. Dabei wird im Pflanzengenom durch Zugabe von EMS (Ethylmethansulfonat) die natürliche Mutationsrate erhöht. Mit Hilfe eines molekularbiologischen Screening-Verfahrens können dann diejenigen Pflanzen ausfindig gemacht werden, die die gewünschte Erbgutveränderung aufweisen (Muth et al., 2008). Neben der gewünschten Veränderung treten jedoch auch eine große Zahl von Mutationen auf, die viele Gene betreffen und erwünschte Eigenschaften in Pflanzen, wie z. B. die Ertragsleistung abschwächen können. Daher müssen die Pflanzen, die die gewünschte Erbgutveränderung aufweisen, mit Hochleistungssorten zurückgekreuzt werden, um wieder ertragreiche Pflanzen zu erhalten, was sehr zeitintensiv ist.

1.2 Der Stärkemetabolismus

Während der Photosynthese nutzen Pflanzen die Lichtenergie des Sonnenlichts, um aus anorganischen Ausgangssubstanzen Biomasse zu bilden. Die Photosynthese lässt sich in Licht- und Dunkelreaktion gliedern. Während der Lichtreaktion in den Chloroplasten wird die Energie des Lichts dazu genutzt, chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und Reduktionsäquivalente in Form von Nicotinamidadeninukleotidphosphat (NADPH) bereitzustellen.

Die Synthese von Kohlenhydraten wird als Dunkelreaktion bezeichnet. Im Calvin-Zyklus, auch als reduktiver Pentosephosphatweg bekannt, carboxyliert die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) das Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP) und fixiert so das aus der Atmosphäre assimilierte CO₂. Dabei entsteht 3-Phosphoglycerat (3-PGA), welches durch die Phosphoglyceratkinase (PGK) zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgesetzt wird. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) katalysiert die

Synthese zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), was über die Triosephosphatisomerase (TPI) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) wird. Die Triosephosphate GAP und DHAP werden entweder für die Regeneration von RubP oder für die Bildung transitorischer Stärke verwendet oder über den in der inneren Chloroplastenmembran lokalisierten Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) ins Cytosol transportiert (Flügge, 1999), wo sie für die Saccharosesynthese verwendet werden (Heldt, 2008).

In Abbildung 1 und in den nachfolgenden Kapiteln ist die Synthese und Mobilisierung transitorischer Stärke in Blättern (s. 1.2.1 und 1.2.2), die Saccharosesynthese im Cytosol (s. 1.2.3), die Phloembeladung, der Transport von Saccharose in die Knollen (s. 1.2.4) und die Synthese von Speicherstärke in Amyloplasten von Knollen (s. 1.2.5) beschrieben.

Beschreibung der folgenden Abbildung 1 (Abbildung s. folgende Seite)

Enzyme: 1: Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO); 2: Triosephosphat-Isomerase (TPI); 3: Aldolase; 4: Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase); 5: Phosphoglukoisomerase (PGI); 6: Phosphoglukomutase (PGM); 7: ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase); 8: Stärkesynthasen, Stärkeverzweigungs- und Stärkeentzweigungsenzym; 9: Pyrophosphatase (PPase); 10: UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UGPase); 11: Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS); 12: Saccharose-Phosphat-Phosphatase (SPP); 13: Invertase; 14: Saccharose-Synthase (SuSy); 15: Hexokinase; 16: Glukan-Wasser-Dikinase (GWD), Phosphoglukan-Wasser-Dikinase (PWD); 17: Stärkeentzweigungsenzym (ISA3); 18: β -Amylase; 19: Disproportionierungsenzym (DPE1); 20: Cytosolische Transglukosidase (DPE2); 21: α -Glukan-Phosphorylase (Pho1); 22: Plastidäre Glukan-Phosphorylase (PHS1); 23: PPI-abhängige Phosphofruktokinase (PFK); 24: ATP-abhängige Phosphofruktokinase (PFK).

Abkürzungen: TrioseP: Triosephosphat; 3-PGA: 3-Phosphoglycerat; TPT: Triosephosphat/Phosphat-Translokator; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DHAP: Dihydroxyaceton-Phosphat; RubP: Ribulose-1,5-bisphosphat; F1,6bP: Fruktose-1,6-bisphosphat; F6P: Fruktose-6-Phosphat; G6P: Glukose-6-Phosphat; G1P: Glukose-1-Phosphat; ADPG: ADP-Glukose; ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; UTP: Uridintriphosphat; UDP: Uridindiphosphat; UDPG: UDP-Glukose; S6P: Saccharose-6-Phosphat; GPT: Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator; NTT: plastidärer Adenylattranslokator; GT: Glukosetransporter; MEX1: Maltoseexporter 1; HT: Hexosetransporter; SEP: Saccharose-Effluxproteine; Pi: anorganisches Orthophosphat; PPI: anorganisches Pyrophosphat; NADPH: Nicotinamadeninindinukleotidphosphat; OPPW: Oxidativer Pentosephosphatweg.

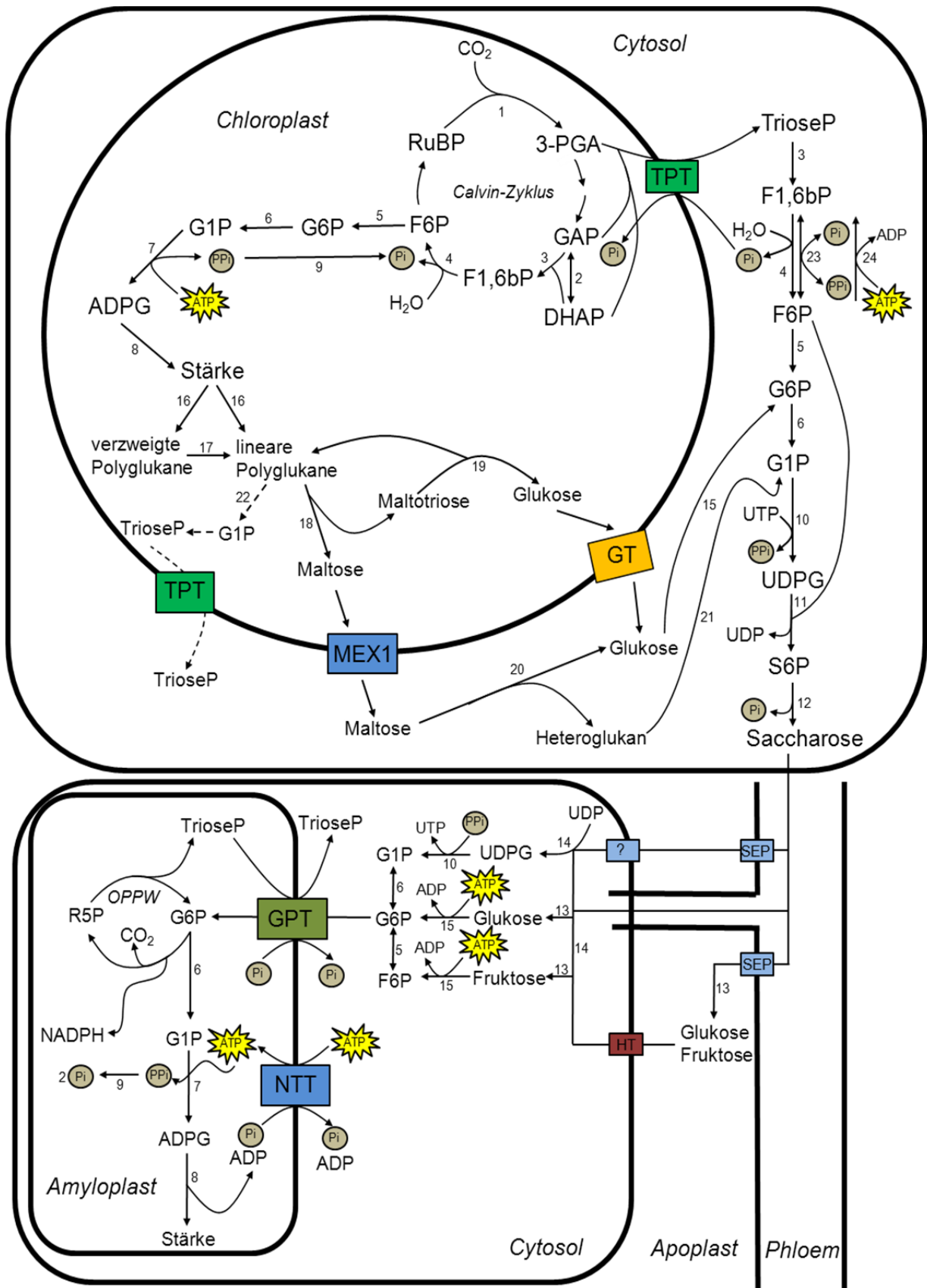


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stärkeaufbaus und -abbaus in Chloroplasten, der Saccharosesynthese im Cytosol und der Stärkesynthese in Amyloplasten.

1.2.1 Die Synthese von transitorischer Stärke in Blättern

In den Chloroplasten der Blätter dient Fruktose-6-Phosphat (F6P), ein Intermediat des Calvin-Zyklus, als Ausgangsprodukt der Stärkesynthese in Blättern. Die Phosphogluko-isomerase (PGI) katalysiert die Isomerisierung von F6P zu Glukose-6-Phosphat (G6P). Die Phosphoglukomutase (PGM) überträgt den Phosphatrest des sechsten Kohlenstoffatoms auf das erste, wodurch Glukose-1-Phosphat (G1P) entsteht. Die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) katalysiert die Reaktion von G1P und ATP zu Pyrophosphat (PPi) und ADP-Glukose, was als Substrat für die folgende Stärkesynthese dient (Smith et al., 1997). Das PPi wird durch eine plastidäre Pyrophosphatase (PPase) irreversibel zu zwei Phosphatmolekülen hydrolysiert und damit dem Reaktionsgleichgewicht entzogen, wodurch sich dieses in Richtung Stärkesynthese verlagert (Weiner et al., 1987).

ADP-Glukose ist das Ausgangsprodukt für die Stärkesynthese. Stärkesynthasen katalysieren den Transfer des Glukoserests von ADP-Glukose auf das reduzierende Ende eines bereits vorhandenen α -1,4-Polyglukans unter Freisetzung von ADP. Lösliche Stärkesynthasen (SS) arbeiten mit Stärkeverzweigungsenzymen (starch branching enzymes, SBE) zusammen, hydrolysieren die α -1,4-Verbindungen und übertragen den Glukosylrest α -1,6 auf einen anderen Glukoserest in der Kette und bilden so Amylopektin (Martin und Smith, 1995; Smith et al., 1995). Stärkeentzweigungsenzyme (debranching enzymes) sind ebenso für die Amylopektinsynthese notwendig, da sie vermutlich falsch plazierte Verzweigungen aufheben. Für die Bildung von Amylose sind granulagebundene Stärkesynthasen (GBSS) notwendig (Smith et al., 1997).

Die Stärkesynthese muss streng reguliert werden, um zu gewährleisten, dass ausreichend Saccharose für den Export zur Verfügung steht und um transitorische Stärke für die Nacht aufzubauen. Um den primären CO_2 -Akzeptor RubP zu regenerieren, müssen immer genügend Triosephosphate zur Verfügung stehen. Die Verfügbarkeit von phosphorylierten Metaboliten, die während der Photosynthese gebildet werden, und von Orthophosphaten (Pi), die bei der Saccharosesynthese entstehen, haben eine wichtige regulatorische Eigenschaft. Außerdem hat die AGPase eine wichtige regulatorische Funktion während der Stärkesynthese (Neuhaus und Stitt, 1990). Die AGPase ist ein Heterodimer und besteht aus zwei großen, regulatorischen und zwei kleineren, katalytischen Untereinheiten (Morell et al., 1987; Okita et al., 1990) und wird durch 3-PGA und Pi allosterisch reguliert, wobei 3-PGA aktiviert und Pi inhibiert (Sowokinos, 1981). Die Stärkesynthese kann somit durch ein gesteigertes 3-PGA/Pi-Verhältnis als Folge einer gesteigerten Bereitstellung von Photoassimilaten durch die Photosynthese stimuliert werden. Ein sinkendes 3-PGA/Pi-Verhältnis inhibiert die AGPase-Aktivität, um ein übermäßigen Fluss von Triosephosphaten in die Stärkesynthese zu unterbinden (Heldt et al., 1977). Zudem liegt eine posttranslationale

Redoxregulation vor, bei der die AGPase-Aktivität durch die Bildung einer intermolekularen Cystein-Brücke zwischen den beiden katalytischen Untereinheiten gehemmt wird. Zudem können im Licht reduzierte Thioredoxine zur Aktivierung der AGPase führen, wodurch sichergestellt wird, dass die Synthese transitorischer Stärke im Licht abläuft (Tiessen et al., 2002; Hendriks et al., 2003).

1.2.2 Die Mobilisierung von transitorischer Stärke in Blättern

Die während des Tages in den Blättern synthetisierte transitorische Stärke (s. 1.2.1) wird während der Nacht zu Saccharose abgebaut und in die *sink* Gewebe transportiert. Dadurch wird gewährleistet, dass das nicht photosynthetisch aktive Gewebe und die Blattzellen mit Reduktionsäquivalenten und Energie versorgt werden. Der nächtliche Abbau lässt sich in drei Schritte aufteilen: (1) Initialisierender Angriff auf die Stärkegranula, (2) Abbau von Amylopektin und Amylose und (3) Export von Maltose und Glukose aus den Plastiden ins Cytosol.

Da Stärke in der Form von semikristallinen Körnern vorliegt, die aus Amylose und Amylopektin bestehen, muss die einleitende Reaktion des Stärkeabbaus von einem Enzym katalysiert werden, das die semikristalline Struktur an der Oberfläche der Stärkekörner angreift und lösliche Glukane produzieren kann. Die Endoamylase α -Amylase sollte dieses Enzym sein (Fincher, 1989; Smith et al., 2005). Diese α -Amylase hydrolysiert im Endosperm von keimenden Getreidekörnern α -1,4-glykosidische Bindungen und setzt lösliche Polyglukane frei. Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* zeigten jedoch, dass α -Amylasen für den Stärkeabbau in Blättern nicht zwingend notwendig sind. In einer *Arabidopsis thaliana* Mutante wurden alle drei Gene, die die α -Amylase-ähnlichen Proteine *AtAMY1*, *AtAMY2*, und *AtAMY3* kodieren, ausgeschaltet, doch dies hatte keine Auswirkungen auf den Stärkeabbau (Yu et al., 2005). Bis heute ist nicht vollständig geklärt, wie der initiale Angriff auf die Granula erfolgt. Bekannt ist, dass durch die Glukan-Wasser-Dikinase (GWD) und die Phosphoglukan-Wasser-Dikinase (PWD) der Stärkeabbau durch Phosphorylierung der Stärke eingeleitet wird. Die GWD fügen an die C6- und C3-Positionen der Glykosylreste β -Phosphate aus ATP an. Die PWD hingegen phosphoryliert die bereits durch die GWD phosphorylierten Glykosylreste (Kötting et al., 2005; Lloyd et al., 2005; Ritte et al., 2006).

Durch die Phosphorylierung wird die kristalline Struktur der Stärkekörner verändert und macht Amylopektinketten für den weiteren Abbau zugänglich (Edner et al., 2007; Hejazi et al., 2008) Untersuchungen zeigen, dass die Exoamylase β -Amylase zusammen mit der Isoamylase 3 (ISA3, debranching enzyme) für den weiteren Abbau sorgen. Die β -Amylase hydrolysiert α -1,4- und ISA3 α -1,6-glykosidische Verbindungen, wodurch Maltose und lineare Polyglukane freigesetzt werden (Scheidig et al., 2002; Smith et al., 2005). Weil die β -

Amylase Maltose von linearen Polyglukanen nur abspaltet, wenn diese länger als drei Glykosylreste sind, bleiben zwangsläufig als Rest die Maltotriosen übrig. Diese werden durch das plastidäre Disproportionierungsenzym (DPE1) abgebaut. Dabei wird ein Glukoserest als Glukose abgespalten und die verbleibenden Glukosereste werden auf ein lineares Glukan übertragen, wodurch Maltopentaose oder längerkettige Maltooligosaccharide entstehen (Critchley et al., 2001). Beim hydrolytischen Abbau von Stärke fallen die Hauptprodukte Maltose und Glukose an, die durch den plastidären Glukosetransporter (Weber et al., 2000) und den Maltoseexporter 1 (MEX1) (Niittyla et al., 2004) ins Cytosol transportiert werden. Zudem kann auch G1P bei der phosphorolytischen Spaltung durch α -Glukan-Phosphorylase (Pho1) gebildet werden.

1.2.3 Die Saccharosesynthese im Cytosol von Mesophyllzellen

Das aus Glukose und Fruktose bestehende Disaccharid Saccharose wird im Cytosol von Mesophyllzellen synthetisiert. Saccharose ist eine wichtige Transportform von Kohlenhydraten in Pflanzen und wird in den *sink* Organen als Energielieferant für Wachstum, Entwicklung und Speicherstoffaufbau genutzt. In wenigen Pflanzen werden Kohlenhydrate jedoch auch als Zuckeralkohole in Form von Sorbitol und Mannitol oder als Zucker der Raffinosefamilie transportiert (Heldt, 2008).

In der Nacht wird Stärke zu Maltose und Glukose abgebaut, die dann für die Saccharosesynthese eingesetzt werden. Am Tag stehen genügend Triosephosphate aus dem Calvin-Zyklus zur Verfügung (Stitt et al., 1984). Die Triosephosphate werden mit Hilfe des TPT im Austausch mit Pi aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert, wo sie über eine Aldolase zu Fruktose-1,6-bisphosphat (F1,6bP) umgesetzt werden. Die Dephosphorylierung zu F6P über die Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) ist ein wichtiger Regulationspunkt der Saccharosesynthese. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Regulatorsubstanz Fruktose-2,6-bisphosphat (F2,6bP), die durch die Fruktose-6-Phosphat-2-Kinase (F6P2K) aus F6P gebildet wird und sich nur in der Stellung einer Phosphatgruppe von F1,6bP unterscheidet. Durch die Fruktose-2,6-bisphosphatase kann F2,6bP wieder zur Ausgangssubstanz hydrolysiert werden. F2,6bP ist ein starker Regulator der cytosolischen FBPase, da bereits geringe F2,6bP-Konzentrationen zu einer stark verringerten Affinität der FBPase zu seinem Substrat F1,6bP führen. F2,6bP kann auch über eine P_{Pi}-abhängige Phosphofruktokinase (PFK) aktiviert werden, die das bei der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase-Reaktion entstandene P_{Pi} verwerten kann. Ohne F2,6bP ist die P_{Pi}-abhängige PFK inaktiv. Triosephosphat und 3-PGA hemmen die F2,6bP-Synthese, wohingegen F6P und Pi die Synthese stimulieren und die Hydrolyse hemmen. Dadurch führt ein Anstieg der Triosephosphat-Konzentration zu einer verringerten F2,6bP-Menge und

einer gesteigerten FBPase-Affinität für F1,6bP. Gleichzeitig erhöht sich auch die Konzentration des über die Aldolasereaktion im Gleichgewicht stehende F1,6bP. Durch diese Regulation wird eine effiziente Anpassung der Saccharosesynthese an die Triosephosphatmenge erreicht: Es wird gewährleistet, dass ein für den Calvin-Zyklus erforderlicher minimaler Triosephosphatspiegel nicht unterschritten wird. Somit passt sich die FBPase nicht nur dem Substratangebot an, sondern auch der Produktnachfrage. Wenn die F6P-Menge ansteigt, wird die F6P2K stimuliert und die Fruktose-2,6-bisphosphatase gehemmt, was ein Anstieg von F2,6bP zur Folge hat und die FBPase-Aktivität herabsetzt (Heldt, 2008).

Aus F6P werden G6P und G1P über die PGI und PGM synthetisiert. Die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UGPase) katalysiert die Synthese von UDP-Glukose aus G1P und Uridintriphosphat (UTP) unter Freisetzung von PPI. Diese Reaktion ist reversibel und PPI wird nicht aus dem Gleichgewicht entfernt. UDP-Glukose kann mit F6P über die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) zu Saccharose-6-Phosphat (S6P) synthetisiert werden. Die Saccharose-Phosphat-Phosphatase (SPP) führt in einem irreversiblen Schritt die Dephosphorylierung zu Saccharose durch. Die Saccharose ist das Endprodukt der Saccharosesynthese und kann in die *sink* Organe transportiert werden (Heldt, 2008).

PPI ist ein wichtiger Metabolit und kann durch PPasen zu Pi hydrolysiert werden. Die PPase kommt sowohl in löslicher Form in Plastiden vor, aber auch in sehr geringen Konzentrationen im Cytosol (George et al., 2010), als auch als membrangebundene Form in Tonoplasten (Davies et al., 1992; Baltscheffsky et al., 1999; Maeshima, 2000), Mitochondrien (Vianello und Macri, 1999) und Chloroplasten (Jiang et al., 1997). In *Solanum tuberosum* wurden die beiden löslichen PPase-Gene *StPPa1* und *StPPa2* identifiziert, die im Cytosol lokalisiert sind (Rojas-Beltran et al., 1999). Die Bedeutung von PPI für den Pflanzenstoffwechsel wurde durch PPase Aktivierungs- bzw. Inhibierungsstudien untersucht. Die konstitutive Expression der anorganischen, löslichen PPase aus *Escherichia coli* im Cytosol von Kartoffel- oder Tabakpflanzen führt zu einer Abnahme der PPI-Gehalte im Cytosol. Dies hat wiederum Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel, was sich in reduzierten Stärke- und erhöhten Zuckergehalten in Blättern äußerte. Die Hydrolyse von PPI hat auch Auswirkungen auf die Kohlenhydratverteilung in Knollen, was sich in erhöhten Zucker- und verringerten Stärkegehalten äußerte, was auf einen weniger effizienten Saccharoseabbau hindeutet (Sonnewald, 1992). Die Repression der anorganischen, löslichen, plastidären PPase führte in Tabakblättern zu verschiedenen physiologischen Störungen im chloroplastidären Metabolismus, als Folge der erhöhten PPI-Gehalte. Dies hatte u. a. Auswirkungen auf den Stärkemetabolismus, ebenso war die Kohlenstoffassimilation in Pflanzen mit reduzierter PPase-Aktivität im Vergleich zu Kontrollpflanzen gestört (George et al., 2010).

In der Nacht läuft die Saccharosesynthese nicht über die FBPase-Reaktion ab, weil hohe Konzentrationen an F2,6bP die FBPase hemmen. Daher erfolgt die Saccharosesynthese nachts mit exportierter Glukose und Maltose (s. 1.2.2). Ein cytosolisches Disproportionierungsenzym (DPE2) katalysiert die Übertragung der Glukose von Maltose auf ein im Cytosol vorhandenes Rezeptorheteroglukan und setzt den anderen Glukoserest frei (Fettke et al., 2005). Die abgespaltete, freie Glukose wird durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu G6P phosphoryliert. Eine cytosolische α -Glukan-Phosphorylase (Pho2) spaltet den Glukoserest vom Heteroglukan phosphorolytisch ab und überträgt diesen auf Pi, wodurch G1P entsteht. Somit kann die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UDPGase) mit G1P als Substrat die Bildung von Uridindiphosphat-Glukose (UDPG) katalysieren, welches zusammen mit F6P für die Saccharosesynthese bereitsteht. Die Saccharose wird entweder über das Phloem exportiert oder in der Vakuole zwischengelagert (Eicks et al., 2002; Lu und Sharkey, 2006).

1.2.4 Die Phloembeladung und der Transport in die Knollen

Die in den Mesophyllzellen gebildete Saccharose diffundiert durch die Plasmodesmata. Der Weitertransport in die Siebröhren erfolgt entweder durch Diffusion der Saccharose über den Symplasten der Bündelscheiden- und Geleitzellen (Roberts und Oparka, 2003) oder apoplastisch. Pflanzen, in denen der Saccharosetransport ins Phloem überwiegend symplastisch erfolgt, werden als „symplastic loaders“ bezeichnet. Die Bündelscheidenzellen sind mit speziellen Geleitzellen, die als Intermediärzellen bezeichnet werden, im weiteren mit den Siebelementen durch eine große Zahl von Plasmodesmen verbunden (Heldt, 2008). Der apoplastische Transport hingegen findet hauptsächlich bei Pflanzen statt, deren Geleit- und Siebzellen nicht sehr stark durch Plasmodesmata mit den umgebenen Zellen verbunden sind (Sauer, 2007). In Blättern von Kartoffeln, Raps, Zuckerrüben oder Getreide z. B. sind in den Phloemparenchymzellen und im Siebzellen/Geleitzellen-Komplex wesentlich weniger Plasmodesmata zu finden. Daher verläuft die Beladung hauptsächlich in apoplastischer Form (Riesmeier et al., 1994; van Bel, 2003). Beim apoplastischen Transport befördern Translokatoren die Saccharose zunächst in den intrazellulären Raum, den Apoplasten. Dieser Transport erfordert keine Energie. Da die Saccharosekonzentration im Apoplasten viel niedriger ist als in den *source* Zellen, verläuft der Transport entlang eines Konzentrationsgradienten. Die dafür notwendigen Saccharosetransporter sind der AtSUC2 bei *Arabidopsis thaliana* (Sauer und Stolz, 1994) bzw. der StSUT1 bei Kartoffeln (Riesmeier et al., 1993). Durch konstitutive Antisense-Expression in Kartoffeln konnte die Bedeutung von StSUT1 für die Phloembeladung gezeigt werden, was sich in einem reduzierten Knollenertrag und einem erhöhten Stärke- und Zuckergehalt in Blättern äußerte. Zudem war

die Zuckerexportkapazität in Blättern verringert (Riesmeier et al., 1994). Auch in *Arabidopsis thaliana* konnte die Bedeutung des *SUC2* Gens für die Phloembeladung gezeigt werden. In *Arabidopsis* Mutanten, die T-DNA-Insertionen im *SUC2* Gen enthielten, war u. a. das Wachstum eingeschränkt und die Entwicklung verzögert (Gottwald et al., 2000). Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass *AtSUC2* in den Geleitzellen lokalisiert ist (Stadler und Sauer, 1996). Für SUT1 in Kartoffel, Tomate und Tabak wurde eine Lokalisation in den Siebelementen vermutet (Kühn et al., 1997). Doch neuere Immunlokalisationsstudien unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das SUT1-Protein aus *Solanaceae* bestätigten dies nicht und zeigten eine Lokalisation in den Geleitzellen (Schmitt et al., 2008). Vakuoläre Saccharosetransporter waren lange Zeit nicht bekannt, obwohl die Vakuole Ort der Saccharosespeicherung ist. Durch einen Proteomansatz, bei dem die tonoplastidären Fraktionen hochgereinigter Mesophyllvakuolen in Gerste analysiert worden sind, konnte unter 88 vakuolären Proteinen auch der *HvSUT2* identifiziert werden. *HvSUT2* und das SUT4 Homolog in *Arabidopsis thaliana* sind an der vakuolären Membran lokalisiert und haben eine Funktion im Saccharosetransport (Endler et al., 2006).

Der Transport von Saccharose aus dem Apoplasten in die Geleitzellen des Phloems erfolgt durch einen Protonensymport (H^+). Dafür ist ein Protonengradient notwendig, der durch eine phloemspezifische H^+ -ATPase erzeugt wird. Diese ist mit den SUTs in den Geleitzellen der Plasmamembran lokalisiert und befördert unter Verbrauch von ATP Protonen in den Apoplasten (Dewitt und Sussman, 1995). Die notwendige Energie in Form von ATP wird aus einem kleinen Teil der importierten Saccharose gewonnen (Lerchl et al., 1995).

Die Saccharose wird über einen Massenfluss, der durch Druckunterschiede zwischen *source* und *sink* Geweben ausgelöst wird, zu den *sink* Organen geführt. Die Druckunterschiede werden durch Substanzen, die auf dem Weg zu den *sinks* aus den Siebröhren entweichen und wieder aufgenommen werden, aufrecht halten (van Bel, 2003). Die dabei ausgeströmte Saccharose wird ständig über SUT1 wieder zurückbefördert (Kühn et al., 1997; van Bel, 2003).

Die Entladung von Saccharose in das *sink* Gewebe erfolgt wie die Beladung entweder apoplastisch oder symplastisch. Bei der symplastischen Entladung gelangt die Saccharose über Plasmodesmen direkt von den Siebröhren in die Zellen der Verbrauchsorgane. In Kartoffelknollen stehen in der frühen Entwicklung Plasmodesmata mit einem außergewöhnlich hohen „size exclusion limit“ (SEL) für eine effektive symplastische Entladung zur Verfügung, wodurch der Saccharosetransport uneingeschränkt ermöglicht wird. Analysen zeigten, dass Proteine mit einer Größe von bis zu 60 kDa frei durch die Plasmodesmata diffundieren können (Oparka und Turgeon, 1999; Baluska et al., 2001). Es wurde in Kartoffelknollen festgestellt, dass während der sehr frühen Knollenentwicklung apoplastische Entladungswege vorherrschen, die jedoch zu Beginn der Knollenbildung von

apoplastischer zu symplastischer Entladung wechseln. Die symplastische Entladung herrscht auch in der weiteren Knollenentwicklung vor (Viola et al., 2001). Das Umschalten von apoplastischer zu symplastischer Phloementladung geht mit großen physiologischen Veränderungen einher, was sich u. a. in einer Verringerung der cytosolischen und apoplastischen Invertaseaktivität äußert. Dadurch wird die Saccharose nicht mehr zu Glukose und Fruktose gespalten, die dann in das Cytosol transportiert werden kann. In wachsenden Knollen ist deswegen die Aktivität der Saccharose-Synthase (SuSy) stark erhöht, die Saccharose im Cytosol zu UDP-Glukose und Fruktose abbaut (Appeldoorn et al., 1997; Appeldoorn et al., 1999; Viola et al., 2001).

Bei der apoplastischen Entladung wird die Saccharose aus den Siebröhren durch Diffusion oder Saccharose-Effluxproteine (SEP) in den Apoplasten exportiert.

Der Weitertransport wird durch einen Saccharose/H⁺-Importer ermöglicht. Die Funktion von SUT1 in Knollen wurde durch knollenspezifische Antisense-Inhibierung untersucht, was zu physiologischen Veränderungen in der Knollenentwicklung von Kartoffelpflanzen führte und diese verzögerte. Dies äußerte sich z. B. in niedrigeren Knollenstärkegehalten in der frühen Knollenentwicklung. Daher liegt die Vermutung nahe, dass SUT1 an der Phloementladung in den Knollen beteiligt ist (Kühn et al., 2003). Zudem besteht die Möglichkeit, dass Saccharose durch die apoplastische Invertase gespalten wird. Der Weitertransport der dabei entstandenen Zucker Fruktose und Glukose erfolgt über Hexosetransporter (Frommer und Sonnewald, 1995).

1.2.5 Die Synthese von Speicherstärke in Amyloplasten von Knollen

In den Knollen werden die angelieferten Kohlenhydrate zu Stärke umgesetzt und deponiert. Dabei hängt in den Amyloplasten die Stärkesynthese im Gegensatz zur Stärkesynthese in Chloroplasten von Blättern vom Import von Kohlenstoffverbindungen und Energie ab.

Die Saccharose gelangt entweder auf symplastischem oder apoplastischem Weg in die Knollen, was sehr stark vom Entwicklungszeitpunkt der Knolle abhängig ist. Durch die symplastische Phloementladung gelangt die Saccharose direkt ins Cytosol, wo sie entweder durch die Invertase oder durch die SuSy abgebaut wird. Wie bereits in 1.2.4 erwähnt, verläuft die Invertase- und SuSy-Aktivität während der Knollenentwicklung gegenläufig. Der Abbau durch die SuSy ist in wachsenden Knollen dominierend. Dabei wird Saccharose unter Aufnahme von Uridindiphosphat (UDP) in UDP-Glukose und Fruktose gespalten. Die UGPase katalysiert die Umwandlung von UDP-Glukose unter P_{Pi}-Verbrauch und Abspaltung von UTP zu G1P. Die PGM katalysiert dann die Umwandlung von G1P zu G6P. Die Fruktose wird von der Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu F6P umgewandelt, die anschließend durch die PGI zu G6P umgesetzt wird.

Erfolgt die Phloementladung apoplastisch, gelangt die Saccharose ebenfalls direkt ins Cytosol und kann über die SuSy, die UGPase und der PGM zu G6P umgebaut werden, oder die Saccharose wird im Apoplasten durch die Invertase in Glukose und Fruktose gespalten, die in das Cytosol importiert und über die Hexokinase zu G6P bzw. F6P umgesetzt wird.

Die gewonnenen Hexosephosphate dienen dann der Stärkesynthese oder als Substrat für die Glykolyse und den oxidativen Pentosephosphatweg (OPPW) in den Amyloplasten (Neuhaus und Emes, 2000).

G6P wird über den Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator (GPT), der in der inneren Hüllmembran der Amyloplasten lokalisiert ist, in Amyloplasten transportiert. Der Transport erfolgt im strikten Austausch mit Pi oder Triosephosphaten (Kammerer et al., 1998). Energie wird dem Amyloplasten in Form von ATP zugeführt; dies erfolgt über den plastidären Adenylat-Translokator (NTT). Dieser transportiert ATP im Gegen Austausch mit ADP und Pi in die Amyloplasten (Kampfenkel et al., 1995; Trentmann et al., 2008). Die Stärkesynthese erfolgt ausgehend von G6P über die Enzyme plastidäre PGM und AGPase, Stärkesynthasen und Stärkeverzweigungsenzyme analog zur Stärkesynthese in Blättern, die bereits in 1.2.1. beschrieben ist.

Es wurde bereits beschrieben, dass der AGPase in Blättern eine zentrale Rolle zukommt, dies ist auch in Amyloplasten der Fall. Wie in Chloroplasten wird die AGPase allosterisch und durch posttranslationale Redoxmechanismen reguliert, wodurch die Stärkesynthese sehr schnell an die Zuckerverfügbarkeit angepasst werden kann (Tiessen et al., 2002; Geigenberger, 2003). Während der Knollenentwicklung sind die 3-PGA-Gehalte in Knollen konstant (Geigenberger und Stitt, 2000), verändern sich jedoch bei Verwundung, Wasserstress, hohen Temperaturen und Sauerstoffmangel. Durch Wasserstress wird die SPS mittels Phosphorylierung aktiviert; dies führt zu einer erhöhten Resynthese der osmotisch aktiven Saccharose im Cytosol. Dadurch sinkt der Gehalt an 3-PGA und inhibiert die AGPase, was eine reduzierte Stärkesynthese zur Folge hat (Geigenberger et al., 1999).

1.3 Die Bedeutung von GPT und NTT für die Stärkesynthese in Knollen

Die Stärkesynthese in Plastiden heterotropher Gewebe (hier: Amyloplasten) ist vom Import von Kohlenstoffgrundgerüsten und Energie abhängig. Die Kohlenstoffgrundgerüste werden in Form von G6P durch den GPT und die Energie in Form von ATP durch den NTT aus dem Cytosol in die Amyloplasten transportiert.

Die GPTs gehören zu der Familie der Phosphat-Translokatoren (Fischer und Weber, 2002), zu der auch die Unterfamilien des TPTs (Flügge et al., 1989; Flügge, 1999), des

Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators (Fischer et al., 1997) und des Xylulose-5-Phosphat/Phosphattranslokators (Eicks et al., 2002) gehören.

Wie alle Phosphat-Translokatoren sind auch die GPTs funktionale Homodimere (Flügge, 1999; Flügge et al., 2003), wobei jedes Monomer aus sechs membranständigen Helices besteht. Die Transporter fungieren als Antiporter, d. h. G6P wird z. B. gegen Phosphat oder Triosephosphat in einem sogenannten Ping-Pong-Mechanismus ausgetauscht. Dadurch wird das gleichzeitige Binden und Transportieren zweier Moleküle verhindert. Bevor ein zweites Molekül in dieselbe Richtung transportiert werden kann, muss der Transport des Austauschmoleküls in die andere Richtung abgeschlossen sein. Erste Hinweise darauf, dass G6P in stärkesynthetisierende Plastiden importiert wird, kamen durch Fütterungsversuche mit G6P in Plastiden von Erbsenkeimlingen (Hill und Smith, 1991), Rapskeimlingen (Kang und Rawsthorne, 1994) oder Kartoffelamyloplasten (Wischmann et al., 1999). Expressionsanalysen haben gezeigt, dass GPTs sehr stark in heterotrophen Geweben und weniger stark in Blättern und grünem Gewebe exprimiert sind (Kammerer et al., 1998; Niewiadomski et al., 2005).

In Kartoffeln existieren drei Isoformen des GPTs, GPT1, -2 und -3. GPT1 und -2 werden vor allem in heterotrophen Gewebe exprimiert, wohingegen GPT3 nur nach Infektion von Kartoffelpflanzen mit *Phytophthora infestans* nachgewiesen werden konnte (Ludewig, unveröffentlicht).

Die große Bedeutung des GPTs für die Stärkesynthese in Pflanzen wird deutlich, wenn man Experimente in *Arabidopsis thaliana* betrachtet, in denen heterozygote *gpt1* Knockout-Pflanzen analysiert worden sind. Die Mutanten waren sehr stark in der Entwicklung der Pollen und der weiblichen Gametophyten beeinträchtigt. In Pollen von *gpt1* Mutanten konnten weniger Lipidkörper festgestellt werden und Stärkekörner fehlten vollständig. Diese beeinträchtigte Gametophytenentwicklung wird durch einen unterbrochenen OPPW erklärt, da dieser aufgrund der verminderten G6P-Zufuhr nur noch eingeschränkt abläuft. Dieser ist jedoch für die Fettsäurebiosynthese sehr wichtig, die wiederum notwendig für die Pollenentwicklung ist. Homozygote *gpt1* Knockout-Pflanzen konnten nicht isoliert werden, da sie letal sind. Mutationen im *GPT2*-Gen hingegen hatten in *Arabidopsis thaliana* in Gewächshausanzuchten keine Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum und die Entwicklung (Niewiadomski et al., 2005).

Der NTT ist ein plastidärer Adenylattranslokator, der in allen Pflanzen vorkommt (Linka et al., 2003) und Homologe in intrazellulären mikrobiellen Parasiten hat (Haferkamp et al., 2006). Sie sind nicht verwandt mit den ADP/ATP-Carriern (AAC), die in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind. Die AACs exportieren das in den Mitochondrien gebildete ATP im Austausch mit ADP ins Cytosol (Haferkamp et al., 2002).

Erste biochemische Hinweise darauf, dass es einen ATP/ADP-Translokator gibt, der ATP in die Chloroplasten im Gegen Austausch mit ADP importiert, gab es bereits im Jahre 1969 (Heldt, 1969; Strotmann und Berger, 1969). Beweise für die Existenz des chloroplastidären NTTs in Plastiden von heterotrophem Gewebe kamen erst später (Schünemann et al., 1993). Molekularbiologische und biochemische Charakterisierungen bestätigten diese Erkenntnisse (Kampfenkel et al., 1995; Möhlmann et al., 1998).

Adenylattranslokatoren sind Monomere, die aus zwölf Transmembranhelices bestehen (Winkler und Neuhaus, 1999) und importieren ATP im Gegen Austausch mit ADP und Pi (Trentmann et al., 2008). In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher zwei Isoformen, der NTT1 und -2 gefunden, in Kartoffelpflanzen lediglich eine (Kampfenkel et al., 1995; Neuhaus et al., 1997; Möhlmann et al., 1998; Linka et al., 2003).

Dass der NTT eine wichtige Funktion in der Stärkesynthese hat, zeigen Untersuchungen, bei denen die Auswirkungen erhöhter oder verringerter Transportaktivitäten in Pflanzen untersucht worden sind. Kartoffelpflanzen, die ein antisense-Konstrukt gegen den NTT konstitutiv exprimieren und dadurch eine verringerte NTT-Aktivität zeigen, haben gleichzeitig bis zu 50% weniger Stärke in Knollen als Wildtyppflanzen. Eine weitere Folge der reduzierten NTT-Aktivität ist, dass sie zwar im Durchschnitt mehr Knollen bilden, dass diese aber wesentlich kleiner sind und der Gesamtknollenertrag pro Pflanze zwischen 70 und 95% vom Wildtyp liegt (Tjaden et al., 1998).

In Kartoffelpflanzen, die den NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des knollenspezifischen Promotors *B33* (Rocha-Sosa et al., 1989) überexprimieren und eine zweifach erhöhte NTT-Aktivität zeigen, konnte kein veränderter Stärkegehalt in Knollen und erhöhter Knollenertrag festgestellt werden (Zhang et al., 2008). Auch in Kartoffelpflanzen, die den GPT aus Wurzeln von *Pisum sativum* knollenspezifisch überexprimieren und eine erhöhte GPT-Aktivität zeigen, wurde kein veränderter Knollenstärkegehalt und Knollenertrag im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Zhang et al., 2008). Erst die gleichzeitige Überexpression beider Transporter führt zu deutlichen Veränderungen in Kartoffelpflanzen. Die doppelt transgenen Pflanzen wiesen einen um bis zu 19% erhöhten Knollenertrag und bis zu 28% erhöhten Knollenstärkegehalt auf. Der Stärkeertrag pro Pflanze wurde somit um 44% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Durch diesen biotechnologischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Stärkebildung in Amyloplasten sowohl durch die Zufuhr in Energie in Form von ATP durch den NTT und durch die Zufuhr von Kohlenstoffgrundgerüsten in Form von G6P durch den GPT co-limitiert ist (Zhang et al., 2008).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, unter Zuhilfenahme zweier biotechnologischer Ansätze, die Frage zu beantworten, ob die simultane Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu einer Ertragssteigerung in Kartoffelpflanzen führt. Zur Erhöhung der *source* Kapazität sollten zwei unterschiedliche Möglichkeiten genutzt werden. Zum einen eine blattspezifische Repression der AGPase aus *Solanum tuberosum* und zum anderen eine mesophyllspezifische Überexpression der PPase aus *Escherichia coli*. Eine mögliche Konsequenz der blattspezifischen StAGPase-Repression könnte sein, dass aufgrund der Inhibierung des Schlüsselenzyms der Stärkesynthese der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese inhibiert wird. Als Konsequenz könnte der Assimilatfluss in die Saccharosesynthese erhöht werden, wodurch der Saccharoseanteil erhöht werden könnte, der zu den *sink* Organen weitergeleitet wird. Eine mögliche Folge der mesophyllspezifischen Überexpression der EcPPase ist, dass zum einen die Reaktion in Richtung Glykolyse verhindert wird und zum anderen die Orthophosphatmenge im Cytosol als Folge der Pyrophosphat-Hydrolyse ansteigt. Dadurch würde die Substratverfügbarkeit für den TPT ansteigen, wodurch der TrioseP-Transport in das Cytosol erhöht werden könnte, der für die Saccharosesynthese genutzt wird. Der erhöhte Saccharoseanteil könnte zu den *sink* Organen weitergeleitet werden (s. Abbildung 2). Die *sink* Kapazität sollte in beiden Ansätzen durch knollenspezifischer Überexpression des NTT aus *Arabidopsis thaliana* und des GPT aus *Pisum sativum* erzielt werden.

Die dreifach transgenen Kartoffelpflanzen (AGN und PGN) sollten in Gewächshausanzuchten analysiert werden. Für den Fall, dass eine gleichzeitig erhöhte *source* und *sink* Kapazität zu einem erhöhten Stärkeertrag in Kartoffelpflanzen führt, sollen die sogenannten AGN-Pflanzen entwicklungsabhängig untersucht werden und in einem Erdbeet unter freilandähnlichen Bedingungen angezogen werden. Zudem sollen Grundüberlegungen getroffen werden, inwieweit sich diese biotechnologischen Ansätze auf andere kommerziell bedeutende Nutzpflanzen übertragen lassen.

Beschreibung der folgenden Abbildung 2 (Abbildung s. folgende Seite)

Enzyme: 1: ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase); 2: Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase); 3: P_i-abhängige Phosphofruktokinase (PFK); 4: ATP-abhängige Phosphofruktokinase (PFK); 5: UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UGPase); 6: cytosolische Pyrophosphatase (PPase).

Abkürzungen: TrioseP: Triosephosphat; TPT: Triosephosphat/Phosphat-Translokator; F1,6bP: Fruktose-1,6-bisphosphat; F6P: Fruktose-6-Phosphat; G6P: Glukose-6-Phosphat; G1P: Glukose-1-Phosphat; ADPG: ADP-Glukose; ATP: Adenosintri-phosphat; ADP: Adenosindiphosphat; UTP: Uridintri-phosphat; UDP: Uridindiphosphat; UDPG: UDP-Glukose; S6P: Saccharose-6-Phosphat; Pi: anorganisches Orthophosphat; P_{ii}: anorganisches Pyrophosphat.

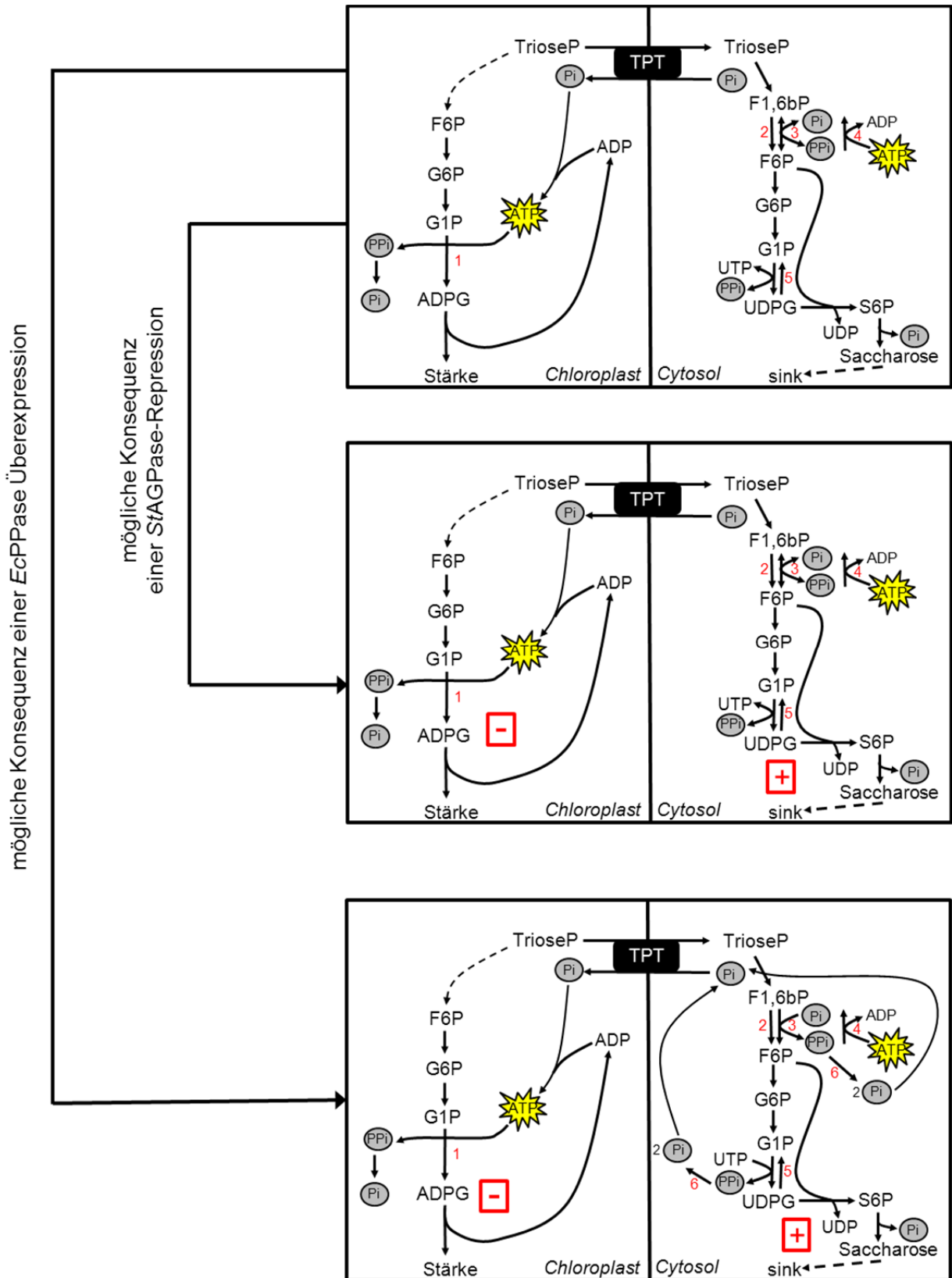


Abbildung 2: Schematische Darstellung der möglichen Konsequenzen einer blattspezifischen StAGPase-Repression oder mesophyllspezifischen EcPPase-Überexpression auf den Stärke- und Saccharosestoffwechsel in Blättern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial und Geräte

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme stammten von den Herstellern Biomol (Hamburg, D), Bioline (London, GB), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck AG (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), New England Biolabs (Frankfurt a. M., D). Der Reinheitsgrad war „research grade“ oder der höchstmöglich verfügbare. Enzyme lieferten die Hersteller Invitrogen (Karlsruhe, D), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D), Promega (Mannheim, D), Quiagen (Hilden, D), Roche (Mannheim, D) und Sigma (Deisenhofen, D).

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden über die Vertriebsfirma VWR (Darmstadt, D) bezogen. Gerätetypen und deren Hersteller werden, soweit dies für die Versuchsdurchführung von Bedeutung ist, bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

2.1.2 Wasserqualität

Für die Herstellung von Lösungen, Medien und Reaktionsansätzen wurde zweifach destilliertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) verwendet.

Bei RNA-Analysen wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angesetzt. Die Herstellung von $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ist in 2.4.1 beschrieben.

2.1.3 Verwendete Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind unter Angabe der Endkonzentrationen in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika und deren Endkonzentrationen.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Carbenicillin	100 µg/ml
Cefotaxim	500 µg/ml
Hygromycin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	150 µg/ml

2.1.4 Verwendete Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in der nachfolgenden Tabelle unter Angabe ihrer Herkunft und der vorhandenen Resistenz zusammengestellt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Vektoren, sowie deren Herkunft und Resistenz.

Vektor	Herkunft	Resistenz
<i>cytFBPase-pBin-EcPPase</i>	U. Sonnewald	Kanamycin
<i>B33-pBin-AtNTT1</i>	Universität Köln	Kanamycin
<i>B33-pBin-PsGPT</i>	Universität Köln	Hygromycin
<i>STLS1-pBin-αAGPase</i>	Universität Köln	Kanamycin

2.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt und wurden von der Firma Metabion (Martinsried, D) synthetisiert.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Die Bezeichnungen der verwendeten Oligonukleotide und der Gene bzw. Genabschnitte, die mit ihnen amplifiziert werden. Zudem sind die Primersequenzen und deren Annealingtemperatur (T) aufgeführt. Primer mit der zusätzlichen Abkürzung RL wurden für die Real-Time-quantifizierende PCR verwendet.

Gen	Primer	Sequenz	T [°C]
St β -Tubulin	β tub_F	AAATGTGCAGAACAAGAACTCATCC	70
	β tub_R	CATAACAAGTTCACCTTTGGCAG	62
AtNTT1	NTT1_F	AAGCCAACTTCAGCCTTCCCA	61
	NTT1_R	CCTTCTTGGAGAGAACATTGGAGAG	66
PsGPT	GPT_F	TTCAACGAAGAAGCCTCTTCATCTTG	69
	GPT_R	CGATCATATTGAAATTGAGCTCGGT	68
EcPPase	PPase_F	CGTTGTTATTGAGATCCCGGC	64
	PPase_R	CCACTTGCCTTTTTTCGAGG	58
StAGPase	AGPase_F	AAGGATCCATTGGTTCCAGGGCACG	54
	AGPase_R	GATATGCATGATCTGAGCCC	58
St β -Tubulin	β tub_F_RL	ATGAAATGGAGTTCACCTGAAGCCGA	70
	β tub_R_RL	CTCATCATCTGCTGTAGCATC	70
StAGPase	AGPase_F_RL	TAACAAAGACAACGTTCAAGAAGCGG	70
	AGPase_R_RL	TGATGACGGTGACAATCCCACTCT	71

2.1.6 Verwendete Bakterienstämme

Zur Transformation von *Solanum tuberosum* (s. 2.2.2) wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 verwendet. Der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α wurde als Positivkontrolle für das Zymogramm (s. 2.5.8) verwendet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
GV2260	Rif [®] /pGV 2260 (pTiB6S Δ T-DNA) Carb [®]
DH5 α	[®] 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U196

2.2 Arbeiten mit *Solanum tuberosum*

2.2.1 Anzucht

Die Anzucht von *Solanum tuberosum* erfolgte in Sterilkultur auf 3MS-Gelrite. Es wurde ausschließlich *Solanum tuberosum* cv. Desirée verwendet.

<u>3MS-Gelrite</u>	4,6 g	Murashige & Skoog Medium (M0244)
	30 g/l	Saccharose (3% (w/v))
	3 g/l	Gelrite
	500 mg/l	Cefotaxim
	pH 5,8	KOH

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen kamen eventuell weitere zur Selektion notwendige Antibiotika hinzu (s. 2.1.3).

Die Anzucht der Kartoffeln erfolgte in Sterilkultur auf 3MS-Gelrite in Einmachgläsern (Fa. Weck, Wehr, D) in einem Pflanzenkulturschrank mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h bei einer Temperatur von 22 °C. Nach dem Erreichen einer Größe von 10 bis 15 cm und der Ausbildung von ausreichend Wurzelmasse, wurden die Stecklinge in Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa, D) umgetopft und ins Gewächshaus transferiert. Dort erhielten sie unter konstanten Langtagbedingungen mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h im Mittel 40 kLux Licht und wurden einer mittleren Tages- und Nachttemperatur von 21 °C bzw. 18 °C ausgesetzt.

Um den Einfluss von Topflimitierung auf das Knollenwachstum der Kartoffeln zu analysieren, wurden die Pflanzen teilweise in einem Beet-Gewächshaus angebaut. Dafür wurden die Stecklinge aus Sterilkultur zunächst in Erde umgetopft und für drei Wochen im Gewächshaus unter den oben genannten Bedingungen vorkultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen ins Beet transferiert. Im Beet-Gewächshaus wurden die Pflanzen ohne zusätzliche Belichtung angezogen und jeden zweiten bis dritten Tag gegossen.

2.2.2 Transformation von Kartoffelblättern

Für eine Transformation von Kartoffelblättern wurden folgende Medien benötigt, die autoklaviert und gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt wurden.

<u>3MS-Medium</u>	4,6 g/l	Murashige & Skoog Medium (M0245)
	30 g/l	Saccharose
	pH 5,8	KOH
<u>GMS-Medium</u>	4,4 g/l	Murashige & Skoog Medium (M0244)
	16 g/l	Glukose
	pH 5,8	KOH
<u>CG76-Medium</u>		GMS-Medium +
	5 g/l	NAA (1-Naphthyllessigsäure)
	0,1 mg/l	BAP (Benzylaminopurin)
	500 mg/l	Cefotaxim
	3 g/l	Gelrite

Blätter junger Kartoffelpflanzen aus Sterilkultur wurden mit einem Skalpell steril abgeschnitten und auf ein mit 3MS-Medium getränktes, steriles Filterpapier gelegt. Der Stängelansatz wurde entfernt, und die Blätter wurden an der Blattoberseite drei bis vier Mal mit einer sterilen Rasierklinge eingeritzt. Die verletzten Blätter wurden in eine Petrischale mit 12 ml 3MS-Medium mit der Oberseite nach unten überführt. Für jede Petrischale wurden ca. 14 solcher Blättchen benötigt. Für jedes Konstrukt wurden ca. fünf Petrischalen benötigt. Zur Transformation kamen 1 ml transgene durch Zentrifugation und anschließender Resuspension in 3MS-Medium aufkonzentrierte Agrobakterien hinzu, die das gewünschte Konstrukt enthielten. Dieser Ansatz wurde zwei Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Transformation eingeleitet wurde. Zur Induktion von Kalli wurden die Blättchen danach in Einmachgläsern auf CG76-Medium ausgelegt und im Pflanzenkulturschrank gelagert.

Bei einer Doppeltransformation in Wildtyp- oder Mutantenhintergrund wurden zwei verschiedene Agrobakterienkulturen verwendet, die jeweils eines der beiden gewünschten Konstrukte tragen. Von den daraus resultierenden Pflanzen sollte etwa 2/3 mit dem einen und 2/3 mit dem anderen Konstrukt transformiert sein. Man erhält insgesamt - statistisch gesehen - von allen selektierten Pflanzen 1/3, die doppelt transformiert sind. Bei einer Doppeltransformation ist besonders darauf zu achten, dass die eingesetzte Menge an Agrobakterien identisch ist. Es bietet sich hier an, bei den in Flüssigkultur vermehrten Agrobakterien die gleiche OD_{600} , die zwischen 1 und 2 liegen sollte, einzustellen und das gleiche Volumen an Agrobakterienkultur für die Transformation zu verwenden.

2.2.3 Induktion von Kalli und Regeneration von Pflanzen

Zur Induktion von Kalli war das folgende Medium erforderlich.

<u>CG75-Medium</u>	GMS-Medium (s. 2.2.2) +
2 mg/l	Zeatin
0,02 mg/l	NAA (1-Naphthyllessigsäure)
0,02 mg/l	GA ₃ (Gibberelinsäure)
500 mg/l	Cefotaxim
3 g/l	Gelrite

Zur Selektion von positiv transformierten Pflanzen wurden dem Medium nach dem Abkühlen die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt (s. 2.1.3). Nach einwöchiger Inkubation in sterilen Einmachgläsern mit CG76-Medium (s. 2.2.2) wurden die Blättchen zur Induktion von Kallus- und Sprosswachstum auf CG75-Medium überführt und nach zwei Wochen auf frisches CG75-Medium umgesetzt. Diese Umsetzung wiederholte sich alle zwei Wochen, bis nach acht bis zwölf Wochen die ersten Sprosse aus den Kalli wuchsen. Auswachsende Sprosse wurden mit Kalli auf CG75-Medium gesetzt. Nach Erreichen einer Größe von 2 - 4 cm wurden die Sprosse vom Kallus abgeschnitten und in Einmachgläser mit 3MS-Medium (s. 2.2.1) überführt. Nach Ausbildung einer Wurzel und dem Erreichen einer Größe von 5 - 10 cm erfolgte die Duplikation der Pflanzen. Dazu wurden sie auf halber Höhe abgeschnitten und die dabei erzeugten Kopfstecklinge in neue Einmachgläser mit 3MS-Medium überführt. Die Duplikate konnten nach Erreichen einer Größe von 10 - 15 cm und der Ausbildung von genügend Wurzelmasse in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert werden.

2.2.4 Probennahme

Proben von Blättern und Knollen wurden mit einem Korkbohrer geerntet, in Eppendorfgefäße überführt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Knollenproben wurden vor dem Einfrieren mit einer Reibe in etwa 1 mm dicke Scheiben zerlegt, um einen späteren Aufschluss zu erleichtern. So präpariert konnten die Proben mehrere Monate bei - 80 °C gelagert werden.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien wurden entweder auf YEB-Platten oder in YEB-Flüssigkultur bei 28 °C angezogen. Zur Transformation von *Solanum tuberosum* wurde der Stamm C58C1 (s. 2.1.6) verwendet. Zur Selektion transgener Organismen kamen die entsprechenden Antibiotika (s. 2.1.3) zu den autoklavierten und abgekühlten Medien hinzu.

<u>YEB-Medium</u>	5 g/l	Bactopepton
	1 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	Beefextrakt
	5 g/l	Saccharose
	0,5 g/l	MgSO ₄ * 7 H ₂ O

<u>YEB-Platten</u>	YEB-Medium + 15 g/l Bakterien Agar
--------------------	------------------------------------

Die Lagerung der Bakterien erfolgte einige Wochen lang bei 4° C auf YEB-Platten oder als Glycerinstammkultur (500 µl Kultur und 500 µl 30% Glycerin in YEB-Medium) bei - 80 °C.

2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Agrobakterien wurden in 5 ml MGL-Medium mit den Antibiotika Rifampicin (150 µg/ml) und Carbenicillin (100 µg/ml) angeimpft und ein bis zwei Tage bei 28 °C im Bodenschüttler (G25, Fa. New Brunswick, Nürtingen, D) bei ca. 250 upm wachsen gelassen.

<u>MGL-Medium</u>	5 g/l	Bactopepton
	2,5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	5 g/l	Mannit
	1,6 g/l	Na-Glutamat
	0,25 g/l	KH ₂ PO ₄
	0,1 g/l	MgSO ₄ * 7H ₂ O
	1mg/l	Biotin

Nach Erreichen der frühen Sättigung wurde die Vorkultur mit MGL-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,04 E - 0,08 E verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 E ca. 4 h weiter inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 4 °C, 3100 g), in 40 ml 1mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert, erneut pelletiert und in 40 ml 1 mM HEPES mit 10% (v/v) Glycerin (pH 7,0) resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation der Bakterien und Aufnahme des Pellets in 2 ml eisgekühltem 1 mM HEPES mit 10% (v/v) Glycerin. Diese Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, 30 s lang erneut zentrifugiert und das Pellet in 200 µl 1 mM HEPES mit 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Diese Suspension wurde zu 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

2.3.3 Transformation von elektrokompetenten Agrobakterien

100 - 500 ng DNA (ca. 1 - 2 µl) wurden zu 50 µl gefrorenen, elektrokompetenten Agrobakterien (s. 2.3.2) pipettiert und 2 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvetten (Fa. PEQlab, Erlangen, D) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω, und 2,5 kV für 8 bis 9 Millisekunden. Sofort wurde 1 ml YEB-Medium (s. 2.3.1) zugegeben und der Transformationsansatz bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 h wurden die Bakterien für 2 min bei 5380 g in der Zentrifuge aufkonzentriert, das Pellet in 50 - 200 µl YEB-Medium (s. 2.3.1) aufgenommen und auf YEB-Platten (s. 2.3.1) ausgestrichen und zwei Tage bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien gepickt, erneut auf YEB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die daraus resultierenden Bakterien wurden mit der Impföse in YEB-Medium (s. 2.3.1) resuspendiert und ein bis zwei Tage im Bodenschüttler bei 28 °C inkubiert, bevor sie für die Transformation eingesetzt worden sind. Alternativ erfolgte die Transformation der Agrobakterien mit der kostengünstigeren Stickstoffmethode. Dafür wurde die gleiche Menge DNA zusammen mit den kompetenten Zellen wie bereits oben beschrieben nach einer Inkubation auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium (s. 2.3.1) erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 28 °C. Die darauffolgenden Schritte stimmten mit der bereits beschriebenen Elektroporationsmethode überein.

2.3.4 Anzucht von *Escherichia coli*

Escherichia coli Bakterien (s. 2.1.6) wurden in LB-Flüssigkultur bei 37 °C angezogen. Zur Selektion transgener Organismen kamen die entsprechenden Antibiotika zu den Medien hinzu (s. 2.1.3).

<u>LB-Medium</u>	5 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

Die Lagerung erfolgte als Glycerinstammkultur (500 µl Kultur und 500 µl 30% Glycerin in LB-Medium) bei - 80 °C.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von RNA aus pflanzlichen Geweben

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Blatt- oder Knollenproben wurden zur Gewinnung von RNA in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert, mit dem dreifachen Volumen Z6-Puffer versetzt und bis zur Homogenität aufgeschlossen. Die Proben wurden mit 600 µl PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) vermischt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Bei Knollenproben wurde vor der PCI-Zugabe ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (5 min, 15 300 g) eingefügt, um die Stärke zu sedimentieren, da sich ein Überschuss an Stärke negativ auf die weitere RNA Isolierung auswirkt. Nach dem Homogenisieren aller Proben wurden diese 15 min bei 15 300 g zentrifugiert. Die dabei entstandene obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA konnte durch Zugabe von 0,7 Volumen absolutem Ethanol und 1/20 Volumen 1 M Essigsäure bei Raumtemperatur gefällt und durch 15 minütige Zentrifugation bei 15 300 g pelletiert werden. Das Pellet wurde zunächst mit 3 M Natriumacetat Lösung (pH 5,2), anschließend mit 75% Ethanol (verdünnt mit H₂O_{DEPC}) gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 500 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei 65 °C unter leichtem Schütteln gelöst und zur Reinigung erneut für ion eingesetzt worden sind. Alternativ erfolgte die Transformation der Agrobakterien mit der kostengünstigeren Stickstoffmethode. Dafür wurde RNA durch Zugabe von 500 µl 5 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4 °C gefällt. Am Folgetag wurde die RNA durch 15 minütige Zentrifugation bei 17 900 g pelletiert und zweimal mit 75% Ethanol (mit H₂O_{DEPC} verdünnt) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde es in 50 - 100 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei 65 °C gelöst. So präpariert konnte die RNA bei - 20 °C bis zur Verwendung lagern.

<u>Z6-Puffer</u>	8 M	Guanidiniumhydrochlorid (pH 7,0)
	20 mM	EDTA
	20 mM	MES
	0,7 %	β-Mercaptoethanol

<u>H₂O_{DEPC}</u>	0,2 % (v/v)	Diethylpyrocarbonat
	Die Lösung wurde über Nacht gerührt und nach dem Autoklavieren zum Ansetzen aller Lösungen verwendet.	

2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches zwischen den Nukleotiden der DNA interkaliert, können die Laufbanden der DNA im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als Referenzgröße wurden 10 bis 15 µl eines 1 kb-Leiters (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D) mit bekannten Größenstandards aufgetragen. Eingewogene Agarose wurde in 50 bis 200 ml 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht und vollständig gelöst. Die Menge an eingewogener Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Für Fragmente größer als 1 kb wurde ein 1% (w/v) Gel gewählt, während für kleinere Fragmente 1 bis 3% (w/v) gewählt wurde. Nach Abkühlen der Lösung auf 50 bis 60 °C wurde Ethidiumbromid zugesetzt und diese in einen mit Paketband abgedichteten Gelträger gegossen. Zum Auftragen der Proben wurden je nach Anzahl und Menge der Proben unterschiedliche Gelkämme in die Träger eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde das Paketband sowie der Kamm entfernt, es in eine Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer gelegt, und die Proben mit 10 x Auftragepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der TAE-Puffer sollte dabei das Gel überdecken. An die Kammer wurde eine Spannung von 70 bis 120 V bei einer Stromstärke von 150 mA angelegt. Für die Dokumentation des Laufs wurde das Gel mit einem Geldokumentationssystem (Fa. Intas, Göttingen, D) auf einem UV-Tisch fotografiert und das Bild als TIFF-Datei auf einem PC gespeichert.

<u>TAE-Puffer (50x)</u>		Tris-Acetat-EDTA-Puffer
	2 M	Tris/HAc pH 7,5
	50 mM	EDTA
<u>10x Auftragepuffer</u>	20 % (w/v)	Ficoll 400
	1 % (w/v)	SDS
	0,05 % (w/v)	Xylenblau
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	40 mM	Tris/HAc pH 7,5
	100 mM	EDTA
<u>Ethidiumbromid</u>	1 % (w/v)	Ethidiumbromid in H ₂ O

2.4.3 Abschätzung der DNA-Konzentration in einem Agarose-Gel

Zur groben Abschätzung der DNA-Konzentration in bestimmten Banden eines Agarose-Gels lässt sich die Leuchtstärke der Banden unter UV-Licht im Vergleich zum ebenfalls aufgetragenen Größenstandard (s. 2.4.2) nutzen. Die Banden des Markers enthalten pro μl eingesetztem Marker 10 ng DNA, wobei die 1,6 kb Bande doppelt so viel DNA enthält. Durch Vergleich der Intensitäten lässt sich so die DNA-Konzentration einer bestimmten Bande relativ gut einschätzen.

2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur genauen Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte eine Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe des NanoDrop[®] ND-100 Spektrophotometers (Fa. Nanodrop Technologies, Wilmington, US). Dazu wurde die Absorption der aufgetragenen Lösung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen; bei RNA bzw. DNA wurde eine Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ gewählt. RNA bzw. DNA besitzen ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 260 \text{ nm}$, Proteine hingegen ein Absorptionsmaximum von 280 nm. Durch den Quotient von 260 nm zu 280 nm konnte der Reinheitsgrad über das mitgelieferte Computerprogramm ermittelt werden. Der Quotient sollte bei einem hohen Reinheitsgrad zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1 μl der zu messenden Probe direkt auf die Messoberfläche pipettiert und der Schwingarm des Gerätes hinuntergelassen. Durch die Oberflächenspannung der Probe wird eine Flüssigkeitssäule aufgebaut, wobei die Absorption der unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wurde. Zum Abgleich des Nullwertes diente Wasser. Aus den gemessenen Spektren und Absorptionswerten wurden anschließend mithilfe des Computerprogramms die Konzentrationen und der Reinheitsgrad bestimmt und auf dem Bildschirm dargestellt.

2.4.5 DNaseI Verdau von RNA-Präparationen

Um RNA von eventuell im RNA-Extrakt vorhandener genomischer DNA zu befreien, wurde ein DNaseI-Verdau mit dem DNase-free-Kit von Ambion[®] (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt. Dazu wurden 2 μg RNA, 1,5 μl 10 x Puffer und 1 μl DNaseI mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ 5 (s. 2.4.1) auf 15 μl aufgefüllt und dieser Reaktionsansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNaseI wurden 2 μl Inaktivierungs-Reagenz hinzugegeben und 2 min bei Raumtemperatur gevortext. Nach einminütiger Zentrifugation bei 15 300 g wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Die reinen RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.6 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wird ein retrovirales Enzym verwendet, welches DNA-Kopien von den in den Proben enthaltenen mRNAs herstellt. Für eine reverse Transkription wird 10 µl (ca. 1,4 µg) isolierte und reine RNA (s. 2.4.1, 2.4.5) mit 1 µl Oligo-dT-Primern und 1 µl H₂O_{DEPC} (s. 2.4.1) gemischt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min. Danach wurden 8 µl Mastermix hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 1 h bei 37 °C und 250 upm inkubiert. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte bei 70 °C für 10 min im Heizblock. Die so erhaltene cDNA konnte sofort verwendet werden oder wurde bei - 20 °C gelagert.

<u>Master-Mix</u>	1 µl	10 mM dNTPs
	4 µl	5 x Puffer (Fa. Bioline®)
	2,75 µl	H ₂ O _{DEPC}
	0,25 µl	BioScript (Fa. Bioline®)

2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*, (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988)) ist eine Methode zur enzymatischen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen. Die Methode der *in vitro* DNA-Vermehrung beruht auf einer zyklischen Reaktion, die sich zwischen 25 und 40 Mal wiederholt. Dabei wird die DNA zunächst bei 95 °C denaturiert, was die Bindung spezifischer, zur Matrizen-DNA komplementärer Oligonukleotide (s. 2.1.5) ermöglicht. Diese Bindung oder auch Anlagerung erfolgt bei Primer-spezifischen Temperaturen zwischen 55 und 65 °C, welche sich aus der Länge der Primer und deren Gehalt an Guanin- und Cytosinbasen ableiten. Die Anlagerung der Primer und der daraus resultierende DNA-Doppelstrang ermöglichen die Bindung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Dream-Taq-Polymerase, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot), welche bei 72 °C eine Kopie des Matrizestranges synthetisiert, wobei sie Desoxynukleotide an die freien Hydroxylgruppen am 3'-Ende der Primer anknüpft. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich so die Anzahl der gewünschten DNA-Fragmente. Die Taq-Polymerase fügt an jeden synthetisierten DNA-Strang zusätzliche Adeninnukleotide an, so dass ein Adenin Überhang entsteht. Zur Amplifikation der DNA-Fragmente wurden die PCR-Maschinen PTC-200 und PTC-100TM Programmable Thermal Controller verwendet. Nach Beenden der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

<u>PCR-Ansatz</u>	ca. 5 µg	Matrizen-DNA
	0,4 µl	forward Primer (10 mM)
	0,4 µl	reverse Primer (10 mM)
	0,4 µl	dNTPs (10 mM)
	2 µl	Puffer (10 x)
	0,04 µl	Taq-Polymerase
	ad 20 µl	H ₂ O
<u>PCR-Programm</u>	1. 95 °C	5 min Denaturierung
	2. 95 °C	40 s Denaturierung
	3. 55 °C	40 s Anlagerung der Primer
	4. 72 °C	~ 60 s / kb DNA-Synthese
	5. 25 - 40-fache Wiederholung von Schritt 2 - 4	
	6. 72 °C	5 min finale DNA-Synthese
	7. 18 °C	∞ Ende

* Die Anlagerungstemperatur ist für die jeweiligen Primer spezifisch und wird bei den einzelnen Experimenten angegeben.

2.4.8 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Kombination aus reverser Transkription (s. 2.4.6) und PCR (s. 2.4.7) und ermöglicht die semi-quantitative Bestimmung der Transkriptmenge eines bestimmten Gens. Bei der RT-PCR verwendet man in zwei getrennten PCR-Reaktionen cDNA als Matrize, und bleibt bei der Amplifikation im linearen Bereich (< 30 Zyklen). Man nutzt in der einen Reaktion genspezifische Primer, während in der anderen Reaktion Primer für ein Gen mit relativ hoher und vor allem konstitutiver Expressionsrate gewählt werden. Für letztere kommen Primer für das β -Tubulin-Gen in Frage. Die Reaktionen werden auf ein Agarosegel (s. 2.4.2) aufgetragen. Der Vergleich der Leuchtstärken der jeweiligen Banden lässt Rückschlüsse auf die relative Menge an cDNA im Ansatz und so auf die Menge an mRNA im Extrakt zu. Für eine RT-PCR werden 1 - 2 µl der Reversen Transkription (s. 2.4.6) eingesetzt. Da man davon ausgehen kann, dass die β -Tubulin-mRNA in allen Ansätzen gleich konzentriert ist, lassen sich alle Aussagen über den mRNA-Gehalt eines Gens in einer Probe auf die Leuchtstärke der β -Tubulin-Bande beziehen.

2.4.9 Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR oder quantitative Echtzeit-PCR ist eine spezifischere Form der RT-PCR (s. 2.4.8), da die amplifizierte DNA parallel zu den PCR-Zyklen mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen quantifiziert wird. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green verwendet, der in die DNA interkaliert, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt. Die Zunahme der amplifizierten DNA und der Fluoreszenz korrelieren von Zyklus zu Zyklus, die Fluoreszenzmessung erfolgt am Ende der Elongation in jedem Zyklus. Am Ende eines PCR-Laufs erfolgt anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung am Anfang der exponentiellen Phase der PCR. Um diesen Zeitpunkt festzulegen, wird der *Cycle Threshold* (Ct-Wert), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, bestimmt.

Der Ansatz der quantitativen Real-Time-PCR wurde nach RNA-Isolierung (s. 2.4.1), DNaseI-Verdau (s. 2.4.5) und Reverser Transkription (s. 2.4.6) mit dem SensiMix™ SYBR Kit (Fa. Biorline Reagents Ltd., London, GB) nach Herstellerangaben angesetzt und im Real Time PCR System 7300 (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt, D) amplifiziert. Zur relativen Quantifizierung wurde β -Tubulin als Referenzgen mitgemessen. Die relative Expression kann aufgrund der bestehenden linearen, umgekehrt proportionalen Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Ct-Wert berechnet werden.

Berechnung von dCt und ddCt:

$$\begin{aligned}dCt &= Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Referenzgen}) \\ddCt &= dCt - (\text{Mittelwert } dCt \text{ Kontrollpflanze})\end{aligned}$$

Berechnung der relativen Expression:

$$\text{relative Expression} = 2^{-ddCt}$$

2.5 Physiologische und biochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blatt- und Knollenproben

Zur Bestimmung löslicher Zucker wurden zwei Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei - 80 °C gelagert. Bei Knollen wurde der mit Hilfe eines Korkbohrers erhaltene Bohrkern in fünf ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewicht der Knollenproben wurde vor der weiteren Aufarbeitung bestimmt. Zur Extraktion der Zucker wurden die Proben mit 1 ml 80% Ethanol im Wasserbad eine Stunde bei 75 °C inkubiert. 800 µl des ethanolischen Extraktes wurden danach in der Speed Vac (Fa. Eppendorf, Hamburg, D) bei Raumtemperatur eingetrocknet. Die kristallisierten Zucker wurden in 200 µl H₂O resuspendiert und für die Zuckermessung verwendet. 10 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl H₂O und 90 µl Messpuffer versetzt und einem gekoppelten enzymatischen Test unterzogen. Dabei wurden sequentiell folgende Enzyme mit einem 96 Nadeln tragendem Stempel (Werkstatt Bot. Institut, Universität Köln) zugesetzt:

<u>Enzym 1</u>	7 Units	Hexokinase (Roche, Mannheim, D)
<u>Enzym 2</u>	0,2 Units	Phosphoglukoisomerase (Roche, Mannheim, D)
<u>Enzym 3</u>	120 Units	Invertase (Roche, Mannheim, D)
<u>Messpuffer</u>	110 mM	HEPES pH 7,4
	22,2 mM	MgCl ₂
	4,4 mM	ATP
	1,8 mM	NAD ⁺
	0,2 Units	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)

In dieser enzymatischen Reaktion wurden Glukose, Fruktose und Saccharose unter Bildung von NADH zu 6-Phosphoglukonolakton umgesetzt. Die Bildung von NADH ist dabei proportional zur Menge der oben genannten Zucker und wurde photometrisch bei 340 nm erfasst. Die Messungen wurden in einem Multiplatten Photometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim, D) in Multiplatten (Elisa-Platte Microton, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen, D) mit einem jeweiligen Volumen von 200 µl pro Küvette durchgeführt.

Aus den einzelnen Extinktionsänderungen konnte nach folgender Formel die Konzentrationen der Zucker im Extrakt berechnet werden.

$$c = ((\Delta E * A_{\text{Küvette}}) / (\epsilon_{340}(\text{NADH}) * V_{\text{Probe}})) * V_{\text{gelöst}} * F / V_{\text{eingedampft}}$$

c:	Konzentration [$\mu\text{mol} / \text{Extrakt}$]
ΔE :	Absolute Extinktionsänderung
$A_{\text{Küvette}}$:	Fläche der Küvette [cm]
$\epsilon_{340}(\text{NADH})$:	Extinktionskoeffizient NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ [$\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$]
V_{Probe} :	Eingesetztes Probenvolumen für die Messung [cm^3]
$V_{\text{gelöst}}$:	Aufnahmevervolumen des eingedampften Zuckers [cm^3]
F:	Verdünnungsfaktor
$V_{\text{eingedampft}}$:	Volumen des eingedampften Extraktes [cm^3]

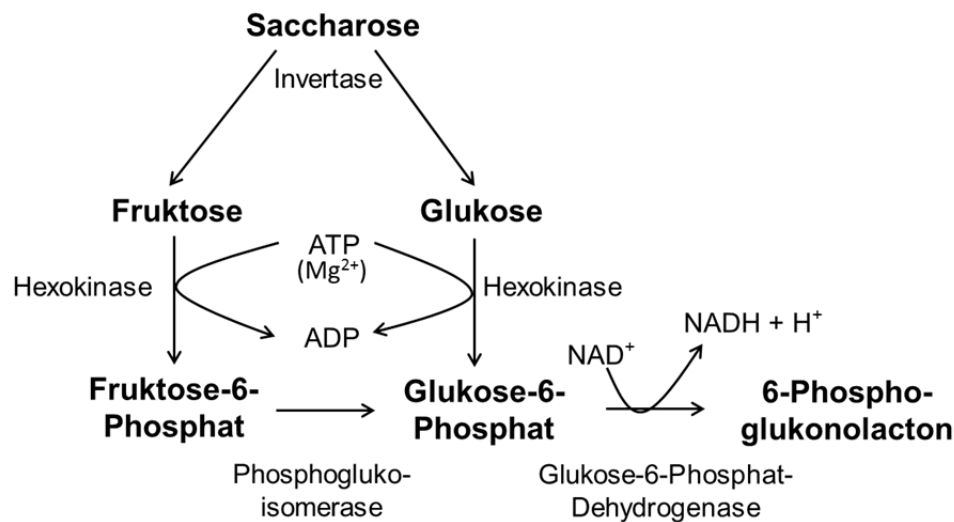


Abbildung 3: Schematische Darstellung der bei der Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose auftretenden Reaktionen.

ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; NAD⁺, Nicotinamadenindinukleotid, NADH, Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form).

2.5.2 Bestimmung der Stärkegehalte in Blättern und Knollen

Zur Bestimmung des Stärkegehalts in Blättern wurden die unter 2.5.1 ausgestanzten Blattscheiben nach Entfernung der Zucker in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bei Knollenproben wurde eine ca. 1 mm dicke Scheibe des Bohrkerns für die Analysen verwendet und vor der Aufarbeitung gewogen, um den Stärkegehalt auf das Frischgewicht zu beziehen. Zur Entfernung der löslichen Zucker wurde die Probe mit 1 ml 80% Ethanol eine Stunde bei 75 °C inkubiert. Anschließend wurde das Ethanol verworfen. Sowohl die Knollen- als auch die Blattproben wurden zwei Mal mit 80% Ethanol durchgespült und mit 200 μl 0,2 M KOH bei Blättern bzw. 900 μl bei Knollen mit einem Bohrer (Fa. Heidolph, Schwabach,

D) homogenisiert. Nach 1 h im Wasserbad bei 95 °C wurde der pH-Wert mit 1 M HAc auf 5,5 - 6 eingestellt, 80 U α -Amylase und 7 U Amyloglukosidase zum Verdau der Stärke hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dies hatte zur Folge, dass sämtliche im Extrakt enthaltene Stärke zu Glukose abgebaut wurde, welche analog zur Messung des Gehaltes an löslichen Zuckern im gekoppelten enzymatischen Test durch Zugabe von Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erfasst wurde (s. 2.5.1). Aufgrund des hohen Stärkegehaltes wurde der Stärkeextrakt aus Blättern in einer Verdünnung von 1 : 10 und aus Knollen 1 : 50 zur Messung eingesetzt.

2.5.3 Bestimmung der Assimilation mittels Infrarotgasanalysen (IRGA)

Mit der Infrarotgasanalyse (IRGA) kann der Gasaustausch an intakten Pflanzen gemessen werden (Wolf et al., 1969). Darunter versteht man die Aufnahme von CO₂ im Licht, sowie die Freisetzung von Wasserdampf bei der Transpiration. Man verwendet dafür offene Gasanalyse-systeme, bei denen die Messung differentiell im Durchflussverfahren erfolgt. Dabei wird ein Gasstrom mit definierter Fließgeschwindigkeit zu einem Teil in eine Infrarot-messzelle geleitet, in der die CO₂- und Wasserdampfkonzentration ermittelt wird (Referenz-gas), und zum anderen Teil in eine Kammer geführt, in welcher ein definierter Ausschnitt einer intakten Blattspreite eingespannt ist. Nach Überfließen der Blattspreite wird dieser Teil des Luftstroms (Analysegas) in eine zweite Messzelle geleitet, in der ebenfalls die CO₂- und Wasserdampfkonzentrationen gemessen werden. Die Unterschiede der CO₂- und Wasser-dampfkonzentrationen in Referenz- und Analysegas bilden den primären Datensatz, aus dem sich Transpirationsrate und Assimilationsrate berechnen lassen. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis des molaren Gasstroms pro Zeiteinheit sowie der eingespannten Blattfläche.

Die Transpirationsrate (E) beträgt:

$$E = u (w_o - w_e) / (1 - w_o)$$

Dabei entspricht w_e dem Wasserdampfpartialdruck der zur Blattkammer führenden Luft und w_o dem Wasserdampfpartialdruck der aus der Blattkammer ausströmenden Luft und u dem molaren Gasstrom. Letzterer berechnet sich wie folgt:

$$u = (P * f) / (R * T * a)$$

In dieser Gleichung bezeichnet P den Luftdruck, f die Flussrate, R die universelle Gaskonstante, T die absolute Temperatur und A die Blattfläche.

Die Assimilationsrate (A) beträgt:

$$A = u (c_e - c_o) / ((1 - w_e) / (1 - w_o))$$

c_e und c_o bezeichnen die CO_2 -Konzentrationen des Referenz- bzw. Analysegas.

Es wurde entweder die Assimilationsrate bei steigenden Belichtungsstärken oder die Assimilation bei einer bestimmten Belichtung gemessen.

2.5.4 $^{14}\text{CO}_2$ -Pulsverfolgungsexperimente von Kartoffelblättern

Um Kohlenstoffflüsse im primären Stoffwechsel zu analysieren, gibt die Verteilung des bei Belichtung inkorporierten $^{14}\text{CO}_2$ im Blattgewebe Auskunft. Lichtadaptiertes Blattmaterial von Kartoffelpflanzen wurde geerntet und bis zur Markierung dunkel und zum Schutz vor Austrocknung in feuchtem Papier gelagert. Für die Versuche wurde eine Blattinkubationskammer verwendet, deren Bestandteil ein verschiebbares Gitter war, auf dessen Oberfläche sich die Blätter befanden und so zwischen der linken Kammer mit $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre und der rechten Kammer mit Raumluft verschoben werden konnten. Der Boden der linken Inkubationskammer wurde mit zwei Lagen Whatman-Papier ausgelegt, dieses anschließend mit 5 ml 1 M NaHCO_3 (pH 9,1) getränkt, die Kammer gasdicht verschlossen und 0,2 mCi $[^{14}\text{C}]\text{-NaHCO}_3$ (56 mCi/mmol) durch ein Septum auf die Whatman-Papierlagen injiziert. Pro Parallele wurden zwei Blattscheiben mit einem Durchmesser von 1,5 cm verwendet. Die Blattscheiben wurden zunächst 5 min unter ambienten Bedingungen in der rechten, ebenfalls gasdicht verschlossenen Blattkammer mit einem Photonenfluss von $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ vorbelichtet und in der linken Inkubationskammer einem Puls von 30 min bei gleicher Photonenflussdichte ausgesetzt. Danach wurde das Gitter mit den Blättern zurück in die rechte Blattkammer gezogen und die Blätter direkt entnommen und in flüssigem Stickstoff überführt. Im schockgefrorenen Zustand wurden die Proben mit 1 ml auf $65 \text{ }^\circ\text{C}$ vortemperiertem 80% Ethanol versetzt und für wenige Minuten auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Anschließend wurde das Ethanol abgenommen und durch 1 ml frisches 80% Ethanol ersetzt und bis zur vollständigen Ausbleichung der Blätter bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ extrahiert. Die ethanolischen Extrakte und das ausgebleichte Gewebe wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Nach Beendigung der Markierungen wurde $^{14}\text{CO}_2$ in der linken Kammer mit 2 M NaOH als $^{14}\text{CO}_3^-$ fixiert und das restliche $^{14}\text{CO}_2$ über Natronkalksäulen ausgeblasen.

2.5.4.1 Aufarbeitung der in Ethanol unlöslichen Fraktion

Das ausgebleichte Gewebe (s. 2.5.4) wurde mit 500 µl 0,2 M KOH versetzt und mit einem Bohrer homogenisiert. Die Stärke wurde durch 45 minütiges Erhitzen auf 95 °C in Lösung gebracht und die pH-Wert Einstellung und enzymatische Hydrolyse erfolgte parallel zu den Beschreibungen in 2.5.2. Am nächsten Tag wurden die Reaktionen durch 10 minütige Denaturierung der Enzyme bei 95 °C abgestoppt und 5 min bei 15 300 g zentrifugiert. 650 µl des Überstandes wurde in Szintillationsröhrchen gefüllt und 3 ml Szintillationslösung (Rotiszint Eco Plus, Fa. Roth, D) wurde zugegeben. Nach kräftigem Schütteln des Reaktionsgemisches erfolgte im Flüssigszintillationszähler (LS7599, Fa. Beckman, München, D) die Detektion von ¹⁴C.

2.5.4.2 Aufarbeitung der löslichen Fraktionen

Die löslichen Fraktionen (s. 2.5.4) wurden in der Speed Vac eingeengt und das getrocknete Sediment wurde in 500 µl destilliertem H₂O aufgenommen und mit einem Enzymspatel resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 15 300 g wurde 80 µl des Überstandes wie in 2.5.4.1 beschrieben im Flüssigszintillationszähler gezählt.

2.5.5 Analyse der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen

Um den Zuckertransport in Petiolen von *source* Kartoffelblättern zu analysieren, wurde der Zuckergehalt in Phloemexsudaten analysiert. Unter Exsudation versteht man in der Pflanzenphysiologie die Abgabe von Substanzen, wie organische Säuren oder Zucker. Die Analysen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Wingenter et al. (2010) durchgeführt. Kartoffelpetiolen wurden mit einem Skalpell abgeschnitten, das Petiolenende wurde unter Wasser nochmals abgeschnitten und direkt in ein Reaktionsgefäß mit 5 - 8 ml 15 mM EDTA, pH 7,25 überführt. Der Zuckerexport erfolgte entweder am Ende der Lichtphase für 12 - 16 h in einem abgedunkelten Raum oder während der Mitte der Lichtphase für 4 h im Gewächshaus mit Belichtung. Anschließend wurden die Blätter aus der Lösung genommen und das Gewicht bestimmt. Die Lösung wurde für 3 min bei 95 °C inkubiert, um enzymatische Reaktionen der Exportprodukte zu stoppen. Der Zuckergehalt der Lösung wurde, wie bereits in 2.5.1 beschrieben, bestimmt. Es wurde der Totalzuckergehalt bestimmt, da die exportierte Saccharose durch Invertaseaktivität in die Monosaccharide Glukose und Fruktose gespalten wurde.

2.5.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Pflanzenextrakten wurde die von Bradford entwickelte Methode verwendet (Bradford, 1976). Das Prinzip dieser Farbreaktion beruht auf der Eigenschaft des in der Rotiquantlösung enthaltenen Coomassie Brilliant Blue G250 bei der Bindung an basische Aminosäuren von dem kationischen in den anionischen Zustand überzugehen. Im kationischen Zustand absorbiert es Licht maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm und im anionischen bei $\lambda = 595$ nm. Diese Farbänderung kann im Photometer detektiert und unter Berücksichtigung einer Eichreihe quantifiziert werden. Rinder-Serum-Albumin hat sich als Standard für die Eichung durchgesetzt.

<u>Reaktionsansatz Eichreihe</u>	10 - 200 μ l	0,1 mg / ml BSA
	200 μ l	Rotiquant
	ad 1000 μ l	H ₂ O
<u>Reaktionsansatz Proben</u>	5 μ l	Proteinextrakt
	200 μ l	Rotiquant
	ad 1000 μ l	H ₂ O

Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Dunkeln wurde die Absorption der Proben bei 450 nm (A450) und 590 nm (A590) in einem Photometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe, D) bestimmt. Der Quotient A450/A590 diente als Maß für die Proteinkonzentration.

2.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in Anlehnung an die Methode von (Laemmli, 1970). Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) gestartet.

<u>Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung</u>	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Bisacrylamid
<u>Sammelgelpuffer (4 x)</u>	500 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS

<u>Trenngelpuffer (4 x)</u>	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4 %	SDS
<u>Sammelgel</u>	25 % (v/v)	Sammelgelpuffer
	42 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
	0,06 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
	0,3 %	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
<u>Trenngel (12,5%)</u>	25 % (v/v)	Trenngelpuffer
	42 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
	0,05 % (w/v)	APS
	0,05 %	TEMED
<u>Elektrodenpuffer (10 x)</u>	250 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,5 % (w/v)	SDS

SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Minigel Apparatur 2050 Midget (Fa. Pharmacia, Freiburg, D) hergestellt, wobei mehrere Gele parallel gegossen werden konnten. Das Gesamtvolumen eines Gels betrug (Länge x Breite x Tiefe) 101 x 82 x 0,75 mm. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 6 x Probenpuffer (s. 2.5.8) versetzt. Proteine wurden zunächst im Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert, um dann im Trenngel in die verschiedenen Proteinbestandteile aufgetrennt zu werden. Sie liefen dann bei 60 V ins Sammelgel, was der Fokussierung diente. Anschließend wurden die Proteine im Trenngel bei 90 V aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend nicht für eine Färbung, z. B. Silbernitrat oder Coomassie-Brilliant-Blue, benutzt, sondern für ein Zymogramm (s. 2.5.8). Aus diesem Grund wurde auch ein abgewandter Probenpuffer verwendet, und die Proben wurden vor dem Auftragen nicht durch Kochen denaturiert, weswegen auch auf Markerproteine verzichtet wurde.

2.5.8 Bestimmung der Aktivität der anorganischen PPase mit Hilfe eines Zymogramms

Bei einem Zymogramm erfolgt die Aktivitätsbestimmung von Enzymen, z. B. die Aktivität der anorganischen PPase, in einem Polyacrylamidgel (s. 2.5.7). Die anorganische PPase aus *Escherichia coli* behält ihre Funktionalität auch nach einer SDS-PAGE (s. 2.5.7). Die

plastidäre PPase aus *Solanum tuberosum* hingegen, ist unter den hier gewählten Bedingungen nicht mehr aktiv, so dass nur die Aktivität der anorganischen PPase aus *Escherichia coli* bestimmt wurde.

Als Positivkontrolle wurde Proteinextrakt verwendet, der aus einer *Escherichia coli* Flüssigkultur gewonnen wurde (s. 2.3.4). Zur Isolierung der Proteine wurden die pelletierten Zellen in Extraktionspuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE verwendet. Zur Bestimmung der Aktivität der anorganischen PPase wurde das Blattmaterial (ca. 1 Fiederblättchen) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C zwischengelagert. Das abgewogene Blattmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert und anschließend mit 1250 µl Extraktionspuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 15 min bei 15 300 g und 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit Hilfe der Methode nach Bradford bestimmt (s. 2.5.6). 50 µg des gesamten löslichen Blattproteins wurden pro zu untersuchender Pflanze ohne vorheriges Aufkochen mit Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (8 - 12,5%) geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4 °C im Kühlraum. Der Pyrophosphatase-Assay wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sonnewald (1992) ausgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 30 min im PPase-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Reaktion der anorganischen PPase, für die das Gel zwei Stunden bei 30 °C im Inkubationspuffer A inkubiert wurde. Nach zwei schnellen Waschschritten mit Inkubationspuffer A wurde das entstandene Phosphat mit colour/stop reagent visualisiert. Das erforderte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Inkubationspuffer B und anschließendes Waschen mit PPase-Puffer. Das Gel konnte im PPase-Puffer aufbewahrt werden.

<u>Extraktionspuffer</u>	50 mM	Natriumphosphat, pH 7,2
	2 mM	Natriumdisulfit
<u>PPase-Puffer</u>	0,1 M	Tris/HCl, pH 9,0
	5 mM	MgSO ₄
<u>Inkubationspuffer A</u>		PPase-Puffer
	1 mM	anorganisches Pyrophosphat
<u>Inkubationspuffer B</u>	40 ml	Inkubationspuffer A
	10 ml	colour/stop reagent

<u>Probenpuffer (6 x)</u>	Extraktionspuffer und Glycerin im Verhältnis 3:8 (v/v) mischen, 1 Spatelspitze Bromphenolblau zugeben
<u>Malachitgrün-Stammlösung</u>	115 mg Malachitgrün in 100 ml H ₂ SO ₄
<u>colour/stop reagent</u>	140 mg Ammoniummolybdat in 10 ml Malachitgrün-Stammlösung (muss täglich frisch angesetzt werden)

2.5.9 Messung der Enzymaktivität der PPase

Die Messung der Enzymaktivität der Pyrophosphatase (PPase) erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Jelitto et al. (1992). Dafür wurden 400 bis 600 mg der bei - 80 °C zwischengelagerten Blattproben in einem mit Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert und mit 800 µl Extraktionspuffer, der auf 4 °C vorgekühlt war, homogenisiert. Nach einem zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 15 300 g und 4 °C wurde 500 µl des zentrifugierten Überstandes mit der Hilfe von NAPTM-5-Säulen (NAPTM-5-Columns, SephadexTM, G-25, Fa. GE Healthcare, Buckinghamshire, GB) entsalzt. Der Proteinextrakt wurde auf die mit Assay-Puffer vorequilibrierten NAPTM-5-Säulen geladen und mit 2 x 500 µl Assay-Puffer eluiert. Nach der Zugabe von 120 µl einer 50 mM Natriumpyrophosphat-Stammlösung wurde die Reaktion gestartet und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl 1 M Citrat gestoppt, und 10 µl des Reaktionsansatzes wurden sofort mit 90 µl Detektionslösung für die Messung verwendet, um das freigesetzte anorganische Phosphat (Pi) zu messen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Absorption bei 610 nm in Multiplatten (Elisa-Platte Microton, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen, D) im Tekan (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim, D) gemessen. Es handelt sich hierbei um eine in Bezug auf Zeit und Menge lineare Reaktion. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass Malachitgrün bei niedrigen pH-Werten einen Komplex mit Phosphomolybdat eingeht, was zu einer Farbänderung führt. Diese kann detektiert und unter Berücksichtigung einer Eichreihe mit Phosphat (0,02 - 100 µmol) quantifiziert werden. Die Steuerung des Geräts, wie auch die nachfolgende Auswertung wurde mit der Software EasyWinKinetics 32bit (Fa. Tecan, Crailsheim, D) durchgeführt. Nach den eigentlichen Enzymmessungen wurde mit einem Aliquot der Extrakte eine Proteinbestimmung (s. 2.5.6) zur Berechnung der spezifischen Aktivität durchgeführt.

<u>Extraktionspuffer</u>	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
	2 mM	MgCl ₂
	1 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
	1 mM	EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)
	5 mM	β-Mercaptoethanol
<u>Assay-Puffer</u>	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	16 mM	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
	100 mM	KCl
<u>Detektionslösung (5 x)</u>	10 mg	Malachitgrün in
	28 mM	Ammoniummolybdat in 2 M H ₂ SO ₄ (täglich frisch ansetzen)

2.5.10 Messung der Enzymaktivität der AGPase

Die Messung der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus Kartoffelblättern erfolgte unter modifizierten Bedingungen (Müller-Röber et al., 1992; Tiessen et al., 2002). Es wurden ca. 100 mg der bei - 80 °C zwischengelagerten Blattproben in einem mit Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert und mit 160 µl vorgekühltem Extraktionspuffer homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 s bei 15 300 g und 4 °C wurden 15 µl des Überstandes für den Aktivitätsassay mit einem Endvolumen von 200 µl verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 mM Natriumpyrophosphat gestartet. Der Assay beruht darauf, dass die Produktion von Glukose-1-Phosphat aus ADP-Glukose in einem NAD⁺-gekoppelten Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-System gemessen wird. Die NAD⁺-Reduktion wurde spektrophotometrisch bei 340 nm in Multiplatten (Elisa-Platte Microton, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen, D) im Tekan (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim, D) gemessen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte von dem verbliebenden Extrakt eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. 2.5.6).

<u>Extraktionspuffer</u>	50 mM	HEPES/KOH pH 7,8
	5 mM	MgCl ₂

<u>Aktivitätsassay</u>	50 mM	HEPES/KOH pH 7,8
	5 mM	MgCl ₂
	10 µM	Glukose-1,6-Bisphosphat
	0,6 mM	NAD ⁺
	1 U/ml	Phosphoglukomutase (Kaninchen Muskel)
	2,5 U/ml	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
	0,5 mM	ADP-Glukose

2.5.11 Bestimmung des Amylose/Amylopektin-Verhältnisses

Das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin in Kartoffelknollen wurde nach einem abgeänderten Protokoll bestimmt (Hovenkamp-Hermelink et al., 1988). Diese Methode kombiniert die Extraktion der Stärke in Perchlorsäure (Lustinec et al., 1983) mit der Absorptionsmessung bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen nach einer Stärkefärbung mit Lugolscher Lösung. Amylose und Amylopektin zeigen unter den gewählten Bedingungen unterschiedliche Absorptionsmaxima. Für die Bestimmung wurden 10 bis 25 mg frisches Knollenmaterial mit 250 µl 45% Perchlorsäure (HClO₄) mit einem Bohrer (Fa. Heidolph, Schwabach, D) homogenisiert. Das aufgeschlossene Knollenmaterial wurde nach Zugabe von 4 ml H₂O 4 min bei Raumtemperatur inkubiert und 30 s bei 15300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 833 µl Lugolscher Lösung (1:2 mit H₂O verdünnt (v/v)) zu 666 µl des Überstandes der Probe. Davon wurden 50 µl mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt, und die Absorption wurde bei 550 und 618 nm in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen, D) im Tekan (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim, D) gemessen. Als Standard wurde eine 10 - 25% ige Amyloselösung verwendet, die nach demselben Prinzip aufgearbeitet wurde wie die Knollenproben. Das Amylose/Amylopektin-Verhältnis kann mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden (Hovenkamp-Hermelink et al., 1988), weil die Absorptionen von unterschiedlich konzentrierten Amylose- und Amylopektinlösungen in Bezug auf die Konzentration linear verlaufen.

Das Verhältnis (R) der Absorptionen:

$$R = \text{Absorption (618 nm)} / \text{Absorption (550 nm)}$$

Das Verhältnis (P) von Amylose und Amylopektin:

$$P = (3,5 - 5,1 * R) / (10,4 * R - 19,9)$$

2.5.12 Metabolitenanalyse mittels GC/MS

Unter GC/MS versteht man die gekoppelte Anwendung der Gaschromatographie (GC) mit der Massenspektrometrie (MS). In der GC wird das zu untersuchende Stoffgemisch aufgetrennt, während die MS der Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten dient.

2.5.12.1 Extraktion und Probenvorbereitung

100 mg bei - 80 °C zwischengelagertes Blattmaterial wurden mit 300 µl auf - 20 °C vortemperiertes Methanol mit Hilfe eines Bohrers homogenisiert. Anschließend kamen als interner Standard 30 µl auf - 20 °C vorgekühltes Ribitol (0,3 mg/ml in Methanol) hinzu. Nach kurzem Vortexen wurde die Probe 15 min bei 70 °C geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, kurzes Vortexen und erneutes Schütteln bei 37 °C für 5 min. Anschließend kamen 400 µl H₂O_{HPLC} hinzu, wodurch sich eine polare und eine apolare Phase bildete. Nach kurzem Vortexen und fünfminütiger Zentrifugation bei 15 300 g wurden 160 µl der oberen Phase abgenommen, in ein verschließbares GC-Fläschchen überführt und in der Speed Vac bis zur Trockne eingengt. Vor der Derivatisierung wurde das GC-Fläschchen geöffnet in einen Exsikkator gestellt, um Kondenswasser zu entfernen. Es folgte die Zugabe von 40 µl Methoxyaminlösung (20 mg Methoxyamin - HCl in 1 ml Pyridin abs.) zu jeder Probe. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 90 min bei 30 °C inkubiert. Diese Methoxymierung soll die Ringbildung von reduzierenden Zuckern verhindern und die Ketogruppen vor einer möglichen Decarboxylierung schützen (Schweer, 1982). Danach wurden zur Silylierung von Carboxyl-, Hydroxyl-, Amin- und Amidgruppen 70 µl MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) hinzu gegeben, kurz gevortext und die Proben 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Silylierung senkt die Siedepunkte der Metabolite und erhöht deren Molekulargewichte. Die derivatisierten Proben wurden in Bördeldeckelfläschchen mit Mikroeinsätzen überführt, mit einem Deckel fest verschlossen und waren so bereit zur Messung.

2.5.12.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie oder Verteilungschromatographie ist nur für Komponenten anwendbar, die gasförmig oder unzersetzt verdampfbar (Siedebereich bis 400 °C) sind. In der mobilen Phase wird Helium als Trägergas genutzt, das mit einem Druck von 60,7 kPa anlag. Die Trennsäule war eine HP - 5MS - Kapillarsäule (Fa. Agilent, US) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm, einer Länge von 30 m und mit 5% Phenyl - Methylpolysiloxan als

Trägermaterial. Ein GC / MS-Lauf wurde vollautomatisch durch Zugabe von 2 µl derivatisierter Probe gestartet. Die Probensubstanz wird nun vom Trägergas transportiert und die Komponenten verweilen je nach Polarität und Dampfdruck der einzelnen Gasmoleküle unterschiedlich lange in der stationären Phase. Die Temperatur des GC - Ofens betrug für 5 min 70 °C und stieg dann mit einer Rate von 5 °C pro min bis auf 280 °C an. Diese Temperatur wurde für 7 min gehalten, bevor wieder auf 70 °C gekühlt wurde und ein neuer Lauf beginnen konnte. Die chromatographische Auftrennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelsubstanzen. Der Austrittszeitpunkt der einzelnen Komponenten kann am Säulenende gemessen werden.

2.5.12.3 Massenspektroskopie

Das mit dem Gaschromatografen gekoppelte Massenspektrometer ionisiert und fragmentiert die von der Säule eluierenden Substanzen und beschleunigt diese im Hochvakuum. Anhand der Flugbahnen der einzelnen Fragmente konnte auf ihr Verhältnis von Masse zu Ladung geschlossen werden. Die Ionenquelle war auf 230 °C und das Quadrupol auf 150 °C temperiert. Geeicht wurde das Massenspektrometer mit Perfluorotributylamin (PFTBA), und zwar über die ChemStation-Software (Agilent, USA) als Ausführung eines so genannten Autotunes. Zur Messung wurde die Scan-Methode gewählt. Bei dieser Betriebsart werden alle Massen von 50 - 600 amu in 0,1 amu Schritten kontinuierlich gemessen, wobei der Analysator 2,69 Durchgänge durch dieses Spektrum pro Sekunde misst.

2.5.12.4 Auswertung

Die Auswertung der GC/MS-Läufe erfolgte mit dem Programm ChemStation (Agilent, USA). Als Ergebnis wird durch dieses Programm eine Tabelle als Textdatei ausgegeben, die mit den gängigen Tabellenkalkulationsprogrammen bearbeitet werden kann.

2.6 Statistische Methoden und Berechnungen

2.6.1 Standardabweichung

Die Standardabweichung (StAbw) ist ein Begriff der Statistik und gilt als Maß für die Streuung von Einzelwerten um einen Mittelwert. Sie wurde von Francis Galton eingeführt und kann nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$StAbw = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}, \quad x_i = \text{Einzelwert}, \quad \bar{x} = \text{Mittelwert}, \quad n = \text{Anzahl der Einzelwerte}$$

2.6.2 Standardfehler

Der Standardfehler ist wie die Standardabweichung ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um einen Mittelwert. Bei der Berechnung wird die Standardabweichung durch die Quadratwurzel der Anzahl der Einzelwerte (n) geteilt, so dass die Streuung um den Mittelwert mit zunehmender Probenzahl abnimmt.

$$\text{Standardfehler} = \frac{StAbw}{\sqrt{n}}$$

2.6.3 Signifikanztest

Mit dem Signifikanztest (t-Test) wird überprüft, ob sich zwei Gruppen von Messwerten signifikant voneinander unterscheiden. Damit kann die Wahrscheinlichkeit p berechnet werden, die ein Maß für die Unterschiedlichkeit ist. Ist $p < 0,05$, sind die Messwertgruppen mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 95\%$ unterschiedlich. Der Test wurde 1908 von Gosset entwickelt und unter dem Pseudonym „student“ veröffentlicht.

3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, unter Zuhilfenahme von zwei biotechnologischen Ansätzen, die Frage zu beantworten, ob die simultane Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität in einer Steigerung des Knollenertrags und der Knollenstärke in Kartoffelpflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen resultiert. Zu diesem Zweck wurden transgene Kartoffelpflanzen analysiert, in denen (1) die AGPase aus *Solanum tuberosum* in Blättern reprimiert und simultan der NTT aus *Arabidopsis thaliana* und der GPT aus *Pisum sativum* in Knollen überexprimiert ist (AGN-Pflanzen) und (2) die PPase aus *Escherichia coli* in den Mesophyllzellen überexprimiert und der NTT aus *Arabidopsis thaliana* und der GPT aus *Pisum sativum* in den Knollen überexprimiert ist (PGN-Pflanzen).

Im ersten Teil sind die verschiedenen Analysen der AGN-Pflanzen und im zweiten Teil die Ergebnisse der Untersuchungen an PGN-Kartoffelpflanzen zusammengestellt.

Abschließend sollte überprüft werden, ob dieser biotechnologische Ansatz auf andere kommerziell bedeutende Nutzpflanzen übertragbar sein könnte.

3.1 Simultane Repression der *St*AGPase und Überexpression des *Ps*GPT und *At*NTT in *Solanum tuberosum*

3.1.1 Hintergrund

Der Import von Energie und Kohlenstoffgrundgerüsten ist für die Stärkesynthese in Amyloplasten unabdingbar. Energie wird in Form von Adenosintriphosphat (ATP) aus dem Cytosol über den plastidären Adenylat-Translokator (NTT) in die Amyloplasten transportiert. Die Kohlenstoffgrundgerüste werden in Form von Glukose-6-Phosphat (G6P) über den Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator (GPT) in die Amyloplasten transportiert (s. 1.2.5). Eine optimale Versorgung von Amyloplasten mit ATP und G6P in Kartoffelpflanzen führt zu einer Erhöhung des Knollenertrags und der Knollenstärke, was durch eine knollenspezifische Überexpression des GPT und NTT gezeigt werden konnte (Zhang et al., 2008). Ob diese erhöhte *sink* Kapazität mit einer gleichzeitig erhöhten *source* Kapazität zu einer weiteren Ertragssteigerung führt, sollte durch eine zusätzliche Manipulation der *source* Kapazität überprüft werden. Hierfür wurde die kleine katalytische Untereinheit der Adenosindiphosphat-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus *Solanum tuberosum* blattspezifisch unter der Kontrolle des *STLS1* Promotors (Stockhaus et al., 1989) reprimiert. Dadurch sollte der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese reduziert werden, was eine Erhöhung des Assimilatflusses in die Saccharosesynthese zur Folge haben könnte.

Transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) der Linie BG1, die den GPT aus *Pisum sativum* unter der Kontrolle des knollenspezifischen *B33-Patatin*-Promotors (Rocha-Sosa et al., 1989) überexprimieren, wurden mit den Konstrukten *STLS1-pBin- α AGPase* und *B33-pBin-AtNTT1* doppeltransformiert. Die daraus resultierenden Pflanzen erhielten die Bezeichnung AGN (AGPase, GPt, NTT1). Eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte und das Transformationsvorgehen zur Generierung der AGN-Pflanzen ist in Abbildung 4 dargestellt.

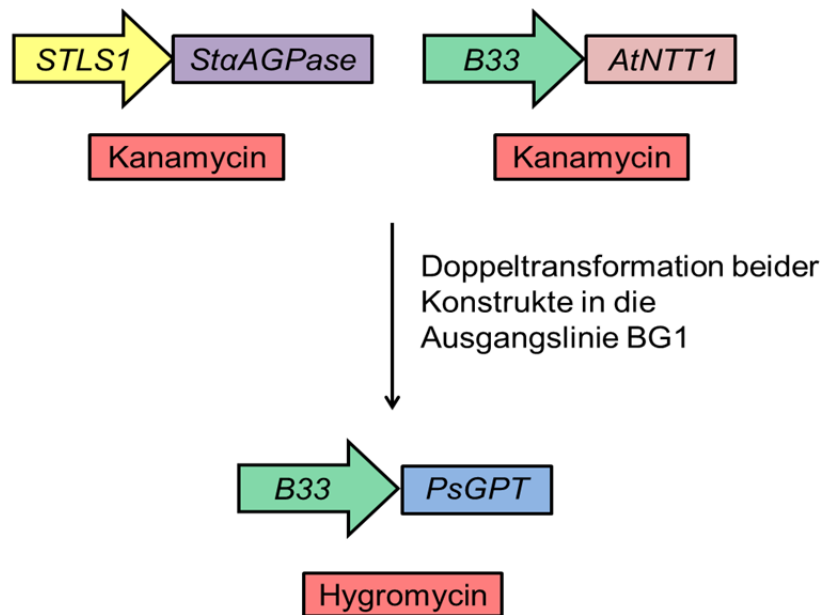


Abbildung 4: Übersicht über die zur Generierung der AGN-Pflanzen verwendeten Konstrukte und schematische Transformationsvorgehensweise.

STLS1 = blattspezifischer Promotor *STLS1/L700*, *StaAGPase* = katalytische Untereinheit der Adenosindiphosphat-Glukose-Pyrophosphorylase aus *Solanum tuberosum* in antisense Orientierung, *B33* = knollenspezifischer Promotor *B33*, *AtNTT1* = Adenylat-Translokator 1 aus *Arabidopsis thaliana*, *PsGPT* = Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator aus *Pisum sativum*. Die Resistenzen sind rot hinterlegt. BG1 = Ausgangslinie, die durch knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* charakterisiert ist.

3.1.2 Expressionsanalysen in transformierten Kartoffelpflanzen

Zur Expressionsanalyse des *PsGPT* und des *AtNTT* dienten Knollenproben, wohingegen für die Expressionsanalyse der *StAGPase* Blattproben entnommen wurden. Aus diesen Proben wurde die RNA extrahiert (s. 2.4.1) und die Konzentration bestimmt (s. 2.4.4). Zur Entfernung von noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt (s. 2.4.5), bevor die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde (s. 2.4.6). Die gewonnene cDNA diente als Matrize für die RT-PCR (s. 2.4.8).

In Abbildung 5 sind die Gelbilder der agarosegelelektrophoretischen Auftrennungen (s. 2.4.2) der *PsGPT*-, *AtNTT1*- und *St β TUB*-Amplifikate der RT-PCR dargestellt. Das *β -Tubulin* Gen,

ein *housekeeping*-Gen aus *Solanum tuberosum*, wurde als quantitative Kontrolle verwendet und diente dem Nachweis, dass in allen PCR-Ansätzen eine vergleichbare cDNA-Menge vorlag. Wie im unteren Gelbild in Abbildung 5 zu sehen ist, waren sowohl beim Wildtyp als auch bei den AGN-Linien 6, 35 und 67 *β-Tubulin*-Amplifikate mit einer Fragmentgröße von 500 bp vorhanden. Da die Bandenintensität bei allen Proben ähnlich war, kann davon ausgegangen werden, dass eine vergleichbare cDNA-Menge eingesetzt wurde. Um die Expression der *PsGPT*- und *AtNTT1*-Konstrukte in Kartoffelknollen zu analysieren, wurden Primerpaare konstruiert, die spezifisch für den *GPT* aus *Pisum sativum* und den *NTT1* aus *Arabidopsis thaliana* waren, und nicht für die jeweiligen Kartoffelgene. Im oberen Gelbild ist die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate mit den *PsGPT* spezifischen Primern abgebildet. Aufgrund der ca. 614 bp großen Bande bei den Linien AGN_6, 35 und 67 und der nicht vorhandenen Bande im Wildtyp wurde gezeigt, dass die gewählten AGN-Linien das *PsGPT*-Transkript besaßen. Mit einer RT-PCR auf die gleiche cDNA unter Verwendung der *AtNTT1* spezifischen Primer konnte festgestellt werden, dass die Linien AGN_6, 35 und 67 ebenfalls *AtNTT1*-Transkripte besaßen, wie an den ca. 480 bp großen Banden im mittleren Gelbild deutlich wurde. Die nicht vorhandene Bande im Wildtyp zeigte, dass auch hier die Primer spezifisch für den *NTT1* aus *Arabidopsis thaliana* waren.

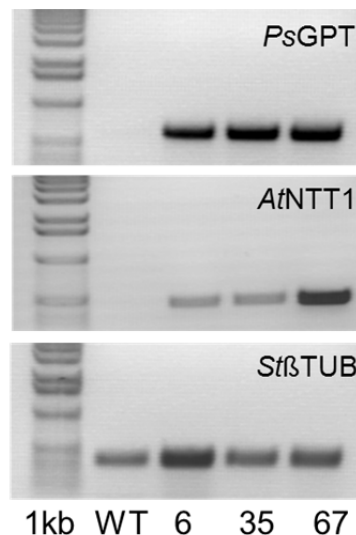


Abbildung 5: Expressionsanalysen des GPT aus *Pisum sativum* und NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* in Kartoffelknollen von AGN-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate des *PsGPT*-, *AtNTT1*- und des *StβTUB*-Gens. Zur Amplifikation wurden die genspezifischen Primer aus 2.1.5 verwendet. Es wurde das Standard PCR-Programm (s. 2.4.7) mit einer Anlagerungstemperatur der Primer von 55 °C (*StβTUB*, *AtNTT1*) und 61 °C (*PsGPT*) mit 28 Zyklen durchgeführt. 1kb-Leiter Invitrogen; WT: Wildtyp; 6, 35, 67: Nummerierung der AGN-Pflanzen, in denen die *StAGPase* reprimiert und der *PsGPT* und *AtNTT1* überexprimiert ist. Die zu erwartende Bandengrößen der PCR-Produkte betragen 614 bp (*PsGPT*), 480 bp (*AtNTT1*) und 500 bp (*StβTUB*).

In Abbildung 6 sind die Gelbilder der gelelektrophoretischen Auftrennungen (s. 2.4.2) der *StAGPase* und *St β TUB*-Amplifikate der RT-PCR aus Kartoffelblättern abgebildet. Wie im unteren Gelbild anhand der Bandenintensität der *St β TUB*-Amplifikate zu sehen ist, wurde für die RT-PCR eine vergleichbare cDNA-Menge eingesetzt. Diese cDNA diente als Matrize für die *StAGPase* Expressionsanalyse. In einer RT-PCR mit *StAGPase*-spezifischen Primern konnten sowohl im Wildtyp als auch in allen AGN-Linien *AGPase*-Transkripte nachgewiesen werden, wie im oberen Gelbild zu sehen ist. Da die Bandenintensität der *St β TUB*-Amplifikate annähernd gleich war, gibt die unterschiedliche Bandenintensität der *StAGPase*-Amplifikate über eine unterschiedlich starke Expression Aufschluss. Demnach zeigten alle AGN-Linien eine verringerte Expression der *StAGPase*, wobei die Expression in den Linien AGN_35 und 67 am schwächsten war.

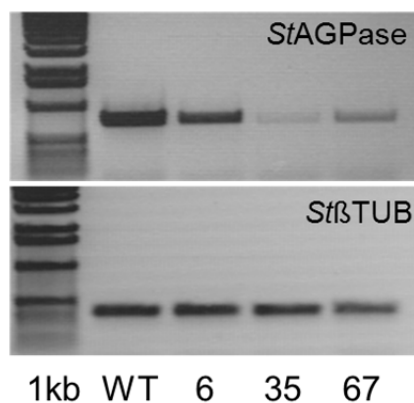


Abbildung 6: Expressionsanalyse der *AGPase* aus *Solanum tuberosum* in Kartoffelblättern von AGN-Pflanzen mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate des *StAGPase*-Gens. Die zur Amplifikation verwendeten genspezifischen Primer sind in 2.1.5 aufgeführt. Es wurde das Standard PCR-Programm (s. 2.4.7) mit einer primerspezifischen Anlagerungstemperatur von 50 °C und einer Zyklenswiederholung von 26 durchgeführt. 1kb-Leiter Invitrogen; WT: Wildtyp; 6, 35, 67: Nummerierung der AGN-Pflanzen, in denen die *StAGPase* reprimiert und der *PsGPT* und *AtNTT1* überexprimiert ist.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate einer RT-PCR gibt lediglich über eine vorhandene, stärkere oder schwächere Expression Aufschluss. Aus diesem Grund wurde zur relativen Quantifizierung der *StAGPase*-Expression in den AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt (s. 2.4.9). Dafür wurde isolierte RNA aus Blättern (s. 2.4.1) nach DNaseI-Verdau (s. 2.4.5) und reverser Transkription (s. 2.4.6) in einem PCR-Ansatz mit dem SensiMixTM SYBR Kit nach Herstellerangaben eingesetzt und im Real Time PCR System 7300 (s. 2.4.9) amplifiziert. Das verwendete Primerpaar war für die Sequenz der *StAGPase* spezifisch (s. 2.1.5, Primerpaare mit der Abkürzung RL). Zur relativen Quantifizierung wurde *β -Tubulin* als Referenzgen mitgemessen. Aufgrund der linearen, umgekehrt proportionalen Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Ct-Wert konnte die relative Expression der

StAGPase in den AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. Der Ct-Wert ist die Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird. Durch die relative Quantifizierung können Änderungen in der Menge der Zielsequenz im Vergleich zu einer Kontrolle beschrieben werden. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von AGN-Kartoffelblättern sind in Abbildung 7 dargestellt und zeigten in allen drei AGN-Linien eine reduzierte Expression der *StAGPase*. Die Expression war in der Linie AGN_6 um 40,7%, in der Linie AGN_35 um 54,8% und in der Linie AGN_67 um 74,5% im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

Somit haben sich die Ergebnisse der agarosegelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate (s. Abbildung 6) bestätigt.

Durch die Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass in Knollen der AGN-Linien 6, 35 und 67 der *A α NTT1* und der *PsGPT* exprimiert werden. In Kartoffelblättern derselben Linien konnte im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte *StAGPase*-Expression nachgewiesen werden. Allerdings ist der Nachweis der Transkripte kein Beweis für die Translation zu funktionalen Genprodukten. Um darüber Aussagen treffen zu können, sind Aktivitätsmessungen notwendig.

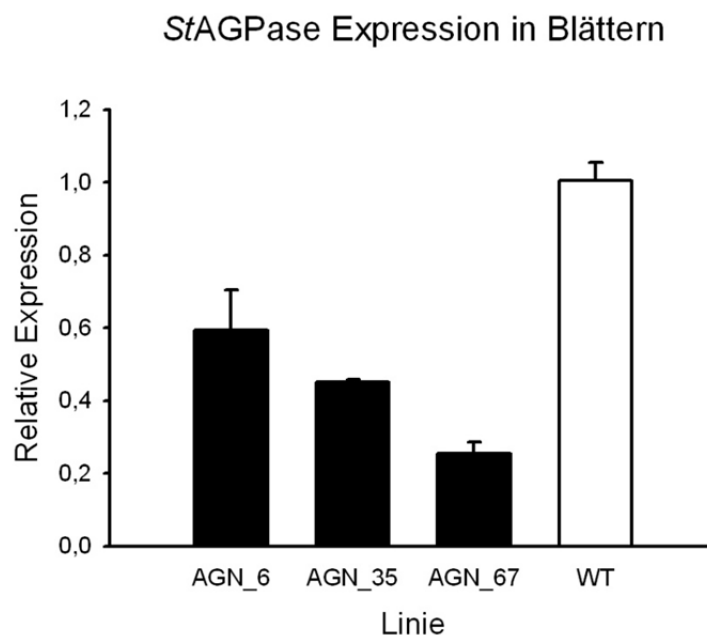


Abbildung 7: Expressionsanalyse der *AGPase* aus *Solanum tuberosum* in Kartoffelblättern von AGN-Pflanzen durch quantitative Real-Time-PCR.

Die Mittelwerte für die AGN-Linien und für den Wildtyp (WT) sind aus n=3 Pflanzen \pm Standardfehler gebildet worden. AGN-Linien: transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *A α NTT1* knollenspezifisch überexprimieren.

3.1.3 AGPase-Aktivitätsmessungen in Kartoffelblättern

Um zu bestätigen, dass die ausgewählten AGN-Linien nicht nur die eingesetzten Konstrukte exprimieren, sondern auch ein funktionales antisense *StAGPase* Genprodukt besitzen, wurden Aktivitätsmessungen der AGPase in Blättern vorgenommen. Der AGPase-Aktivitätsassay beruht auf der photometrischen Messung des von ADP-Glukose gebildeten Glukose-1-Phosphat in einem NAD^+ -gekoppelten Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-System (s. 2.5.10).

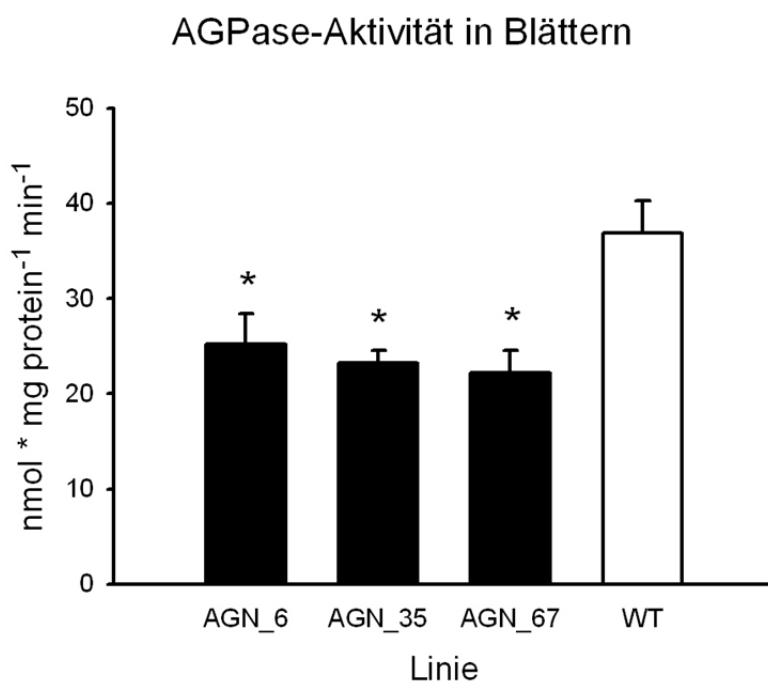


Abbildung 8: AGPase-Aktivitätsmessung in Blattextrakten von AGN- und Wildtyppflanzen.

Die Mittelwerte für die AGN-Linien und für den Wildtyp (WT) sind aus jeweils $n=4-9$ Pflanzen \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$). AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, besitzen die ausgewählten AGN-Linien 6, 35 und 67 nicht nur herunterregulierte Transkripte für das Gen *StAGPase*, sondern auch deutlich verringerte AGPase-Aktivitäten in Kartoffelblättern im Vergleich zum Wildtyp. Alle gemessenen Werte waren signifikant im Vergleich zum Wildtyp verändert, was mit dem t-Test berechnet wurde, und lagen bei allen Linien bei $p < 0,05$. Die dreifach transgene Linie AGN_6 hatte somit eine Restaktivität der AGPase von 68,4%, die Linie AGN_35 von 62,9% und die Linie AGN_67 von 60,2%. Demnach konnte in allen ausgewählten AGN-Linien die funktionelle Expression der *StAGPase* in Kartoffelblättern nachgewiesen werden.

3.1.4 Untersuchungen der AGN-Kartoffelpflanzen aus Gewächshausanzuchten

Die ausgewählten dreifach transgenen AGN-Linien 6, 35 und 67 wurden in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert, wo sie nach 11 bis 14 Wochen Anzucht von April bis August geerntet wurden. Mit Hilfe der Gewächshausanzuchten sollte überprüft werden, welchen Einfluss die blattspezifische Repression der *StAGPase* und die gleichzeitige knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* auf die Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp hat. Zusätzlich zum Wildtyp wurde zum Teil die Linie BGA_31 als Kontrollpflanze angebaut. Diese doppelt transgene Linie ist durch die simultane Überexpression des *PsGPT* und des *AtNTT1* unter Kontrolle des knollenspezifischen Promotors *B33* charakterisiert. Mit diesem biotechnologischen Ansatz konnte eine Erhöhung der *sink* Kapazität erzielt werden, was sich in einem um 19% erhöhten Knollenertrag, einem um 23% erhöhten Knollenstärkegehalt und in einem im Vergleich zum Wildtyp um 44% gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze äußerte (Zhang et al., 2008).

3.1.4.1 Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile

Änderungen der Aktivitäten von Enzymen, die für den Stärkemetabolismus essentiell sind, könnten das Wachstum der oberirdischen grünen Pflanzenteile beeinflussen. Daher wurde das Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile bei den Ernten ermittelt. In Abbildung 9 sind die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile von drei verschiedenen Ernten (08.09, 07.10 und 04.08) dargestellt. Lediglich in der Ernte April 2008 (04.08) zeigte die Linie AGN_35 ein im Vergleich zum Wildtyp um 35,2% signifikant erhöhtes Grüngewicht. Ansonsten waren die bei manchen Linien auftretenden Änderungen negativ, d. h. die transgenen Pflanzen waren partiell tendenziell leichter als Wildtyppflanzen. Diese Reduktion zeigte sich bei allen untersuchten Linien in der August 2009 Anzucht (08.09); wobei die Änderungen hier nicht signifikant waren. Die Anzuchten von April 2008 (04.08) und Juli 2010 (07.10) bestätigten diese Beobachtung nicht. Es traten zwar geringe Schwankungen auf, die jedoch bis auf Linie AGN_6 (07.10) nicht signifikant waren. Somit lässt sich bei den transgenen Kartoffelpflanzen der Linien AGN und BGA_31 in manchen Anzuchten die Tendenz beobachten, etwas weniger grüne Pflanzenteile zu bilden als der Wildtyp.

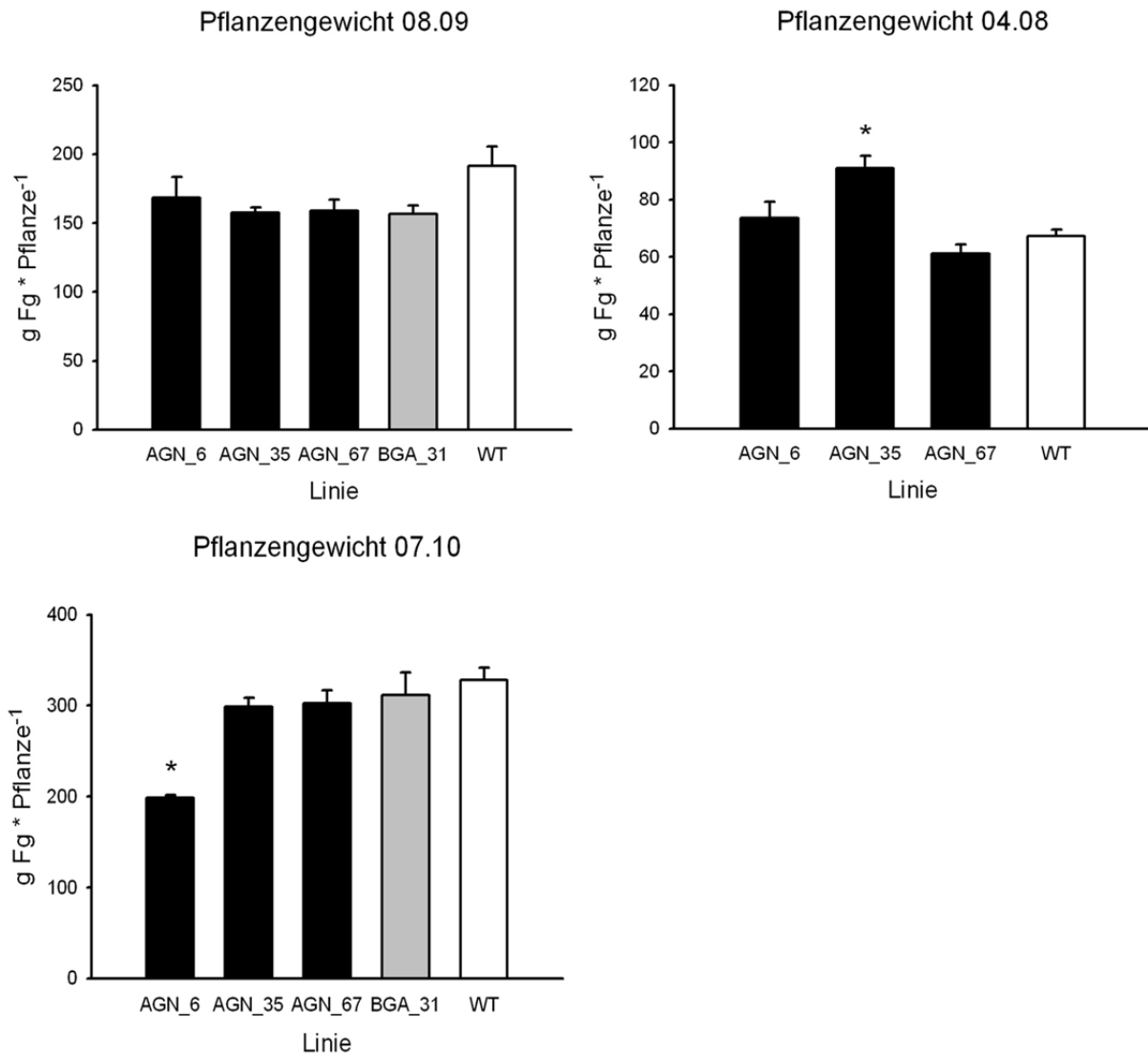


Abbildung 9: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen (WT) in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze aus drei verschiedenen Anzuchten. AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Die Mittelwerte der Anzucht 08.09 sind aus n=8-10 Einzelwerten, der Anzucht 07.10 aus n=3-8 Einzelwerten und der Anzucht 04.08 aus n=4-8 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.4.2 Stärkegehalte in Kartoffelblättern

Leidreiter et al. (1995) konnte zeigen, dass die blattspezifische Antisense-Inhibierung der AGPase zu einem verringerten Stärkegehalt in Blättern führt. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass die AGN-Linien, in denen ebenfalls die AGPase blattspezifisch herunterreguliert ist, einen verringerten Stärkegehalt in Blättern aufweisen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Stärkegehalt in Kartoffelblättern in mehreren Ernten nach zehn bis elf Wochen Anzucht im Gewächshaus untersucht. Die Blätter zeigten in diesem Entwicklungsstadium noch keine Seneszenz. Die Blattproben wurden am frühen

Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildetem Fiederblatt von oben entnommen und der Stärkegehalt nach dem Protokoll in 2.5.2 gemessen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei Ernten (08.09, 04.08 und 07.10) dargestellt (s. Abbildung 10). Aus den Analysen aller dargestellten Anzuchten wird deutlich, dass der Stärkegehalt in Blättern von AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert war. In der Anzucht August 2009 (08.09) und Juli 2010 (07.10) war der Stärkegehalt zwischen 27,7% (AGN_6, Anzucht 07.10) und 36,0% (AGN_67, Anzucht 07.10) reduziert. Unter den AGN-Linien zeigten sich keine Unterschiede. In der Anzucht von April 2008 (04.08) war der Blattstärkegehalt von Linie AGN_67 um 57,7%, in der Linie AGN_6 um 41,5% und in der Linie AGN_35 um 34,3% im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die in WT-Pflanzen gemessene Blattstärkemenge stimmte mit vorhandenen Literaturdaten überein (Leidreiter et al., 1995)

In der Linie BGA_31, die durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AfNTT1* charakterisiert ist, war der Blattstärkegehalt im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass diese Pflanzen lediglich im Knollen- und nicht im Blattgewebe manipuliert worden sind.

Die deutliche Reduktion des Blattstärkegehalts in allen untersuchten AGN-Linien ist die Konsequenz der bereits in Blättern festgestellten reduzierten AGPase-Aktivität (s. 3.1.3) und weist auf eine Reduktion der Stärkesynthese in Blättern hin. Somit konnte der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese durch die blattspezifische Repression der *StAGPase* erfolgreich reduziert werden.

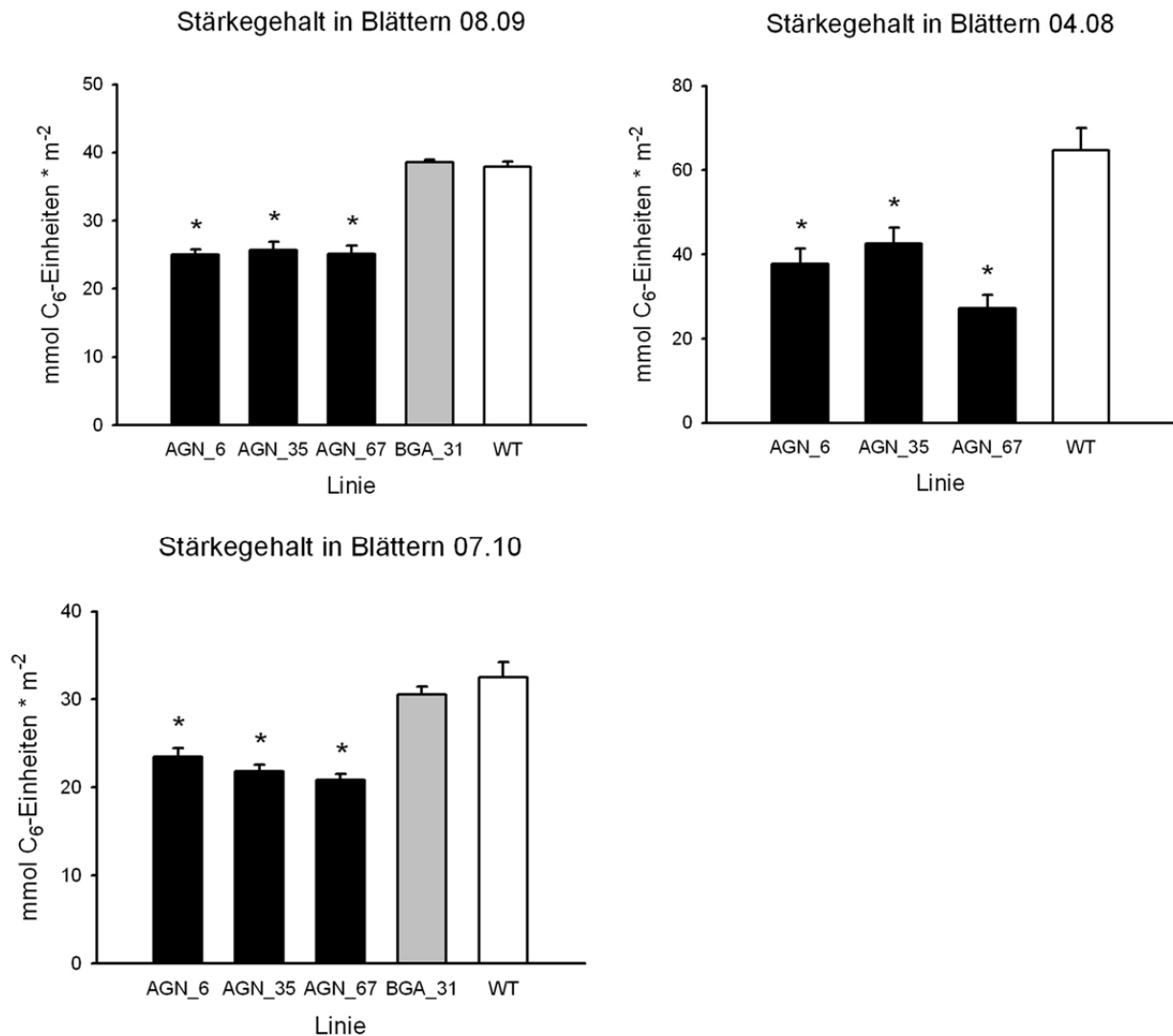


Abbildung 10: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AfNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AfNTT1* charakterisiert. Der Stärkegehalt ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche dargestellt. Die Mittelwerte der Anzucht 08.09 sind aus n=8-10 Einzelwerten, der Anzucht 04.08 aus n=4-7 Einzelwerten und der Anzucht 07.10 aus n=3-8 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.4.3 Zuckergehalte in Kartoffelblättern

Da die untersuchten AGN-Pflanzen eine verringerte Synthesekapazität der Blattstärke zeigten (s. 3.1.4.2), wäre es aufschlussreich zu analysieren, ob dies einen Einfluss auf andere Kohlenhydrate wie z. B. auf lösliche Zucker hat. Die Gehalte der Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurden nach dem in 2.5.1 beschriebenen Protokoll nach zehn bis elf Wochen Anzucht im Gewächshaus untersucht. Das Probenmaterial wurde am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt von oben entnommen, das noch keine Anzeichen von Seneszenz zeigte.

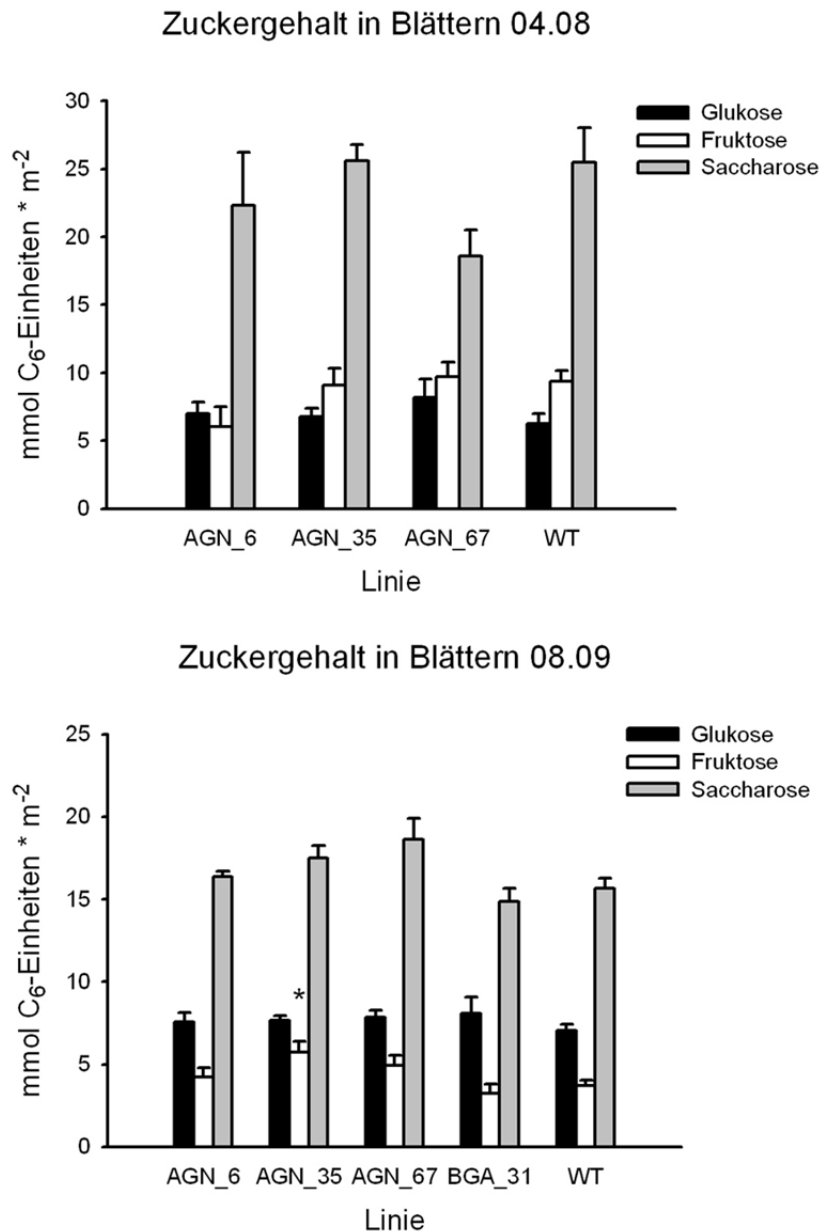


Abbildung 11: Zuckergehalte in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Gehalt der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche dargestellt. Die Mittelwerte der Anzucht 04.08 sind aus n=4-8 Einzelwerten, der Anzucht 08.09 aus n=8-10 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Zuckeranalysen von zwei Anzuchten (04.08 und 08.09) dargestellt. Es wird deutlich, dass die Zuckergehalte in beiden Anzuchten ähnlich zu denen des Wildtyps waren. Signifikanzanalysen (s. 2.6.3) ergaben keine Wahrscheinlichkeit für Unterschiede bei den löslichen Zuckern Glukose, Fruktose und Saccharose zwischen transgenen Pflanzen und dem Wildtyp. Nur in der Anzucht von August 2009 (08.09) war der Gehalt an Fruktose in der Linie AGN_35 signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Da diese schwache Änderung jedoch nur bei einer Linie auftrat und sich bei der anderen

Anzucht nicht bestätigte, kann davon ausgegangen werden, dass die blattspezifische Repression der AGPase keinen Einfluss auf die Akkumulation der löslichen Zucker in Blättern hatte. Ein Unterschied zwischen den beiden dargestellten Anzuchten war, dass das Verhältnis von Glukose zu Fruktose verschieden war. Da es sich hier jedoch um geringfügige Änderungen handelte, die nicht regelmäßig auftraten, können sie vernachlässigt werden. Diese Ergebnisse werden im Übrigen von Leidreiter et al. (1995) bestätigt, da auch hier die blattspezifische Repression der AGPase zwar zu einem reduzierten Stärkegehalt in Blättern führte (s. 3.1.4.2), aber keinen Einfluss auf die löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose hatte.

3.1.4.4 Analyse der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen

Um die *source* Kapazität der transgenen Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp genauer zu analysieren, wurden Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen analysiert. Dafür wurden Kartoffelpetiolen unter Wasser abgeschnitten und während des Tages und am Ende der Lichtphase für 4 bzw. 16 Stunden in Licht bzw. Dunkelheit in einer EDTA-Lösung inkubiert (s. 2.5.5). Der Zuckergehalt wurde bestimmt, um die Exportkapazität in Blättern zu untersuchen (s. 2.5.1).

Aus Abbildung 12 A sind die Zuckergehalte der EDTA-Lösung nach 16-stündigem Export während der Nacht in Prozent vom Wildtyp zu entnehmen. In allen AGN-Linien war ein erhöhter Zuckerexport zu erkennen. Der Export war in der Linie AGN_6 um den Faktor 2,4, in AGN_35 um den Faktor 2,5 und in AGN_67 um den Faktor 2,1 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dies war eine durchschnittliche Erhöhung um den Faktor 2,3. Da die Abweichungen zwischen den einzelnen Werten, wie man anhand der Standardfehler sehen kann, hoch waren, handelte es sich hierbei nicht um signifikante Veränderungen. Die Exportkapazität war bei einem weiteren Versuch (Abbildung 12 B) in allen AGN-Linien und auch in der Linie BGA_31 durchschnittlich um den Faktor 2,1 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Bei der Linie AGN_6 und BGA_31 handelte es sich um eine signifikante Erhöhung.

Da die Schwankungen der Messwerte während eines nächtlichen Exports recht hoch waren, wurde der Zuckerexport zusätzlich während des Tages nach 4-stündiger Inkubation analysiert, da es prinzipiell möglich wäre, dass die abgeschnittenen Petiolen ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr exportieren.

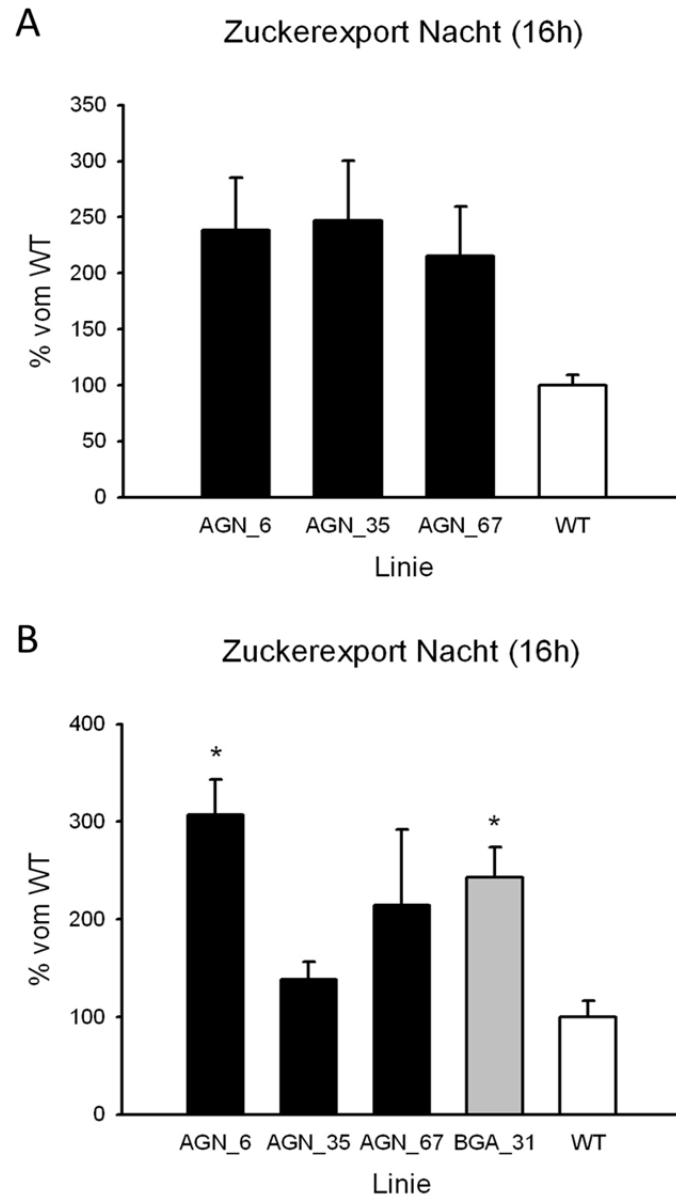


Abbildung 12: Analyse des Zuckergehaltes in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen von AGN, BGA_31- und Wildtyppflanzen nach Inkubation für 16 Stunden in der Nacht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Ergebnisse sind dargestellt in % vom Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=4-5 (A) und n=3-4 Pflanzen (B) \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse des Zuckerexports während des Tages sind in Abbildung 13 dargestellt. In allen AGN- und BGA_31-Linien konnte ein gesteigerter Zuckerexport festgestellt werden. Bis auf Linie BGA_31 und in einem der gezeigten Beispiele der Linie AGN_35 (Abbildung 13 A) zeigten alle Linien eine signifikante Erhöhung. Der Zuckergehalt in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen war maximal um den Faktor 2,9 erhöht. In den AGN-Linien lag eine durchschnittliche Erhöhung um Faktor 2,3 vor. Auch in Abbildung 13 B zeigten alle AGN-

Linien eine signifikant erhöhte Zuckerexportkapazität. Hier lag eine durchschnittliche Erhöhung um Faktor 2,1 vor.

Zusammenfassend haben die Zuckeranalysen der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen während des Tages und der Nacht gezeigt, dass die transgenen Pflanzen mehr Zucker als der Wildtyp exportieren. Dies zeigt die Anpassung zu einer erhöhten Exportkapazität auch ohne *sink* Gewebe.

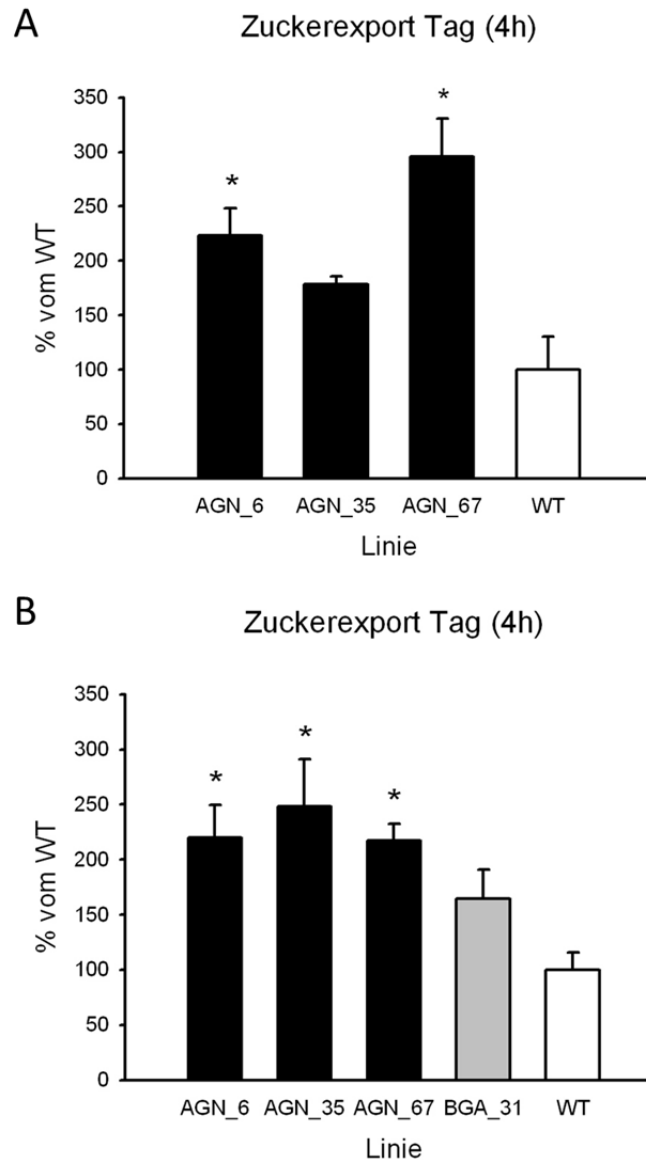


Abbildung 13: Analyse des Zuckergehaltes in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen von AGN, BGA_31- und Wildtyppflanzen nach Inkubation für 4 Stunden im Licht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Ergebnisse sind dargestellt in % vom Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=4 (A) und n=5 Pflanzen (B) ± Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.4.5 Bestimmung der CO₂-Assimilation

Um weitere Auswirkungen der reduzierten AGPase-Aktivität (s. 3.1.3) und des verringerten Stärkegehalts (s. 3.1.4.2) in Blättern zu analysieren, erschien es sinnvoll, die CO₂-Assimilationsrate der transgenen Kartoffelblätter bei verschiedenen Belichtungsstärken zu ermitteln und sie mit der des Wildtyps zu vergleichen (s. 2.5.3). Die Bestimmung der CO₂-Assimilation erfolgte am frühen Nachmittag.

In Abbildung 14 ist die Assimilationsrate von Kartoffelblättern der AGN-Linien 6, 35 und 67 im Vergleich zum Wildtyp nach zehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus dargestellt. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, stieg bei wachsender Belichtungsstärke die Rate der CO₂-Assimilation pro m² Blattfläche und Sekunde an. Im Bereich zwischen 0 bis ca. 200 µE verlief diese Steigerung linear zur Belichtungsstärke. Ab einer Belichtungsstärke von 400 µE trat eine Sättigung ein. Es konnten bei diesem Experiment bei allen gewählten Belichtungsstärken keine signifikanten Unterschiede in der CO₂-Assimilationsrate zwischen den transgenen Pflanzen und dem Wildtyp gefunden werden. Im Folgenden wurde die Assimilation nur noch bei 450 µE bestimmt.

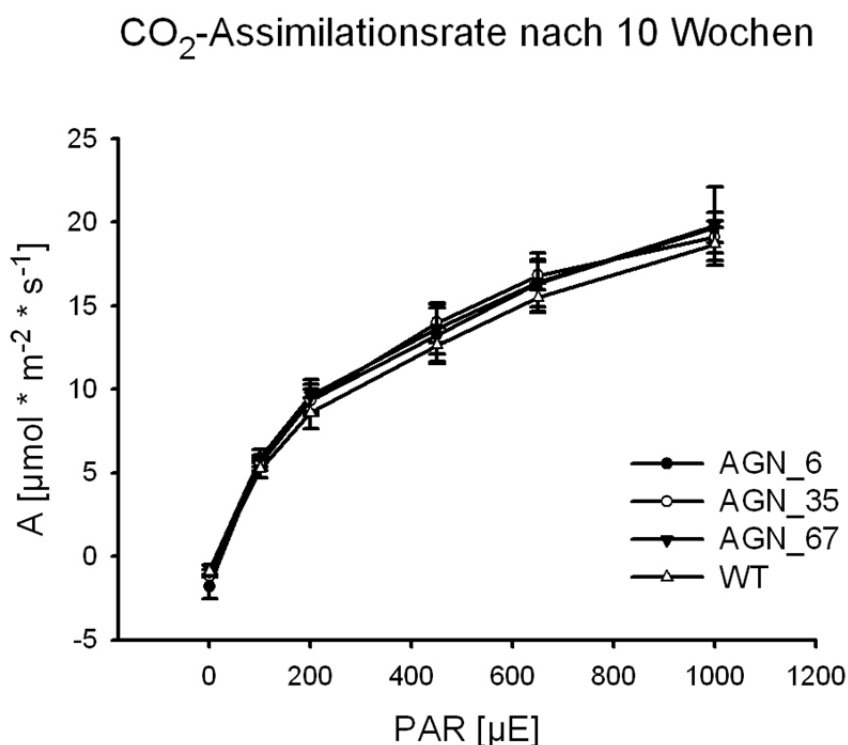


Abbildung 14: CO₂-Assimilationsrate von Kartoffelblättern in µmol assimiliertem CO₂ pro m² Blattfläche und Sekunde in AGN- und Wildtyppflanzen nach zehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die StAGPase blattspezifisch reprimieren und den PsGPT und AtNTT1 knollenspezifisch überexprimieren. WT: Wildtyp; µE: µEinstein; PAR: photosynthetic active radiation. Die Werte sind Mittelwerte von n=3-4 Pflanzen ± Standardfehler.

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen einen Einfluss auf die CO_2 -Assimilation haben, wurde die CO_2 -Assimilation bei einer Belichtungsstärke von $450 \mu\text{E}$ in Kartoffelpflanzen nach zehn- und sechzehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus am frühen Nachmittag gemessen.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der CO_2 -Assimilationsmessung bei $450 \mu\text{E}$ von zehn bzw. sechzehn Wochen alten AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Wie aus dem Diagramm ersichtlich wird, waren in allen AGN-Pflanzen nach zehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus keine signifikanten Änderungen der CO_2 -Assimilation im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Betrachtet man dagegen die CO_2 -Assimilation nach sechzehnwöchiger Anzucht, war in allen AGN-Linien eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die Assimilation war in Linie AGN_6 um den Faktor 3,1, in AGN_35 um den Faktor 3,7 und in Linie AGN_67 um den Faktor 3,8 erhöht. Es konnte somit eine durchschnittliche Erhöhung um den Faktor 3,6 festgestellt werden. Es war auffällig, dass die CO_2 -Assimilation in älteren Wildtyppflanzen und auch transgenen AGN-Pflanzen sehr stark abnahm. In zehn Wochen alten Wildtyppflanzen wurde bei $450 \mu\text{E}$ eine CO_2 -Assimilation von $12,6 \pm 1,06 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen. In dreizehn Wochen alten Wildtyppflanzen betrug die CO_2 -Assimilation $5,1 + 0,81 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und sank nach sechzehn Wochen weiter auf $1,32 + 0,09 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (nicht gezeigt).

Es wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen der CO_2 -Assimilation in Kartoffelblättern und dem Entwicklungsstadium der Pflanze bestand. Mit zunehmendem Alter und eintretender Seneszenz nahm die CO_2 -Assimilation der Blätter kontinuierlich ab. Diese Abnahme der CO_2 -Aufnahme in Blättern war auch in AGN-Pflanzen zu beobachten. In sechzehn Wochen alten AGN-Pflanzen konnte jedoch im Gegensatz zu jüngeren Pflanzen eine signifikante Erhöhung der CO_2 -Assimilation im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Diese hier gemessene erhöhte photosynthetische Aktivität weist auf eine erhöhte photosynthetische Leistungsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp hin und lässt sich in Zusammenhang mit einer gekoppelten erhöhten *source* und *sink* Kapazität begründen.

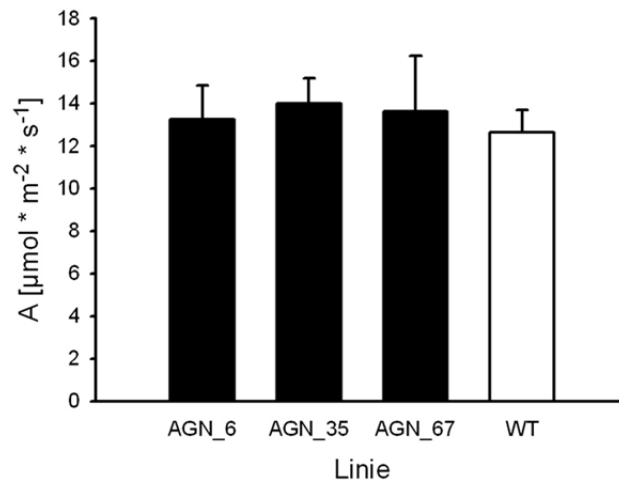
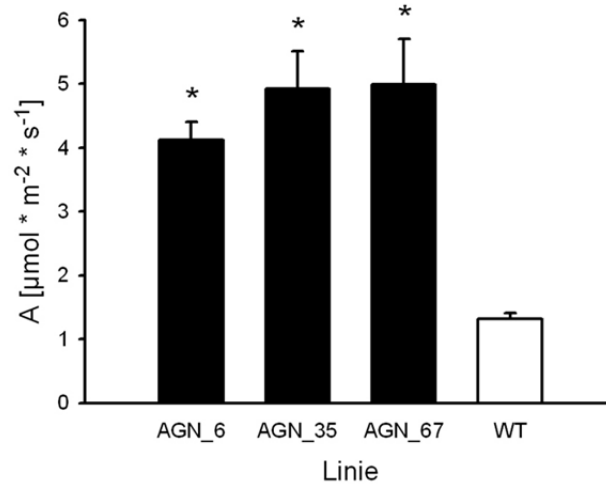
CO₂-Assimilation bei 450 μE nach 10 WochenCO₂-Assimilation bei 450 μE nach 16 Wochen

Abbildung 15: CO₂-Assimilation von Kartoffelblättern in μmol assimiliertem CO₂ pro m² Blattfläche und Sekunde in AGN- und Wildtyppflanzen bei einer Belichtungsstärke von 450 μE nach zehn- bzw. sechzehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. WT: Wildtyp; μE: μEinstein; PAR: photosynthetic active radiation. Die Werte sind Mittelwerte von n=3-5 Pflanzen ± Standardfehler; * = signifikant (p < 0,05).

3.1.4.6 Bestimmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme in die Blattstärke

Um Kohlenstoffflüsse im primären Stoffwechsel zu analysieren, wurden die Kohlenstoffflüsse mit Hilfe der Markierung von $^{14}\text{CO}_2$ untersucht, wobei der Fluss des assimilierten Kohlenstoffs in die lösliche Zuckerfraktion und unlösliche Stärkefraktion untersucht wurde. Die Einlagerung von $^{14}\text{CO}_2$ in die Blattstärke wurde nach dem in 2.5.4 beschriebenen Protokoll bestimmt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der prozentualen Einlagerung von $^{14}\text{CO}_2$ in die unlösliche Blattstärkefraktion in AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen dargestellt. Es konnten sowohl in allen AGN-Linien als auch in den BGA_31-Linien keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. In der löslichen Blattsuckerfraktion konnten ebenso keine Änderungen detektiert werden (Daten hier nicht gezeigt). Mögliche Erklärungen für die nicht vorhandenen Veränderungen könnten sein, dass der Inkubationszeitraum über 30 Minuten zu kurz war, um eventuelle Unterschiede in der $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme detektieren zu können. Zudem war die vorhandene CO_2 -Konzentration in der Inkubationskammer sehr hoch und lag im Sättigungsbereich. Daher wäre es möglich, dass keine Unterschiede zwischen den transgenen AGN-Linien und dem Wildtyp detektierbar waren, da der vorhandene Verlust an AGPase-Aktivität nicht so stark ausgeprägt ist. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die abgetrennten einzelnen Blätter nicht mehr im Stoffwechsel eingebunden waren und deswegen keine Unterschiede detektierbar waren.

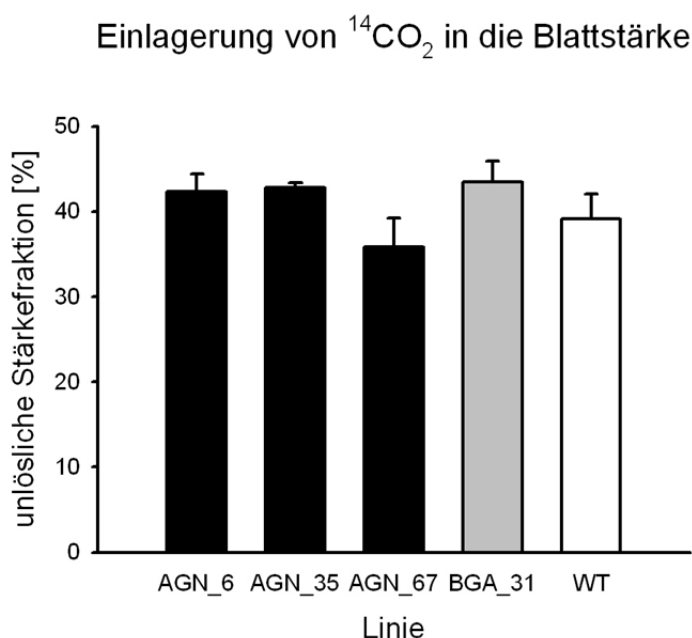


Abbildung 16: Analyse der Einlagerung von $^{14}\text{CO}_2$ in die Blattstärke von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Ergebnisse sind dargestellt als unlösliche Stärkefraktion in %. Die Werte sind Mittelwerte aus n=2-4 Einzelwerten \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.4.7 GC/MS-Messungen von Kartoffelblättern

Durch die bisherigen Analysen konnte gezeigt werden, dass die blattspezifische Repression der *StAGPase* in AGN-Pflanzen in einer erhöhten *source* Kapazität resultiert (s. 3.1.4.4). Um zu untersuchen, ob dies einen Einfluss auf das Profil von Aminosäuren und anderen Metaboliten hat, wurden diese in Blattextrakten mittels GC/MS-Analysen untersucht. Es wurden die BGA_31- und AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nach 11 Wochen Anzucht im Gewächshaus analysiert. Die Ergebnisse der Metabolitanalysen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Rohdaten wurden auf Ribitol als internen Standard und auf das Probenfrischgewicht bezogen. Anschließend wurden die Abweichungen bezogen auf den auf 100% normierten Wildtyp in % bestimmt; diese sind nun in Tabelle 5 dargestellt.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die AGN- und BGA_31-Linien ein im Vergleich zum Wildtyp ähnliches Metabolitprofil aufwiesen. Die Unterschiede waren bis auf einige wenige Ausnahmen (Glycerat: BGA_31, AGN_67 oder Valin: BGA_31 und AGN_6) nicht signifikant vom Wildtyp verschieden.

Es wäre daher sinnvoll, die GC/MS-Analyse in einer weiteren Anzucht zu wiederholen, um sicherzustellen, dass tatsächlich keine Veränderungen auftreten. Dennoch ist es nachvollziehbar, dass keine nennenswerten Veränderungen detektiert werden konnten, da in den Blättern der AGN-Pflanzen ausschließlich der Stärkemetabolismus manipuliert wurde. Bei den hier analysierten Substanzen handelt es sich hauptsächlich um Aminosäuren oder Metabolite, die eine Funktion im Citratzyklus haben.

Tabelle 5: Ergebnisse der Metabolitanalysen mittels GC/MS von Blattextrakten von Wildtyp-, BGA_31- und AGN-Pflanzen.

Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus n=3-6 Einzelmessungen \pm Standardfehler und stellen die prozentualen Änderungen bezogen auf den auf 100% normierten WT dar. Die Rohdaten wurden auf den internen Standard Ribitol und auf das Frischgewicht der Proben bezogen. TMS = Anzahl trimethylsilylierten Gruppen; WT = Wildtyp; BGA_31: knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1*, AGN: transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren; * = signifikant ($p < 0,05$).

	WT	BGA_31	AGN_6	AGN_35	AGN_67
2-Ketoglutarat	100 \pm 20,1	155,7 \pm 13,3	109,6 \pm 23,8	172,3 \pm 15,9	165,3 \pm 20,4
Oxalacetat	100 \pm 13,2	75,4 \pm 1,3	103,7 \pm 7,7	72,0 \pm 13,4	76,2 \pm 17,9
Succinat	100 \pm 10,5	75,9 \pm 19,5	87,4 \pm 12,1	100,8 \pm 4,5	116,1 \pm 16,4
Fumarat	100 \pm 23,2	115,4 \pm 3,3	61,9 \pm 19,2	112,6 \pm 10,7	160,3 \pm 18,5
Glycerat	100 \pm 18,1	153,8 \pm 1,0*	90,1 \pm 12,2	106,1 \pm 13,6	183,4 \pm 18,6*
GABA	100 \pm 18,0	138,5 \pm 3,1	174,8 \pm 14,3	168,0 \pm 12,9	192,0 \pm 16,0
Valin	100 \pm 12,5	46,1 \pm 8,8*	46,6 \pm 20,8*	72,5 \pm 23,5	105,8 \pm 10,3
Histidin	100 \pm 26,0	84,6 \pm 11,5	42,3 \pm 31,7	202,4 \pm 57,8	208,1 \pm 39,8
L-Lysin 3TMS	100 \pm 16,6	89,3 \pm 4,9	109,8 \pm 12,9	101,0 \pm 1,6	138,5 \pm 12,7
L-Lysin 4TMS	100 \pm 23,0	70,9 \pm 14,4	52,0 \pm 32,4	89,8 \pm 33,5	106,6 \pm 26,3
Threonin	100 \pm 22,0	58,6 \pm 16,8	101,6 \pm 15,3	98,4 \pm 27,2	115,0 \pm 10,5
Tyrosin 2TMS	100 \pm 19,5	66,4 \pm 2,4	30,6 \pm 17,7	122,1 \pm 15,3	124,0 \pm 7,3
Serin 2TMS	100 \pm 7,7	78,1 \pm 2,5	73,8 \pm 1,8*	70,8 \pm 4,3*	103,0 \pm 9,7
Asparagin	100 \pm 22,2	51,4 \pm 17,4	67,9 \pm 9,4	60,7 \pm 18,6	92,8 \pm 21,8
β-Alanin	100 \pm 21,9	64,2 \pm 0,7	72,6 \pm 8,5	79,1 \pm 9,4	142,8 \pm 1,0
Alanin 2TMS	100 \pm 18,5	57,9 \pm 0,6	132,0 \pm 4,1	56,1 \pm 32,0	178,4 \pm 18,5
Glycin	100 \pm 15,1	105,4 \pm 0,3	32,0 \pm 49,9	65,0 \pm 4,5	172,8 \pm 12,1
Isoleucin 2TMS	100 \pm 11,4	55,5 \pm 10,1	56,3 \pm 9,9	88,4 \pm 11,9	93,5 \pm 13,7
Aspartat 3TMS	100 \pm 22,4	169,6 \pm 10,4	153,6 \pm 16,1	164,8 \pm 21,8	204,0 \pm 20,4
Aspartat 2TMS	100 \pm 16,8	100,1 \pm 7,0	54,2 \pm 29,9	61,9 \pm 21,0	119,7 \pm 24,1
5-Oxo-Prolin	100 \pm 8,2	69,4 \pm 11,0*	6,3 \pm 24,0	91,3 \pm 19,2	131,2 \pm 20,7
L-Glutamat	100 \pm 25,1	54,0 \pm 32,2	149,7 \pm 42,6	44,5 \pm 0,05	146,1 \pm 19,7

3.1.4.8 Analyse der Knollenerträge

Um festzustellen, ob die blattspezifische Repression der *StAGPase* zusammen mit einer erhöhten *sink* Kapazität einen Einfluss auf die Kartoffelknollenbildung und das Knollenwachstum hat, wurden die Knollen gesammelt und gewogen.

In Abbildung 17 sind die Knollenerträge von drei Ernten (08.09, 04.08 und 07.10) dargestellt. Zudem ist als Zusammenfassung aller drei Ernten die Knollenertragsbilanz dargestellt. Die hier ermittelten Knollenerträge pro Pflanze stimmten mit Literaturwerten überein und lagen zwischen 50 und 200 g Frischgewicht pro Pflanze (Zhang et al., 2008). Bei allen Ernten wurde deutlich, dass sowohl bei der Linie BGA_31 als auch in den dreifach transgenen AGN-Linien der Knollenertrag in g Frischgewicht pro Pflanze deutlich im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Bis auf Linie BGA_31 und AGN_6 (07.10) handelte es sich bei allen Werten um signifikante Veränderungen. In der Ernte vom April 2008 (04.08) war der Knollenertrag zwischen 34,7% (AGN_6) bis zu 40,0% (AGN_67) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Anzucht von August 2009 (08.09) war der Knollenertrag in der Linie BGA_31 um 40,2% erhöht und in den AGN-Linien um 68,4% (AGN_67) bis 84,4% (AGN_6), verglichen mit Wildtyppflanzen. Es konnte somit in den AGN-Linien eine durchschnittliche Erhöhung des Knollenertrags um 78,1% im Vergleich zum Wildtyp erzielt werden. Zudem konnte eine zusätzliche Erhöhung des Knollenertrags im Vergleich zur Linie BGA_31 erzielt werden, die durchschnittlich 27% betrug. Diese Ergebnisse konnten auch in der Anzucht von Juni 2010 (07.10) bestätigt werden. Der Knollenertrag war zwischen 50,4% (AGN_6) und 89,2% (AGN_67) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Im Vergleich zur Linie BGA_31 konnte eine Steigerung um 59,2% erzielt werden.

Die Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, bildeten demnach mehr Knollenmasse pro Pflanze aus als Wildtyppflanzen. Zusätzlich konnten die Ergebnisse der bereits veröffentlichten Linie BGA_31 (Zhang et al., 2008) bestätigt werden, und durch die Herstellung der dreifach transgenen AGN-Pflanzen konnte eine zusätzliche Erhöhung erreicht werden. Das Knollengewicht konnte bis zu 89,2 % (AGN_67, Ernte 07.10) im Vergleich zum Wildtyp erhöht werden. Das Knollengewicht war durchschnittlich um 61,6% im Vergleich zum Wildtyp erhöht, wie der Knollenertragsbilanz der drei Anzuchten aus Abbildung 17 zu entnehmen ist.

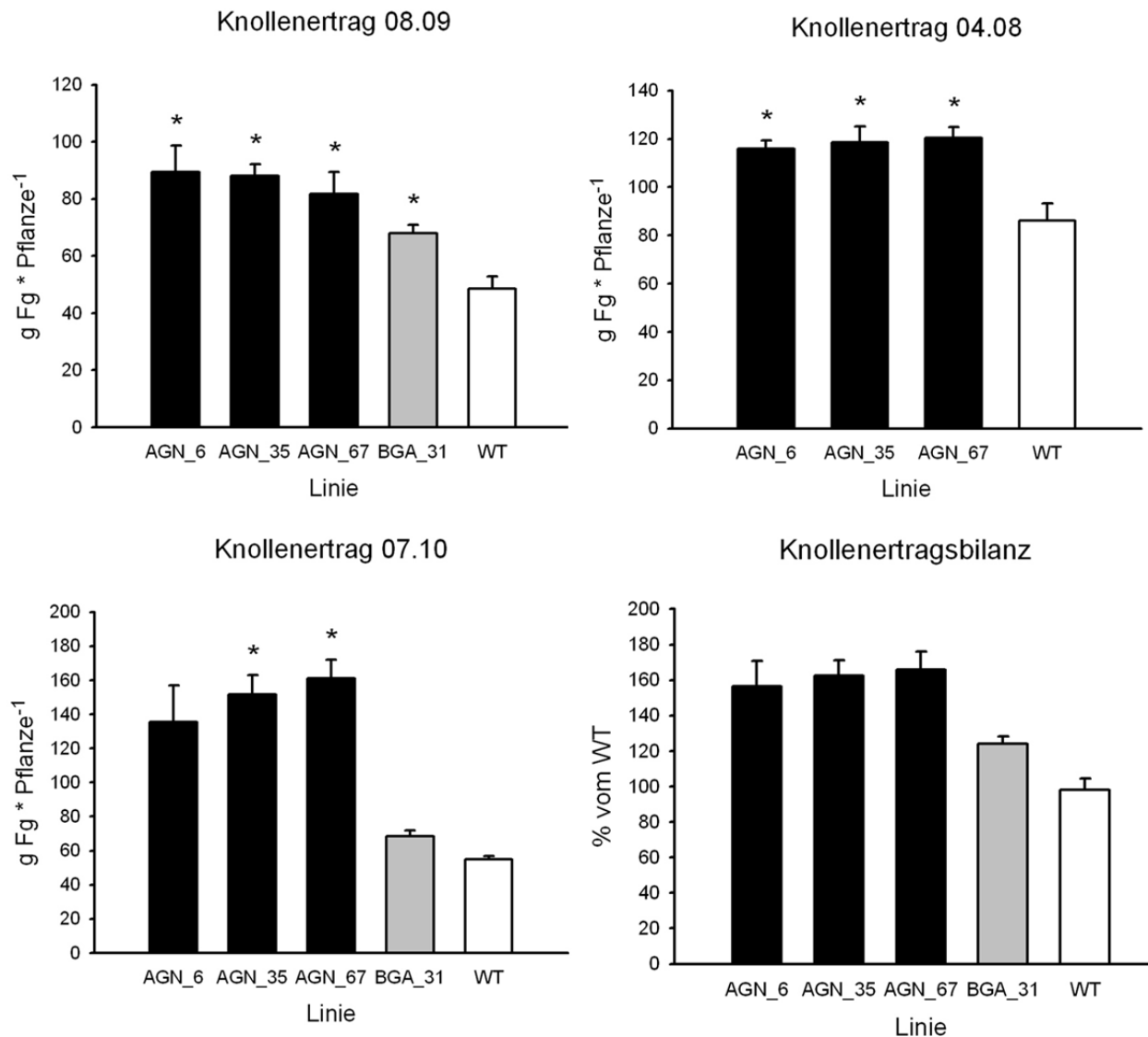


Abbildung 17: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze in AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus $n=8-10$ (08.09), $n=4-8$ (04.08) und $n=3-8$ (07.10) Einzelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Die Knollenertragsbilanz stellt die Mittelwerte der dargestellten Anzuchten (08.09, 07.10 und 04.08 bei AGN-Linien bzw. 08.09 und 07.10 bei *BGA_31*) in % vom Wildtyp dar.

3.1.4.9 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Ob in den AGN-Linien zum deutlich gesteigerten Knollenertrag (s. 3.1.4.9) zusätzlich eine Steigerung des Stärkegehalts vorlag, wurde im Folgenden untersucht. Der Stärkegehalt wurde in Kartoffelknollen der drei Anzuchten (08.09, 04.08 und 07.10) nach dem in 2.5.2 beschriebenen Protokoll ermittelt.

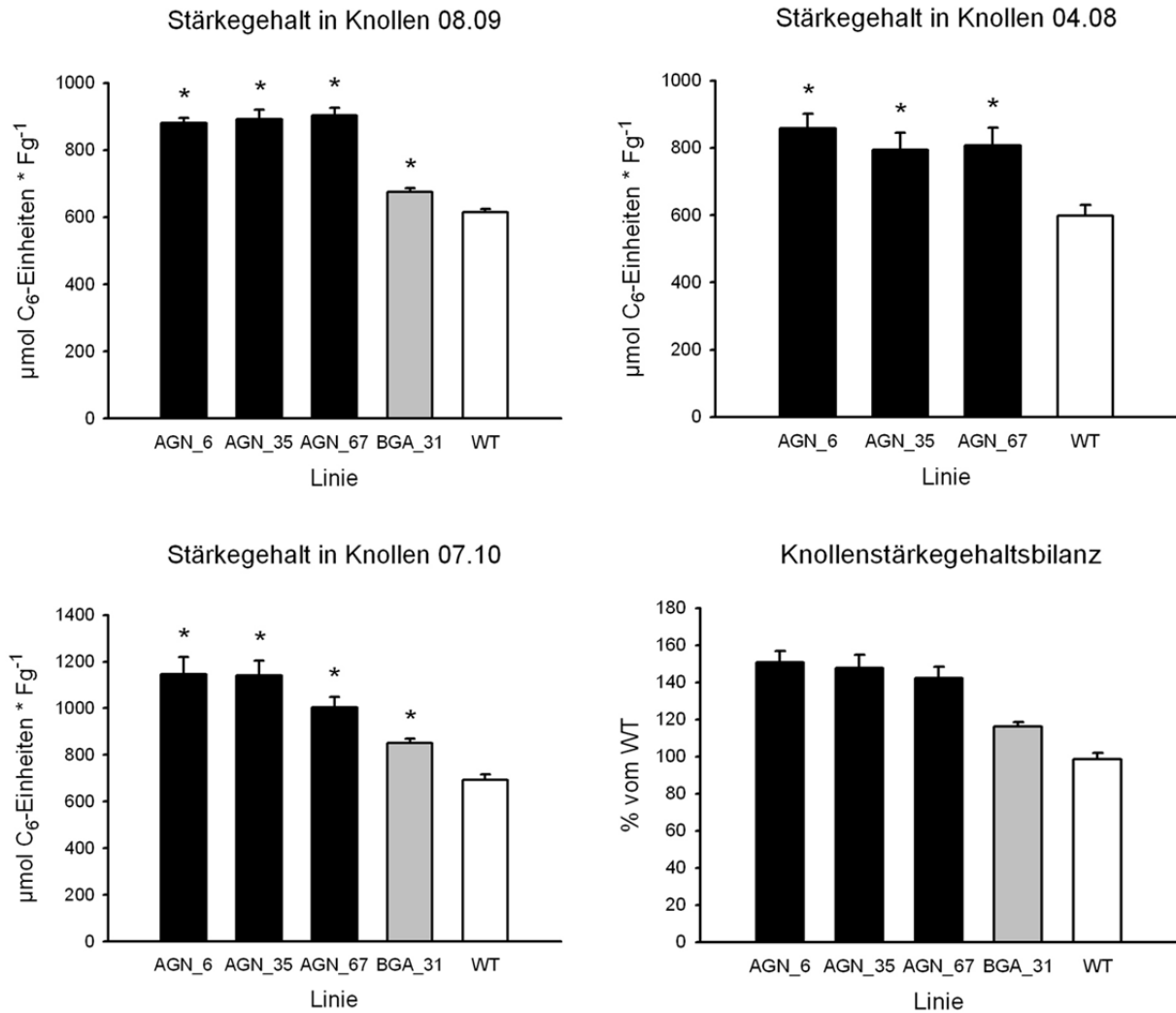


Abbildung 18: Stärkegehalte in Kartoffelpflanzen in $\mu\text{mol C}_6$ Einheiten pro g Frischgewicht (Fg) von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus $n=8-10$ (08.09), $n=4-8$ (04.08) und $n=3-8$ (07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Die Knollenstärkegehaltsbilanz stellt die Mittelwerte der dargestellten Anzuchten (08.09, 07.10 und 04.08 bei AGN-Linien bzw. 08.09 und 07.10 bei BGA_31) in % vom Wildtyp dar.

Den Ergebnissen aus Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass in allen dargestellten Ernten der Stärkegehalt in Knollen in $\mu\text{mol C}_6\text{-Einheiten pro g Frischgewicht (Fg)}$ signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. In der Ernte von April 2008 (04.08) war der Stärkegehalt in Kartoffelknollen zwischen 32,7% (AGN_35) und 43,5% (AGN_6) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dies war eine durchschnittliche Erhöhung um 37,1%. In der Anzucht von August 2009 (08.09) war der Kartoffelstärkegehalt in der Linie BGA_31 um 9,9% und in den AGN-Linien um durchschnittlich 45,1% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Somit war der Stärkegehalt in den AGN-Linien im Vergleich zu der Linie BGA_31 um 32,0% erhöht. Auch die Ergebnisse der Ernte Juli 2010 (07.10) bestätigten diese Ergebnisse. Der Stärkegehalt in

Knollen war in den AGN-Linien um durchschnittlich 57,9% im Vergleich zum Wildtyp und um 28,9% im Vergleich zur Linie BGA_31 erhöht.

Insgesamt zeigten die dreifach transgenen AGN-Linien, dass sie mehr Stärke in den Knollen akkumulierten als Wildtyppflanzen. Die Bilanz des Stärkegehalts in Knollen der drei dargestellten Anzuchten zeigt, eine durchschnittliche Erhöhung um 46,9% im Vergleich zum Wildtyp. Zudem konnte der bereits gesteigerte Stärkegehalt in Knollen von BGA_31-Pflanzen in AGN-Pflanzen weiter gesteigert werden.

3.1.4.10 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze ist definiert als die Menge an Stärke, die pro Pflanze aus den Knollen gewonnen werden kann und wird durch Multiplikation des Stärkegehalts von Knollen mit dem Knollenertrag pro Pflanze ermittelt. Durch den Stärkeertrag pro Pflanze wird deutlich, ob eine Ertragsteigerung vorliegt. Zur Analyse des Stärkeertrags pro Pflanze dienten die Ergebnisse aus 3.1.4.8 und 3.1.4.9. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Wie den Resultaten zu entnehmen ist, lag bis auf Linie AGN_6 (07.10) in allen transgenen Kartoffelpflanzen und Ernten eine signifikante Erhöhung des Stärkeertrages pro Pflanze vor. Der Stärkeertrag war in der Anzucht von April 2008 (04.08) durchschnittlich um den Faktor 1,9 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Anzucht 08.09 war der Stärkeertrag in den AGN-Linien durchschnittlich um den Faktor 2,5 im Vergleich zum Wildtyp und um den Faktor 1,6 im Vergleich zur Linie BGA_31 erhöht. Diese Ergebnisse wurden in der Anzucht Juli 2010 (07.10) bestätigt, wo der Stärkeertrag der AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp durchschnittlich um den Faktor 2,7 und im Vergleich zur Linie BGA_31 um den Faktor 2,1 gesteigert war.

Die Ergebnisse der dargestellten Ernten zeigen, dass die AGN-Pflanzen einen eindeutig gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanzen aufweisen. Dieser konnte durchschnittlich um den Faktor 2,3 in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht werden, wie die Stärkeertragsbilanz der drei gezeigten Anzuchten in Abbildung 19 darstellt. Dies war auf den erhöhten Knollenertrag pro Pflanze (s. 3.1.4.8) und den erhöhten Stärkegehalt in Kartoffelknollen (s. 3.1.4.9) zurückzuführen.

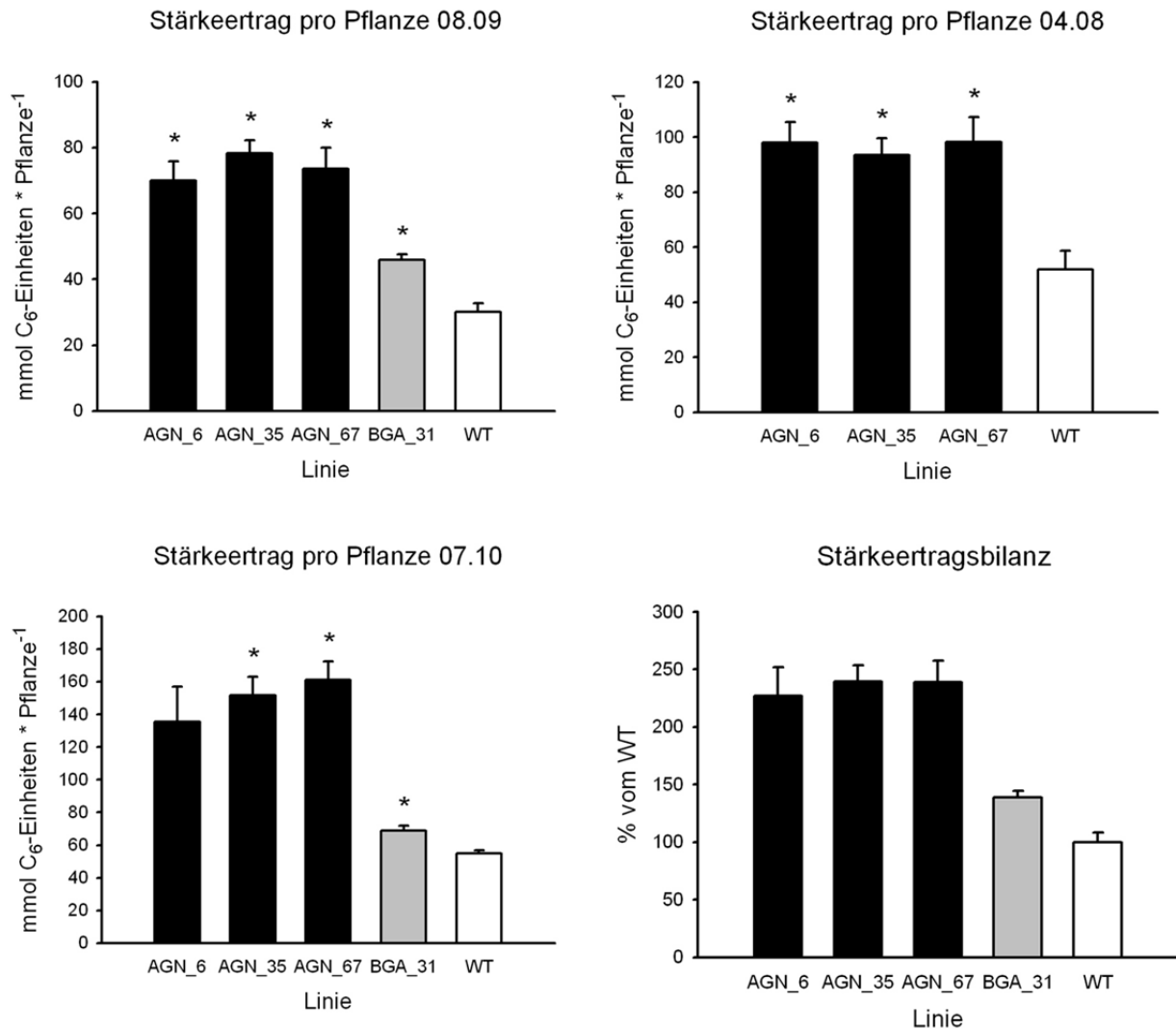


Abbildung 19: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C₆-Einheiten pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=8-10 (08.09), n=4-8 (04.08) und n=3-8 (07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Die Stärkeertragsbilanz stellt die Mittelwerte der dargestellten Anzuchten (08.09, 07.10 und 04.08 bei AGN-Linien bzw. 08.09 und 07.10 bei *BGA_31*) in % vom Wildtyp dar.

3.1.4.11 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Der Einfluss der simultanen blattspezifischen *StAGPase* Repression und knollenspezifischen *PsGPT* und *AtNTT1* Überexpression auf den Gehalt an löslichen Zuckern in Kartoffelknollen wurde ebenso analysiert. Das Vorgehen zur Zuckermessung ist dem Protokoll in 2.5.1 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Zuckeranalysen zweier Anzuchten (08.09 und 04.08) sind Abbildung 20 zu entnehmen. Ähnlich wie in den Blättern konnten keine durchgängigen Änderungen der Zuckergehalte in Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

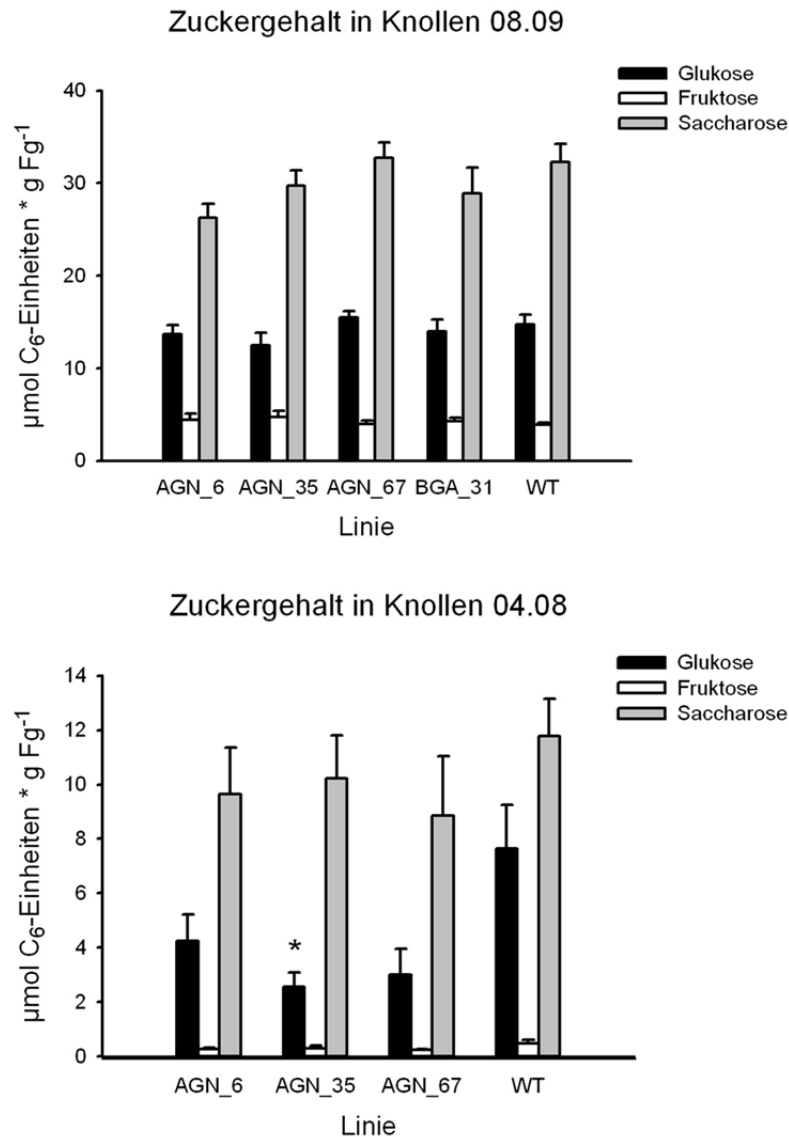


Abbildung 20: Gehalte an löslichen Zuckern in Kartoffelpflanzen von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen in $\mu\text{mol C}_6\text{-Einheiten pro g Frischgewicht (Fg)}$.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=8-9 (08.09) und n=4-8 (04.08) Einzelwerten \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5 Untersuchungen der AGN-Kartoffelpflanzen aus Beetzuchten

Transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, zeigten in Gewächshausanzuchten einen gesteigerten Stärkegehalt in Knollen sowie einen höheren Knollenertrag pro Pflanze. Es sollte untersucht werden, ob die AGN-Pflanzen auch in Erdbeeten den bereits oben beschriebenen Phänotyp zeigen. Die Anzucht in einem Erdbeet unter den hier gewählten Bedingungen (s. 2.2.1) liegt der einer Freilandanzucht sehr nahe, weil die Pflanzen keinem Zusatzlicht und keiner Temperatur- und Feuchteregeung ausgesetzt sind.

Die Kartoffelpflanzen wurden nach 13-wöchiger Anzucht (Mai bis August 2010) im Erdbeet geerntet und analysiert.

3.1.5.1 Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile

In Ertragsanalysen der oberirdischen grünen Pflanzenteile der AGN- und BGA_31-Linien aus Gewächshausanzuchten war die Tendenz zu beobachten, etwas weniger grüne Pflanzenteile zu bilden als Wildtyppflanzen (s. 3.1.4.1). Um zu überprüfen, ob sich diese Beobachtung in der Beetanzucht bestätigt, wurde das Gewicht der oberirdischen Kartoffelpflanzenteile bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 zusammengestellt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle AGN- und auch die BGA_31-Linie im Vergleich zum Wildtyp weniger Grüngewicht bildeten. In der Linie AGN_6 und BGA_31 handelte es sich um eine signifikante Verringerung. In der Linie AGN_6 war das Grüngewicht um 53,6% und in der Linie BGA_31 um 53,2% reduziert. Auch die AGN-Linien 35 und 67 bildeten durchschnittlich 29,6% weniger Grüngewicht als Wildtyppflanzen.

Zusammenfassend zeigten die transgenen Linien auch in der Beetanzucht den Trend, weniger oberirdische Kartoffelpflanzenteile zu generieren als Wildtyppflanzen. In der Beetanzucht war diese Auswirkung stärker ausgeprägt als in Gewächshausanzuchten, da das Grüngewicht bis zu 53,6% reduziert war (AGN_6, Beetanzucht) und in der Gewächshausanzucht um maximal 17,8% reduziert war.

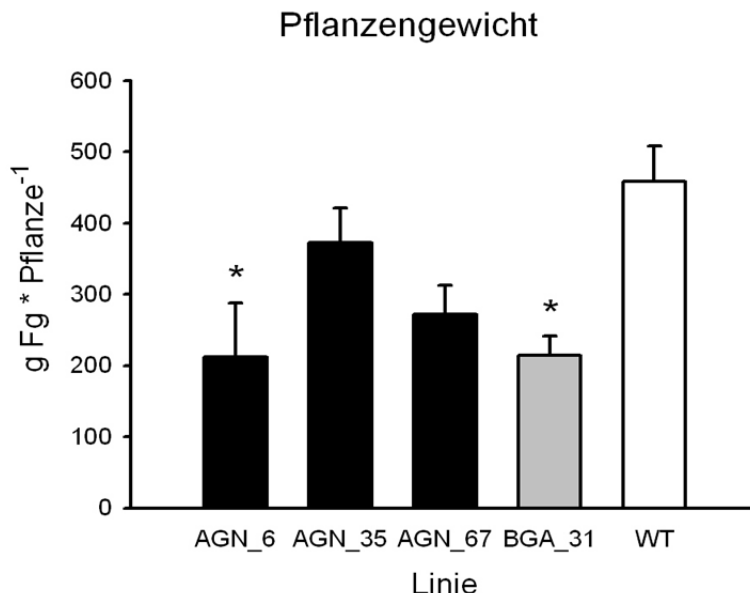


Abbildung 21: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen (WT) in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze aus einer Beetanzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Die Mittelwerte sind aus n=6-10 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5.2 Stärkegehalte in Kartoffelblättern

In Gewächshausanzuchten zeigten alle untersuchten dreifach transgenen AGN-Linien einen signifikant reduzierten Stärkegehalt in Blättern. Der Stärkegehalt war in den gezeigten Anzuchten in den AGN-Linien um durchschnittlich 36,7% verringert (s. 3.1.4.2). Um zu bestätigen, dass der Stärkegehalt in Blättern auch bei Pflanzen reduziert ist, die in einem Erdbeet angezogen wurden, wurden Blattproben entnommen und der Stärkegehalt nach dem in 2.5.2 beschriebenen Protokoll ermittelt. Wie den Ergebnissen aus Abbildung 22 zu entnehmen ist, war der Stärkegehalt in allen AGN-Linien signifikant verringert. Der Stärkegehalt war zwischen 26,9% (AGN_35) und 32,9% (AGN_67) reduziert. Dies ist eine gemittelte Verringerung um 30,4% in den drei AGN-Linien. Der Stärkegehalt in der Linie BGA_31 war mit dem des Wildtyps vergleichbar, was bereits in den Gewächshausanzuchten gezeigt werden konnte (s. 3.1.4.2). Demzufolge konnte die Reduktion der Stärkesynthese in Blättern, die bereits in den Gewächshausanzuchten gezeigt wurde, in einer Beetanzucht bestätigt werden.

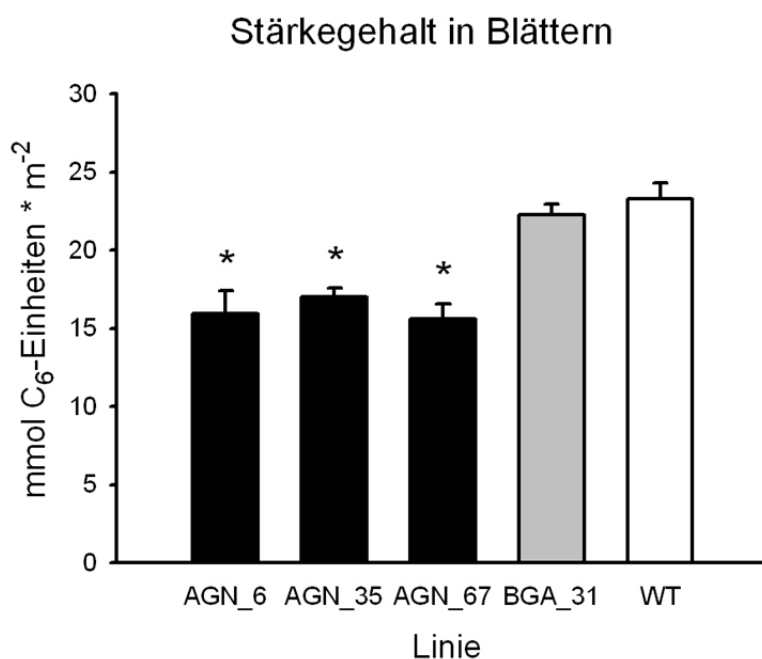


Abbildung 22: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetanzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Stärkegehalt ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche dargestellt. Die Mittelwerte der Anzucht 08.09 sind aus n=6-10 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5.3 Zuckergehalte in Kartoffelblättern

Um zu prüfen, ob der reduzierte Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese womöglich einen Einfluss auf den Gehalt an löslichen Zuckern in Blättern hat, wurde der Gehalt an löslichen Zuckern bestimmt. Als Probenmaterial dienten Fiederblätter, die noch keine Anzeichen von Seneszenz aufwiesen. Die Gehalte der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose der AGN- und BGA_31-Linie ist Abbildung 23 zu entnehmen. Die Gehalte an Glukose und Fruktose waren denen des Wildtyps ähnlich. Signifikanzanalysen ergaben keine Wahrscheinlichkeit für Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen und Wildtyp-pflanzen. Dadurch konnten die Ergebnisse der Gewächshausanzucht bestätigt werden (s. 3.1.4.2). Der Gehalt an Saccharose war in den Linien AGN_35 und 67 im Vergleich zum Wildtyp signifikant um 23% erhöht. Weil sich diese Änderung jedoch nicht in der Linie AGN_6 bestätigte und auch in den Gewächshausanzuchten keine signifikant erhöhten Saccharosegehalte festgestellt werden konnten, muss dieses phänotypische Merkmal in weiteren Beetzuchten überprüft werden.

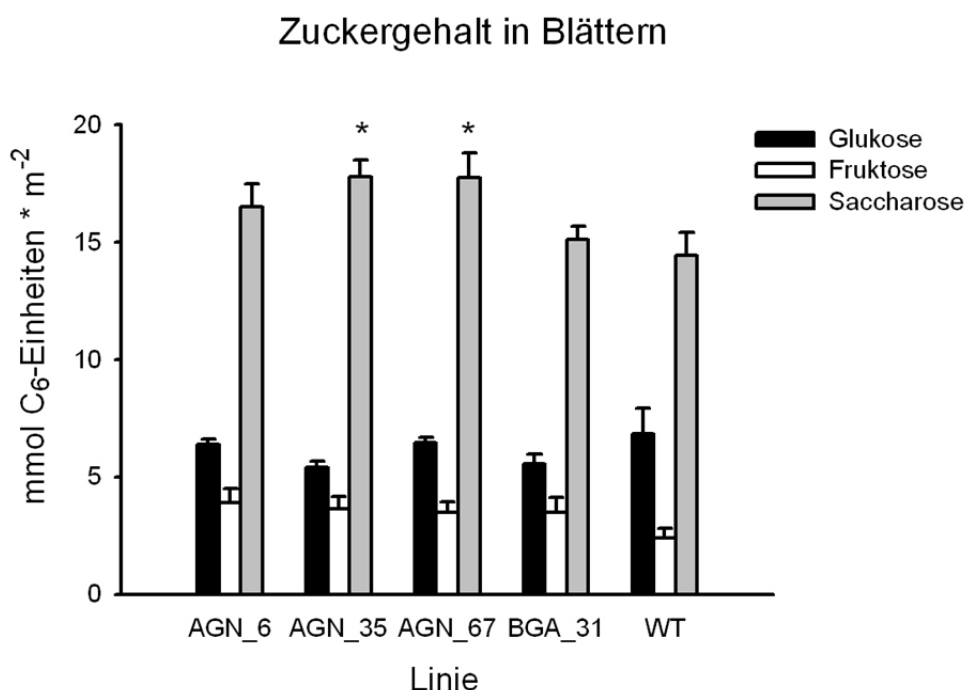


Abbildung 23: Zuckergehalt in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Stärkegehalt ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche dargestellt. Die Mittelwerte sind aus n=6-10 ± Standardfehler gebildet worden; * = signifikant (p < 0,05).

3.1.5.4 Analyse der Knollenerträge

In Gewächshausanzuchten konnte bereits gezeigt werden, dass die blattspezifische Repression der *StAGPase* zusammen mit einer erhöhten *sink* Kapazität einen deutlichen Einfluss auf die Kartoffelknollenbildung und das Knollenwachstum haben. Der Knollenertrag konnte in den AGN-Linien um maximal 89,2% (AGN_67, Ernte 07.10) und durchschnittlich 61,7% und in der Linie BGA_31 um 23,6% erhöht werden (s. 3.1.4.8). In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Analyse der Knollenerträge aus einer Beetanzucht dargestellt. Die Kartoffelpflanzen wurden nach dreizehn Wochen Anzucht im Erdbeet geerntet und gewogen. Die gemittelten Knollenerträge der AGN- und BGA_31 Linien sind in g Frischgewicht pro Pflanze dargestellt. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, war in allen drei AGN-Linien der Knollenertrag signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Der Knollenertrag war zwischen 73,7% (AGN_67) und 98,4% (AGN_35) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Hierbei handelte es sich um eine durchschnittliche Erhöhung um 89,3%. In der Linie BGA_31 ist der Knollenertrag um 23,3% erhöht.

Somit lassen sich die Ergebnisse des Knollenertrags aus Gewächshausanzuchten auch in einer Beetanzucht bestätigen. In einem Erdbeet waren die Kartoffelpflanzen im Gegensatz zum Gewächshaus nicht in ihrem Knollenwachstum auf die Topfgröße limitiert. Die Pflanzen konnten sich in einem Erdbeet unterirdisch uneingeschränkt ausbreiten, was die Knollenentwicklung begünstigte, da das Gewicht der Knollen aus der Beetanzucht im Vergleich zur Gewächshausanzucht erhöht war. Außerdem konnte der Effekt des erhöhten Knollenertrages in der Beetanzucht zusätzlich um durchschnittlich 27,6% erhöht werden. Ob dieser positive Effekt durch eine nicht vorhandene Topflimitierung tatsächlich zu einer weiteren Steigerung des Knollenertrages führt, müsste in einer weiteren Beetanzucht untersucht werden.

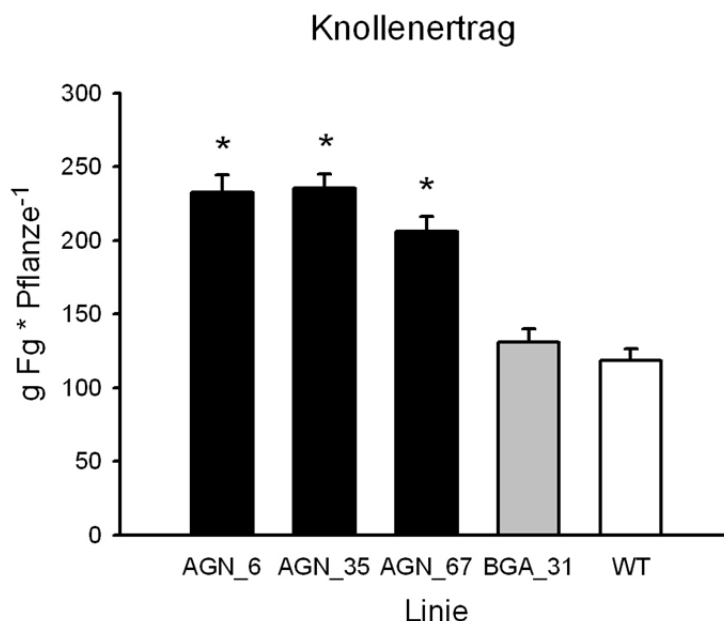


Abbildung 24: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen (WT) aus einer Beetanzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Die Mittelwerte sind aus n=6-10 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5.5 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Um zu untersuchen, ob der gesteigerte Knollenertrag in den AGN-Linien aus einer Beetanzucht auch einen gesteigerten Stärkegehalt in Kartoffelknollen zur Folge hat, wurde im Weiteren untersucht. Die Ergebnisse der Analysen des Stärkegehalts in Kartoffelknollen sind Abbildung 25 zu entnehmen. Es wird deutlich, dass der Stärkegehalt in allen AGN-Linien erhöht war. In den Linien AGN_35 und 67 war der Stärkegehalt signifikant um durchschnittlich 29,5% im Vergleich zum Wildtyp erhöht und in der Linie AGN_6 um 22,3%. In der Linie BGA_31 konnte eine Erhöhung um 11,5% erzielt werden.

Demnach konnte der Stärkegehalt in Kartoffelknollen in den drei AGN-Linien in einer Beetanzucht um durchschnittlich 27,1% erhöht werden, was zeigte, dass die AGN-Linien mehr Stärke in den Knollen akkumulieren konnten als Wildtyppflanzen. Vergleicht man diese durchschnittliche Erhöhung mit der aus den Gewächshausanzuchten (s. 3.1.4.9), so fällt auf, dass die Erhöhung in einer Beetanzucht um 19,8% geringer war als die aus Gewächshausanzuchten. Um diesbezüglich jedoch endgültige Schlussfolgerungen ableiten zu können, sind weitere Beetanzuchten notwendig.

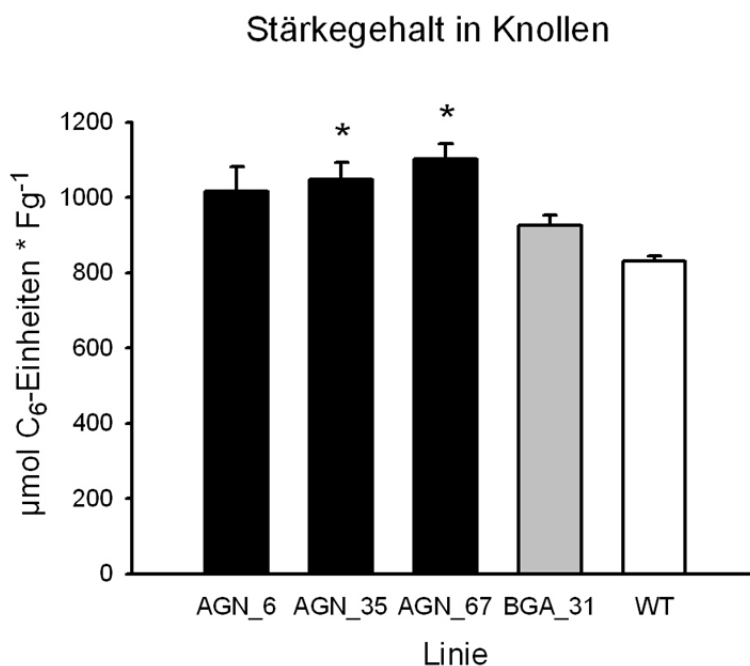


Abbildung 25: Stärkegehalte in Kartoffelknollen in µmol C₆-Einheiten pro g Frischgewicht (Fg) von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen aus einer Beetanzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=4-8 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5.6 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Abschließend wurde der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze ermittelt, der angibt, ob eine Ertragssteigerung vorliegt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt und wurden aus den Ergebnissen in 3.1.5.4 und 3.1.5.5 berechnet. Der Stärkeertrag pro Pflanze war in allen AGN-Linien signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Es handelte sich hierbei um eine durchschnittliche Erhöhung um den Faktor 2,5 in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp. In der Linie BGA_31 war der Stärkeertrag im Vergleich zum Wildtyp um Faktor 1,2 erhöht. Vergleicht man dies mit Ergebnissen aus Gewächshausanzuchten, wo eine durchschnittliche Erhöhung des Stärkeertrages von Kartoffelpflanzen pro Pflanze um Faktor 2,3 vorlag, dann sieht man eine ähnliche Steigerung der Stärkeerträge pro Pflanze. Die Ergebnisse der Beetanzucht zeigten, dass die AGN-Pflanzen einen eindeutig gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze aufweisen.

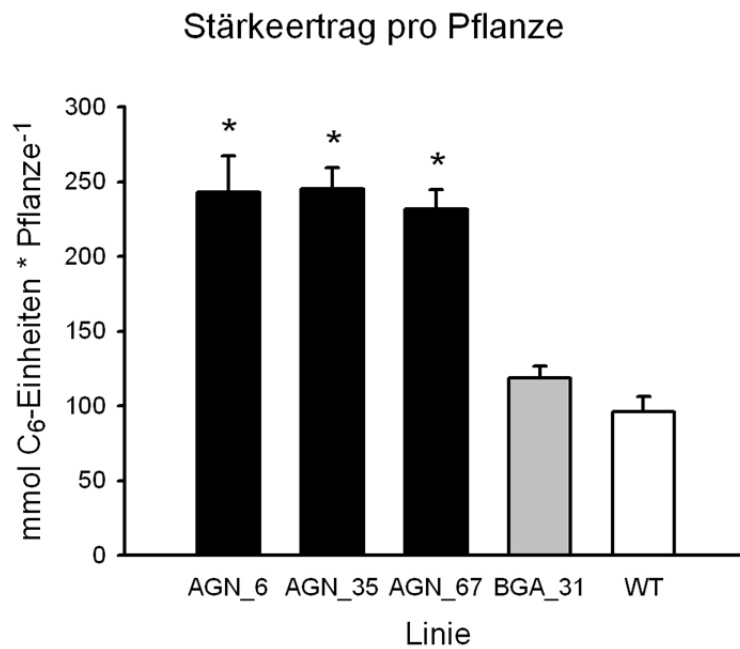


Abbildung 26: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C₆-Einheiten pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen in einer Beetanzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=4-8 Einzelwerten \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5.7 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Den Ergebnissen der Gewächshausanzuchten war bereits zu entnehmen, dass die gleichzeitige blattspezifische *StAGPase* Repression und knollenspezifische *PsGPT* und *AtNTT1* Überexpression keinen Einfluss auf den Gehalt an löslichen Zuckern in Kartoffelknollen hat (s. 3.1.4.11). Um zu analysieren, ob auch keine veränderten Zuckergehalte in Kartoffelknollen aus Beetanzuchten vorlagen, wurde der Gehalt an löslichen Zuckern bestimmt. Die Ergebnisse sind Abbildung 27 zu entnehmen. Wie bei den Gewächshausanzuchten konnten keine durchgängigen Änderungen der Zuckergehalte in Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden.

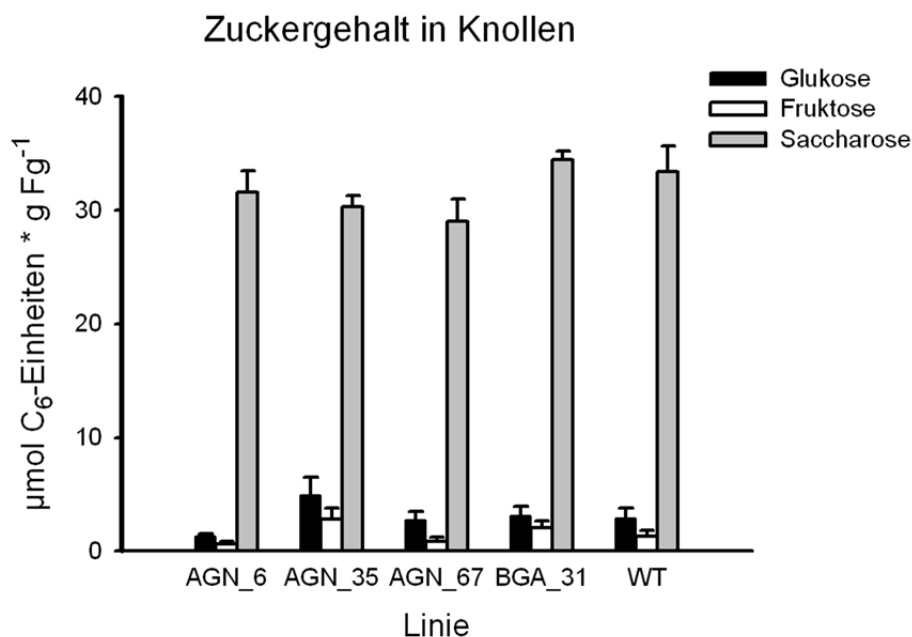


Abbildung 27: Zuckergehalt in Knollen von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Stärkegehalt ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche dargestellt. Die Mittelwerte der sind aus n=6-10 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.5.8 Amylosegehalte in Kartoffelknollen

Sowohl in den Gewächshausanzuchten als auch in der Beetzucht konnte gezeigt werden, dass die blattspezifische Repression der *StAGPase* und die gleichzeitige knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* einen starken Einfluss auf die Knollenentwicklung hat, was sich in einem erhöhten Stärkeertrag pro Pflanze äußert. Es stellt sich die Frage, ob dies auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Knollenstärke hat. Aus diesem Grund wurde das Amylose/Amylopektin-Verhältnis in Kartoffelknollen nach dem in 2.5.11 beschriebenen Protokoll ermittelt. Der Gehalt an Amylose in Knollen in % von der Stärke von AGN-, *BGA_31*- und Wildtyp-Pflanzen wurde bestimmt und die Ergebnisse in Abbildung 28 dargestellt. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass der Amylosegehalt der Knollenstärke in allen transgenen Linien erhöht war. In den AGN-Linien war der Gehalt signifikant um durchschnittlich 38,5% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Linie *BGA_31* konnte eine Erhöhung um 9,9% detektiert werden. In der Linie *BGA_31* konnte bereits in früheren Studien eine Steigerung des Amylosegehalts in Knollen im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Zhang et al., 2008), womit sich diese Ergebnisse bestätigen lassen.

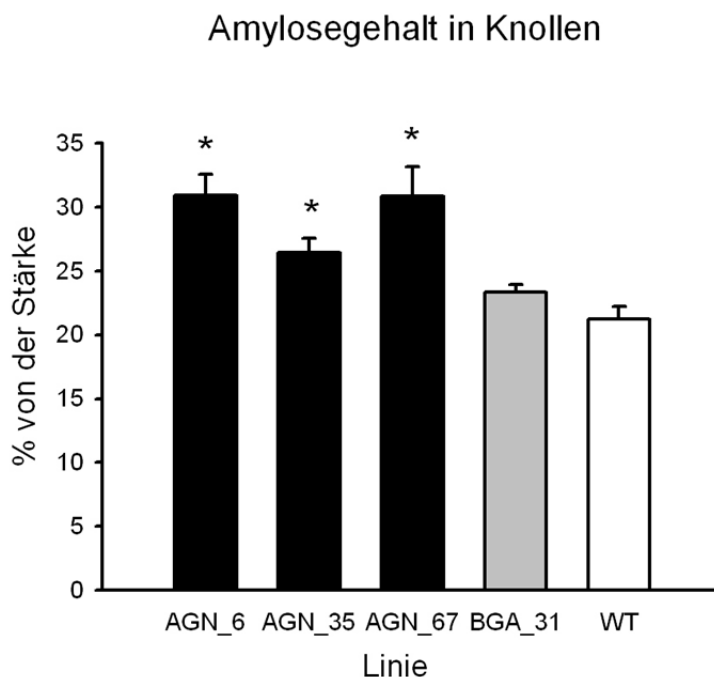


Abbildung 28: Amylosegehalt in Knollen von AGN- und BGA-31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Amylosegehalt ist in Prozent der Stärke dargestellt. Die Mittelwerte der sind aus $n=3$ Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.6 Die AGN-Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Die bereits präsentierten Analysen der AGN-Pflanzen aus Gewächshausanzuchten (s. 3.1.4) und aus einer Beetzucht (s. 3.1.5) haben gezeigt, dass die blattspezifische Repression der *StAGPase* und die gleichzeitige knollenspezifische Überexpression des *PsGPTs* und des *AtNTT1* zu starken phänotypischen Veränderungen in Kartoffelpflanzen führen, die von großer biotechnologischer Bedeutung sind. Diese Veränderungen äußerten sich zum einen in einer reduzierten *AGPase*-Aktivität (s. 3.1.3) und einem reduzierten Stärkegehalt in Blättern (s. 3.1.4.2 und 3.1.6.2) und zum anderen in einem deutlich erhöhten Knollenertrag (s. 3.1.4.8 und 3.1.5.4) und Stärkegehalt in Kartoffelknollen (s. 3.1.4.9 und 3.1.5.5).

Um diese Änderungen umfassender zu entschlüsseln, wurden die AGN-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht. Diese Analysen sollten hilfreich sein, um die Frage zu beantworten, ob die AGN-Pflanzen schon zu Beginn der Knollendifferenzierung einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Knollenertrag und Knollenstärkegehalt haben oder ob sich dieser erst in späteren Entwicklungsstadien äußert. Des Weiteren sollte die entwicklungsabhängige Analyse hilfreich sein, um Aussagen darüber machen zu können, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Knollenertrag zu Beginn und zum Ende der Knollenbildung in Bezug auf die *AGPase*-Aktivität und den Stärkegehalt in Blättern gibt.

Die Analyse der AGN-Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurde zweifach durchgeführt. In der Anzucht von September 2009 (09.09) wurde ein Untersuchungszeitraum von 8 bis 15 Wochen gewählt. In dem zweiten Anzuchtsbeispiel von Juli 2010 (07.10) wurde ein Untersuchungszeitraum von 10 bis 17 Wochen untersucht. Die Pflanzen wurden aus der Sterilkultur zeitlich versetzt ins Gewächshaus transferiert und dann zum selben Zeitpunkt geerntet, so dass die Bedingungen zum Erntezeitpunkt vergleichbar waren.

3.1.6.1 Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile

Die Gewichte der oberirdischen, grünen Pflanzenteile der AGN- und Wildtyppflanzen wurden in beiden entwicklungsabhängigen Anzuchten (09.09 und 07.10) analysiert und die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Pflanzen der September 2009 wurden nach 8, 9, 11, 13 und 15 Wochen Anzucht im Gewächshaus geerntet, und das Grüngewicht in g Frischgewicht pro Pflanze wurde bestimmt. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, traten in allen Entwicklungsstadien keine signifikanten Unterschiede in den AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Tendenz aus den Gewächshausanzuchten (s. 3.1.4.1) und der Beetanzucht (s. 3.1.5.1) in den AGN-Linien weniger Grüngewicht zu bilden, bestätigte sich hier nicht. Von der achten zur neunten Woche stieg das Grüngewicht durchschnittlich um den Faktor 8,3 sehr stark an. In der elften Woche blieb das Grüngewicht konstant und stieg bis zur 13. Woche durchschnittlich um den Faktor 1,6 an und blieb schließlich bis zur 15. Woche weitgehend konstant.

In der zweiten entwicklungsabhängigen Anzucht von Juli 2010 (07.10) wurden sechs Zeitpunkte in einem Zeitraum von acht Wochen analysiert. Die Pflanzen wurden nach 10, 11, 12, 13, 15 und 17 Wochen geerntet. Auch hier waren die Grüngewichte der AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verschieden. Nur in der AGN-Linie 35 war das Gewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile in Woche 15 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Da diese Beobachtung ansonsten jedoch nicht auftrat, kann sie vernachlässigt werden. Des Weiteren stieg das Grüngewicht von Woche 10 zu 11 durchschnittlich um den Faktor 1,9 an. Von Woche 11 zu 12 erfolgte ein weiterer durchschnittlicher Anstieg um den Faktor 2,0. Anschließend blieb das Grüngewicht in den folgenden Wochen 13, 15 und 17 konstant.

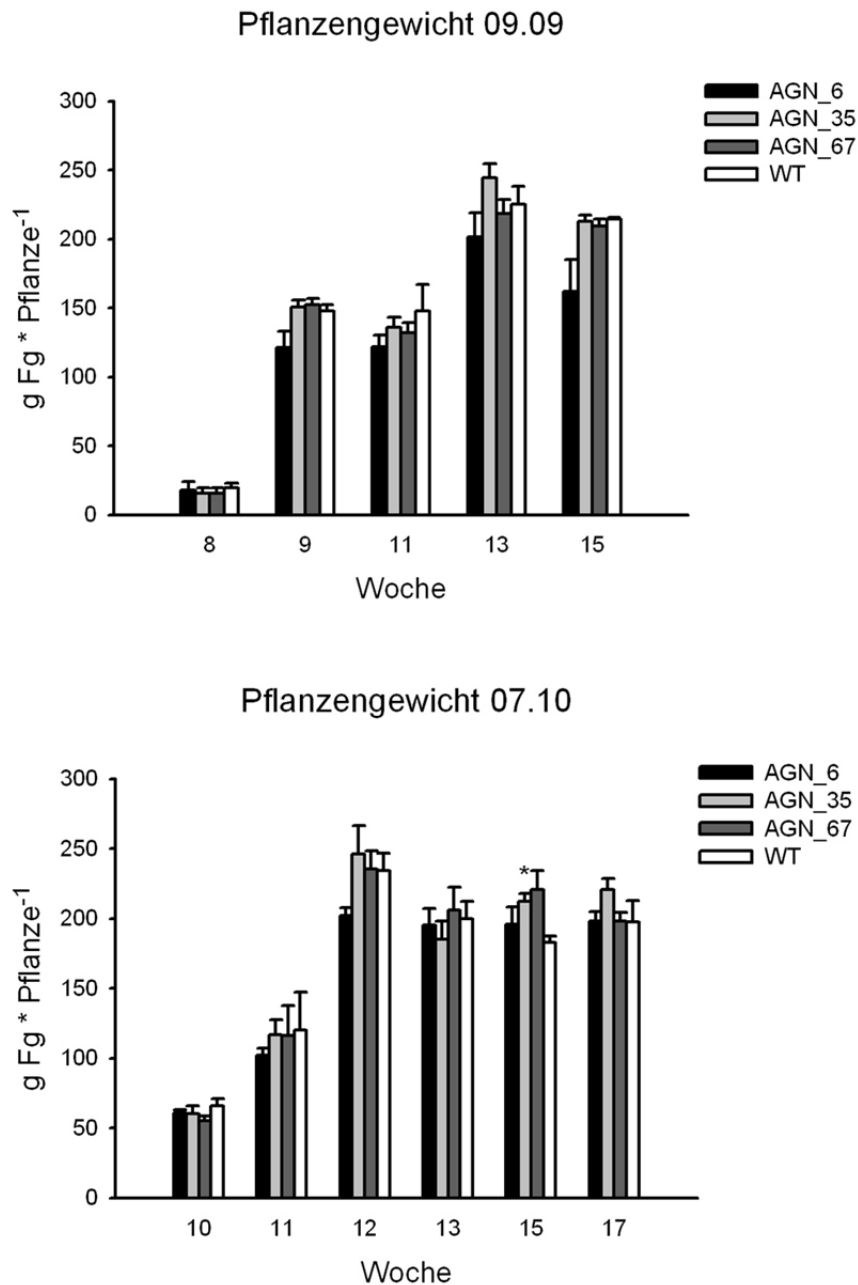


Abbildung 29: Gewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze in AGN- und Wildtyppflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus $n=3-4$ (Anzucht 09.09) und $n=3-5$ (Anzucht 07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.6.2 Stärkegehalte in Kartoffelblättern

Im Gewächshaus und Beet war der Stärkegehalt in Blättern von AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert (s. 3.1.4.2 und 3.1.5.2). Der Stärkegehalt in Blättern wurde auch in den beiden entwicklungsabhängigen Anzuchten vom September 2009 und Juli 2010 analysiert.

In der oberen Darstellung in Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Stärkemessungen in Blättern zu fünf unterschiedlichen Entwicklungsstadien der September 2009 Anzucht dargestellt. In frühen Entwicklungsstadien (Woche 8 und 9) trat der bereits beschriebene Phänotyp der AGN-Linien, weniger Blattstärke als der Wildtyp zu akkumulieren, nicht auf. Erst ab der elften Woche konnte in den AGN-Linien eine signifikante Verringerung festgestellt werden. Die Reduktion betrug im Vergleich zum Wildtyp 22,8%. In den folgenden Wochen 13 und 15 betrug die Verringerung im Vergleich zum Wildtyp 29,7 bzw. 22,7%. Diese Ergebnisse konnten in der zweiten entwicklungsabhängigen Anzucht vom Juli 2010 bestätigt werden (Abbildung 30). In frühen Entwicklungsstadien (Woche 10 und 11) waren die Stärkegehalte in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen ähnlich. Ab der zwölften Woche war eine Differenz zwischen Wildtyp und den AGN-Linien zu erkennen. Der Stärkegehalt war um 15,3% verringert. Der Effekt verstärkte sich in späteren Entwicklungsstufen. In Woche 13 betrug die Reduktion durchschnittlich 35,6%, in Woche 15 43,8% und in Woche 17 38,1%. Nun stellt sich die Frage, ob diese entwicklungsabhängige Differenz des Stärkegehalts in Blättern auf eine Reduktion oder Steigerung des Stärkegehalts in AGN- oder Wildtyppflanzen zurückzuführen war. Betrachtet man diesbezüglich beide entwicklungsabhängigen Analysen, so fällt auf, dass der Stärkegehalt in den AGN-Linien zu späteren Entwicklungszeitpunkten tendenziell fiel und in den Wildtyppflanzen anstieg.

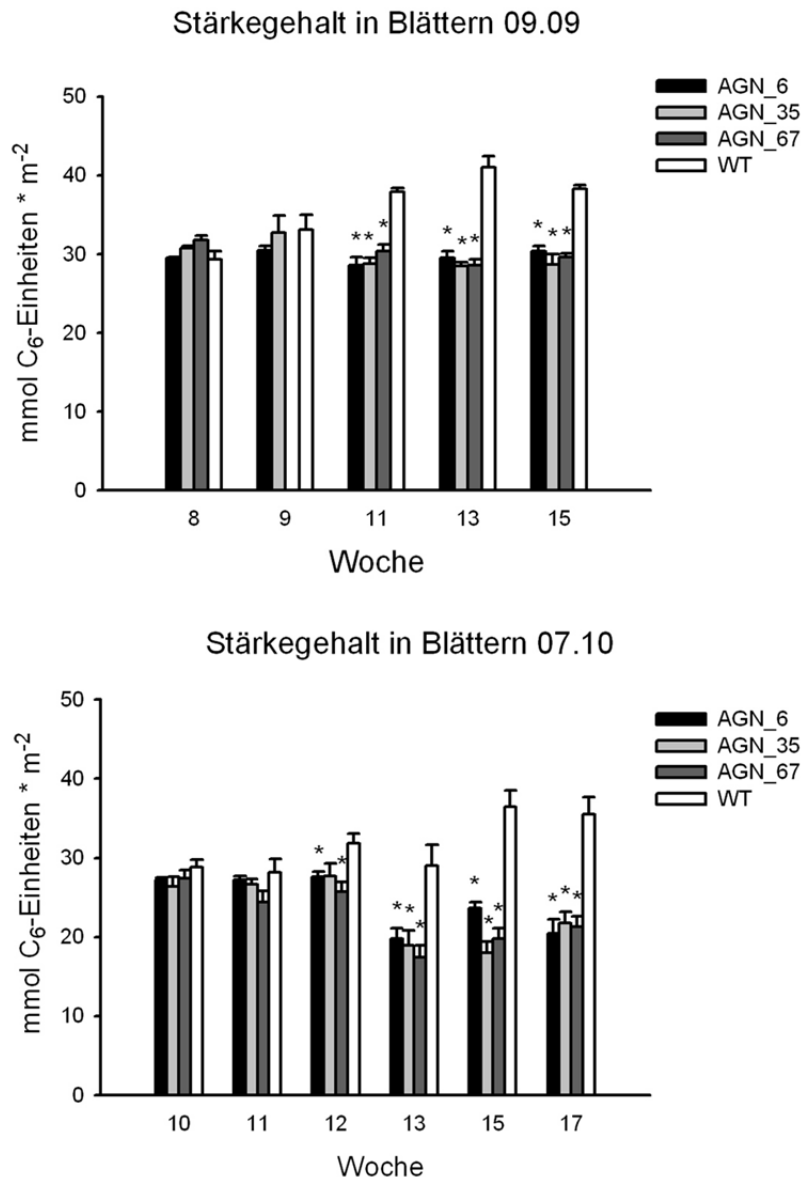


Abbildung 30: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten in mmol C₆-Einheiten pro m².

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus n=3-4 (Anzucht 09.09) und n=3-5 (Anzucht 07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.6.3 Zuckergehalte in Kartoffelblättern

In bisherigen Analysen waren die Gehalte der löslichen Zuckern Glukose, Fruktose und Saccharose in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen ähnlich. Um zu überprüfen, ob in den verschiedenen Entwicklungsstadien irgendwelche Auffälligkeiten auftreten, wurde der Zuckergehalt in Blättern gemessen.

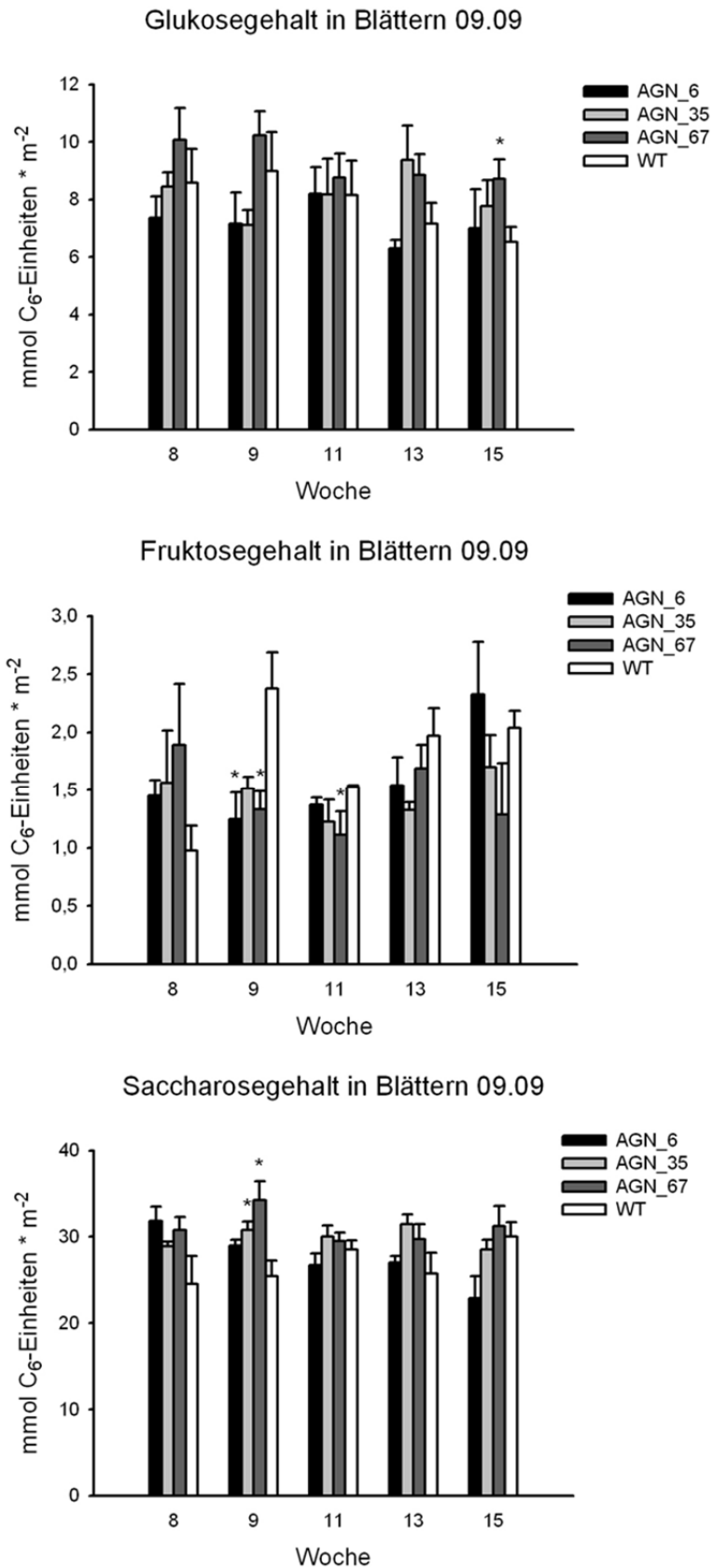


Abbildung 31: Zuckergehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus $n=3-4$ Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

Die Gehalte der löslichen Blattzucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien der Anzucht vom September 2009 analysiert und die Ergebnisse in Abbildung 31 dargestellt. Der Glukosegehalt war zu allen Zeitpunkten in AGN- und Wildtyppflanzen annähernd gleich und es traten bis auf Linie AGN_67, Woche 15 keine signifikanten Veränderungen auf. Auch der Gehalt an Fruktose in den AGN-Linien ähnelte den Werten des Wildtyps. Nur in Woche 9 und 11 traten drei signifikante Veränderungen auf (AGN_6 und _67 Woche 9 und AGN_67 Woche 11). Auch die Analyse der Saccharosegehalte in Blättern zeigte in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ähnliche Ergebnisse. Nur in Woche 9 war der Gehalt in den Linien AGN_35 und _67 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass die Akkumulation löslicher Zucker in den verschiedenen AGN-Linien zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp zeigen.

3.1.6.4 AGPase-Aktivitätsmessungen in Kartoffelblättern

Es konnte bereits gezeigt werden, dass aufgrund der herunterregulierten Transkripte des *StAGPaseB* Gens die AGPase Aktivität in Blättern verringert war (s. 3.1.3). Nun sollte überprüft werden, ob die AGPase-Aktivität in allen Entwicklungsstadien reduziert ist. Aus diesem Grund wurde die AGPase-Aktivität in Blättern in der entwicklungsabhängigen Anzucht vom September 2009 und Juli 2010 gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Betrachtet man die Ergebnisse der Anzucht von September 2009, so fällt auf, dass die AGPase-Aktivität in den Wochen 11, 13 und 15 in den AGN-Linien signifikant im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. In Woche 11 betrug die Reduktion durchschnittlich 27,8%, in Woche 13 22,7% und in Woche 15 27,2%. In Woche 9 zeigten die AGN-Linien zwar auch eine verringerte AGPase-Aktivität in Blättern, es handelte sich hierbei jedoch nicht um eine signifikante Veränderung. Die Aktivitätsanalysen der Juli 2010 Anzucht bestätigten diese Ergebnisse. In den Wochen 13, 15 und 17 war die AGPase-Aktivität in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. In Woche 13 war die Aktivität um 36,2% reduziert und in Woche 15 bzw. 17 um 39,7 bzw. 34,5%. In Woche 11 und 12 zeigten die AGN-Linien zwar ebenfalls eine verringerte AGPase-Aktivität, die jedoch im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant war.

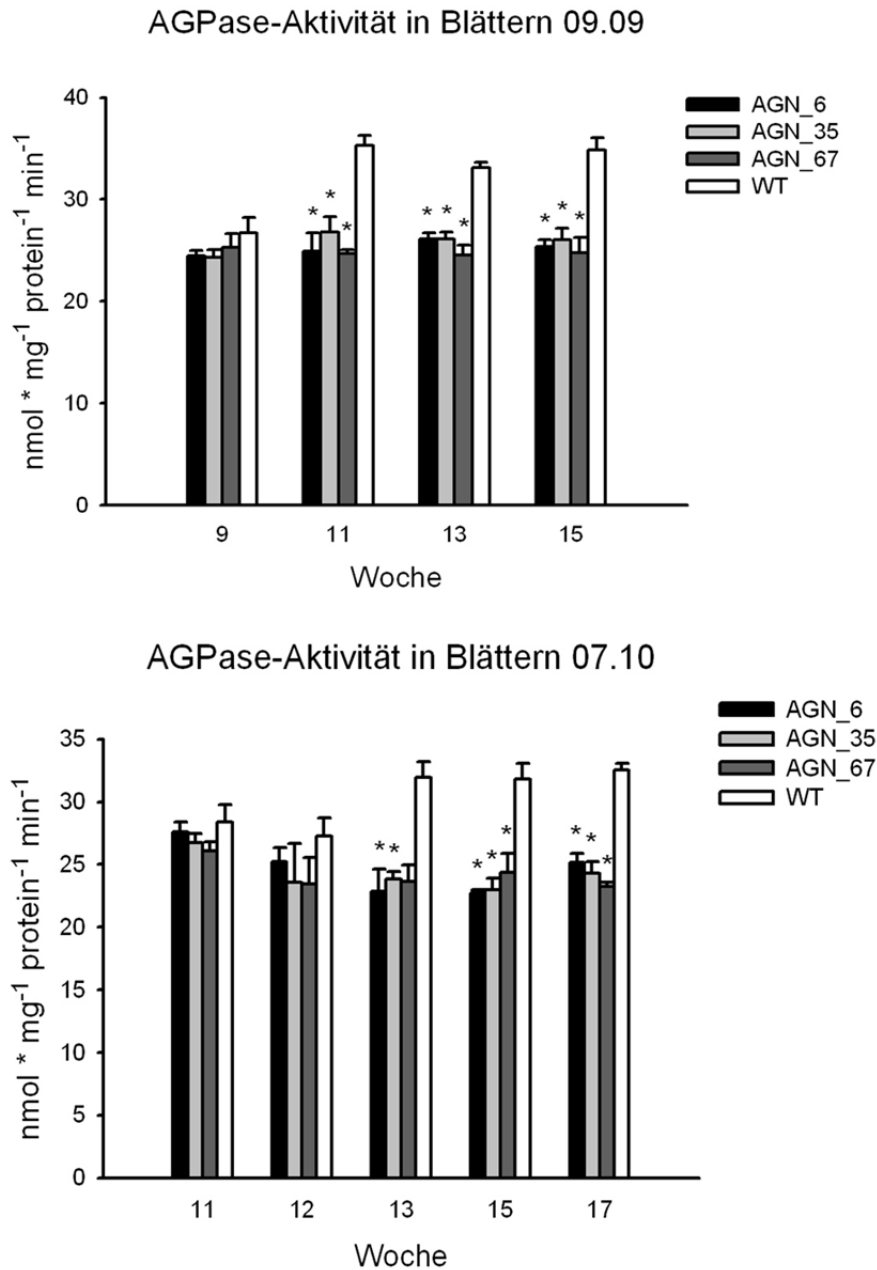


Abbildung 32: AGPase-Aktivität in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus n=3-4 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.6.5 Ertragsanalysen der Kartoffelknollen

In den bereits dargestellten Gewächshausanzuchten und der Beetanzucht konnte gezeigt werden, dass die Generation der AGN-Pflanzen von biotechnologischer Bedeutung sein könnte, da der Knollenertrag im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht war (s. 3.1.4.8 und 3.1.5.4). Um diese dreifach transgenen Kartoffelpflanzen genauer charakterisieren zu können, ist es interessant, das Knollenwachstum der AGN-Pflanzen im Vergleich zum

Wildtyp näher zu untersuchen. Die Knollenerträge der Anzucht von September 2009 (09.09) und Juli 2010 (07.10) sind in Abbildung 33 zusammengestellt. In der Anzucht 09.09 bildeten die Kartoffelpflanzen in Woche 8 und 9 keine Knollen. Sie zeigten nur verdickte Stolone, was erste Anzeichen für die Knollenbildung sind. In Woche 11 konnten erste Knollen geerntet werden, es zeigten sich jedoch bis auf Linie AGN_67 keine signifikanten Erhöhungen im Vergleich zum Wildtyp. In den folgenden zwei Wochen setzte das Knollenwachstum stark ein und stieg verglichen mit Woche 11 von durchschnittlich 11,3 auf 103,2 g Frischgewicht pro Pflanze an. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt war der Knollenertrag bis zu 53,9% (AGN_6) und durchschnittlich um 48,5% erhöht. Bis zur Woche 15 stieg der Knollertrag weiter an. Der Ertrag war zu diesem Zeitpunkt bis zu 71,2% (AGN_6) und durchschnittlich um 66,0% signifikant erhöht. Auch in der zweiten entwicklungsabhängigen Anzucht von Juli 2010 konnten diese Resultate bestätigt werden. In den Wochen 10 bis 12 konnten noch keine Knollen geerntet werden. In der 13. Woche waren die geringen Knollenerträge der bereits vorhandenen AGN-Knollen verglichen mit den Wildtypknollen nicht erhöht. Bis zu Woche 15 stieg das Knollenwachstum deutlich von 9,4 auf 106,0 g Frischgewicht pro Pflanze an. In Woche 15 war der Knollenertrag in den AGN-Linien um durchschnittlich 72,3% erhöht. Bis Woche 17 stieg der Knollenertrag weiter an und war in den AGN-Linien verglichen mit dem Wildtyp um 93,0% erhöht.

Fasst man die Ergebnisse der Knollenerträge der verschiedenen Entwicklungsphasen zusammen, so fällt auf, dass das Knollenwachstum erst nach 11 bis 13 Wochen Anzucht im Gewächshaus begann. In frühen Entwicklungsstadien konnten zwischen den AGN- und Wildtyppflanzen keine Unterschiede detektiert werden. Erst nach 13 bis 15 Wochen Anzucht im Gewächshaus wurden deutlich höhere Knollenerträge in den AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Diese konnten in der weiteren Entwicklung weiter gesteigert werden. Vergleicht man die Knollenerträge in den unterschiedlichen Entwicklungsphasen mit den Stärkegehalten in Blättern, so fällt auf, dass der Stärkegehalt in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp erst dann reduziert war, wenn auch Knollen vorhanden waren. Damit gibt es einen Zusammenhang zwischen der Stärkesynthese in den Blättern und der Knollenentwicklung.

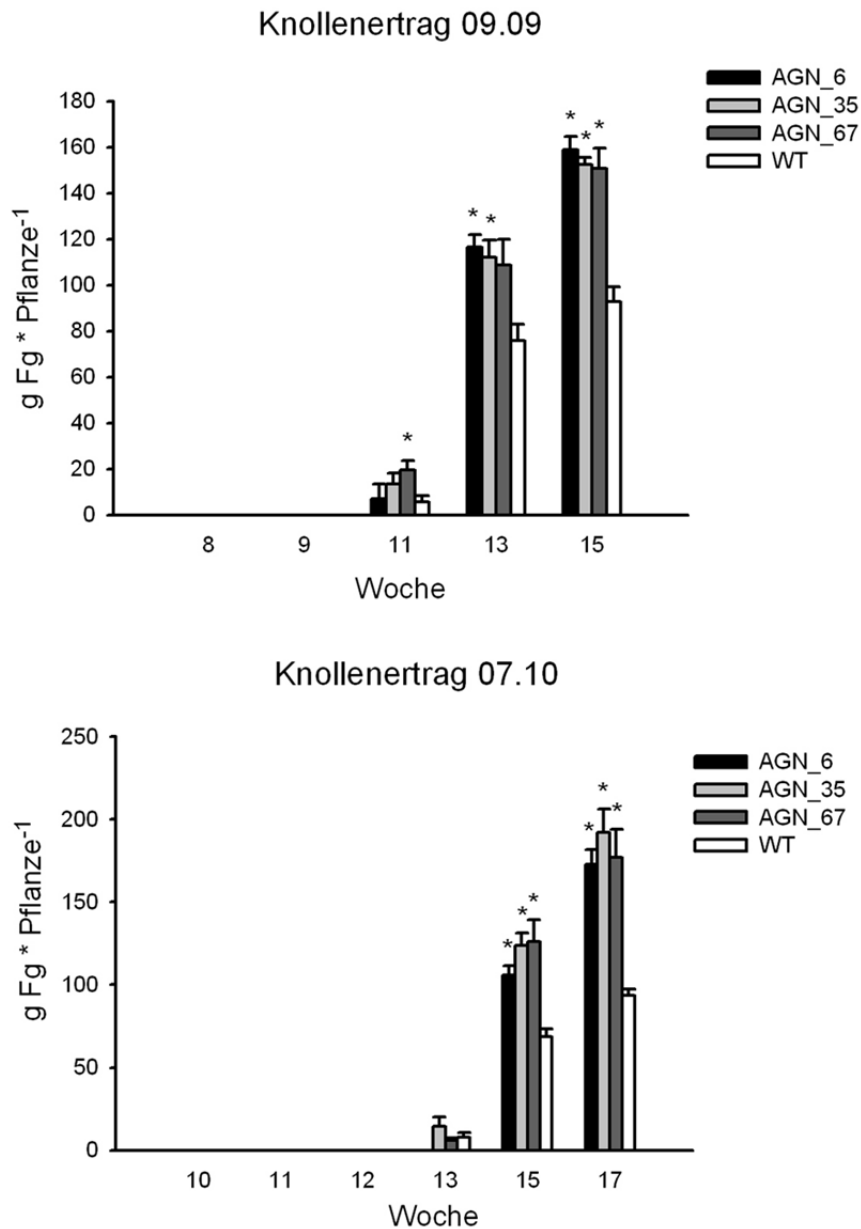


Abbildung 33: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus n=3-4 (Anzucht 09.09) und n=3-5 (Anzucht 07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.6.6 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Um festzustellen, ob der Stärkegehalt in Kartoffelknollen in AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlich ist, wurden diese gemessen. Die Resultate zweier entwicklungsabhängiger Anzuchten (09.09 und 07.10) sind in Abbildung 34 dargestellt.

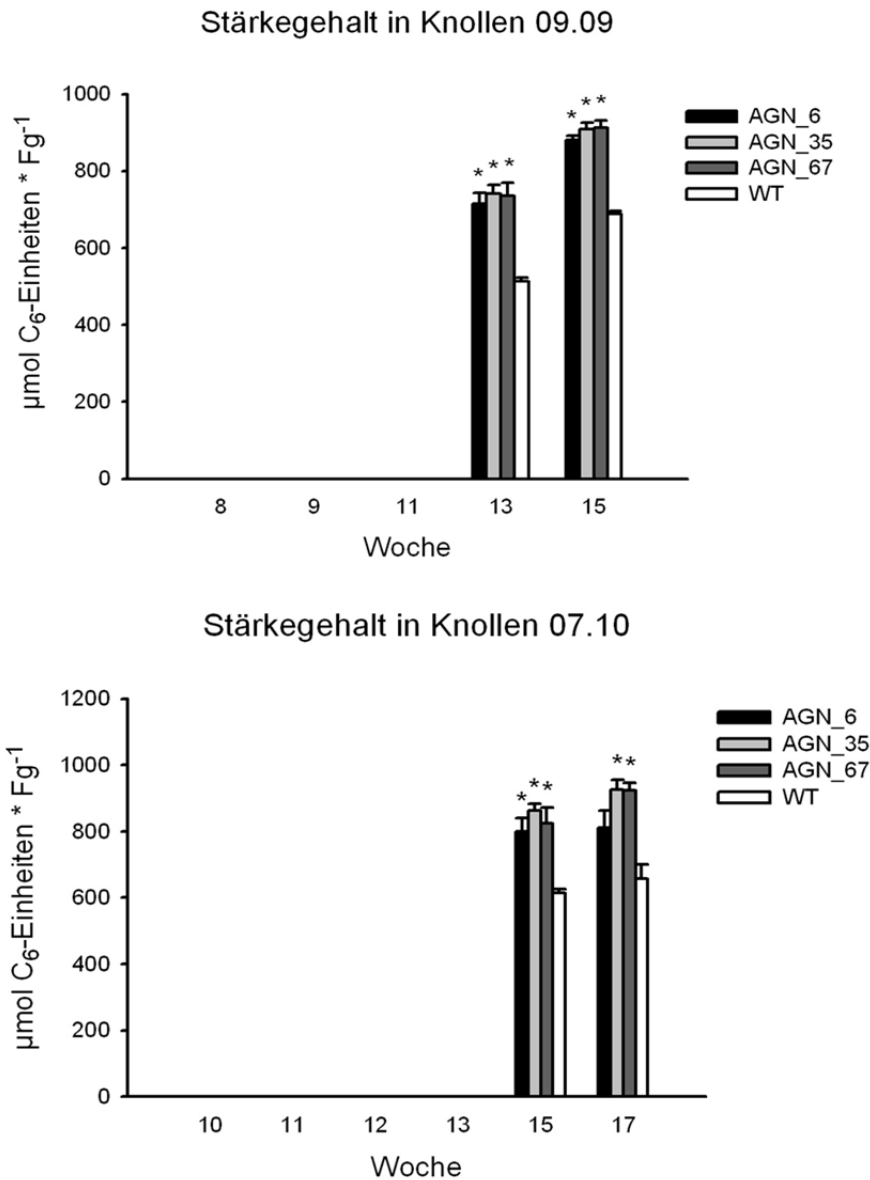


Abbildung 34: Stärkegehalt in Knollen von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus $n=3-4$ (Anzucht 09.09) und $n=3-5$ (Anzucht 07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass der Stärkegehalt in Kartoffelknollen von AGN-Pflanzen zu allen Zeitpunkten im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. In der Anzucht von September 2009 war der Stärkegehalt der AGN-Linien in Woche 13 um durchschnittlich 30,8% erhöht. Dieser Effekt wurde in Woche 15 weiter gesteigert. Dann betrug die durchschnittliche Erhöhung in den AGN-Linien 42,2%. In der Anzucht Juli 2010 sah man eine tendenzielle Steigerung des Stärkegehalts von Woche 15 zu 17. Der Stärkegehalt war in den AGN-Linien in Woche 17 um 34,8% im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

3.1.6.7 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Abschließend wurde der Stärkeertrag aus den bereits dargestellten Ergebnissen des Knollenertrages (s.3.1.6.5) und des Stärkegehalts in Knollen (s. 3.1.5.6) berechnet. Die Ergebnisse des Stärkeertrages zweier entwicklungsabhängiger Analysen (09.09 und 07.10) sind in Abbildung 35 zusammengefasst. Der Stärkeertrag war in beiden entwicklungsabhängigen Anzuchten in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der September 2009 Anzucht war der Stärkeertrag in Woche 13 in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1,9 erhöht. Bis Woche 15 stieg der Stärkeertrag weiter an und war in den AGN-Linien um Faktor 2,1 erhöht. Diese Ergebnisse konnten in der entwicklungsabhängigen Anzucht von Juli 2010 bestätigt werden. In Woche 15 war der Stärkeertrag in den AGN-Linien durchschnittlich um den Faktor 2,5 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Diese Erhöhung wurde in Woche 17 weiter gesteigert und der Stärkeertrag war um den Faktor 3,0 erhöht.

3.1.6.8 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Um mögliche Auswirkungen des gesteigerten Stärkeertrages auf den Gehalt an löslichen Zuckern in Knollen von AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp festzustellen, wurde der Zuckergehalt in einer entwicklungsabhängigen Anzucht analysiert. Die Ergebnisse der Zuckergehalte in Knollen der entwicklungsabhängigen Anzucht von September 2009 sind in Abbildung 36 dargestellt. Der Glukosegehalt in Knollen von AGN-Linien war zu beiden untersuchten Zeitpunkten (Woche 13 und 15) mit dem Wildtyp ähnlich. Diese Beobachtung bestätigte sich auch für den Saccharosegehalt in Knollen. Der Fruktosegehalt war in beiden untersuchten Wochen in den AGN-Linien verringert. In Woche 13 handelte es sich um signifikante Änderungen, was jedoch in Woche 15 nicht bestätigt wurde.

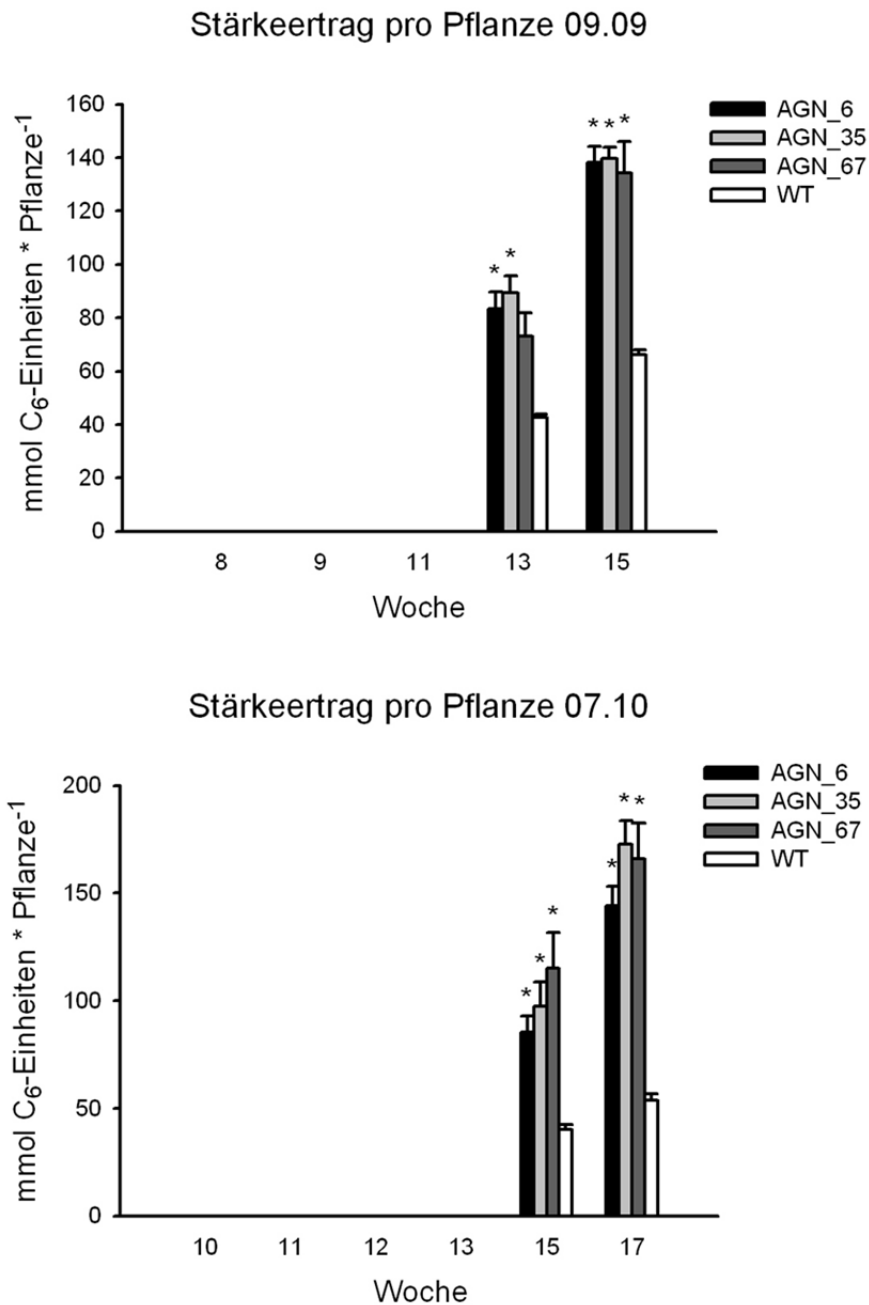


Abbildung 35: Stärkeertrag pro Pflanze von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus $n=3-4$ (Anzucht 09.09) und $n=3-5$ (Anzucht 07.10) Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

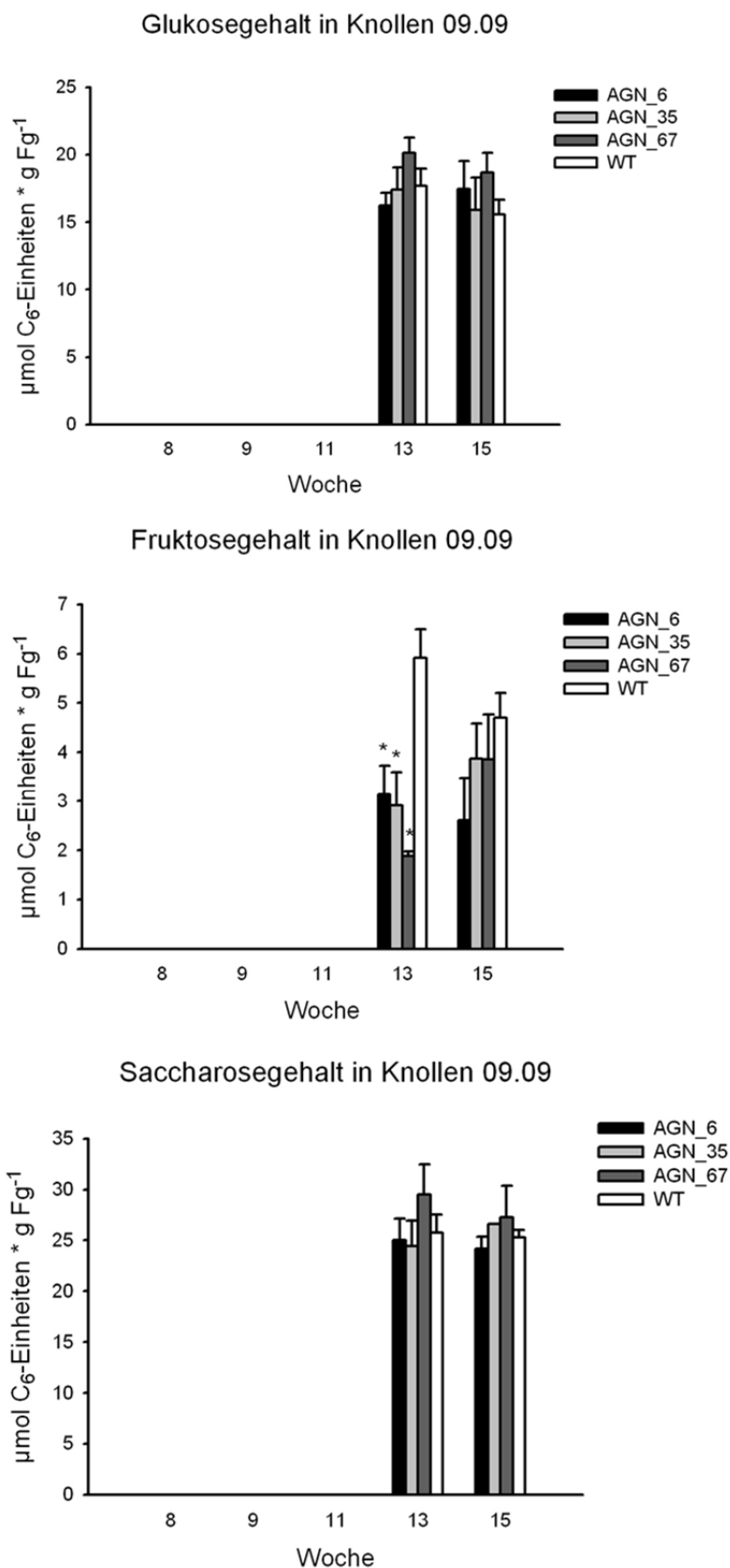


Abbildung 36: Zuckergehalt in Knollen von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die Mittelwerte sind aus n=3-4 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.7 Die AGN-Pflanzen im 24-h-Verlauf

Die Analyse der AGN-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien hat gezeigt, dass die Stärkeakkumulation in Blättern von AGN-Pflanzen entwicklungsabhängig ist und sich in unterschiedlichen Wachstumsphasen vom Wildtyp unterscheidet. Aus diesem Grund ist es interessant zu analysieren, ob bereits in einem Zeitraum von 24 Stunden Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten sind. Der Stärke- und Zuckergehalt und die AGPase-Aktivität wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden in AGN- und Wildtyppflanzen analysiert. Die Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt 11 (Juni 2010, 07.10) bzw. 16 (November 2010, 11.10) Wochen im Gewächshaus.

3.1.7.1 Stärkegehalte in Blättern

Die Stärkegehalte in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen wurden über einem Zeitraum von 24 Stunden analysiert, um zu überprüfen, ob die Stärkeakkumulation in Blättern von AGN-Pflanzen im Laufe eines Tages vom Wildtyp verschieden ist. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Analysen (07.10 und 11.10) sind in Abbildung 37 zusammengestellt. In der Anzucht vom Juli 2010 wurden die Proben um 16 und 21 Uhr am ersten Untersuchungstag und um 9, 12 und 16 Uhr am zweiten Untersuchungstag genommen. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass der Stärkegehalt in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp am ersten Untersuchungstag um 16 Uhr um durchschnittlich 28,1% reduziert war. Dies blieb bis 21 Uhr konstant, dann war der Stärkegehalt um durchschnittlich 25,7% verringert. Am nächsten Untersuchungstag um 9 Uhr war der Stärkegehalt sowohl in den Blättern der AGN- als auch der Wildtyppflanzen deutlich geringer als am Vortag. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Differenz zwischen den AGN-Linien und dem Wildtyp durchschnittlich 18,2%. Bis 12 Uhr am gleichen Tag stieg der Stärkegehalt wieder auf seine ursprüngliche Höhe an und die Differenz zwischen transgenen Linien und Wildtyp betrug durchschnittlich 27,6%. Die Stärkegehalte blieben bis 16 Uhr weitgehend konstant.

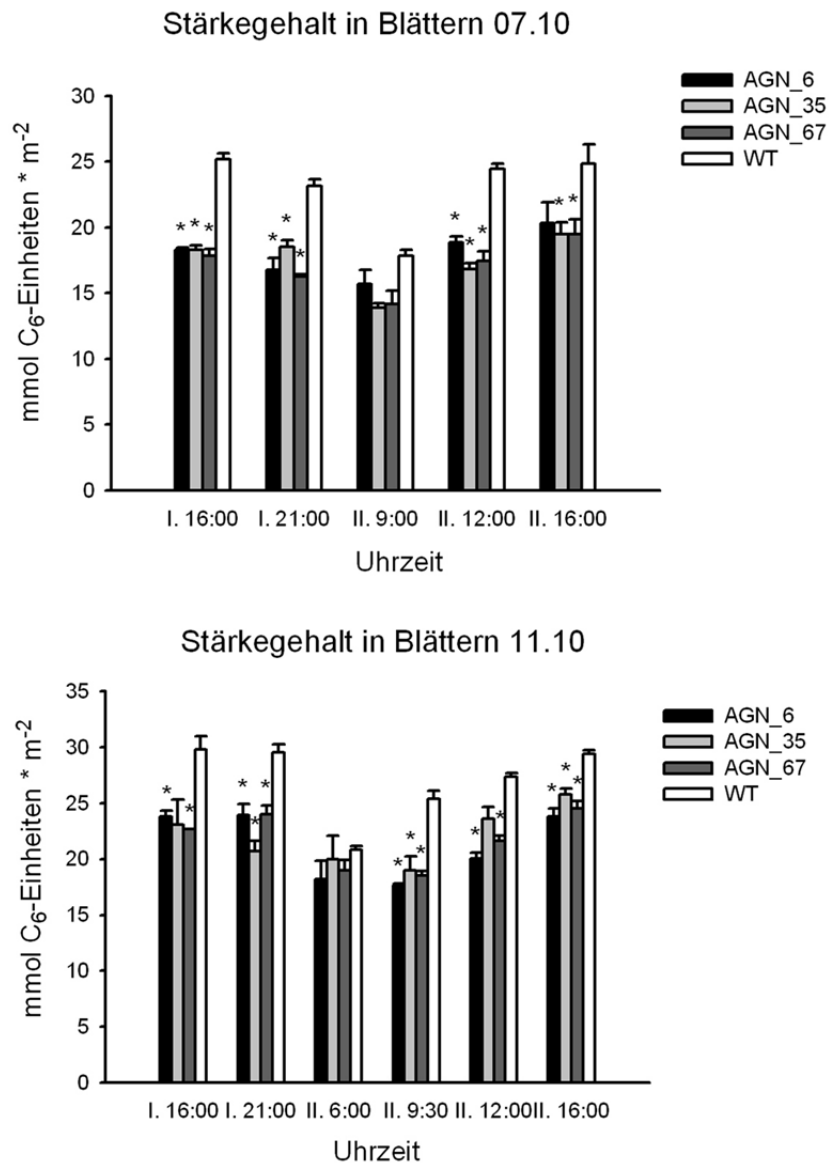


Abbildung 37: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einem Zeitraum von 24 Stunden von zwei Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. I: erster Untersuchungstag; II: zweiter Untersuchungstag. Die Mittelwerte sind aus $n=3$ Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

In einer zweiten Analyse (11.10) wurden Blattproben um 16 und 21 Uhr am ersten Versuchstag und 6, 9.30, 12 und 16 Uhr am zweiten Versuchstag genommen (s. Abbildung 37). Der bereits beschriebene Verlauf der Stärkeakkumulation in Blättern von AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einem Zeitraum von 24 Stunden wurde in der zweiten Analyse vom November 2010 erneut bestätigt. Auch hier war die Stärkeakkumulation am ersten Versuchstag konstant. Die Reduktion der Stärkegehalte in den Blättern von AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp betrug um 16 und 21 Uhr 22%. Am zweiten Versuchstag wurden zusätzlich um 6 Uhr Proben genommen, um Aussagen über die Stärkeakkumulation am Ende der Nacht machen zu können. Es wurde deutlich, dass die

Stärke in Blättern sowohl von AGN- als auch von Wildtyppflanzen teilweise über Nacht abgebaut wurde und mit Anbruch des Tages wieder kontinuierlich anstieg. Am Ende der Nacht wurden keine signifikanten Unterschiede in den AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt; es war nur die Tendenz zu beobachten, dass die transgenen Linien weniger Blattstärke akkumulierten. Ab 9:30 Uhr handelte es sich bei den Verringerungen um signifikante Veränderungen. Um 9:30 Uhr akkumulierten die AGN-Pflanzen im Schnitt 27,5% weniger Stärke und um 12 bzw. 16 Uhr durchschnittlich 20,4 bzw. 15,9%.

Die Analyse der Stärkeakkumulation in Blättern über einem Zeitraum von 24 Stunden zeigte, dass der Stärkegehalt sowohl in den AGN-Linien als auch im Wildtyp über die Nacht abnahm und im Laufe des nächsten Vormittages wieder ihr Ursprungslevel erreichte. Die Änderungen waren beim Wildtyp stärker ausgeprägt, als bei den AGN-Pflanzen.

3.1.7.2 Zuckergehalte in Blättern

Die Gehalte der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurden in den AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht, um Aussagen über eine eventuell veränderte Zuckerakkumulation machen zu können. Da die Blattzuckerakkumulation in den vorherigen Analysen in den AGN-Pflanzen mit dem Wildtyp vergleichbar war (s. 3.1.6.3), erfolgte die Zuckeranalyse nur in einer Anzucht. Die Proben wurden um 16 und 21 Uhr am ersten Versuchstag und 9, 12 und 16 Uhr am zweiten Versuchstag genommen. Die Ergebnisse des 24-h-Verlauf der Anzucht von Juli 2010 (07.10) sind in Abbildung 38 zusammengestellt. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Akkumulation der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose über einen Zeitraum von 24 Stunden ähnlich war. Sowohl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten als auch im Vergleich zum Wildtyp verlief die Blattzuckerakkumulation in den AGN-Pflanzen gleichbleibend. Lediglich um 21 Uhr am ersten Versuchstag war der Glukosegehalt in der Linie AGN_67 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Da diese Veränderung jedoch zu anderen Zeitpunkten nicht auftrat, wurde ihr keine besondere Bedeutung beigemessen.

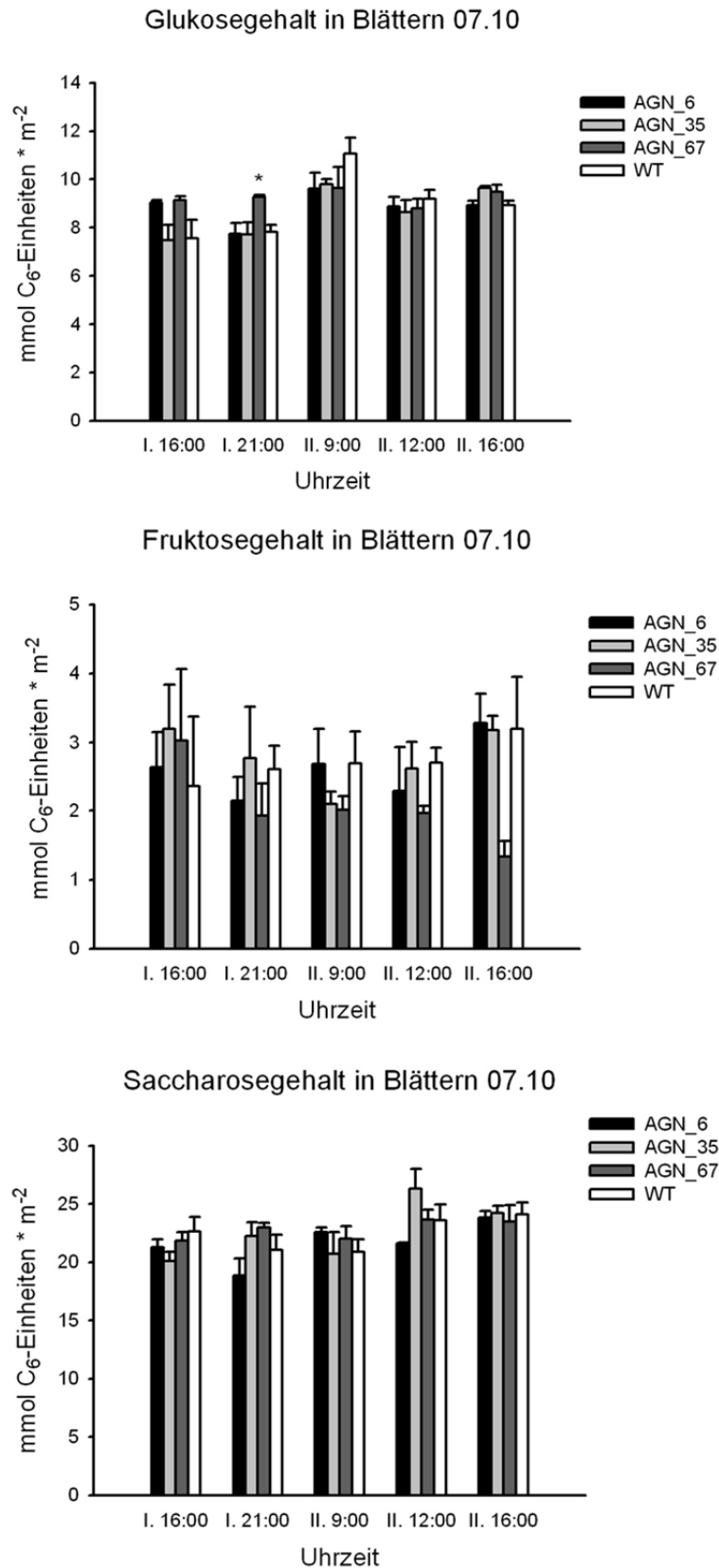


Abbildung 38: Gehalte löslicher Zucker in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen im 24-h-Verlauf.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. I: erster Untersuchungstag; II: zweiter Untersuchungstag. Die Mittelwerte sind aus $n=3$ Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.7.3 AGPase-Aktivität in Blättern

Um die zu- bzw. abnehmende Stärkeakkumulation in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen im Tagesverlauf zu erklären, wurde die AGPase-Aktivität bestimmt. Die Proben wurden am ersten Versuchstag um 16 und 21 Uhr und am zweiten Versuchstag um 6, 9:30 und 16 Uhr der Anzucht November 2010 genommen. Die Resultate sind Abbildung 39 zu entnehmen. Es zeigte sich ein zur Stärkeakkumulation (s. 3.1.7.1) vergleichbarer Aktivitätsverlauf der AGPase zu den einzelnen Zeitpunkten. Am ersten Untersuchungstag waren die Aktivitäten weitgehend konstant. In den AGN-Linien war die AGPase-Aktivität um 16 und 21 Uhr um durchschnittlich 25,7% im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. Am nächsten Versuchstag sank die AGPase-Aktivität sowohl in den Transgenen als auch im Wildtyp. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Differenz im Mittel 21,5%. Anschließend stieg die AGPase-Aktivität bis 16 Uhr sowohl in den AGN-Linien als auch im Wildtyp kontinuierlich an und erreichte ihr Ausgangslevel.

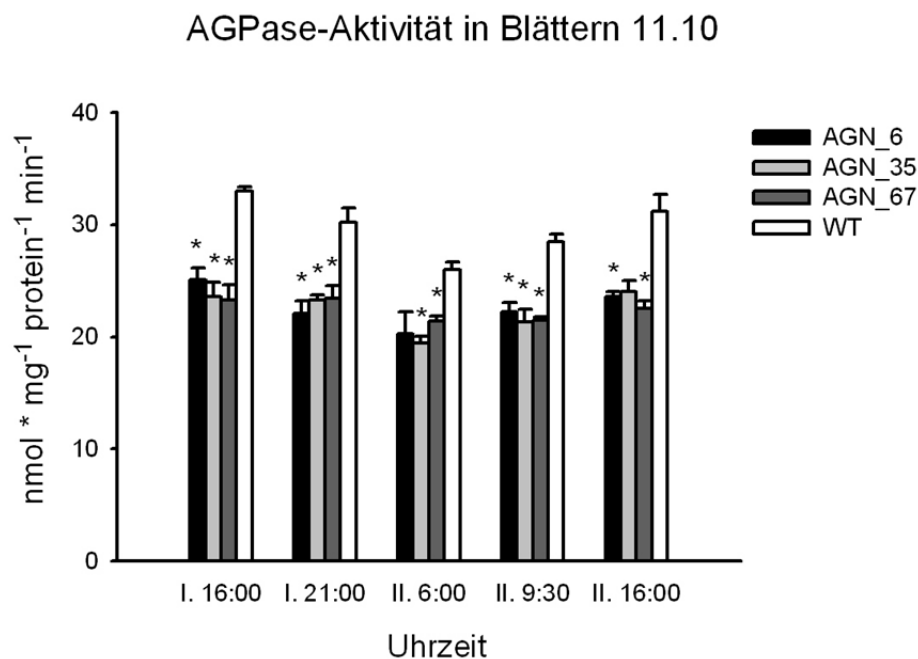


Abbildung 39: AGPase-Aktivität in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einem Zeitraum von 24 Stunden.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AfNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. I: erster Untersuchungstag; II: zweiter Untersuchungstag. Die Mittelwerte sind aus n=3 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.1.8 Die AGN-Pflanzen in einer verlängerten Dunkelphase

Die AGN-Pflanzen lassen sich durch einen erhöhten Stärkeertrag pro Pflanze charakterisieren, was von großer biotechnologischer Bedeutung sein könnte. Nun bleibt die Frage offen, ob diese Pflanzen irgendwelche Nachteile im Vergleich zum Wildtyp haben. Bisher konnte nur tendenziell gezeigt werden, dass die AGN-Pflanzen ein geringeres Gewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile aufweisen, was jedoch nicht in allen Anzuchten bestätigt wurde (s. 3.1.4.1, 3.1.5.1 und 3.1.6.1). Es wäre möglich, dass die transgenen Pflanzen in einer verlängerten Dunkelperiode früher eingehen, da sie durch einen verringerten Stärkegehalt in Blättern typisiert wurden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die AGN- und die Wildtyppflanzen in eine Dunkelkammer gestellt, wo ihnen zu verschiedenen Zeitpunkten Blattproben entnommen wurden, in denen die Stärke- und Zuckergehalte ermittelt wurden.

3.1.8.1 Stärkegehalte in Blättern

Die Stärkegehalte in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen wurden in einer verlängerten Dunkelphase zu bestimmten Zeitpunkten untersucht. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Analysen von Juli 2010 (07.10) und November 2010 (11.10) sind in Abbildung 40 dargestellt. Von der Anzucht 07.10 wurden Blattproben um 16 und 21 Uhr am ersten Untersuchungstag und um 9, 12 und 16 Uhr am zweiten Untersuchungstag genommen. Um 21 Uhr wurden die Pflanzen aus dem Gewächshaus bis zum Versuchsende in Dunkelkammern transferiert, um eine verlängerte Nacht zu simulieren. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Stärkeakkumulation am ersten Versuchstag sowohl in den AGN-Linien als auch im Wildtyp konstant war. Der Stärkegehalt in den AGN-Linien war im Vergleich zum Wildtyp zu beiden Zeitpunkten um durchschnittlich 18,7% reduziert. Zum nachfolgenden Untersuchungszeitpunkt am nächsten Versuchstag war der Stärkegehalt in den AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp erheblich gesunken. Die Differenz zum Wildtyp betrug zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 65,0%. Bis 12 Uhr sank der Stärkegehalt in den AGN-Linien weiter, die Abweichung war jedoch nicht so stark, wie von 21 Uhr erster Versuchstag zu 9 Uhr zweiter Versuchstag. Betrachtet man die Stärkeakkumulation am letzten Untersuchungszeitpunkt um 16 Uhr, so war die Stärkeakkumulation sowohl in den AGN-Linien als auch im Wildtyp stetig gesunken. Der Stärkegehalt war von durchschnittlich 21,7 um 16 Uhr am ersten Untersuchungstag auf 1,6 mmol C₆-Einheiten pro m² am zweiten Untersuchungstag um 16 Uhr gesunken. Dies war eine Reduktion um im Mittel 92,7% über einen Zeitraum von 19 Stunden Dunkelheit.

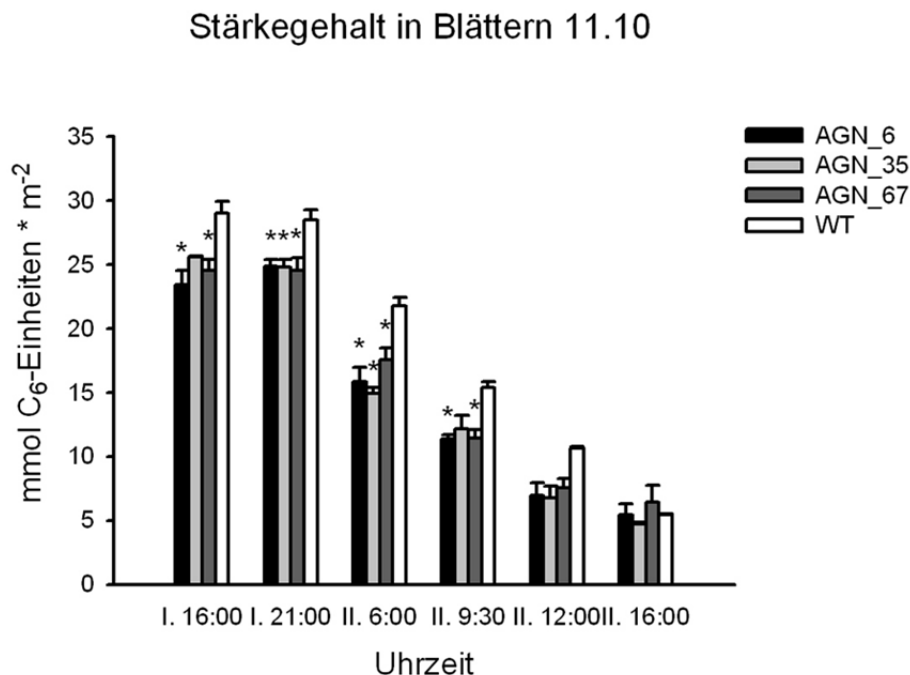
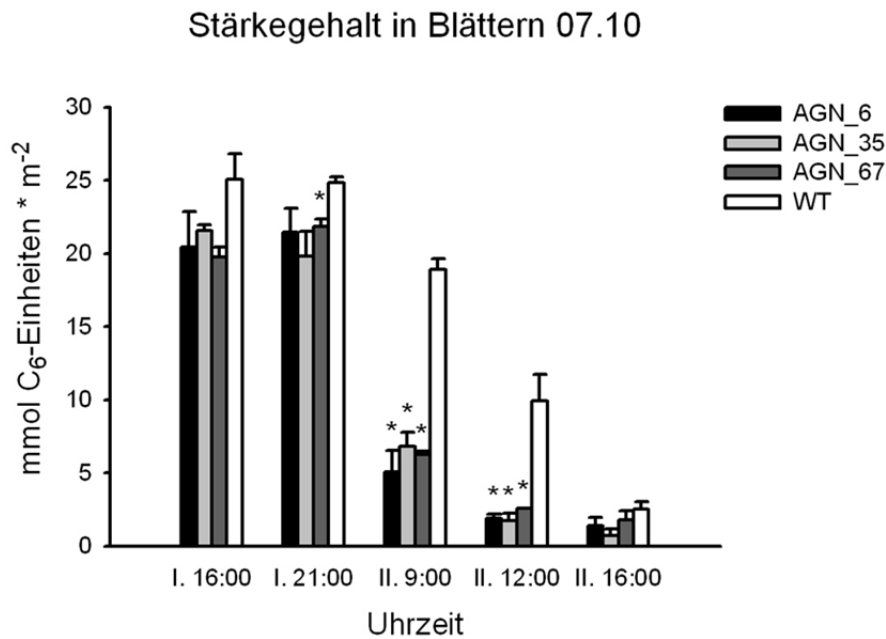


Abbildung 40: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einer verlängerten Dunkelphase von zwei Anzuchten.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. I: erster Untersuchungstag; II: zweiter Untersuchungstag. Die Mittelwerte sind aus $n=3$ Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

Von der zweiten Anzucht (11.10) wurden um 16 und 21 Uhr am ersten Untersuchungstag und um 6, 9:30, 12 und 16 Uhr am zweiten Untersuchungstag Blattproben entnommen. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass der Stärkegehalt in Blättern ab 21 Uhr stetig abnahm. Die Differenz im Vergleich zum Wildtyp lag bei durchschnittlich 15,5% und war verglichen mit anderen Anzuchten nicht sehr hoch. Vergleicht man den 24 Stunden Verlauf in der

verlängerten Dunkelperiode dieser Anzucht mit der 07.10 Anzucht, so fällt auf, dass die Verringerung zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nicht so abrupt verlief. Der Stärkegehalt nahm von 25,7 mmol C₆-Einheiten pro m² am ersten Versuchstag um 16 Uhr auf 5,5 mmol C₆-Einheiten pro m² am zweiten Versuchstag um durchschnittlich 78,5% ab. Am Endzeitpunkt wurden in den AGN-Linien keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Die Analyse der Blattstärkeakkumulation in einer verlängerten Dunkelphase zeigte, dass der Stärkegehalt sowohl in den dreifach transgenen Linien als auch im Wildtyp stetig abnahm. Am Ende der Dunkelphase war die anfängliche Differenz zwischen AGN-Linie und Wildtyp nicht mehr gegeben und die Stärkeakkumulation war auf einer vergleichbaren niedrigen Stufe. Aus diesem Grund bestätigte sich die Vermutung, dass die AGN-Pflanzen möglicherweise schneller eingehen, nach diesem Experiment nicht.

3.1.8.2 Zuckergehalt in Blättern

Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Dunkelphase einen Einfluss auf die Zuckerakkumulation in AGN- oder Wildtyppflanzen hat, wurden die Gehalte der löslichen Zucker zu verschiedenen Zeitpunkten der Anzucht von Juli 2010 (07.10) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt. Die Proben wurden um 16 und 21 Uhr am ersten Versuchstag und um 9, 12 und 16 Uhr am zweiten Versuchstag entnommen. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass sowohl die Glukose- als auch die Saccharoseakkumulation in Blättern von AGN-Linien in einer verlängerten Dunkelperiode mit Wildtyppflanzen ähnlich war. Die Schwankungen der Fruktosegehalte fielen größer aus, da diese jedoch nur in einer Linie (AGN_67) zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten auftraten, waren sie vernachlässigbar.

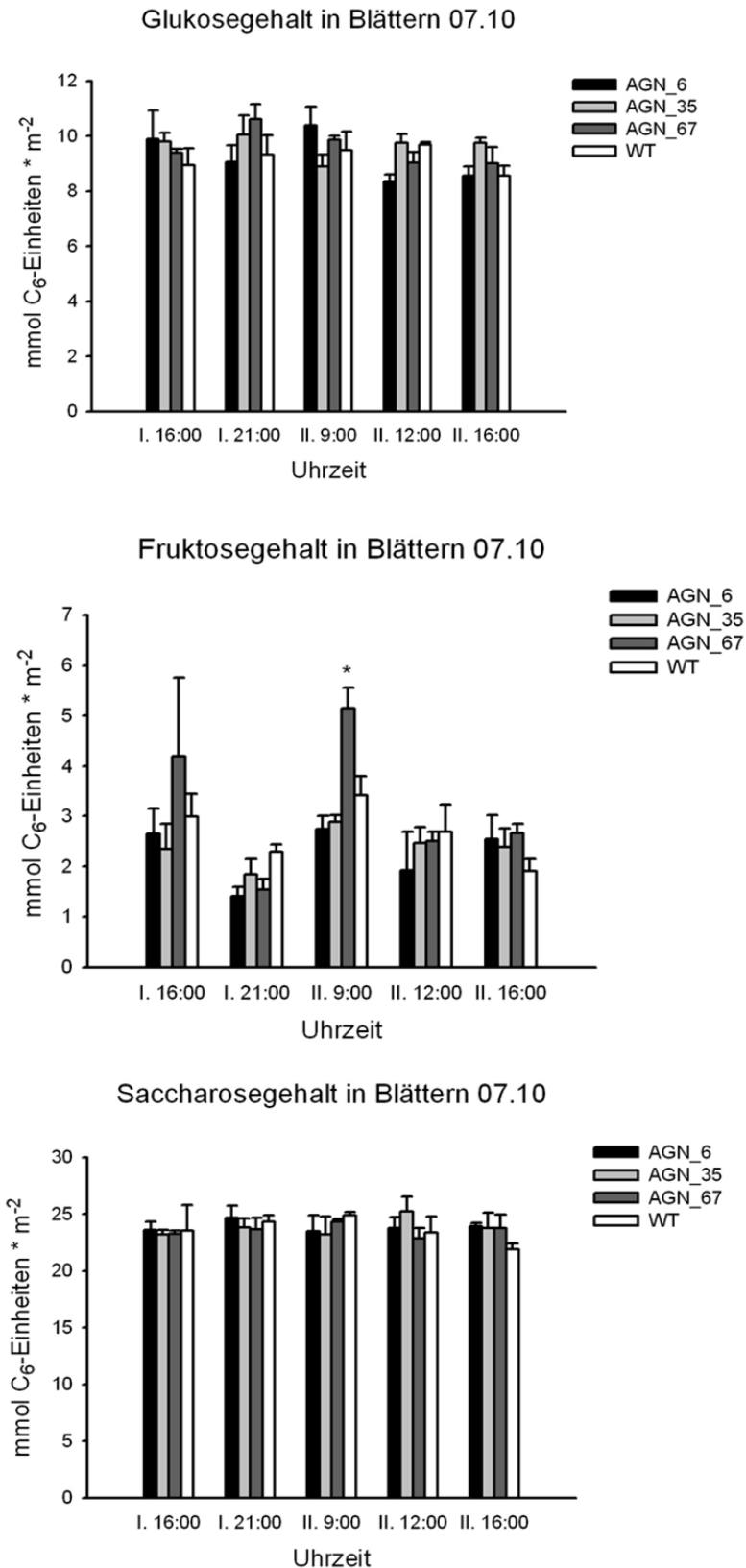


Abbildung 41: Gehalte löslicher Zucker in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einer verlängerten Dunkelphase.

AGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *StAGPase* blattspezifisch reprimieren und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. I: erster Untersuchungstag; II: zweiter Untersuchungstag. Die Mittelwerte der sind aus $n=3$ Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.2 Simultane Überexpression der *EcPPase*, des *PsGPT* und *AtNTT* in *Solanum tuberosum*

3.2.1 Hintergrund

Mit Hilfe der AGN-Pflanzen konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die simultane Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu einem deutlich erhöhten Knollenertrag und Knollenstärkegehalt führt (s. 3.1). Dieses Ergebnis sollte nun zusätzlich durch einen weiteren biotechnologischen Ansatz bekräftigt werden. Die *source* Kapazität wurde manipuliert, indem eine Pyrophosphatase aus *Escherichia coli* (*EcPPase*) mesophyllspezifisch im Cytosol unter der Kontrolle des cytosolischen *Fruktose-1,6-bisphosphatase*-Promotors (*FBPase*-Promotors) überexprimiert wurde. Dies sollte bezwecken, dass mehr Photoassimilate aus den Chloroplasten in die Saccharosesynthese geschleust werden, wodurch der Assimilatfluss in Richtung Saccharosesynthese umgelenkt wird. Dieser erhöhte Saccharosefluss könnte dann zu den *sink* Organen weitergeleitet werden und dazu genutzt werden, die Kapazität der Knollenentwicklung und Stärkesynthese in Knollen zu steigern.

Transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* cv. Desirée) der Linie BG1, die den GPT aus *Pisum sativum* unter Kontrolle des knollenspezifischen *B33-Patatin*-Promotors (Rocha-Sosa et al., 1989) überexprimieren, wurden mit den Konstrukten *cytFBPase-pBin-EcPPase* und *B33-pBin-AtNTT1* doppeltransformiert. Die daraus resultierenden Pflanzen erhielten die Benennung PGN (Pase, GPT, NTT1). Die Übersicht über die verwendeten Konstrukte und die Vorgehensweise bei der Transformation zur Herstellung der PGN-Pflanzen ist Abbildung 42 zu entnehmen.

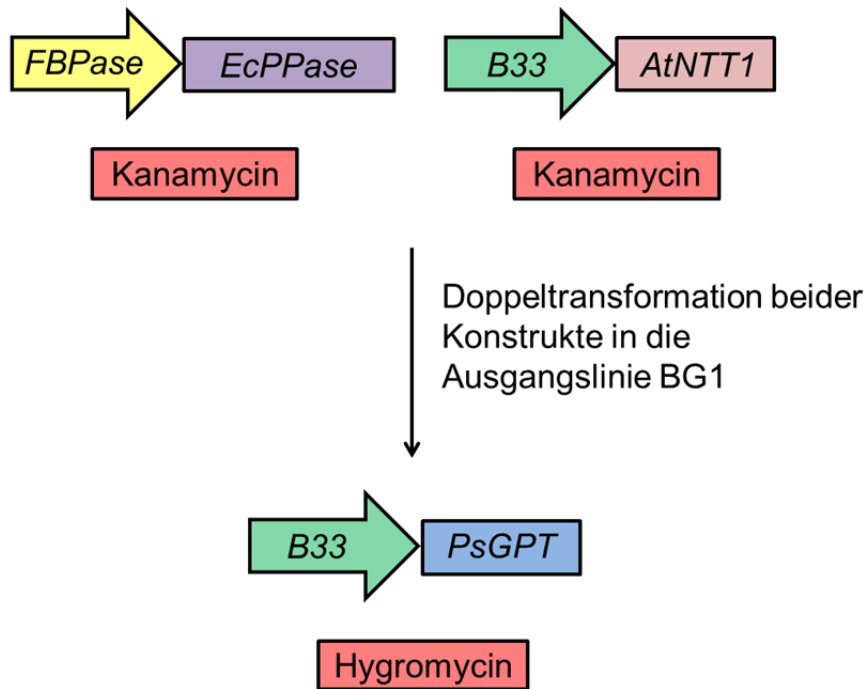


Abbildung 42: Übersicht über die zur Generation der PGN-Pflanzen verwendeten Konstrukte und schematische Transformationsvorgehensweise.

B33 = knollenspezifischer Promotor *B33*, *PsGPT* = Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator aus *Pisum sativum*, *FBPase* = cytosolischer *Fruktose-1,6-bisphosphatase*-Promotor, *EcPPase* = Pyrophosphatase aus *Escherichia coli*, *AtNTT1* = Adenylat-Translokator 1 aus *Arabidopsis thaliana*. Die Resistenzen sind rot hinterlegt. BG1 = Ausgangslinie, die durch knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* charakterisiert ist.

3.2.2 Expressionsanalysen in transformierten Kartoffelpflanzen

Für die Expressionsanalysen des *PsGPTs* und des *AtNTT1s* wurden Knollenproben verwendet, wobei für die Expressionsanalyse der *EcPPase* Blattproben verwendet wurden. Das praktische Vorgehen zum Nachweis der Expression verlief wie bereits in 3.1.2 beschrieben.

In Abbildung 43 sind die gelelektrophoretischen Auftrennungen (s. 2.4.2) der *PsGPT*-, *AtNTT1*- und *StβTUB*-Amplifikate der RT-PCR abgebildet. Die Amplifikation des *β-Tubulin*-Gens, einer quantitativen Kontrolle, zeigte, dass in allen PCR-Ansätzen eine vergleichbare cDNA-Menge vorlag (Abbildung 43). Da die Bandenintensität bei allen Proben ähnlich war, kann davon ausgegangen werden, dass auch die cDNA-Menge ähnlich war. Die Primerpaare zur Amplifikation des *PsGPT* und *AtNTT1* wurden so konstruiert, dass sie spezifisch für den *GPT* aus *Pisum sativum* und *NTT1* aus *Arabidopsis thaliana* waren und nicht für die jeweiligen Kartoffelgene. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR des *PsGPTs* ist im oberen Gelbild in Abbildung 43 dargestellt. Da nur in den Linien PGN_58, 95 und 113 eine Bande zu erkennen war und keine Bande im Wildtyp, kann davon ausgegangen werden, dass die gewählten PGN-Linien das *PsGPT*-Transkript besaßen. Die gleiche cDNA wurde für eine weitere PCR unter Verwendung der *AtNTT1* spezifischen

Primer verwendet. Das Gelbild der RT-PCR ist im unteren Teil von Abbildung 44 abgebildet. Es wird deutlich, dass die PGN-Linien 58, 95 und 113 *AtNTT1*-Transkripte besaßen. Die Spezifität der Primer kann dadurch gezeigt werden, dass im Wildtyp keine Amplifikate vorhanden waren.

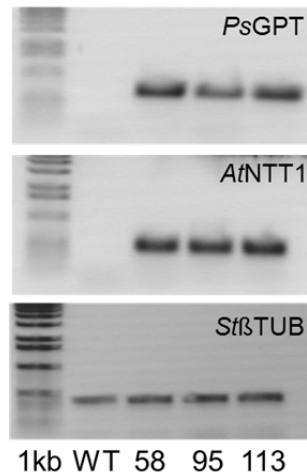


Abbildung 43: Expressionsanalysen des *PsGPTs* und *AtNTT1* in Kartoffelknollen von PGN-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR.

Darstellung der Gelbilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR des *PsGPT*-, *AtNTT1*- und des *StβTUB*-Gens. Für die Amplifikation wurden die genspezifischen Primer aus 2.1.5 verwendet. Es wurde das Standard-PCR-Programm (s. 2.4.7) mit einer Anlagerungstemperatur der Primer von 55 °C (*StβTUB*, *AtNTT1*) und 61 °C (*PsGPT*) mit 28 Zyklen durchgeführt. 1kb-Leiter Invitrogen; WT: Wildtyp; 58, 95, 113: Nummerierung der PGN-Pflanzen, in denen *EcPPase*, *PsGPT* und *AtNTT1* überexprimiert sind. Die zu erwartenden Bandengrößen der PCR-Produkte betragen 614 bp (*PsGPT*), 480 bp (*AtNTT1*) und 500 bp (*StβTUB*).

In Abbildung 44 sind die Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennungen der *EcPPase*- und *StβTUB*-Amplifikate der RT-PCR aus Kartoffelblättern von PGN- und Wildtyppflanzen dargestellt. Die Amplifikation des *StβTUB*-Gens zeigte, dass in allen Ansätzen cDNA vorhanden war. Diese cDNA wurde für die Amplifikation des *EcPPase*-Gens eingesetzt, das Bild der gelelektrophoretischen Auftrennung ist in Abbildung 44 zu sehen. Es wird deutlich, dass nur die PGN-Linien 58, 95 und 113 das *PPase*-Gen aus *Escherichia coli* exprimierten. Die Expressionsanalysen der PGN-Pflanzen haben gezeigt, dass in den Kartoffelknollen der PGN-Linien 58, 95 und 113 der *AtNTT1* und *PsGPT* exprimiert wird. In Kartoffelblättern derselben Linien wurde auch die Expression der *EcPPase* nachgewiesen. In weiteren Schritten sollte nun überprüft werden, ob die vorhandenen Transkripte zu funktionalen Proteinen translatiert werden.

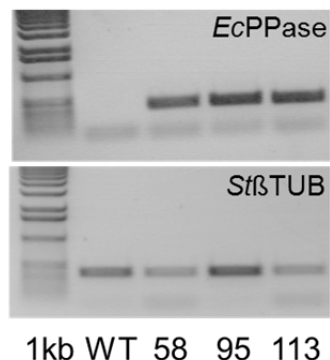


Abbildung 44: Expressionsanalyse der PPase aus *Escherichia coli* in Kartoffelblättern von PGN-Pflanzen mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR.

Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate der RT-PCR des *EcPPase*-Gens. Die zur Amplifikation verwendeten genspezifischen Primer sind in 2.1.5 aufgeführt. Es wurde das Standard PCR-Programm (s. 2.4.7) mit einer primerspezifischen Anlagerungstemperatur von 54 °C und einer Zyklenswiederholung von 28 durchgeführt. 1 kb-Leiter Invitrogen; WT: Wildtyp; 58, 95, 113: Nummerierung der PGN-Pflanzen, in denen *EcPPase*, *PsGPT* und *AtNTT1* überexprimiert sind.

3.2.3 PPase-Aktivitätsmessungen in Kartoffelblättern

Um zu zeigen, dass die Überexpression der *EcPPase* erfolgreich war, wurde die Aktivität der *EcPPase* in Kartoffelblättern von PGN-Pflanzen analysiert und mit Wildtyppflanzen verglichen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels Zymogramm nach dem in 2.5.8 beschriebenen Protokoll. Dieser Aktivitätsnachweis beruht darauf, dass das durch die anorganische PPase-Reaktion gebildete Phosphat über eine SDS-PAGE visualisiert wird. Als Probenmaterial dienten Blattproben der PGN-Pflanzen 58, 95, 113 und des Wildtyps und Proteinextrakt, der aus *Escherichia coli* gewonnen wurde. In Abbildung 45 ist das Zymogramm graphisch dargestellt. Man sieht, dass der Aktivitätsnachweis der anorganischen PPase mittels Zymogramm erfolgreich war, da in Spur 1, in der *Escherichia coli*-Extrakt als Positivkontrolle aufgetragen wurde, eine Bande zu sehen ist. Auch die Tatsache, dass die plastidäre PPase aus *Solanum tuberosum* nach einer SDS-PAGE (s. 2.5.7) ihre Funktionalität verliert, konnte bestätigt werden, weil in Spur 5, in der Wildtypextrakt aus Kartoffelblättern als Negativkontrolle aufgetragen wurde, keine Bande zu sehen ist. In Spur 2 bis 5, in denen aus den PGN-Linien gewonnener Blattextrakt aufgetragen wurde, sind Banden zu erkennen, die in ihrer Intensität mit der Positivkontrolle vergleichbar sind.

Unter Einsatz des Zymogramms konnte also in den ausgewählten PGN-Linien 58, 95 und 113 erfolgreich anorganische PPase-Aktivität nachgewiesen.

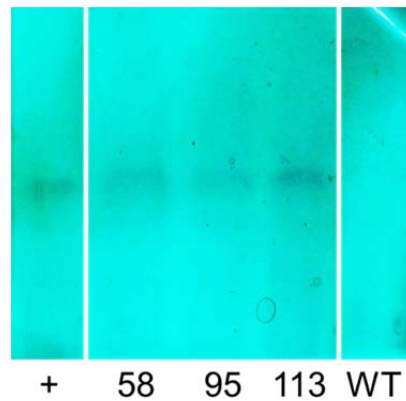


Abbildung 45: Grafische Darstellung des Zymogrammes der anorganischen Pyrophosphatase aus *Escherichia coli* exprimiert in transgenen PGN-Kartoffelpflanzen.

In Spur 1 befindet sich der Extrakt aus *Escherichia coli* als Positivkontrolle (+), in Spur 2, 3 und 4 die Proteinextrakte aus den Blättern der PGN-Linien 58, 95 und 113. PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. In Spur 5 ist der aus Wildtyp-Blättern gewonnene Proteinextrakt (WT) als Negativkontrolle aufgetragen.

Ein Zymogramm gibt lediglich darüber Aufschluss, ob in den Blättern der PGN-Linien anorganische PPase-Aktivität vorhanden ist oder nicht. Deswegen wurde mit Hilfe eines PPase-Assays eine Quantifizierung durchgeführt, bei der in den Blättern von PGN- und Wildtyppflanzen in einer Reaktion mit Natriumpyrophosphat das freigesetzte anorganische Phosphat mit Hilfe einer Phosphateichreihe quantifiziert wurde (s. 2.5.9). Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt. Es wurde deutlich, dass in allen ausgewählten PGN-Linien das pro Minute und Frischgewicht (Fg) gebildete Phosphat signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Die Differenz zwischen Wildtyp- und PGN-Pflanzen konnte dadurch erklärt werden, dass in den transgenen Linien zusätzlich zu plastidären PPasen, die auch in Wildtyppflanzen vorkommen, die anorganische PPase aus *Escherichia coli* im Cytosol aktiv war. Die Aktivität war zwischen 40,5% (PGN_95) und 70,1% (PGN_58) im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht.

Demnach wurde in allen ausgewählten PGN-Linien durch ein Zymogramm und zusätzlich durch ein PPase-Assay die Aktivität der anorganischen PPase aus *Escherichia coli* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Der Nachweis ist nun erbracht, dass die Expression der *EcPPase* zu funktionalen Genprodukten führt.

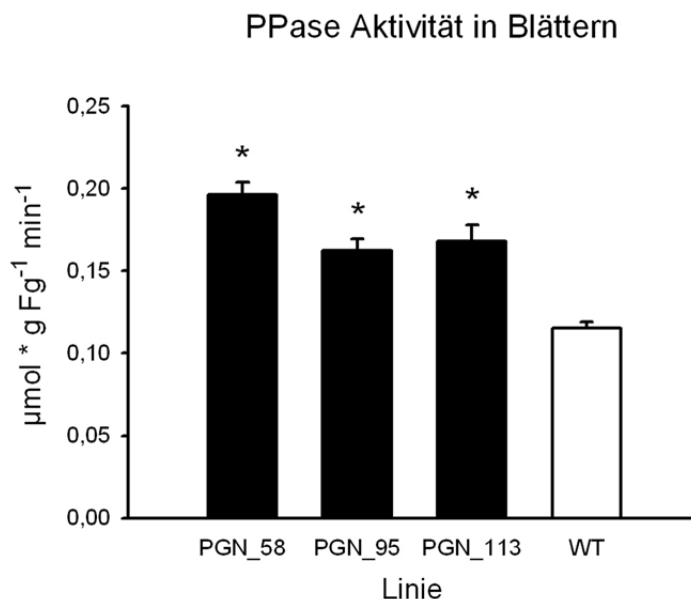


Abbildung 46: PPase-Aktivität in Blattextrakten von PGN- und Wildtyppflanzen.

Die Mittelwerte der Aktivitäten für die PGN-Linien und den Wildtyp (WT) sind aus jeweils n=3-4 Pflanzen \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$). PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren.

3.2.4 Untersuchungen der PGN-Pflanzen aus Gewächshausanzuchten

Die PGN-Linien 58, 95 und 113 wurden aus Sterilkultur in Erde umgetopft und ins Gewächshaus überführt. Dort wurden sie nach 11 bis 14 Wochen Anzucht (von April bis August) geerntet. Durch die Gewächshausanzuchten sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die simultane mesophyllspezifische Überexpression der *EcPPase* und knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* in Kartoffelpflanzen hat. In manchen Ernten wurde zusätzlich die bereits publizierte Linie BGA_31 angebaut (Zhang et al., 2008), in der die Erhöhung der *sink* Kapazität zu einem erhöhten Stärkeertrag pro Pflanze führt, um mögliche Unterschiede im Vergleich zu den PGN-Pflanzen zu erfassen.

3.2.4.1 Ertragsanalysen der oberirdischen Pflanzenteile

Bei jeder Ernte wurde zunächst das Gewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile bestimmt, um zu untersuchen, ob die Manipulation der *source* und *sink* Kapazität das Wachstum der grünen Pflanzenteile beeinflusst.

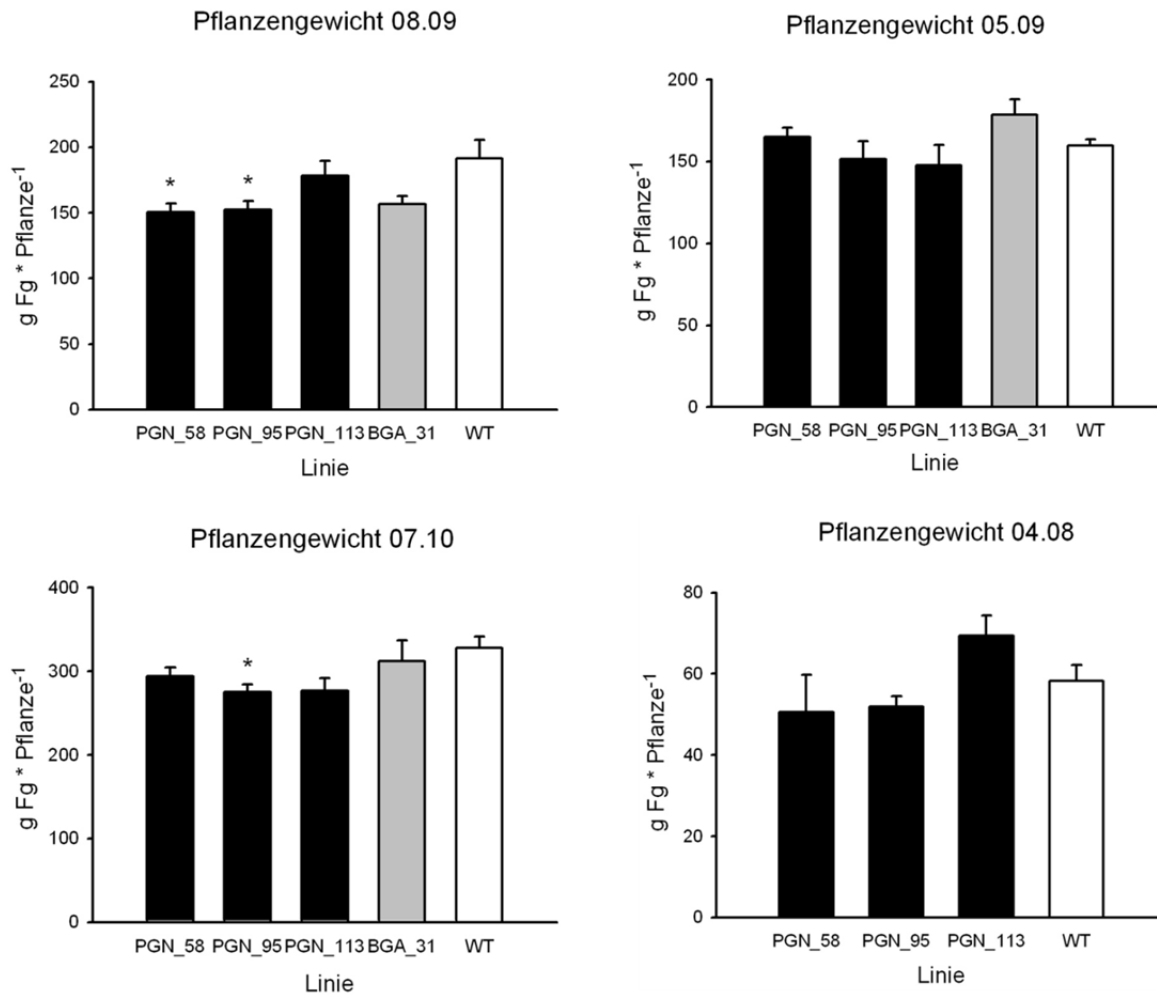


Abbildung 47: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von PGN-, BGA_31 und Wildtyppflanzen (WT) in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze aus vier verschiedenen Anzuchten. PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Die Mittelwerte der Anzucht 08.09 sind aus n=6-8 Einzelwerten, der Anzucht 05.09 und 07.10 aus n=5-10 Einzelwerten und der Anzucht 04.08 aus n=3-5 Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse von vier verschiedenen Ernten (08.09, 05.09, 07.10, 04.08) sind in Abbildung 47 zusammengestellt. Es wird deutlich, dass das Grüngewicht in den PGN- und BGA_31-Linien weitgehend mit dem Wildtyp vergleichbar war. Nur in den Linien PGN_58 und _95 der Anzucht 08.09 und Linie PGN_95 der Anzucht 07.10 wurde eine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Hier war das Grüngewicht zwischen 16,2% (PGN_95, 07.10) und 21,4% (PGN_58, 08.09) im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Betrachtet man die Grüngewichte der anderen Linien, so fällt auf, dass sie tendenziell weniger Grüngewicht bildeten als Wildtyppflanzen; da es sich jedoch meist nur um geringfügige, nicht signifikante Veränderungen handelt, können sie vernachlässigt werden.

3.2.4.2 Stärkegehalte in Kartoffelblättern

In den bereits beschriebenen AGN-Pflanzen wurde festgestellt, dass der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese durch die blattspezifische Repression der StAGPase verringert war. Der Stärkegehalt war bis zu 57,7% (AGN_67, 04.08) im Vergleich zum Wildtyp reduziert (s. 3.1.4.2). Um nun zu analysieren, ob die mesophyllspezifische Überexpression der EcPPase Veränderungen im Blattstärkemetabolismus zur Folge hat, wurde der Stärkegehalt in Blättern von PGN-Pflanzen nach dem in 2.5.2 beschriebenen Protokoll ermittelt. Die Blätter zeigten zum Zeitpunkt der Probennahme keine Anzeichen von Seneszenz und wurden am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt von oben genommen.

Die Ergebnisse der Stärkeanalysen in Blättern von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen von vier unterschiedlichen Ernten (08.09, 05.09, 07.10 und 04.08) sind in Abbildung 48 dargestellt. Es stellte sich heraus, dass der Stärkegehalt in allen Anzuchten in den Blättern von PGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Bis auf Linie PGN_58 und _95 aus der Anzucht von April 2008 handelte es sich um signifikante Verringerungen. In der Anzucht von August 2009 war der Stärkegehalt in den PGN-Linien um durchschnittlich 37,0% reduziert. Die Reduktionen der Anzuchten von Juli 2010 und Mai 2009 betragen im Mittel 37,4 bzw. 33,3% im Vergleich zum Wildtyp. In der Linie BGA_31 war der Stärkegehalt in Blättern im Vergleich zum Wildtyp unverändert, da, wie bereits erwähnt (s. 3.1.4.2), in diesen Pflanzen Manipulationen im Knollen- und nicht im Blattgewebe vorgenommen wurden.

Demnach zeigten die Stärkeanalysen in Blättern von PGN-Pflanzen eine deutliche Reduktion des Stärkegehaltes im Vergleich zum Wildtyp. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die PPase, die im Cytosol von Mesophyllzellen exprimiert wurde, das während der Saccharosesynthese entstehende Pyrophosphat in Orthophosphat spaltet. Die Konsequenz davon ist, dass auf der einen Seite eine Rückreaktion in Richtung Glykolyse unmöglich wird und auf der anderen Seite die Menge an Orthophosphat im Cytosol höher ist und mehr Gegentauchsubstrat für den Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) zur Verfügung steht. Dadurch können mehr Photosassimilate aus den Chloroplasten in die Saccharose-synthese geschleust werden, wodurch der geringere Stärkegehalt in Blättern zu erklären ist. Demnach zeigten die bisherigen Resultate, dass die Überexpression der EcPPase erfolgreich war, weil der Photoassimilatfluss in die Blattstärkesynthese erfolgreich gehemmt wurde.

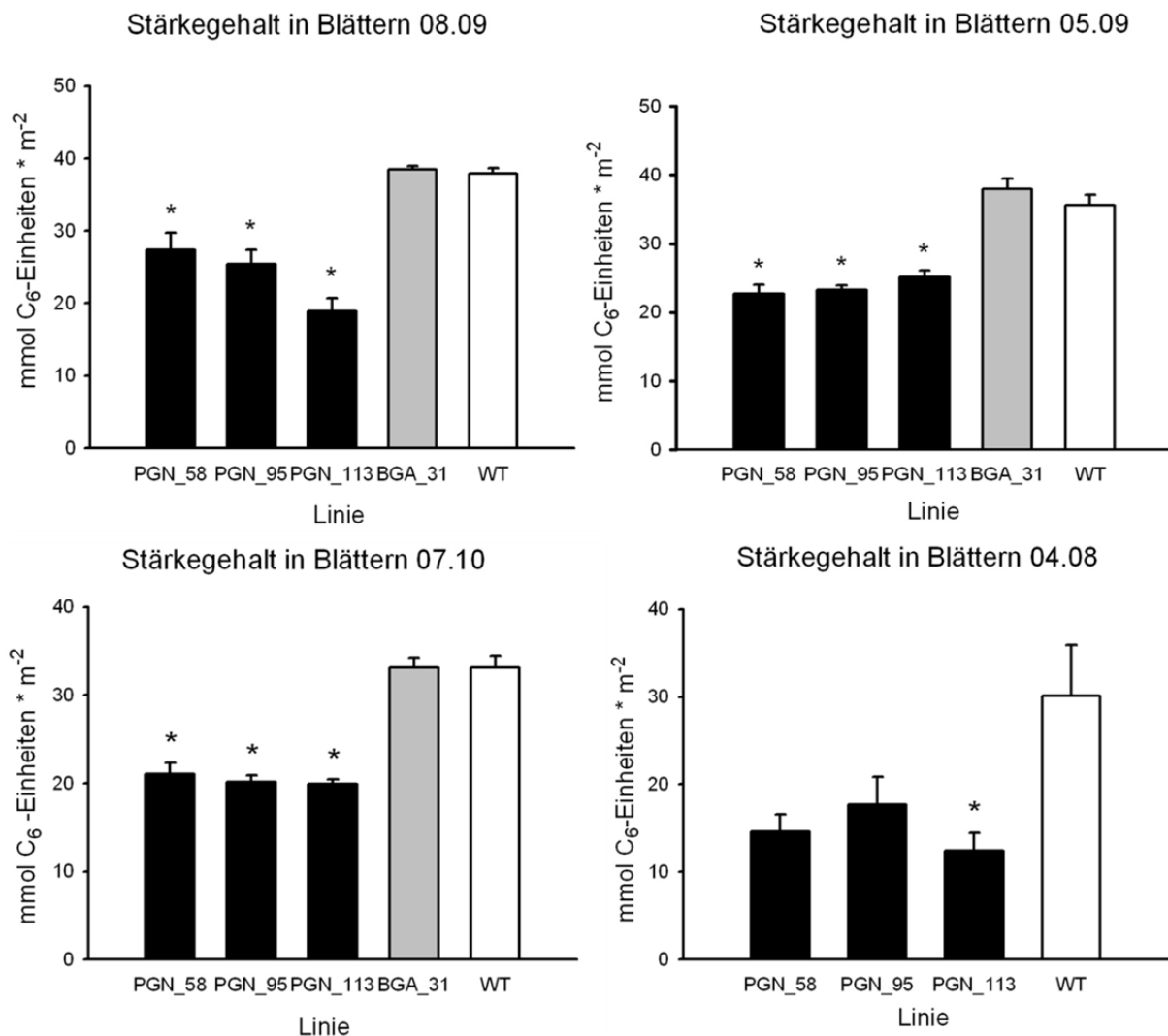


Abbildung 48: Stärkegehalte in Blättern von PGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Stärkegehalt ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche angegeben. Die Mittelwerte der Anzucht 08.09 sind aus n=6-8 Einzelwerten, der Anzucht 05.09 und 07.10 aus n=5-10 Einzelwerten und der Anzucht 04.08 aus n=3-5 Einzelwerten ± Standardfehler gebildet worden; * = signifikant (p < 0,05).

3.2.4.3 Zuckergehalte in Kartoffelblättern

Die Gehalte der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurden in Blättern von PGN-Pflanzen analysiert und mit dem Wildtyp verglichen. Dadurch sollte analysiert werden, ob die Veränderungen des Stärkemetabolismus Einfluss auf die Zuckerakkumulation in Blättern hat. Die Bestimmung der Zucker erfolgte von Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp nach dem in 2.5.1 beschriebenen Protokoll.

Die Ergebnisse von zwei Anzuchten (08.09 und 04.08) sind in Abbildung 49 zusammengestellt. Bis auf eine signifikante Reduktion des Saccharosegehaltes um 23,7% in

der Linie PGN_58 der Anzucht April 2008, wurden keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp detektiert.

Die unveränderten Saccharosegehalte in Blättern der transgenen Kartoffelpflanzen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die *sink* Organe größere Mengen an Saccharose aufnehmen können, da die Kapazität der *sink* Organe durch die knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* erhöht ist und deshalb keine veränderten Saccharosegehalte gemessen werden konnten.

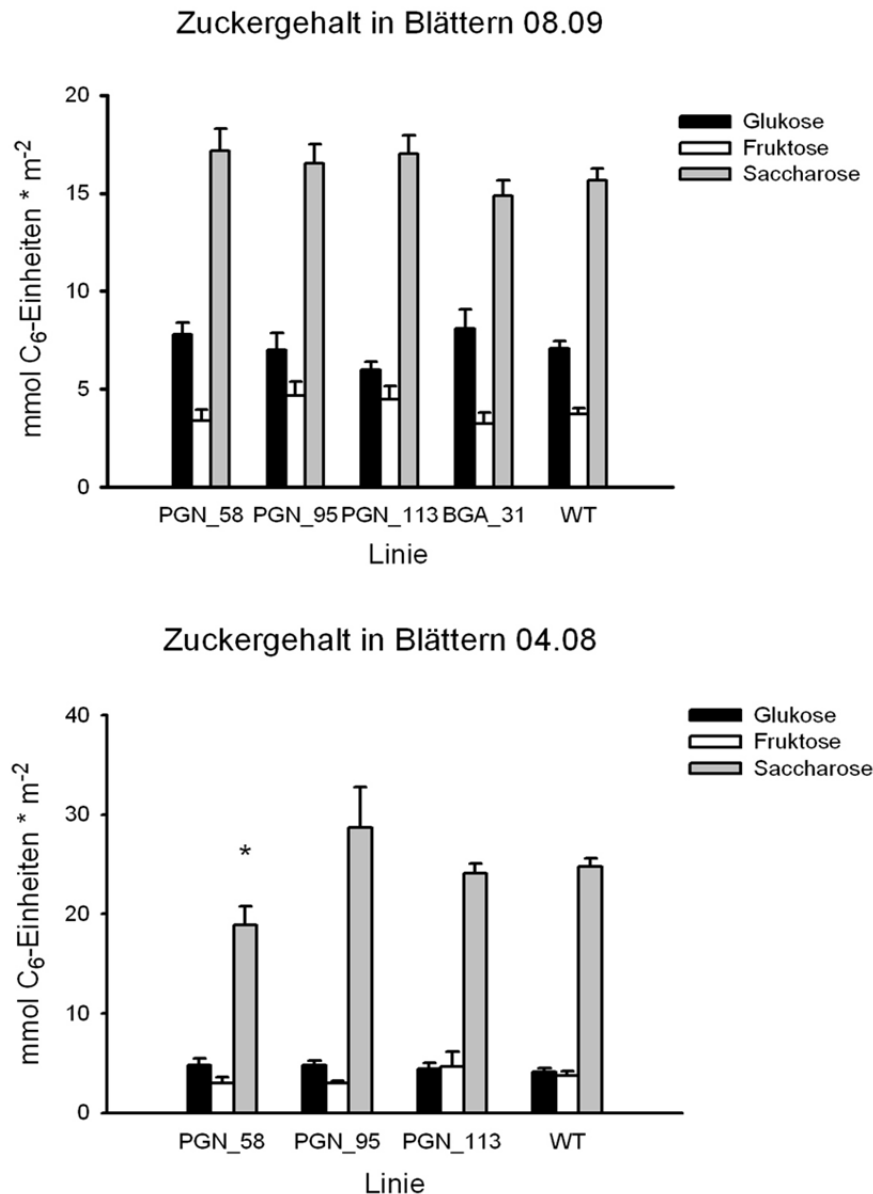


Abbildung 49: Zuckergehalte in Blättern von PGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. Der Gehalt an löslichen Zuckern ist in mmol C₆-Einheiten pro m² Blattfläche angegeben. Die Mittelwerte der Anzucht 08.09 sind aus n=6-8 Einzelwerten und 04.08 sind aus n=3-5 Einzelwerten ± Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.2.4.4 Analyse der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen

Zur genaueren Analyse der *source* Kapazität der transgenen PGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp, wurde der Zuckergehalt in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen analysiert. Die Vorgehensweise ist in 2.5.5 beschrieben. In Abbildung 50 sind die Zuckergehalte der EDTA-Lösung nach 16-stündigem Transport während der Nacht und 4-stündigem Transport während des Tages in Prozent vom Wildtyp dargestellt. Es wurden die PGN-Linien 58, 95 und 113 und die Linie BGA_31 im Vergleich zum Wildtyp analysiert. In allen untersuchten PGN- und BGA_31-Linien war der Zuckerexport sowohl während der Nacht, als auch während des Tages im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Während der nächtlichen Analyse war der Zuckerexport in der Linie PGN_113 signifikant um den Faktor 2,1 und in der Linie BGA_31 um den Faktor 2,4 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In den Linien PGN_58 bzw. 95 war der Export um den Faktor 2,3 bzw. 1,6 im Vergleich zum Wildtyp gestiegen. Betrachtet man die Ergebnisse des Zuckerexports während des Tages, so trat in allen dreifach transgenen PGN-Pflanzen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp auf. Der Zuckerexport war um den Faktor 1,9 (PGN_113) bis 2,6 (PGN_95) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Linie BGA_31 war der Zuckerexport um den Faktor 1,6 erhöht.

Zusammenfassend zeigen die Zuckeranalysen der Phloemexsudate aus Kartoffelpetiolen, dass die transgenen Linien mehr Zucker exportieren als Wildtyppflanzen. Durch die mesophyllspezifische Überexpression der *EcPPase* konnte, wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, eine Erhöhung der *source* Kapazität erreicht werden. Der bereits untersuchte, unveränderte Zuckergehalt in Blättern von PGN-Pflanzen (s. 3.2.4.3) weist im Zusammenhang mit dem Petiolexperiment darauf hin, dass der Überfluss an Saccharose direkt aus den Blättern weitertransportiert wurde.

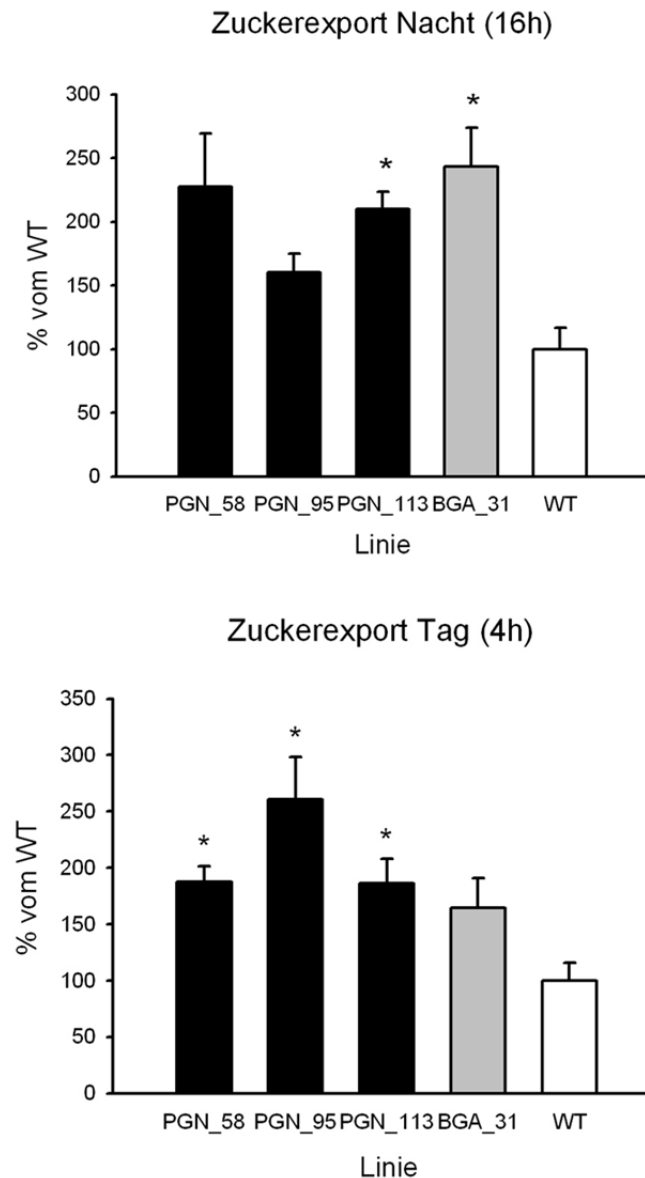


Abbildung 50: Analyse des Zuckergehaltes in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen von PGN, BGA_31 und Wildtyppflanzen nach Inkubation für 16 Stunden in der Nacht (oben) und 4 Stunden am Tag.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPTs* und *AtNTT1* charakterisiert. Die Ergebnisse sind in % vom Wildtyp (WT) dargestellt. Die Werte sind aus n=3-4 (oberes Diagramm) und n=5 (unteres Diagramm) Einzelwerten \pm Standardfehler ermittelt worden; * = signifikant für $p < 0,05$.

3.2.4.5 Bestimmung der CO₂-Assimilation

Die Untersuchung der CO₂-Assimilation von AGN-Pflanzen hat gezeigt, dass nach sechzehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp vorlag. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung auch auf die PGN-Pflanzen übertragbar ist, wurde die CO₂-Assimilation nach zwölfwöchiger Anzucht im Gewächshaus bei 450 μ E gemessen. Leider standen zum Versuchszeitpunkt keine älteren PGN-Pflanzen

zur Verfügung, da die IRGA-Messungen der AGN-Pflanzen (s. 3.1.4.5) gezeigt haben, dass erst in älteren Pflanzen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp zu detektieren waren.

Die Ergebnisse der CO₂-Assimilation von PGN-Pflanzen nach zwölf Wochen Anzucht im Gewächshaus bei 450 µE sind in Abbildung 51 dargestellt. Es wird deutlich, dass die CO₂-Assimilation in allen untersuchten PGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. In der Linie PGN_95 war die CO₂-Assimilation um den Faktor 1,6 und in der Linie PGN_113 um den Faktor 2,1 erhöht. Jedoch handelte es sich nicht um signifikante Veränderungen, die Anzahl der gemessenen Pflanzen war mit n=3 recht gering. Daher müsste dieser Versuch zukünftig mit mehr Pflanzen pro Linie durchgeführt werden, die sechzehn Wochen im Gewächshaus angezogen worden sind. Dennoch kann aus den Resultaten gefolgert werden, dass eine Tendenz zu einer erhöhten CO₂-Assimilation vorliegt.

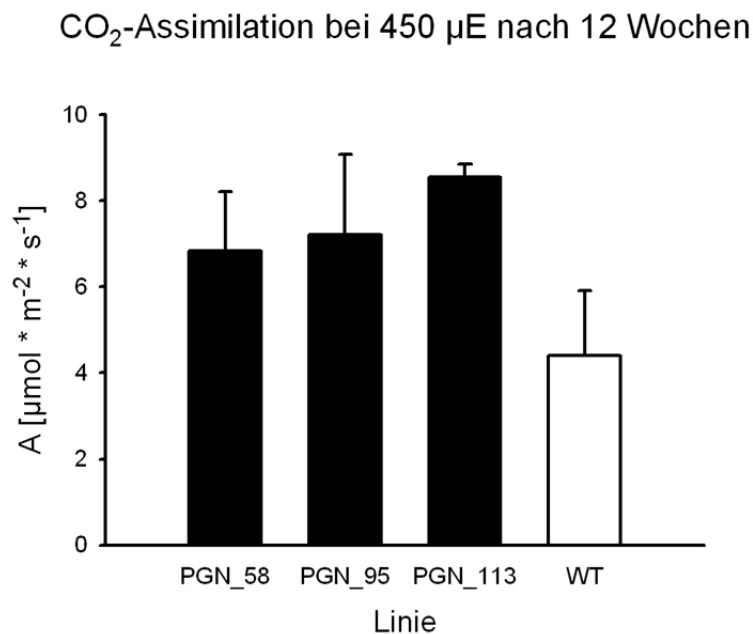


Abbildung 51: CO₂-Assimilation von Kartoffelblättern in µmol assimiliertem CO₂ pro m² Blattfläche und Sekunde in PGN- und Wildtyppflanzen bei einer Belichtungsstärke von 450 µE nach zwölfwöchiger Anzucht im Gewächshaus.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. WT = Wildtyp; µE = µEinstein; PAR = photosynthetic active radiation. Die Werte sind Mittelwerte aus n=3 Pflanzen ± Standardfehler ermittelt worden; * = signifikant (p < 0,05).

3.2.4.6 Bestimmung der ¹⁴CO₂-Aufnahme in die Blattstärke

Zur Analyse von Kohlenstoffflüssen im Primärstoffwechsel wurde durch ¹⁴CO₂-Markierung der Fluss des assimilierten Kohlenstoffs in die lösliche Zuckerfraktion und unlösliche Stärkefraktion nach dem in 2.5.4 beschriebenen Protokoll untersucht. In Abbildung 52 sind die Ergebnisse der prozentualen Einlagerung von ¹⁴CO₂ in die unlösliche Blattstärkefraktion in PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen dargestellt. Sowohl in den PGN-Linien als auch in

der BGA_31-Linie konnten im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Veränderungen detektiert werden. In der löslichen Blattsuckerfraktion waren auch keine Änderungen detektierbar (Daten hier nicht gezeigt). Mögliche Ursachen für die nicht vorhandenen Veränderungen könnten sein, dass zum einen die Inkubation von 30 Minuten zu kurz war, um Unterschiede in der $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme zu sehen, und zum anderen wäre es möglich, dass die abgetrennten Blätter nicht mehr im Stoffwechsel eingebunden waren und deswegen keine Unterschiede detektierbar waren. Eine weitere mögliche Ursache könnte sein, dass die CO_2 -Konzentration in der verwendeten Blattinkubationskammer sehr hoch war und damit im gesättigten Bereich lag, weswegen mögliche geringe Unterschiede schwer zu detektieren sind.

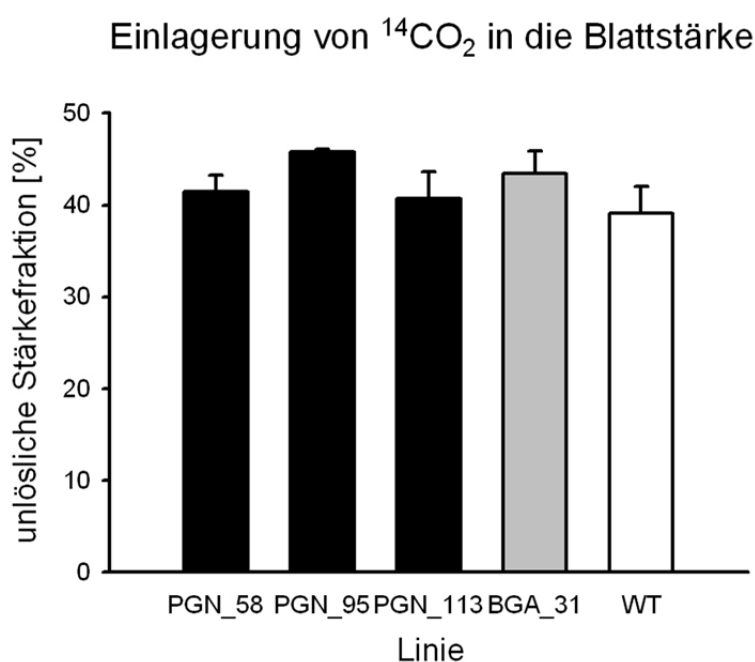


Abbildung 52: Analyse der Einlagerung von $^{14}\text{CO}_2$ in die Blattstärke von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA_31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Ergebnisse sind dargestellt als unlösliche Stärkefraktion in %. Die Werte sind Mittelwerte aus n=2-4 Einzelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.2.4.7 GC/MS-Messungen von Kartoffelblättern

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine mesophyllspezifische Überexpression der *EcPPase* in PGN-Pflanzen die *source* Kapazität erhöht wurde (s. 3.2.4.4). Um zu untersuchen, ob dies einen Einfluss auf das Profil von Metaboliten hat, wurden diese in Blattextrakten mittels GC/MS-Analysen untersucht. Die BGA_31- und PGN-Pflanzen wurden im Vergleich zum Wildtyp nach 11 Wochen Anzucht im Gewächshaus analysiert. Die

Ergebnisse sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die Rohdaten wurden auf Ribitol als internen Standard und auf das Probenfrischgewicht bezogen. Anschließend wurden die Abweichungen bezogen auf den auf 100% normierten Wildtyp in % bestimmt.

Es wird deutlich, dass das Profil der BGA_31- und PGN-Pflanzen weitgehend mit dem Wildtyp vergleichbar war. Die auftretenden Veränderungen waren größtenteils nicht signifikant, aus diesem Grund wäre es sinnvoll, die GC/MS-Analyse in einer weiteren Anzucht zu wiederholen, um sicherzustellen, dass tatsächlich keine Veränderungen auftreten. Es ist verständlich, dass keine nennenswerten Veränderungen detektiert werden konnten, da in den Blättern der PGN-Pflanzen ausschließlich der Stärkemetabolismus manipuliert wurde. Bei den hier analysierten Substanzen handelt es sich hauptsächlich um Aminosäuren oder Metabolite, die im Citratzyklus eine Funktion haben.

Tabelle 6: Ergebnisse der Metabolitanalysen mittels GC/MS von Blattextrakten von Wildtyp-, BGA_31- und PGN-Pflanzen.

Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus n=3-6 Einzelmessungen \pm Standardfehler und stellen die prozentualen Änderungen bezogen auf den auf 100% normierten WT dar. Die Rohdaten wurden auf den internen Standard Ribitol und auf das Frischgewicht der Proben bezogen. TMS = Anzahl trimethylsilylierten Gruppen; WT = Wildtyp; BGA_31: knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1*, PGN: transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren; * = signifikant ($p < 0,05$).

	WT	BGA_31	PGN_58	PGN_95	PGN_113
2-Ketoglutarat	100 \pm 20,1	155,7 \pm 13,3	84,1 \pm 64,0	85,7 \pm 24,9	193,0 \pm 5,0
Oxalacetat	100 \pm 13,2	75,4 \pm 1,3	60,8 \pm 4,5*	95,3 \pm 11,5	87,8 \pm 11,6
Succinat	100 \pm 10,5	75,9 \pm 19,5	13,9 \pm 167,7	107,7 \pm 7,8	116,9 \pm 8,1
Fumarat	100 \pm 23,2	115,4 \pm 3,3	118,0 \pm 26,1	211,7 \pm 12,0	157,8 \pm 15,9
Glycerat	100 \pm 18,1	153,8 \pm 1,0	36,0 \pm 15,8	117,7 \pm 16,2	131,8 \pm 8,1
GABA	100 \pm 18,0	138,5 \pm 3,1	147,2 \pm 18,9	94,8 \pm 28,4	125,2 \pm 7,8
Valin	100 \pm 12,5	46,1 \pm 8,8*	53,4 \pm 15,7*	64,4 \pm 9,9	80,4 \pm 13,6
Histidin	100 \pm 26,0	84,6 \pm 11,5	53,7 \pm 42,4	78,0 \pm 37,5	119,5 \pm 4,8
L-Lysin 3TMS	100 \pm 16,6	89,3 \pm 4,9	95,6 \pm 11,7	122,9 \pm 14,7	126,8 \pm 11,9
L-Lysin 4TMS	100 \pm 23,0	70,9 \pm 14,4	84,7 \pm 18,1	98,5 \pm 21,2	132,7 \pm 8,1
Threonin	100 \pm 22,0	58,6 \pm 16,8	105,4 \pm 13,0	132,5 \pm 13,7	196,2 \pm 6,2
Tyrosin 2TMS	100 \pm 19,5	66,4 \pm 2,4	80,1 \pm 34,0	81,1 \pm 21,0	162,4 \pm 21,9
Serin 2TMS	100 \pm 7,7	78,1 \pm 2,5	81,4 \pm 19,0	89,1 \pm 17,2	134,8 \pm 8,3
Asparagin	100 \pm 22,2	51,4 \pm 17,4	71,4 \pm 14,2	109,2 \pm 15,1	90,8 \pm 17,5
β-Alanin	100 \pm 21,9	64,2 \pm 0,7	126,5 \pm 23,2	86,5 \pm 15,1	89,3 \pm 15,8
Alanin 2TMS	100 \pm 18,5	57,9 \pm 0,6	83,7 \pm 15,1	92,4 \pm 22,5	208,7 \pm 6,3
Glycin	100 \pm 15,1	105,4 \pm 0,3	83,0 \pm 13,5	94,6 \pm 12,3	101,4 \pm 10,4
Isoleucin 2TMS	100 \pm 11,4	55,5 \pm 10,1	55,3 \pm 19,9	60,9 \pm 14,1	115,4 \pm 6,7
Aspartat 3TMS	100 \pm 22,4	169,6 \pm 10,4	292,0 \pm 24,7	103,2 \pm 27,1	174,4 \pm 7,8
Aspartat 2TMS	100 \pm 16,8	100,1 \pm 7,0	143,8 \pm 23,0	102,1 \pm 11,2	180,3 \pm 13,4
5-Oxo-Prolin	100 \pm 8,2	69,4 \pm 11,0*	118,5 \pm 25,1	132,2 \pm 9,4	154,8 \pm 9,3
L-Glutamat	100 \pm 25,1	54,0 \pm 32,2	115,0 \pm 40,6	22,9 \pm 60,1	185,2 \pm 32,6

3.2.4.8 Analyse der Knollenerträge

Die Knollenerträge von AGN- und PGN-Pflanzen wurden nach Gewächshausanzuchten im Vergleich zum Wildtyp und der Linie BGA_31 untersucht. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die mesophyllspezifische Überexpression der *EcPPase* zusammen mit einer gleichzeitig erhöhten *sink* Kapazität einen Einfluss auf die Kartoffelknollenbildung und das -wachstum hat. In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der Ertragsanalysen von drei verschiedenen Anzuchten (08.09, 05.09 und 07.10) zusammengestellt. Die ermittelten Knollenerträge pro Pflanze lagen zwischen 50 und 200 g Frischgewicht pro Pflanze und stimmen mit veröffentlichten Werten überein (Zhang et al., 2008).

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass in allen dreifach transgenen PGN-Linien der Knollenertrag signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. In der Anzucht von August 2009 (08.09) war der Knollenertrag zwischen 66,4% (PGN_58) und 80,6% (PGN_113) im Vergleich zum Wildtyp erhöht; dies war eine durchschnittliche Erhöhung um 72,7%. In der Linie BGA_31 war der Knollenertrag signifikant um 40,2% erhöht. Die Anzucht vom Mai 2009 (05.09) zeigte eine durchschnittliche Erhöhung des Knollenertrags um 37,3% in den PGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp. In der Anzucht Juli 2010 (07.10) konnte in den PGN-Linien eine Knollenertragserhöhung um im Mittel 93,5% erreicht werden. Die Knollenerträge konnten durchschnittlich in allen drei Anzuchten um 66,9% im Vergleich zum Wildtyp erhöht werden, wie die Knollenertragsbilanz zeigt.

Demnach bilden die Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, mehr Knollenmasse pro Pflanze aus als Wildtyppflanzen. Zusätzlich konnte in den dreifach transgenen PGN-Pflanzen der Knollenertrag im Vergleich zur doppelt transgenen Linie BGA_31 weiter gesteigert werden.

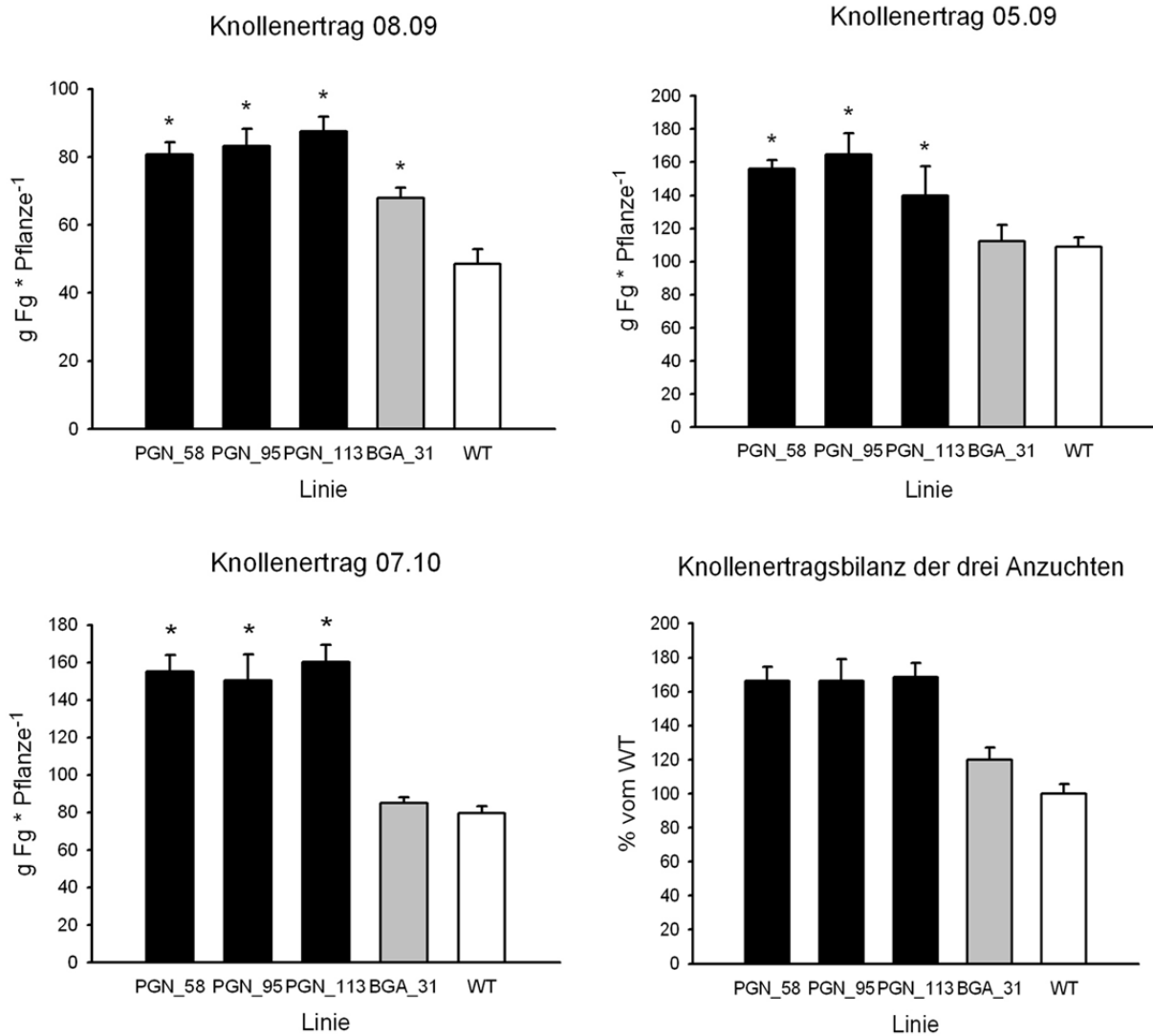


Abbildung 53: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze in PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AfNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AfNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus $n=6-8$ (08.09) und $n=5-10$ (05.09, 07.10) Einzelwerten + Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Die Knollenertragsbilanz stellt die Mittelwerte der drei dargestellten Anzuchten (08.09, 05.09 und 07.10) in % vom Wildtyp dar.

3.2.4.9 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Durch die Analyse des Stärkegehaltes in Knollen von PGN-Pflanzen sollte untersucht werden, ob zum deutlich gesteigerten Knollenertrag (s. 3.2.4.8) zusätzlich eine Steigerung des Stärkegehaltes vorlag. Der Stärkegehalt in Kartoffelknollen wurde in drei verschiedenen Anzuchten (08.09, 05.09 und 07.10) nach dem in 2.5.2 beschriebenen Protokoll bestimmt.

Den Ergebnissen aus Abbildung 54 ist zu entnehmen, dass in allen dargestellten Ernten der Stärkegehalt in Knollen von PGN- und *BGA_31*-Pflanzen in $\mu\text{mol C}_6$ -Einheiten pro g Frischgewicht (Fg) signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht war.

In der Ernte von August 2009 (08.09) war der Stärkegehalt in den PGN-Linien zwischen 46,6% (PGN_113) und 54,5% (PGN_58) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dies war eine durchschnittliche Erhöhung um 51,0%. In der Linie BGA_31 lag eine 10,0% ige Erhöhung gegenüber dem Wildtyp vor. Auch in den beiden anderen dargestellte Anzuchten war der Stärkegehalt in den transgenen Linien erhöht. In der Anzucht 05.09 lag in den PGN-Linien eine Erhöhung um durchschnittlich 27,9%, in der Linie BGA_31 um 18,9% vor. In der Anzucht 07.10 war der Knollenstärkegehalt in den PGN-Linien um in Mittel 56,2% und in der Linie BGA_31 um 22,6% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Der Stärkegehalt in Knollen konnte um durchschnittlich 45,7% erhöht werden, wie der Bilanz des Knollenstärkegehalts aus Abbildung 54 zu entnehmen ist.

Grundsätzlich zeigten die dreifach transgenen PGN-Linien, dass sie mehr Stärke in den Knollen akkumulieren konnten als Wildtyppflanzen. Zudem konnte der bereits gesteigerte Stärkegehalt in Knollen von BGA_31-Pflanzen in AGN-Pflanzen weiter gesteigert werden.

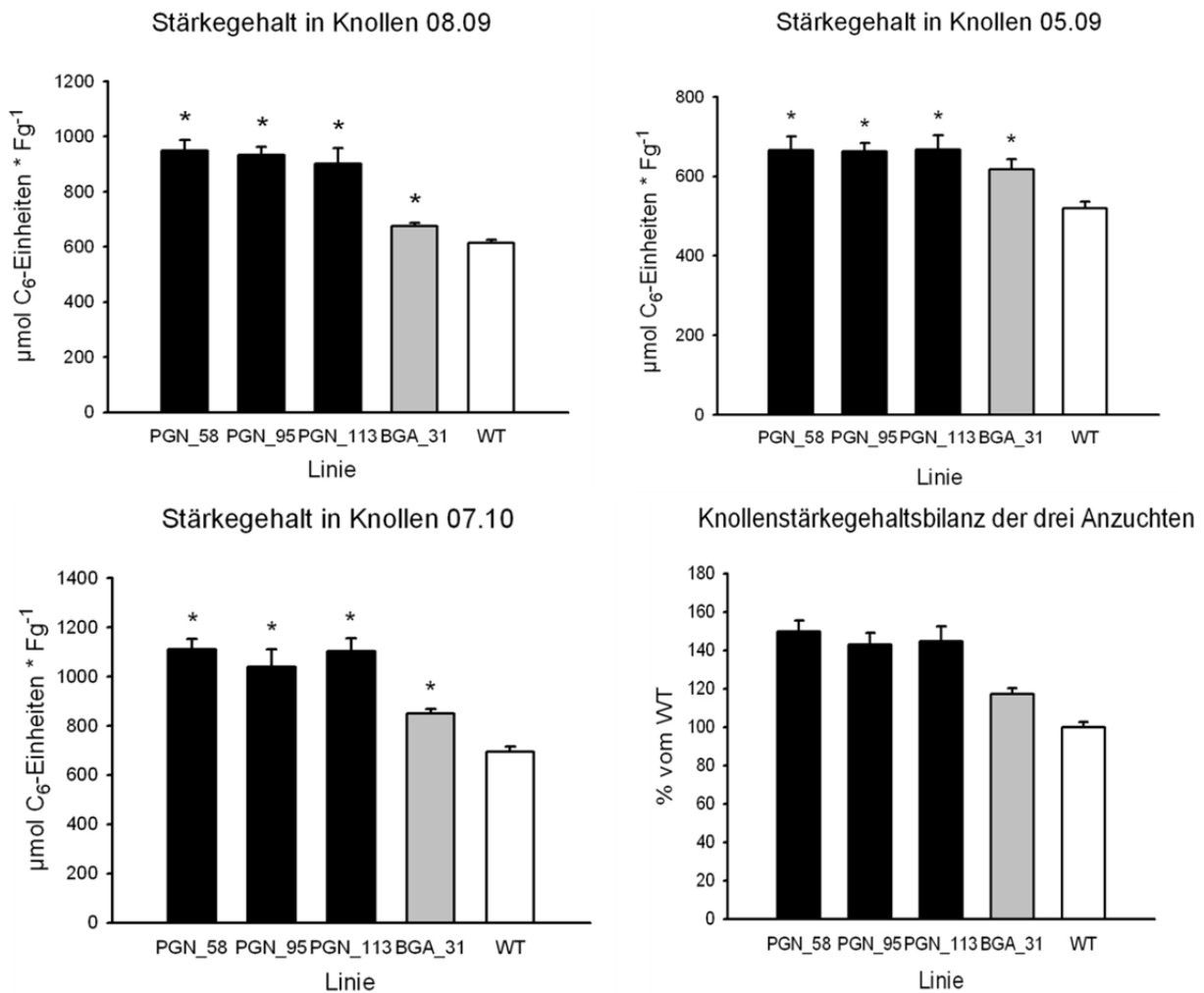


Abbildung 54: Stärkegehalte in Kartoffelknollen in µmol C₆-Einheiten pro g Frischgewicht (Fg) von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=6-8 (08.09) und n=5-10 (05.09, 07.10) Messungen ± Standardfehler; * = signifikant (p < 0,05). Die Knollenertragsbilanz stellt die Mittelwerte der drei dargestellten Anzuchten (08.09, 05.09 und 07.10) in % vom Wildtyp dar.

3.2.4.10 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze ist beschrieben als die Menge an Stärke, die pro Pflanze aus den Knollen gewonnen werden kann und kann durch Multiplikation des Stärkegehalts von Knollen mit dem Knollenertrag pro Pflanze ermittelt werden. Zur Analyse des Stärkeertrags pro Pflanze dienen die Ergebnisse aus 3.2.4.8 und 3.2.4.9. Die Endergebnisse sind in Abbildung 55 zusammengestellt. In allen transgenen PGN- und *BGA_31*-Linien war der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Anzucht 08.09 war der Stärkeertrag in den PGN-Linien durchschnittlich um den Faktor 2,6 und in der Linie *BGA_31* um den Faktor 1,5 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Mai 2009 Anzucht wurde der

Stärkeertrag durchschnittlich um den Faktor 1,8 in den PGN-Linien und um 1,4 in der BGA_31-Linie gesteigert. Auch in der Anzucht 07.10 war der Stärkeertrag in den PGN-Linien im Mittel um den Faktor 3,2 und in der BGA_31-Linie um den Faktor 1,3 erhöht. Der Stärkeertrag in den AGN-Linien wurde in allen gezeigten Anzuchten durchschnittlich um den Faktor 2,5 im Vergleich zum Wildtyp erhöht, wie die Bilanz in Abbildung 55 zeigt.

Die Ergebnisse der präsentierten Ernten zeigen, dass die PGN-Pflanzen einen eindeutig gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanzen aufweisen. Dies lässt sich durch den erhöhten Knollenertrag pro Pflanze und den erhöhten Stärkegehalt in Kartoffelknollen erklären.

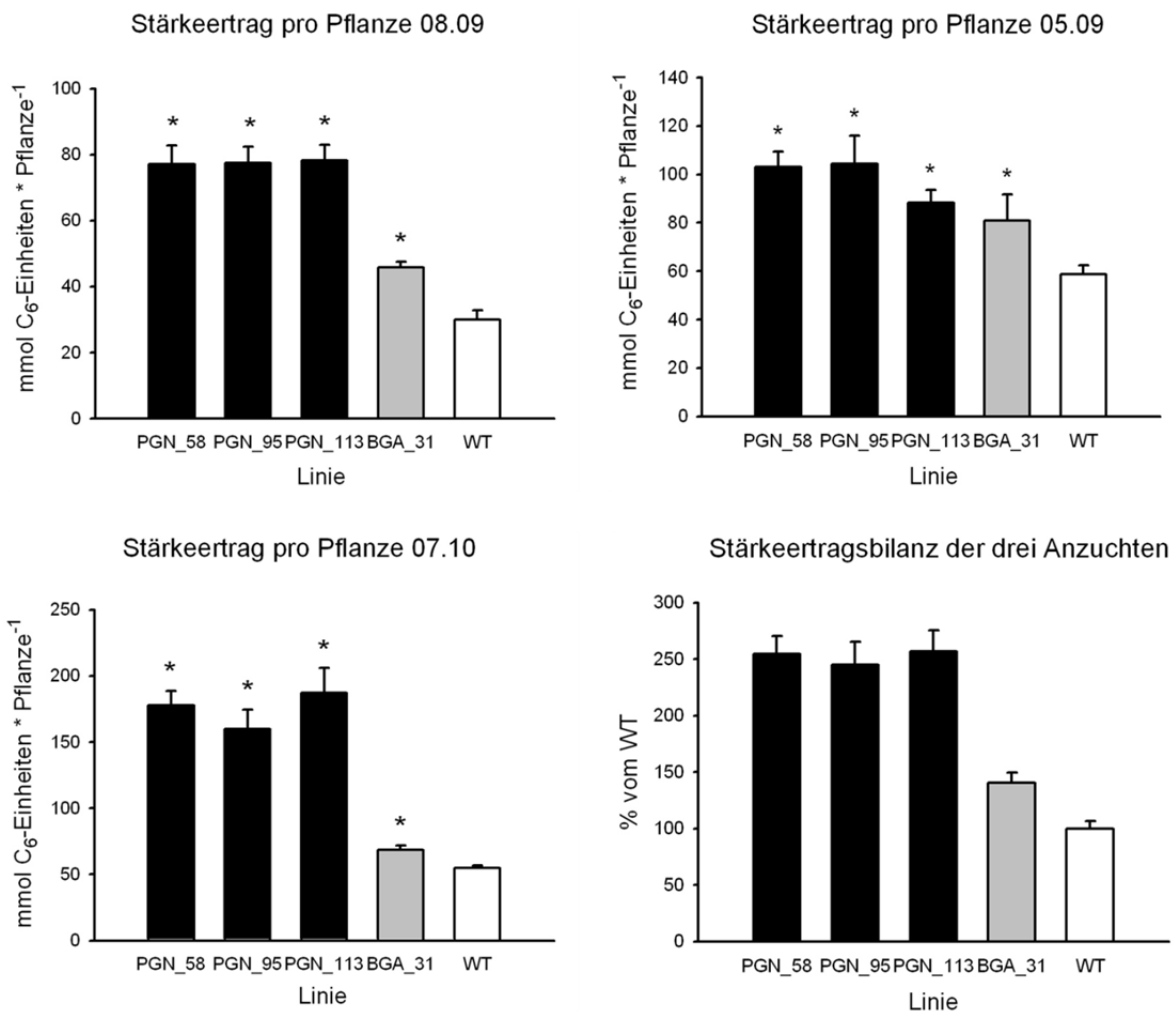


Abbildung 55: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C₆-Einheiten pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus n=6-8 (08.09) und n=5-10 (05.09, 07.10) Messungen ± Standardfehler gebildet worden; * = signifikant (p < 0,05). Die Stärkeertragsbilanz stellt die Mittelwerte der drei dargestellten Anzuchten (08.09, 05.09 und 07.10) in % vom Wildtyp dar.

3.2.4.11 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Zur Vervollständigung der Charakterisierung der PGN-Linien wurden die Gehalte der löslichen Zucker in Kartoffelknollen analysiert. Die Gehalte der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose in Knollen von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen von zwei Anzuchten (08.09 und 04.08) sind in Abbildung 56 zusammengestellt. In beiden Analysen traten keine signifikanten Unterschiede in der Zuckerakkumulation von PGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp auf. Nur in der Linie PGN_95 war der Fruktosegehalt im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. Zusammenfassend zeigten die Zuckeranalysen von PGN-Linien, dass die simultane Überexpression der *EcPPase*, des *PsGPT* und *AtNTT1* keinen Einfluss auf die Akkumulation der löslichen Zucker in Knollen hat.

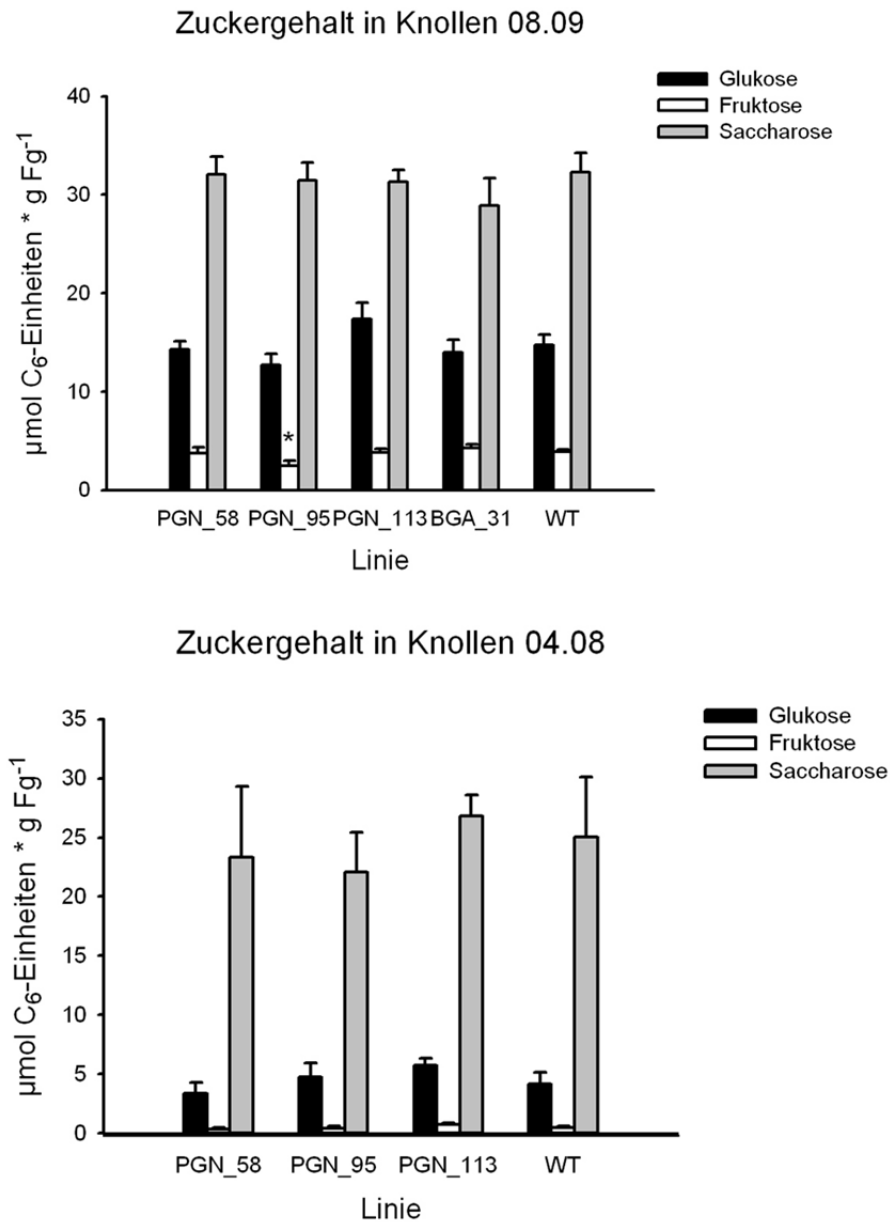


Abbildung 56: Gehalte an löslichen Zuckern in Kartoffelknollen von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen in $\mu\text{mol C}_6\text{-Einheiten pro g Frischgewicht (Fg)}$.

PGN-Linien sind transgene Kartoffelpflanzen, die die *EcPPase* mesophyllspezifisch und den *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die *BGA_31*-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp. Die Werte sind Mittelwerte aus $n=3-5$ (08.09) und $n=6-8$ (04.08) Einzelwerten \pm Standardfehler gebildet worden; * = signifikant ($p < 0,05$).

3.3 Ist dieser biotechnologische Ansatz auf andere Nutzpflanzen übertragbar?

Unter Anwendung zweier biotechnologischer Ansätze konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die simultane Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu einer Steigerung des Knollenertrags und der Knollenstärke in Kartoffelpflanzen führt (s. 3.1 und 3.2). Kartoffelpflanzen besitzen die Eigenschaft, die während des Tages akkumulierte Blattstärke während der Nacht nicht vollständig abzubauen. Daher besteht die Möglichkeit, dass dieser noch vorhandene Stärkeanteil anderweitig genutzt werden könnte und z. B. zu den *sink* Organen weitergeleitet werden könnte.

Der Stärkegehalt in Kartoffel- und Tabakblättern wurde in verlängerten Dunkelphasen analysiert. Dafür wurde den Pflanzen aus dem Gewächshaus Blattproben entnommen (Zeitpunkt 0), anschließend wurden sie in eine Dunkelkammer transferiert und nach 18,5 und 25,5 Stunden Blattproben entnommen. In Kartoffelpflanzen wurde nach 18,5 Stunden Dunkelheit ein Reststärkegehalt von 75,9% detektiert. Nach 25,5 Stunden Dunkelheit betrug der Reststärkegehalt 14,8%. In Tabakblättern hingegen konnte nach 18,5 Stunden ein Reststärkegehalt von 23,9% und nach 25,5 Stunden von 4,1% detektiert werden. Vergleicht man die Stärkeakkumulation in verlängerter Dunkelheit beider Pflanzen, so fällt auf, dass die Blattstärke in Kartoffelpflanzen im Gegensatz zu Tabakpflanzen im Verlauf der Dunkelperiode langsamer abgebaut wurde. Der Abbau betrug in der Kartoffelpflanze nach 18,5 Stunden Dunkelheit 24,1%, wohingegen in der Tabakpflanze 76,1% abgebaut wurde (nicht gezeigt).

Es konnte gezeigt werden, dass der Stärkespeicher in Kartoffelblättern nach längeren Dunkelperioden nicht völlig ausgeschöpft ist und die akkumulierte Blattstärke möglicherweise nicht vollständig für grundlegende metabolische Prozesse erforderlich ist. In diesem Hintergrund konnten die beiden biotechnologischen Ansätze erfolgreich angewandt werden. Um eine Vorstellung darüber zu erhalten, wie der Zeitverlauf der Blattstärkemenge in Nutzpflanzen ist, wurde diese in diesen analysiert, um mögliche Ähnlichkeiten oder Unterschiede im Vergleich zur Kartoffelpflanze festzustellen.

3.3.1 Blattstärkeakkumulation in Nutzpflanzen während verlängerter Dunkelphasen

Die Stärkeakkumulation in Blättern von Nutzpflanzen sollte nach verlängerter Dunkelheit analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde von zahlreichen biotechnologisch bedeutsamen im Gewächshaus angezogenen Nutzpflanzen zunächst um 17 Uhr (Zeitpunkt 0) Blattproben entnommen. Nach vier Stunden wurden nochmals Blattproben genommen; anschließend

wurden die Pflanzen für die restliche Dauer des Versuchs in eine Dunkelkammer transferiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. In Abbildung 57 sind die Ergebnisse der Blattstärkeanalysen verschiedener Nutzpflanzen in verlängerter Dunkelheit dargestellt. Es ist der prozentuale Stärkegehalt bezogen auf Zeitpunkt 0 in Prozent angegeben. Soweit nichts anderes erwähnt ist, wurden Proben von adulten Blättern entnommen, die keine Anzeichen von Seneszenz zeigten. Die Nutzpflanzen wurden vor Versuchsbeginn fotografiert, so dass das Entwicklungsstadium der jeweiligen Nutzpflanze aus den Fotos in Abbildung 57 bzw. 58 entnommen werden kann.

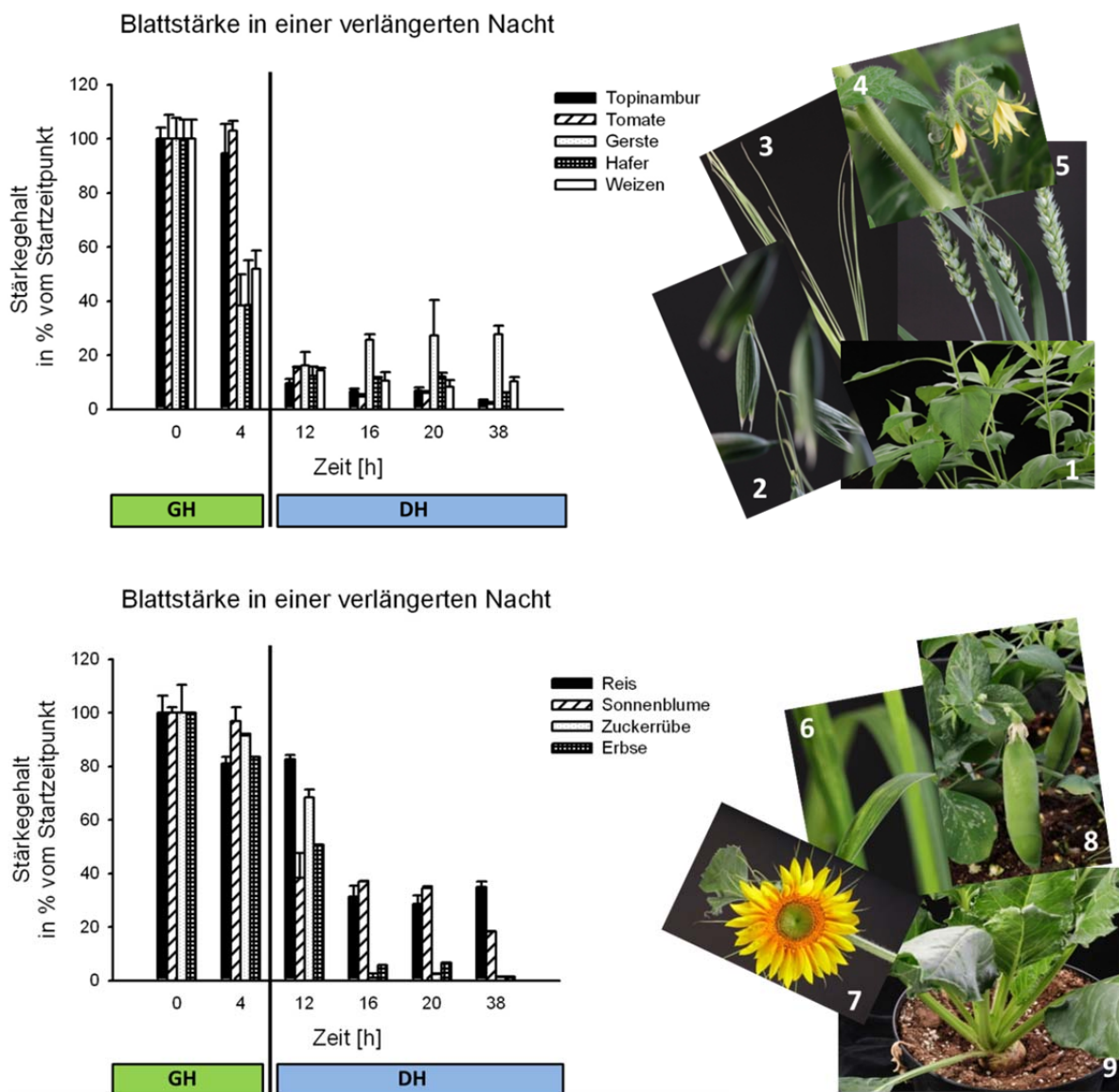


Abbildung 57: Stärkegehalt in Blättern von Nutzpflanzen in einer verlängerten Dunkelphase.

Der Stärkegehalt in Blättern ist in % vom Startzeitpunkt (0 h) dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte von $n=3$ Pflanzen \pm Standardfehler. GH = Pflanzen im Gewächshaus, Versuchsstartzeitpunkt 0 (17 Uhr, Tag 1), nach 4 h (21 Uhr, Tag 1) Probenahme. DH = Pflanzen in Dunkelraum; Probenahme nach 12 (9 Uhr, Tag 2), 16, 20 und 38 h nach Transfer in Dunkelraum (21 Uhr, Tag 1). Unter Normalbedingungen würde die Beleuchtung im Gewächshaus um 7 Uhr, Tag 2 angeschaltet werden. Nummerierung der Photos: 1 = Topinambur; 2 = Gerste; 3 = Hafer; 4 = Tomate; 5 = Weizen; 6 = Reis; 7 = Sonnenblume; 8 = Erbse; 9 = Zuckerrübe.

In dem oberen Diagramm von Abbildung 57 sind die Zeitverläufe der Blattstärke von Topinambur-, Tomaten-, Gerste-, Hafer- und Weizenblättern dargestellt. Topinambur (*Helianthus tuberosus*) ist eine Nutzpflanze, deren Wurzelknolle in erster Linie als Nahrungsmittel verwendet wird. Zunehmend steigt jedoch auch das Interesse an der Nutzung als Energiepflanze. Im Gewächshaus blieb der Blattstärkegehalt zwischen 17 und 21 Uhr konstant. Nach 12 Stunden Dunkelheit nahm der Blattstärkegehalt um 85,2% ab und nahm in den folgenden 26 Stunden Dunkelheit langsam weiter ab. Am Endzeitpunkt betrug der Stärkegehalt 3% bezogen auf den Startzeitpunkt.

Die Tomatenpflanze (*Solanum lycopersicum*) wird hauptsächlich als Nahrungsmittel verwendet. Der Blattstärkeverlauf ähnelte dem der Topinamburpflanze.

Gerste (*Hordeum vulgare*), Hafer (*Avena sativa*) und Weizen (*Triticum aestivum*) haben hauptsächlich eine ernährungsphysiologische Bedeutung für Menschen, sind jedoch auch für die Tiermast von Bedeutung. Als Blattmaterial wurde das Fahnenblatt verwendet, dies ist das der Ähre nächstgelegene obere Blatt. Die Assimilationsleistung des Fahnenblattes hat eine große Bedeutung für die Ertragsausbildung (Feucht et al., 1982). Betrachtet man den Blattstärkeverlauf dieser Nutzpflanzen, so nahm der Stärkegehalt bereits von 17 (Zeitpunkt 0) zu 21 Uhr im Gewächshaus um durchschnittlich 57,1% ab. Nach zwölf Stunden Dunkelheit nahm der Stärkegehalt weiter ab; der Reststärkegehalt betrug zum Endzeitpunkt nach 38 Stunden Dunkelheit 14,7%, bezogen auf den Startzeitpunkt.

Im unteren Diagramm von Abbildung 57 sind die Blattstärkemengen im Zeitverlauf von Reis-, Sonnenblumen-, Zuckerrüben- und Erbsenblättern dargestellt. Die Erbsenpflanze (*Pisum sativum*) ist eine wichtige Nutzpflanze; nach zwölf Stunden Dunkelheit konnte eine Abnahme des Stärkegehalts um 32,6% detektiert werden. Am Ende der Zeitverlaufsanalysen war der Stärkegehalt in Blättern fast vollständig abgebaut. Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) ist eine Kulturpflanze, die hauptsächlich zur Zuckerherstellung angebaut wird, gewinnt aber zunehmend auch für die Herstellung von Bioethanol und Biogas an Bedeutung. Nach zwölf Stunden Dunkelheit war der Stärkegehalt um 23,0% abgebaut, was z. B. im Vergleich zu den analysierten Getreidearten relativ wenig war. Die Blattstärke war jedoch nach 16 Stunden Dunkelheit vollständig abgebaut.

Eine weitere wichtige Nutzpflanze ist die Sonnenblume (*Helianthus annuus*), die hauptsächlich als Ölpflanze in der Landwirtschaft angebaut wird. Hier betrug der Stärkegehalt nach zwölf Stunden 38,3% und nach 38 Stunden Dunkelheit 18,3% der Blattstärke vom Startzeitpunkt.

Reis (*Oryza sativa*) gehört zu den Grundnahrungsmitteln der Menschen. Nach zwölf Stunden Dunkelheit konnte - bezogen auf den Startzeitpunkt - eine Abnahme des Stärkegehaltes um 17,4% detektiert werden, nach 38 Stunden Dunkelheit eine Abnahme um 65,0%. Dieser

Stärkeabbau war, verglichen mit den anderen Nutzpflanzen wie z. B. Zuckerrübe oder Erbse, recht langsam.

Fasst man die Zeitverlaufsanalysen der Blattstärkemengen der Nutzpflanzen in verlängerter Dunkelheit zusammen, so fällt auf, dass die Blattstärke von Topinambur, Tomate, Gerste, Hafer und Weizen bereits nach zwölf Stunden Dunkelheit zum größten Teil abgebaut war. Der Stärkeabbau in Blättern von Reis-, Sonnenblumen-, Zuckerrüben- und Erbsenpflanzen verlief langsamer, womit bei diesen Nutzpflanzen die am Tag akkumulierte Blattstärke während der Nacht nicht vollständig abgebaut wird.

Abschließend wurde der Zeitverlauf der Blattstärkemengen in verlängerter Dunkelheit in Rapspflanzen (*Brassica napus*) analysiert. Aus der Rapssaat wird Rapsöl gewonnen, das als Speiseöl und Futtermittel verwendet wird, aber auch als Biokraftstoff. Die Pflanzen waren 155 Stunden in einer Dunkelkammer, die Ergebnisse der Stärkegehalte sind in Abbildung 58 dargestellt. Es ist auffällig, dass der Stärkegehalt nur sehr langsam abnahm, nach 155 Stunden war der Stärkegehalt bezogen auf den Startzeitpunkt um 54,9% reduziert.

Die Analyse der Blattstärkeakkumulation in verlängerten Dunkelperioden zeigte, dass bei einigen Nutzpflanzen die Blattstärkemengen nicht vollständig abgebaut wird. Aufgrund dieser Daten könnte es sich lohnen, den bereits in Kartoffelpflanzen etablierten biotechnologischen Ansatz auf diese Nutzpflanzen zu übertragen.

Blattstärke in Rapsblättern in einer verlängerten Nacht

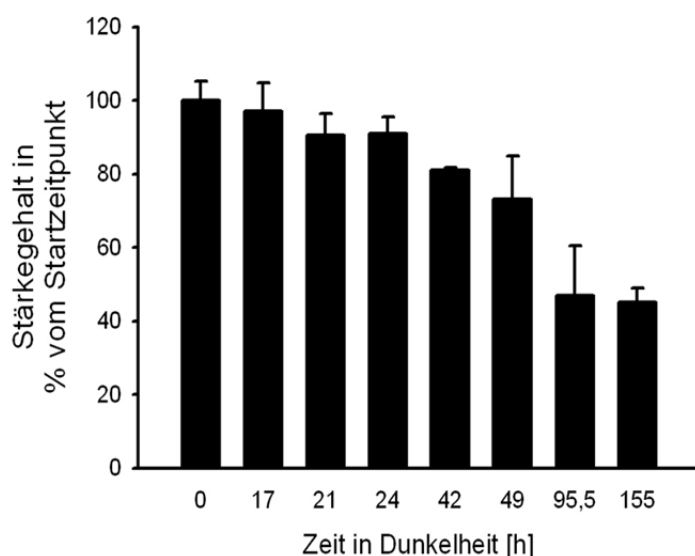


Abbildung 58: Stärkegehalt in Blättern von Rapspflanzen in einer verlängerten Dunkelfase. Der Stärkegehalt in Blättern ist in % vom Startzeitpunkt (0 h) dargestellt. GH = Pflanzen im Gewächshaus; DH = Pflanzen in Dunkelraum. Die Werte sind Mittelwerte von n=3 Pflanze \pm Standardfehler.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit Hilfe von zwei biotechnologischen Ansätzen die Frage zu beantworten, ob die gleichzeitige Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu einer Steigerung des Knollenertrages und der Knollenstärke in Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp führt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierungen von AGN- und PGN-Pflanzen aus Gewächshausanzuchten vor dem theoretischen Hintergrund erörtert. Ein weiteres Anliegen war die Untersuchung der AGN-Linien während einer Beetzucht, sowie der Vergleich der daraus gewonnenen Erkenntnisse mit Ergebnissen aus dem Gewächshaus.

Außerdem werden Möglichkeiten diskutiert, Erkenntnisse aus diesem biotechnologischen Ansatz auf andere kommerziell bedeutende Nutzpflanzen anzuwenden, da ein wichtiges Ziel der klassischen Pflanzenzüchtung und der biotechnologischen Forschung darin besteht, den Pflanzenertrag zu erhöhen.

4.1 Die Auswirkungen einer erhöhten *source* und *sink* Kapazität auf Kartoffelpflanzen im Gewächshaus

Es sollte analysiert werden, wie sich eine Erhöhung der *source* Kapazität durch blattspezifische Repression der *StAGPase* oder durch mesophyllspezifische Überexpression der *EcPPase* auf den Knollenertrag und die Stärkemenge in Knollen auswirkt, wenn gleichzeitig die *sink* Kapazität erhöht ist. Die Erhöhung der *sink* Kapazität erfolgte durch knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und des *AtNTT1*. In AGN- und PGN-Linien konnten in den Blättern *StAGPase*- bzw. *EcPPase*-Transkripte und in den Knollen *PsGPT* und *AtNTT1*-Transkripte erfolgreich nachgewiesen werden (s. 3.1.2 und 3.2.2.). Dass diese Transkripte auch funktionale Genprodukte herstellen, konnte durch Aktivitätsanalysen der *AGPase* (s. 3.1.3) in Blättern der AGN-Linien bzw. der *PPase* (s. 3.2.3) in Blättern von PGN-Linien gezeigt werden. Auf die Bestimmung der *GPT*- und *NTT*-Aktivität in Knollen wurde verzichtet, da diese erhöhten Aktivitäten bereits analysiert und veröffentlicht worden sind (Zhang et al., 2008).

4.1.1 Inhibierung der Stärkebiosynthese in Blättern von AGN- und PGN-Pflanzen

Untersuchungen der Blattstärkeakkumulation in AGN- und PGN-Pflanzen haben gezeigt, dass die Manipulation der *source* Kapazität eine reduzierte Stärkeakkumulation zur Folge

hat. In AGN-Linien wurden um maximal 57,7% und in PGN-Linien um maximal 58,8% verringerte Stärkemengen im Vergleich zum Wildtyp detektiert (s. 3.1.4.2 und 3.2.4.2).

Die AGPase wurde in den AGN-Linien blattspezifisch reprimiert. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von G1P und ATP zu PPi und ADP-Glukose. Das freigesetzte PPi wird zu Pi umgesetzt, wodurch die AGPase-Reaktion irreversibel wird. ADP-Glukose dient als Substrat für die nachfolgende Stärkesynthese, wobei die AGPase in Kartoffeln durch 3-PGA aktiviert und durch Phosphat gehemmt wird (Sowokinos und Preiss, 1982). Zudem konnte gezeigt werden, dass die AGPase z. B. durch Dithiothreitol (DTT) oder Thioredoxin aktiviert wird (Fu et al., 1998; Ballicora et al., 2000). Während des Aktivierungsvorganges werden die Disulfidbrücken zwischen den Cys82-Resten der beiden kleinen, katalytischen Untereinheiten gespalten. Dadurch geht die inaktive Disulfidform in eine inaktive Dithiolform über. Nach Inkubation mit ADP-Glukose erfolgt der Übergang in die aktivierte Dithiolform. Die Aktivierung ist durch Oxidation mit DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)) reversibel (Fu et al., 1998). In Kartoffelknollen konnte gezeigt werden, dass die AGPase nicht nur durch Zugabe von DTT, sondern auch durch Zugabe von hohen Zuckermengen *in vitro* aktiviert werden kann. *In vivo* korreliert die Aktivierung der AGPase stark mit einer Erhöhung der Saccharosemenge (Tiessen et al., 2002). Auch in Kartoffelblättern wird die AGPase posttranslational reguliert. Die Überführung von der dimerisierten in die monomerisierten Form geht mit einer Aktivitätssteigerung einher. Die Belichtung isolierter Chloroplasten führt zur Monomerbildung, wohingegen die Dunkelinkubation von vorbelichteten Blättern zur Dimerbildung führt. Es wurde festgestellt, dass das Ausmaß der Monomerisierung mit den Zuckergehalten korreliert und am Tag höher ist. Durch diesen posttranslationalen Regulationsmechanismus wird die Stärkesyntheseregulation nach Verfügbarkeit von Licht und Zuckern ermöglicht (Hendriks et al., 2003).

Die Bedeutung der AGPase für die Stärkebiosynthese höherer Pflanzen wird deutlich, wenn Untersuchungen betrachtet werden, in denen die AGPase inhibiert wurde (Müller-Röber et al., 1992). Die Repression der katalytischen Untereinheit B der AGPase mittels antisense Technologie unter der Kontrolle des konstitutiven 35S *CaMV* Promotors hat zur Folge, dass in transgenen Kartoffelpflanzen der Stärkegehalt in Blättern um das Zehnfache reduziert ist. Zudem führt die Inhibierung der Stärkesynthese zur Überführung eines stärkespeichernden *sink* Organs in ein Zuckerspeicherndes und hat Einfluss auf den Entwicklungsprozess der Knollenbildung, was sich in einer erhöhten Knollenanzahl pro Pflanze und pro Stolon äußert. Die Repression der AGPase äußert sich zudem in einer Abnahme des Trockenknollengewichts um 30 bis 40% jedoch in einer Erhöhung des Wasseranteils in Knollen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Knollenzellen aufgrund der hohen Zuckerakkumulation einem hohen osmotischen Stress ausgesetzt sind, der einen erhöhten Wassergehalt in Knollen zur Folge hat (Müller-Röber et al., 1992). Um die negativen Auswirkungen der

konstitutiven AGPase-Repression unter der Kontrolle des 35S *CaMV* Promotors zu vermeiden, wurde die katalytische Untereinheit der AGPase B in einem weiteren Ansatz und auch im Rahmen dieser Dissertation unter der Kontrolle des blattspezifischen Promotors *StLS1* (Stockhaus et al., 1989) reprimiert. Dies hat einen reduzierten Stärkegehalt in Blättern zur Folge; jedoch keinen Einfluss auf die Akkumulation der löslichen Zucker. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Reduktion der Stärkekapazität in Blättern der Transport von Assimilaten in die Knollen erhöht wird (Leidreiter et al., 1995). Der Promotor des *StLS1* Gens ist ausschließlich in photosynthetisch aktivem Gewebe aktiv (Stockhaus et al., 1989), daher wurde keine AGPase-Aktivitätsminderung in Knollen festgestellt und damit auch keine Beeinflussung des Knollenwachstums (Leidreiter et al., 1995). Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Dissertation bestätigt; eine Folge der um bis zu 39,8% reduzierten AGPase-Aktivität war eine verringerte Blattstärkeakkumulation (s. 3.1.3 und 3.1.4.2). Betrachtet man die reduzierten Stärkemengen in Bezug auf die reduzierte AGPase-Aktivität, so fällt auf, dass in den von Leidreiter et al. (1995) untersuchten Linien die AGPase-Restaktivität zwischen 5 und 10% lag, und dies hatte 20 bis 50% reduzierte Stärkemengen im Vergleich zum Wildtyp zur Folge. Damit war die Restaktivität im Vergleich zu den AGN-Pflanzen, wo diese bei 60,2% lag, deutlich geringer. In einer weiteren Studie wurden ebenfalls Kartoffelpflanzen analysiert, die die AGPase blattspezifisch reprimieren. In Linien mit einer Restaktivität der AGPase von 26% konnten deutlich verringerte Blattstärkegehalte festgestellt werden (Ludewig et al., 1998). Vergleicht man diese Erkenntnisse mit den AGN-Linien, in denen eine Restaktivität von 60,2% eine um bis zu 57,7% reduzierte Stärkemenge im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hat, so ist die Restaktivität viel höher und hat trotzdem einen eindeutigen Einfluss auf den Blattstärkemetabolismus. Diese Unterschiede lassen sich womöglich durch die zusätzlich erhöhte *sink* Kapazität in den AGN-Linien erklären. Die Erhöhung der *sink* Kapazität hat zur Folge, dass die erhöhte Nachfrage an Photoassimilaten durch einen Assimilatfluss aus den *source* Organen befriedigt wird.

In den AGN-Pflanzen wurde der Fluss von Photoassimilaten in die Blattstärkesynthese reduziert, was aufgrund der verringerten Blattstärkegehalte deutlich wird (s. 3.1.4.2). Dadurch sollte der Fluss in die Saccharosesynthese erhöht werden und damit eine Erhöhung der *source* Kapazität einhergehen (s. 4.1.2). Im zweiten biotechnologischen Ansatz sollte die Erhöhung der *source* Kapazität dadurch erzielt werden, eine PPase im Cytosol von Mesophyllzellen überzuexprimieren, wo diese im Wildtyp nicht exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde die PPase aus *Escherichia coli* unter der Kontrolle des Promotors der cytosolischen *Fruktose-1,6-bisphosphatase* (*FBPase*) aus Kartoffeln exprimiert. Dieser Promotor ist ausschließlich in Mesophyllzellen der Blätter aktiv und wird nicht in den Geleitzellen des Phloems exprimiert (Ebneith, 1996).

In den Blättern der generierten PGN-Linien nimmt der Stärkegehalt als Konsequenz der um bis zu 70,1% erhöhten PPase-Aktivität um maximal 57,7% ab (s. 3.2.3 und 3.2.4.2). Der verringerte Blattstärkegehalt lässt sich dadurch erklären, dass die im Cytosol der Mesophyllzellen exprimierte PPase das durch die Saccharosesynthese entstandene PPi zu Pi hydrolysiert. PPi entsteht zum einen durch die Reaktion der pyrophosphatabhängigen PFK und zum anderen durch die Reaktion der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase. Die Hydrolyse des daraus entstandenen PPi hat zur Folge, dass einerseits aufgrund Substratmangels die Rückreaktion in Richtung Glykolyse inhibiert wird und andererseits das Pi im Cytosol ansteigt und mehr Gegentauschsubstrat für den Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) (Flügge et al., 1989) zur Verfügung steht. Dadurch können mehr Photoassimilate aus den Chloroplasten aus- und in die Saccharosesynthese eingeschleust werden, wodurch der geringere Blattstärkegehalt zu erklären wäre. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Überexpression der cytosolischen, anorganischen PPase aus *Escherichia coli* in Kartoffelpflanzen zu einer Umlenkung der Kohlenhydratverteilung in Richtung Zuckersynthese führt, was sich in erhöhten Saccharose- und verringerten Stärkeleveln in *source* Blättern äußert. In Kartoffelknollen konnten erhöhte Zucker- und verringerte Stärkemengen detektiert werden, was durch einen gestörten Saccharosetransport in die Geleitzellen als Konsequenz einer reduzierten Effizienz der Saccharoseverwertung durch die SuSy in Abwesenheit von PPi erklärt wurde. Zudem waren die Mengen an UDP-Glukose in Knollen erhöht und an Hexosephosphaten reduziert (Jelitto et al., 1992; Sonnewald, 1992). PPi wird für eine effiziente Phloembeladung benötigt, da die Saccharose in den Geleitzellen sonst nicht zur ATP-Gewinnung verwendet werden kann. ATP ist jedoch notwendig, um den Protonengradienten für den Import von Saccharose in den Geleitzellen aufrecht zu erhalten (Sonnewald, 1992). Aus weiterführenden Analysen in Tabakpflanzen kann gefolgert werden, dass die spezifische Überexpression der anorganischen PPase in Blattmesophyllzellen die Exportkapazität in Blättern erhöht, ohne das *sink* Gewebe zu beeinflussen (Lerchl et al., 1995), weshalb die *EcPPase* mesophyllspezifisch überexprimiert wurde. Somit stehen in den PGN-Linien mehr Photoassimilate zum Transport in das *sink* Gewebe zur Verfügung, die nicht für die Blattstärkesynthese verwendet werden.

Beide biotechnologischen Ansätze zur Erhöhung der *source* Kapazität resultieren in einer reduzierten Blattstärkeakkumulation im Vergleich zu Wildtyppflanzen. In Blättern von Kartoffelpflanzen ist es möglich, die Stärkesynthese zu reduzieren, da Kartoffelblätter im Gegensatz zu z. B. Blättern von *Arabidopsis thaliana* die während des Tages gebildete transitorische Stärke während der Nacht nicht vollständig abbauen. Der Verlauf der Blattstärkegehalte wurde in Kartoffelpflanzen in einem Zeitraum von 24 h analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Lichtphase 70% der Blattstärke vom Ende der

Lichtphase in Kartoffelblättern von Wildtyppflanzen detektiert werden. Somit war die Blattstärke am Ende der Nacht nicht vollständig abgebaut (s. 3.1.7.1). In einer weiteren, unabhängigen Studie zeigte die Analyse der Stärkeakkumulation in Kartoffelblättern in einem Zeitraum von 24 Stunden, dass zu Beginn der Lichtphase 30% der Stärke vom Ende der Lichtphase detektiert werden konnte (Ferreira et al., 2010). Die vorhandenen Unterschiede in der Menge an Reststärke lassen sich durch die Wahl verschiedener Kartoffelkultivare, durch Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien und unterschiedliche Anzuchtbedingungen erklären. In Blättern von *Arabidopsis thaliana* hingegen wird die während des Tages synthetisierte Stärke während der Nacht vollständig abgebaut (Gibon et al., 2004).

Um zu bestätigen, dass die verringerte Stärkeakkumulation in Blättern von AGN- und PGN-Pflanzen ausschließlich auf Manipulationen im *source* Gewebe zurückzuführen ist, wurde der Blattstärkegehalt zusätzlich in der Linie BGA_31 (Zhang et al., 2008) bestimmt. Wie erwartet, konnten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen festgestellt werden, da diese Linie ausschließlich im *sink* Gewebe manipuliert worden ist (s. 3.1.4.2 und 3.2.4.2).

4.1.2 Erhöhte Zuckerexportkapazität in AGN- und PGN-Pflanzen

Eine erhöhte *source* Kapazität ist dadurch definiert, dass mehr Photoassimilate zum Transport in die *sink* Organe (hier Knollen) zur Verfügung stehen. Da der lösliche Zucker Saccharose nicht nur ein wichtiger Speicherstoff, sondern auch die wichtigste Transportform von Assimilaten in den meisten Pflanzen, u. a. Kartoffeln ist, wäre es möglich, dass in den transgenen Linien aufgrund des reduzierten Assimilatflusses in die Blattstärkesynthese der Fluss in die Saccharosesynthese erhöht ist, was erhöhte Saccharosegehalte in Blättern zur Folge haben könnte. Die Analysen der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose in Blättern von AGN- und PGN-Pflanzen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (s. 3.1.4.3 und 3.2.4.3). In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die alleinige blattspezifische Repression der AGPase keinen Einfluss auf die Akkumulation der löslichen Zucker hat (Leidreiter et al., 1995). Um festzustellen, ob eine alternative unlösliche Einlagerung von Photoassimilaten existiert, wurde die relative Verteilung von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Komponenten mittels $^{14}\text{CO}_2$ -Pulsverfolgungsexperimenten von Kartoffelblättern bestimmt. Es zeigten sich sowohl in den PGN- als auch in den AGN-Pflanzen keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (s. 3.1.4.6 und 3.2.4.6). Bereits in früheren Analysen konnten durch $^{14}\text{CO}_2$ -Pulsverfolgungsexperimente in den von Leidreiter et al. (1995) hergestellten Pflanzen keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Die konstitutive Überexpression der *EcPPase* in Tabakpflanzen hingegen führt zu einer stark erhöhten Zucker- und Stärkeakkumulation in Blättern (Sonnewald, 1992). Dies kann dadurch

erklärt werden, dass der Hauptteil der Biomasse in Tabakblättern enthalten ist und nicht in Wurzeln oder Samen. Derselbe Ansatz in Kartoffelpflanzen führt zu einer erhöhten Saccharose- und einer verringerten Stärkeakkumulation in Blättern. Die Unterschiede zwischen Tabak- und Kartoffelpflanzen lassen sich dadurch erklären, dass Kartoffelpflanzen Knollen als *sink* Organe besitzen, die die produzierten Photoassimilate benötigen (Sonnewald, 1992). Es ist auch ein gegenteiliger Ansatz bekannt, bei dem die Erhöhung des PPI-Gehalts in Blättern zu einer Inhibierung der Saccharosesynthese in Spinatblättern führt. Dazu wurden Spinatblätter in fluoridhaltigen Lösungen inkubiert und nach Extraktion metabolisch analysiert. Es wurde festgestellt, dass der PPI-Gehalt um das Vier- bis Fünffache gestiegen ist, was mit einem UDP-Glukose-Abbau und verringerter Saccharose-Phosphat-Synthase-Aktivität einherging und eine eingeschränkte Saccharosesynthese zur Folge hatte (Quick et al., 1989).

Eine mögliche Erklärung für die unveränderte Zuckerakkumulation in den Blättern von AGN- und PGN-Pflanzen könnte sein, dass die *sink* Organe direkt größere Mengen Saccharose aufnehmen können, da ihre Kapazität auch erhöht ist. Wenn dies der Fall wäre, dann müsste die Exportkapazität der Zucker aus den Blättern im Vergleich zum Wildtyp erhöht sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die löslichen Zuckergehalte in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiole während des Tages und der Nacht bestimmt. In den AGN-Linien war die Zuckerexportkapazität um bis zu 195,8% und in den PGN-Linien um bis zu 160,9% im Vergleich zum Wildtyp erhöht (s. 3.1.4.4 und 3.2.4.4). Dadurch konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die *source* Kapazität in den transgenen Linien erhöht ist, weil die Saccharosemenge, die aus den Blättern in die *sink* Organe transportiert wird, in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. Der Photoassimilatfluss konnte in Richtung Saccharosesynthese umgelenkt werden, was durch die reduzierten Stärkegehalte in Blättern (s. 4.1.1) und die erhöhte Zuckerexportkapazität (s. o.) gezeigt wurde.

4.1.3 Gesteigerte photosynthetische Aktivität in AGN- und PGN-Pflanzen

Analysen der CO₂-Assimilation in AGN- und PGN-Pflanzen haben gezeigt, dass sich diese im Laufe der Kartoffelentwicklung verändert. Bei Messungen der CO₂-Assimilation in zehn Wochen alten AGN-Pflanzen konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. In 16 Wochen alten Pflanzen hingegen war die photosynthetische Aktivität in allen AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (s. 3.1.4.5). Dabei ist auffällig, dass die CO₂-Assimilation im zunehmenden Alter sowohl in den transgenen Linien als auch im Wildtyp stark abnahm. Die Photosynthese blieb jedoch in den transgenen Linien länger aufrecht als in Wildtyppflanzen, wodurch sich die erhöhte CO₂-

Assimilation in 16 Wochen alten AGN-Pflanzen erklären läßt. In PGN-Pflanzen konnten ähnliche Ergebnisse festgestellt werden; in zwölf Wochen alten Pflanzen war die photosynthetische Aktivität erhöht. Um jedoch aussagekräftigere Resultate zu erhalten, sollten die PGN-Pflanzen zusätzlich noch nach 16 Wochen analysiert werden (s. 3.2.4.5).

In früheren Experimenten wurde die Photosyntheserate von Kartoffelblattscheiben mittels $^{14}\text{CO}_2$ bereits zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten analysiert, und es zeigten sich charakteristische Veränderungen, die nicht im Zusammenhang mit der Seneszenz des Einzelblattes lagen. Es erwies sich folgender Verlauf als typisch: in der frühen Entwicklung ist die Photosyntheserate hoch, während des Knollenansatzes fällt sie leicht ab, erreicht ein Maximum im Laufe der Speicherphase, und dann folgt ein starker Abfall infolge zunehmender Seneszenz (Moll, 1980). Dieser Verlauf bestätigt die Erkenntnisse, die aus

Feucht et al., 1982¹. Betrachtet man den Blattstärkeverlauf, so fällt ab. Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass sich die transgenen Pflanzen länger in der Speicherphase befinden (1995). Wildtyppflanzenkartoffelpflanzen wurden auch in Hinblick auf eine veränderte photosynthetische Aktivität mittels IRGA analysiert. Hierzu wurde die CO_2 -Assimilation während der Lichtphase gemessen, doch es zeigten sich zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp keine signifikanten Differenzen. Hier bleibt jedoch die Frage offen, ob sich die von Leidreiter et al. (1995) analysierten Pflanzen zum Versuchszeitpunkt bereits am Ende der Speicherphase befanden.

4.1.4 Unbeeinflusstes Grüngewicht in AGN- und PGN-Pflanzen

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass ein manipulierter Kohlenhydratmetabolismus nicht nur Auswirkungen auf die Stärkeakkumulation in Blättern (s. 4.1.1) oder die Zuckerexportkapazität (s. 4.1.2) in den transgenen AGN- und PGN-Linien hat, sondern auch das Wachstum der oberirdischen grünen Pflanzenteile beeinflusst. Die Bestimmung der oberirdischen, grünen Pflanzenteile hat gezeigt, dass zwar bei manchen Anzuchten die Tendenz bestand, dass in den transgenen Linien weniger grüne Pflanzenteile gebildet wurden als im Wildtyp, jedoch handelte es sich hierbei nicht um reproduzierbare, signifikant verringerte Veränderungen (s. 3.1.4.1 und 3.1.6.1). Demnach haben die im Rahmen dieser Dissertation vorgenommenen Manipulationen der *source* Kapazität keine Auswirkungen auf das Grüngewicht. Darüber hinaus zeigten die durchgeführten Metabolitanalysen mittels GC-MS, dass der Aminosäurestoffwechsel sowie der Citratzyklus in den transgenen Pflanzen nicht beeinträchtigt ist (s. 3.1.4.7 und 3.2.4.7).

In früheren Studien, bei denen die AGPase blattspezifisch in Kartoffelblättern reprimiert wurde, konnte ebenfalls ein unverändertes Grüngewicht festgestellt werden (Leidreiter et al., 1995). Wurde die AGPase konstitutiv herunterreguliert, so traten ebenfalls keine großen Veränderungen auf. Es war lediglich auffällig, dass die transgenen Linien eine erhöhte Tendenz zeigten, Achselsprosse auszubilden und einen früheren Blühzeitpunkt haben (Müller-Röber et al., 1992). Im Fall der konstitutiven *EcPPase*-Überexpression zeigten die transgenen Kartoffelpflanzen eine im Vergleich zum Wildtyp ähnliche Entwicklung; zu beobachten war nur ein leicht verringertes Pflanzengewicht, das Ausbilden zusätzlicher Triebe und die etwas verringerte Blattfläche im Vergleich zum Wildtyp (Sonnewald, 1992). Über die Auswirkungen einer mesophyllspezifischen Überexpression der *EcPPase* auf die Kartoffelpflanzenentwicklung ist bisher nichts bekannt.

Gewöhnlich wird in Kartoffelpflanzen ein Teil der in den *source* Organen synthetisierten Assimilate zu den *sink* Organen transportiert, der andere Teil dient als Energielieferant, der für das Wachstum und den Erhalt grundlegender metabolischer Prozesse der grünen Pflanzenteile erforderlich ist. Wenn die Kapazität zur Aufnahme von Photoassimilaten in den *sink* Organen erhöht wird, ist es möglich, dass diese erhöhte Nachfrage durch eine erhöhte *source* Kapazität ausgeglichen wird. In den dreifach transgenen Kartoffelpflanzen scheint dieses Prinzip zu funktionieren, da die erhöhte *source* Kapazität ausreicht, den erhöhten Bedarf der *sink* Organe auszugleichen, ohne dass dies Auswirkungen auf das Wachstum der grünen Pflanzenteile hat.

4.1.5 Erhöhter Knollenertrag und Stärkegehalt in Knollen von AGN und PGN-Pflanzen

Die *sink* Organe der Kartoffelpflanze sind auf die Energieversorgung durch die *source* Organe angewiesen, was vor allem für die Knollen zum Wachstum und der Produktion von Speicherstärke essentiell ist. Um zu prüfen, ob die manipulierte Energiezufuhr der beiden biotechnologischen Ansätze positive Auswirkungen auf den Knollenertrag und den Stärkegehalt in Knollen hat, wurden beide Parameter in den dreifach transgenen Pflanzen in mehreren Anzuchten analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Knollenertrag sowohl in den AGN- als auch in den PGN-Pflanzen deutlich im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Der Ertrag konnte verglichen mit der doppelt transgenen BGA_31-Linie zusätzlich erhöht werden (s. 3.1.4.8 und 3.2.4.8). Auch die Analysen der Stärkegehalte in Kartoffelknollen von AGN- und PGN-Pflanzen zeigten eindeutige Steigerungen im Vergleich zu Knollen des Wildtyps und der BGA_31-Linie (s. 3.1.4.9 und 3.2.4.9). Der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze, was im landwirtschaftlichen Anbau ein Parameter für Ertragssteigerungen ist, war sowohl in den AGN- als auch in den PGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp und zu der

Linie BGA_31 signifikant erhöht (s. 3.1.4.10 und 3.2.4.10). Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass beide biotechnologische Ansätze einer Erhöhung der *source* Kapazität in Kombination mit einer erhöhten *sink* Kapazität zu signifikanten Ertragssteigerungen führen.

Es ist auffällig, dass das Knollengewicht der Kartoffelpflanze und der Stärkegehalt in Knollen in den verschiedenen Anzuchten innerhalb eines Gewächshauses variierten. Dies ist dadurch erklärbar, dass der Wassergehalt der Pflanze für das Frischgewicht entscheidend ist und demzufolge Knollen mit höherem Wassergehalt ein höheres Frischgewicht haben. Vergleicht man Pflanzen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Ernte gegossen worden sind, so fällt auf, dass das Frischgewicht umso höher ist, je näher der Zeitpunkt des Gießens am Erntezeitpunkt liegt. Der Stärkegehalt in Knollen bezogen auf das Frischgewicht ist in Pflanzen kleiner, die aufgrund eines höheren Wassergehalts mehr Frischgewicht aufweisen. Daher lassen sich nur die Stärkegehalte in Pflanzen der gleichen Anzucht miteinander vergleichen, da der Wassergehalt in diesen Pflanzen vergleichbar ist. Würde man den Stärkegehalt auf das Trockengewicht beziehen, dann lassen sich auch verschiedene Anzuchten miteinander vergleichen, da der variable Faktor Wassergehalt eliminiert wurde.

Abweichende Stärkegehalte in Knollen können zudem durch unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Probenahme erklärt werden. Der Stärkegehalt nimmt von der Schale in Richtung Knollenn Mittelpunkt um etwa 40% ab. Somit beträgt der durchschnittliche Stärkegehalt einer 30 g schweren Knolle im Schalenbereich 1000 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht, in Richtung Mittelpunkt nimmt der Gehalt bis zu 600 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht ab (Bologa et al., 2003). Aus diesem Grund wurde bei der Knollenprobenahme sehr viel Wert darauf gelegt, dass die Proben immer aus dem selben Bereich der Knolle entnommen wurden.

In einer früheren Studie führte die Überexpression der beiden auch hier verwendeten Transportergene in Knollen zu einer Erhöhung der *sink* Stärke, d. h. die Knollen nehmen mehr angelieferte Photoassimilate auf. Um die *sink* Stärke zu erhöhen, wurde der Metabolitransporter Glukose-6-Phosphat/Phosphatranslokator (GPT) aus *Pisum sativum* (Kammerer et al., 1998) und der Adenylatranslokator (NTT1) aus *Arabidopsis thaliana* (Kampfenkel et al., 1995) unter der Kontrolle des knollenspezifischen B33 Patatin Promotors (Rocha-Sosa et al., 1989) exprimiert. Transgene Kartoffelpflanzen, die diese beiden Transporter überexprimieren, weisen bereits einen erhöhten Knollenertrag und Stärkegehalt in Knollen auf (Zhang et al., 2008). Die knollenspezifische Überexpression des AtNTT1 in Kartoffelpflanzen, die bereits den PsGPT knollenspezifisch überexprimieren, führt zu einem um 19% erhöhten Knollenertrag und um 28% erhöhten Stärkegehalt in Knollen (Zhang et al., 2008). Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass beide Metabolitransporter für die Erhöhung des Knollenertrages und der Knollenstärke in Wildtyppflanzen notwendig sind. Es konnte gezeigt werden, dass die separate knollenspezifische Überexpression des AtNTT1 oder PsGPT unter der Kontrolle des B33 Promotors keinen Einfluss auf Knollenausbeute und

Knollenstärkegehalt hat. Somit ist die Stärkebildung in Amyloplasten sowohl durch den Import von Energie in Form von ATP, als auch von Kohlenstoffgrundgerüsten in Form von Glukose-6-Phosphat limitiert.

Die ATP-Versorgung von Amyloplasten ist, wie schon früher gezeigt werden konnte, sehr wichtig, da eine Antisense-Repression des *StNTT1* in Kartoffelpflanzen unter Kontrolle des *35S CaMV*-Promotors zu verringerten Knollenstärkegehalten führt. Des Weiteren hat die Repression des *StNTT* Auswirkungen auf Knollenmorphologie und -anzahl. Dies äußert sich in einer erhöhten Knollenanzahl, wobei die einzelnen Knollen, verglichen mit Wildtypknollen, kleiner sind und eine längliche Knollenform ausbilden, mit der Tendenz der Knospung zusätzlicher Knollen ausgehend von der Hauptknolle (Tjaden et al., 1998). In Kartoffelpflanzen mit verringerter *NTT*-Aktivität konnte festgestellt werden, dass das Amylose/Amylopektin-Verhältnis der Knollenstärke verringert ist. Auch die Morphologie der Stärkekörner ist verändert, was sich in einer im Vergleich zum Wildtyp kleineren Stärkekorngröße äußert (Geigenberger et al., 2001).

Die konstitutive Überexpression des *AtNTT1* hat keine signifikanten Auswirkungen auf Knollenanzahl und -morphologie. Es konnten zwar Linien mit erhöhtem Stärkegehalt selektiert werden, die aber einen geringeren Knollenertrag aufwiesen. Die Pflanzen zeigten außerdem einen zum Teil kleineren Wuchs sowie gelbliche, verschrumpelte Blätter (Tjaden et al., 1998). Um den negativen Einfluss einer konstitutiven Überexpression auf die oberirdischen Pflanzenteile zu verhindern, wurde in den von Zhang et al. (2008) hergestellten Pflanzen der knollenspezifische Promotor *B33* gewählt.

Die Auswirkungen verringerter *GPT*-Aktivitäten in Kartoffelpflanzen sind bisher noch nicht veröffentlicht, doch Untersuchungen an *GPT*-RNAi-Pflanzen mit reduzierter *GPT1*- und *2*-Aktivität zeigten reduzierte Knollenerträge und Knollenstärkegehalte (Ludewig, unveröffentlicht). In Mutanten von *Arabidopsis thaliana* führt ein Mangel an *AtGPT1* zu letalen Gametophyten, als Konsequenz eines eingeschränkten oxidativen Pentosephosphatstoffwechsels durch limitierte Verfügbarkeit von *G6P*. Die transgenen Pflanzen enthielten weniger Lipide, und Stärkekörner fehlten vollständig (Niewiadomski et al., 2005). In Samen der schwarzen Ackerbohne (*Vicia narbonensis*) führt eine *GPT*-Repression zu einer reduzierten Stärkeakkumulation (Rolletschek et al., 2007).

In Analysen von *BGA*-Linien wurde deutlich, dass die erhöhten Stärkeerträge die Konsequenz einer erhöhten Verfügbarkeit der *AGPase*-Substrate ATP und Hexosephosphat sind (Zhang et al., 2008). Erhöht man in den *BGA*-Linien zusätzlich die *source* Kapazität, dann kann der Knollenertrag und Stärkegehalt in Knollen weiter gesteigert werden. Es zeigt sich, dass die *BGA*-Linien *source* limitiert sind, weil die parallele Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu weiteren Ertragssteigerungen führt, wie die Herstellung der *AGN*- und *PGN*-Pflanzen gezeigt hat. Es wäre jedoch auch der Fall möglich, dass eine stärkere

Erhöhung der GPT- und NTT-Aktivitäten zu höheren Knollenerträgen und Stärkegehalten in Knollen führen würde, dann wäre die BGA-Linie *sink* limitiert. Ob die hergestellten AGN- und PGN-Linien *sink* oder *source* limitiert sind, kann nicht klar beantwortet werden. Falls in den AGN- oder PGN-Linien eine weitere Erhöhung der *source* Kapazität zu weiteren Ertragssteigerungen führen würde, dann wären die Pflanzen *source* limitiert. Andererseits wären die AGN- oder PGN-Linien *sink* limitiert, wenn eine weitere Erhöhung der *sink* Kapazität zu weiteren Ertragssteigerungen führen würde.

4.1.6 Unveränderte Zuckergehalte in Knollen von AGN- und PGN-Pflanzen

Die Akkumulation der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurde in Knollen von AGN- und PGN-Linien analysiert, doch es konnten keine reproduzierbaren, signifikanten Veränderungen festgestellt werden (s. 3.1.4.11 und 3.2.4.11). Somit konnte gezeigt werden, dass der Saccharosetransport aus den *source* Organen in die Knollen wie in Wildtyppflanzen abläuft. Dies war in früheren Studien anders, weil z. B. die konstitutive Repression der AGPase in Kartoffeln ein stärkespeicherndes *sink* Organ aufgrund der heruntergefahrenen Stärkesynthese in ein zuckerspeicherndes *sink* Organ überführte (Müller-Röber et al., 1992). Auch die konstitutive Überexpression der *EcPPase* führte zu einer tendenziell erhöhten Zucker- und einer verringerten Stärkeakkumulation in Knollen (Sonnewald, 1992). Dies liegt darin begründet, dass der Saccharosetransport in die *sink* Organe gestört ist. Um diese für die Pflanze negativen Auswirkungen zu verhindern, erfolgte die Manipulation der *source* Kapazität in weiteren Ansätzen und auch im Rahmen dieser Dissertation durch die Wahl spezifischer Promotoren (Leidreiter et al., 1995; Lerchl et al., 1995).

4.1.7 Veränderter Entwicklungsprozess in AGN-Pflanzen

Um die Auswirkungen der *source/sink*-Manipulationen auf den Metabolismus der Pflanze näher zu analysieren, wurden die AGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp in verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert (s. 3.1.6).

Während der Knollenentwicklung treten verschiedene physiologische Veränderungen auf, wie bereits die Analysen der photosynthetischen Aktivitäten gezeigt hat (s. 3.1.4.5, 3.2.4.5 und 4.1.3). Außerdem verändert sich während der frühen Knollenentwicklung z. B. die Saccharoseentladung im *sink* Gewebe, die entweder apoplastisch oder symplastisch ablaufen kann. In der sehr frühen Knollenentwicklung, während der Elongationsphase der Stolone, ist die apoplastische Phloementladung dominierend, wechselt jedoch während der Knollenentwicklung von apoplastisch auf symplastisch (Viola et al., 2001). Zudem verläuft die

Metabolisierung der Saccharose in der frühen Knollenentwicklung anders. Generell kann die Saccharose entweder durch die apoplastische oder die cytosolische Invertase zu Glukose oder Fruktose hydrolysiert werden. Alternativ ist auch die Spaltung durch die Saccharose-Synthase zu Fruktose und UDP-Glukose möglich. In der frühen Knollenentwicklung erfolgt ein Wechsel der Saccharosespaltung durch die Invertase zu SuSy (Appeldoorn et al., 1997). Es liegt eine gegenläufige Korrelation zwischen Invertase- und SuSy-Aktivität während der Knollenentwicklung vor. Die Abnahme der Invertaseaktivität leitet den Beginn der Speicherphase ein. Es wird vermutet, dass die Zunahme der SuSy-Aktivität positiv mit der Stärke der *sink* Organe korreliert, wodurch Saccharose metabolisiert und Stärke synthetisiert wird (Zrenner et al., 1995). Darüber hinaus gibt es Studien über die Genexpression verschiedener Stoffwechselprodukte während der Knollenentwicklung (Ferne und Willmitzer, 2001; Verhees et al., 2002; Faivre-Rampant et al., 2004; Ferreira et al., 2010). In ungeschwollenen Stolonen ist die Expression verschiedener Stärkebiosynthesegene niedrig, wohingegen die Expression des Gens, das die Stärkesynthase IV kodiert, hoch ist, deren Funktion in der Stärkekörnerinitiierung liegt (Roldan et al., 2007; Szydlowski et al., 2009; Ferreira et al., 2010). In der anschließenden Knollenentwicklung steigt die Expression verschiedener Gene, die eine Funktion in der Stärkebiosynthese haben. Dazu gehören Gene, die den Import von Glukose-6-Phosphat und ATP in Plastiden und die Überführung zu ADP-Glukose kodieren, wie z. B. GPT1 und 2 (Glukose-6-Phosphat-Translokator 1 und 2), PGM (plastidäre Phosphoglukomutase), NTT1 (Adenylat-Translokator 1), AGPase LS (große Untereinheit der AGPase) und AGPase SS (kleine Untereinheit der AGPase). Zudem steigt die Genexpression von Stärkesynthasen (außer Stärkesynthase IV), von Verzweigungsenzymen und Genen, die die Saccharosespaltung kodieren. Es konnte zudem erneut bestätigt werden, dass während der anfänglichen Knollenentwicklung die Expression von Genen, welche die Invertase kodieren abnimmt und die, die SuSy kodieren zunimmt (Ferreira et al., 2010).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden das Grün- und Knollengewicht und die Akkumulation von Stärke und Zucker in Blättern und Knollen im Entwicklungsverlauf der AGN- und Wildtyp-Pflanzen analysiert und miteinander verglichen. Es zeigten sich die folgenden Auffälligkeiten: das Gewicht der oberirdischen, grünen Pflanzenteile war in allen untersuchten Entwicklungsstadien in AGN- und Wildtyppflanzen ähnlich (s. 3.1.6.1). Wenn das Grüngewicht nahe am Maximum war, setzte die Knollenbildung in den AGN- und Wildtyppflanzen ein (s. 3.1.6.1 und 3.1.6.5). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Pflanze den Energiefluss in Form von Kohlenhydraten nun nicht mehr vorrangig in den photosynthetisch aktiven Geweben zur Entwicklung der oberirdischen, grünen Pflanzenteile benötigt, sondern zur Knollenbildung.

Zu Beginn der Knollenentwicklung war die Differenz im Knollenertrag zwischen AGN- und Wildtyppflanze nicht stark ausgeprägt. In der weiteren Entwicklung verlief das Wachstum der Knollen und auch die Einlagerung der Stärke in Knollen in den AGN-Linien deutlich schneller als in Wildtyppflanzen, und die Ertragsteigerung in AGN-Pflanzen wurde sichtbar (s. 3.1.6.5 und 3.1.6.6). Es ist außerdem auffällig, dass es einen Zusammenhang zwischen der Knollenentwicklung und der Blattstärkeakkumulation gibt. Beim Einsetzen der Knollenbildung stieg die AGPase-Aktivität in Blättern von Wildtyppflanzen an, was in einer erhöhten Stärkeakkumulation in Blättern resultierte. Gründe für das Ansteigen der AGPase-Aktivität in Wildtyppflanzen zu Beginn der Knollenentwicklung sind nicht bekannt. In den AGN-Linien hingegen, blieb die AGPase-Aktivität konstant, die Stärkemenge in Blättern war beim Einsetzen der Knollenbildung tendenziell leicht verringert (s. 3.1.6.2 und 3.1.6.4). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass zu Beginn und während der fortlaufenden Knollenentwicklung verschiedene Gene, die Enzyme für den Saccharose- und Stärkemetabolismus kodieren, sehr stark in Knollen hochreguliert werden (Bachem et al., 2000; Kloosterman et al., 2005; Ferreira et al., 2010). Die hohe Nachfrage der sich entwickelnden Knolle nach Photoassimilaten wird durch den Assimilatfluss aus dem *source* Gewebe gestillt (s. 1.2.4). In AGN-Linien ist die Nachfrage nach Photoassimilaten in Knollen aufgrund der erhöhten *sink* Stärke höher als im Wildtyp. Die hohe Nachfrage kann jedoch durch die erhöhte *source* Kapazität befriedigt werden, was sich schließlich in erhöhten Stärkeerträgen in Knollen von AGN-Pflanzen zeigte (s. 4.1.5). Es ist auffällig, dass sich mit Beginn der Knollenbildung die Stärkemenge in Blättern von AGN-Pflanzen leicht verringerte. Inwieweit dies im Zusammenhang mit einem erhöhten Bedarf an Photoassimilaten in AGN-Knollen steht, der durch die *source* Organe gestillt wird, bleibt offen und muss in weiteren Analysen untersucht werden. In Wildtyp-Knollen ist die Nachfrage an Photoassimilaten geringer, und damit auch der Anteil an Saccharose, der für die Knollenstärkesynthese eingesetzt wird. Die entwicklungsabhängige Analyse zeigte, dass in Wildtyppflanzen die Stärkeakkumulation zu Beginn der Knollenbildung anstieg. Inwiefern eine Verbindung zwischen der erhöhten Blattstärkeakkumulation im Wildtyp zu Beginn der Knollenbildung und des im Vergleich zu den AGN-Linien verringerten Assimilationsflusses in die *sink* Organe steht, muss in weiteren Analysen geklärt werden.

Es wurde zudem beschrieben, dass hohe Saccharosegehalte in sich entwickelnden Stolonen die Knollenbildung begünstigen (Ferne und Willmitzer, 2001). In AGN-Linien ist die Nachfrage an Saccharose in den Knollen aufgrund der erhöhten *sink*-Kapazität im Vergleich zum Wildtyp höher. Es konnte gezeigt werden, dass in den AGN-Linien die Zuckerexportkapazität erhöht ist (s. 4.1.2), was darauf hindeutet, dass die Menge an Saccharose, die aus den *source* in die *sink* Organe transportiert wird, im Vergleich zum Wildtyp gesteigert ist. Dies deutet darauf hin, dass in den AGN-Knollen erhöhte

Saccharosemengen vorliegen, welche die Knollenbildung begünstigen. Es konnten jedoch keine erhöhten Saccharosemengen in Knollen von AGN-Linien nachgewiesen werden (s. 4.1.6), weil die Saccharose zeitnah als Substrat der Stärkesynthese dient, was sich in einer erhöhten Knollenstärkeakkumulation äußert (s. 4.1.5). Es ist jedoch notwendig, diese Hypothese in weiteren Experimenten zu überprüfen. Die Akkumulation der löslichen Zucker blieb sowohl in Blättern als auch in Knollen von AGN- und Wildtyppflanzen während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien konstant (s. 3.1.6.3 und 3.1.6.8).

4.1.8 Eventuelle Nachteile der AGN-Pflanzen in verlängerten Dunkelperioden

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die simultane Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu einer deutlichen Ertragsteigerung in Kartoffelpflanzen führte (s. 3.1.4.10 und 3.2.4.10). Da die entwicklungsabhängige Analyse der AGN-Pflanzen eine im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche Stärkeakkumulation in Blättern zeigte (s. 3.1.6.2), war es aufschlussreich zu analysieren, ob bereits Unterschiede in einem Zeitraum von 24 Stunden auftreten. Darüber hinaus sollte die Analyse der AGN-Pflanzen während einer verlängerten Dunkelperiode Aufschluss darüber geben, ob die AGN-Pflanzen aufgrund der geringeren Blattstärkeakkumulation (s. 3.1.4.2 und 3.2.4.2) das vorhandene Blattstärkedepot schneller aufbrauchen als Wildtyppflanzen und dadurch in Zeiten mit mangelnder Lichtzufuhr, z. B. bei Schlechtwetterphasen, benachteiligt sein könnten.

Die Analyse der Blattstärkeakkumulation in AGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp über einen Zeitraum von 24 Stunden hat gezeigt, dass der Stärkegehalt über Nacht abnahm und im Laufe des nächsten Vormittages wieder den Ausgangsspiegel erreichte. Der diurnale Verlauf der Stärkeakkumulation in Kartoffelpflanzen wird von früheren Studien bestätigt, bei denen der Stärkegehalt in Blättern zu Beginn des Tages am geringsten war und im Laufe der folgenden Lichtphase wieder anstieg (Ferreira et al., 2010). Die Analyse der Blattstärkeakkumulation über einen Zeitraum von 24 Stunden hat zudem gezeigt, dass die Veränderungen bei Wildtyppflanzen stärker ausfallen als bei den AGN-Pflanzen (s. 3.1.7.1). Die AGN-Linien akkumulieren als Konsequenz der reduzierten AGPase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp weniger Blattstärke. Zudem ist in den AGN-Linien die *sink* Stärke erhöht, wodurch der Bedarf an Assimilaten, die zu den Knollen transportiert werden, höher ist. Es ist auffällig, dass der Anteil der über Tag akkumulierten Blattstärke, den Wildtyppflanzen über Nacht abbauen, größer ist, als in AGN-Linien. Inwieweit dieser erhöhte Anteil in Wildtyppflanzen in photosynthetisch aktivem Gewebe zur Entwicklung der oberirdischen, grünen Pflanzenteile einfließt, ist nach den bisherigen Analysen unklar. Die Analysen der oberirdischen, grünen Pflanzenteile zeigten lediglich in manchen Anzuchten tendenziell

verringerte Grüngewichte in den AGN-Linien (s. 3.1.4.1), was darauf hindeuten würde, dass Wildtyppflanzen den Photoassimilatfluss verstärkt zur Entwicklung der oberirdischen, grünen Pflanzenteile nutzen.

Die Akkumulation der löslichen Zucker ist sowohl in den AGN- als auch in den Wildtyppflanzen zu allen untersuchten Zeitpunkten konstant (s. 3.1.7.2). In den von Ferreira et al. (2010) durchgeführten Analysen hingegen ist die Saccharoseakkumulation zu Beginn der Lichtphase am niedrigsten und steigt im Tagesverlauf an. Die unveränderten Zuckergehalte, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt worden sind, könnten darin begründet liegen, dass die Blattproben für die Zuckeranalysen um 9 Uhr genommen worden sind, wo die Pflanze nach der nächtlichen Dunkelphase bereits mehrere Stunden belichtet werden. Zudem könnten diese Abweichungen daran liegen, dass in den von Ferreira et al. (2010) durchgeführten Studien ein anderes Kartoffelkultivar, nämlich *Solanum tuberosum* cv. *Solara* verwendet wurde, sich die Pflanzen in einem anderen Entwicklungsstadium befanden oder variierende Anzuchtbedingungen vorlagen.

Die AGPase-Aktivität in Blättern von AGN-Pflanzen und Wildtyppflanzen zeigte die Tendenz einer leichten Reduktion über Nacht und dann eines Anstiegs im Verlaufe des nächsten Vormittages, wobei die Tendenz in Wildtyppflanzen stärker ausgeprägt war (s. 3.1.7.3). Diese Tendenz ist nachvollziehbar, weil die diurnale Expressionsanalyse der kleinen AGPase-Untereinheit in Kartoffelblättern am Ende der Dunkelphase die niedrigste Expression zeigt, und im Verlauf der Lichtphase wieder ansteigt (Ferreira et al., 2010). Zudem wird die AGPase, wie bereits in 4.1.1 und 1.2.1 beschrieben, durch einen redoxabhängigen, posttranslationalen Regulationsmechanismus reguliert, der eine Regulation in Abhängigkeit vom Licht ermöglicht (Hendriks et al., 2003). Während des Tages liegt die AGPase in der monomerisierten Form vor, was im Gegensatz zur Nacht, wenn sie in der dimerisierten Form vorliegt, eine höhere Aktivität zur Folge hat (Hendriks et al., 2003).

Die Analysen der AGN- und Wildtyppflanzen in einer verlängerten Dunkelperiode haben gezeigt, dass die Blattstärkegehalte im Verlauf einer verlängerten Dunkelheit stetig abnahmen. Dies ist plausibel, weil während der Dunkelphase der Stärkeabbau erfolgt, um die notwendigen Photoassimilate für die Saccharosesynthese und den Saccharoseexport zur Verfügung zu stellen. Am Ende des Versuchs war die anfängliche Differenz zwischen den AGN-Linien und dem Wildtyp nicht mehr gegeben und die Stärkeakkumulation war auf einer ähnlichen, niedrigen Stufe (s. 3.1.8.1). Die Stärkeanalyse in verlängerten Dunkelperioden hat somit gezeigt, dass nach 19 Stunden Dunkelheit die Blattstärke sowohl in den AGN-Linien als auch im Wildtyp fast vollständig abgebaut war, jedoch nicht der Fall zutrifft, dass in den AGN-Linien die Blattstärke eher abgebaut war. Somit kann nach den bisherigen Experimenten ausgeschlossen werden, dass die AGN-Linien aufgrund ihres geringeren Blattstärkegehalts in verlängerten Dunkelperioden benachteiligt sind.

4.2 Bestätigung des AGN-Phänotyps in einer Beetanzucht

In einer Freilandanzucht sind die äußeren Bedingungen wie Belichtung und Wasserversorgung, sowie Temperatur und Tageslänge nicht wie im Gewächshaus kontrollierbar. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Gewächshaus- und Freilandbedingungen ist für die praktische Anwendung eines biotechnologischen Ansatzes jedoch eine unabdingbare Voraussetzung. Im Rahmen der Dissertation von Christian Greiten wurden die BGA-Linien im Freiland angezogen, doch es konnten im Gegensatz zu Gewächshausanzuchten keine Erhöhungen im Stärkegehalt von Knollen und im Knollenertrag festgestellt werden, sondern sogar Verringerungen (Greiten, 2008). Als mögliche Ursache wurde eine in den transgenen Linien früher eintretende Seneszenz angenommen, die im Freiland beobachtet werden konnte. Somit würden die transgenen Linien ihre Speicherphase früher beenden und der Wildtyp könnte mehr Stärke in Knollen akkumulieren. Schon nach zwölf Wochen konnte bei den transgenen Linien ein signifikant geringeres Frischgewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile gemessen werden, was mit einem Rückgang im Knollenertrag korrelierte (Greiten, 2008). Um zu überprüfen, ob sich diese Beobachtungen auch für die AGN-Linien bestätigen, wurden sie zusammen mit der Linie BGA_31 und dem Wildtyp in einem Beet angebaut, wo sie sich ohne Topflimitierung, Zusatzlicht und Temperatur- und Feuchtigkeitsregulierung unter freilandähnlichen Bedingungen entwickeln konnten (s. 3.1.5). Die Analyse der oberirdischen, grünen Pflanzenteile zeigte sowohl in den AGN-Linien als auch in der Linie BGA_31 deutliche Verringerungen im Vergleich zum Wildtyp (s. 3.1.5.1). Somit bestätigten die Ergebnisse aus dieser Beetanzucht die Ergebnisse der von Greiten durchgeführten Freilandanzuchten und die Annahme liegt nahe, dass in den transgenen Linie eine verfrühte Seneszenz eintritt. Um diesbezüglich genauere Aussagen machen zu können, würde es sich anbieten, die oberirdischen grünen Pflanzenteile und die photosynthetischen Aktivitäten während einer weiteren Beetanzucht in Kartoffelpflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu analysieren. Die Analyse der photosynthetischen Aktivitäten in AGN-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien deutet darauf hin, dass die photosynthetische Aktivität der AGN-Pflanzen länger aufrecht bleibt und sich die Pflanzen dadurch länger in der Speicherphase befinden (s. 4.1.3), was gegen eine verfrühte Seneszenz sprechen würde. Nun bleibt die Frage offen, ob diese Reduktion des Grüngewichts in den transgenen Linien mit einem verringerten Knollenertrag und Stärkegehalt in Knollen korrelierte. Die Analysen der Knollenerträge haben gezeigt, dass sowohl der Knollenertrag als auch der Stärkegehalt in Knollen in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp nicht verringert war, sondern erhöht (s. 3.1.5.4 und 3.1.5.5). Die Linie BGA_31 zeigte während der gesamten Anzucht ein schlechteres Wachstum, was sich schließlich auch im Knollenertrag und Stärkegehalt in

Knollen äußerte, welche zwar einen Anstieg zeigten, aber im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verschieden waren. Ähnliche Beobachtungen sind bereits im Feld gemacht worden (Greiten, 2008). Betrachtet man jedoch die Gesamtergebnisse, dann bestätigte sich der im Freiland beschriebene Phänotyp im Beet nicht und die Reduktion des Grüngewichts hat keinen Einfluss auf Knollenertrag und Stärkegehalt in Knollen. Es wird deutlich, dass die transgenen AGN-Linien auch unter erschwerten „natürlichen“ Bedingungen den bekannten Phänotyp zeigten. Auch die Analyse der Stärke- und Zuckergehalte in Blättern (s. 3.1.5.2, 3.1.5.3) und des Knollenzuckergehalts (s. 3.1.5.7) zeigten, verglichen mit den Ergebnissen aus dem Gewächshaus, ähnliche Resultate.

4.2.1 Veränderte Stärkezusammensetzung in Knollen von AGN-Pflanzen

Die Bestimmung des Amylose/Amylopektin-Verhältnisses in Knollen von AGN- und BGA_31-Pflanzen resultierte in einem erhöhten Amylosegehalt in allen untersuchten Linien. In den AGN-Linien war der Amylosegehalt verglichen mit dem Wildtyp um 38,5% und in der Linie BGA_31 um 9,9% erhöht (s. 3.1.5.8). Die ermittelten Werte der prozentualen Zusammensetzung der Knollenstärke stimmen mit bereits veröffentlichten Werten überein. Der Amylosegehalt in Knollen von Wildtyppflanzen konnte im Rahmen dieser Dissertation auf 21,2% detektiert werden, in Zhang et al. (2008) wurde 19,4% und in Tjaden et al. (1998) 18,8% ermittelt. In den von Zhang et al. (2008) analysierten BGA-Linien wurde ein Amylosegehalt von 21,6 - 22,6% festgestellt. In antisense *AfNTT1*-Kartoffelknollen unter der Kontrolle des 35S-Promotors betrug der Amylosegehalt 11,5 - 18,0% und in sense *AfNTT1*-Kartoffelknollen lag der Amylosegehalt bei 22,7 - 27,0% (Tjaden et al., 1998).

Eine Erklärung für diese Erhöhung ist, dass es zwei verschiedene Isoformen von Stärkesynthasen gibt, granangebundene und lösliche (Visser et al., 1991; Smith et al., 1997). Die granangebundenen Isoformen sind für die Synthese der Amylose verantwortlich und haben eine niedrigere Affinität für ADP-Glukose als die löslichen Formen, die an der Amylopektinsynthese beteiligt sind (Smith et al., 1997). Da der Import von ATP und G6P in Amyloplasten für die ADP-Glukose-Synthese notwendig ist, kann angenommen werden, dass erhöhte Import-Raten mit höheren Konzentrationen an stromaler ADP-Glukose korrelieren. Dadurch erhöht sich nicht nur der Gesamtstärkegehalt, sondern auch, aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der Stärkesynthaseisoformen, die Stärkezusammensetzung. In Blättern von *Arabidopsis thaliana* wurde eine positive Korrelation zwischen hohen Stärkegehalten und hohen Amylosegehalten in unterschiedlich alten Wildtyppflanzen und stärkeakkumulierenden Mutanten festgestellt. Des Weiteren war die Aktivität der granangebundenen Stärkesynthase in Blättern von stärkeakkumulierenden Mutanten erhöht,

wohingegen die Aktivität der löslichen Stärkesynthese der des Wildtyps ähnelte (Zeeman et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der Amylosegehalt in Knollen von BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. In AGN-Pflanzen wurde dieser Effekt weiter verstärkt, was dadurch erklärbar ist, dass im Vergleich zur Linie BGA_31 mehr Saccharose angeliefert werden kann, wodurch mehr G6P und ATP importiert werden kann. Dadurch wurde nicht nur der Gehalt an ADP-Glukose erhöht, sondern auch der von Amylose.

4.3 Die Besonderheit dieses biotechnologischen Ansatzes

Die Kartoffelpflanze ist aufgrund ihres hohen Stärkegehalts in Knollen eine wichtige Nutzpflanze und hat sowohl für die Lebensmittelproduktion als auch für verschiedene industrielle Anwendungen einen bedeutenden Stellenwert. Dies zeigt sich darin, dass es ca. 600 unterschiedliche Produkte gibt, die aus pflanzlicher Stärke gewonnen werden (Ball et al., 1996). Somit ist die Etablierung neuer Ansätze z. B. zur Ertragssteigerung von Kartoffelknollen für die Pflanzenzüchtung und auch für die angewandte biotechnologische Forschung eine wichtige Aufgabe.

Ein klassischer Ansatz, die Stärkesynthese in Kartoffelknollen zu erhöhen, bestand in der Überexpression des Schlüsselenzyms der Stärkesynthese, der AGPase (Stark et al., 1992). Durch die knollenspezifische Überexpression einer AGPase aus *Escherichia coli* (glgC16), die nicht allosterisch reguliert ist, konnte eine Erhöhung des Stärkegehalts in Knollen erzielt werden. Diese Daten konnten jedoch in ähnlichen Ansätzen, in denen lediglich eine andere Kartoffelsorte gewählt wurde, nicht bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der AGPase-Aktivität keinen langanhaltenden Effekt auf den Knollenstärkegehalt hat, weil ein Nebeneffekt der Aktivitätserhöhung eine erhöhte Stärkedegradation war (Sweetlove et al., 1996a, b). Weitere Versuche, Knollenertrag und -stärke in Kartoffeln zu erhöhen, beinhalteten u. a. die Manipulation des Adenylatgleichgewichts (Regierer et al., 2002), der *de Novo* Pyrimidin-Synthese (Geigenberger et al., 2005) oder der SuSy-Aktivität (Baroja-Fernandez et al., 2009). Im ersten genannten Beispiel wurde die Aktivität der plastidären Adenylatkinase reduziert, was zu einer Erhöhung der Adenylatmenge führte und in der Kartoffelpflanze einen erhöhten Knollenertrag und -stärkegehalt zur Folge hatte. Das Knollengewicht war bis zu 39% und der Stärkegehalt bis zu 60% verglichen mit dem Wildtyp erhöht. Damit konnte gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von ATP im Stroma als Konsequenz der reduzierten Adenylatkinaseaktivität den Stärkeertrag in Kartoffeln erhöht (Regierer et al., 2002). Diese Ertragssteigerung konnte in einer nachfolgenden Studie dadurch erklärt werden, dass die AGPase in einem höheren Aktivierungszustand vorlag, der durch einen größeren Adenylatpool und eine bessere Verfügbarkeit von ATP erreicht wurde (Oliver et al., 2008). Bisher wurde jedoch nicht analysiert, ob in diesen Pflanzen neben der

erhöhten ATP-Verfügbarkeit als zusätzlicher Nebeneffekt auch eine erhöhte Verfügbarkeit an Glukose-6-Phosphat vorliegt. Diese Vermutung liegt nahe, da gezeigt werden konnte, dass die separate Überexpression des *PsGPT* oder *AtNTT1* und die damit einhergehende erhöhte Verfügbarkeit von Glukose-6-Phosphat oder ATP keinen Einfluss auf den Knollenertrag und den Stärkegehalt in Kartoffelknollen hat. Erst die simultane Überexpression beider Transporter und damit die erhöhte Verfügbarkeit beider Assimilate führt zu den erwünschten Steigerungen (Zhang et al., 2008). Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre es sinnvoll, in denen von Regierer et al. (2002) hergestellten Pflanzen die GPT-Aktivität zu bestimmen, die möglicherweise durch einen pleiotropen Effekt hochreguliert sein könnte.

Im Fall der Inhibierung der *de novo* Pyrimidinsynthese wurde durch Antisense-Inhibierung der UMP-Synthase, dem Schlüsselenzym der *de novo* Pyrimidinsynthese, die Pyrimidinwiederverwertung und der Uridinnukleotidgehalt erhöht. Dies hatte einen gesteigerten Fluss von ^{14}C -markierter Saccharose in die Stärke und erhöhte Stärkegehalte in Knollen zur Folge (Geigenberger et al., 2005).

Im dritten genannten Beispiel resultierte die konstitutive Überexpression der SuSy in Kartoffelknollen, mit einer erhöhten SuSy-Aktivität und Gehalten an UDP-Glukose und ADP-Glukose im Vergleich zu Wildtypknollen. Zudem enthielten die Knollen 35 bis 55% mehr Stärke und das Knollentrockengewicht war im Vergleich zu Kontrollpflanzen erhöht (Baroja-Fernandez et al., 2009).

Die beschriebenen Studien zeigen, dass es bereits verschiedene vielversprechende Ansätze gibt, den Knollenertrag und den Stärkegehalt in Knollen zu erhöhen. Die Frage, welcher biotechnologische Ansatz in Bezug auf Knollenertrag und Knollenstärke nun der effizienteste ist, bleibt offen. Es ist schwierig, die prozentualen Erhöhungen der unterschiedlichen Ansätze miteinander zu vergleichen, weil das Wachstum der Kartoffelpflanzen, aber auch die Ernte und die nachfolgende Probenaufarbeitung von vielen Parametern abhängig und damit unterschiedlich sein kann. In Abschnitt 4.1.5 wurden bereits verschiedene Möglichkeiten thematisiert, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Die Besonderheit des hier gewählten biotechnologischen Ansatzes liegt darin begründet, dass nicht nur die *source* oder *sink* Kapazität manipuliert worden sind, sondern beide. Damit ist es in zwei unabhängigen Ansätzen gelungen, dreifach transgene Kartoffelpflanzen herzustellen, AGN- und die PGN-Pflanzen (s. 3.1 und 3.2), die eine erhöhte *source* und *sink* Kapazität zeigen. Zudem zeigt sich, dass sich beide Möglichkeiten einer erhöhten *source* Kapazität in Kombination mit einer erhöhten *sink* Kapazität als wirksam erwiesen haben, den Knollenertrag (s. 3.1.4.8 und 3.2.4.8) und die Knollenstärke (s. 3.1.4.9 und 3.2.4.9) effizient im Vergleich zu Kontrollpflanzen zu erhöhen. Demnach konnte der bereits veröffentlichte Ansatz, bei dem durch alleinige Manipulation der *sink* Kapazität eine Ertragsteigerung in

Knollen und eine Knollenstärkegehaltssteigerung erfolgreich erzielt werden konnte, zusätzlich verbessert werden.

4.4 Transfer der gewonnenen Erkenntnisse auf andere Nutzpflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu erhöhten Stärkeerträgen pro Pflanze in Kartoffelpflanzen führt (s. 3.1 und 3.2). Kartoffelpflanzen besitzen die Eigenschaft, die während des Tages akkumulierte Blattstärke während der Nacht nicht vollständig abzubauen, dieser noch vorhandene Stärkeanteil könnte möglicherweise anderweitig genutzt werden und zu den *sink* Organen weitergeleitet werden. Um zu überprüfen, wie die Stärkeakkumulation in Blättern kommerziell bedeutsamer Nutzpflanzen ist, wurde sie in verlängerten Dunkelphasen analysiert (s. 3.3). Die Analysen zeigten, dass die Blattstärke von Topinambur, Tomate, Gerste, Hafer und Weizen bereits nach zwölf Stunden Dunkelheit zum größten Teil abgebaut war. Der Blattstärkeabbau von Zuckerrübe, Raps, Reis, Erbse und Sonnenblume verlief langsamer. Besonders Raps zeigte einen sehr langsamen Stärkeabbau in verlängerten Dunkelperioden (s. 3.3.1). Es könnte sich somit lohnen, den bereits in Kartoffelpflanzen etablierten Ansatz auf diese Nutzpflanzen zu übertragen. Ein Ziel der biotechnologischen Forschung ist, ertragreichere Kulturpflanzen auf den Markt zu bringen, um die Effizienz der Landwirtschaft zu erhöhen. In Rapspflanzen ist es z. B. sinnvoll, die Ausbeute der Rapssaat zu erhöhen, woraus Rapsöl gewonnen wird. In Zuckerrüben liegt das Ziel der biotechnologischen Forschung z. B. darin, den Saccharosegehalt in Vakuolen von Zuckerrüben und die Zuckerrübenenertrag zu steigern.

In Hinblick auf den Transfer des Ansatzes auf andere Nutzpflanzen ist die Aufklärung der *source/sink*-Beziehungen essentiell, d. h. ob der Ertrag der jeweiligen Pflanze *source* oder *sink* limitiert ist. Um dies aufzuklären, sind Manipulationen der *source/sink*-Beziehungen häufig hilfreich. Die Erhöhung der *source* Kapazität könnte durch blattspezifische Repression der AGPase erfolgen. Diese Inhibition der Blattstärkesynthese könnte in den Nutzpflanzen, wie bereits in Kartoffelpflanzen gezeigt werden konnte, zu einer verringerten Blattstärkeakkumulation führen und den Assimilatfluss in die Saccharosesynthese umleiten (s. 4.1.1 und 4.1.2.). Dadurch würden mehr Assimilate für den Transport in die *sink* Organe zur Verfügung stehen, was den Ertrag beeinflussen könnte, wenn die Pflanze *source* limitiert wäre.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, durch Optimierung des Saccharosetransportes aus den *source* in die *sink* Organe, die *source* Kapazität zu erhöhen. Dies würde jedoch z. B. in Zuckerrüben nur funktionieren, wenn die Ausbeute und Zuckergehalte in Rüben *source*-

limitiert sind. Durch Überexpression eines SUT1-ähnlichen Saccharosetransporters in den Geleitzellen des Phloems könnte die Effizienz des Transportes gesteigert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die konstitutive Überexpression von SUT1 aus Spinat in Kartoffeln zwar keinen Einfluss auf den Knollenstärkegehalt und Knollenertrag hat, aber die Saccharoseakkumulation in den Blättern verringert und in den Knollen erhöht ist, was auf einen erhöhten Saccharoseexport hindeutet, obwohl die *sink* Stärke nicht erhöht war. (Leggewie et al., 2003).

Die Erhöhung der *sink* Kapazität könnte in Zuckerrüben durch Optimierung der Saccharoseentladung in die Zuckerrübenvakuolen erfolgen, z. B. durch Überexpression verschiedener Zuckertransporter. Bisher ist der Mechanismus der Saccharoseentladung nicht vollständig aufgeklärt, da das Wissen über vakuoläre Transporter, die für den vakuolären Saccharosetransport verantwortlich sind, nicht bekannt ist. Durch die Analyse tonoplastidärer Fraktionen hochreiner Mesophyllvakuolen, konnte gezeigt werden, dass *HvSUT2* und das *AtSUT4*-Homolog an vakuolären Transport- und Speicherprozessen von Saccharose beteiligt sind (Endler et al., 2006). Der vakuoläre Transportmechanismus beruht auf einem Saccharose/H⁺-Antiport, wofür Energie, z.B. ATP aus der Saccharosespaltung, benötigt wird (Wyse, 1979; Getz, 1991). Durch rübenspezifische Überexpression dieser Saccharosetransporter könnte die *sink* Kapazität in Zuckerrüben erhöht werden.

Um in den Nutzpflanzen sowohl *source* als auch *sink* Kapazität gleichzeitig zu erhöhen, könnte der tonoplastidäre Monosaccharidtransporter (TMT1) aus *Arabidopsis thaliana* konstitutiv überexprimiert werden. In *Arabidopsis thaliana* gibt es drei Isoformen des TMT, wobei der TMT3 im Gegensatz zu TMT1 und 2 nur schwach exprimiert wird (Wormit et al., 2006). Die Überexpression des TMT1 in *Arabidopsis thaliana* führt zu einem erhöhten Import von Monosacchariden in isolierte Mesophyllvakuolen im Vergleich zu Vakuolen von Wildtyp-Blättern. Dadurch waren die Monosaccharidgehalte in Vakuolen von TMT1-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp erhöht und im Cytosol verringert. Dadurch war die transkriptionelle Runterregulation von zuckerreprimierten Genen nicht mehr möglich und die Expression des Gens *suc2*, das den Saccharosetransporter SUC2 kodiert war erhöht. Die Überexpressionslinien zeigten eine erhöhte Zuckerexportkapazität was möglicherweise an einer effizienteren Phloembeladung liegt, was auf eine erhöhte *source* Kapazität hindeutet. Es konnte zudem ein schnelleres Wachstum sowohl auf Erde als auch auf glukosehaltigen Medien gezeigt werden, und die Samenausbeute sowie der Öl- und Proteingehalt in Samen war in den TMT1-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Wormit et al., 2006; Wingenter et al., 2010).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass zum einen zunächst geklärt werden sollte, ob der Ertrag der jeweiligen Nutzpflanzen *source*- oder *sink*-limitiert ist. Anschließend könnte in den *source* Geweben z. B. entweder die AGPase blattspezifisch reprimiert oder die PPase

mesophyllspezifisch überexprimiert wird, wodurch die *source* Kapazität gesteigert werden könnte. Die Erhöhung der *sink* Kapazität könnte dadurch erzielt werden, unter Kontrolle *sink* spezifischer Promotoren spezifische Transportergene überzuexprimieren, die an der Synthese der jeweiligen Speicherstoffe beteiligt sind.

5 Fazit

Die von den dreifach transgenen Pflanzen erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu deutlichen Steigerungen des Knollenertrags und des Stärkegehalts in Kartoffelpflanzen unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus führt. In AGN- bzw. PGN-Pflanzen ist der Stärkeertrag pro Pflanze durchschnittlich um den Faktor 2,4 bzw. 2,5 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der Linie BGA_31, deren *sink* Kapazität durch gleichzeitige knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* erhöht ist, ist der Stärkeertrag pro Pflanze um den Faktor 1,4 erhöht (Zhang et al., 2008). Somit führt die zusätzliche Erhöhung der *source* Kapazität, was durch zwei unterschiedliche Ansätze - blattspezifische Repression der *StAGPase* oder mesophyll-spezifische Überexpression der *EcPPase* - erfolgte, zu weiteren Ertragssteigerungen. In einer Beetzucht unter freilandähnlichen Bedingungen konnten die Ergebnisse für die AGN-Pflanzen bestätigt werden. Es bleibt abzuwarten, ob dies auch für die PGN-Pflanzen zutrifft und ob sich der beschriebene Phänotyp der dreifach transgenen Pflanzen in Freilandanzuchten bestätigt.

Die Analyse der AGN-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien im Vergleich zum Wildtyp zeigt ein ähnliches Wachstum der oberirdischen grünen Pflanzenteile. Die Knollenbildung setzte ein, sobald das Grüngewicht nahe am Maximum war, da die Pflanze den Photoassimilatfluss nicht mehr vorrangig zur Entwicklung der oberirdischen, grünen Pflanzenteile benötigt, sondern zur Knollenbildung. Analysen der photosynthetischen Aktivität zeigte, dass diese in AGN-Linien länger aufrecht erhalten bleibt, was darauf hindeutet, dass sich die dreifach transgenen Linien länger in der Speicherphase befinden als der Wildtyp, was von biotechnologischem Interesse sein könnte.

Die hier gesammelten Erkenntnisse in Kartoffelpflanzen können zudem dazu beitragen, neue Perspektiven bei der Herstellung von Nutzpflanzen zur Ertragssteigerung zu berücksichtigen, da diese von großem biotechnologischem und züchterischem Interesse sind. Mit diesem Ansatz konnte erstmalig gezeigt werden, dass die gleichzeitige Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu deutlichen Ertragssteigerungen führt.

6 Literaturverzeichnis

- Appeldoorn, N.J.G., De Bruijn, S.M., Koot-Gronsveld, E.A.M., Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D. und Van der Plas, L.H.W.** (1997). Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose phosphate during early tuberisation of potato. *Planta* **202**, 220-226.
- Appeldoorn, N.J.G., De Bruijn, S.M., Koot-Gronsveld, E.A.M., Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D. und Van der Plas, L.H.W.** (1999). Developmental changes in enzymes involved in the conversion of hexose phosphate and its subsequent metabolites during early tuberization of potato. *Plant, Cell & Environment* **22**, 1085-1096.
- Bachem, C., Van der Hoeven, R., Lucker, J., Oomen, R., Casarini, E., Jacobsen, E. und Visser, R.** (2000). Functional genomic analysis of potato tuber life-cycle. *Potato Research* **43**, 297-312.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P. und Preiss, J.** (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**, 349-352.
- Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y., Schurmann, P. und Preiss, J.** (2000). Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 1315-1320.
- Baltscheffsky, M., Schultz, A. und Baltscheffsky, H.** (1999). H⁺-PPases: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters* **457**, 527-533.
- Baluska, F., Cvrckova, F., Kendrick-Jones, J. und Volkmann, D.** (2001). Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiology* **126**, 39-46.
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Montero, M., Etxeberria, E., Sesma, M.T., Ovecka, M., Bahaji, A., Ezquer, I., Li, J., Prat, S. und Pozueta-Romero, J.** (2009). Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiology* **50**, 1651-1662.
- Bologa, K.L., Fernie, A.R., Lisse, A., Loureiro, M.E. und Geigenberger, P.** (2003). A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology* **132**, 2058-2072.
- Bradford, M.M.** (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M. und Smith, S.M.** (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **26**, 89-100.
- Davies, J.M., Poole, R.J., Rea, P.A. und Sanders, D.** (1992). Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proceedings National Academy of Sciences United States of America* **89**, 11701-11705.
- Dewitt, N.D. und Sussman, M.R.** (1995). Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* **7**, 2053-2067.
- Ebneth, M.** (1996). Expressionsanalyse des Promotors einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M., Steup, M. und Ritte, G.** (2007). Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial beta-amylases. *Plant Physiology* **145**, 17-28.

- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.I. und Fischer, K.** (2002). The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiology* **128**, 512-522.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E. und Schmidt, U.G.** (2006). Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis mesophyll* cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196-207.
- Faivre-Rampant, O., Cardle, L., Marshall, D., Viola, R. und Taylor, M.A.** (2004). Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene. *Journal of Experimental Botany* **55**, 613-622.
- Fernie, A.R. und Willmitzer, L.** (2001). Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* **127**, 1459-1465.
- Ferreira, S., Senning, M., Sonnewald, S., Keßling, P.-M., Goldstein, R. und Sonnewald, U.** (2010). Comparative transcriptome analysis coupled to X-ray CT reveals sucrose supply and growth velocity as major determinants of potato tuber starch synthesis. *BMC Genomics* **11**, 1471-2164.
- Fettke, J., Poeste, S., Eckermann, N., Tiessen, A., Pauly, M., Geigenberger, P. und Steup, M.** (2005). Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme. *Plant Cell Physiology* **46**, 1987-2004.
- Feucht, D., Schmitz, M. und Hofner, W.** (1982). Veränderungen der Blattspreiten und des Chlorophyllgehaltes der Fahnenblätter von Winterweizen durch Wachstumsregulatoren. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **145**, 288-295.
- Fincher, G.B.** (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 305-346.
- Fischer, K. und Weber, A.** (2002). Transport of carbon in non-green plastids. *Trends in Plant Science* **7**, 345-351.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Hausler, R.E. und Flügge, U.I.** (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **9**, 453-462.
- Flügge, U.I.** (1999). Phosphate translocators in plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 27-45.
- Flügge, U.I., Häusler, R.E., Ludewig, F. und Fischer, K.** (2003). Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 27-45.
- Flügge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F. und Eckerskorn, C.** (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *Embo Journal* **8**, 39-46.
- Frommer, W.B. und Sonnewald, S.** (1995). Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *Journal of Experimental Botany* **46**.
- Fu, Y., Ballicora, M.A., Leykam, J.F. und Preiss, J.** (1998). Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 25045-25052.

- Geigenberger, P.** (2003). Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany* **54**, 457-465.
- Geigenberger, P. und Stitt, M.** (2000). Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant Journal* **23**, 795-806.
- Geigenberger, P., Muller-Rober, B. und Stitt, M.** (1999). Contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis is decreased by water stress in growing potato tubers. *Planta* **209**, 338-345.
- Geigenberger, P., Stamme, C., Tjaden, J., Schulz, A., Quick, P.W., Betsche, T., Kersting, H.J. und Neuhaus, H.E.** (2001). Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic potato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. *Plant Physiology* **125**, 1667-1678.
- Geigenberger, P., Regierer, B., Nunes-Nesi, A., Leisse, A., Urbanczyk-Wochniak, E., Springer, F., van Dongen, J.T., Kossmann, J. und Fernie, A.R.** (2005). Inhibition of de novo pyrimidine synthesis in growing potato tubers leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathway and a subsequent increase in biosynthetic performance. *Plant Cell* **17**, 2077-2088.
- George, G.M., van der Merwe, M.J., Nunes-Nesi, A., Bauer, R., Fernie, A.R., Kossmann, J. und Lloyd, J.R.** (2010). Virus-induced gene silencing of plastidial soluble inorganic pyrophosphatase impairs essential leaf anabolic pathways and reduces drought stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* **154**, 55-66.
- Getz, H.P.** (1991). Sucrose transport in tonoplast vesicles of red beet roots is linked to ATP hydrolysis. *Planta* **185**, 261-268.
- Gibon, Y., Blasing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H., Fisahn, J., Hohne, M., Gunther, M. und Stitt, M.** (2004). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal* **39**, 847-862.
- Gottwald, J.R., Krysan, P.J., Young, J.C., Evert, R.F. und Sussman, M.R.** (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13979-13984.
- Greiten, C.** (2008). Untersuchungen von Sink / Source Verhältnissen in transgenen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), welche den *PsGPT* und *AtNTT* überexprimieren. Analysen von Freilandanzuchten und Analysen von Kartoffeln, welche die *AtATase2* überexprimieren. (University of Cologne).
- Haferkamp, I., Hackstein, J.H., Voncken, F.G., Schmit, G. und Tjaden, J.** (2002). Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *European Journal of Biochemistry* **269**, 3172-3181.
- Haferkamp, I., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., Neigel, N., Horn, M. und Neuhaus, H.E.** (2006). Tapping the nucleotide pool of the host: novel nucleotide carrier proteins of *Protochlamydia amoebophila*. *Molecular Microbiology* **60**, 1534-1545.
- Hejazi, M., Fettke, J., Haebel, S., Edner, C., Paris, O., Froberg, C., Steup, M. und Ritte, G.** (2008). Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant Journal* **55**, 323-334.
- Heldt, H.W.** (1969). Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts. *FEBS Letters* **5**, 11-14.

- Heldt, H.W.** (2008). Pflanzenbiochemie. Spektrum, Akademischer Verlag, 4. Auflage.
- Heldt, H.W., Chon, C.J. und Maronde, D.** (1977). Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology* **59**, 1146-1155.
- Hendriks, J.H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. und Geigenberger, P.** (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* **133**, 838-849.
- Hill, L.M. und Smith, A.M.** (1991). Evidence that glucose-6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* **185**, 91-96.
- Hovenkamp-Hermelink, J.H.M., Devries, J.N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B. und Feenstra, W.J.** (1988). Rapid estimation of the amylose amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. *Potato Research* **31**, 241-246.
- Jelitto, T., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Hajirezeai, M. und Stitt, M.** (1992). Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *Escherichia coli* pyrophosphatase in their cytosol. In *Planta*, pp. 238-244.
- Jiang, S.S., Fan, L.L., Yang, S.J., Kuo, S.Y. und Pan, R.L.** (1997). Purification and characterization of thylakoid membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Spinacia oleracea* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **346**, 105-112.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. und Flügge, U.I.** (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**, 105-117.
- Kampfenkel, K., Mohlmann, T., Batz, O., van Montagu, M., Inze, D. und Neuhaus, H.E.** (1995). Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Letters* **374**, 351-355.
- Kang, F. und Rawsthorne, S.** (1994). Starch and fatty-acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L). *The Plant Journal* **6**, 795-805.
- Kloosterman, B., Vorst, O., Hall, R.D., Visser, R.G. und Bachem, C.W.** (2005). Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 505-519.
- Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M. und Ritte, G.** (2005). Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiology* **137**, 242-252.
- Kruger, N.J.** (1997). Carbohydrate synthesis and degradation *Plant Metabolism* (Dennis, D. D., Turpin, D. H., Layzell, D. B., Lefebvre, D. D., eds.), 83-104. London: Longman.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R. und Frommer, W.B.** (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**, 1298-1300.
- Kühn, C., Hajirezaei, M.R., Fernie, A.R., Roessner-Tunali, U., Czechowski, T., Hirner, B. und Frommer, W.B.** (2003). The sucrose transporter *SfSUT1* localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology* **131**, 102-113.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Leggewie, G., Kolbe, A., Lemoine, R., Roessner, U., Lytovchenko, A., Zuther, E., Kehr, J., Frommer, W.B., Riesmeier, J.W., Willmitzer, L. und Fernie, A.R.** (2003). Overexpression of the sucrose transporter *SoSUT1* in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* **217**, 158-167.
- Leidreiter, K., Heineke, D., Heldt, H.W., Muller-rober, B., Sonnewald, U. und Willmitzer, L.** (1995). Leaf-specific antisense inhibition of starch biosynthesis in transgenic potato plants leads to an increase in photoassimilate export from source leaves during the light period. *Plant and Cell Physiology* **36**, 615-624.
- Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M. und Sonnewald, U.** (1995). Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* **7**, 259-270.
- Linka, N., Hurka, H., Lang, B.F., Burger, G., Winkler, H.H., Stamme, C., Urbany, C., Seil, I., Kusch, J. und Neuhaus, H.E.** (2003). Phylogenetic relationships of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes. *Gene* **306**, 27-35.
- Lloyd, J.R., Kossmann, J. und Ritte, G.** (2005). Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science* **10**, 130-137.
- Lu, Y. und Sharkey, T.D.** (2006). The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell & Environment* **29**, 353-366.
- Ludewig, F., Sonnewald, U., Kauder, F., Heineke, D., Geiger, M., Stitt, M., Muller-Rober, B.T., Gillissen, B., Kuhn, C. und Frommer, W.B.** (1998). The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Letters* **429**, 147-151.
- Lustinec, J., Hadacova, V., Kaminek, M. und Prochazka, Z.** (1983). Quantitative-determination of starch, amylose, and amylopectin in plant-tissues using glass-fiber paper. *Analytical Biochemistry* **132**, 265-271.
- Maeshima, M.** (2000). Vacuolar H⁽⁺⁾-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 37-51.
- Martin, C. und Smith, A.M.** (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985.
- Möhlmann, T., Tjaden, J., Schwoppe, C., Winkler, H.H., Kampfenkel, K. und Neuhaus, H.E.** (1998). Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in *Arabidopsis thaliana* L. molecular characterisation and comparative structural analysis of similar ATP/ADP translocators from plastids and *Rickettsia prowazekii*. *European Journal of Biochemistry* **252**, 353-359.
- Moll, A.** (1980). Die Photosyntheserate während der Entwicklung der Kartoffelpflanze. *Potato Research* **23**, 319-326.
- Morell, M.K., Bloom, M., Knowles, V. und Preiss, J.** (1987). Subunit structure of spinach leaf ADP glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* **85**, 182-187.
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. und Willmitzer, L.** (1992). Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and Influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *Embo Journal* **11**, 1229-1238.
- Muth, J., Hartje, S., Twyman, R.M., Hofferbert, H.R., Tacke, E. und Prüfer, D.** (2008). Precision breeding for novel starch variants in potato. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 576-584.
- Neuhaus, E. und Stitt, M.** (1990). Control analysis of photosynthate partitioning. *Planta* **182**, 445-454.
- Neuhaus, H.E. und Emes, M.J.** (2000). Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 111-140.

- Neuhaus, H.E., Thom, E., Mohlmann, T., Steup, M. und Kampfenkel, K.** (1997). Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Journal* **11**, 73-82.
- Niewiadowski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U.S., Rosso, M.G., Ache, P., Flugge, U.I. und Schneider, A.** (2005). The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17**, 760-775.
- Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. und Zeeman, S.C.** (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**, 87-89.
- Okita, T.W., Nakata, P.A., Anderson, J.M., Sowokinos, J., Morell, M. und Preiss, J.** (1990). The subunit structure of potato tuber ADP glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* **93**, 785-790.
- Oliver, S.N., Tiessen, A., Fernie, A.R. und Geigenberger, P.** (2008). Decreased expression of plastidial adenylate kinase in potato tubers results in an enhanced rate of respiration and a stimulation of starch synthesis that is attributable to post-translational redox-activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Experimental Botany* **59**, 315-325.
- Oparka, K.J. und Turgeon, R.** (1999). Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**, 739-750.
- Quick, P., Neuhaus, E., Feil, R. und Stitt, M.** (1989). Fluoride leads to an increase of inorganic pyrophosphate and inhibition of photosynthetic sucrose synthesis in spinach leaves. *Biochimica Biophysica Acta* **973**, 263-271.
- Regierer, B., Fernie, A.R., Springer, F., Perez-Melis, A., Leisse, A., Koehl, K., Willmitzer, L., Geigenberger, P. und Kossmann, J.** (2002). Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nature Biotechnology* **20**, 1256-1260.
- Riesmeier, J.W., Hirner, B. und Frommer, W.B.** (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell* **5**, 1591-1598.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L. und Frommer, W.B.** (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *Embo Journal* **13**, 1-7.
- Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlow, S., Haebel, S., Kotting, O. und Steup, M.** (2006). Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Letters* **580**, 4872-4876.
- Roberts, A.G. und Oparka, K.J.** (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell & Environment* **26**, 103-124.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *Embo Journal* **8**, 23-29.
- Rojas-Beltran, J.A., Dubois, F., Mortiaux, F., Portetelle, D., Gebhardt, C., Sangwan, R.S. und du Jardin, P.** (1999). Identification of cytosolic Mg²⁺-dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis. *Plant Molecular Biology* **39**, 449-461.
- Roldan, I., Wattedled, F., Mercedes Lucas, M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, R., Ball, S., D'Hulst, C. und Merida, A.** (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant Journal* **49**, 492-504.

- Rolletschek, H., Nguyen, T.H., Hausler, R.E., Rutten, T., Gobel, C., Feussner, I., Radchuk, R., Tewes, A., Claus, B., Klukas, C., Linemann, U., Weber, H., Wobus, U. und Borisjuk, L.** (2007). Antisense inhibition of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage. *Plant Journal* **51**, 468-484.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sauer, N.** (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309-2317.
- Sauer, N. und Stolz, J.** (1994). SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant Journal* **6**, 67-77.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, S., Lloyd, J.R. und Kossmann, J.** (2002). Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant Journal* **30**, 581-591.
- Schmitt, B., Stadler, R. und Sauer, N.** (2008). Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: new perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiology* **148**, 187-199.
- Schünemann, D., Borchert, S., Flügge, U.I. und Heldt, H.W.** (1993). ADP/ATP translocator from pea root plastids (comparison with translocators from spinach chloroplasts and pea leaf mitochondria). *Plant Physiology* **103**, 131-137.
- Schweer, H.** (1982). Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Aldoses as O-Methoxime, O-2-Methyl-2-Proxime and O-Normal-Butoxime Pertrifluoroacetyl Derivatives on Ov-225 with Methylpropane as Ionization Agent .1. Pentoses. *Journal of Chromatography* **236**, 355-360.
- Smith, A.M., Denyer, K. und Martin, C.R.** (1995). What controls the amount and structure of starch in storage organs? *Plant Physiology* **107**, 673-677.
- Smith, A.M., Denyer, K. und Martin, C.** (1997). The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 67-87.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C. und Smith, S.M.** (2005). Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 73-98.
- Sonnewald, U.** (1992). Expression of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plant Journal* **2**, 571-581.
- Sowokinos, J.R.** (1981). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: II. catalytic properties and regulation of ADP-glucose and UDP-glucose pyrophosphorylase activities in potatoes. *Plant Physiology* **68**, 924-929.
- Sowokinos, J.R. und Preiss, J.** (1982). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: III. purification, physical and catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiology* **69**, 1459-1466.
- Stadler, R. und Sauer, N.** (1996). The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanical Acta* **109**, 299-306.

- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J. und Kishore, G.M.** (1992). Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**, 287-292.
- Stitt, M., Kurzel, B. und Heldt, H.W.** (1984). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate : II. partitioning between sucrose and starch. *Plant Physiology* **75**, 554-560.
- Stockhaus, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1989). Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1 with the presence of chloroplasts. *Embo Journal* **8**, 2445-2451.
- Strotmann, H. und Berger, S.** (1969). Adenine nucleotide translocation across the membrane of isolated *Acetabularia* chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **35**, 20-26.
- Sweetlove, L.J., Burrell, M.M. und ap Rees, T.** (1996a). Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADP glucose pyrophosphorylase. *Biochemical Journal* **320 (Pt 2)**, 493-498.
- Sweetlove, L.J., Burrell, M.M. und ap Rees, T.** (1996b). Characterization of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers with increased ADP glucose pyrophosphorylase. *Biochemical Journal* **320 (Pt 2)**, 487-492.
- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldan, I., Montero, M., Munoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C. und Merida, A.** (2009). Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *Plant Cell* **21**, 2443-2457.
- Tiessen, A., Hendriks, J.H.M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farre, E.M. und Geigenberger, P.** (2002). Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**, 2191-2213.
- Tjaden, J., Möhlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G. und Neuhaus, H.E.** (1998). Altered plastidic ATP/ADP-translocator activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *The Plant Journal* **16**, 531-540.
- Trentmann, O., Jung, B., Neuhaus, H.E. und Haferkamp, I.** (2008). Nonmitochondrial ATP/ADP transporters accept phosphate as third substrate. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 36486-36493.
- van Bel, A.** (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* **26**, 125-149.
- Verhees, J., van der Krol, A.R., Vreugdenhil, D. und van der Plas, L.H.** (2002). Characterization of gene expression during potato tuber development in individuals and populations using the luciferase reporter system. *Plant Molecular Biology* **50**, 653-665.
- Vianello, A. und Macri, F.** (1999). Proton pumping pyrophosphatase from higher plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **105**, 763-768.
- Viola, R., Roberts, A.G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R.D., Marmioli, N., Machray, G.C. und Oparka, K.J.** (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* **13**, 385-398.
- Visser, R.G., Somhorst, I., Kuipers, G.J., Ruys, N.J., Feenstra, W.J. und Jacobsen, E.** (1991). Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Molecular and General Genetics* **225**, 289-296.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Groner, F., Hebbeker, U. und Flugge, U.I.** (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**, 787-802.

- Weiner, H., Stitt, M. und Heldt, H.W.** (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **893**, 13-21.
- Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., Hoermiller, I.I., Heyer, A.G., Marten, I., Hedrich, R. und Neuhaus, H.E.** (2010). Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis. *Plant Physiology* **154**, 665-677.
- Winkler, H.H. und Neuhaus, H.E.** (1999). Non-mitochondrial ATP transport. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 64-68.
- Wischmann, B., Hamborg Nielsen, T. und Lindberg Moller, B.** (1999). In vitro biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiology* **119**, 455-462.
- Wolf, D.D., Pearce, R.B., Carlson, G.E. und Lee, D.R.** (1969). Measuring photosynthesis of attached leaves with air sealed chambers. *Crop Science* **9**, 24-27.
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E. und Neuhaus, H.E.** (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* **18**, 3476-3490.
- Wyse, R.** (1979). Sucrose uptake by sugar beet tap root tissue. *Plant Physiology* **64**, 837-841.
- Yu, T.S., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Fulton, D.C., Dunstan, H., Lue, W.L., Hegemann, B., Tung, S.Y., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D.L., Wang, S.M., Smith, A.M., Chen, J. und Smith, S.M.** (2005). Alpha-amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 9773-9779.
- Zeeman, S.C., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, K.L., Donald, A.M. und Smith, A.M.** (2002). Starch synthesis in Arabidopsis. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiology* **129**, 516-529.
- Zhang, L., Häusler, R.E., Greiten, C., Hajirezaei, M.R., Haferkamp, I., Neuhaus, H.E., Flügge, U.I. und Ludewig, F.** (2008). Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 453-464.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. und Sonnewald, U.** (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* **7**, 97-107.

Verwendete Internetquellen:

Biosicherheit, 2011

<http://www.biosicherheit.de/basisinfo/547.nahrhafte-knolle.html>

<http://www.biosicherheit.de/basisinfo/262.staerke-kartoffel.html>

<http://www.biosicherheit.de/forschung/kartoffel/263.amflora-kartoffel-industrie.html>

BMELV, 2011 (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz)

<http://www.bmelv-statistik.de/de/fachstatistiken/besondere-ernteermittlung/getreide>

<http://www.bmelv-statistik.de/de/fachstatistiken/besondere-ernteermittlung/kartoffeln>

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stärkeaufbaus und -abbaus in Chloroplasten, der Saccharosesynthese im Cytosol und der Stärkesynthese in Amyloplasten.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der möglichen Konsequenzen einer blattspezifischen StAGPase-Repression oder mesophyllspezifischen EcPPase-Überexpression auf den Stärke- und Saccharosestoffwechsel in Blättern.	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der bei der Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose auftretenden Reaktionen.	32
Abbildung 4: Übersicht über die zur Generierung der AGN-Pflanzen verwendeten Konstrukte und schematische Transformationsvorgehensweise.	46
Abbildung 5: Expressionsanalysen des GPT aus <i>Pisum sativum</i> und NTT1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in Kartoffelknollen von AGN-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	47
Abbildung 6: Expressionsanalyse der AGPase aus <i>Solanum tuberosum</i> in Kartoffelblättern von AGN-Pflanzen mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	48
Abbildung 7: Expressionsanalyse der AGPase aus <i>Solanum tuberosum</i> in Kartoffelblättern von AGN-Pflanzen durch quantitative Real-Time-PCR.	49
Abbildung 8: AGPase-Aktivitätsmessung in Blattextrakten von AGN- und Wildtyppflanzen.	50
Abbildung 9: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen (WT) in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze aus drei verschiedenen Anzuchten.	52
Abbildung 10: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.	54
Abbildung 11: Zuckergehalte in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.	55
Abbildung 12: Analyse des Zuckergehaltes in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen von AGN, BGA_31- und Wildtyppflanzen nach Inkubation für 16 Stunden in der Nacht.	57
Abbildung 13: Analyse des Zuckergehaltes in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen von AGN, BGA_31- und Wildtyppflanzen nach Inkubation für 4 Stunden im Licht.	58
Abbildung 14: CO ₂ -Assimilationsrate von Kartoffelblättern in µmol assimiliertem CO ₂ pro m ² Blattfläche und Sekunde in AGN- und Wildtyppflanzen nach zehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus.	59
Abbildung 15: CO ₂ -Assimilation von Kartoffelblättern in µmol assimiliertem CO ₂ pro m ² Blattfläche und Sekunde in AGN- und Wildtyppflanzen bei einer Belichtungsstärke von 450 µE nach zehn- bzw. sechszehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus.	61
Abbildung 16: Analyse der Einlagerung von ¹⁴ CO ₂ in die Blattstärke von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	62
Abbildung 17: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze in AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	66

Abbildung 18: Stärkegehalte in Kartoffelpflanzen in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (Fg) von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	67
Abbildung 19: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C_6 -Einheiten pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	69
Abbildung 20: Gehalte an löslichen Zuckern in Kartoffelpflanzen von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen in $\mu\text{mol C}_6$ -Einheiten pro g Frischgewicht (Fg).	70
Abbildung 21: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen (WT) in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze aus einer Beetzucht.	71
Abbildung 22: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und BGA-31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.	72
Abbildung 23: Zuckergehalt in Blättern von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.	73
Abbildung 24: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen (WT) aus einer Beetzucht.	75
Abbildung 25: Stärkegehalte in Kartoffelknollen in $\mu\text{mol C}_6$ -Einheiten pro g Frischgewicht (Fg) von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen aus einer Beetzucht.	76
Abbildung 26: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C_6 -Einheiten pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen in einer Beetzucht.	77
Abbildung 27: Zuckergehalt in Knollen von AGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.	78
Abbildung 28: Amylosegehalt in Knollen von AGN- und BGA-31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in einer Beetzucht.	79
Abbildung 29: Gewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze in AGN- und Wildtyppflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.	81
Abbildung 30: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten in mmol C_6 -Einheiten pro m^2	83
Abbildung 31: Zuckergehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen.	84
Abbildung 32: AGPase-Aktivität in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.	86
Abbildung 33: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.	88
Abbildung 34: Stärkegehalt in Knollen von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.	89
Abbildung 35: Stärkeertrag pro Pflanze von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen zweier Anzuchten.	91
Abbildung 36: Zuckergehalt in Knollen von AGN- und Wildtyppflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanzen.	92

Abbildung 37: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einem Zeitraum von 24 Stunden von zwei Anzuchten.	94
Abbildung 38: Gehalte löslicher Zucker in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen im 24-h-Verlauf. 96	
Abbildung 39: AGPase-Aktivität in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einem Zeitraum von 24 Stunden.	97
Abbildung 40: Stärkegehalt in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einer verlängerten Dunkelphase von zwei Anzuchten.	99
Abbildung 41: Gehalte löslicher Zucker in Blättern von AGN- und Wildtyppflanzen in einer verlängerten Dunkelphase.....	101
Abbildung 42: Übersicht über die zur Generation der PGN-Pflanzen verwendeten Konstrukte und schematische Transformationsvorgehensweise.	103
Abbildung 43: Expressionsanalysen des <i>PsGPTs</i> und <i>A_tNTT1</i> in Kartoffelknollen von PGN-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR.	104
Abbildung 44: Expressionsanalyse der PPase aus <i>Escherichia coli</i> in Kartoffelblättern von PGN-Pflanzen mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR.	105
Abbildung 45: Grafische Darstellung des Zymogrammes der anorganischen Pyrophosphatase aus <i>Escherichia coli</i> exprimiert in transgenen PGN-Kartoffelpflanzen.....	106
Abbildung 46: PPase-Aktivität in Blattextrakten von PGN- und Wildtyppflanzen.....	107
Abbildung 47: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von PGN-, BGA_31 und Wildtyppflanzen (WT) in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze aus vier verschiedenen Anzuchten.....	108
Abbildung 48: Stärkegehalte in Blättern von PGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.	110
Abbildung 49: Zuckergehalte in Blättern von PGN- und BGA_31-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.	111
Abbildung 50: Analyse des Zuckergehaltes in Phloemexsudaten aus Kartoffelpetiolen von PGN, BGA_31 und Wildtyppflanzen nach Inkubation für 16 Stunden in der Nacht und 4 Stunden am Tag.113	
Abbildung 51: CO ₂ -Assimilation von Kartoffelblättern in µmol assimiliertem CO ₂ pro m ² Blattfläche und Sekunde in PGN- und Wildtyppflanzen bei einer Belichtungsstärke von 450 µE nach zwölfwöchiger Anzucht im Gewächshaus.	114
Abbildung 52: Analyse der Einlagerung von ¹⁴ CO ₂ in die Blattstärke von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	115
Abbildung 53: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze in PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	119
Abbildung 54: Stärkegehalte in Kartoffelknollen in µmol C ₆ -Einheiten pro g Frischgewicht (Fg) von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	121
Abbildung 55: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C ₆ -Einheiten pro Pflanze von AGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen.	122

Abbildung 56: Gehalte an löslichen Zuckern in Kartoffelknollen von PGN-, BGA_31- und Wildtyppflanzen in $\mu\text{mol C}_6\text{-Einheiten pro g Frischgewicht (Fg)}$ 124

Abbildung 57: Stärkegehalt in Blättern von Nutzpflanzen in einer verlängerten Dunkelphase..... 126

Abbildung 58: Stärkegehalt in Blättern von Rapspflanzen in einer verlängerten Dunkelphase..... 128

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika und deren Endkonzentrationen	18
Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Vektoren, sowie deren Herkunft und Resistenz.....	18
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	19
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	19
Tabelle 5: Ergebnisse der Metabolitanalysen mittels GC/MS von Blattextrakten von Wildtyp-, BGA_31- und AGN-Pflanzen.....	64
Tabelle 6: Ergebnisse der Metabolitanalysen mittels GC/MS von Blattextrakten von Wildtyp-, BGA_31- und PGN-Pflanzen.....	117

9 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
μ	mikro
μE	Mikroeinsteinstein ($\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
μF	Mikrofarad
λ	lamda
Ω	Ohm
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Absorption
AAC	ADP/ATP-Carrier
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glukose-Pyrophosphorylase
amu	Atomic Mass Unit, 1 amu = 1 Da
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
pb	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Blumenkohl (Cauliflower) Mosaik Virus
cDNA	copyDNA
CO_2	Kohlendioxid
^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit einem Atomgewicht von 14
$^{14}\text{CO}_2$	Kohlendioxid mit radioaktiv markiertem C-Atom
$[\text{}^{14}\text{C}]\text{-NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat mit radioaktiv markiertem C-Atom
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
cm	Zentimeter
cv.	Cultivar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DPE1	Disproportionierungsenzym
DPE2	cytosolisches Disproportionierungsenzym (Transglukosidase)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

et al.	und andere
F	eng. forward
F1,6bP	Fruktose-1,6-bisphosphat
F2,6bP	Fruktose-2,6-bisphosphat
F6P2K	Fruktose-6-Phosphat-2-Kinase
F6P	Fruktose-6-Phosphat
Fa.	Firma
FBPase	Fruktose-1,6-bisphosphatase
Fg	Frischgewicht
g	Gramm
G1P	Glukose-1-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBSS	granulagebundene Stärkesynthasen
GC/MS	kombinierte Gaschromatograf / Massenspektrometer
GPT	Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator
GWD	Glukan-Wasser-Dekinese
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{DEPC}	DEPC behandeltes Wasser
H ₂ O _{HPLC}	hochreines Wasser für die Chromatographie
HClO ₄	Perchlorsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAc	Essigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin
IRGA	Infrarotgasanalyse
ISA3	Stärkeentzweigungsenzym
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kLUX	Kilolux
KOH	Kaliumhydroxid
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
m	Meter
M	Molar

mA	Milliampere
mCi	Millicurie
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MEX1	Maltoseexporter
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide
n	Anzahl der Einzelwerte
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
NTT	plastidärer Adenylattranslokator
OD _x	optische Dichte (Koeffizient gibt die Wellenlänge des Lichtes an)
OPPW	Oxidativer Pentosephosphatweg
3-PGA	3-Phosphoglycerat
p	Wahrscheinlichkeit
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFTBA	Perfluorotributylamin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionen-Konzentration
Pi	Orthophosphat
PPi	Pyrophosphat
Pho1	α-Glukan-Phosphorylase
Pho2	cytosolische α-Glukan-Phosphorylase
PFK	Phosphofruktokinase
PPase	Pyrophosphatase
PGI	Phosphoglukoisomerase
PGM	Phosphoglukomutase
PWD	Phosphoglukan-Wasser-Dikinase
R	eng. reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

RubisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RubP	Ribulose-1,5-bisphosphat
s	Sekunde
s.	siehe
S6P	Saccharose-6-Phosphat
SBE	Stärkeverzweigungsenzymen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPP	Saccharose-Phosphat-Phosphatase
SPS	Saccharose-Phosphat-Synthase
SS	lösliche Stärkesynthase
StAbw	Standardabweichung
SuSy	Saccharose-Synthase
SUT	Saccharosetransporter
TPI	Triosephosphatisomerase
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	UDP-Glukose
UDPGase	UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
UTP	Uridintriphosphat
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
y x g	y-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$)
z. B.	zum Beispiel

10 Kurzzusammenfassung und Abstract

10.1 Kurzzusammenfassung

Der universelle Rohstoff Stärke hat sowohl für die Nahrungsmittelindustrie als auch für die industrielle Verarbeitung einen hohen Stellenwert, wodurch die Anforderungen an Rohstoffpflanzen immer größer werden. In Deutschland ist die Kartoffelpflanze ein wichtiger Stärkelieferant. Daher besteht ein Ziel der biotechnologischen Forschung darin, deren Stärkeertrag pro Pflanze zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch Analysen dreifach transgener Kartoffelpflanzen untersucht werden, ob die gleichzeitige Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität zu Ertragssteigerungen führt. Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Erhöhung der *source* Kapazität verwendet, zum einen die blattspezifische Repression der *StAGPase* und zum anderen die mesophyllspezifische Überexpression der *EcPPase*. Die Erhöhung der *sink* Kapazität erfolgte durch simultane knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT*, was bereits in früheren Studien zu Ertragssteigerungen in Kartoffelpflanzen führte (Zhang et al., 2008). Die AGN- und PGN-Pflanzen zeigten in Gewächshausanzuchten eindeutige Ertragsteigerungen im Vergleich zum Wildtyp und zu der zweifach transgenen Linie, deren *sink* Stärke erhöht ist. Der Knollenertrag war in den AGN-Linien um durchschnittlich 62%, der Stärkegehalt in Knollen um durchschnittlich 47% und der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze durchschnittlich um den Faktor 2,4 im Vergleich zum Wildtyp gesteigert. In den PGN-Linien war der Knollenertrag um durchschnittlich 67%, der Stärkegehalt in Knollen um durchschnittlich 46% und der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze durchschnittlich um den Faktor 2,5 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Diese Steigerungen lassen sich dadurch erklären, dass in den dreifach transgenen Pflanzen der Assimilatfluss in die Saccharosesynthese erfolgreich erhöht wurde, was eine erhöhte Zuckerexportkapazität zeigte. Dieser erhöhte Zuckerexport konnte in die *sink* Organe weitergeleitet werden und hatte zudem einen reduzierten Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese und dadurch reduzierte Blattstärkegehalte zur Folge. Diese Erkenntnisse konnten für die AGN-Pflanzen in einer Beetanzucht unter freilandähnlichen Bedingungen bestätigt werden. Als Konsequenz der verbesserten Verfügbarkeit von ADP-Glukose in Knollen, aufgrund des erhöhten Imports von Glukose-6-Phosphat und ATP, konnte ein erhöhter Amylosegehalt in Knollen detektiert werden, was auf eine erhöhte Leistung der granagebundenen Stärkesynthese hinweist. Entwicklungsabhängige Analysen der AGN-Pflanzen deuten darauf hin, dass die photosynthetische Aktivität in AGN-Pflanzen länger aufrechterhalten bleibt und die Pflanzen sich länger in der Speicherphase befinden.

Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Erhöhung von *source* und *sink* Kapazität in Kartoffelpflanzen zu eindeutigen Ertragssteigerungen führt, was nicht nur für die Ertragssteigerung in der Kartoffelpflanze von großem biotechnologischem Interesse sein könnte, sondern auch für andere Nutzpflanzen.

10.2 Abstract

The all-purpose raw material starch is very important for food industry as well as for industrial processing, whereby the requirements for plants as raw material increase more and more. The potato plant is an important starch resource in Germany. Therefore an aim of biotechnological research is to enhance the total starch content per plant.

The aim of the present work was to analyse triple transgenic potato plants, to investigate whether the simultaneous enhancement of *source* and *sink* capacities results in an increased yield. Two different approaches to increase the *source* capacity were applied, on the one hand, the leaf-specific repression of the *StAGPase* and on the other hand the mesophyll-specific overexpression of the *EcPPase*. The enhancement of *sink* capacity occurs by the simultaneous tuber-specific overexpression of the *PsGPT* and *AtNTT* that led to increased potato yield in a previous study (Zhang et al., 2008). The AGN and PGN plants indicated a distinct yield enhancement when grown in the greenhouse in comparison to wild-type and double transgenic lines, which are only manipulated in their *sink* capacity. Tuber yield in AGN plants was enhanced on average by about 62%, starch content of tubers on average by about 47% and total starch content produced in tubers per plant was enhanced on average by a factor of 2,4 in comparison to the wild-type. In PGN plants tuber yield was increased on average by about 67%, starch content in tubers on average by about 46% and total starch per plant on average by a factor of 2,5 in comparison to the wild-type. This increase in yield can be explained by a successful increased flow of assimilates towards sucrose synthesis in the triple transgenic lines, which also becomes apparent in an increased sugar export capacity. This enhanced sugar content can be transferred to the *sink* organs and results in a reduced flow into starch synthesis in leaves and therefore reduced contents of leaf starch. These findings were confirmed for AGN plants in an experiment where plants were grown under conditions similar to field conditions. As a consequence of the enhanced availability of ADP-glucose in tubers, due to the increased glucose-6-phosphate and ATP import, the content of amylose in tubers increased, which can be explained by an increased capacity of the granule-bound starch synthase. Developmental analyses of AGN lines suggest that their photosynthetic activity is longer standing and therefore the plants show longer storage phase than the wild-type.

The present work indicate that the simultaneous enhancement of *source* and *sink* capacities results in an distinct yield increase in potato plants. This finding is not only of biotechnological interest for yield increase in potato but also for other crop plants.

11 Tagungsbeiträge

Jonik, C., Zhang, L., Greiten, C., Flügge, U.-I., Ludewig, F. (2009) Is there an effect of increased source capacity on the yield of potato plants with increased sink strength? Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Leipzig

Jonik, C., Flügge, U.-I., Ludewig, F. (2010) A simultaneous enhancement of source and sink capacities results in increased potato tuber yield. 23. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

Jonik, C., Flügge, U.-I., Ludewig, F. (2010) A simultaneous enhancement of source and sink capacities results in increased potato tuber yield. 10. GABI Statusseminar, Potsdam

Jonik, C., Flügge, U.-I., Ludewig, F. (2010) A simultaneous enhancement of source and sink capacities results in increased potato tuber yield. Forschungskolloquium im Botanischen Institut, Köln

Jonik, C., Flügge, U.-I., Ludewig, F. (2011) Simultaneous boosting of source and sink capacities increases tuber starch content and yield of transgenic potato plants. 11. GABI Statusseminar, Potsdam

12 Danksagungen und Formalia

12.1 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei all denen zu bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für die Möglichkeit, an einem so interessanten und ertragreichen Projekt im Rahmen meiner Promotion mitzuarbeiten und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Dr. K. Schnetz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Frau Prof. Dr. C. Gebhardt und Herrn Prof. Dr. U. Conrath bedanke ich mich für die Diskussionsbereitschaft im Rahmen der jährlichen Treffen der „Graduate School for Biological Sciences“ und bei Dr. Isabell Witt für das Ermöglichen zahlreicher interessanter Kurse.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Frank Ludewig für seine ständige Diskussionsbereitschaft, wissenschaftlichen Anregungen und das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Iris Schmitz danke ich für das Bereitstellen der dreifach transgenen AGN- und PGN-Pflanzen, und der anfänglichen großen Unterstützung bei Laborarbeiten.

Bei Raphael Wemhöner möchte ich mich für die Untertützung im Labor und bei Dr. Markus Gierth und Dr. Stephan Krüger für die Ansprechbarkeit bei theoretischen oder technischen Fragen bedanken.

Dem Gärtnereiteam danke ich für die Betreuung der Kartoffelpflanzen.

Bei Siggie Werth möchte ich mich für die schönen Photos der Nutzpflanzen bedanken.

Dorien, Nicole, Judith, Nils, Simon, Veronika, Pia und Annemarie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, aber auch für die Abwechslung während zahlreicher Spiel-, Koch-, Grillabende oder beim Sport.

Natürlich geht auch ein großes Dankeschön an den Rest der Arbeitsgruppe Flügge für ein angenehmes Arbeitsklima, viele schöne Betriebsausflüge und Abende im Kreise der Kollegen.

Henning danke ich nicht nur für die Unterstützung innerhalb der Uni, sondern auch für die schöne Zeit außerhalb.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern und meiner Schwester Susanne für die nicht hoch genug einzuschätzende liebevolle Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

12.2 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Arbeit ist von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge betreut worden.

Claudia Jonik

Köln, Mai 2011

12.3 Lebenslauf

Claudia Jonik

Luxemburgerstrasse 154, 50937 Köln

Telefon: 01 72 800 80 51

E-Mail: claudiajonik1583@aol.com

Geburtsdatum 07.12.1983

Geburtsort Aachen

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1990 – 1994 Grundschule am Fischmarkt, Aachen

1994 – 2003 St. Ursula Gymnasium, Aachen

Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

2003 – 2007 Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich

Studiengang: Bioingenieurwesen

Studienschwerpunkt: Biotechnologische Verfahren

Abschluss: Diplom-Ingenieurin

Diplomarbeit mit dem Titel *„Herstellung, Reinigung und Charakterisierung von Humanem Serumalbumin aus pflanzlichen Produktionssystemen“* am Fraunhofer IME für Molekulare und Angewandte Ökologie in Aachen

Promotion

Seit 12/2007 Wissenschaftliche Angestellte an der Universität zu Köln (AG Flügge)

Promotion