

Entwicklungsabhängige Analysen zum
Kohlenstoffmetabolismus
und
biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung
der Nutzpflanzen *Beta vulgaris* (Zuckerrübe) und
Solanum tuberosum (Kartoffel)

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

vorgelegt von
Nicole Wöstefeld
aus Düren

Köln 2014

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von November 2010 bis März 2014 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2014

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit am Botanischen Institut (II) der Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge im Rahmen des BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) geförderten Projektes "BETAMORPHOSIS- *Beta vulgaris*- Manipulation of tap root metabolism and photosynthate allocation by increasing sink and source capacities".

Die Daten und Ergebnisse zum Zuckerrübenteil mit dem Thema "Entwicklungsabhängige Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus und biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanzen *Beta vulgaris* (Zuckerrübe)" lagen teilweise zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit noch unter Geheimhaltung. Aufgrund eines Patents bzw. einer angehenden Publikation wurden beispielsweise die Sequenzdaten für die Micro-Arrays, sowie die für die Auswertung benötigten Sequenzen nicht veröffentlicht. Die Auswertung der Arrays erfolgte mittels einer Datenbank, welche vom Institut für Pflanzenzüchtung der Firma KWS SAAT AG zur Verfügung gestellt wurde.

„Alle Wahrheiten sind leicht verständlich von dem Zeitpunkt an, wo sie aufgedeckt werden.

Die Frage ist, ob sie aufgedeckt werden.“

Galileo Galilei (1564-1642)

italienischer Mathematiker, Philosoph und Physiker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Industrielle Bedeutung der Nutzpflanzen <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe) und <i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	1
1.2	Kohlenhydrate als Speicherform in Pflanzen	2
1.3	Synthese transitorischer Stärke in Blättern	2
1.4	Mobilisierung von transitorischer Stärke in Blättern	4
1.5	Saccharosesynthese im Cytosol der Mesophyllzellen	6
1.6	Transport und Speicherung der Kohlenhydrate in <i>sink</i> -Geweben	7
1.6.1	Speicherung von Saccharose in den Vakuolen der Rübenpfahlwurzeln	9
1.6.2	Synthese von Speicherstärke in den Amyloplasten der Kartoffelknollen	10
1.7	Die Bedeutung von GPT, NTT und AAC in Kartoffelknollen	11
1.8	Seneszenz	14
1.9	Verzögerung der Seneszenz durch Cytokinine	15
1.10	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Geräte	19
2.1.2	Wasserqualität	19
2.1.3	Verwendete Vektoren	19
2.1.4	Oligonukleotide	20
2.1.5	Verwendete Antibiotika	21
2.1.6	Bakterienstämme	21
2.2	Arbeiten mit <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe)	22
2.2.1	Pflanzenmaterial und Anzucht	22
2.2.2	Probennahme von Blatt- und Pfahlwurzelgewebe	22

2.3 Arbeiten mit <i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffeln)	22
2.3.1 Pflanzenmaterial und Anzucht	22
2.3.2 Transformation von Kartoffelblätter.....	23
2.3.3 Induktion von Kalli und Regeneration von Kartoffelpflanzen.....	24
2.3.4 Probennahme von Blatt- und Knollengeweben.....	24
2.4 Mikrobiologische Methoden	25
2.4.1 Umgang mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	25
2.4.2 Umgang mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>).....	25
2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	26
2.4.4 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	27
2.4.5 Transformation von chemisch kompetenten <i>A. tumefaciens</i>	27
2.5 Molekularbiologische Methoden	28
2.5.1 Plasmid-Präparation.....	28
2.5.2 Präparation von genomischer DNA aus Pflanzengeweben.....	28
2.5.3 Präparation von RNA aus Pflanzengeweben.....	29
2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.5.5 DNase Verdau von RNA-Präparationen	31
2.5.6 Reverse Transkription	31
2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.5.8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	32
2.5.9 Agarosegelelektrophorese	33
2.5.10 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	33
2.5.11 Sequenzierung von DNA.....	34
2.5.12 Restriktionsverdau von DNA und Plasmid-DNA.....	34
2.5.13 Herstellung eines <i>entry</i> -Vektors.....	35
2.5.14 Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren	35
2.5.15 Ligation	35
2.6 Physiologische und biochemische Methoden	36
2.6.1 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blättern und Kartoffelknollen.....	36
2.6.2 Bestimmung des Stärkegehalts in Blättern und Knollen.....	37
2.6.3 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Rübenpfahlwurzelgeweben.....	38
2.6.4 Bestimmung der Assimilationsrate mittels Infrarotgasanalyse (IRGA).....	38

2.6.5	Proteinbestimmung von Kartoffelblättern.....	39
2.6.6	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Blättern.....	40
2.6.7	Histochemische GUS-Färbung von Kartoffelblättern.....	40
2.6.8	Bestimmung der GUS-Aktivität in Kartoffelblättern	41
2.6.9	Bestimmung des Fv/Fm-Verhältnisses.....	42
2.6.10	Färbung von Zuckerrübenakuolen mittels Acridin-Orange und Neutralrot.....	42
2.6.11	Färbung von Lignin in Pfahlwurzelgewebe	43
2.6.12	Bestimmung des Anteils unlöslicher Stoffe im Pfahlwurzelgewebe.....	43
2.6.13	Bestimmung von Lignin im Pfahlwurzelgewebe	43
2.6.14	Präparation von Zuckerrübenakuolen aus Pfahlwurzelgewebe	44
2.7	Statistische Methoden und Berechnungen	45
2.7.1	Standardabweichung.....	45
2.7.2	Standardfehler.....	45
2.7.3	Signifikanztest	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Entwicklungsabhängige Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus und biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanzen <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe)	46
3.1.1	Zeitabhängige Ontogenese von <i>Beta vulgaris</i> unter Gewächshausbedingungen	46
3.1.2	Lichtabhängige Ontogenese von <i>Beta vulgaris</i> unter Gewächshausbedingung....	59
3.1.3	Orts- und Wachstumsphasen-abhängige Transkriptanalysen von <i>Beta vulgaris</i>	64
3.1.4	Biotechnologische Ansätze zur Ertragsteigerung von <i>Beta vulgaris</i>	84
3.2	Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanze <i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	88
3.2.1	Biotechnologischer Ansatz zur Manipulation der <i>sink</i> -Kapazität	88
3.2.2	Biotechnologische Ansatz zur Manipulation der <i>sink/source</i> -Kapazität.....	95

4	Diskussion	125
4.1	Entwicklungsabhängige Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus und biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanze <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe)	125
4.1.1	Zeitabhängige Ontogenese von <i>Beta vulgaris</i> unter Gewächshausbedingungen	125
4.1.2	Lichtabhängige Ontogenese von <i>Beta vulgaris</i> unter Gewächshausbedingung....	127
4.1.3	Anbau- und Wachstumsphasenabhängige Transkriptanalysen von <i>Beta vulgaris</i>	129
4.1.4	Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung	133
4.1.5	Fazit und Outlook	134
4.2	Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanze <i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	136
4.2.1	Auswirkungen der Manipulation der <i>sink</i> -Kapazität.....	136
4.2.2	Auswirkungen der Manipulation der <i>sink/source</i> -Kapazität durch verzögerte Seneszenz	137
4.2.3	Fazit und Outlook	143
5	Literaturverzeichnis	144
6	Abbildungsverzeichnis	156
7	Tabellenverzeichnis	160
8	Abkürzungsverzeichnis	161

9	Anhang.....	166
9.1	Datenergänzung zur zeitabhängige Ontogenese von <i>Beta vulgaris</i> unter Gewächshausbedingungen	166
9.2	Datenergänzung zur zeitabhängige Ontogenese von <i>Beta vulgaris</i> unter Gewächshausbedingungen	179
9.3	Datenergänzung zur umgebungs- und zeitabhängige Entwicklung von <i>Beta vulgaris</i>	180
10	Kurzzusammenfassung und Abstract	189
10.1	Kurzzusammenfassung.....	189
10.2	Abstract.....	190
11	Danksagungen und Formalia.....	192
11.1	Danksagungen.....	192
11.2	Erklärung.....	193
11.3	Lebenslauf.....	194

1 Einleitung

1.1 Industrielle Bedeutung der Nutzpflanzen *Beta vulgaris* (Zuckerrübe) und *Solanum tuberosum* (Kartoffel)

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) ist die Pflanze mit dem höchsten Zuckergehalt und somit der wichtigste Zuckerlieferant in Europa. Zucker wird zwar primär zum Süßen von Lebensmitteln verwendet, findet darüber hinaus aber eine breite Anwendung in der modernen Industrie. Nebenprodukte der Zuckergewinnung werden vor allem für die Futtermittelindustrie und in der chemischen Industrie weiterverwendet (Biosicherheit, 2014). Der gewonnene Zucker wird unter anderem als Konservierungsmittel, Farbstoff, Geschmacksverstärker, Bindemittel, als Grundlage von Kosmetika und Fermentierungsprozessen, als auch für die Gewinnung von Polymeren im Bereich der Kunststoffherstellung verwendet. Zucker findet zunehmend Verwendung im Bereich der Bioethanol- und Biogasherstellung (Koivistoinen *et al.*, 1985, Schnepf 2006).

Seit dem 18. Jahrhundert versuchen Pflanzenzüchter, den Zuckergehalt von Zuckerrüben zu steigern. Die heutigen bekannten Zuckerrübensorten haben ihren Ursprung im 18. Jahrhundert, in dem die Runkelrübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *crassa* bzw. var. *alba*) gezielt auf einen hohen Zuckergehalt hin gezüchtet wurde. Zunächst mit beachtlichem Erfolg: Der Zuckergehalt stieg von etwa 4% auf Spitzenwerte bis zu 24% in den heutigen Hochleistungssorten. Die Zuckerrübe ist mit 24% die zuckerreichste Pflanze Europas. Züchter stehen heutzutage aber vor einem Problem: Der Zuckergehalt und der Ertrag der Zuckerrüben korrelieren negativ miteinander, das heißt, steigert man den Ertrag von Zuckerrüben, sinkt ihr Zuckergehalt. Versucht man hingegen, den Zuckergehalt weiter zu steigern, dann sinkt der Ertrag. Wie diese negative Korrelation zustande kommt, wurde bis heute nicht genau aufgeklärt (KWS, 2014).

Neben der Zuckerrübe ist die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) eine der wichtigsten Nutzpflanzen in Europa und dient als Stärkelieferant. Native und modifizierte Stärke sind wichtige Bestandteile der heutigen Ernährung. Nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie spielt Stärke heutzutage eine bedeutende Rolle, sondern auch in der Futtermittel- und Papierindustrie, sowie in der chemischen Industrie. Aus Stärke können Produkte wie z.B. Kleister, Kleb- und Schmierstoffe, Bau- und Kunststoffe hergestellt werden. In den letzten Jahren hat es eine Fülle von Produktentwicklungen auf Stärkebasis gegeben, wie z.B. biologisch abbaubare Biokunststoffe, auf deren Basis kompostierbare Tragetaschen und Tüten hergestellt werden. Das Potential der Stärke ist noch nicht ausgeschöpft, weshalb an neuen Einsatzmöglichkeiten geforscht wird. Die klassische Züchtung von Kartoffeln und das damit verbundene Einkreuzen von gewünschten Eigenschaften ist bei der Kartoffel aufgrund eines tetraploiden Chromosomensatzes deutlich erschwert. Die Gentechnik ist heutzutage ein

wichtiges Werkzeug, um den Ertrag der Pflanzen gezielt zu manipulieren und den Bedürfnissen der Industrie gerecht zu werden (Biosicherheit, 2014).

1.2 Kohlenhydrate als Speicherform in Pflanzen

Kohlenhydrate dienen der Pflanze als Lieferant und Speicher für Energie, welche zum Wachstum und zum Erhalt fundamentaler metabolischer Prozesse erforderlich sind. In vielen höheren Pflanzen dient Stärke neben Saccharose als wichtigste Speicherform von Kohlenhydraten (Heldt *et al.*, 2010). Sie kann bis zu 80% des Trockengewichts in Speichergeweben erreichen. In Pflanzen unterscheidet man zwei Arten von Stärke, die transitorische und die Speicher- bzw. Reservestärke, wobei die transitorische Stärke in den Chloroplasten der Blätter (*source*-Gewebe) und in geringen Mengen auch in anderen grünen Geweben (z.B. Stängel) synthetisiert wird. Stärke ist neben Saccharose das wichtigste Hauptzwischenprodukt der Photosynthese, so wird der Überschuss der Photosyntheseprodukte in Form von Stärke in den Blättern zwischengespeichert. Die Stärke wird dann in der Dunkelphase abgebaut und bei den meisten Pflanzen in Form von Saccharose mobilisiert und zu den Verbrauchsgeweben (*sink*-Gewebe) transportiert.

In Zuckerrüben wird Saccharose in den Speichervakuolen der Rübenpfahlwurzel gespeichert (Martinoia *et al.*, 1987). Das Vakuolumvolumen kann bis zu 90% der Zelle ausmachen (Martinoia *et al.*, 1981). In Kartoffelknollen wird Reservestärke in den Amyloplasten gespeichert (Geiger *et al.*, 1994). Die Verwertung der Speicherkohlenhydrate erfolgt während der Keimung. Die Stärke dient als Energiequelle für die vegetative Vermehrung.

1.3 Synthese transitorischer Stärke in Blättern

Die Stärkesynthese erfolgt in den Chloroplasten der Blätter, dies ist in Abbildung 1 dargestellt. Ausgangsprodukt der Stärkesynthese in Blättern ist Fruktose-6-phosphat (F6P), ein Intermediat des Calvinzyklus. Die für die Stärkesynthese erforderliche Energie stammt aus der Lichtreaktion. Die Assimilation von CO₂ erfolgt während der Dunkelreaktion der Photosynthese. Im Calvin-Zyklus reagiert das CO₂ mit Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) unter Bildung von zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (3-PGA). Diese Reaktion wird von der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) katalysiert.

Die Isomerisierung von F6P zu Glukose-6-phosphat (G6P) erfolgt durch die Phosphoglukoisomerase (PGI). In einem weiteren Schritt überträgt die Phosphoglukomutase (PGM) den Phosphatrest des sechsten Kohlenstoffatoms auf das erste, wodurch Glukose-1-phosphat (G1P) entsteht. Die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) katalysiert dann die Reaktion von G1P mit ATP. Es entsteht

ADP-Glukose (Smith *et al.*, 1997b). Das bei dieser Gleichgewichtsreaktion anfallende Pyrophosphat (PP_i) wird durch eine plastidäre Pyrophosphatase (PPase) in zwei Phosphatmoleküle (P_i) gespalten, wodurch das Pyrophosphat aus dem Gleichgewicht entfernt wird, was die Gesamtreaktion irreversibel macht (Weiner *et al.*, 1987). Die Aktivität der AGPase unterliegt der allosterischen Regulation durch 3-PGA, ein Intermediat aus dem Calvinzyklus, und P_i , wobei 3-PGA als Effektor und P_i als Inhibitor wirken. Ein steigendes 3-PGA/ P_i -Verhältnis regt die Stärkesynthese an, wobei ein sinkendes 3-PGA/ P_i -Verhältnis die AGPase-Aktivität herabsetzt. Des Weiteren unterliegt die AGPase-Aktivität einer posttranslationalen Redoxregulation (Preiss *et al.*, 1991). Dabei wird eine intermolekulare Cystein-Brücke zwischen den beiden katalytischen Untereinheiten des Enzyms gebildet, wodurch das Enzym inhibiert wird (Hendriks *et al.*, 2003a). Analog können im Licht reduzierte Thioredoxine zur Aktivierung der AGPase führen.

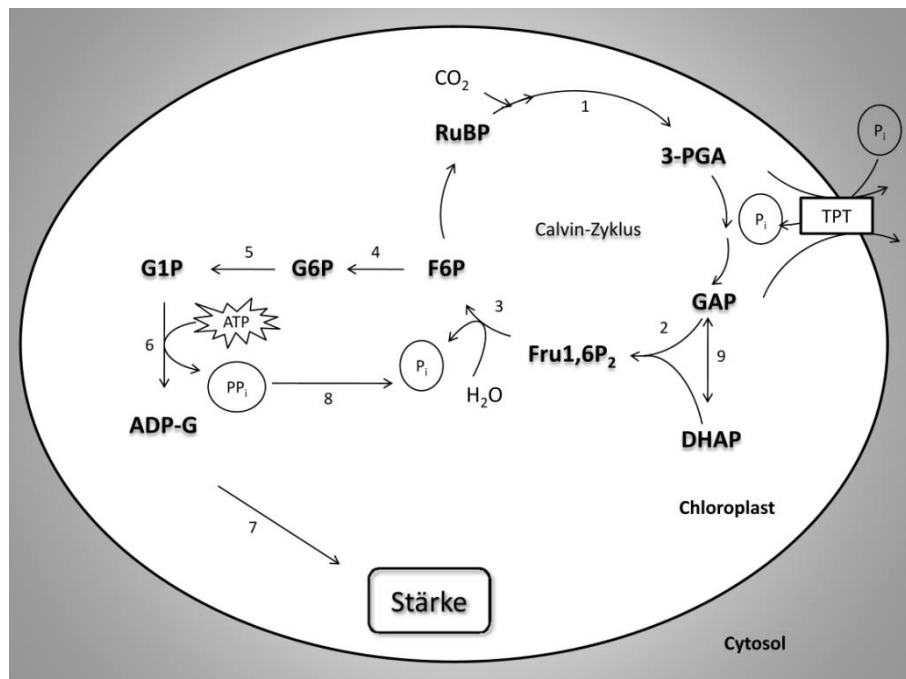


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stärkeaufbaus in Chloroplasten.

Enzyme: 1: Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase; 2: Aldolase; 3: Fruktose-1,6-bisphosphatase; 4: Phosphoglukoisomerase; 5: Phosphoglukomutase; 6: ADP-Glukose Pyrophosphorylase; 7: Stärke-Synthasen und Stärkeverzweigungsenzyme; 8: Pyrophosphatase; 9: Triosephosphat Isomerase

Ausgangssubstrat der Stärkesynthese ist Fruktose-6-Phosphat (F6P). F6P ist ein Intermediat des Calvin-Zyklus. Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) reagiert mit CO_2 zu 3-Phosphoglycerat (3-PGA). 3-PGA wird durch weitere Reaktionsschritte zu F6P. Die Phosphoglukoisomerase (PGI) isomerisiert dann F6P zu Glukose-6-phosphat (G6P), welches anschließend mittels Phosphoglukomutase (PGM) zu GP1 wird. Die ADP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase) katalysiert dann die Reaktion von G1P und ATP. Es entsteht ADP-Glukose (ADP-G). Durch Stärkesynthasen und Stärkeverzweigungsenzyme entsteht letztendlich die Stärke.

Durch diese Mechanismen wird sichergestellt, dass die Synthese von transitorischer Stärke nur im Licht abläuft (Hendriks *et al.*, 2003b). Ausgehend von ADP-Glukose erfolgt die Übertragung des Glukoserestes auf eine bereits existierende $\alpha(1\rightarrow4)$ -Polyglukankette durch Stärkesynthasen (SS). Auf diese Weise entstehen Amylose und Amylopektin, die beiden Bestandteile der Stärke. Aus Kartoffelpflanzen konnten bis heute drei Isoformen der löslichen Stärkesynthase, SS I, SS II, und SS III (Abel *et al.*, 1996, Edwards *et al.*, 1996, Kossmann *et al.*, 2000) und zwei Isoformen der granulagebundenen Stärkesynthasen (GBSS) (Kossmann *et al.*, 2000) isoliert werden. Die genaue Bedeutung der Isoform SSI im Bezug auf die Stärkesynthese ist unklar (Kossmann *et al.*, 1999). Eine Inhibierung der SSI in Kartoffel zeigte keine Änderung in der Stärkemenge oder der Qualität gegenüber den Kontrollpflanzen.

Die Synthese von Amylose geht von der granulagebundenen Stärkesynthase I aus (GBSSI). Kartoffelpflanzen, in denen die GBSSI mittels antisense-Technik inhibiert wurde, synthetisieren amylosefreie Stärke. Amylopektin wird durch Stärkeverzweigungs-Enzyme (engl.: *starch branching enzyme* SBE) gebildet. Sie hydrolysieren eine $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidische Bindung und katalysieren die Bildung einer $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidischen Bindung zwischen dem reduzierenden Ende des Polyglukans und einem anderen Glykosylrest (Martin *et al.*, 1995).

1.4 Mobilisierung von transitorischer Stärke in Blättern

Während der Nacht wird transitorische Stärke, welche tagsüber in den Chloroplasten der Blätter synthetisiert wurde, abgebaut (siehe Abbildung 2), um Saccharose zu synthetisieren. Saccharose dient in den meisten Pflanzen als Haupttransportform von Photoassimilaten und wird über das Phloem transportiert. Sie dient u.a. zur Versorgung nicht-photosynthetisch aktiver Gewebe. Stärke liegt in Form von semikristallinen Körnern vor, welche hauptsächlich aus Amylose und Amylopektin bestehen. Die initialisierende Reaktion des Stärkeabbaus ist die Aufbrechung bzw. das Angreifen der Oberfläche der Stärkekörner. Der Stärkeabbau kann in drei Phasen unterteilt werden:

1. Initialisierender Angriff auf die Stärkegranula
2. Abbau von Amylopektin und Amylose
3. Export von Maltose und Glukose ins Cytosol

Lange Zeit wurde angenommen, dass α -Amylasen den Stärkeabbau in den Chloroplasten einleiten, aber neuere Studien stellen dies in Frage. Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass für den Stärkeabbau in Blättern die α -Amylase nicht unbedingt benötigt wird (Yu *et al.*, 2005). Wie genau der initiale Angriff auf die Granula der Stärke stattfindet, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Im Gegensatz zur Stärkesynthese sind die dem Stärkeabbau zugrunde liegenden Mechanismen weniger verstanden. Bekannt ist, dass die Glukan-Wasser-Dikinase (GWD) und die Phosphoglukan-Wasser-Dikinase (PWD) eine wichtige Rolle spielen. Ein entscheidender Schritt für die Einleitung des Stärkeabbaus ist die Phosphorylierung der Stärke durch GWD und PWD (Fettke *et al.*, 2007, Lloyd *et al.*, 2005, Zeeman *et al.*, 2007). Die GWD fügen im Amylopektin an die C6- und C3-Positionen der Glykosylreste β -Phosphatreste aus ATP an. Die PWD phosphoryliert die bereits durch die GWD phosphorylierte Glykosylreste (Kötting *et al.*, 2005, Ritte *et al.*, 2006). Das Vorhandensein von Phosphatgruppen an Stärke-Polymeren stört vermutlich die Organisation bzw. die Struktur der Matrix der Granula, wodurch die Amylopektinketten für den weiteren Abbau zugänglich gemacht werden (Edner *et al.*, 2007, Hejazi *et al.*, 2008, Ritte *et al.*, 2006). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Exoamylase (β -Amylase) und das Stärke-Entzweigungsenzym Isoamylase 3 (engl.: *debranching enzym*, ISA3) für den weiteren Abbau sorgen. Die β -Amylase hydrolysiert $\alpha(1\rightarrow4)$ - und ISA3 $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidische Bindungen, wobei Maltose und lineare Polyglukane freigesetzt werden (Scheidig 2006).

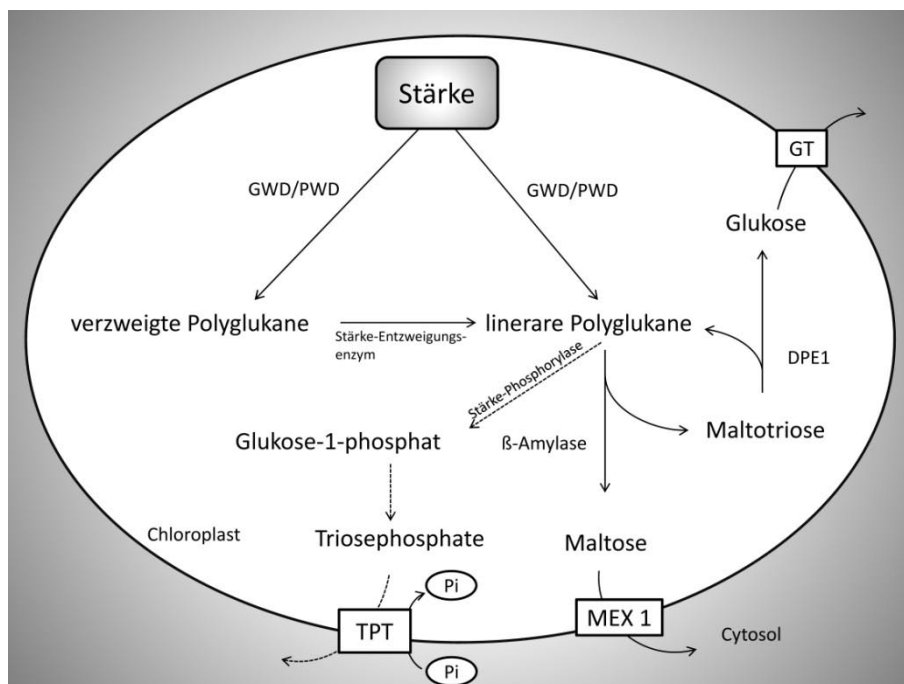


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Stärkeabbaus in Chloroplasten.

Die Stärke wird durch die Glukan-Wasser-Dikinase (GWD) und die Phosphoglukan-Wasser-Dikinase (PWD) phosphoryliert. Die dabei entstandenen verzweigten Polyglukane werden über Stärke-Entzweigungsenzyme linearisiert. Die linearen Polyglukane werden durch die β -Amylase zu Maltose und Maltotriosen abgebaut. Die Maltose wird über den Maltoseexporter MEX 1 ins Cytosol exportiert. Die Maltotriosen werden durch das plastidäre Disproportionierungsenzym I (DPEI) zu Glukose abgebaut, welche anschließend über den Glukosetransporter (GT) ins Cytosol transportiert wird. Die beim Abbau der linearen Polyglukane entstandenen Triosephosphate werden über den Triosephosphat-Phosphat Translokator im Austausch mit Pi ins Cytosol exportiert.

Die β -Amylase ist ausschließlich in der Lage, Maltose von linearen Polyglukanen abzuspalten, wenn diese länger als drei Glykosylreste sind, somit bleibt bei ungeradzahligen Ketten zwangsläufig ein Rest, Maltotriose (Lizotte *et al.*, 1990). Diese werden durch das plastidäre Disproportionierungsenzym (DPE1) abgebaut.

Dabei wird ein Glukoserest als Glukose freigesetzt und die verbleibenden zwei Glukosereste auf ein lineares Glukan übertragen (Critchley *et al.*, 2001). Glukose und Maltose werden dann ins Cytosol exportiert, wobei Maltose über den Maltoseexporter MEX1 (Niittylä *et al.*, 2004) und Glukose durch den plastidären Glukosetransporter (Weber *et al.*, 2000) exportiert werden, wo sie letztlich zur Synthese von Saccharose dienen.

1.5 Saccharosesynthese im Cytosol der Mesophyllzellen

Die Saccharosesynthese erfolgt im Cytosol der Mesophyllzellen (Abbildung 3). Saccharose ist ein aus Glukose und Fruktose bestehendes Disaccharid und stellt eine wichtige Transportform von Kohlenhydraten in Pflanzen dar. Saccharose dient den *sink*-Gewebe als Energielieferant für Wachstum, Entwicklung und Aufbau von Speicherstoffen wie z.B. Stärke. Nachts dienen Maltose und Glukose aus dem Stärkeabbau in Chloroplasten als Ausgangspunkt der Saccharosesynthese, wobei tagsüber in der Regel genügend Triosephosphate aus dem Calvinzyklus zur Saccharosesynthese zur Verfügung stehen (Stitt *et al.*, 1984).

Im Licht werden die Triosephosphate mittels des Triosephosphat/Phosphat-Translokators (TPT) im strikten Austausch mit P_i (Flügge *et al.*, 1989) aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert und über eine Aldolase zu Fruktose-1,6-bisphosphat (F1,6BP) umgesetzt. F1,6BP wird durch die Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) zu Fruktose-6-phosphat (F6P) dephosphoryliert, dies ist der erste irreversible Schritt der Saccharosesynthese. Diese Reaktion läuft nur im Licht ab, da die Fruktose-1,6-bisphosphatase im Dunkeln durch hohe Fruktose-2,6-bisphosphat-Konzentrationen gehemmt wird (Stitt *et al.*, 1984). F6P kann dann mit UDP-Glukose über die Saccharosephosphat-Synthase zu Saccharose-6-phosphat (Suc6P) verknüpft werden. Anschließend wird Suc6P durch die Saccharosephosphat-Phosphatase (SPP) in einer irreversiblen Reaktion zu Saccharose dephosphoryliert. G6P und G1P werden über die Reaktionen der PGI und PGM aus F6P gebildet. Die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase bildet aus UTP und G1P unter Freisetzung eines Pyrophosphats UDP-Glukose (Heldt 1999, Vreughdenhil 2007).

Eine effiziente Synthese von Saccharose im Dunkeln ist wegen der Hemmung der FBPase nur aus exportierter Maltose bzw. Glukose möglich. Nachts überträgt ein Disproportionierungs-Enzym (DPE2) einen Glukoserest der Maltose auf ein im Cytosol vorhandenes Heteroglukan, dabei wird der andere Glukoserest freigesetzt. Dieser Rest wird dann von einer Hexokinase (HK) zu Glukose-6-phosphat

phosphoryliert, das weiter durch die Phosphoglukoisomerase (PGI) zu F6P umgewandelt wird, welches im Anschluss wie oben beschrieben mit aktivierter Glukose zu Saccharose verknüpft wird. Die Saccharose wird dann über das Phloem exportiert oder in der Vakuole zwischengelagert (Lu *et al.*, 2004).

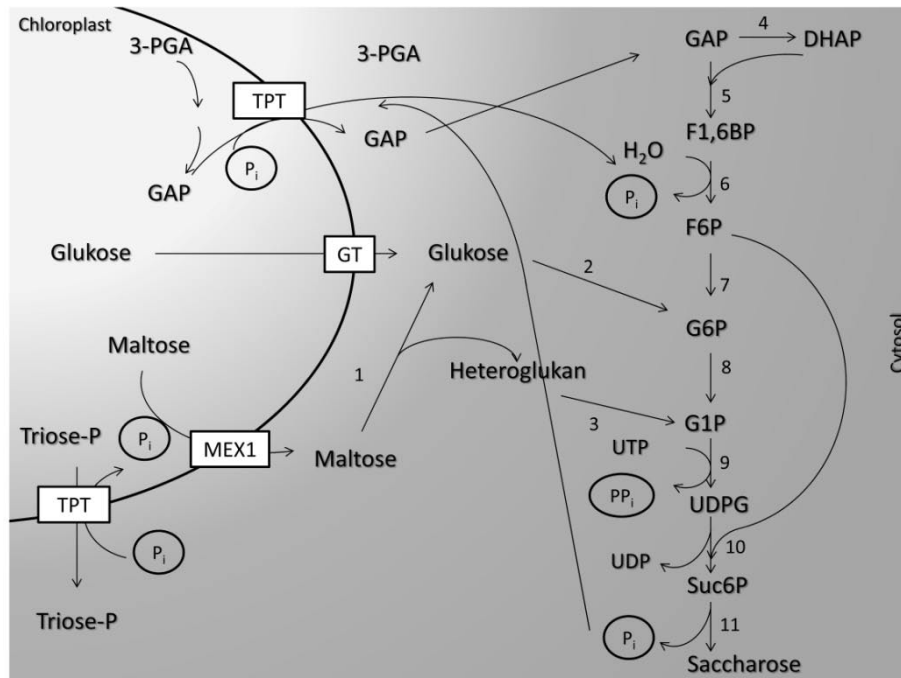


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Saccharosesynthese im Cytosol.

Enzyme: 1: Disproportionierungsenzym 2: Hexokinase; 3: Cytosolische Glukan-Phosphorylase; 4: Triosephosphat Isomerase
5: Aldolase; 6: Fruktose-1,6-bisphosphatase; 7: Phosphoglukoisomerase; 8: Phosphoglukomutase; 9: UDP-Glukose-Pyrophosphorylase; 10: Saccharose-Phosphat-Synthase; 11: Saccharose-Phosphat-Phosphatase

Triosephosphate wie z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) werden über den Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert. Im Cytosol werden dann GAP und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Fruktose-1,6-bisphosphat (F1,6BP) umgesetzt. Fruktose-1,6-bisphosphatase dephosphoryliert dann Fruktose-1,6-bisphosphat (F1,6BP) zu Fruktose-6-phosphat (F6P). Anschließend wird aus F6P durch die Phosphoglukoisomerase (PGI) erst Glukose-6-phosphat (G6P) und anschließend durch die Phosphoglukomutase Glukose-1-phosphat (G1P). G1P wird zusammen mit UTP durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase UDP-Glukose (UDPG), welches durch die Saccharose-Phosphat-Synthase zu Saccharose-6-phosphat (Suc6P) umgesetzt wird. Letztendlich wird aus Suc6P durch die Saccharose-Phosphat-Phosphatase Saccharose.

1.6 Transport und Speicherung der Kohlenhydrate in *sink*-Gewebe

Die dominante Transportform von Kohlenhydraten ist die Saccharose, da diese weniger reaktiv ist als reduzierende Zucker wie z.B. Glukose oder Fruktose (Taiz *et al.*, 2006). Sie wird von den *source*-Organen (Produktionsort) zu den Verbrauchsorganen, sogenannten *sink*-Organen transportiert. Man unterscheidet beim Saccharostransport den apoplastischen und den symplastischen Transport. Der

symplastische Transport der Saccharose erfolgt durch Plasmodesmata in die angrenzenden Siebröhrenelemente (Roberts *et al.*, 2003).

Beim apoplastischen Transport befördern Saccharosetransporter die Saccharose aus den Mesophyllzellen in den intrazellulären Raum (Apoplasten). Dieser Schritt erfordert keine Energie, da der Transport entlang eines Konzentrationsgradienten verläuft. Erst 2012 konnten Chen *et al.*, zeigen, dass Transporter der SWEET-Familie am Saccharoseexport aus den Mesophyllzellen beteiligt sind. Aus dem Apoplasten wird die Saccharose durch einen spezifischen Translokator, den H⁺-Saccharose-Translokator (SUC/SUT) wie z.B. der AtSUC2 bei *Arabidopsis thaliana* (Sauer *et al.*, 1994) oder der StSUT1 bei Kartoffeln (Riesmeier *et al.*, 1994) in die Geleitzellen transportiert. Der dazu benötigte Protonengradient wird durch eine H⁺-ATPase erzeugt, welche die erforderlichen Protonen unter ATP-Verbrauch in den Apoplasten exportiert. Die dazu notwendige Energie (ATP) wird aus einem kleinen Teil der importierten Saccharose gewonnen (Lerchl *et al.*, 1995). Wie wichtig diese Saccharosetransporter für die Versorgung der *sink*-Organe sind, zeigten Riesmeier *et al.*, (1994). Kartoffelpflanzen mit einer Antisense-Expression gegen den StSUT1 wiesen einen reduzierten Knollenertrag und einen erhöhten Stärke- und Zuckergehalt in den Blättern auf. Darüber hinaus verringerte sich die Zuckerexportkapazität. Auch *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit einer T-DNA-Insertion im SUC2 Gen (Gottwald *et al.*, 2000) zeigten unter anderem ein eingeschränktes Wachstum und eine verzögerte Entwicklung.

In den Siebröhren herrscht eine hohe Saccharosekonzentration. Durch die ständige Entnahme von Saccharose aus den Siebröhren entsteht ein Massenfluss von den *source*- zu den *sink*-Organen (Heldt, 2003). Die Entladung kann entweder auf dem symplastischen Weg oder auf dem apoplastischen Weg erfolgen (Sauer 2007). Bei der symplastischen Entladung gelangt die Saccharose über Plasmodesmen direkt von den Siebröhren in die Zellen der *sink*-Organe. Bei der apoplastischen Entladung wird die Saccharose aus den Siebröhren durch Diffusion in den Apoplasten exportiert. Der Weitertransport ist dann durch Saccharose/H⁺-Importer (SUC/SUT) möglich. Saccharose kann auch im Apoplasten durch Invertasen zu Glukose und Fruktose hydrolysiert werden und durch Hexosetransporter in die Zellen transportiert werden (Lalonde *et al.*, 1999). In Kartoffelpflanzen spielt auch der SUT1 bei der Entladung eine wichtige Rolle. Kartoffelpflanzen mit einer knollenspezifische antisense Expression wiesen eine Reduktion im Stärkegehalt in den Knollen auf (Kühn *et al.*, 2003), was auf eine Beteiligung an der Phloementladung hindeutet. Zudem gibt es die Möglichkeit, dass Saccharose durch die apoplastische Invertase gespalten wird (siehe Abbildung 4). Der Weitertransport der dabei entstehenden Zucker Fruktose und Glukose erfolgt über Hexosetransporter (Frommer *et al.*, 1995).

1.6.1 Speicherung von Saccharose in den Vakuolen der Rübenpfahlwurzeln

Prinzipiell können die verschiedenen Zucker kurz- oder langfristig in der Vakuole gespeichert werden. Welche Zucker in der Vakuole bevorzugt eingelagert werden, hängt nicht nur von der Pflanzenart, sondern auch vom jeweiligen Gewebetyp ab.

In Pfahlwurzeln der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) wird Saccharose in den parenchymatischen Zellen eingelagert, welche im zweiten Vegetationsjahr als Energiequelle für die generative Entwicklungsphase, d.h. für das Schossen, Blühen und die Samenbildung (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003) dient. Es liegen in der Rübenpfahlwurzel bis zu 100-fach höhere Konzentrationen an Saccharose in der Vakuole als im Cytoplasma vor (Snyder *et al.*, 1966). In den Vakuolen der Rübenpfahlwurzel werden Zucker weit über den Konzentrationsausgleich akkumuliert. Der Import erfordert somit eine Energetisierung des Tonoplasten (Martinoia *et al.*, 2000). Es gibt zwei verschiedene Protonenpumpen zur Energetisierung des Tonoplasten. Es gibt eine V-Pyrophosphatase (V-PPase) und eine ATPase vom V-Typ (V-ATPase), durch deren Aktivitäten ein elektrochemischer Gradient über dem Tonoplasten entsteht (Kluge *et al.*, 2003, Maeshima *et al.*, 2000, Rea *et al.*, 1987, Sze *et al.*, 1999). Alle Vakuolentypen scheinen beide Protonenpumpen zu haben (Hedrich *et al.*, 1989, Krebs *et al.*, 2010). ATPasen sind komplexe Proteine, die aus zahlreichen Untereinheiten aufgebaut sind (Sze *et al.*, 2002).

Proteine, die den Zuckertransport über den Tonoplasten in die Vakuole vermitteln, sind in *Arabidopsis* teilweise identifiziert. Zuckertransporter des Tonoplasten sind erst in den letzten Jahren auf molekularer Ebene identifiziert worden, jedoch bis vor kurzem kein Transportprotein für den vakuolären Saccharoseimport (Büttner *et al.*, 2000). Zu den wichtigen Saccharosetransportern in Pflanzen gehören die SUTs (Doidy *et al.*, 2012). Schneider *et al.*, (2012) zeigten, dass der AtSUT4 im Tonoplasten lokalisiert ist und für den Saccharoseexport als Saccharose/H⁺-Symporter fungiert.

Eine wichtige Transporterfamilie sind die SWEETs. Bisher wurden die SWEETs als Plasmamembran Proteine und als Glukosetransporter beschrieben (Chen *et al.*, 2010). Erst vor kurzem wurden SWEET16 und SWEET17 aus *Arabidopsis thaliana* als tonoplastidäres Protein beschrieben (Chardon *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2012), welches die Diffusion von Fruktose bzw. Glukose aus der Vakuole erleichtert. Darüber hinaus besitzen die SWEETs ebenfalls die Fähigkeit, Saccharose zu transportieren. Chen *et al.*, (2012) zeigten, dass die SWEET-Transporter am Export von Saccharose aus den Mesophyllzellen beteiligt sind.

Eine weitere wichtige Transporterfamilie, die zur Major-Facilitator-Superfamilie (MFS) gehört, ist die der Tonoplast-Monosaccharid-Transporter (TMT) (Wormit *et al.*, 2006). Sie wurden als Hexose/H⁺-Antiporter charakterisiert und vermitteln den Glukoseimport über den Tonoplasten in die Vakuole

(Neuhaus 2007). Ursprünglich galten TMTs als reine Glukose- und Fruktosetransporter, neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass sie höchst wahrscheinlich ebenfalls am Saccharosetransport beteiligt sind (Schulz *et al.*, 2011). Wie genau die Saccharose in die Speichervakuole der Rübenpfahlwurzeln gelangt, ist noch unklar.

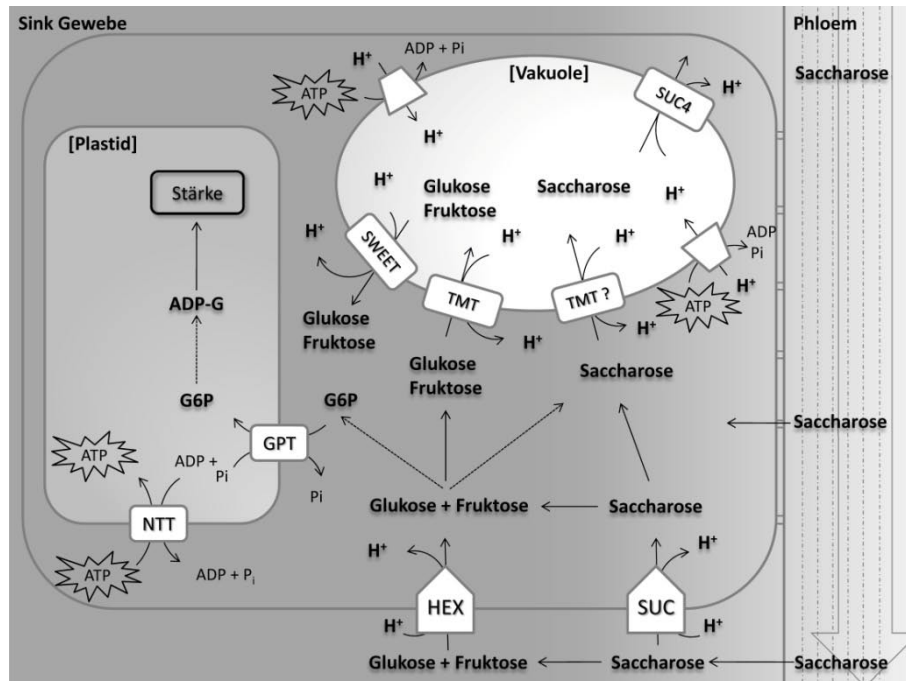


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Transportwege von Saccharose in der Rübenpfahlwurzel (Lalonde *et al.*, 1999) von *Beta vulgaris* (Zuckerrübe).

Saccharose wird über das Phloem in die *sink*-Gewebe transportiert und diffundiert hauptsächlich symplastisch über Plasmodesmata in die Zelle (Farrar *et al.*, 1992). Des Weiteren kann Saccharose auch apoplastisch entladen werden, wobei die Saccharose über einen durch SUTs vermittelten H^+ -Symport in die Zelle transportiert wird (Buckhout 1989). Die Saccharose kann dann entweder direkt in der Vakuole gespeichert werden oder durch Invertasen zu Glukose und Fruktose gespalten werden. Die Hexosen können über einen durch TMTs vermittelten H^+ -Antiport in die Vakuole transportiert werden. Möglicherweise sind die TMTs auch am Saccharoseimport beteiligt.

1.6.2 Synthese von Speicherstärke in den Amyloplasten der Kartoffelknollen

Im Gegensatz zur Stärkesynthese in Chloroplasten von Blättern ist die Stärkesynthese in heterotrophen Amyloplasten vom Import von Kohlenstoffverbindungen und Energie abhängig. Als Ausgangssubstrat in den Amyloplasten dient nicht wie in den Blättern F6P sondern G6P. G6P wird über den Glukose-6-phosphat/Phosphat Translokator (GPT) im strikten Gegentausch mit P_i oder Triosephosphaten aus dem Cytosol in die Amyloplasten transportiert (Kammerer *et al.*, 1998).

G6P kann auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden (s. Abbildung 5). Die durch die Saccharosesynthese (SuSy) gewonnene UDP-Glukose (UDPG) muss zunächst durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase zu G1P umgesetzt werden. G1P wird dann durch die PGM zu G6P umgewandelt

und steht dann ebenfalls für den Transport in die Amyloplasten bereit. G6P kann auch über den Invertase-Weg synthetisiert werden. Dabei entstehen Glukose und Fruktose bei der Spaltung von Saccharose durch Invertasen. Die Glukose und die Fruktose werden durch Hexokinasen zu G6P und F6P. F6P wird dann durch die Phosphoglukomutase zu G6P. Die Stärkesynthese erfolgt ausgehend von G6P in den Amyloplasten analog zur Stärkesynthese in Chloroplasten über die Enzyme plastidäre PGM und AGPase, sowie verschiedene Stärkesynthasen und Stärkeverzweigungsenzyme. Wie die AGPase in Blättern, wird auch die AGPase in Knollen allosterisch und durch posttranslationale Redoxmechanismen reguliert (Sweetlove *et al.*, 1999, Tiessen *et al.*, 2002) (s. 1.3.1). Die in den Amyloplasten benötigte Energie für die Stärkesynthese wird in Form von ATP über den plastidären Adenylat-Translokator (NTT) zugeführt (Kampfenkel *et al.*, 1995a). Der NTT transportiert ATP im Austausch mit $\text{ADP} + \text{P}_i$ in die Amyloplasten (Trentmann *et al.*, 2008). Das importierte G6P kann auch zur Gewinnung von NADPH genutzt werden (s. Abbildung 5). Im Rahmen des oxidativen Pentosephosphatwegs wird aus G6P unter Gewinnung von NADPH Ribulose 5-phosphat gebildet. Das gewonnene NADPH kann dann weiter z.B. für die Fettsäuresynthese genutzt werden.

1.7 Die Bedeutung von GPT, NTT und AAC in Kartoffelknollen

Die Stärkesynthese in den Amyloplasten hängt vom Import von Kohlenstoffgrundgerüsten und Energie ab. Um die Energie und die Kohlestoffgrundgerüste bereitzustellen, sind verschiedene Transporter notwendig. Zum einen der mitochondriale ADP/ATP-Transporter (AAC), welcher für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP im Cytosol verantwortlich ist, zum anderen der NTT, welcher die benötigte Energie (ATP) aus dem Cytosol in die Amyloplasten transportiert und der GPT, welcher die Bereitstellung der Kohlenstoffgrundgerüste für die Stärkesynthese gewährleistet. Die schematische Darstellung der Transporter in Abbildung 1.5 verdeutlicht deren Zusammenspiel.

Das in den Mitochondrien gebildete ATP wird im Austausch mit ADP durch den AAC ins Cytosol exportiert. Dort steht die Energie für weitere anabolische Prozesse bereit, wie z.B. zur Stärkesynthese. In *Arabidopsis* sind drei Isoformen des AAC bekannt (Haferkamp *et al.*, 2002). Die AACs sind in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Fiore *et al.*, 1998, Klingenberg 1989). Wie wichtig der AAC1 für Pflanzen ist, zeigen Knockout-Analysen. Der Knockout des AAC1 in *Arabidopsis thaliana* ist letal. Dies beweist, dass der AAC1 für Pflanzen essentiell ist (Leroch 2006).

Wie bereits erwähnt, importiert der GPT G6P, welches als Kohlenstoffgrundgerüst für die Stärkesynthese dient. Der plastidäre NTT transportiert die benötigte Energie in Form von ATP in die Amyloplasten (s. Abbildung 5). Auswirkungen erhöhter Transportaktivität des NTT durch deren Überexpression wurden bereits mit verschiedenen Promotoren an Kartoffeln untersucht (Geigenberger *et al.*, 2001, Greiten 2008, Tjaden *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2008).

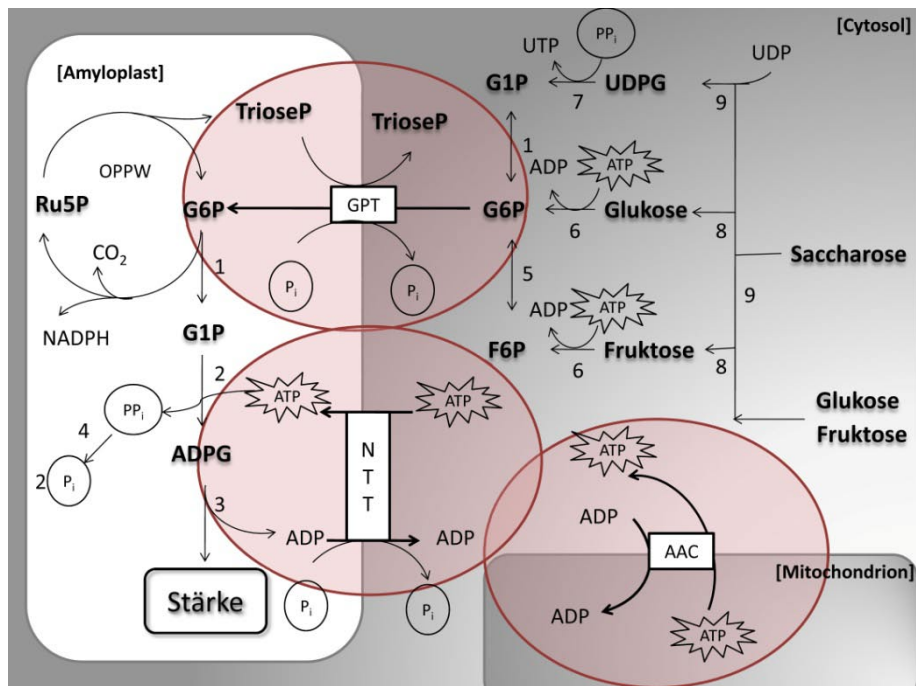


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bedeutung von GPT, NTT und AAC bei der Stärkesynthese in Amyloplasten.

Enzyme: 1: Phosphoglukomutase; 2: ADP-Glukose Pyrophosphorylase; 3: Stärkesynthasen und Stärkeverzweigungsenzyme; 4: Pyrophosphatase; 5: Phosphoglukoisomerase; 6: Hexokinase; 7: UDP-Glukose Pyrophosphorylase; 8: Invertase; 9: Saccharosesynthase; OPPW: oxidativer Pentosephosphatweg

Die Stärkesynthese in den Amyloplasten ist vom Import von Glukose-6-phosphat (G6P) und vom Import von ATP abhängig. Das benötigte G6P wird durch den Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT) im Austausch mit anorganischem Phosphat (P_i) oder Triosephosphat importiert. G6P kann dann entweder im oxidativen Pentosephosphatweg weiter reagieren oder durch die Phosphoglukomutase zu Glukose-1-phosphat umgesetzt werden. Die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) katalysiert dann die Reaktion von G1P und ATP. Das hierfür benötigte ATP wird mit Hilfe des plastidären Adenylat-Translokators (NTT) aus dem Cytosol in die Amyloplasten importiert. Dies geschieht im strikten Austausch mit $ADP + P_i$. Der mitochondriale ADP/ATP-Transporter (AAC) versorgt das Cytosol mit ATP, indem er das in den Mitochondrien produzierte ATP ins Cytosol transportiert. Dies geschieht im Gegen Austausch mit ADP.

Wie wichtig die Transporter NTT und GPT für die Stärkesynthese sind, zeigen unter anderem *antisense*- und Überexpressions-Versuche in Kartoffeln (Tjaden *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2008). In Arabidopsis wurden bisher zwei NTT-Isoformen charakterisiert, NTT1 und NTT2 (Kampfenkel *et al.*, 1995b, Linka *et al.*, 2003), wohingegen in Kartoffeln lediglich ein NTT-Gen gefunden wurde (Reiser *et al.*, 2004). Kartoffelpflanzen, die ein *antisense*-Konstrukt gegen den NTT exprimieren, wurden 1998 von Tjaden *et al.*, (1998) untersucht. Die Pflanzen zeichnen sich durch eine verminderte NTT-Aktivität aus, wobei diese gleichzeitig bis zu 50% weniger Stärke in Knollen im Vergleich zu Wildtyppflanzen (WT) aufweisen. Ein weiteres Merkmal dieser *antisense*-Pflanzen ist der reduzierte Knollenertrag, so dass der Gesamtknollenertrag pro Pflanze zwischen 5% und 30% vermindert ist. Die von Zhang *et al.*, (2008) untersuchten Pflanzen, die den NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Patatin-Promotors überexprimieren, zeichnen sich durch eine bis zu

zweifach erhöhte NTT-Aktivität aus. Jedoch konnte bei diesen Pflanzen keine Änderung im Stärkegehalt der Knollen und auch keine Erhöhung im Knollenertrag festgestellt werden (Zhang *et al.*, 2008).

Auch Pflanzen, die den GPT unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Patatin-Promotors überexprimieren, zeichnen sich durch eine erhöhte GPT-Transportaktivität aus. Jedoch konnte auch bei diesen Pflanzen keine Änderung im Stärkegehalt der Knollen bzw. im Knollenertrag festgestellt werden (Zhang *et al.*, 2008). Andere Experimente mit dem GPT zeigen die Bedeutung des Transporters für die Stärkesynthese. In *Arabidopsis thaliana* beispielsweise existieren zwei Isoformen des GPT. Die Abwesenheit von einem dieser Transporter (GPT1) führt zu Letalität der Gametophyten, vermutlich als Folge einer Beschränkung des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges durch die begrenzte Glukose-6-phosphat Zufuhr (Niewiadomski *et al.*, 2005). Zusammenfassend weisen die untersuchten Kartoffelpflanzen, welche entweder den GPT- oder den NTT überexprimieren, zwar erhöhte Transportaktivitäten auf, jedoch keine Änderung im Stärkegehalt bzw. Knollenertrag, wohingegen bei Pflanzen, die simultan beide Konstrukte unter Kontrolle des B33-Patatin-Promotors überexprimieren, deutliche Änderungen in den untersuchten Parametern festgestellt werden konnten. Sie zeigten ebenfalls zweimal mehr NTT- und 1,8-mal mehr GPT-Aktivität als Kontrollpflanzen. Darüber hinaus wiesen sie einen bis zu 19% erhöhten Knollenertrag und einen bis zu 28% höheren Stärkegehalt in Knollen im Vergleich zu WT-Pflanzen auf, so dass der Gesamtstärkeertrag pro Pflanze in Knollen um bis zu 44% erhöht war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stärkebildung sowohl durch die Zufuhr von Energie (durch NTT) als auch durch die Versorgung mit Kohlenstoffgrundgerüsten (durch GPT) co-limitiert ist (Zhang *et al.*, 2008).

Kartoffelpflanzen, welche den GPT und den NTT überexprimieren, zeigten im Gewächshaus signifikante Steigerungen im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze im Vergleich zum WT. In Freilandversuchen wiesen die transgenen Pflanzen hingegen eine leichte Verringerung im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze auf. Darüber hinaus zeigten sie insgesamt ein schlechteres Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile und eine früher einsetzende Seneszenz (Greiten 2008).

1.8 Seneszenz

Im Pflanzenreich wird zwischen der synchronen und der sequentiellen Seneszenz unterschieden (Leopold 1961). Die sequentielle Seneszenz von überdauernden Stauden, Sträuchern und Bäumen ist allgemein als herbstliche Laubfärbung bekannt. Die synchrone Seneszenz kann bei einjährigen Pflanzen, beispielsweise beim Reifen von Kartoffelfeldern, beobachtet werden. Die grundlegenden Prozesse sind die gleichen, doch unterscheiden sich diese beiden Seneszenztypen in einem entscheidenden Faktor. Während die sequentielle Seneszenz dem Absterben von Pflanzenteilen vorausgeht, führt die synchrone Seneszenz letztlich zum Tod der gesamten Pflanze mit Ausnahme der Samen bzw. der Knollen. Die Seneszenz ist wie das Wachstum oder die Reife ein geordneter und wichtiger Schritt in der Entwicklung (Straßburger 2002).

Die Seneszenz betrifft neben anderen Organen der Pflanze vor allem Blätter, die bei der sequentiellen Seneszenz als Herbstlaub zu Boden fallen und bei der synchronen Seneszenz als gelbbraune Blätter an der ebenfalls absterbenden Pflanze verbleibt. In beiden Fällen steht der Seneszenz-Vorgang unter Kontrolle von Phytohormonen. Ein steigender Gehalt an seneszenzfördernden Phytohormonen wie z.B. Abscisinsäure oder Ethylen und eine Abnahme an seneszenzverzögernden Phytohormonen, wie Cytokininen leiten die Seneszenz ein (Straßburger 2002). Es werden Zellinhaltsstoffe remobilisiert und aus dem Blatt transportiert, die bei mehrjährigen Pflanzen in überdauernden Organen gespeichert und bei einjährigen Pflanzen wie der Kartoffel zum Aufbau der Knollen genutzt werden (Feller *et al.*, 1986).

Während der Seneszenz ist für das bloße Auge nur der Abbau des Chlorophylls durch Abnahme der Grünfärbung sichtbar. Der Abbau des Chlorophylls und die Auflösung der Chloroplasten (Nooden *et al.*, 1997) dienen als Schutz des seneszierenden Gewebes vor photooxidativer Schädigung durch das Chlorophyll, das durch den Abbau der Chlorophyllbindeproteine freigesetzt wird (Hörtensteiner 1999, Matile 1992).

Die Rückgewinnung von wichtigen Verbindungen wie Stickstoff und Magnesium spielt in Bezug auf den Abbau des Chlorophylls nur eine untergeordnete Rolle. Der Schutz des seneszierenden Blattes gegen Photooxidation deutet darauf hin, dass es sich bei der Seneszenz nicht um einen passiven und ungeordneten Prozess handelt. Die Seneszenz ist ein regulierter Prozess, der nach einem festgelegten Programm abläuft und die Expression spezifischer Gene erfordert. Der Ablauf dieses Programms ist von äußeren Faktoren abhängig und in seiner Geschwindigkeit modulierbar, kann aber nicht völlig unterdrückt oder verhindert werden (Nooden *et al.*, 1997).

Die Seneszenz wird durch Veränderungen in der Genexpression bestimmter Gene begleitet. Durch „differentielles *Screening*“ von cDNA-Bibliotheken wurde gezeigt, dass die Expression vieler Gene während der Seneszenz herunterreguliert wird, während die Expression anderer Gene hochreguliert

wird. Ein Schwerpunkt der Seneszenzforschung ist die Identifizierung solcher Seneszenz-assoziiierter Gene (SAGs, (Lohman *et al.*, 1994), deren Transkripte während der Seneszenz verstärkt akkumulieren. Es wurden bisher eine Vielzahl von SAGs identifiziert (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003, Wingler *et al.*, 1998). Darunter sind Gene, die degradierende Enzyme wie RNasen (Taylor *et al.*, 1993) und Proteinasen (Hensel *et al.*, 1993) kodieren. Ein Beispiel für ein Seneszenz-assoziiertes Gen ist das SAG12 (Gan *et al.*, 1995). Dieses Gen kodiert eine Cystein-Protease und ist Seneszenz-abhängig. Es ist nicht Blatt-spezifisch, sondern kommt noch in anderen alternden Geweben wie z.B. Stängeln und Blütenorganen vor (Grbić 2002). Es ist bisher nicht möglich, den genauen zeitlichen Beginn der Seneszenz festzulegen, aber der Beginn des Chlorophyllabbaus entspricht dem Beginn der Expression der bisher bekannten SAGs.

1.9 Verzögerung der Seneszenz durch Cytokinine

1957 wurde erstmals nach exogener Gabe von Cytokinin zu abgetrennten Blättern eine verzögerte Seneszenz festgestellt (Richmond *et al.*, 1957). In anderen Versuchen wurden sogar bereits gelbe Blätter durch die externe Zugabe von Cytokinin wieder grün (Gan *et al.*, 1996). Die Isopentenyltransferase, kurz IPT, ist das Schlüsselenzym für die Cytokininbiosynthese. Es ist der erste limitierende Schritt der Synthese von Cytokinin. Die Isopentenyltransferase (IPT) katalysiert die Übertragung der Isopentenylgruppe von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) auf ATP, ADP oder AMP. Dies führt zur Bildung von Isopentenyl-ATP, -ADP bzw. -AMP, den Vorstufen der biologisch aktiven Cytokinine. Die Überexpression der Isopentenyltransferase in Pflanzen führte zwar zu einer vermehrten Cytokinin-Produktion, jedoch hat die Überproduktion von Cytokininen negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum (Gan *et al.*, 1995). Um der Überproduktion von Cytokininen in Pflanzen entgegenzuwirken, haben Gan und Amasino (1995) transgene Tabakpflanzen hergestellt, welche das IPT-Gen unter Kontrolle des Seneszenz-spezifischen Promotors SAG12 exprimierten. Es handelt sich hierbei um ein autoreguliertes System, d.h. sobald die Seneszenz beginnt, wird der SAG12-Promotor aktiviert, was zur IPT-Bildung führt, was wiederum zur Bildung von Cytokininen führt. Cytokinine führen schließlich zur Verzögerung der Seneszenz, wodurch der Promotor wieder inaktiviert wird, bis dieser Zyklus, wie in Abbildung 1.8 dargestellt, erneut beginnt.

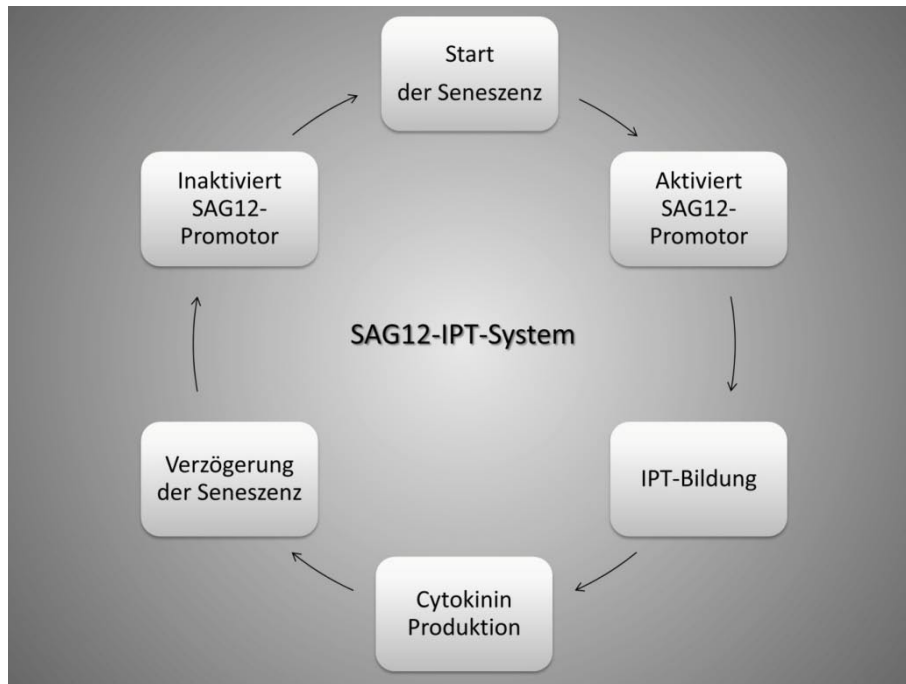


Abbildung 6: Regulation der Seneszenz mittels SAG12-IPT-System.

Ein Modell für die Cytokinin-Biosynthese. Das SAG12-IPT System ist ein autoreguliertes System, d.h. es reguliert sich selbst. Beginnende Seneszenz aktiviert den SAG12-Promotor, der wiederum zur Bildung von Cytokinen durch die Isopentenyltransferase (IPT) beiträgt. Die Cytokine regulieren die Seneszenz, d.h. sie wird verzögert, was bedeutet, dass der Promotor nicht mehr aktiv ist. Dies hat zur Folge, dass die Seneszenz sich nach einiger Zeit wieder verstärkt und somit den Promotor wieder aktiviert. So beginnt der Zyklus ständig von neuem.

1.10 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit waren entwicklungsabhängige Untersuchungen zum Kohlenstoffmetabolismus von Zuckerrübenpflanzen, sowie biotechnologische Ansätze zur Ertragsteigerung von Zuckerrübenpflanzen und Kartoffelpflanzen.

Es sollten Zuckerrübenpflanzen über ihre gesamte Entwicklung von fünf Monaten auf verschiedene Parameter hin untersucht werden. Zusätzlich sollten die Transkriptmengen verschiedener Gene vor der Zuckerspeicherphase und zum anderen während der Zuckerspeicherphase analysiert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Genexpression zwischen Gewächshausrüben und Feldrüben gibt. Darüber hinaus sollten zwei verschiedene biotechnologische Ansätze zur Ertragsteigerung von Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) untersucht werden. Zum einen sollte die *source*-Kapazität, zum anderen die *sink*-Kapazität in den Zuckerrübenpflanzen erhöht werden. Zur Erhöhung der *source*-Kapazität sollte die kleine, katalytische Untereinheit der Adenosindiphosphat-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus *Beta vulgaris* blattspezifisch unter der Kontrolle des *Bv.C1*-Promotors (KWS) reprimiert werden. Dadurch sollte der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese reduziert werden, was eine Erhöhung des Assimilatflusses in die Saccharosesynthese zur Folge haben könnte. Zur Erhöhung der *sink*-Kapazität sollte der mitochondriale ADP/ATP-Transporter (AAC) aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des rübenspezifischen *Bv.2-1-48*-Promotors (KWS) überexprimiert werden. Dadurch sollte die Bereitstellung von Energie in Form von ATP im Cytosol erhöht werden, was möglicherweise eine Erhöhung des Imports von Saccharose in die Speichervakuole zur Folge haben könnte.

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation bestand darin, mit Hilfe von verschiedenen biotechnologischen Ansätzen, die Frage zu beantworten, ob eine weitere Ertragssteigerung von bereits gentechnisch optimierten Kartoffelpflanzen möglich ist. Ein Ansatz bestand darin, die *sink*-Kapazität von Kartoffelpflanzen weiter zu optimieren. Doppelt transgene BGA-Pflanzen, welche simultan den *PsGPT* und *AtNTT1* unter Kontrolle des knollenspezifischen Promotors B33 exprimierten, wiesen im Gewächshaus einem um 19% erhöhten Knollenertrag, einen um 28% erhöhten Knollenstärkegehalt und in einen im Vergleich zum Wildtyp um 44% gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze auf (Zhang *et al.*, 2008). Darüber hinaus stellte Zhang bei diesen Pflanzen eine zusätzliche Erhöhung der Aktivität des mitochondrialen ADP/ATP-Transporter (AAC) fest. Es sollte überprüft werden, ob die zusätzliche knollenspezifische Überexpression des AAC1 aus *Arabidopsis thaliana* im Hintergrund der doppelt transgenen Pflanzen zu einer weiteren Ertragsteigerung führt. Eine mögliche Konsequenz der zusätzlichen Expression des *AtAAC1* bestand darin, mehr Energie in Form von ATP im Cytosol für den Import in die Amyloplasten und somit zur Stärkesynthese bereits zu stellen (s. Abbildung 5). Es sollte also die Frage untersucht werden, ob die Aktivitätserhöhung des AAC in

den doppelt transgenen BGA-Pflanzen bereits ausreichend war oder ob durch eine zusätzliche Überexpression des *AtAAC1* eine weitere Ertragssteigerung möglich ist. Gegenstand dieser Arbeit war die Analyse dieser dreifach transgenen Pflanzen. Grundlage stellte die bereits in meiner Diplomarbeit hergestellten transgenen ACGN- Pflanzen dar, welche in Gewächshausanzuchten analysiert werden sollten.

Ein weiterer Ansatz basiert auf die Dissertation von Greiten (2008). Die von Greiten untersuchten BGA-Kartoffelpflanzen mit erhöhter GPT- und NTT-Aktivität in den Knollen wiesen bei Anzuchten im Gewächshaus signifikante Steigerungen im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze im Vergleich zum WT auf. Bei Anzuchten im Freiland jedoch war bei den transgenen Pflanzen eine leichte Verringerung im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze festzustellen. Darüber hinaus zeigten sie insgesamt ein schlechteres Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile und eine früher einsetzende Seneszenz. Es sollte überprüft werden, ob eine zusätzliche Überexpression der Isopentenyltransferase (IPT) aus *Agrobacterium tumefaciens* unter Kontrolle des Seneszenz-spezifischen SAG12-Promotors im Hintergrund der doppelt transgenen Pflanzen zur Verhinderung des Ertragsverlusts im Freiland führt. In dieser Arbeit sollten dreifach transgene Pflanzen (IGN) hergestellt werden und in Gewächshausanzuchten auf ihre Seneszenz und den Ertrag hin untersucht werden. Eine mögliche Konsequenz könnte aufgrund der verlängerten Aufrechterhaltung der Photosyntheseleistung der Blätter sein, dass es zu einer längeren Versorgung der *sink*-Organe mit Saccharose kommen könnte. Darüber hinaus ist bislang der SAG12-Promotor in Kartoffelpflanzen noch nicht untersucht worden. Zu diesem Zweck sollte zusätzlich die Aktivität des Promotors anhand einer Reporteranalyse (GUS) untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Auswirkung der verzögerten Seneszenz durch das SAG12-IPT-System im Wildtyp Hintergrund analysiert werden. Die verzögerte Seneszenz könnte möglicherweise zu einer Ertragssteigerung führen. Aufgrund der verlängerten Aufrechterhaltung der Photosyntheseleistung der Blätter könnte es zu einer längeren Versorgung der *sink*-Organe mit Saccharose zur Folge haben, was möglicherweise zu einem erhöhten Ertrag führen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Zur Herstellung von Lösungen, Medien und Puffern wurden Chemikalien mit einem Mindestreinheitsgrad von *pro analysi* von folgenden Firmen verwendet: AppliChem GmbH (Darmstadt, D), Biomol (Hamburg, D), Duchefa (Haarlem, NL), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) und VWR (Darmstadt, D).

Die Verbrauchsmaterialien, die zur Durchführung dieser Arbeit benötigt wurden, wurden bei der Vertriebsfirma VWR (Darmstadt, D) bestellt. Für den molekularbiologischen Teil dieser Arbeit wurden Enzyme der Firmen Invitrogen (Kalsruhe, D), MBI Fermentas (Leon-Rot, D), Promega (Mannheim, D), Qiagen (Hilden, D), Roche (Mannheim, D) und Sigma (Deisenhofen, D) verwendet.

2.1.2 Wasserqualität

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

2.1.3 Verwendete Vektoren

Tabelle 1: Verwendete Vektoren, deren Herkunft und Resistenzen

Vektor	Herkunft	Bakterielle Resistenz	Pflanzliche Resistenz
pBin19-B33-AAC	Universität Kaiserslautern	Hygromycin	Hygromycin
pBin19-B33-NTT	Universität Köln	Kanamycin	Kanamycin
pGWB1-SAG12-GUS	Universität zu Köln	Hygromycin Kanamycin	Hygromycin Kanamycin
pGWB1-SAG12-IPT	Universität zu Köln	Hygromycin Kanamycin	Hygromycin Kanamycin
pBINAR-KAN	Universität zu Köln	Kanamycin	
p2-1-48-GUS	KWS	Ampicillin	
pC1-TL	KWS	Ampicillin	

2.1.4 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden mithilfe des Computerprogramms Vector NTI 11 der Firma Invitrogen entworfen und von der Firma Sigma (Deisenhofen, D) synthetisiert.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Name	Nr.	Sequenz	T [°C]
At.NTT (480) fwd	4a	AAGCCAACCTTCAGCCTTCCCA	61
At.NTT (480) rev	4b	CCTTCTTGGAGAGAACATTGGAGAG	66
IPT control fwd	10a	ATGGACCTGCATCTAATTTTCGGTC	69
IPT control rev	10b	TCTGGCTAGCAAACAACATGGCATA	70
St.β-tub fwd	12a	AAATGTGCAGAACAAGAACTCATCC	66
St.β-tub rev	12b	CATAACAAGTTCACTTTGGCAG	58
PsGPT fwd	13a	TTCAACGAAGAAGCCTCTTCA	69
PsGPT rev	13b	CGATCATATTGAAATTGAGCTCGGT	67
GUS fwd	16a	GCAATTGCTGTGCCAGGCAG	63
GUS rev	16b	GAAGTTCATGCCAGTCCAGC	60
At.SAG12 fwd	17a	AAGTTGAGATATGTTTGAGAAGAGG	61
At.SAG12 rev	17b	GTGTTGATGATGTTTTGCAT	52
Bv.AGPB1 fwd	22a	GCTTAGCACTCTGCAGCACCATT	69
Bv.AGPB1 rev	22b	GGTCATGGTGGGAGACTCAGATAGG	69
Bv.GPT1 fwd	24a	GTGTGAAGCTTATGAGGCAGATCGA	69
Bv.GPT1 rev	24b	ATGTTGCGGAAGACAAAAGCCA	69
Bv.TMT1.fwd	25a	AAAGAAGGTGCAGATGGGAGGAAG	69
Bv.TMT1.rev	25b	GGGAACAAGCAAACAAGCTCAAGCT	70
Bv.Actin1 fwd	27a	GACATGGAGAAGATTTGGCACCAC	69
Bv.Actin1 rev	27b	ACCAGCAAGATCCAAACGGAGAA	69
Bv.NTT1 fwd	28a	ATGAACCGCTCGGGAAGTCACC	72
Bv.NTT1.rev	28b	GGGATCTTGCTACCCTTGTCGTTGC	72
Bv. AGPaseB2 fwd	31a	GCAGACATTACTGTTGCTGC	61
Bv. AGPaseB2 rev	31b	ACCGATGACGCTGTCAGTTA	63
Bv.C1 fwd	33a	AGCTTGAGGATCAACATTCTTCTG	64
Bv.C1 rev	33b	ATCAAGGGCTAGATTGGGTTTGAGA	68
Bv.2-1-48 fwd	34a	AACTGAACTGAACTGTTAATT	52
Bv.2-1-48 rev	34b	GGTTTGGAAATTTTGGAAACGCTCAC	67
Bv.SUT1 fwd	36a	AGCATCTCCGGATCAGGACAAG	70
Bv.SUT1 rev	36b	GATCCCCGTTCTCTAACATTTCT	69
Bv.SUT2 fwd	37a	AAGAAACACAACAACAAGAACACCA	65
Bv.SUT2 rev	37b	GAAGAAGGAAAAAATGCATTGGCA	69

2.1.5 Verwendete Antibiotika

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika und deren Endkonzentrationen

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

2.1.6 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5α verwendet.

Zur Transformation von *Solanum tuberosum* wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Quelle	Genotyp
DH5α	Hanahan, 1983	φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k -m _k -), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U196
GV2260	MC Brid und Summerfelt 1990	Rif [®] /pGV 2260 (pTiB6SΔT-DNA) Carb [®]

2.2 Arbeiten mit *Beta vulgaris* (Zuckerrübe)

2.2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Die Zuckerrüben wurden in einem 14-tägigen Rhythmus im Gewächshaus ausgesät und nach zwei Wochen in Töpfe mit 7 Liter Volumen (Oberradius= 11 cm, Unterradius= 8 cm und Höhe= 26 cm) pikiert. Die Anzuchten und Pflege der Zuckerrübenpflanzen übernahm das Team der Gärtnerei. Im Gewächshaus herrschten konstante Langtagbedingungen mit einem Licht/Dunkelrhythmus von 16/8 Stunden und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40%. Die Temperatur betrug in der Lichtperiode 21 °C und wurde in der Dunkelperiode auf 18 °C abgesenkt. Die photosynthetisch aktive Strahlung betrug im Durchschnitt von 200-300 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2\text{s})$. Die Pflanzen wurden alle zwei Wochen mit 2%tigem Wuxal gedüngt. Die Erde „Classic“ mit der Zusatzbezeichnung ED 73 wurde von der Firma EINHEITS-ERDE (Sinntal-Altengrona, D) bezogen.

2.2.2 Probennahme von Blatt- und Pfahlwurzelgewebe

Gewebeproben von Blättern wurden mit einem Korkbohrer ($r= 0,4$ cm) geerntet, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Pfahlwurzelproben wurden mit Hilfe einer Gemüseraspel in feine Streifen geschnitten und direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die so präparierten Proben konnten nun bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert werden.

2.3 Arbeiten mit *Solanum tuberosum* (Kartoffeln)

2.3.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Die Anzucht der Kartoffeln erfolgte in Sterilkultur auf 3MS-Medium in Einmachgläsern (Firma Weck, Wehr, D) in einem Pflanzenkulturschrank mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Temperatur von 22 °C. Nach dem Erreichen einer Größe von ca. 12 cm und der Ausbildung von Wurzelmasse wurden die Stecklinge in Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) umgetopft und ins Gewächshaus transferiert. Im Gewächshaus herrschten konstante Langtagbedingungen, mit einem Licht/Dunkelrhythmus von 16/8 Stunden und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40%. Die Temperatur betrug in der Lichtperiode 21 °C und wurde in der Dunkelperiode auf 18 °C abgesenkt. Die photosynthetisch aktive Strahlung betrug im Durchschnitt von 200 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2\text{s})$.

2.3.2 Transformation von Kartoffelblätter

Zur Transformation von Kartoffelblättern waren folgende Medien erforderlich:

<u>3MS-Flüssigmedium:</u>	4,6	g/l	Murashige & Skoog-Medium (M0245)
	30,0	g/l	Saccharose
	pH 5,8		mit KOH
<u>GMS-Medium:</u>	4,4	g/l	Murashige & Skoog-Medium (M0245)
	16,0	g/l	Glukose
	pH 5,8		mit KOH
<u>CG76-Medium:</u>			GMS-Medium
	3,0	g/l	Gelrite
	5,0	mg/l	NAA (Naphtyl Acetic Acid)
	0,1	mg/l	BAP (G-Benzaladenin)
	350	mg/l	Cefotaxim

Die zur Transformation benötigten transgenen Agrobakterien wurden zwei Tage vor der eigentlichen Transformation als 50 ml Flüssigkultur in Selektionsmedium (siehe Tabelle 3) angezogen. Am Transformationstag wurde die Agrobakterienkultur 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Sediment wurde in 10 ml 3MS-Flüssigmedium resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Agrobakterienlösung bei einer Wellenlänge von 600 (OD600) zwischen 1-2 mit 3MS-Flüssigmedium eingestellt. Blätter junger Kartoffelpflanzen aus Sterilkultur wurden abgeschnitten und auf ein mit 3MS-Flüssigmedium getränktes, steriles Filterpapier in einer Petrischale gelegt. Die Stängelansätze wurden entfernt und die Blätter mit einem sterilen Skalpell an der Blattoberseite vorsichtig eingeritzt. 12 bis 15 der so behandelten Blätter wurden, mit der Oberseite nach unten, in eine mit 12 ml 3MS-Flüssigmedium und 1 ml Agrobakterienlösung gefüllte Petrischale überführt. Dieser Ansatz wurde zwei Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die Transformation einzuleiten. Zur Vorbereitung der Induktion von Kalli wurden die Blättchen auf CG76-Medium in Einmachgläser überführt und im Pflanzenkulturschrank gelagert.

2.3.3 Induktion von Kalli und Regeneration von Kartoffelpflanzen

Zur Induktion von Kalli war folgendes Medium erforderlich:

<u>CG75-Medium:</u>		GMS-Medium
	3,0 g/l	Gelrite
	0,02 mg/l	NAA (Naphtyl Acetic Acid)
	0,02 mg/l	GA ₃
	2,0 mg/l	Zeatin
	350 mg/l	Cefotaxim

Zur Selektion von positiv transformierten Pflanzen wurde dem Medium die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt (s. Tabelle 3). Nach einwöchiger Inkubation auf CG76-Medium (s. 2.3.2) wurden die Blätter zur Induktion von Kallus und Sproßwachstum auf CG75-Medium in Einmachgläser überführt und nach zwei Wochen auf frisches CG75-Medium umgesetzt. Diese Umsetzung wiederholte sich alle zwei Wochen, bis genügend Sprosse aus den Kalli gewachsen waren. Nach Erreichen einer Größe von zwei bis vier cm wurden die Sprosse vom Kallus abgeschnitten und in weitere Einmachgläser mit 3MS-Medium mit entsprechenden Antibiotika (s. Tabelle 3) überführt. Nach Ausbildung von Wurzeln und Erreichen einer Größe von fünf bis zehn cm erfolgte die Duplikation der Pflanzen. Dazu wurden diese auf halber Höhe abgeschnitten, die dabei erzeugten Stecklinge wurden dann mit der Schnittseite nach unten in ein neues Einmachglas mit 3MS-Medium, mit entsprechenden Antibiotika (s. 2.1.3) überführt. Die Duplikate wurden nach Erreichen einer Größe von ca. 12 cm und der Ausbildung von genügend Wurzelmasse in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert.

2.3.4 Probennahme von Blatt- und Knollengeweben

Gewebeprobe von Blättern und Knollen wurden mit einem Korkbohrer ($r = 0,4$ cm) geerntet, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Knollenproben wurden vor dem Einfrieren mit einem Skalpell in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten, um einen späteren Aufschluss zu erleichtern. Die so präparierten Proben konnten nun bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert werden.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Umgang mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli-Bakterien (*E. coli*-Stamm DH5 α) wurden entweder in LB-Flüssigkultur oder auf LB-Platten bei 37 °C angezogen.

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

<u>LB-Platten:</u>		LB-Medium
	15 g/l	Bakterien-Agar

Nach dem Auffüllen mit Wasser wurden die jeweiligen Medien autoklaviert. Zur Selektion transgener Organismen wurden nach Abkühlen auf ca. 60 °C die benötigten Antibiotika hinzugegeben (s. Tabelle 3). Zur Anzucht von *E.coli* in Flüssigkultur wurden einzelne vorhandene Kolonien von einer LB-Platte gepickt oder 5 μ l einer Glycerinstammkultur in 3 ml LB-Medium angeimpft und bei 38 °C unter Schütteln (ca. 250 min⁻¹, Bodenschüttler G25, Fa. New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D) über Nacht inkubiert. Die Lagerung der Bakterien erfolgte einige Wochen lang bei 4 °C auf LB-Platten oder als Glycerinstammkultur (500 μ l Kultur und 500 μ l 100% Glycerin) bei -80 °C.

2.4.2 Umgang mit *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)

Agrobacterium tumefaciens-Bakterien (GV2260) wurden entweder in YEB-Flüssigkultur oder auf YEB-Platten bei 28 °C angezogen.

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

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

Nach dem Auffüllen mit Wasser wurden die jeweiligen Medien autoklaviert. Zur Selektion transgener Organismen wurden nach Abkühlen auf ca. 60 °C die benötigten Antibiotika hinzugegeben (s. Tabelle 3). Zur Anzucht von *A. tumefaciens* in Flüssigkultur wurden einzelne vorhandene Kolonien von einer YEB-Platte gepickt oder 5 µl einer Glycerinstammkultur in 3 ml YEB-Medium angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln (ca. 250 min⁻¹, Bodenschüttler G25, Fa. New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D) über zwei Tage inkubiert. Die Lagerung der Bakterien erfolgte einige Wochen lang bei 4 °C auf YEB-Platten oder als Glycerinstammkultur (500 µl Kultur und 500 µl 100% Glycerin) bei -80 °C.

2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* und *A. tumefaciens*

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden folgende Lösungen verwendet:

<u>TFB 1:</u>	100	mM	RbCl ₂
	50	mM	MnCl ₂
	30	mM	KOAc (Kaliumacetat)
	10	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin (v/v)
	pH 5,8		mit HAC

<u>TFB 2:</u>	100	mM	RbCl ₂
	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	MOPS
	15	%	Glycerin (v/v)
	pH 7,0		mit NaOH

Nach dem Auffüllen mit Wasser wurde die Lösung sterilfiltriert und auf Eis gelagert.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden aus der jeweiligen Glycerinstammlösung 5 µl der Bakterien in 10 ml Kulturmedium angeimpft. Zur Herstellung kompetenter *E.coli* wurde der Stamm DH5α in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C bei 250 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* wurde der Stamm GV2260 in YEB-Medium angeimpft und über Nacht bei 28 °C bei 250 rpm schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde 1 ml der Vorkultur in einen 250 ml Kolben mit 100 ml vorgewärmtem bakterienspezifischen Medium überführt und weiter bei der jeweiligen artspezifischen Temperatur schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer OD von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm, wurde die Kultur in eiskalte 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten auf Eis gelagert. Nach anschließender Zentrifugation bei 2.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Zellen fortlaufend auf Eis gelagert. Das Zellsediment wurde in 15 ml eiskaltem TFB1 vorsichtig resuspendiert. Nach der Resuspendierung wurden die Zellen für zwei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend bei 2.000 rpm 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Sediment in 2 ml eiskaltem TFB2

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 100 µl Aliquots in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei –80 °C gelagert wurden.

2.4.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 50 bis 200 ng DNA zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 1 min in einem 42 °C warmen Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 800 µl LB-Medium, und die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert, ein Teil des Überstandes verworfen, so dass das Sediment in 100 µl verbleibendem Überstand resuspendiert wurde. Bei erwarteten hohen Kolonienzahlen wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (s. Tabelle 3) ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C kopfüber inkubiert.

2.4.5 Transformation von chemisch kompetenten *A. tumefaciens*

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 50 bis 200 ng DNA zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 5 min in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 800 µl YEB-Medium und eine weitere Inkubation von 5 min bei 37 °C. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension für eine Minute bei 12000 rpm zentrifugiert, ein Teil Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl verbleibendem Überstand resuspendiert. Diese Suspension wurde dann auf YEB- Platten mit den entsprechenden Antibiotika (s. Tabelle 3) ausplattiert. Die Agarplatten wurden zwei Tage bei 28 °C kopfüber inkubiert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Plasmid-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit der Firma Bio-Rad Laboratories genutzt und nach Herstellerangaben verwendet. Um ein „low copy“-Plasmid zu isolieren, wurde das Pure Yield™ Plasmid Midiprep System der Firma Promega genutzt und nach Herstellerangaben verwendet. Ein Teil der Flüssigkultur wurde gegebenenfalls als Glycerinstammkultur bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2 Präparation von genomischer DNA aus Pflanzengewebe

<u>2x-Puffer:</u>	100 mM	Tris HCl, pH 7,5
	600 mM	NaCl
	40 mM	EDTA
	1 %(w/v)	Sarkosyl
	4 %(w/v)	SDS

<u>Extraktionspuffer:</u>	25 ml	2x-Puffer
	20 ml	12 M Harnstoff
	2,5 ml	Phenol
	2,5 ml	H ₂ O

<u>PCI:</u>	50 %	Phenol
	48 %	Chloroform
	2 %	Isoamylalkohol

Um DNA eines ausreichend hohen Reinheitsgrades z.B. für die PCR (s. 2.5.7) zu erhalten, erwies sich eine leicht abgewandelte Version des Protokolls von Liu (Liu *et al.*, 1995) als geeignet. Dazu wurde Gewebematerial entnommen, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ggfs. bis zur Präparation bei -80 °C aufbewahrt. Die Proben wurden mit einem vorgekühlten Bohrer zermahlen und in 500 µl Extraktionspuffer aufgenommen. Die Extrakte wurden anschließend mit 400 µl PCI ausgeschüttelt. Um restliches Blattmaterial und Proteine abzutrennen, wurden die Extrakte 15 min lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 400 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA aus der Lösung wurden 280 µl Isopropanol hinzugefügt und der Ansatz 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Die ausgefallene DNA konnte dann durch zehn-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm sedimentiert, zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen, in der Speed Vac (Fa. Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur eingetrocknet und anschließend in

50 µl H₂O gelöst werden. Die DNA-Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5.3 Präparation von RNA aus Pflanzengeweben

Zur Isolierung von RNA aus Blatt- und Knollengewebe waren folgende Lösungen erforderlich:

<u>Z6-Puffer:</u>	8 mM	Guanidinhydrochlorid, pH 7,0
	20 mM	EDTA
	20 mM	MES
	0,7 %	Mercaptoethanol

<u>PCI:</u>	50 %	Phenol
	48 %	Chloroform
	2 %	Isoamylalkohol

Die zu isolierende RNA wurde aus Blatt- und Knollenmaterial der einzelnen Pflanzen gewonnen.

Hierzu wurden 50-100 mg Gewebematerial Pflanzen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, in flüssigen Stickstoff überführt und ggfs. bis zur Präparation bei -80 °C aufbewahrt. Die Proben wurden mit Hilfe eines mit Stickstoff vorgekühlten Mörsers zerkleinert, mit 1,6 ml Z6-Puffer versetzt und anschließend bis zur Homogenität gemörsert. Das Homogenat wurde auf zwei neue Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 300 µl PCI hinzugegeben, gemischt und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 40 µl 1 M Essigsäure und 560 µl Ethanol (100%) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 rpm 15 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl 80% Ethanol zweimal gewaschen.

Nach dem Waschvorgang wurde zentrifugiert (12.000 rpm, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment getrocknet. Nach Trocknung wurde das Sediment in 500 µl DEPC-H₂O gelöst und bei 65 °C für 15 min schüttelnd inkubiert. Der RNA-haltige Überstand, die wässrige Phase, wurde in ein neues RNA-freies Reaktionsgefäß überführt, mit 510 µl Lithiumchlorid versetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde am Folgetag der Überstand verworfen und das Sediment erneut zweimal mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (12.000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Sediment vollständig bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Sediment wurde in 30 µl H₂O bei 65 °C für 15 min schüttelnd gelöst, und zur Sedimentation wurde für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Um eine eventuelle

Kontamination mit DNA-Resten zu eliminieren, wurde ein darauf folgender DNA-Verdau durchgeführt (siehe 2.5.5).

2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die RNA- bzw. DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch eine Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des NanoDrop® ND-100 Spektrophotometers (Nanodrop Technologies). Es wurde die Absorption der aufgetragenen Lösung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. RNA bzw. DNA wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. 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 wurde der Reinheitsgrad über das mitgelieferte Computerprogramm ermittelt. Der Quotient sollte bei einem hohen Reinheitsgrad zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Thermo Fisher Scientific, 2009).

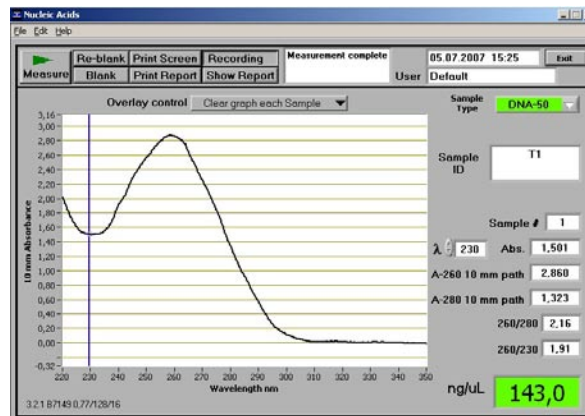


Abbildung 7: Darstellung einer Nano-Drop-Messung (<http://www.ous-research.no/home/lothe/methods/5860>)

1 μl der zu messenden Probe wurde direkt auf die Messoberfläche pipettiert und der Schwingarm des Gerätes darauf hinuntergelassen. Durch die Oberflächenspannung der Probe wird dabei eine Flüssigkeitssäule aufgebaut, wobei die Absorption der unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wurde. Zum Abgleich des Nullwertes diente Nukleinsäure-freies Wasser. Aus den gemessenen Spektren und Absorptionswerten wurden anschließend mithilfe des Computerprogramms die Konzentrationen und der Reinheitsgrad bestimmt und auf dem Bildschirm dargestellt (siehe Abbildung 7).

2.5.5 DNase Verdau von RNA-Präparationen

Um die RNA-Proben von vorhandener DNA-Verunreinigung zu befreien, wurde ein DNase-Verdau mit dem DNase-free Kit von Ambion® durchgeführt.

<u>Reaktionsansatz:</u>	30 µl	RNA (aus 2.5.3)
	4 µl	10x Puffer
	1,0 µl	DNase
	ad 40 µl	H ₂ O

2.5.6 Reverse Transkription

Von den gewonnenen reinen RNA-Proben (aus 2.5.5) wurden 4-6 µg RNA auf 22 µl mit H₂O aufgefüllt mit 2 µl Oligo-dT-Primern gemischt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden 16 µl Mastermix hinzugegeben und für 2-3 Stunden bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 70 °C für 10 min. Die so erhaltenen cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

<u>Mastermix:</u>	2,0 µl	10 mM dNTPs
	8,0 µl	5X Puffer (Bioline®)
	5,5 µl	H ₂ O
	0,5 µl	BioScript (Bioline®)

2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)


Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode, um eine bestimmte DNA-Sequenz *in vitro* zu vervielfältigen. Hierbei wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die *Dream Taq* DNA-Polymerase, kurz *Dream Taq* (MBI-Fermentas), verwendet. Sie verlängert Oligonukleotide, sogenannte „Primer“, die komplementär zu Sequenzen der Matrizen-DNA sind und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt beidseitig flankieren (Winnacker 1990). Durch wiederholte Reaktionszyklen wird das so definierte DNA-Fragment amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde in einem 20 µl-Maßstab in silikonisierten 200 µl „PCR-Strips“-Reaktionsgefäßen mit den in Tabelle 5 aufgeführten Komponenten angesetzt.

Tabelle 5: PCR-Komponenten

Name	Menge bzw. Konzentration	
Matrizen DNA/Template	1-3	ng
10 mM dNTPs	0,60	μl
10 mM 5'-Primer	0,50	μl
10 mM 3'-Primer	0,50	μl
<i>Dream</i>-Taq DNA-Polymerase	0,05	μl (2,5 Units)
10x <i>Dream</i>-Taq-Puffer	2,00	μl
H₂O	<i>ad</i> 20,00	μl

Zur Amplifikation der DNA-Fragmente wurden die PCR-Maschinen PTC-100™ Programmable Thermal Controller und PTC-200 verwendet und folgendes Programm durchgeführt (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	45 sec	20-30 x 
Primeranlagerung	X °C	1 min	
Primerverlängerung	72 °C	1 min/kb	
Primerverlängerung	72 °C	5 min	

Die Anlagerungstemperatur X ist für die jeweiligen Primer-Kombinationen spezifisch und ist Tabelle 2 zu entnehmen. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde der Reaktionsansatz in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (2.5.9).

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

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Kombination aus Reverser Transkription (siehe 2.5.6) und einer PCR (siehe 2.5.7). Sie dient zur Quantifizierung der Genexpression von spezifischen Genen. Bei der RT-PCR dient, anders als bei der gewöhnlichen PCR, mRNA als Ausgangsmaterial. Die RT-PCR wurde in zwei Schritte unterteilt:

Im ersten Schritt wurde die mRNA durch die reverse Transkription in cDNA umgewandelt (siehe 2.5.6). Im zweiten Schritt wurde eine PCR mit der im ersten Schritt erzeugten cDNA als Matrize durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde in einem 20 μl-Maßstab in silikonisierten 200 μl „PCR-Strips“-Reaktionsgefäßen mit den in Tabelle 5 aufgeführten Komponenten angesetzt.

2.5.9 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen und ihre Stranglänge zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft, dass DNA-Moleküle aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen Fragmente, beim Anlegen eines elektrischen Feldes durch die Gelmatrix zur positiven Anode wandern.

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches sich interkalierend in der doppelsträngigen DNA einlagert, bildet sich eine Fluoreszenz, die bei Anregung durch UV-Licht (Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar wird (Winnacker 1990).

In dieser Arbeit wurden aufgrund der Größe der gesuchten Fragmente 1-2%ige_(w/v) Gele verwendet. Dazu wurde die eingewogene Agarose mit 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 25 $\mu\text{l/l}$ Ethidiumbromid versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde anschließend in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Es wurde in dieser Arbeit für die Agarosegelelektrophorese das gesamte PCR-Amplifikat eingesetzt. Die mit 2 μl 10x Ladepuffer versetzten Proben wurden zusammen mit einem DNA-Größenmarker (1 Kb DNA *Ladder*, Fermentas) zur Einordnung der Größe der erhaltenen Fragmente auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mittels Geldokumentationssystem (Fa. Intas, Göttingen, D) fotografiert.

<u>50x TAE-Puffer:</u>	2	M	Tris/Essigsäure, pH 7,5
	1	M	NaAc
	50	mM	EDTA

<u>10x Ladepuffer:</u>	30	%(w/v)	Ficoll
	1	%(w/v)	Bromphenolblau
	0,1	%(w/v)	Xylemcyanol
	50	mM	EDTA

<u>Ethidiumbromid:</u>	0,5	%(w/v)	Ethidiumbromid in Methanol
------------------------	-----	--------	----------------------------

2.5.10 Elution von DNA aus Agarosegelen


Zur Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel nach erfolgter Elektrophorese wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte am Institut für Genetik (CCG) der Universität zu Köln, lediglich die Vorbereitung zur Sequenzierung wurde selbst durchgeführt. Die Sequenzierung wurde mittels der Kettenabbruchmethode basieren auf die Methoden nach Sanger und Coulson (1975) durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde das BigDye®-Terminator v. 3.1 Cycle-Sequencing-Kit (Fa. Applied Bioscience) verwendet. Für eine Standard-Reaktion wurden je nach Größe der aufgereinigten DNA 100 bis 200 ng Plasmid-DNA oder 25 bis 50 ng eines gereinigten PCR-Produktes sowie 0,25 µl 10 mmol/l Primer und 0,5 µl BigDye-Mix eingesetzt und zu einem Volumen von 10 µl mit H₂O aufgefüllt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: PCR-Sequenzierungsprogramm

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	96 °C	20 sec	1 x
	96 °C	10 sec	25 x 
	50 °C	5 sec	
Finalisierung	60 °C	4 min	1 x

Die elektrophoretische Auftrennung und Analyse erfolgte am Institut für Genetik der Universität zu Köln. Das Ergebnis wurde mit dem Programm Vector NTI 11 (Invitrogen) ausgewertet.

2.5.12 Restriktionsverdau von DNA und Plasmid-DNA

Die Überprüfung der DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide erfolgte durch einen Restriktionsverdau. Beim Restriktionsverdau werden Restriktionsendonukleasen aus Bakterien genutzt, um doppelsträngige DNA an spezifischen palindromischen Sequenzen zu schneiden. Die Enzyme wurden für die jeweiligen Reaktionen gemäß den Herstellerempfehlungen verwendet (MBI Fermentas oder Promega). Restriktionen wurden entweder für zwei Stunden oder für einen Großverdau über Nacht durchgeführt. Es wurden Enzymmengen zwischen einer Unit und 10 Units verwendet, wobei zu beachten ist, dass eine Unit Enzym in einer Stunde ca. 1 µg DNA verdaut. Die Inkubationstemperatur ergab sich aus dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms.

2.5.13 Herstellung eines *entry*-Vektors

Zur Herstellung eines *entry*-Vektors wurde zunächst das gewünschte DNA-Fragment aus bereits vorhandenen Originalvektoren mittels Restriktionsverdau (s. 2.5.12) herausgeschnitten. Anschließend wurde das Fragment mittels Elektrophorese isoliert und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt (s. 2.5.10). Gleichzeitig wurde der Vektor pENTR4 mit entsprechend homologen Enzymen verdaut und mittels Elektrophorese und Gel-Extraktion isoliert. Eine Behandlung des pENTR4 mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) (s. 2.5.14) wurde eingesetzt, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Bei der anschließenden Ligation (siehe 2.5.15) wurden die beiden Fragmente miteinander verknüpft. Die Selektion der gewünschten Vektor-Fragment-Kombination erfolgte mit Hilfe der Antibiotikaresistenzgene des Vektors und wurde anschließend nach der Plasmidisolation durch eine Sequenanalyse überprüft.

2.5.14 Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren

Zur Dephosphorylierung des offenen Vektors wurde SAP eingesetzt. Zu 8 µl DNA kamen 1 µl 10x SAP-Puffer sowie 1 µl SAP hinzu. Der Reaktionsansatz für die „*sticky end*“-DNA-Fragmente wurde 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP 15 min bei 65 °C deaktiviert.

2.5.15 Ligation

Bei der Ligation mittels T4-DNA-Ligase werden DNA-Fragmente mit endständiger 3`-OH-Gruppe, mit Fragmenten mit 5`-Phosphatgruppe miteinander verknüpft. Bei dieser ATP-verbrauchenden Reaktion können sowohl komplementäre (*sticky*) als auch glatte (*blunt*) Enden miteinander verbunden werden. Für die Reaktion wurden DNA-Fragment und Vektor je nach Größe im Verhältnis 3:1 oder 1:3 gemischt, wobei die kürzere DNA jeweils in der dreifachen molaren Menge verwendet wurde. Für eine 20 µl-Reaktion wurde dem Ligationsansatz 2 µl 10x Ligationspuffer sowie 1 bis 2 Units T4 DNA-Ligase (Promega) hinzugefügt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz direkt zur Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen (s. 2.4.4) genutzt.

2.6 Physiologische und biochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blättern und Kartoffelknollen

Zur Bestimmung der löslichen Zucker war folgender Messpuffer erforderlich:

<u>Messpuffer:</u>	110	mM	Hepes, pH 7,5
	22,2	mM	MgCl ₂
	4,4	mM	ATP
	1,8	mM	NAD ⁺
	0,2	Units	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Zur Bestimmung der löslichen Zucker in Blättern wurden 0,38 cm² große Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Von Kartoffelknollengewebe wurde etwa 100 mg Proben entnommen, dazu wurden mit dem Korkbohrer Proben ausgestanzt und in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Zur Extraktion der Zucker wurden die Proben mit 1 ml 80%igem Ethanol im Wasserbad eine Stunde lang bei 75 °C inkubiert. Die ethanolischen Extrakte wurden danach in einer Speed Vac (Eppendorf) bei Raumtemperatur eingetrocknet. Die kristallisierten Zucker wurden in 1 ml H₂O resuspendiert und für die Zuckermessung verwendet. 10 µl dieser Lösung wurden mit 190 µl Messpuffer versetzt und einem gekoppelten enzymatischen Test unterzogen (Bergmeyer 1970). Dabei wurden nacheinander folgende Enzyme mit einer Multistep-Pipette zugesetzt:

<u>1. Enzym</u>	7	Units	Hexokinase (Roche®)
<u>2. Enzym</u>	0,2	Units	Phosphoglukoisomerase (Roche®)
<u>3. Enzym</u>	120	Units	Invertase (Roche®)

In diesen enzymatischen Reaktionen wurden Glukose, Fruktose und Saccharose unter Bildung von NADH zu 6-Phosphoglukonolakton umgesetzt (s. Abbildung 8). Die Bildung von NADH ist dabei proportional zur Menge der oben genannten Zucker und konnte photometrisch bei 340 nm erfasst werden.

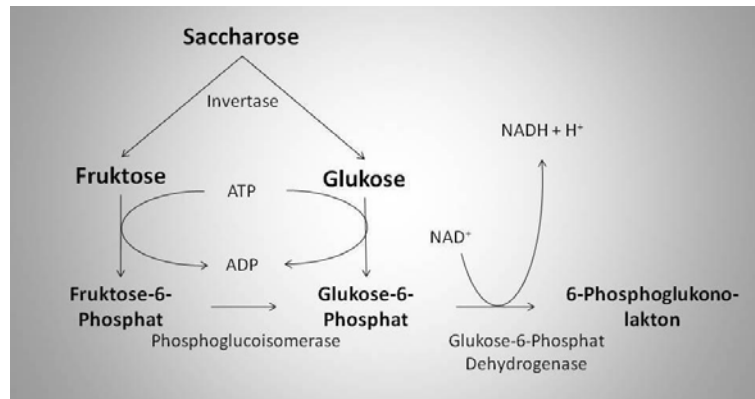


Abbildung 8: Schematische Darstellung der bei der Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose auftretenden Reaktionen.

ATP, Adenosintri-phosphat; ADP, Adenosindiphosphat; NAD⁺, Nicotinamidadenindinukleotid; NADH, Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)

Die eigentlichen Messungen wurden hauptsächlich in einem Multiplatten Photometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit einem jeweiligen Volumen von 200 µl pro Küvette durchgeführt.

Aus den einzelnen Extinktionsänderungen konnten die Konzentrationen der Zucker im Extrakt berechnet werden:

$$c = \frac{\Delta E * A_{Küvette}}{\varepsilon * V_{Küvette}} * F$$

c= Konzentration
 ΔE = Absolute Extinktionsänderung
 $A_{Küvette}$ = Fläche der Kavität
 ε = Extinktionskoeffizient NADH bei $\lambda = 340$ nm
 $V_{Küvette}$ = Eingesetztes Probenvolumen für die Messung
 F= Verdünnungsfaktor

2.6.2 Bestimmung des Stärkegehalts in Blättern und Knollen

Die unter 2.6.1 bereits in Ethanol gekochten Blattscheiben/Knollenproben wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl 0,2 M KOH (bei Knollen 1000 µl) und zwei bis drei Glaskugeln ($\varnothing = 1,5$ mm) versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend durch schütteln homogenisiert. Nach einer zusätzlichen Inkubation von einer Stunde ebenfalls bei 95 °C wurde der pH-Wert mit 1 M Essigsäure auf 5,5-6 eingestellt, 8 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 nach

Bergmeyer (1970) im gekoppelten enzymatischen Test durch Zugabe von Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erfasst werden konnte (s. 2.6.1).

2.6.3 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Rübenpfahlwurzelgeweben

Bisher wurden zur Bestimmung löslicher Zucker in z.B. Kartoffelknollen etwa 0,5 cm² große Proben entnommen und in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert (siehe 2.6.1). Jedoch führt das Anschneiden der Zuckerrübe zur direkten Invertase-Aktivierung, was zu einem drastischen Saccharose-Verlust rund um die Schnittstelle führt. Dies führt zur Verfälschung der Zuckerwerte. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Rüben in 5 Probenstellen unterteilt, diese wiederum sofort über flüssigem Stickstoff mit einer Gemüseraspel kleingeraspelt. Die weiteren Schritte wurden mit dem gefrorenen Rübenmaterial durchgeführt, denn nur eine kontinuierlich niedrige Temperatur kann garantieren, dass Saccharose-abbauende Enzyme nicht aktiv sind. Das Frischgewicht der Rübenraspelp Proben wurde vor der weiteren Aufarbeitung bestimmt. Im Anschluss wurden die Proben im Lyophilisator für ca. 8 Stunden gefriergetrocknet. Nach der Gefrierdrying wurden die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Extraktion der Zucker wurden die Proben 2-mal mit 1 ml 80% Ethanol im Wasserbad eine Stunde lang bei 75 °C inkubiert. Die ethanolischen Extrakte wurden danach in einer Speed Vac (Eppendorf) bei Raumtemperatur eingetrocknet. Die kristallisierten Zucker wurden in 1 ml H₂O resuspendiert und für die Zuckermessung verwendet (s. 2.6.1).

2.6.4 Bestimmung der Assimilationsrate mittels Infrarotgasanalyse (IRGA)

Mit der Infrarotgasanalyse (IRGA) kann der Gasaustausch an intakten Pflanzen gemessen werden (Woolf 1969). Darunter versteht man die Aufnahme von CO₂ im Licht, die Abgabe von O₂ im Rahmen der Atmung sowie die Freisetzung von Wasserdampf bei der Transpiration. Man verwendet dafür offene Gasanalysensysteme, bei denen die Messung differentiell im Durchflußverfahren erfolgt. Dabei wird ein Gasstrom mit definierter Fließgeschwindigkeit zu einem Teil in eine Infrarotmesszelle geleitet, in der die CO₂- und Wasserdampfkonzentration ermittelt wird (Referenzgas), 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 Wasserdampfkonzentrationen 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:

$$E = \frac{u * (w_o - w_e)}{(1 - w_o)}$$

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:

$$u = \frac{(p * f)}{(R * T * LA)}$$

In dieser Gleichung bezeichnet p den Luftdruck, f die Flussrate, R die universelle Gaskonstante, T die absolute Temperatur und LA die Blattfläche. Die Assimilationsrate (A) beträgt:

$$A = u(ce - co) * \frac{(1 - w_e)}{(1 - w_o)}$$

ce und co bezeichnen die CO₂-Konzentrationen des Referenz- bzw. Analysegas.

2.6.5 Proteinbestimmung von Kartoffelblättern

Zur Quantifizierung von Proteinen in Kartoffelblättern wurde die Bradford-Methode verwendet (Bradford 1976). Diese Methode basiert auf eine Farbreaktion des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brillant Blau G250, welcher in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Proteinseitenketten Komplexe bildet. Im kationischen Zustand absorbiert es Licht maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm und im anionischen bei $\lambda = 590$ nm. Durch eine photometrische Messung bei $\lambda = 590$ nm und mit Hilfe einer Eichreihe kann dann die Proteinmenge quantifiziert werden.

Nach 10-minütiger Inkubation der Proteinextrakte mit Rotiquant im Dunkeln wurde die Absorption der Proben bei $\lambda = 450$ nm und $\lambda = 590$ nm in einem Photometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe, D) bestimmt. Der Quotient (Q) diente als Maß für die Proteinkonzentration und wurde mit Hilfe der Eichgeraden berechnet:

$$Q = \frac{A(450)}{A(590)}$$

2.6.6 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Blättern

Die Bestimmung der Chlorophyllgehalte erfolgte photometrisch (Graan *et al.*, 1984). Hierzu wurde der ethanolische Extrakt, der aus den Blattproben in 2.6.1 gewonnen wurde, verwendet. Zur Bestimmung der löslichen Zucker in Blättern wurden 0,38 cm² große Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Extraktion der Zucker wurden die Proben mit 1 ml Ethanol (80%) im Wasserbad eine Stunde bei 75 °C inkubiert. 10 µl dieses Extraktes wurde zur photometrischen Bestimmung der Chlorophyllgehalte verwendet.

Die Proben wurden 1:20 verdünnt und die Chlorophyllgehalte wurden im Multiplattenphotometer (Fa. Tekan) bei den Wellenlängen $\lambda = 649$ nm und $\lambda = 665$ nm bestimmt. Mit folgender Formel wurden die jeweiligen Mengen an Chlorophyll a und b berechnet:

$$c = \frac{\Delta E * A_{Küvette}}{\varepsilon * V_{Küvette}} * F$$

c=	Konzentration [mg/ml]
ΔE =	Absolute Extinktionsänderung
$A_{Küvette}$ =	Fläche der Kavität
ε =	Extinktionskoeffizient Chlorophyll a bei $\lambda = 665$ nm/b bei $\lambda = 649$ nm
$V_{Küvette}$ =	Eingesetztes Probenvolumen für die Messung
F=	Verdünnungsfaktor

2.6.7 Histochemische GUS-Färbung von Kartoffelblättern

<u>GUS-Färbelösung:</u>	0,1	M	NaPO ₄
	10	mM	EDTA
	0,5	mM	K-Ferrocyanid
	0,5	mM	K-Ferricyanid
	0,1	%(v/v)	Triton X-100
	1	mM	X-Gluc

Die histochemische GUS-Färbung ist eine einfache optische Methode zur Überprüfung der β -Glucuronidase Aktivität und wird beispielsweise zur Analyse von Promotoraktivitäten eingesetzt. Das Enzym β -Glucuronidase kann X-Gluc hydrolysieren, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Zur Analyse der Promotoraktivität wurde jeweils ein Blatt bzw. ein Teil des Blattes mit GUS-Färbelösung bedeckt und für 20 min vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des Unterdrucks durch die Vakuumfiltration konnte das Substrat X-Gluc in die Zellen gelangen und durch das Enzym β -Glucuronidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt werden. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen. Um die Farbüberlagerung des Chlorophylls zu verhindern, wurden die Proben mit 70% Ethanol bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die vom

Chlorophyll befreiten Blätter in H₂O aufgenommen. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Blätter fotografiert.

2.6.8 Bestimmung der GUS-Aktivität in Kartoffelblättern

<u>Extraktionspuffer:</u>	50 mM	NaPhosphat-Puffer, pH 7,0
	10 mM	EDTA
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	0,1 %(v/v)	Triton X-100
	0,4 %(v/V)	Sacrosyl

<u>MUG-Lösung (1mM):</u>	1 mM	MUG
	50 mM	NaPhosphat-Puffer, pH 7,0
	1 mM	EDTA
	0,1 %(v/V)	Triton X-100

Zur Quantifizierung der β-Glucuronidase Aktivität wurden etwa 100 mg Gewebe (5 Blattscheiben; d= 0,4 cm) mit 500 µl GUS-Extraktionspuffer homogenisiert. Hierzu wurden Glaskugeln und ein mit Stickstoff vorgekühlter Tissuelyser (Fa. Retsch) verwendet. Durch Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Proteingehalt des Überstands wurde nach Bradford (s. 2.6.5) bestimmt. Für die Fluoreszenzmessung wurden 25 µl des Überstands mit 200 µl MUG-Lösung gemischt. Die Fluoreszenzen wurden im Multiplattenphotometer (Fa. Tecan) bei einer Anregung von 365 nm und Emission von 455 nm Wellenlänge für 30 Minuten aufgenommen. Zusätzlich wurden die Fluoreszenzen einer Eichreihe mit Methylumbelliferon (MU) aufgenommen. Die Steigung der Regressionsgerade für die MU-Messwerte gegen die Zeit ergab die Aktivität der β-Glucuronidase in pmol MU/h. Diese wurde zur eingesetzten Gesamtproteinmenge ins Verhältnis gesetzt, wodurch die relative Aktivität mit der Einheit pmol MU/(h*mg lösliches Gesamtprotein) errechnet werden konnte. Alle Aktivitäten wurden durch mindestens zwei unabhängige Messungen bestimmt.

2.6.9 Bestimmung des Fv/Fm-Verhältnisses

Die Chlorophyllfluoreszenz beruht auf der Fluoreszenz des Photosystems II (PSII) (Krause *et al.*, 1991) und kann Auskunft über die Intaktheit des Photosystems, sowie einer Vielzahl anderer photosynthetischer Prozesse geben. Vor Beginn der Messungen wurden zur Bestimmung von F0 und Fm einzelne Blätter 10 min dunkeladaptiert. Zur Messung des Verhältnisses von Fv zu Fm wurde die Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie genutzt (PAM; ImagingPAM/PAM2100, Walz, Effeltrich). Um die Grundfluoreszenz zu ermitteln, wurde ein schwaches gepulstes Messlicht verwendet. Es regt die Grundfluoreszenz (F0) der Lichtsammelkomplexe an. Bei Gabe eines sättigenden Lichtblitzes wurde die variable Fluoreszenz (Fv), die vom PSII-Reaktionszentrum ausgeht, messbar. Diese erreicht im dunkeladaptierten Zustand einen Maximalwert (Fm). Mit Hilfe eines Lichtgesättigungspuls (4000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 800 ms) wurde die variable Fluoreszenz (Fm') ermittelt. Anhand dieser absoluten Werte wurden die maximale Quanteneffizienz von PSII (Genty *et al.*, 1990) berechnet:

$$\left(\frac{Fv}{Fm}\right) = \left(\frac{Fm - F0}{Fm}\right)$$

2.6.10 Färbung von Zuckerrübenvakuolen mittels Acridin-Orange und Neutralrot

Acridin-Orange ist ein basischer, fluoreszierender Farbstoff. Er reichert sich in sauren Kompartimenten wie etwa Vakuolen, Lysosomen oder Autophagosomen an und ändert mit fallendem pH (und zunehmender Protonierung) seine Farbe von gelb über orange zu rot.

Der basische Farbstoff Acridin-Orange ist in unprotonierter Form membranpermeabel. Das heißt, dass es zunächst aufgrund des Konzentrationsgefälles zum Ausgleich von Acridin-Orange-Molekülen zwischen Vakuoleninnen- und außenraum kommt.

Dabei zeigt Acridin-Orange bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 400 nm eine orange/grüne Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm.

2.6.11 Färbung von Lignin in Pfahlwurzelgewebe

Für die histochemische Färbung von Lignin im Pfahlwurzelgewebe von Zuckerrübenpflanzen wurde der Wiesner-Test benutzt, der eine Rotfärbung ligninhaltiger Strukturen in salzsaurer Phloroglucinlösung bewirkt (Wiesner, 1928; Sherwood & Vance, 1976). Pfahlwurzelstücke/Scheiben wurden für etwa 30 min in einer 3%igen Lösung von Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol) in Ethanol inkubiert und anschließend in 25% HCl überführt. Die Reaktion konnte an Hand der fortschreitenden Rotfärbung verfolgt werden.

2.6.12 Bestimmung des Anteils unlöslicher Stoffe im Pfahlwurzelgewebe

Das Rübenmaterial (ca. 200 mg) wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Das Frischgewicht des Pulvers wurde bestimmt und für 24 h gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt und daraus der Wassergehalt errechnet. Nach der Trocknung wurde das Pulver zur Zuckerextraktion mit 1,5 ml 80% Ethanol versetzt und für 1 h bei 75 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach 5-minütiger Zentrifugation (14.000 rpm) entfernt und das feuchte Pulver noch mal mit 80% Ethanol extrahiert und eine weitere Stunde bei 75 °C inkubiert. Dieser Prozess wurde noch einmal wiederholt, um sicher zu gehen, dass keine Zucker mehr in den Proben vorhanden waren. Das zuckerfreie Pellet wurde für 8 h bei 60 °C in einer Speed Vac getrocknet. Zum Schluss wurde das absolute Trockengewicht bestimmt, und somit konnte der prozentuale Anteil unlöslicher Stoffe des Pfahlwurzelgewebes errechnet werden.

2.6.13 Bestimmung von Lignin im Pfahlwurzelgewebe

Um ein standardisierbares, möglichst feines Homogenat zu erhalten, wurde das aus der Bestimmung des unlöslichen Anteils (s. 2.6.12) übriggebliebene Rübenmaterial in Stickstoff eingefroren und mit Hilfe des Tissuelysizer noch mal pulverisiert. Anschließend wurde das gewogene Pulver der Thioglycolsäurederivatisierung unterzogen, um Lignin bzw. ligninähnliche Phenylpropane zu extrahieren und nachzuweisen.

Hierzu wurden die Proben zunächst mit 1 ml 2 M HCl angesäuert. Nach Durchmischen wurden 0,2 ml Thioglycolsäure zugegeben und erneut gemischt. Die Eppis wurden gut verschlossen 4 h bei 95 °C im Thermomixer geschüttelt, sodass es zu einer vollständigen Säurehydrolyse und Derivatisierung des Lignins kommen konnte. Anschließend wurden die Proben abgekühlt und 15 min zentrifugiert (4 °C, 14.000 rpm). Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Pellet 3x mit Wasser gewaschen (5 min, 14.000 rpm, 4 °C). Um das Lignin-Thioglycolsäurederivat (LTGA)

anschließend in Lösung zu bringen, wurde das Pellet in 1 ml 0,5 M NaOH suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gehalten. Daraufhin wurde erneut zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein 2 ml Eppi überführt. Das Pellet wurde mit 0,4 ml 0,5 M NaOH nachgewaschen (10 min, 14.000 rpm, 4 °C), dieser Überstand abgenommen und dem vorher gewonnenen Überstand hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend mit 0,3 ml konz. HCl angesäuert, was zur Fällung des LTGA führte (4 °C, 4 h). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (20 min, 14.000 rpm, 4 °C), der Überstand abdekantiert und verworfen. Das deutlich sichtbare braune Pellet wurde in 1 ml 0,5 M NaOH suspendiert, die Lösung gut durchmischt und die Extinktion bei 280 nm im Photometer gemessen.

Zur Quantifizierung des Lignins wurde ein spezifischer Absorptionskoeffizient von $6,0 \text{ lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ benutzt, der aus einer Eichgeraden mit kommerziellem Alkalilignin ermittelt wurde (Müse *et al.*, 1997).

2.6.14 Präparation von Zuckerrübenvakuolen aus Pfahlwurzelgewebe

Collection Medium:

1	M	Sorbitol
5	mM	EDTA
1	mM	DTT
50	mM	Tris
	pH	7,6 (HCL)

Nycodenz-Lösung:

		Collection Medium
30	%	Nycodenz

Zur Isolierung von Zuckerrübenvakuolen aus Pfahlwurzelgewebe wurden zwei bis fünf Monate alte Pflanzen verwendet. Zunächst wurden die Pfahlwurzeln vom Blattmaterial getrennt, gewaschen und geschält. Anschließend wurde die Wurzel mit einem Gemüsehobel in 1 mm dünne Scheiben geschnitten und im Collection Medium aufgefangen. Die so entstandenen Scheiben wurden im Collection Medium mit einer Rasierklinge erst in 1 mm dünne Streifen geschnitten, welche dann zu kleinen Würfeln weiterverarbeitet wurden. Um die im Collection Medium enthaltenen Vakuolen von den Pfahlwurzelwürfeln zu trennen, wurden das Gemisch durch ein 200 µm Nylon-Netz filtriert. Um weitere Zelltrümmer abzutrennen wurde das Filtrat nochmals durch ein 63 µm Stahlnetz (Fa. Retsch) filtriert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Pellet in 3 ml Nycodenz-Lösung aufgenommen. Die Nycodenz-Vakuolen-Lösung wurde zusätzlich durch das 63 µm Stahlnetz filtriert. Anschließend wurde das Filtrat für zehn Minuten bei 1500 g und 4 °C im Swingrotor zentrifugiert. Aufgrund des Dichtegradientens der Nycodenz-Lösung flotieren die Vakuolen nach oben und befinden sich in der oberen Schicht und können mit einer einfachen Einwegpipette vorsichtig abgenommen werden.

2.7 Statistische Methoden und Berechnungen

2.7.1 Standardabweichung

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$STAB = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Dabei entspricht x_i den Einzelwerten, den \bar{x} Mittelwerten und n der Anzahl der Einzelwerte.

2.7.2 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.

$$STAF = \frac{STAB}{\sqrt{n}}$$

2.7.3 Signifikanztest

Mit dem Signifikanztest (t-Test) wird überprüft, ob sich zwei Gruppen von Messwerten signifikant voneinander unterscheiden. So 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

3.1 Entwicklungsabhängige Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus und biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanzen *Beta vulgaris* (Zuckerrübe)

3.1.1 Zeitabhängige Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingungen

Es sollten Zuckerrübenpflanzen über ihre gesamte Entwicklung auf verschiedene Parameter, wie z.B. ihre Stärke- und Zuckermengen, hin untersucht werden. Hierzu wurden die Zuckerrüben in einem 14-tägigen Rhythmus im Gewächshaus ausgesät und nach zwei Wochen in Töpfe mit sieben Liter Volumen (Oberradius= 11 cm, Unterradius= 8 cm und Höhe= 26 cm) pikiert. Die Ernte für entwicklungsabhängige Analysen wurde nach 22-wöchiger Anzucht der ältesten Rüben durchgeführt, wobei die Blattproben für die Stärke- und Zuckeranalysen jeweils einen Tag vorher genommen wurden. Um Aufschluss über den Entwicklungsstand der Rüben zu erhalten, wurde dieser morphologisch erfasst. Um den jahreszeitlichen Einfluss der Aussaat im Gewächshaus zu erfassen, wurden vier verschiedene Zeitreihen zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt. Dazu wurden die Zuckerrübenpflanzen für das erste Zeitreihenexperiment vom 31.01.2011-23.05.2011 ausgesät, für die zweite Zeitreihe vom 23.05.2011-12.09.2011, Zeitreihe Nr. 3 vom 12.09.2011-02.01.2012, und Zeitreihe Nr. 4 wurde vom 16.01.2012-07.05.2012 ausgesät (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Zuckerrübenaussaaten für die verschiedenen Zeitreihen.

	Pflanzenalter	Zeitreihe Nr. 1	Zeitreihe Nr. 2	Zeitreihe Nr. 3	Zeitreihe Nr. 4
Aussaat 1	22 Wochen	31.01.2011	23.05.2011	12.09.2011	16.01.2012
Aussaat 2	20 Wochen	14.02.2011	06.06.2011	26.09.2011	30.01.2012
Aussaat 3	18 Wochen	28.02.2011	20.06.2011	10.10.2011	13.02.2012
Aussaat 4	16 Wochen	14.03.2011	04.07.2011	24.10.2011	27.02.2012
Aussaat 5	14 Wochen	28.03.2011	18.07.2011	07.11.2011	12.03.2012
Aussaat 6	12 Wochen	11.04.2011	01.08.2011	21.11.2011	26.03.2012
Aussaat 7	10 Wochen	25.04.2011	15.08.2011	05.12.2011	09.04.2012
Aussaat 8	8 Wochen	09.05.2011	29.08.2011	19.12.2011	23.04.2012
Aussaat 9	6 Wochen	23.05.2011	12.09.2011	02.01.2012	07.05.2012

Die verschiedenen Zeitreihen zeigten ähnliche Wachstumscharakteristika, daher wurden die Ergebnisse der einzelnen Zeitreihen im Folgenden zusammenfasst. Die einzelnen Daten der verschiedenen Zeitreihen sind dem Anhang zu entnehmen.

3.1.1.1 Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile

Die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewicht) wurden in den entwicklungsabhängigen Anzuchten analysiert. In Abbildung 9 ist die Ontogenese der Grüngewichte von Zuckerrübenpflanzen über einen Zeitraum von 22 Wochen dargestellt. Nach acht Wochen Anzucht lag das Grüngewicht bei etwa 60 g/Pflanze. Von der achten bis zur zehnten Woche war eine deutliche Gewichtszunahme um 100% zu erkennen. Nach dieser Gewichtszunahme blieb das Gewicht bis zur 14. Woche bei 120 g/Pflanze konstant. Von der 14. bis zur 18. Woche stieg dann das Gewicht noch einmal um 50% auf etwa 160 g/Pflanze an und blieb dann bis zum Ende konstant.

Die Zunahme des Grüngewichts kann von verschiedenen Faktoren abhängen, z.B. von der Grünfläche, daher war es naheliegend, nicht nur das Grüngewicht der Zuckerrübenpflanzen zu bestimmen, sondern auch die Grünflächen in Abhängigkeit der verschiedenen Entwicklungsstadien zu analysieren (s. Abbildung 9). Hierzu wurde die gesamte Blattfläche (Grünfläche) der einzelnen Zuckerrübenpflanzen vermessen. Das Grüngewicht und die Grünfläche korrelierten positiv, das heißt, die Grünfläche zeigte ähnliche Wachstumscharakteristika wie das Grüngewicht. Nach achtwöchiger Anzucht lag die Grünfläche bei 700 cm²/Pflanze. Von der achten bis zur zehnten Woche war auch hier eine deutliche Zunahme der Grünfläche auf rund 1800 cm²/Pflanze zu beobachten. Die Gesamtgrünfläche veränderte sich dann bis zur 14. Woche nicht. Von diesem Zeitpunkt bis zur 20. Woche an war wieder eine Zunahme auf etwa 2500 cm²/Pflanze erkennbar, welche anschließend konstant blieb.

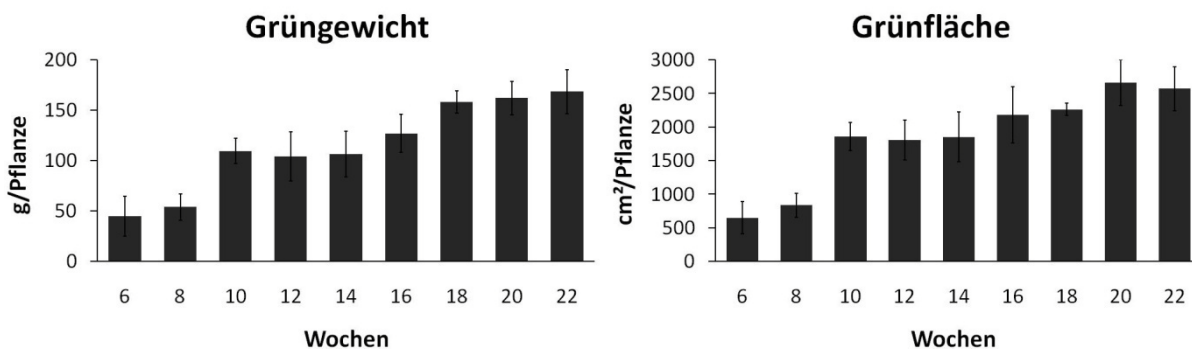


Abbildung 9: Zeitabhängige Entwicklung des Grüngewichts und der Grünfläche von *Beta vulgaris* (Zuckerrübe).

Das Grüngewicht und die Grünfläche wurden von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Grüngewicht (g/Pflanze) und Grünfläche (cm²/Pflanze) wurden für die einzelnen Zeitreihen je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Zeitreihen ± Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Die Zunahme der Grüngewichte und der Gesamtgrünfläche kann von der Blattanzahl bzw. der Fläche der einzelnen Blättern abhängen, daher war es naheliegend, die Blattanzahl und die durchschnittliche Fläche pro Blatt der einzelnen Pflanzen in Abhängigkeit der verschiedenen Zeitpunkte zu verifizieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Anzahl der Blätter nahm über den gesamten analysierten Zeitraum von 22 Wochen stetig zu. Eine sechs Wochen alte Zuckerrübenpflanze hatte im Durchschnitt sieben Blätter, wobei eine 22 Wochen alte Pflanze etwa 35 Blätter hatte. Setzt man die Gesamtgrünfläche mit der Blattanzahl in Bezug (Abbildung 10), so zeigt sich deutlich, dass nach zehn Wochen die durchschnittliche Fläche mit etwa 140 cm² pro Blatt am größten war. Mit zunehmendem Alter war die Fläche der nachwachsenden Blätter mit etwa 100 cm² nicht mehr so groß wie nach zehn Wochen, was auch optisch zu erkennen war. Aus der Abbildung 10 geht deutlich hervor, dass mit zunehmendem Alter die Fläche der nachwachsenden Blätter kleiner war als zu Beginn der Anzucht.

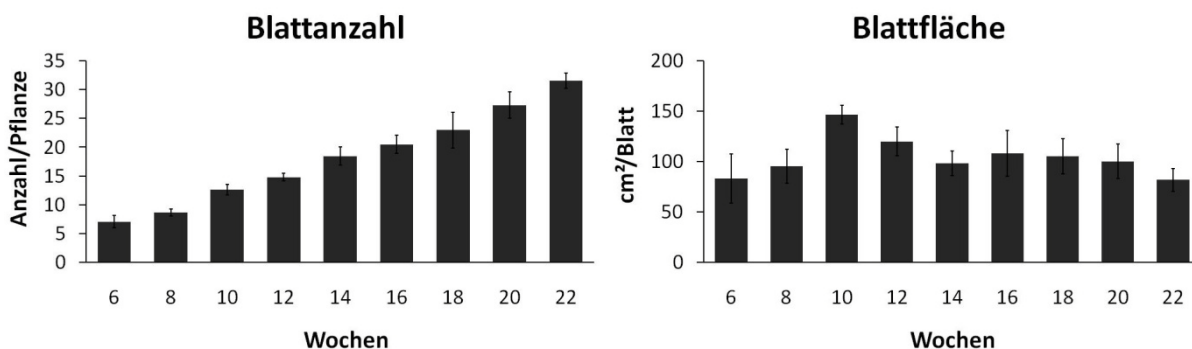


Abbildung 10: Zeitabhängige Entwicklung der Blattanzahl und der Blattfläche von *Beta vulgaris* (Zuckerrübe).

Die Blattanzahl und die Blattfläche wurden von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Blattanzahl (Anzahl/Pflanze) und Blattfläche (cm²/Blatt) wurden für die einzelnen Zeitreihen je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Zeitreihen ± Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

3.1.1.2 Entwicklungsabhängige Analyse der Kohlenhydratgehalte in Zuckerrübenblättern

Neben der Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile war der Gehalt an Stärke in den Blättern der verschiedenen Zeitpunkte von Bedeutung. Die Blätter wurden hierzu in drei Kategorien eingeteilt. Die Blattklassifizierung wurde aufgrund der verschiedenen Wachstumsstadien der Blätter erstellt. Zu diesem Zweck wurden die Blätter ihrer Größe nach in drei Klassen unterteilt. In Abbildung 11 ist ein Beispiel der Klassifizierung anhand einer neun Wochen alten Rübe dargestellt. Die jüngsten und somit kleinsten Blätter sind in Blattstufe 1 zusammengefasst. Die mittelgroßen Blätter werden in Blattstufe 2 und die größten bzw. ältesten Blätter werden in Blattstufe 3 eingeteilt. Diese Klassifizierung wurde für alle weiteren Blattanalysen angewendet.

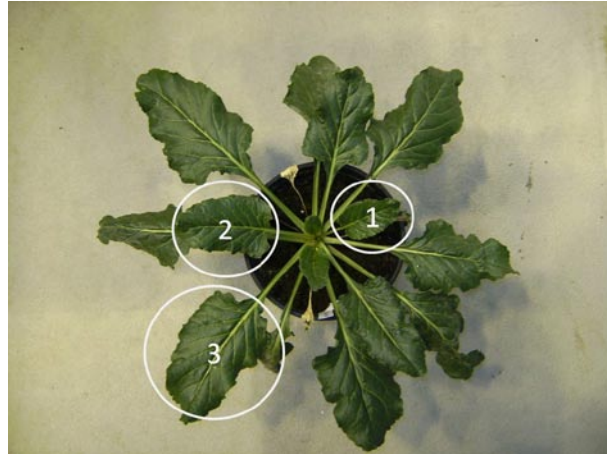


Abbildung 11: Einteilung der Blattstufen nach Blattgrößen (neun Wochen alte Zuckerrübe).

1: Blattstufe 1; jüngere Blätter (kleinste Blätter)

2: Blattstufe 2; mittlere Blätter (mittlere Blätter)

3: Blattstufe 3; ältere Blätter (größte Blätter)

Die Blattproben der vier verschiedenen Zeitreihen (s. Tabelle 8) wurden am Nachmittag (15:00 Uhr) von allen drei Blattgrößen genommen. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Stärkemessungen in Blättern der unterschiedlichen Entwicklungsstadien zusammengefasst.

Die sechs Wochen alten Pflanzen wiesen mit 11 bis 14 mmol/m² den höchsten Blattstärkegehalt auf. Von der sechsten bis zur 12. Woche war eine kontinuierliche Abnahme der Stärkegehalte in den Blättern zu beobachten. Ab der 12. Woche blieb der Stärkegehalt konstant. Die jungen Blätter (Blattstufe 1) hatten einen durchschnittlichen Stärkegehalt von 6 mmol/m², die mittelalten Blätter (Blattstufe 2) 5 mmol/m² und die alten Blätter (Blattstufe 3 mit 3 mmol/m²) den geringsten Stärkegehalt. Mit zunehmendem Blattalter nahm auch der Blattstärkegehalt ab.

Neben dem Stärkegehalt der Zuckerrübenblätter wurden zusätzlich die Gehalte an löslichen Zuckern zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Auch hier wurden die Blattproben am Nachmittag genommen. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Zuckermessungen der Blattstufe 2 von den unterschiedlichen Entwicklungsstadien stellvertretend für die anderen beiden Blattstufen dargestellt. In den Blattstufen 1 und 3 waren ähnliche Tendenzen zu beobachten (siehe Anhang). In den ersten sechs Wochen war der Blattzuckergehalt mit etwa 1 mmol/m² sehr gering, wobei sich Glukose, Fruktose und Saccharose in ihrem Gehalt nicht voneinander unterschieden. Ab der zehnten Woche nahm der Saccharosegehalt in Blättern stetig zu. Die Gehalte an Glukose und Fruktose stiegen über den analysierten Zeitraum leicht an.

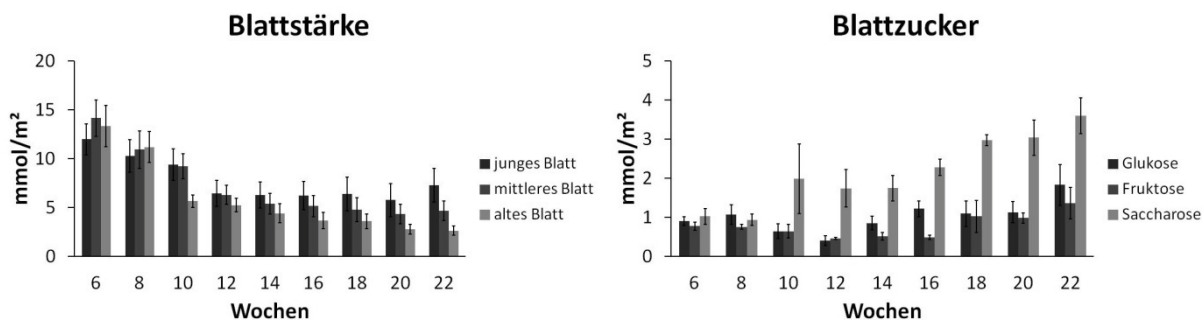


Abbildung 12: Entwicklungsabhängige Stärke- (alle drei Blattstufen) und Zuckergehalte (mittleres Blatt) in Rübenblättern.

Die Blattstärke und die Blattzucker wurden von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Blattstärke (mmol/m^2) und Blattzucker (mmol/m^2) wurden für die einzelnen Zeitreihen je $n = 5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Zeitreihen \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Probennahme: 15:00 Uhr.

Vergleicht man den Stärkegehalt mit dem Saccharosegehalt in Blättern, so fällt auf, dass der Stärkegehalt und der Saccharosegehalt miteinander negativ korrelierten. Während der Blattstärkegehalt mit zunehmendem Pflanzenalter abnahm, nahm der Saccharosegehalt stetig zu. In den 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen war der Saccharosegehalt in den Blättern mit $3,5 \text{ mmol/m}^2$ am höchsten. Dies wird auch durch das Verhältnis deutlich (Abbildung 13). Setzt man beides ins Verhältnis, so fällt auf, dass in den sechs Wochen alten Blätter fast 4-mal so viel Stärke wie Blattzucker vorhanden war. Danach war eine kontinuierliche Abnahme des Stärke/Zucker Verhältnis in den Blättern zu beobachten.

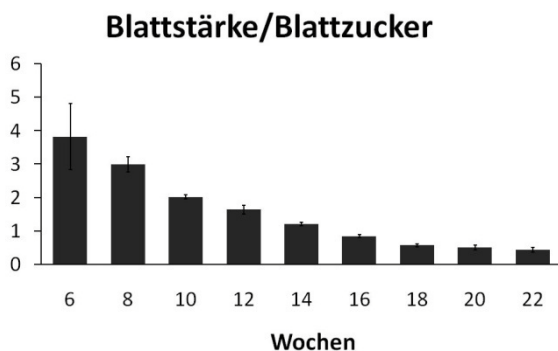


Abbildung 13: Entwicklungsabhängiges Blattstärke/Blattzucker Verhältnis (mittleres Blatt) in Rübenblättern.

Das Blattstärke/Blattzucker Verhältnis wurde von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen berechnet. Zur Berechnung wurden die Parameter Blattstärke (mmol Hexose/m^2) und Blattzucker (mmol Hexose/m^2) für die einzelnen Zeitreihen je $n = 5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Zeitreihen \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Probennahme: 15:00 Uhr.

3.1.1.3 Entwicklung der unterirdischen Pflanzenteile

Die Gewichte der unterirdischen Pflanzenteile (Rübenpfehlwurzel) wurden ebenfalls in den entwicklungsabhängigen Anzuchten analysiert. In Abbildung 14 ist die Ontogenese der Rübenpfehlwurzel dargestellt. Nach sechswöchiger Anzucht lag das Rübenpfehlwurzelgewicht bei rund 12 g/Pflanze und nahm mit zunehmendem Rübenalter stetig zu. Zwölf Wochen alte Pflanzen wiesen ein durchschnittliches Pfehlwurzelgewicht von 56 g/Pflanze auf. In den ersten zwölf Wochen war die Gewichtszunahme nicht so groß wie in den darauffolgenden Wochen. Ab der 14. Woche bis zur 22. Woche nahm das Rübenpfehlwurzelgewicht um etwa 45 g/Pflanze pro Woche zu und erreichte nach 22-wöchiger Anzucht ein Rübenpfehlwurzelgewicht von rund 500 g/Pflanze. Zusätzlich wurde der Ernteindex berechnet. Der Ernteindex ist der Anteil des Ernteprodukts am Gesamtgewicht der Pflanze. Je näher dieser Wert an 1 liegt, desto größer ist der prozentuale Anteil des Ernteprodukts.

In den ersten acht Wochen lag der Ernteindex bei etwa 0,2, das heißt, dass die Rübenpfehlwurzel 20% der Gesamtpflanze ausmachte. Von der achten zur zehnten Woche verdoppelte sich der Ernteindex und blieb bis zur 12. Woche konstant. Von der 12. Woche an stieg der Ernteindex kontinuierlich. Die 22 Wochen alten Pflanzen hatten letztendlich einen Ernteindex von 0,74.

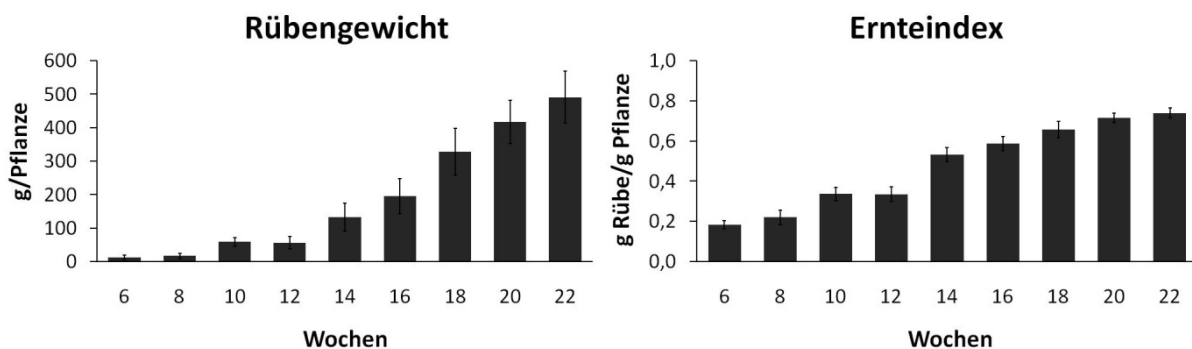


Abbildung 14: Zeitabhängige Entwicklung des Rübenpfehlwurzelgewichts und des Ernteindex.

Das Rübenpfehlwurzelgewicht und der Ernteindex wurden von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Rübenpfehlwurzel (g/Pflanze) und Ernteindex (g Rübe/g Pflanze) wurden für die einzelnen Zeitreihen je $n = 5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Zeitreihen \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Um eine mögliche Beziehung zwischen Pfehlwurzellänge und Rübenumfang zu untersuchen, wurden die Pfehlwurzellänge und der Rübenumfang (Abbildung 15) zusätzlich erfasst. Nach sechswöchiger Anzucht erreichte die Rübenpfehlwurzel eine Länge von bis zu 8 cm. Wie bei den anderen untersuchten morphologischen Charakteristika war auch hier ein deutlicher Trend im Wachstum zu beobachten. Von der achten bis zur zwölften Woche war keine deutliche Längenzunahme zu erkennen. Von der zwölften bis zur 20. Woche war ein Längenwachstum um insgesamt 12 cm erkennbar. In den ersten sechs Wochen erreicht der Pfehlwurzelumfang rund 5 cm. Nach

achtwöchiger Anzucht betrug der Umfang etwa 6 cm. Von der zehnten bis zur zwölften Woche blieb der Umfang nahezu konstant. Ab der zwölften Woche nahm der Umfang deutlich und kontinuierlich mit 1,4 cm pro Woche zu. Dies zeigte sich auch im Verhältnis von Rübenlänge/Rübenbreite. Nach achtwöchiger Anzucht lag das Verhältnis von Länge zu Breite bei 3. Dies bedeutet, dass die Rübe dreimal so lang wie der Umfang war. Bis zur zwölften Woche nahm das Verhältnis mit zunehmendem Alter ab und blieb dann konstant. Das bedeutet, dass das Längenwachstum und die Zunahme des Umfangs gleich waren.

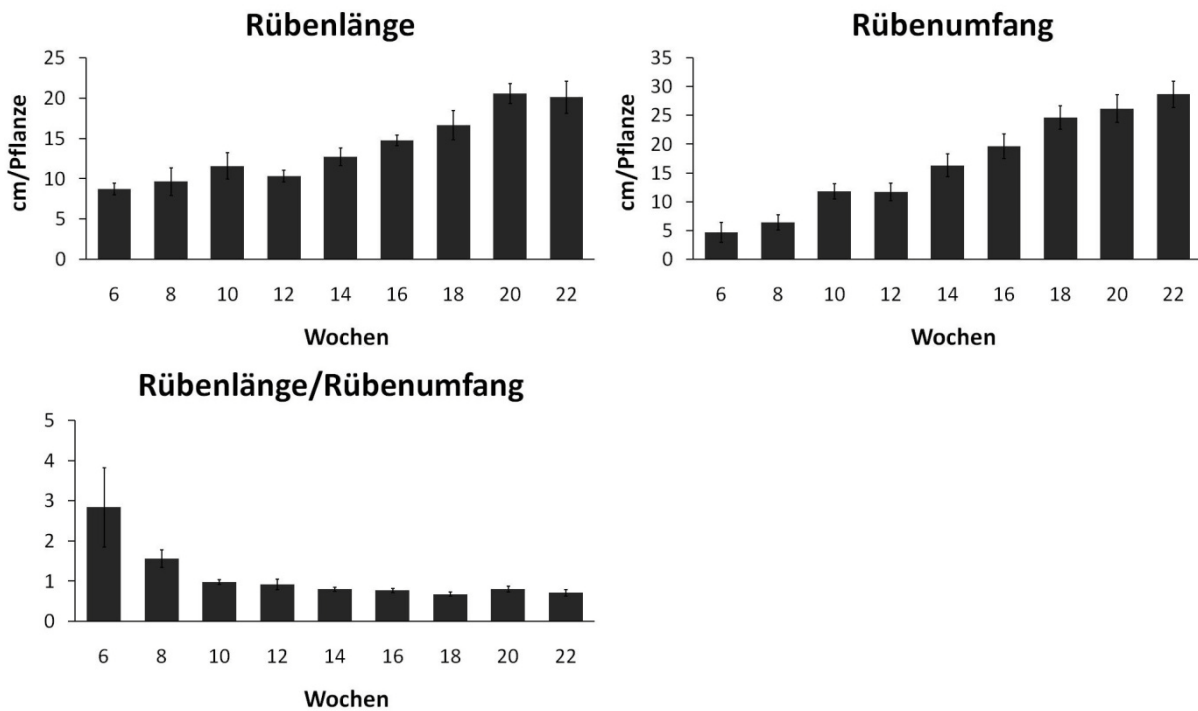


Abbildung 15: Zeitabhängige Entwicklung der Rübenlänge und des Rübenumfangs pro Rübe in cm und das Verhältnis Rübenlänge/Rübenumfang.

Die Rübenlänge und der Rübenumfang wurden von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Rübenpfahlwurzellänge (cm/Pflanze) und Rübenpfahlwurzelumfang (cm/Rübe) wurden je $n=5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Das Verhältnis von Rübenlänge/Rübenumfang wurde zusätzlich bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

3.1.1.4 Entwicklungsabhängige Untersuchung des Zuckergehalts in Pfahlwurzeln von Zuckerrübenpflanzen

Um die Charakterisierung der Rübenpfahlwurzel zu vervollständigen, wurden die verschiedenen Zucker, wie Glukose, Fruktose und Saccharose analysiert. Hierzu wurde die Pfahlwurzel in 5 Probenstellen unterteilt (s. Abbildung 16). Probenstelle 1 stellt den äußeren Kopfbereich der Pfahlwurzel dar. Probenstelle 2 den mittleren Kopfbereich. Probenstelle 3 stellt den äußeren Mittelteil dar, die Probenstelle 4 die Mitte und die Nr. 5 die Spitze der Pfahlwurzel. Rüben, die jünger als 14 Wochen waren, waren zu klein, um diese in fünf Probenstellen zu unterteilen; daher wurden diese Rüben in zwei, bzw. drei Probenstellen in Kopf, Mitte und Spitze unterteilt.

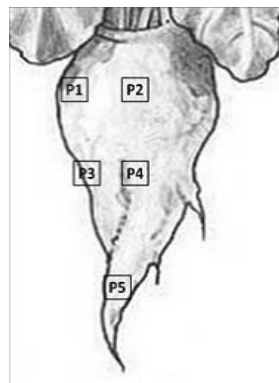


Abbildung 16: Übersicht der Probenstellen für die Bestimmung der Zuckergehalte in den Rübenpfahlwurzeln.

P1= Probenstelle 1 (äußerer Kopfbereich der Pfahlwurzel), P2= Probenstelle 2 (mittlerer Kopfbereich der Pfahlwurzel), P3= Probenstelle 3 (äußere Mittelteil der Pfahlwurzel), P4= Probenstelle 4 (Mittelteil der Pfahlwurzel) und P5= Probenstelle 5 (Spitze der Pfahlwurzel).

In den ersten 14 Wochen lag der Rübensaccharosegehalt bei rund 300 $\mu\text{mol/g}$, was einem Zuckeranteil von 10% entspricht (s. Abbildung 17). Ab der vierzehnten Woche war eine stetige Zunahme des Saccharosegehalts in der Pfahlwurzel zu verzeichnen. Eine Zunahme bis auf 550 $\mu\text{mol/g}$ konnte nach 22 Wochen beobachtet werden. Dies entspricht einem Zuckergehalt von 19%. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenstellen. In der Spitze war der Saccharosegehalt im Vergleich zum Rübenpfahlwurzelkopf und Körper am geringsten. Die Gehalte an Glukose und Fruktose in der Rübenpfahlwurzel lagen unter 0,5% (siehe Anhang).

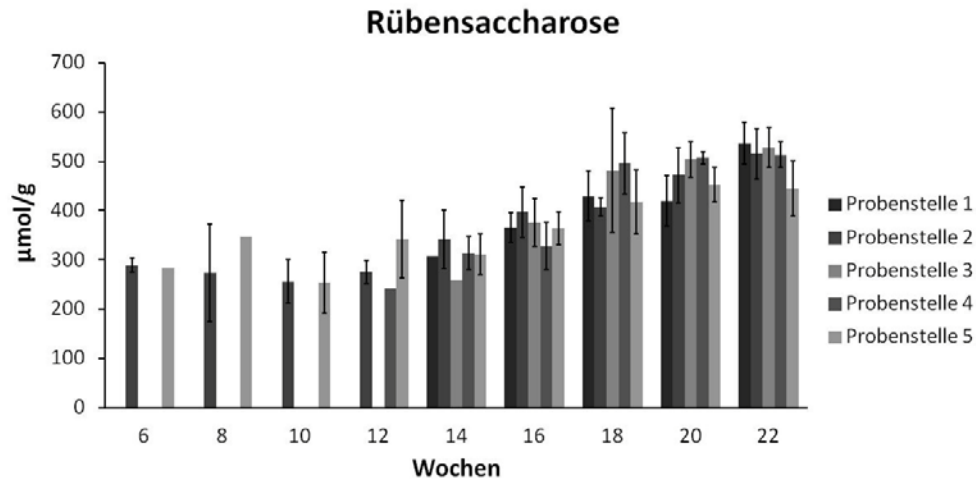


Abbildung 17: Zeitabhängige Entwicklung des Rübensaccharosegehalts in Rübenpfahlwurzeln an verschiedenen Probenstellen in µmol/g.

Die Rübensaccharose wurde von sechs bis 22 Wochen alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Rübenpfahlwurzel-saccharose ($\mu\text{mol/g}$) wurden für die einzelnen Zeitreihen je $n = 5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Zeitreihen \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr. Probenstelle 1 stellt den äußeren Kopfbereich der Pfahlwurzel dar. Probenstelle 2 den mittleren Kopfbereich. Probenstelle 3 stellt den äußeren Mittelteil dar, die Probenstelle 4 die Mitte und die Probenstelle 5 die Spitze der Pfahlwurzel.

3.1.1.5 Entwicklungsabhängige Expressionen verschiedener am Kohlenstoffmetabolismus beteiligter Gene

Zusätzlich sollten die Transkriptmengen verschiedener am Kohlenstoffmetabolismus beteiligter Gene analysiert werden. Es sollte der Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator (GPT), der plastidäre Adenylattranslokator (NTT), der Tonoplast Monosaccharid Transporter (TMT), und mehrere Saccharose-Transporter in Rüben unterschiedlicher Entwicklungsstufen untersucht werden. Die zu untersuchenden Gene waren bisher nur teilweise beschrieben, daher war es nötig, auf ESTs (*expressed sequence tags*) zurückzugreifen. Anhand dieser ESTs wurden die für die PCR jeweils benötigten Primerpaare abgeleitet. Zur Transkriptmengenbestimmung wurde die Gesamt-RNA aus den Geweben isoliert und eine Reverse Transkription durchgeführt. Darüber hinaus musste ein Referenzgen für die quantitative Transkriptmengenbestimmung gefunden werden. Zu diesem Zweck wurde das Aktin1 Gen getestet, was bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* als Referenz fungiert. Es wurde aus der Rübenpfahlwurzel die RNA extrahiert (s. 2.5.3) und die Konzentration bestimmt (s. 2.5.4). Zur Entfernung von noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (s. 2.5.5), um anschließend die RNA in cDNA umzuschreiben (s. 2.5.6). Diese cDNA diente als Matrize für die RT-PCR (s. 2.5.8).

In Abbildung 18 ist eine Amplifikation des Aktins in Zuckerrübe mit cDNA aus Pfahlwurzelgewebe zu sehen. Aus der Abbildung geht hervor, dass das Aktin in allen getesteten

Rübenentwicklungsstadien in den Pfahlwurzeln gleich stark exprimiert wurde. Das Aktin ist ein *housekeeping*-Gen und wurde als quantitative Kontrolle verwendet und diente dem Nachweis, dass in allen PCR Ansätzen eine vergleichbare Menge an cDNA vorlag.

Wie aus dem Gelbild (Abbildung 18) deutlich hervorgeht, waren alle GPT Amplifikate mit einer Fragmentgröße von 533 bp vorhanden und bei allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten von acht bis 22 Wochen alten Pflanzen gleich stark. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Expression des GPTs in der Pfahlwurzel immer gleich stark unter den analysierten Bedingungen war. Der gleiche Trend war auch bei dem NTT und der AGPase zu beobachten. Die 746 bp großen Banden des NTT, die 510 bp großen Banden der AGPase, sowie die 318 bp großen Banden des TMT1 zeigten keine Änderung der Intensität über den untersuchten Entwicklungszeitraum. Die Intensität der Banden des SUC1 Fragments (408 pb) nahm mit zunehmendem Rübenpfahlwurzelalter etwas zu, wobei die Bandenintensität der 636 bp großen Fragmente des SUC2 mit zunehmendem Rübenpfahlwurzelalter leicht abnahm.

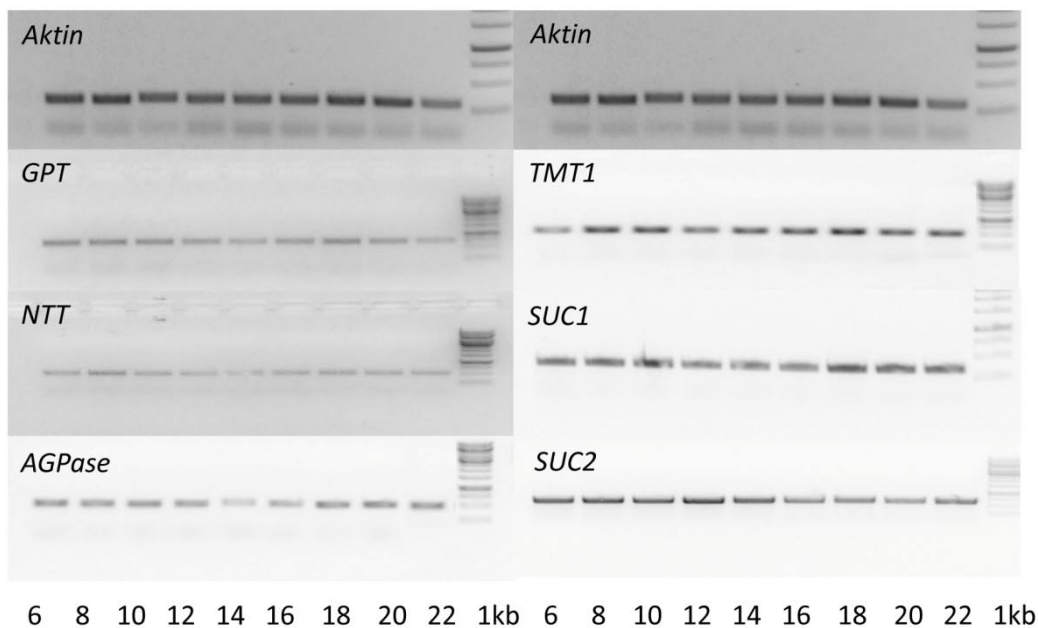


Abbildung 18: Expressionsanalysen des GPT, NTT, AGPase, TMT1, SUC1 und SUC2 von *Beta vulgaris* mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Es wurde das Standard PCR-Programm mit den primerspezifischen Annealing Temperaturen und 28 Zyklen verwendet. Die Transkriptmengen der Gene wurde mit Hilfe einer PCR auf cDNA aus sechs bis 22 Wochen alte Rübenpfahlwurzelgewebe mit den genspezifischen Primern nachgewiesen; 1kb-Leiter (Fermentas).

3.1.1.6 Charakterisierung des Rübenpfahlwurzelgewebes

In den letzten Jahren wurde die Rübenernte umgestellt. Bisher wurden die Rüben bei der Ernte geköpft. In den letzten Jahren hat sich ein neues Verfahren zur Ertragsteigerung immer mehr durchgesetzt. Bei der neuen Entblätterungsmethode werden die Rüben nicht mehr geköpft wie bisher, sondern nur noch mittels Schlegeln entblättert. Der Rübenkopf wurde neuerdings mit geerntet. Dadurch können Mehrerträge von 5-10 % erreicht werden (W. Beer und F. Michiels-Corsten in Zuckerrübe 3/2009). Jedoch kam es in der letzten Zeit vermehrt Probleme in der Zuckerfabrik bei der Abpressung von Rübenschnitzeln (priv. Mitteilung, Südzucker). Ein Grund für die neuerdings auftretenden Pressschäden an den Maschinen könnte ein höherer Verholungsgrad des Rübenkopfes darstellen. Daher sollte der Lignifizierungsgrad von Zuckerrüben in verschiedenen Geweberegionen, z.B. Rübenkopf (außen und Mitte), sowie Rübenkörper (außen und Mitte) untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Verfahren getestet und weiterentwickelt. Um eine erste Übersicht von der Ligninverteilung in Zuckerrüben zu bekommen, wurden Zuckerrübenquerschnitte mit Hilfe des Wiesner-Tests angefärbt. Für die Analysen wurden fünf Monate alte Zuckerrüben aus einer Freilandanzucht verwendet.

Der Wiesner-Test ist eine histochemische Färbung, mit der Lignin im Gewebe mittels einer Rotfärbung ligninhaltiger Strukturen in salzsaurer Phloroglucinlösung sichtbar wird (Wiesner, 1928).

In Abbildung 19 ist eine Ligninfärbung des Rübenkopfes mittels Phloroglucin dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, dass am Blattansatz vermehrt lignifiziertes Gewebe im Vergleich zum restlichen Rübenkörper vorhanden ist. Um dies weiter zu untersuchen, wurden Querschnitte von Rübenköpfen direkt unter den Blattansätzen gefärbt. Die Abbildung 19 zeigt einen solchen gefärbten Rübenkopf-Querschnitt entlang der Blattansätze. Dieses Bild verdeutlicht die Verteilung des lignifizierten Rübenkörpergewebes. An den Blattansätzen war die Rotfärbung deutlich zu erkennen.

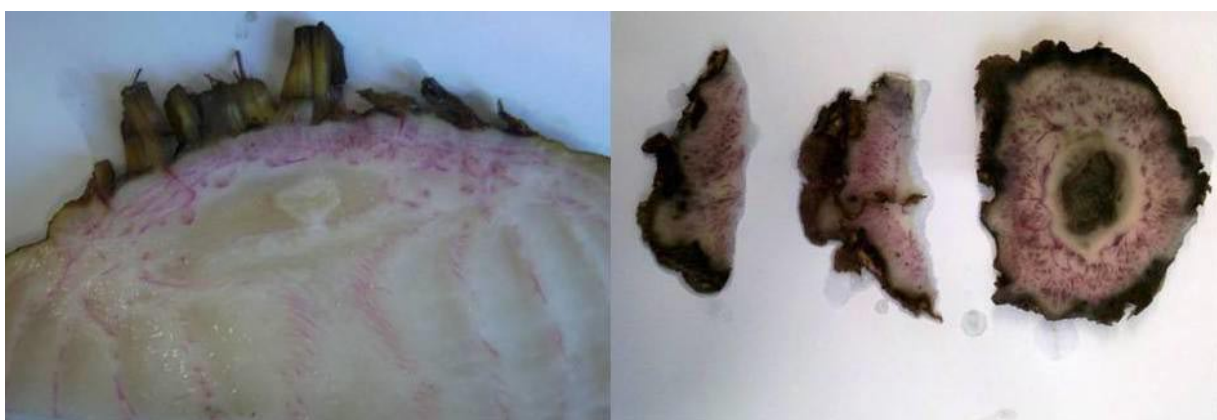


Abbildung 19: Färbung des ligninhaltigen Gewebes von Pfahlwurzeln mittels Phloroglucin.

Die Verteilung des Lignins in Zuckerrübenpfahlwurzelgewebe wurde mittels Färbung mit Phloroglucin von fünf Monate alten Pflanzen aus einer Freilandanzucht analysiert. Links: Längsschnitt eines Rübenkopfes mit Blattansatz; rechts: Querschnitt eines Rübenkopfes, direkt unterm Blattansatz.

Darüber hinaus wurde der Anteil von unlöslichen Stoffen in Zuckerrüben in den verschiedenen Regionen, also Rübenkopf (außen und Mitte) bzw. Rübenkörper (außen und Mitte) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden auch hier fünf Monate alte Freilandrüben verwendet. Das Rübenmaterial wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Das Frischgewicht des Pulvers wurde bestimmt und für 24 h gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt und daraus der Wassergehalt errechnet. Nach der Trocknung wurden Zucker extrahiert. Das zuckerfreie Pellet wurde getrocknet. Zum Schluss wurde das absolute Trockengewicht bestimmt. Aus Abbildung 20 geht hervor, dass der unlösliche Anteil im Gewebe im äußeren Teil des Rübenkopfes mit rund 10% deutlich höher im Vergleich zur Rübenmitte war. Diese Ergebnisse wurden durch die quantitative Bestimmung des Ligningehalts (Abbildung 20) unterstützt, wobei der tatsächliche Ligningehalt sehr gering war. Bezieht man den Ligningehalt in Prozent auf das eingesetzte Trockengewicht, so kam man auf 0,65% im Rübenkopf-Außen, Rübenkopf-Mitte auf 0,26% und die beiden Rübenkörper-Außen und Mitte auf rund 0,06%.

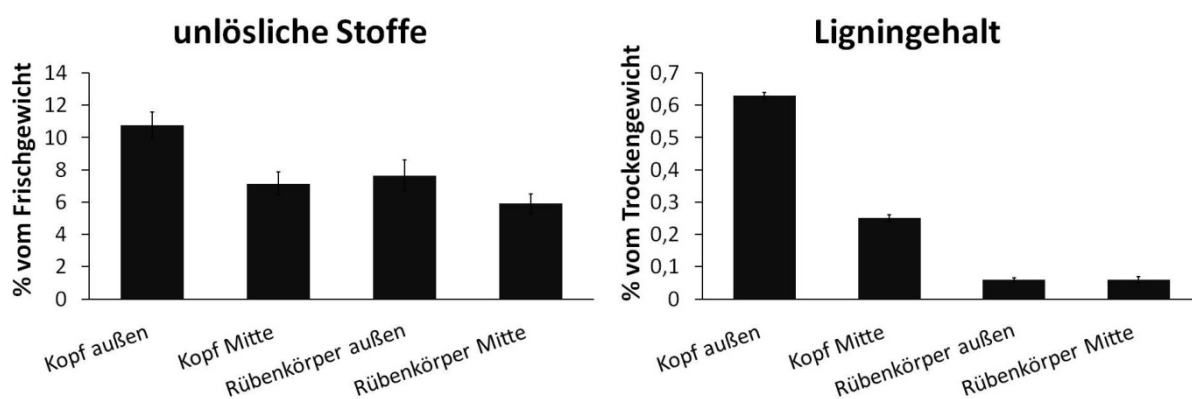


Abbildung 20: Bestimmung der Menge an unlöslichen Stoffen in Zuckerrüben in % vom Frischgewicht und des Ligningehalt in % vom Trockengewicht.

Der Anteil an unlöslichen Stoffen und der Ligningehalt in Rübenpfahlwurzeln wurden von fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der beiden Parameter wurden je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.1.1.7 Charakterisierung der Vakuolen des Rübenpfahlwurzelgewebes

In der Vakuole werden u.a. verschiedene Zucker kurz- bzw. langfristig gespeichert. In Speichergeweben der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) wird Saccharose eingelagert, die als Energiequelle dient, sobald die Gewebe von *sink*- auf *source*-Metabolismus umstellen (Buchanan *et al.*, 2000). Die Zentralvakuole in vegetativen Geweben zählt zu den lytischen Vakuolen (Jauh *et al.*, 1999). Das Vakuolenlumen kann bis zu 90% der Zelle einnehmen und spielt in der Saccharosespeicherung eine wichtige Rolle (Heineke *et al.*, 1994, Winter *et al.*, 1993). Daher war es interessant, nicht nur die Entwicklung der Zuckerrübenpflanzen als Ganzes zu untersuchen, sondern auch die Vakuole.

Die Abbildung 21 zeigt die Färbung von Zuckerrübenpfahlwurzelgewebe mit Acridinorange von zwei und drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen. Acridinorange ist ein tertiäres Amin, welches sich nach Zugabe in den sauren Kompartimenten lebender Zellen anreichert (Gluck *et al.*, 1982). Im normalen Durchlicht erschienen die Schnitte rötlich, wohingegen im angeregten Zustand mit $\lambda = 450$ nm der Farbstoff im Sauren grün emittierte. Die Vakuolen erschienen somit im Gegensatz zu den Zellwänden grün, was zeigt, dass keine Anreicherung des Farbstoffs in diesem Bereich erfolgte. Zusätzlich zeigte die Färbung, dass es keine erkennbaren Unterschiede der Vakuolengröße mit zunehmendem Alter gab. Der Durchmesser der Vakuolen lag zwischen 50 bis 100 μm .

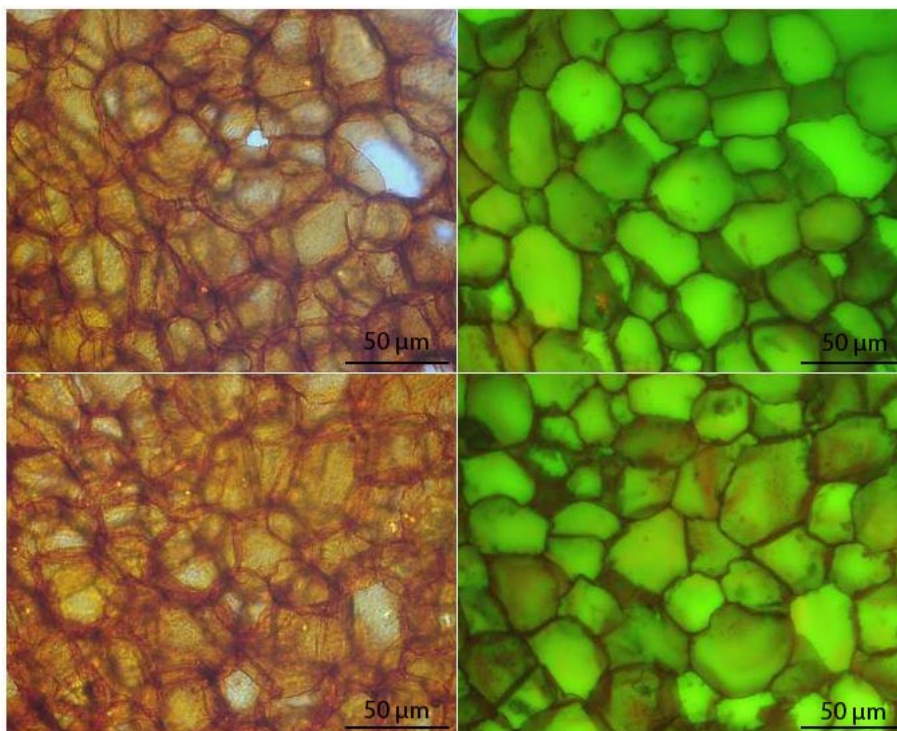


Abbildung 21: Färbung zwei und drei Monate alter Zuckerrübenpflanzengewebe mit 10 mM Acridinorange.

200x Vergrößerung; Probe unter Bestrahlung mit normalen Durchlicht (links) und Licht der Wellenlänge $\lambda = 450$ nm (rechts); Längensymbol 50 μm ; grün fluoreszierende Vakuolen; nicht fluoreszierende Zellwände.

3.1.2 Lichtabhängige Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingung

Nachdem die Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Standardlichtbedingungen im Gewächshaus untersucht wurde, sollte zusätzlich der Einfluss von verschiedenen Lichtstärken auf die Entwicklung der Zuckerrübenpflanzen analysiert werden. Um eine eventuelle Wachstumslimitierung durch die ausgewählte Lichtmenge auszuschließen, war es wichtig, den Einfluss verschiedener Lichtbedingungen auf das Wachstum der Zuckerrübenpflanzen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Zuckerrübenpflanzen im Gewächshaus unter „wenig“ Licht mit einer Lichtintensität von $\approx 150 \text{ mmol}/(\text{m}^2\text{s})$ ohne Zusatzbeleuchtung, unter „normal“ Licht von $\approx 220 \text{ mmol}/(\text{m}^2\text{s})$, welches in den anderen Experimenten als Standard verwendet wurde und unter „viel“ Licht mit $\approx 300 \text{ mmol}/(\text{m}^2\text{s})$ angezogen. Die Pflanzen wurden Anfang Juni 2013 ausgesät und nach zwei Wochen in Töpfe mit sieben Liter Volumen (Oberradius= 11 cm, Unterradius= 8 cm und Höhe= 26 cm) pikiert. Die Ernte wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (zwei, drei, vier und fünfmonatiger Anzucht) durchgeführt, wobei die Blattproben für die Stärke- und Zuckeranaysen jeweils einen Tag vorher genommen wurden. Um Aufschluss über den Entwicklungsstand der Rüben zu erhalten, wurden diese morphologisch charakterisiert.

3.1.2.1 Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile

Die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewicht) wurden in entwicklungsabhängigen Anzuchten analysiert. In Abbildung 23 ist die Ontogenese der Grüngewichte von zwei bis fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen gezeigt.

In den ersten zwei Monaten gab es keinen Unterschied im Grüngewicht der Zuckerrübenpflanzen unter den verschiedenen Lichtbedingungen. Das Grüngewicht lag bei etwa 100 g/Pflanze. Nach drei-monatiger Anzucht kristallisierte sich heraus, dass die unter „hoch“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen ein deutlich höheres Grüngewicht mit 240 g/Pflanze im Vergleich zu den im „normal“ bzw. „wenig“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen mit rund 170 g/Pflanze aufwiesen. In den folgenden Monaten blieb das Grüngewicht der im „hoch“ Licht angezogenen Pflanzen nahezu unverändert, wobei die Zuckerrübenpflanzen unter „normal“ Licht vom dritten Monat zum vierten Monat deutlich an Grüngewicht zunahmten. Nach viermonatiger Anzucht erreichten diese Pflanzen rund 290 g/Pflanze. Vergleicht man die gesamte Ontogenese des Grüngewichts der unter verschiedene Lichtbedingungen angezogenen Pflanzen, so zeigte sich, dass die Entwicklung des Grüngewichts unter den „normal“ und „wenig“ Lichtbedingung verzögert war. Dies war auch optisch zu erkennen (Abbildung 22).

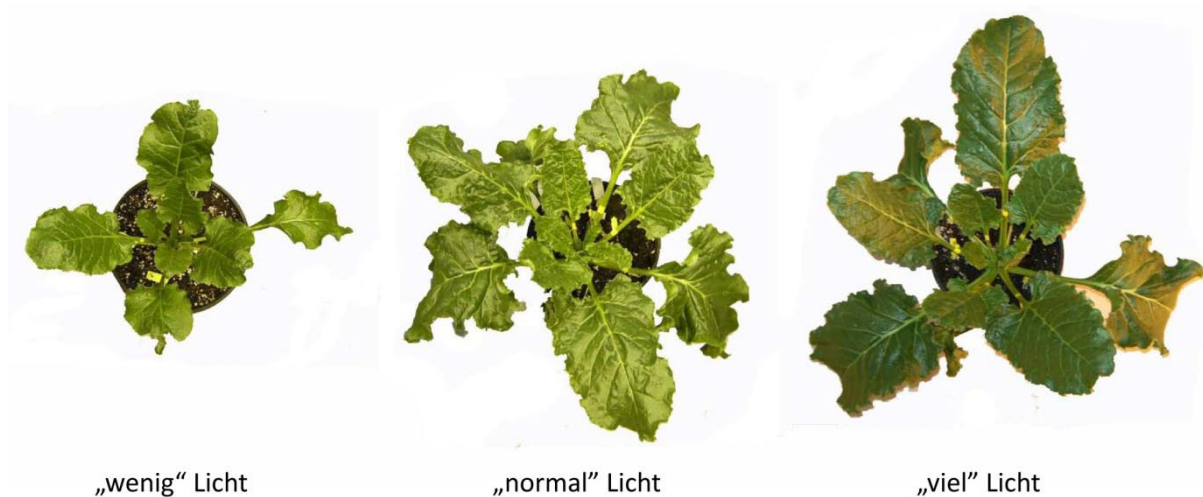


Abbildung 22: Lichtabhängige Entwicklung von drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen.

Aufsicht von drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen, welche unter verschiedene Lichtbedingungen im Gewächshaus angezogen wurden. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; „wenig“ Licht $\approx 150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „normal“ Licht $\approx 220 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „viel“ Licht $\approx 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

Die Unterschiede und die Zunahme der Grünflächen der unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogen Zuckerrübenpflanzen war optisch gut zu erkennen, daher wurde auch die Grünflächenentwicklung in Abhängigkeit der verschiedenen Lichtbedingungen und Entwicklungsstadien analysiert (s. Abbildung 23). Hierzu wurde die gesamte Blattfläche (Grünfläche) der einzelnen Zuckerrübenpflanzen vermessen. Das Grüngewicht und die Grünfläche korrelierten positiv, das heißt die Grünfläche wies eine ähnliche Wachstumscharakteristik wie das Grüngewicht unter den verschiedenen Lichtbedingungen auf.

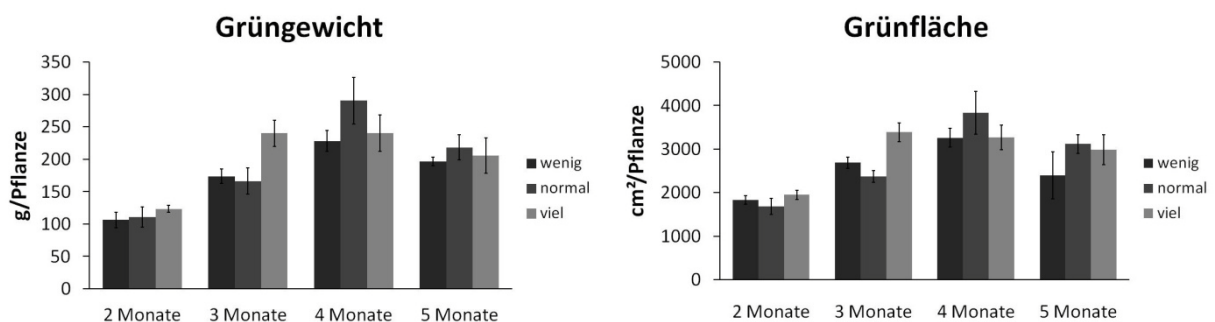


Abbildung 23: Grüngewicht und Grünfläche der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen.

Das Grüngewicht und die Grünfläche wurden von zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Grüngewicht (g/Pflanze) und Grünfläche (cm²/Pflanze) wurden je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; „wenig“ Licht $\approx 150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „normal“ Licht $\approx 220 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „viel“ Licht $\approx 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

In den ersten zwei Monaten lag die Grünfläche bei 2000 cm²/Pflanze. Vom zweiten zum dritten Monat war auch hier eine deutliche Zunahme der Grünfläche der unter „viel“ Licht angezogenen Pflanzen auf rund 3300 cm²/Pflanze zu beobachten. Auch hier zeigte sich, dass die Ontogenese der Grünfläche unter den „normal“ und „wenig“ Lichtbedingung im Vergleich zu den unter „viel“ Licht angezogenen Pflanzen verzögert war.

Neben der Ontogenese des Grüngewichts und der Grünfläche wurden die Blattanzahl und die durchschnittliche Assimilation der mittelgroßen Blätter der einzelnen Pflanzen in Abhängigkeit der verschiedenen Lichtbedingungen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

Die Anzahl der Blätter nahm über den gesamten analysierten Zeitraum stetig zu, wobei die Blattanzahl der unter „viel“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen bis zum vierten Monat im Vergleich zu den unter „normal“ bzw. unter „wenig“ Licht angezogenen Pflanzen leicht erhöht war. Die unter „wenig“ Licht angezogenen Pflanzen hatten in den ersten drei Monaten im Vergleich zu den anderen Zuckerrübenpflanzen eine etwas verringerte Blattanzahl. Bei den vier Monate alten Zuckerrübenpflanzen gab es keinen Unterschied in der Blattanzahl. Die durchschnittliche Blattanzahl lag bei 30 Blättern/Pflanze.

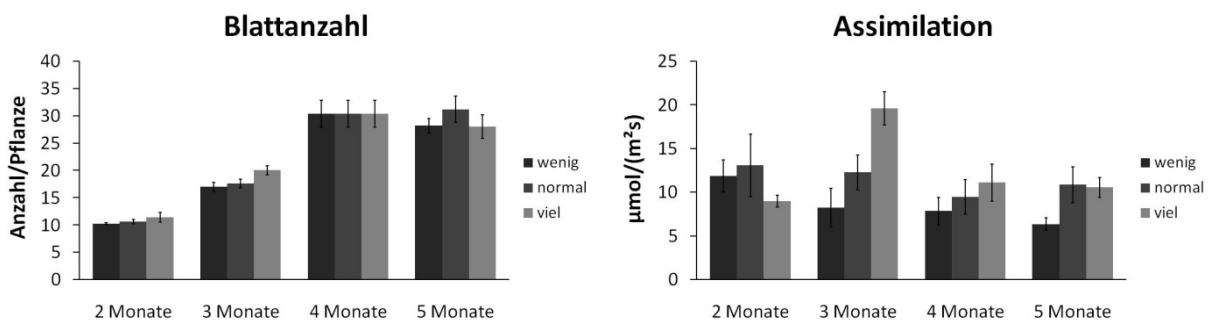


Abbildung 24: Blattanzahl und Assimilation (Blattstufe 2) der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen.

Die Blattanzahl und die Assimilation wurden von zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Blattanzahl (Anzahl/Pflanze) und Assimilation ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wurden je $n=5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; „wenig“ Licht $\approx 150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „normal“ Licht $\approx 220 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „viel“ Licht $\approx 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Lichtbedingungen auf den Blattmetabolismus näher zu analysieren, wurde die CO₂-Assimilationsrate bestimmt. Die Messung erfolgte am frühen Nachmittag. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Assimilationsmessungen der Blattstufe 2 (mittelalte Blätter) dargestellt. In den Blattstufen 1 und 3 waren ähnliche Tendenzen zu beobachten (siehe Anhang). Anders als bei den bisher untersuchten Parametern zeigten die unter „wenig“ und unter „normal“ Licht angezogenen zwei Monate alten Pflanzen eine leicht erhöhte Assimilationsrate im Vergleich zu den unter „viel“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen. Dies änderte sich mit zunehmendem Alter. Die drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen unter „viel“ Licht hatten eine durchschnittliche

Assimilation von $20 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, die unter „normal“ Licht eine Assimilation von $12 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ und die unter „wenig“ Licht $8 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$. Auch in den darauf folgenden Monaten war die Assimilationsrate der unter „wenig“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen am geringsten.

3.1.2.2 Entwicklungsabhängige Analyse der Kohlenhydratgehalte in Zuckerrübenblättern

Neben der Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile wie z.B. des Grüngewichts und der Grünfläche der Zuckerrübenpflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen, war der Gehalt an Stärke in den Blättern dieser Pflanzen interessant. Die Blätter wurden auch hierzu in drei Kategorien eingeteilt. Zu diesem Zweck wurden die Blätter ihrer Größe nach wie in 3.1.1.2 kategorisiert. Die jüngsten und somit kleinsten Blätter sind in Blattstufe 1 zusammengefasst. Die mittelgroßen Blätter werden in Blattstufe 2 und die größten bzw. ältesten Blätter werden in Blattstufe 3 eingeteilt.

Auch hier führte sich der Trend fort, dass die unter „viel“ Licht angezogenen Pflanzen im Durchschnitt den höchsten und die unter „wenig“ Licht angezogenen im Durchschnitt den niedrigsten Blattstärkegehalt in den Blättern aufwiesen (s. Abbildung 25). Dieser Trend zeigte sich mit Ausnahme zwei Monate alter Pflanzen auch im Blattsaccharosegehalt. Hier war der Saccharosegehalt in den Blättern der unter „normal“ Licht angezogenen Pflanzen am höchsten, was sich aber nicht in den anderen untersuchten Zeitpunkten widerspiegelte.

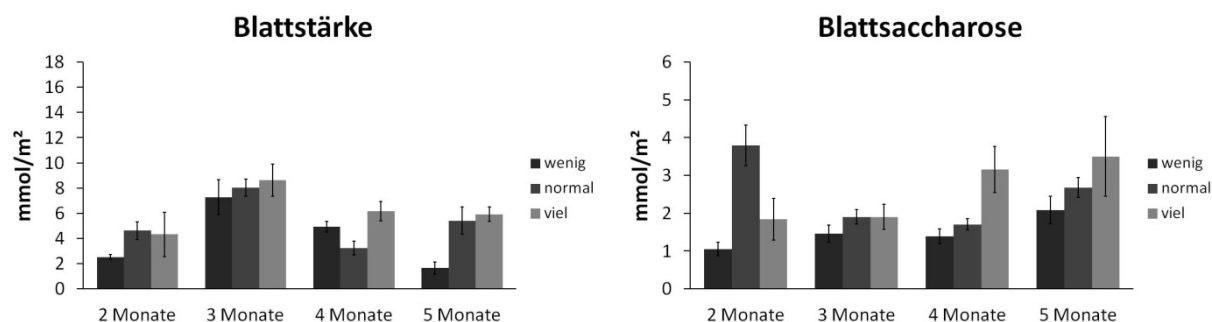


Abbildung 25: Blattstärke- und Blattsaccharosegehalt der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen.

Die Stärke- und Saccharosegehalte in Blättern der Stufe 2 (mittelalte Blätter) von zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurden analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Blattstärke und Blattsaccharose (mmol/m^2) wurden je $n = 5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; „wenig“ Licht $\approx 150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „normal“ Licht $\approx 220 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „viel“ Licht $\approx 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

3.1.2.3 Entwicklung der unterirdischen Pflanzenteile

Um den Einfluss der verschiedenen Lichtintensitäten auf die Ontogenese der unterirdischen Pflanzenteile (Rübenpfahlwurzelgewicht) zu bestimmen, wurde das Rübengewicht ebenfalls analysiert. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Rübenpfahlwurzelgewichte der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen dargestellt. Hier zeigt sich, dass das Pfahlwurzelgewicht mit zunehmender Lichtintensität während des Wachstums zunahm. Nach zweimonatiger Anzucht im Gewächshaus erreichte das Pfahlwurzelgewicht der unter „wenig“ Licht angezogenen Pflanzen etwa 40 g/Pflanze, wobei die unter „normal“ und „viel“ Licht angezogenen Pflanzen bereits 100 g/Pflanze aufwiesen. Nach dreimonatiger Anzucht betrug das Rübengewicht der in „wenig“ Licht angezogenen Pflanzen 140 g/Pflanze. Die unter „normal“ Licht hatten ein Rübengewicht von 250 g/Pflanze und die unter „viel“ Licht angezogenen Pflanzen hatten nach drei monatiger Anzucht bereits 400 g/Pflanze. Der Unterschied zwischen den Lichtbedingungen „normal“ und „viel“ war nach vier monatiger Anzucht nicht mehr so deutlich ausgeprägt wie bei den Zeitpunkten zuvor. Weiterhin zeigten die unter „wenig“ Licht angezogenen Pflanzen mit einem Pfahlwurzelgewicht von 250 g/Pflanzen ein deutlich niedrigeres Gewicht im Vergleich zu den Pflanzen unter den anderen beiden Lichtbedingungen. Nach fünfmonatiger Anzucht erreichten die unter „viel“ Licht angezogenen Pflanzen mit 800 g/Pflanze das höchste Rübengewicht im Vergleich zu den Pflanzen unter den anderen Lichtbedingungen.

Der Ernteindex ist der Anteil des Ernteprodukts am Gesamtgewicht der Pflanze. Je näher der Ernteindex an 1 liegt, desto größer ist der prozentuale Anteil des Ernteprodukts. In den ersten zwei Monaten gab es keinen Unterschied im Ernteindex der Zuckerrübenpflanzen unter „normal“ und „viel“ Licht. Hier lag der Ernteindex bei 0,44, wobei der Ernteindex der unter „wenig“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen nur bei 0,27 lag. Auch nach dreimonatiger Anzucht gab es keinen Unterschied im Ernteindex der unter „normal“ und „viel“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen. Nach vier monatiger Anzucht kristallisierte sich heraus, dass die unter „hoch“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen einen leicht erhöhten Ernteindex mit 0,65 im Vergleich zu den im „normal“ bzw. „wenig“ Licht angezogenen Zuckerrübenpflanzen mit 0,53 („wenig“) und 0,59 („normal“) aufwiesen. Vergleicht man den Ernteindex über die gesamte Pflanzenentwicklung der unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogenen Pflanzen, so zeigt sich, dass der Ernteindex mit zunehmendem Licht zunahm.

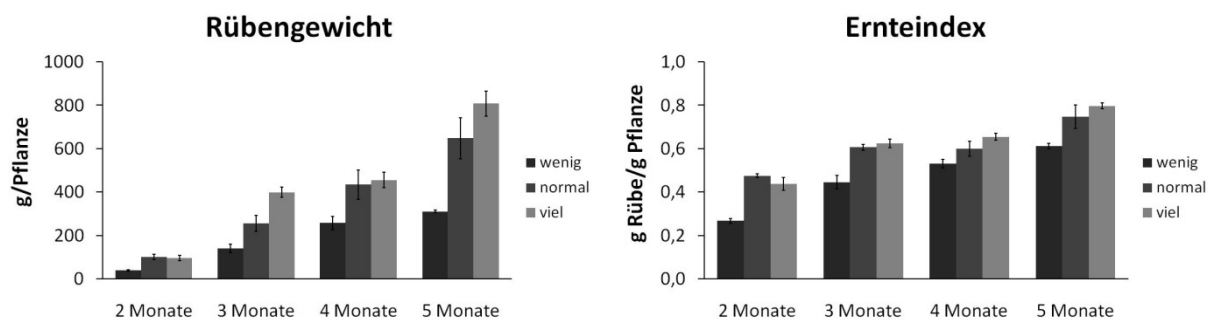


Abbildung 26: Rübengewicht der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen.

Das Rübengewicht wurde von zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen analysiert. Zur Bestimmung der Parameter Rübenpfahlwurzelgewicht (g/Pflanze) und Ernteindex (g Rübe/g Pflanze) wurden je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; „wenig“ Licht $\approx 150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „normal“ Licht $\approx 220 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$; „viel“ Licht $\approx 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

3.1.3 Orts- und Wachstumsphasen-abhängige Transkriptanalysen von *Beta vulgaris*

Es sollten Transkriptmengen von verschiedenen Genen in zwei verschiedenen Wachstumsphasen mittels Micro-Array-Analysen untersucht werden. Zum einen sollten die Transkriptmengen verschiedener Gene vor der Zuckerspeicherphase und zum anderen während der Zuckerspeicherphase analysiert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Genexpression zwischen Gewächshausrüben und Feldrüben gibt. Wie in 3.1.1 gezeigt wurde, ist eine Anzucht von Zuckerrüben im Gewächshaus möglich. Ob und wie sich die Entwicklung der Pflanzen in der Gewächshaus- und Freilandanzucht unterscheiden, wurde bisher nicht gezeigt. Darüber hinaus wurde in 3.1.2 der Einfluss von verschiedenen Lichtbedingungen auf die Ontogenese der Rübenpflanzen untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Wachstumslimitierung durch zu niedrige Lichtintensitäten. Daher sollten zusätzlich die möglichen Unterschiede der Pflanzenentwicklung zwischen Gewächshaus- und Freilandanzucht untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden im Mai 2011 Zuckerrüben im Gewächshaus und im Feld angebaut und nach zwei bzw. fünf Monaten geerntet. Darüber hinaus wurden Blattproben um 15:00 Uhr und 23:00 Uhr genommen. Um Aussagen über den Entwicklungsstand der Zuckerrüben machen zu können, wurden die Pflanzen zusätzlich morphologisch charakterisiert.

3.1.3.1 Umgebungs- und zeitabhängige Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile

Die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewicht) wurden in umgebungs-, sorten- und zeitabhängigen Anzuchten analysiert. Hierzu wurden die beiden Zuckerrübensorten 8k_1101 (8K) und 7N_1920 (7N) ausgewählt. Die Rübensorte 8K ist die Transformationsorte und 7N eine Hochleistungssorte, wie sie in der Feldanzucht zur Zuckerproduktion heute verwendet wird. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen.

In Abbildung 27 ist die Entwicklung der Grüngewichte der beiden Sorten dargestellt. Beide Sorten zeigten ähnliche Tendenzen. Die im Gewächshaus angezogenen Pflanzen hatten nach zwei monatiger Anzuchtphase ein höheres Grüngewicht im Vergleich zu den im Freiland angezogenen Pflanzen. Das Grüngewicht der Sorte 7N war nach fünfmonatiger Anzucht im Gewächshaus im Vergleich zu den zwei Monate alten Rüben gering erhöht, wobei die Sorte 8K eine deutliche Reduktion des Grüngewichts mit zunehmendem Alter zeigte. Bei beiden Sorten verdoppelte sich das Grüngewicht im Freiland von zwei zu fünf Monaten.

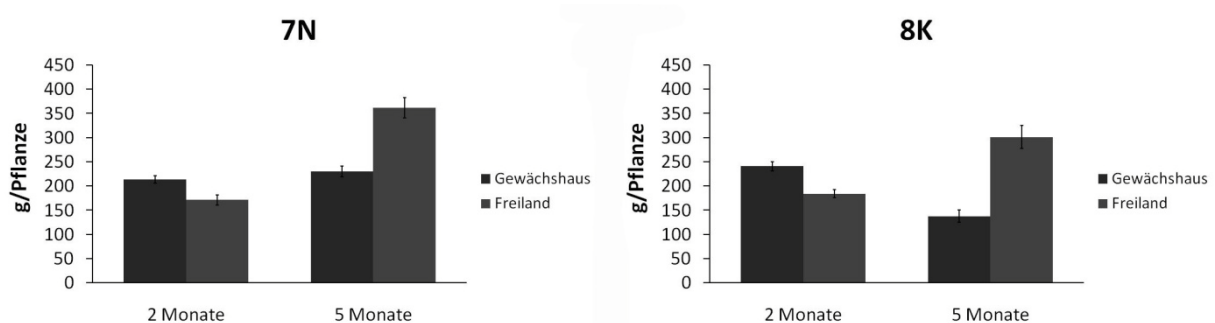


Abbildung 27: Grüngewicht der in Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung des Grüngewichts wurden je $n = 30$ (Gewächshaus) bzw. $n = 50$ (Freiland) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Um die Unterschiede der Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewichte) zwischen Gewächshausanzucht und Feldanzucht erklären zu können, war es interessant, nicht nur das Grüngewicht der Zuckerrübenpflanzen zu bestimmen, sondern auch die Gesamtblattflächen (Grünflächen). Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Es waren ähnliche Tendenzen wie beim Grüngewicht zu beobachten. Beide im Gewächshaus angezogenen Sorten hatten nach zwei monatiger Anzucht eine größere Gesamtgrünfläche im Vergleich zu den im Freiland angezogenen Pflanzen. Die Grünfläche der fünf Monate alten Sorte 7N war im Gewächshaus gering erhöht im Vergleich zu den zwei Monate alten Rüben, wobei die Sorte 8K eine deutliche Reduktion der

Grünfläche mit zunehmendem Alter aufwies. Bei beiden Sorten verdoppelte sich auch hier die Grünfläche im Freiland von zwei zu fünf Monaten.

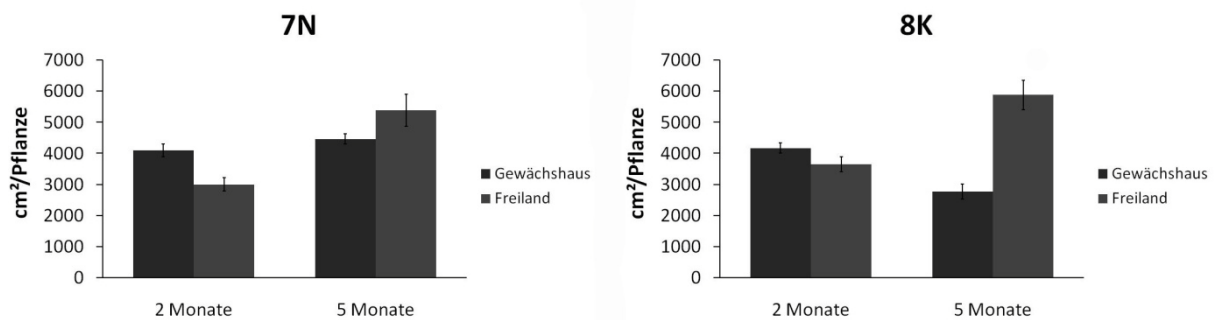


Abbildung 28: Gesamtblattfläche der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung der Gesamtblattfläche wurden je n= 20 (Gewächshaus) bzw. n= 30 (Freiland) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Das Grüngewicht hängt auch von der Blattanzahl ab, daher war es naheliegend, zusätzlich die Anzahl der Blätter zu bestimmen. Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, gibt es kaum Unterschiede zwischen im Gewächshaus herangezogenen Rübenpflanzen und im Freiland wachsenden Pflanzen. Vergleicht man die zwei Monate alten Rüben mit den fünf Monate alten Rüben, so zeigt sich, dass sich die Anzahl der Blätter fast verdoppelt hat.

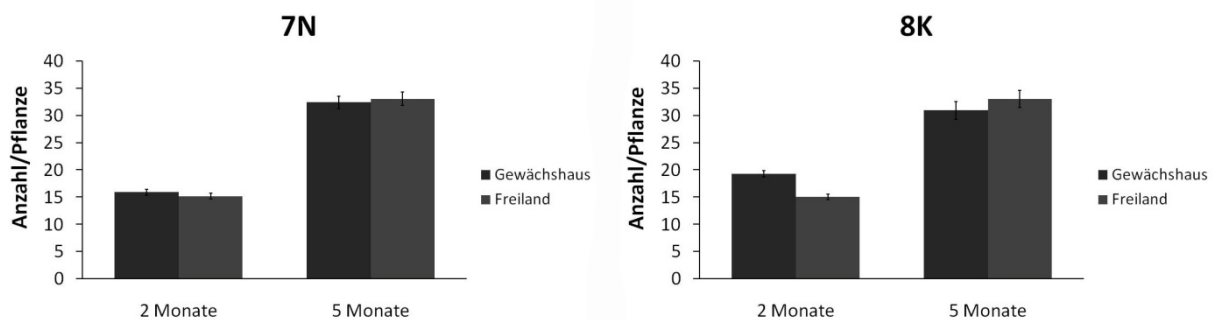


Abbildung 29: Blattanzahl der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung der Blattanzahl wurden je n= 30 (Gewächshaus) bzw. n= 50 (Freiland) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

3.1.3.2 Umgebungs- und zeitabhängige Entwicklung der Kohlehydratgehalte in Zuckerrübenblättern

Die Stärkemengen in Zuckerrübenblättern wurden sowohl um 15:00 Uhr (Tag) als auch um 23:00 Uhr (Nacht) bestimmt, da um diese Uhrzeiten auch Proben für die Transkriptanalysen genommen wurden. Die Blattstärkemenge nimmt im Allgemeinen während des Tages zu und nachts ab. Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, war der Blattstärkegehalt in den im Freiland angezogenen Pflanzen generell höher als bei den im Gewächshaus angezogenen Pflanzen. Dies zeigte sich sowohl bei den zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen als auch bei den fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen. Mit zunehmendem Alter nahm der Blattstärkegehalt in Blättern ab. Diese Abnahme war bei den Gewächshauspflanzen ausgeprägter als bei den Freilandrüben. Zusammenfassend ist zu sagen, dass Zuckerrübenpflanzen, die im Freiland angezogen wurden, mehr Stärke in Blättern aufwiesen - unabhängig von der Sorte.

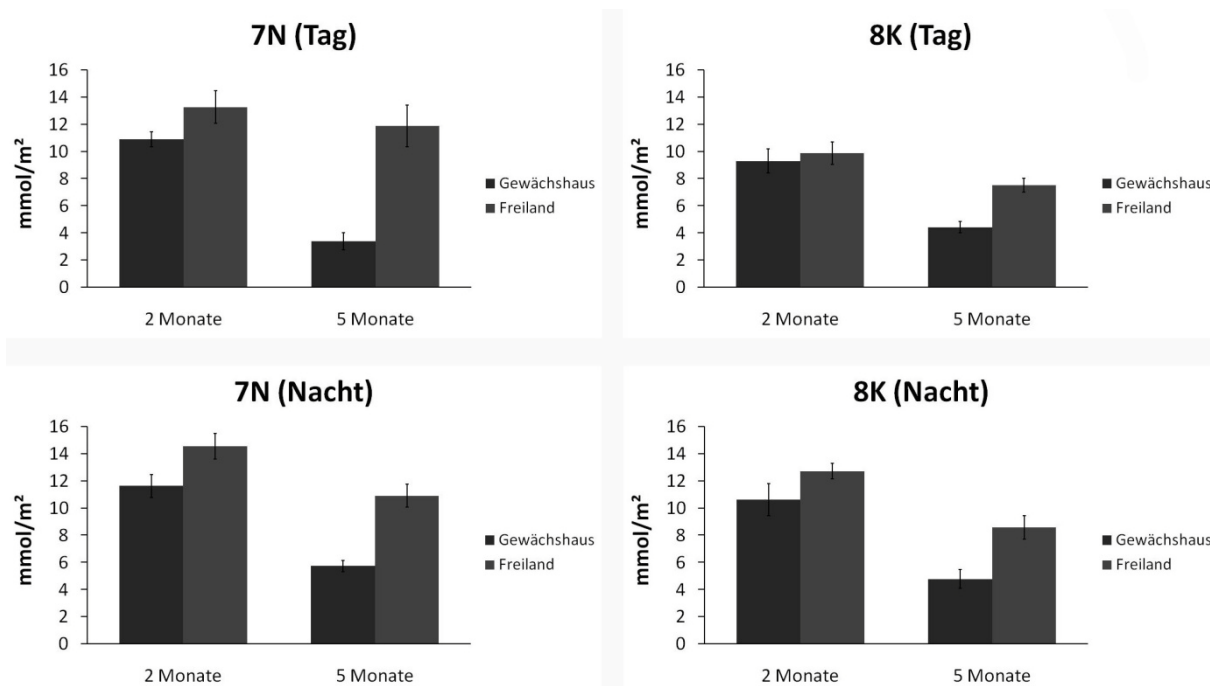


Abbildung 30: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Die Stärkegehalte in Blättern der Stufe 2 (mittelalte Blätter) wurden analysiert. Die Probennahme erfolgte um 15:00 Uhr (Tag) und 23:00 Uhr (Nacht). Zur Bestimmung der Blattstärke (in mmol Hexose/ m²) wurden je n= 10 (2 Monate) bzw. n= 5 (5 Monate) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Die Glukose-, Fruktose- und Saccharosemengen wurden ebenfalls sowohl um 15:00 Uhr (Tag) als auch um 23:00 Uhr (Nacht) bestimmt. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Saccharosemessungen der Blattstufe 2 stellvertretend für die anderen Blattstufen 1 und 3 dargestellt. In den Blattstufen 1 und 3, sowie für die Glukose- und Fruktosegehalte waren ähnliche Tendenzen zu beobachten (siehe Anhang). Hier war der Trend zu beobachten, dass mit zunehmendem Alter der Zuckergehalt in Blättern zunahm. Generell zeigte sich, dass die Blattsucker in Freilandrüben höher waren als bei den im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen.

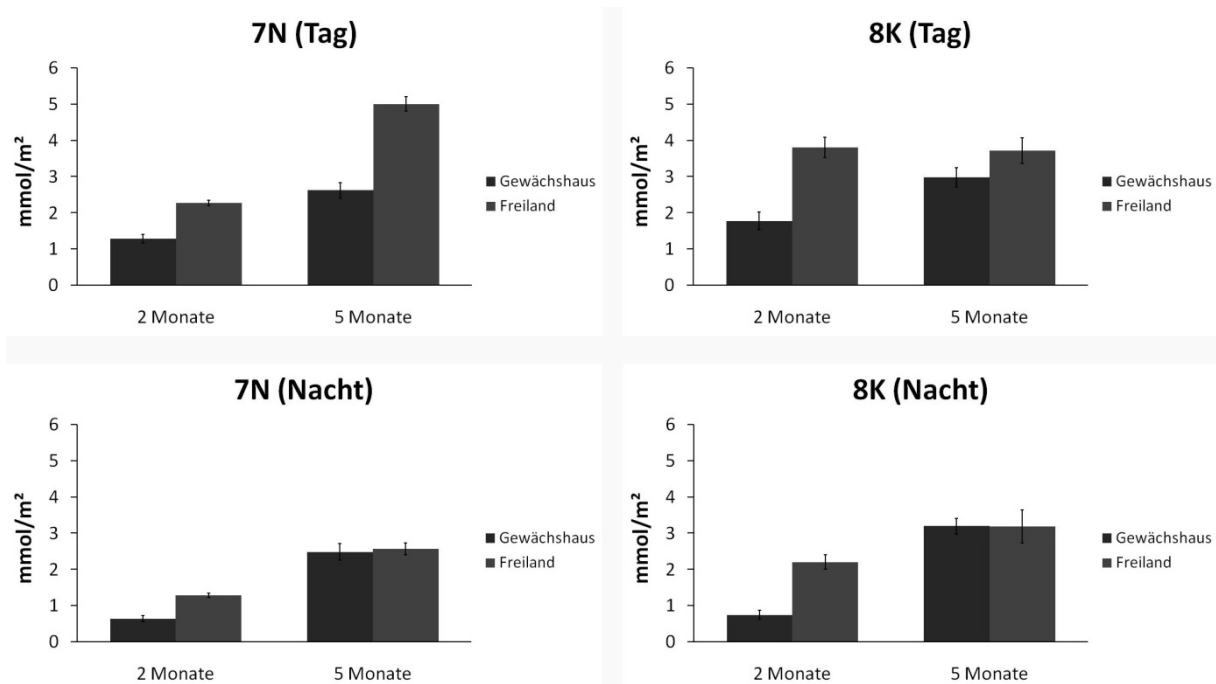


Abbildung 31: Blattsaccharosegehalte der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Die Saccharosegehalte in Blättern der Stufe 2 (mittelalte Blätter) wurden analysiert. Die Probennahme erfolgte um 15:00 Uhr (Tag) und 23:00 Uhr (Nacht). Zur Bestimmung der Saccharose (in mmol/m²) wurden je n= 10 (2 Monate) bzw. n= 5 (5 Monate) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Um die Unterschiede im Kohlenstoffmetabolismus der Blätter der im Gewächshaus und im Freiland angezogenen Zuckerrübenpflanzen näher zu untersuchen, wurden diese zusätzlich über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert. Daraus lässt sich möglicherweise ableiten, ob es möglich ist, mittels transgener Ansätze die nachts nicht benötigte Stärke in die Pfahlwurzel umzuleiten. Dazu wäre es wichtig, dass am Ende der Nacht noch Reststärke in den Blättern vorhanden ist. Diese überschüssige Stärke könnte mittels einer Modifikation der *source*- und *sink*-Kapazität ins *sink*-Gewebe umgeleitet werden, um damit die Menge in der Pfahlwurzel gespeicherter Saccharose möglicherweise zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich Pflanzen der Sorte *Beta vulgaris* Lukas im Freiland und Gewächshaus Mitte April 2013 ausgesät.

Der Stärkegehalt in allen drei Blattstufen von zwei, drei und fünf Monate alten Pflanzen wurde analysiert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34) zusammengefasst. Zum einen zeigte sich hier, dass der Stärkegehalt in den Blättern mit zunehmendem Alter der Pflanze in allen drei Blattstufen abnahm. Zum anderen war der Blattstärkegehalt in den im Freiland angezogenen Zuckerrübenpflanzen höher als in den Gewächshauspflanzen. Aus den Abbildungen wird der diurnale Verlauf des Stärkegehalts in den Blättern deutlich. Bis zum Einsetzen der Dunkelphase (im Gewächshaus ab 21:00 Uhr) wurde Stärke synthetisiert und anschließend, bis ca. drei Stunden in die Lichtphase (im Gewächshaus ab 6:00 Uhr) hinein, wieder abgebaut.

Es stellte sich immer wieder ein Stärkegehalt um die Ursprungskonzentration nach 24 Stunden ein. Bei den zwei Monate alten Pflanzen aus der Freilandanzucht war der Stärkegehalt mit 30 mmol/m² am Ende des Tages fast dreimal so hoch wie in den Pflanzen im Gewächshaus. Am Ende der Nacht waren noch rund 30% der am Tag synthetisierten Stärke in den Blättern der Freilandrüben vorhanden, wobei bei den im Gewächshaus angezogenen Pflanzen noch 10% Reststärke am Ende der Nacht vorhanden war (Abbildung 32).

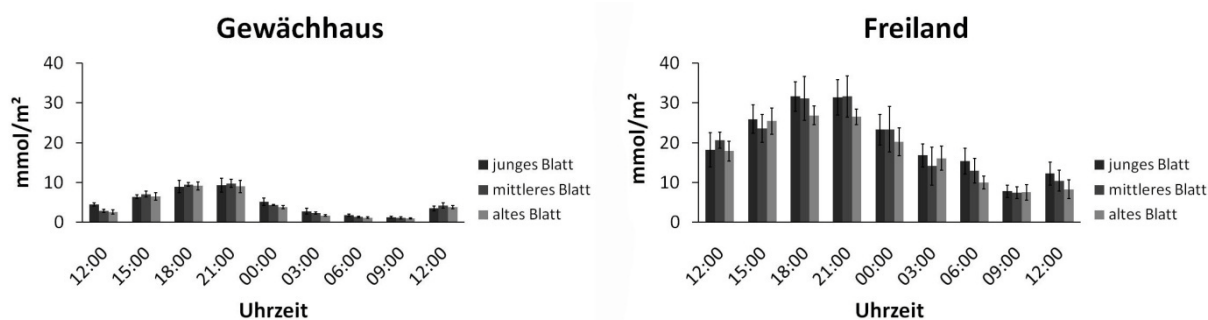


Abbildung 32: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.

Der Stärkegehalt in Blättern von zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurde von allen drei Blattstufen analysiert. Die Probennahme erfolgte alle drei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Blattstärke (mmol Hexose/m²) wurden je n = 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Dunkelphase im Gewächshaus: 21:00-06:00 Uhr; Lichtphase im Freiland: 05:26-21:32 Uhr; Dunkelphase im Freiland: 21:32-05:25 Uhr.

Die drei Monate alten im Freiland angezogenen Pflanzen synthetisierten im Verlauf des Tages bis zu 25 mmol/m² Stärke im Blatt. Hier waren am Ende der Nacht bis zu 20% der tagsüber synthetisierten Blattstärke noch vorhanden. Im Gewächshaus angezogene Pflanzen erreichten tagsüber nur bis zu 9 mmol/m², und am Ende der Nacht waren noch rund 10% der Stärke in den Blättern (Abbildung 33).

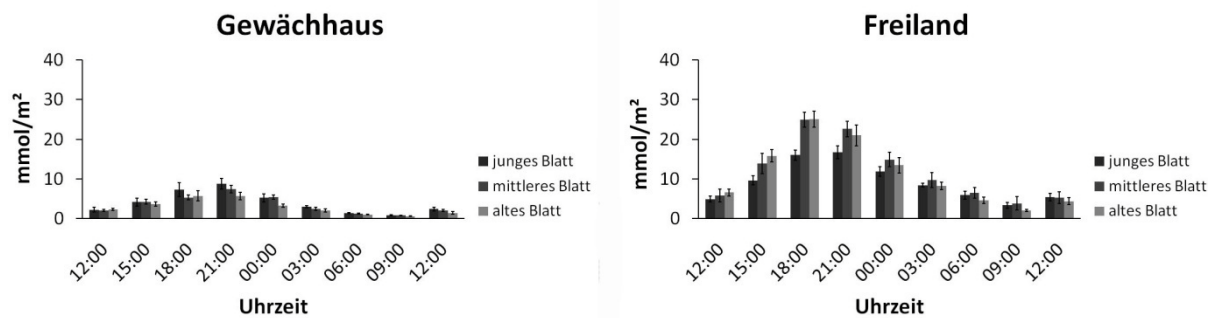


Abbildung 33: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebaute drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.

Der Stärkegehalt in Blättern von drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurde von allen drei Blattstufen analysiert. Die Probennahme erfolgte alle drei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Blattstärke (mmol Hexose/m²) wurden je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Dunkelfase im Gewächshaus: 21:00-06:00 Uhr; Lichtphase im Freiland: 05:20-21:50 Uhr; Dunkelfase im Freiland: 21:50-05:20 Uhr.

Die fünf Monate alten Freilandrübenpflanzen synthetisierten weniger Stärke als die zwei bzw. drei Monate alten Pflanzen. Generell wurde tagsüber in den Freilandrübenpflanzen mehr Stärke als in den Gewächshausrübenpflanzen synthetisiert, und es war auch am Ende der Nacht mehr Stärke in den Blättern vorhanden mit bis zu 30% (Abbildung 34).

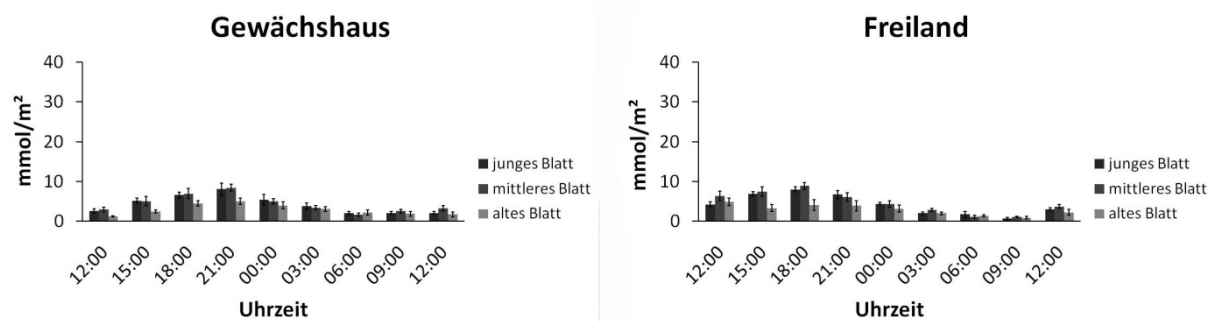


Abbildung 34: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebaute fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.

Der Stärkegehalt in Blättern von fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurde von allen drei Blattstufen analysiert. Die Probennahme erfolgte alle drei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Blattstärke (mmol Hexose/m²) wurden je n= 5 Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Dunkelfase im Gewächshaus: 21:00-06:00 Uhr; Lichtphase im Freiland: 06:51-20:08 Uhr; Dunkelfase im Freiland: 20:08-06:52 Uhr.

Der Stärkegehalt in Zuckerrübenblättern zeigte in den 24-Stunden-Analysen deutlich einen diurnalen Rhythmus, daher war es wichtig zu untersuchen, ob es einen solchen Verlauf auch bei den löslichen Zuckern in den Zuckerrübenblättern gab. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls die zusätzlich ausgesäten Pflanzen der Sorte *Beta vulgaris* Lukas im Freiland und Gewächshaus von Mitte April

2013 verwendet. Der Zuckergehalte wurden von allen drei Blattstufen der zwei, drei und fünf Monate alten Pflanzen analysiert.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37) sind die Zuckergehalte der Blattstufe 2 stellvertretend für die anderen beiden Blattstufen (siehe Anhang) dargestellt. Auffällig ist hier, dass der Zuckergehalt in den Blättern der im Freiland angezogenen Rübenpflanzen deutlich höher war als bei den im Gewächshaus angezogenen, und dies unabhängig vom Pflanzenalter. Es ließ sich kein diurnaler Rhythmus bei den verschiedenen Zuckern erkennen. Die Zuckergehalte der im Gewächshaus angezogenen Pflanzen unterlagen kaum Schwankungen, wobei die im Freiland angezogenen Zuckerrübenpflanzen leichte Schwankungen im Glukose und Fruktosegehalt der Blätter zeigten. Auffällig bei den Blattzuckern war, dass der Gehalt in den im Gewächshaus angezogenen Pflanzen im Vergleich zu den im Freiland angezogenen Pflanzen sehr gering war. Bei den im Freiland angezogenen Pflanzen nahm mit zunehmendem Alter der Gehalt an Zuckern im Blatt ab, wobei im Gewächshaus eine leichte Zunahme zu verzeichnen war.

Die zwei Monate alten Zuckerrüben aus dem Freiland hatten einen Glukosegehalt von 8 bis 14 mmol/m², was im Vergleich zu den im Gewächshaus angezogenen Pflanzen fast dem 10-fachen Gehalt entsprach. Der Glukosegehalt blieb von 12:00 Uhr mittags bis 21:00 Uhr bei 14 mmol/m² fast konstant und fiel mit Beginn der Dunkelheit leicht auf 8 mmol/m² ab. Beim Fruktosegehalt war der Unterschied zwischen den Freiland und den Gewächshausrüben noch höher. Die im Freiland angezogenen Pflanzen hatten einen durchschnittlichen Fruktosegehalt von 15-20 mmol/m² und somit den höchsten Gehalt an löslichen Zuckern im Blatt im Vergleich zu den Gewächshausrüben, wobei auch hier von mittags bis zum Einsetzen der Dunkelheit der Fruktosegehalt im Blatt fast konstant blieb und anschließend mit Beginn der Dunkelheit leicht abfiel. Dies war auch beim Saccharosegehalt zu beobachten. Dieser war jedoch mit 1-2 mmol/m² im Vergleich zum Glukose- und Fruktosegehalt sehr gering. Vergleicht man die löslichen Zucker der im Freiland angebauten Rüben mit denen aus dem Gewächshaus, so zeigt sich, dass die Gehalte in den Freilandrüben deutlich erhöht waren (Abbildung 35).

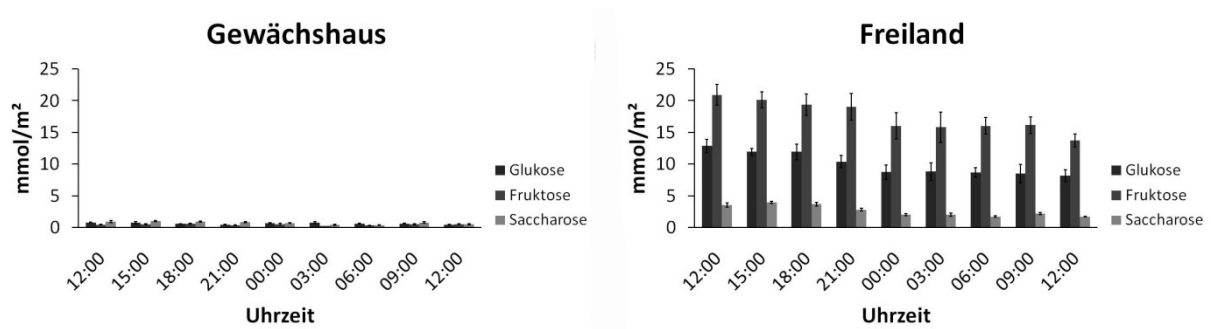


Abbildung 35: Blattzuckergerhalt der im Gewächshaus und Freiland angebaute zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.

Die Zuckergehalte in Blättern der Stufe 2 (mittelalte Blätter) von zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurden analysiert. Die Probennahme erfolgte alle drei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Blattzucker (mmol/m^2) wurden je $n=5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Dunkelphase im Gewächshaus: 21:00-06:00 Uhr; Lichtphase im Freiland: 05:26-21:32 Uhr; Dunkelphase im Freiland: 21:32-05:25 Uhr.

Auch bei den drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen zeigte sich, dass die im Freiland angebaute Pflanzen einen deutlich höheren Gehalt an löslichen Zuckern im Blatt im Vergleich zu den im Gewächshaus aufwiesen. In den drei Monate alten Pflanzen war der Unterschied nicht mehr ganz so groß wie bei den zwei Monate alten Pflanzen. Der Glukosegehalt der Freilandrüben war um 12:00 Uhr mittags am geringsten, stieg im Laufe des Tages an und erreichte 3:00 Uhr nachts mit rund $16 \text{ mmol}/\text{m}^2$ den höchsten Wert. Der Saccharosegehalt war dazu gegenläufig. Um 15:00 Uhr nachmittags war der Saccharosegehalt mit etwa $6 \text{ mmol}/\text{m}^2$ am höchsten und fiel dann bis auf $1 \text{ mmol}/\text{m}^2$ ab. Auffällig war auch hier, dass im Gewächshaus angezogene Pflanzen geringere Zuckergehalte in den Blättern im Vergleich zu den aus dem Freiland aufwiesen und dass hier der Saccharosegehalt in den Blättern im Vergleich zum Glukose- und Fruktosegehalt erhöht war (Abbildung 36).

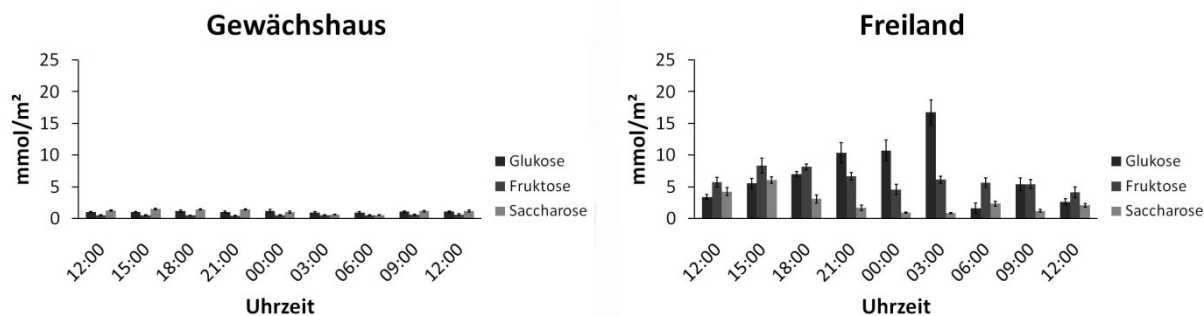


Abbildung 36: Blattzuckergerhalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.

Die Zuckergehalte in Blättern der Stufe 2 (mittelalte Blätter) von drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurden analysiert. Die Probennahme erfolgte alle drei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Blattzucker (mmol/m^2) wurden je $n=5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Dunkelphase im Gewächshaus: 21:00-06:00 Uhr; Lichtphase im Freiland: 05:20-21:50 Uhr; Dunkelphase im Freiland: 21:50-05:20 Uhr.

Der Unterschied zwischen den fünf Monate alten und den zwei bzw. drei Monate alten Rüben war, dass der Saccharosegehalt im Vergleich zum Glukose- und Fruktosegehalt tagsüber erhöht war. Auffällig bei den fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen war, dass die Gehalte an löslichen Blattzuckern im Vergleich zu den zwei und drei Monate alten Pflanzen wesentlich geringer waren, wobei die Blattzucker in den Freilandpflanzen im Vergleich zu den Gewächspflanzen immer leicht erhöht waren (Abbildung 37).

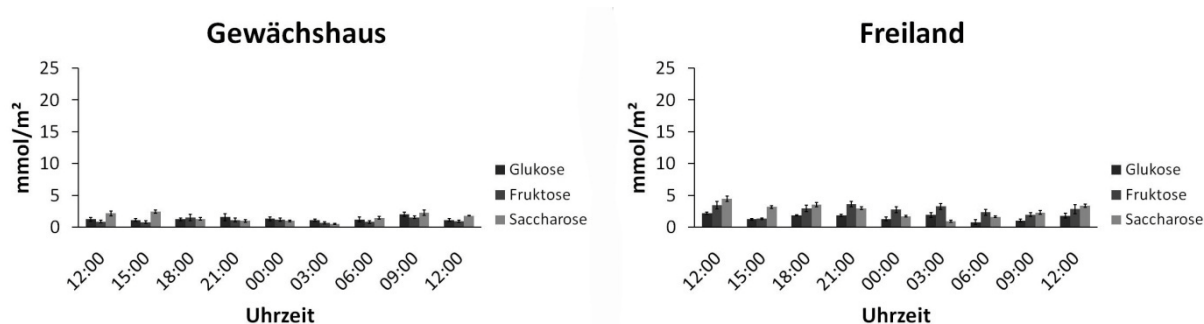


Abbildung 37: Blattzuckergerhalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.

Die Zuckergehalte in Blättern der Stufe 2 (mittelalte Blätter) von fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen wurden analysiert. Die Probennahme erfolgte alle drei Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Blattzucker (mmol/m^2) wurden je $n=5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr; Dunkelphase im Gewächshaus: 21:00-06:00 Uhr; Lichtphase im Freiland: 06:51-20:08 Uhr; Dunkelphase im Freiland: 20:08-06:52 Uhr.

3.1.3.3 Umgebungs- und zeitabhängige Entwicklung der unterirdischen Pflanzenteile

Um Unterschiede der Rübenkörper zwischen Gewächshausanzucht und Feldanzucht aufzeigen zu können, wurde diese ebenfalls untersucht (s. Abbildung 38). Nach zweimonatiger Anzucht zeigten beide Rübensorten aus dem Gewächshaus keine deutlichen Unterschiede im Rübengewicht im Vergleich zu den Freilandrüben. Nach fünfmonatiger Anzucht wurde auch hier deutlich, dass die Freilandrüben bis zu doppelt so viel Rübenmaterial aufbauten. Hier zeigte sich, dass die Hochleistungssorte 7N nach fünfmonatiger Anzucht im Freiland den doppelten Ertrag im Vergleich zu der Transformationslinie 8K brachte.

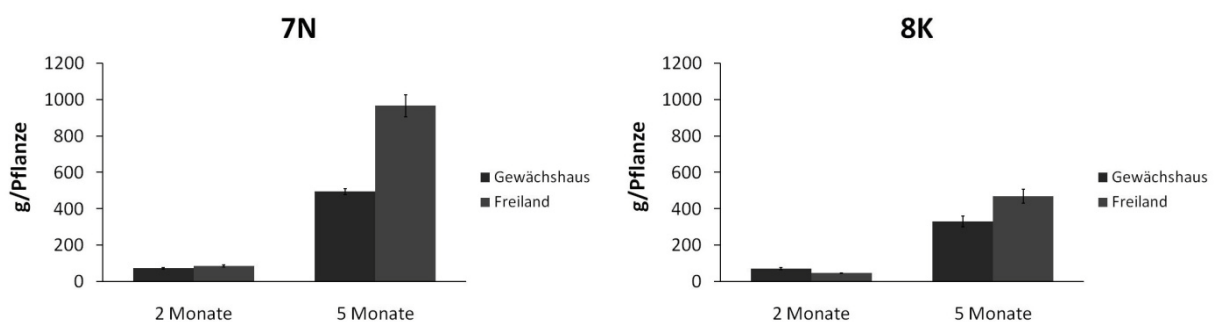


Abbildung 38: Rübengewicht der im Gewächshaus und im Freiland angebaute zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung des Rübenpfahlwurzelgewichts wurden je n= 30 (Gewächshaus) bzw. n= 50 (Freiland) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Zur Vervollständigung der Charakterisierung der Rüben wurden ebenfalls die Rübenpfahlwurzellängen (Rübenlängen) bestimmt. Auch bei diesem Parameter zeigten die zwei Monate alten Rüben aus dem Gewächshaus keine Unterschiede in der Rübenlänge im Vergleich zu den Freilandrüben (s. Abbildung 39). Nach fünfmonatiger Anzucht beider Sorten wurde deutlich, dass die Freilandrüben bis zu doppelt so lang waren wie die Gewächshausrüben, wobei auch hier die Hochleistungssorte 7N gegenüber der Transformationslinie 8K ein verstärktes Längenwachstum aufwies.

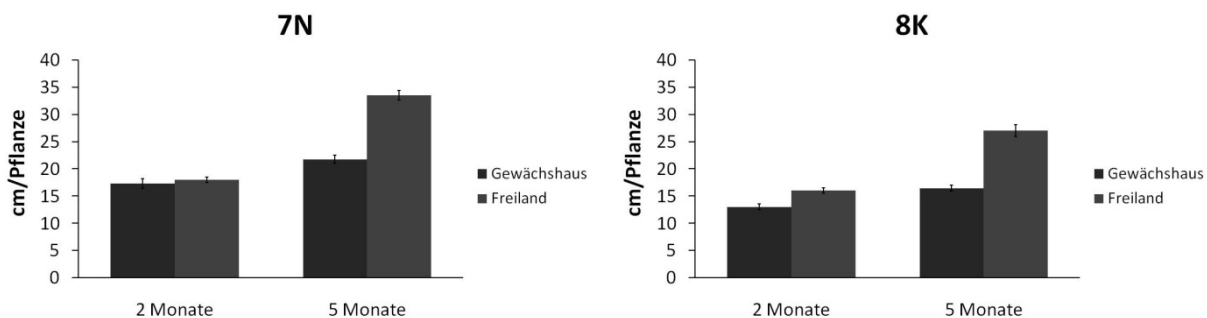


Abbildung 39: Rübenpfahlwurzellänge der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung der Rübenpfahlwurzellänge wurden je n= 30 (Gewächshaus) bzw. n= 50 (Freiland) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Neben der Länge wurde auch der Umfang der Rüben untersucht. Wie bei den anderen untersuchten morphologischen Charakteristika ist auch hier der Vorteil der Hochleistungsrübensorte 7N deutlich zu erkennen. Während die zwei Monate alten Rüben keinen Unterschied im Rübenumfang zwischen Gewächshausanzucht und Freilandanzucht zeigten, wurde der Unterschied nach fünf Monaten deutlich. Die Freilandrüben zeigten einen bis zu 20% größeren Umfang (s. Abbildung 40), vor allem bei der Sorte 7N wurde dieser Trend deutlich. Die Freilandrüben hatten einen durchschnittlichen Rübenumfang von 40 cm, wobei der Umfang der Gewächshausrüben im Vergleich mit den Freilandrüben mit 30 cm rund 25% geringer war.

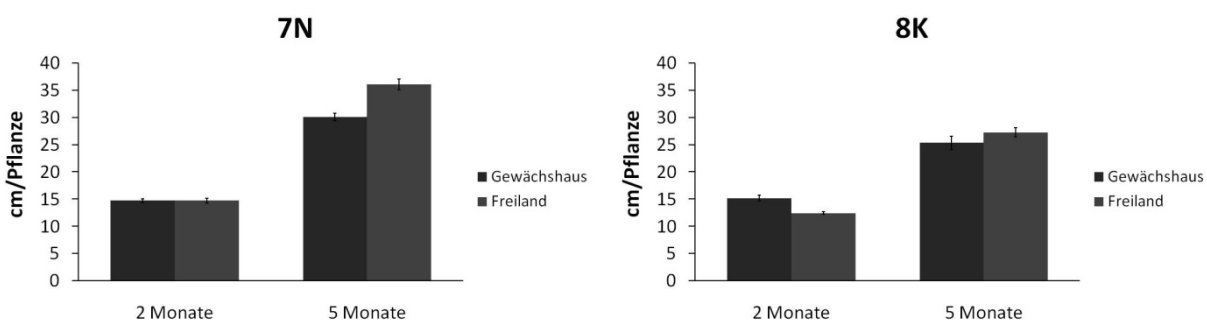


Abbildung 40: Rübenpfahlwurzelumfang der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung des Rübenpfahlwurzelumfangs wurden je n= 30 (Gewächshaus) bzw. n= 50 (Freiland) Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

3.1.3.4 Umgebungs- und zeitabhängiger Zuckergehalt in Pfahlwurzeln von Zuckerrübenpflanzen

Neben der unterschiedlichen Morphologie der Zuckerrübenpflanzen im Gewächshaus und im Freiland, war es von besonderem Interesse, den Zuckergehalt in den Rüben zu untersuchen.

Nach zweimonatiger Anzucht hatten die im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen einen um 50% geringeren Zuckergehalt im Vergleich zu den im Freiland angebauten Pflanzen. Dieser Unterschied zeigte sich bei beiden Sorten, bei der Hochleistungszuckerrübensorte 7N war dieser Unterschied deutlich ausgeprägter als bei der Transformationslinie 8K. Nach fünfmonatiger Anzucht der Zuckerrübenpflanzen war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. Die im Gewächshaus angezogenen Pflanzen hatten den gleichen Saccharosegehalt wie die im Freiland angezogenen Pflanzen. Hier zeigte sich, dass die Hochleistungssorte einen höheren Saccharosegehalt im Vergleich zur Transformationslinie 8K aufwies.

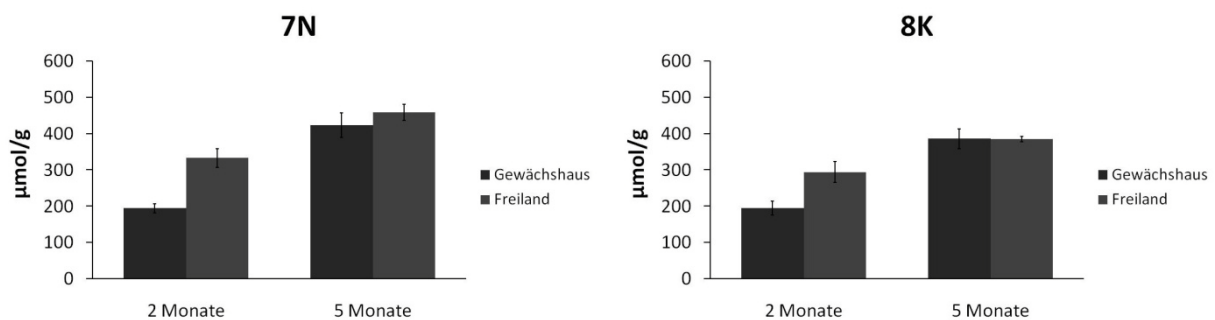


Abbildung 41: Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.

Zur Bestimmung des Rübenzuckers (in μmol Saccharose pro g Frischgewicht) wurden je $n = 5$ Zuckerrübenpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Beide Sorten wurden im Gewächshaus und im Freiland zur gleichen Zeit ausgesät und angezogen. Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

3.1.3.5 Orts- und Wachstumsphasen-vergleichende Transkriptanalysen von *Beta vulgaris* (Zuckerrübe)

Es sollten Transkriptmengen von verschiedenen Genen in zwei verschiedenen Wachstumsphasen mittels Micro-Array-Analysen untersucht werden. Zum einen sollten die Transkriptmengen verschiedener Gene vor der Zuckerspeicherphase und zum anderen während der Zuckerspeicherphase analysiert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Genexpression zwischen Gewächshausrüben und Feldrüben gibt. Zu diesem Zweck wurden Zuckerrüben im Gewächshaus und im Feld angebaut und nach zwei Monaten bzw. nach fünf Monaten Anzucht geerntet. Zusätzlich wurden Blattproben um 15:00 Uhr und 23:00 Uhr einen Tag zuvor genommen, um die Expression während der Lichtphase mit der Dunkelphase zu vergleichen. Es

wurde die RNA von den verschiedenen Proben der Hochleistungssorte 7N_1920 (7N) isoliert (s. 2.5.3) und die Konzentration bestimmt (s. 2.5.4). Die Hybridisierung der Proben wurde von der Firma SourceBioscience durchgeführt. Die Expressionen wurden folgendermaßen verglichen:

- 1) 2M Rübe Tag vs. 5M Rübe Tag GWH
- 2) 2M Rübe Tag vs. 5M Rübe Tag Freiland
- 3) 2M Rübe Tag vs. 5M Rübe Tag GWH/Freiland
- 4) 2M Rübe Tag vs. 5M Rübe Tag GWH
- 5) 2M Rübe Tag vs. 5M Rübe Tag Freiland
- 6) 2M Rübe Tag vs. 5M Rübe Tag GWH/Freiland
- 7) 5M Rübe Tag vs. Blatt Tag GWH
- 8) 5M Rübe Tag vs. Blatt Tag Freiland
- 9) 5M Rübe Tag vs. Blatt Tag GWH/Freiland
- 10) 5M Rübe Nacht vs. Blatt Nacht GWH
- 11) 5M Rübe Nacht vs. Blatt Nacht Freiland
- 12) 5M Rübe Nacht vs. Blatt Nacht GWH/Freiland
- 13) Blatt Tag vs. Blatt Nacht GWH
- 14) Blatt Tag vs. Blatt Nacht Freiland
- 15) Blatt Tag vs. Blatt Nacht GWH/Freiland
- 16) 5M Rübe GWH vs. 5M Rübe Freiland Tag
- 17) 5M Rübe GWH vs. 5M Rübe Freiland Nacht
- 18) 2M Rübe GWH vs. 2M Rübe Freiland (Tag)

3.1.3.5.1 Expressions- und phylogenetische Analyse von Phosphattranslokator Homologen

Es wurden Analysen zu den Phosphattranslokator Homologen in *Beta vulgaris* durchgeführt. Hierzu wurden die Sequenzen der verschiedenen Gene aus *Arabidopsis thaliana* auf Proteinebene dazu verwendet, diese mit dem Genom von Zuckerrüben mit Hilfe der Datenbank der Firma KWS abzugleichen. Es wurden 19 Homologe zu den Phosphattranslokator Proteinen gefunden. Die phylogenetische Analyse in Abbildung 42 verdeutlicht die Homologie der Proteine von *Beta vulgaris* zu denen von *Arabidopsis thaliana*. Es konnten eindeutig vier Contigs als Glukose-6-phosphat/Phosphat Translokator (GPT) zugeordnet werden. Von diesen waren drei in Blättern im Vergleich zur Rübe hochreguliert (Nr. 1, 3 und 9 je etwa 1,7-fach im Gewächshaus, im Freiland war Nr. 3 10-fach und Nr. 9 13-fach erhöht).

Neben dem Import über den GPT kann Kohlenstoff auch mittels PPTs in Plastiden transportiert werden, um im Gewebe z.B. Fettsäuren zu synthetisieren. In Blättern wird der PPT beispielsweise benötigt, um eine Vorstufe Phosphoenolpyruvat (PEP) für den Shikimatweg über den aromatische Aminosäuren synthetisiert werden, aus dem Cytosol zu importieren. Es konnten fünf Homologe dem Phosphoenolpyruvat/Phosphat Translokator (PPT) zugewiesen werden. Von diesen fünf waren drei dem PPT1 ähnlicher als dem PPT2, allerdings wiesen nur zwei eine veränderte Expression auf. Diese beiden waren in Blättern 1,5-fach (Contig Nr.10) und 170-fach (Nr.12) stärker als in Rüben exprimiert. Beide waren auch am Tag mit 1,5-fach (Nr.10) und 10,6-fach (Nr.12) stärker als in der Nacht im Blatt

exprimiert. Zusätzlich war Contig Nr. 10 in älteren Rüben 1,4-fach stärker als in jungen exprimiert. Des Weiteren wurden vier Contigs dem Triosephosphat/Phosphat Translokator (TPT) zugewiesen. Von diesen vier waren zwei unterschiedlich reguliert, wobei Contig Nr. 17 mit 20,4-fach und Contig Nr.18 mit 23,7-fach in Blättern stärker als in Rüben exprimiert war. Zudem waren diese ebenfalls in jungen Rüben 2,8-fach (Nr. 17) und 4,1-fach (Nr.18) stärker im Vergleich zu fünf Monate alten Rüben exprimiert.

Dem Xylulose-5-Phosphat/Phosphat Translokator (XPT) konnte ein Contig aus Zuckerrübe zugewiesen werden. Das XPT Homolog (Contig Nr. 15) war ebenfalls mit 4,9-fach in Blättern stärker als in Rüben exprimiert, darüber hinaus war die Expression in Blättern stärker am Tag (3,6-fach) als bei Nacht. In fünf Monate alten Rüben war der XPT ebenfalls im Vergleich mit den jungen Rüben 2,3-fach stärker exprimiert. Über den XPT findet der Austausch von Pentosephosphaten zwischen dem Cytosol und den Chloroplasten statt. Im Rahmen der Pentosephosphatwege werden in den Chloroplasten Pentosephosphate z.B. für die Nukleinsäuresynthese hergestellt, die auch in Mitochondrien und im Zellkern benötigt werden. Zwei der fünf nicht genau zuzuordnenden Homologen (Nr. 5 und Nr. 7) waren in Rüben stärker als in Blättern exprimiert (3,5- bzw. 2-fach) und stellen damit die einzigen Phosphattranslokatoren dar, die in Pfahlwurzeln stärker als in Blättern exprimiert waren.

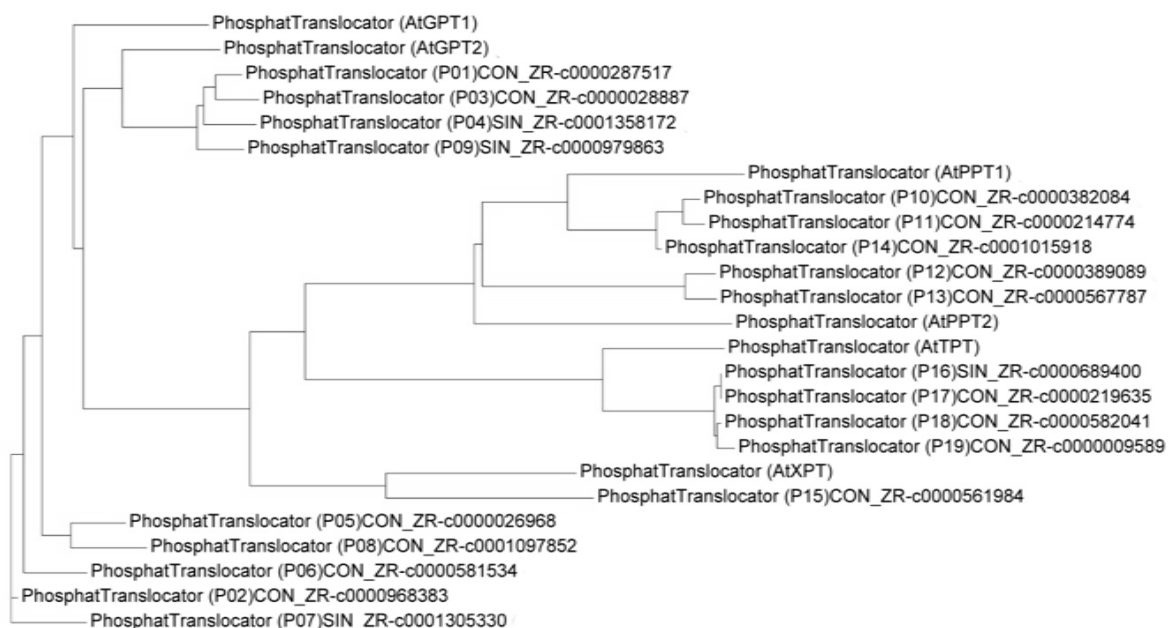


Abbildung 42: Phylogenetische Analyse von Phosphattranslokator Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) im Vergleich mit Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*.

3.1.3.5.2 Expressions- und phylogenetische Analyse von SUC/SUT Homologen

Neben den bereits analysierten Phosphattranslokatoren wurden Analysen zu den Saccharose Transporter (SUT/SUC) Homologen durchgeführt. Die SUCs gehören mit zu den wichtigsten Transportern, die am Saccharosetransport beteiligt sind (Doidy *et al.*, 2012). Daher wurden die Sequenzen der SUC Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* auf Proteinebene verwendet und mit dem Genom von Zuckerrüben mit Hilfe der Datenbank der Firma KWS abgeglichen. Es wurden 15 Homologe zu den SUC Proteinen gefunden. Die phylogenetische Analyse in Abbildung 43 verdeutlicht die Homologie der SUC Proteinen von *Beta vulgaris* zu denen von *Arabidopsis thaliana*.

Bei den Transkriptanalysen wurden einerseits Blätter und Rüben und andererseits junge (2 Monate) vor der Zuckerspeicherphase und fünf Monate alte Rüben während der Zuckerspeicherphase miteinander verglichen. Von den 15 SUC ähnlichen Genen zeigten fünf Gene eine veränderte Expression. Wie dem phylogenetischen Baum zu entnehmen ist, handelt es sich dabei um zwei Contigs (Nr. 1 und 2), die dem SUC3 Homologen aus *Arabidopsis thaliana* zuzuordnen waren. Deren Expression war in alten gegenüber jungen Rüben um 1,5- bzw. 2,2-fach und in Rüben gegenüber Blättern 1,7- bzw. 1,6-fach erhöht. Weiterhin war ein SUC4 Homolog zu finden (Nr. 4), welcher in fünf Monate alten Rüben mit 2,2-fach leicht und in Rüben gegenüber Blättern mit 4,5-fach erhöht war. Die anderen beiden in der Expression veränderten SUC/SUT Homologen gehörten der SUC1/2 Homologen an (Nr. 9 und 3). Mit einer 10,7-fach erhöhten Expression der Homologen in Blättern gegenüber der Expression in Rüben zeigten diese die stärkste Veränderung der untersuchten SUC-Homologen. Dessen Expression war gleichzeitig in jungen gegenüber alten Rüben 4,4-fach erhöht.

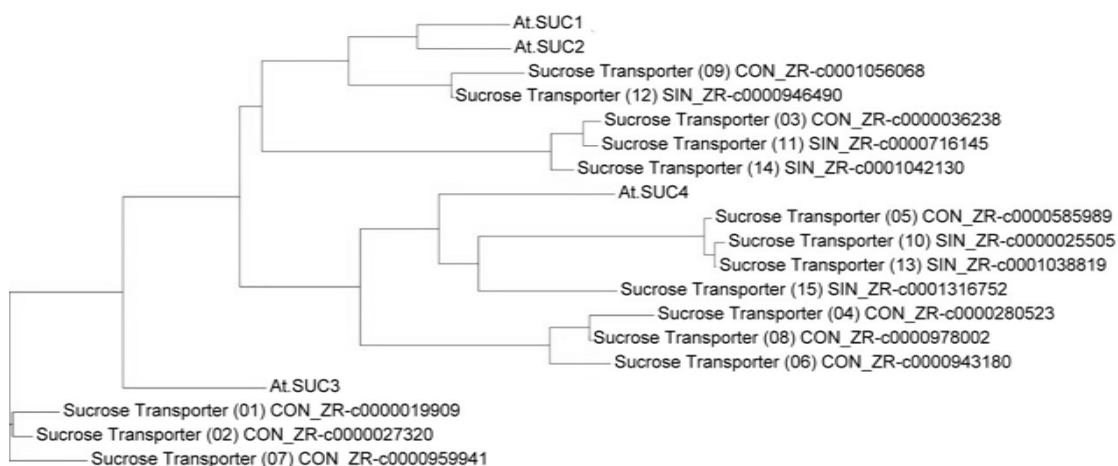


Abbildung 43: Phylogenetische Analyse von SUC/SUT Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) im Vergleich mit SUC-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*.

3.1.3.5.3 Expressions- und phylogenetische Analyse von Saccharose Synthase Homologen

Saccharose ist der wichtigste Transportzucker. Saccharose kann durch die Saccharose-Synthase (SuSy) unter Aufnahme von Uridindiphosphat (UDP) in UDP-Glukose und Fruktose gespalten werden. Bei der Einlagerung von Saccharose ist die Frage, ob die in die Rübenpfehlwurzel transportierte Saccharose erst abgebaut und in weiteren Verlauf resynthetisiert wird oder direkt in die Vakuolen eingelagert wird. Daher war es ebenfalls interessant, die Expression der Susy zu analysieren, um gegebenenfalls Expressionsunterschiede in jungen bzw. alten Zuckerrübenpflanzen aufzuzeigen. Hierzu wurden ebenfalls die Sequenzen der SuSy Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* auf Proteinebene verwendet und ebenfalls mit dem Genom von Zuckerrüben mit Hilfe der Datenbank der Firma KWS abgeglichen. Es wurden 28 Homologe zu den Saccharose Synthase Proteinen gefunden (Abbildung 44), wobei sich nur zwei Homologe in ihrer Expression zwischen Blatt und Rübe unterschieden. Diese waren mit 18,8-fach (Contig Nr. 1) und 20,5-fach (Contig Nr. 8) deutlich erhöht im Blatt. Zudem wiesen beide Contigs mit 1,3-fach (Nr.1) und 1,2-fach (Nr.8) eine leicht erhöhte Expression in den zwei Monate alten Rüben gegenüber den fünf Monate alten Rüben auf. Darüber hinaus war auch die Expression in den Blättern am Tag im Vergleich zur Nacht mit 1,5-fach (Nr.1) und 1,2-fach (Nr.8) ebenfalls leicht erhöht. Die anderen 26 Susy Homologen zeigten in diesen Analysen keine Expressionsänderungen.

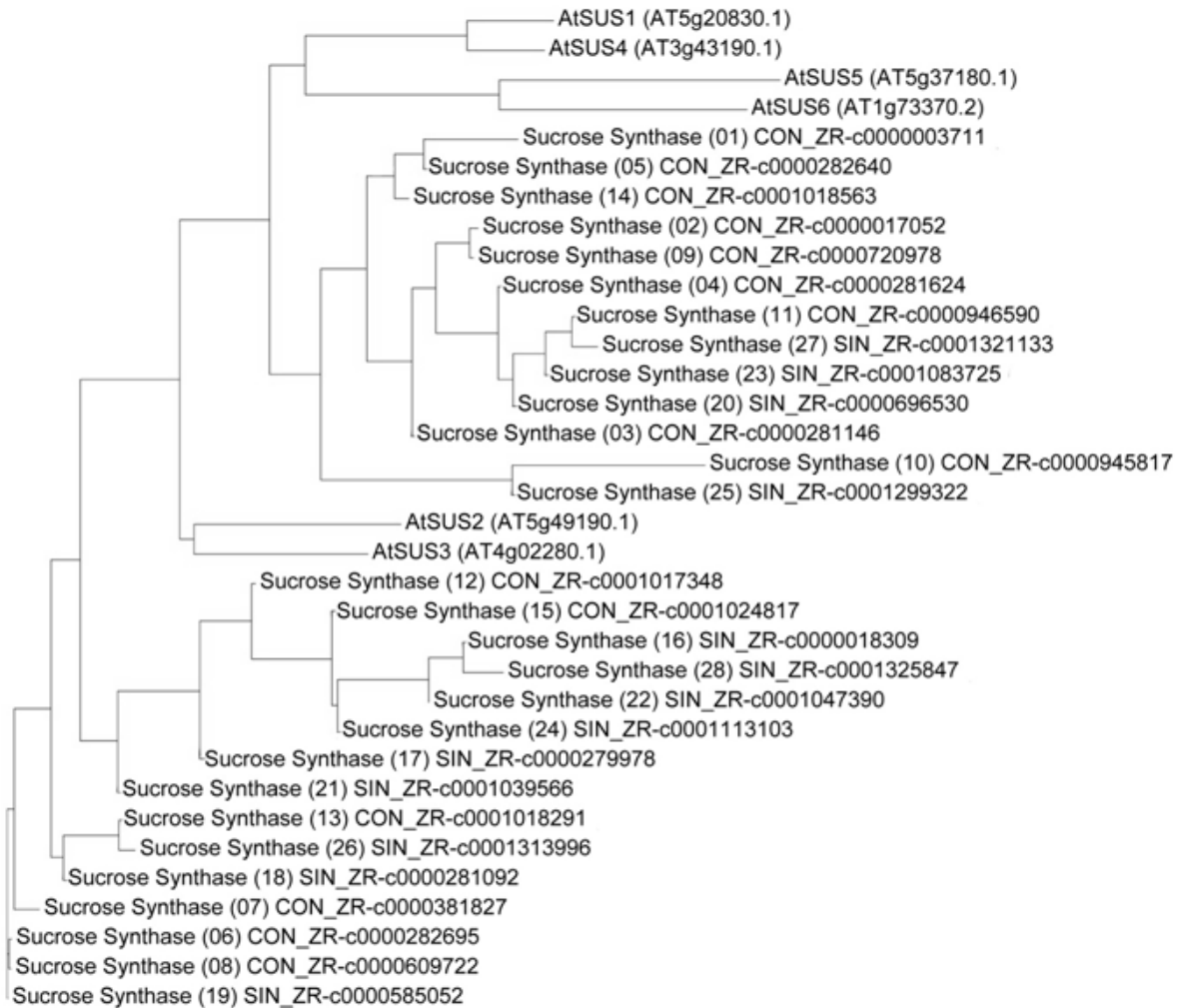


Abbildung 44: Phylogenetische Analyse von Saccharose Synthase Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) im Vergleich mit Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*.

3.1.3.5.4 Expressions- und phylogenetische Analyse von SWEET Homologen

SWEET16 und SWEET17 aus *Arabidopsis thaliana* wurden als tonoplastidäre Proteine beschrieben (Chardon *et al.*, 2013, W Patrick *et al.*, 2013), welche die Diffusion von Fruktose bzw. Glukose aus der Vakuole von *Arabidopsis* erleichtern. Daher wurde die Expression von vorhandenen SWEET Homologen in Zuckerrübe sehr von Bedeutung. Es erschien sinnvoll, deshalb ebenfalls Analysen zu den SWEET Homologen in *Beta vulgaris* durchzuführen. Hierzu wurden die Sequenzen der verschiedenen Gene aus *Arabidopsis thaliana* auf Proteinebene verwendet und mit dem Genom von Zuckerrübe mit Hilfe der Datenbank der Firma KWS abgeglichen. Es wurden 15 Homologe zu den SWEET Proteinen gefunden. Die phylogenetische Analyse in Abbildung 45 verdeutlicht auch hier die Homologie der Proteine von *Beta vulgaris* zu denen von *Arabidopsis thaliana*.

Bei den Transkriptanalysen wurden einerseits Blätter und Rüben und andererseits junge (zwei Monate) Rüben vor der Zuckerspeicherphase und fünf Monate alte Rüben während der

Zuckerspeicherphase miteinander verglichen. Von den 15 SWEET-ähnlichen Genen zeigten fünf Gene eine veränderte Expression. Wie dem phylogenetischen Baum zu entnehmen ist, handelt es sich dabei um zwei Contigs (Nr. 1 und 2), die dem SWEET1 Homologen aus *Arabidopsis thaliana* zuzuordnen waren. Deren Expression waren in alten gegenüber jungen Rüben um 8,6-fach erniedrigt, und in Rüben gegenüber Blättern war Contig Nr. 1 um 1,9-fach erhöht. Weiterhin war ein SWEET6/7 Homolog zu finden (Nr. 6), das in fünf Monate alten Rüben 6,6-fach niedriger exprimiert war. Ein weiteres in der Expression verändertes SWEET Gen gehörte den SWEET9 Homologen an (Nr. 10). Dessen Expression war in alten gegenüber jungen Rüben um 2,0-fach erhöht und in Rüben gegenüber Blättern um 1,6-fach erniedrigt. Ein SWEET16/17 ähnliches Gen (Contig Nr.13) zeigte mit einer 35-fach höheren Expression in Blättern gegenüber der Expression in Rüben die stärkste Veränderung der untersuchten SWEET Homologen.

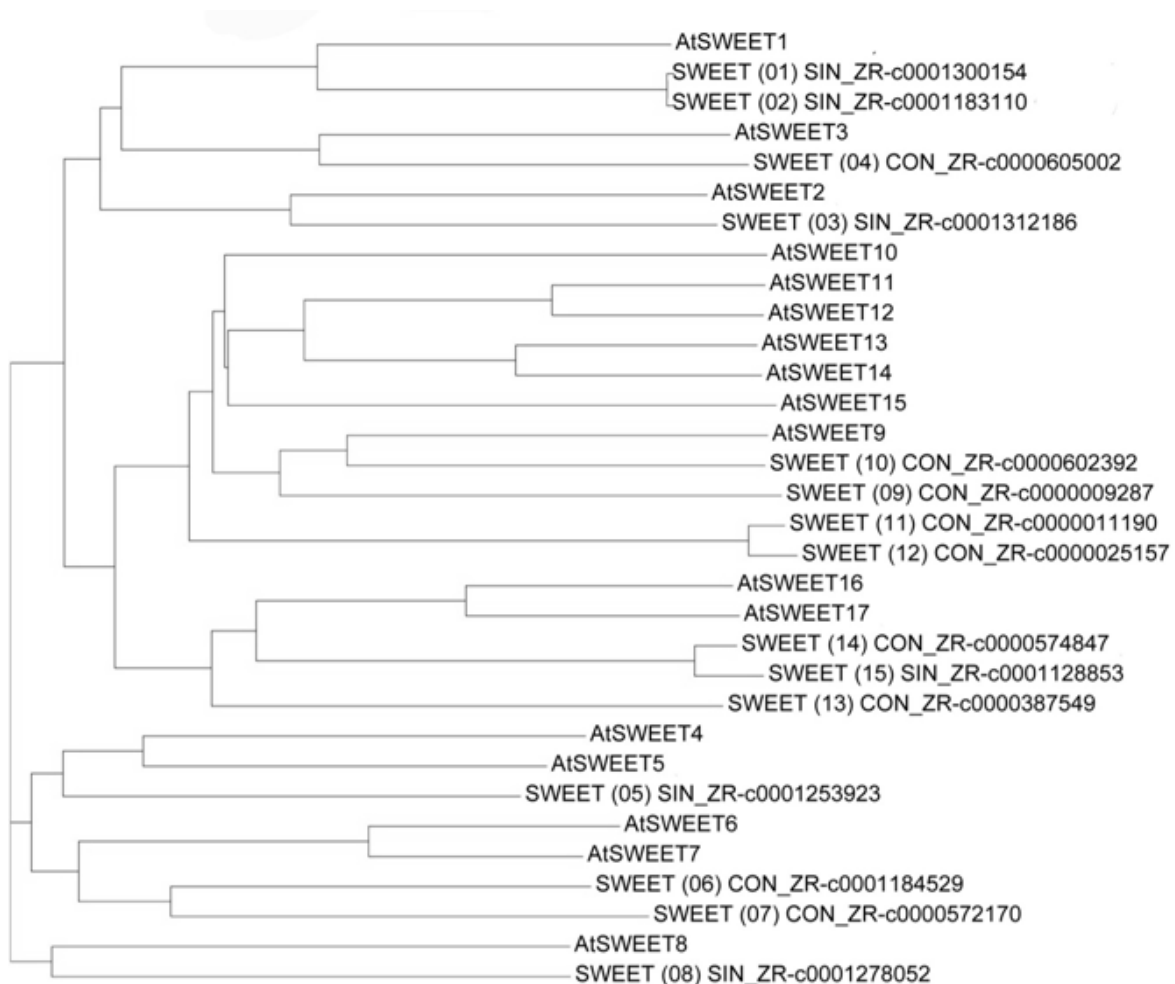


Abbildung 45: Phylogenetische Analyse von Sweet Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) im Vergleich mit Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*.

3.1.3.5.5 Expressions- und phylogenetische Analyse von tonoplastidären Monosaccharid Transporter Homologen

Die Aufnahme von Saccharose in die Vakuole kann sowohl energieunabhängig entlang des Konzentrationsgradienten oder energieabhängig gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen, wie z.B. durch einen Protonen-gekoppelten Transport. Welcher der beiden Mechanismen bevorzugt wird, hängt vom Gewebe ab. Einige Proteine, die den Zucker-Transport über den Tonoplasten vermitteln oder zumindest hierfür postuliert werden, sind in Arabidopsis bereits identifiziert worden. Der vakuoläre Import von Glukose und Fruktose in Arabidopsis erfolgt teilweise über die tonoplastidären Monosaccharid Transporter (TMT (Wormit *et al.*, 2006)).

In *Arabidopsis thaliana* sind drei TMTs bekannt. Beim Homologievergleich mit *Beta vulgaris* zeigte sich allerdings, dass hier vier TMTs existieren (Abbildung 46). Bei den Transkriptanalysen wurden auch hier einerseits Blätter und Rüben und andererseits junge (zwei Monate) Rüben vor der Zuckerspeicherphase und fünf Monate alte Rüben während der Zuckerspeicherphase miteinander verglichen. Von den vier TMT Homologen zeigten drei Gene eine veränderte Expression, wobei zwei TMT Homologe dem TMT2 aus Arabidopsis zugeordnet werden konnten. Diese waren mit 36-fach (Contig Nr. 2) und 10-fach (Contig Nr. 3) deutlich in der Rübe gegenüber dem Blatt erhöht. Zudem wiesen beide Contigs mit 1,7-fach (Nr.1) und 1,2-fach (Nr.3) eine leicht erhöhte Expression in den fünf Monate alten Rüben gegenüber den zwei Monate alten Rüben auf. Die Expression des TMT3 Homolog war in jungen gegenüber alten Rüben 1,4-fach erhöht und in Rüben gegenüber Blättern um 1,5-fach erhöht. Das TMT1 homologe Gen zeigte in keiner Analyse eine Expressionsänderung.

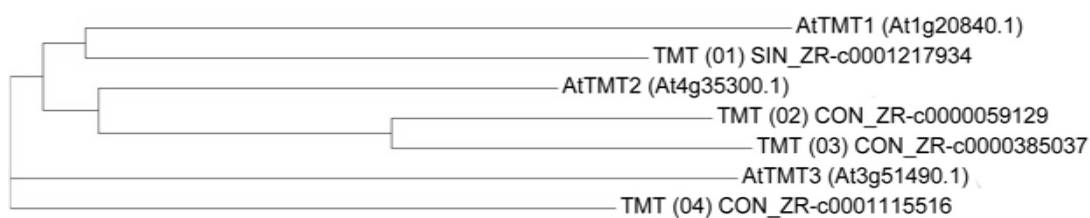


Abbildung 46: Phylogenetische Analyse von TMT Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) im Vergleich mit Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*.

3.1.4 Biotechnologische Ansätze zur Ertragsteigerung von *Beta vulgaris*

Es sollten zwei verschiedene biotechnologische Ansätze zur Ertragsteigerung von Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) untersucht werden. Zum einen sollte die *source*-Kapazität, zum anderen die *sink*-Kapazität in den Zuckerrübenpflanzen erhöht werden.

Die kleine, katalytische Untereinheit der Adenosindiphosphat-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus *Beta vulgaris* sollte blattspezifisch unter der Kontrolle des *Bv.C1*-Promotors (KWS) reprimiert werden. Dadurch sollte die *source*-Kapazität der Pflanzen erhöht werden, da der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese reduziert wird, was eine Erhöhung des Assimilatflusses in die Saccharosesynthese zur Folge haben könnte.

Der zweite Ansatz beruht auf die rübenspezifischen Überexpression des mitochondriale ADP/ATP-Transporter (AAC) aus *Arabidopsis thaliana*. Dies soll zur Erhöhung der *sink*-Kapazität führen, denn der AAC ist für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP im Cytosol wichtig. Die erhöhte ATP-Bereitstellung im Cytosol könnte zu Folge haben, dass mehr Saccharose in die Speichervakuole transportiert wird, da der Import der Saccharose in die Vakuole ATP-abhängig ist.

3.1.4.1 Biotechnologischer Ansatz zur Modifikation der *source*-Kapazität

Zur Umleitung der Assimilate in die Rübenpfahlwurzel wurde ein Teil der kodierenden Sequenz der katalytischen Untereinheit B der AGPase aus cDNA von *Beta vulgaris* Blattmaterial amplifiziert, mit *AvaI* und *EcoRI* verdaut und in antisense Richtung in den pC1-TL, welcher ebenfalls mit *AvaI* und *EcoRI* verdaut wurde, ligiert. Zusätzlich wurde aus dem pBINAR-Kan der 35S-Promotor mit *EcoRI* und *BamHI* herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde der blattspezifische C1-Promotor mit der AGPase antisense aus dem PC1-TL-Bv.AGPase mit *EcoRI* und *BamHI* herausgeschnitten, welches nun in den promotorlosen pBINAR-Kan ligiert wurde (s. Abbildung 47). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Transformation von Agrobakterien und die anschließende Transformation der Zuckerrübenpflanzen übernahm die Firma KWS.

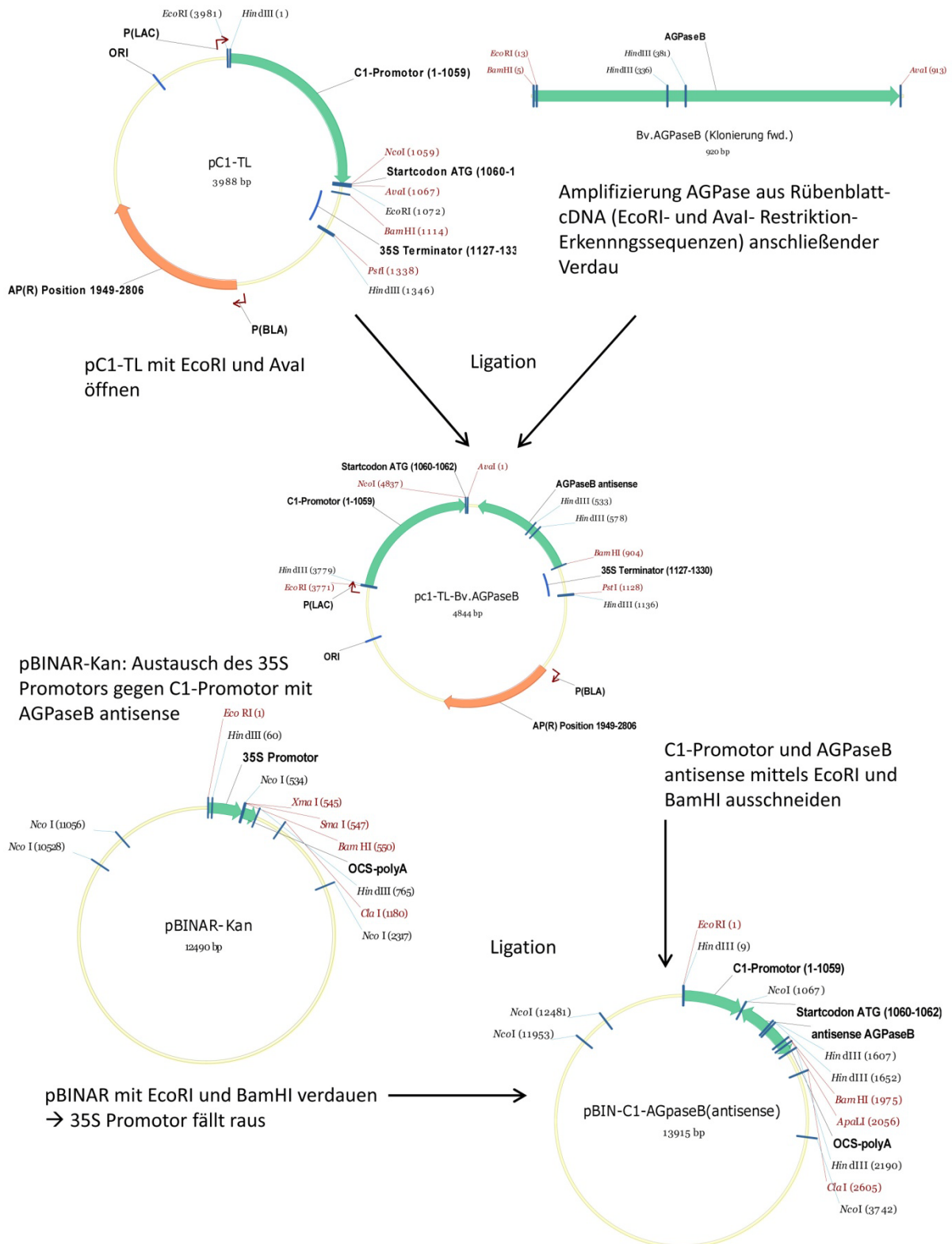


Abbildung 47: Klonierungsstrategie des blattspezifischen *AGPaseB* Antisense Konstrukts

3.1.4.2 Biotechnologischer Ansatz zur Modifikation der *sink*-Kapazität

Zur Erhöhung der *sink*-Kapazität in der Rübenpfahlwurzel wurde die Sequenz des mitochondrialen ADP/ATP-Transporter (AAC) aus cDNA von *Arabidopsis thaliana* Blattmaterial mit Hilfe von Primern mit den Restriktionserkennungssequenzen von *SmaI* und *BamHI* amplifiziert verwendet und anschließend verdaut (s. Abbildung 48). Zunächst wurde der binäre pBIN-2-1-48 Kan Vektor hergestellt. Zu diesem Zweck wurde der nicht benötigte 35S-Promotor aus dem pBINAR-Kan mittels Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *SmaI* herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde der p2-1-48-Promotor aus dem Vektor p2-1-48-GUS (KWS) mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden promotorspezifische Primer mit den Restriktionserkennungssequenzen *EcoRI* und *SmaI* verwendet. Anschließend wurde der p2-1-48-Promotor mit den Enzymen *EcoRI* und *SmaI* verdaut und in den promotorlosen pBINAR-Kan ligiert. Der so erstellte binäre Vektor wurde danach mit *SmaI* und *BamHI* geöffnet. Die Insertion des AtAAC1 Fragments in den Vektor ergab den Vektor p-2-1-48 Kan AtAAC1. Mit einer PCR mit genspezifischen Primern wurde die Richtung des Fragments bestimmt. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Transformation von Agrobakterien und die anschließende Transformation der Zuckerrübenpflanzen übernahm die Firma KWS.

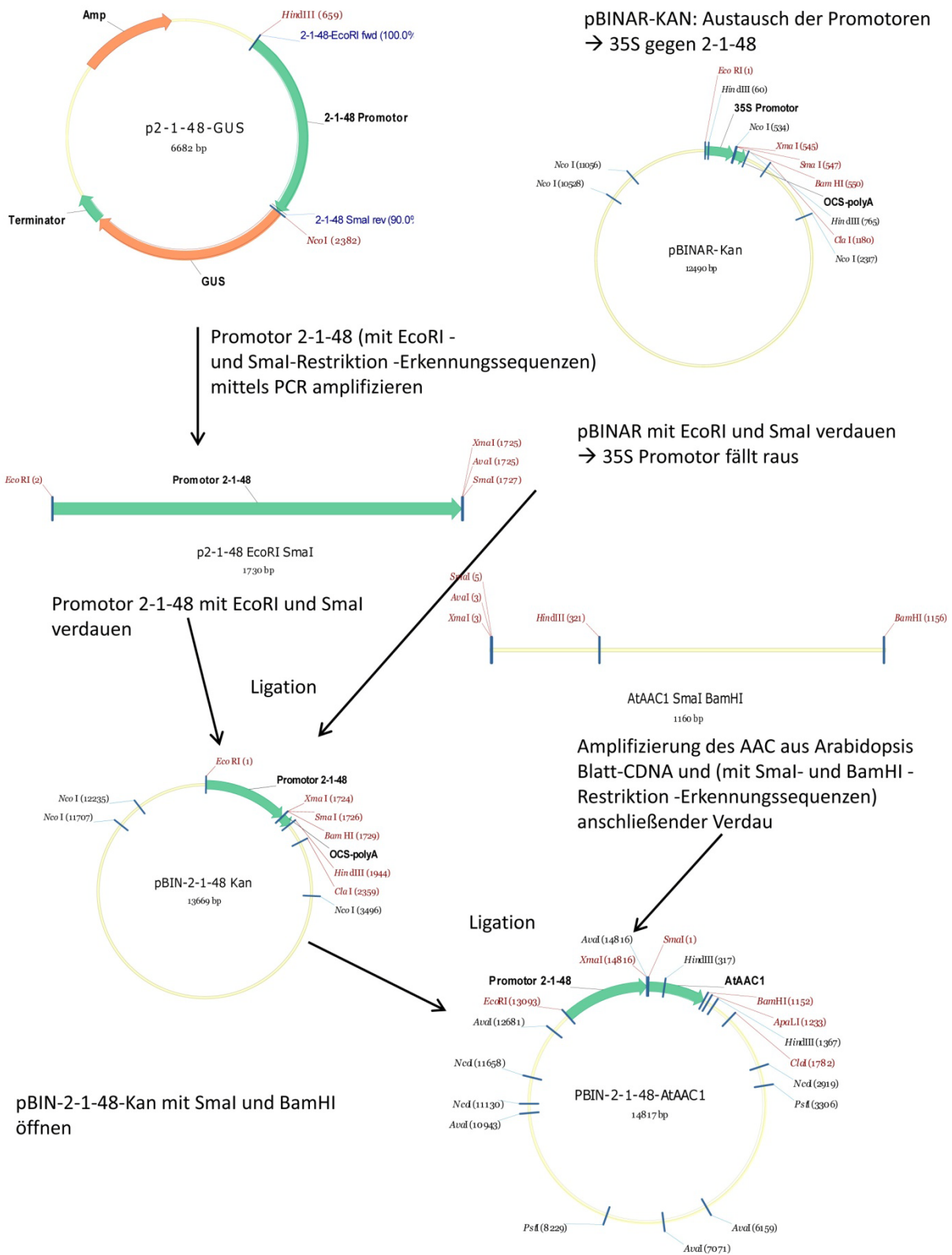


Abbildung 48: Klonierungsstrategie des pfahlwurzel-spezifischen AtAAC1 Konstrukts

3.2 Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanze *Solanum tuberosum* (Kartoffel)

Stärke ist ein wichtiger und universeller Rohstoff. Sie spielt nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie heutzutage eine bedeutende Rolle, sondern auch in der Futtermittel- und Papierindustrie sowie in der chemischen Industrie wächst stetig ihre Bedeutung. Aus Stärke werden Produkte wie z.B. Kleister, Kleb- und Schmierstoffe, Bau- und Kunststoffe hergestellt werden. Darüber hinaus dient die Stärke heutzutage auch zur Herstellung von biologisch abbaubare Biokunststoffen, auf deren Basis z.B. kompostierbare Tragetaschen hergestellt werden. In Kartoffeln ist Stärke die Speicherform von Kohlenhydraten und kann bis zu 80% des Knollentrockengewichts ausmachen (Kruger 1997). Eine Kartoffel, aus der Stärke gewonnen wird, soll vor allem einen hohen Anteil an Stärke haben, und ihre Qualität sowie Beschaffenheit soll optimal für die industrielle Verwendung sein. Daher ist die Gentechnik ein wichtiges Werkzeug, um den Stärkegehalt der Kartoffel gezielt zu manipulieren und den Bedürfnissen der Industrie gerecht zu werden (Biosicherheit, 2010).

3.2.1 Biotechnologischer Ansatz zur Manipulation der *sink*-Kapazität

In den Amyloplasten ist die Stärkesynthese vom Import von Energie und Kohlenstoffgrundgerüsten abhängig. Um die benötigte Energie und die Kohlenstoffgrundgerüste in den Amyloplasten bereitzustellen, ist der NTT, der die benötigte Energie (ATP) aus dem Cytosol in die Amyloplasten transportiert, und der GPT, für die Bereitstellung der Kohlenstoffgrundgerüste notwendig. Dabei spielen noch weitere Faktoren eine bedeutende Rolle. Zum Beispiel ist der mitochondriale ADP/ATP-Transporter (AAC) wichtig. Dieser stellt die Energie in Form von ATP im Cytosol bereit, welche dann für den Import über den NTT in die Amyloplasten bereitsteht.

Die von Zhang (2008) untersuchten Kartoffelpflanzen, welche simultan den GPT und den NTT unter den knollenspezifischen B33-Promoters überexprimieren, zeigten einen bis zu 19% erhöhten Knollenertrag und einen bis zu 28% höheren Stärkegehalt in Knollen im Vergleich zu WT-Pflanzen auf, so dass der Gesamtstärkeertrag pro Pflanze in Knollen um bis zu 44% erhöht war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stärkebildung sowohl durch die Zufuhr von Energie (durch NTT) als auch durch die Versorgung mit Kohlenstoffgrundgerüsten (durch GPT) co-limitiert ist (Zhang *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde bei diesen Pflanzen eine zusätzliche Erhöhung der Aktivität des mitochondrialen ADP/ATP-Transporters (AAC) beobachtet. Dies warf die Frage auf, ob die Aktivitätserhöhung des AAC ausreichend oder limitierend für die Stärkesynthese in den Amyloplasten ist. Daher sollten die drei Transporter in Kartoffelpflanzen unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Promoters (Rocha-Sosa *et al.*, 1989) überexprimiert werden, um deren Auswirkungen auf die

Kartoffelpflanze zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde eine transgene Linie (BG1;(Zhang *et al.*, 2008)), welche den *PsGPT* unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimiert, mit dem B33-AAC Konstrukt sowie dem B33-NTT Konstrukt co-transformiert.

3.2.1.1 Expressionsanalysen des AAC in *Solanum tuberosum*

Zur Analyse der Expression des AAC-, des GPT- und NTT-Gens wurde Knollengewebe der transformierten Pflanzen (s. Abbildung 49) verwendet. Als Kontrolle dienten Wildtyppflanzen. Es wurde aus den Geweben die RNA extrahiert (s. 2.5.3) und die Konzentration bestimmt (s. 2.5.4). Zur Entfernung von noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (s. 2.5.5), um anschließend die RNA in cDNA umzuschreiben (s. 2.5.6). Diese cDNA diente als Matrize für die PCR (s. 2.5.8). Das Gelbild der β -Tubulin-Amplifikation zeigt deutlich, dass alle β -Tubulin Amplifikate mit einer Fragmentgröße von 398 bp mit ähnlicher Bandenintensität vorhanden waren, so dass man davon ausgehen konnte, dass in allen Proben die gleiche Menge an cDNA vorhanden war. Die Geldbilder der Amplifikate von AAC, GPT und NTT aus Knollenproben zeigten, dass in allen getesteten ACGN-Linien die Expression vorhanden war. Die nicht vorhandenen Banden im Wildtyp zeigten, dass nur die gewählten ACGN-Linien die entsprechenden Transkripte besaßen.

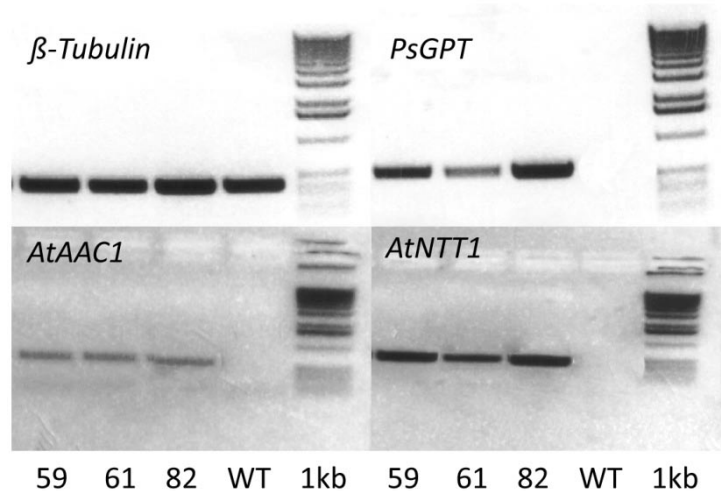


Abbildung 49: Expressionsanalyse von AAC, GPT und NTT in Kartoffelknollen von ACGN-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Es wurde das Standard PCR-Programm mit den primerspezifischen Annealing Temperaturen und 30 Zyklen verwendet. Die Transkriptmengen der Gene wurde mit Hilfe einer PCR auf cDNA aus Knollenmaterial mit den genspezifischen Primern nachgewiesen; 59, 61 und 82: Nummerierung der ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren; WT: Wildtyp; 1kb-Leiter (Fermentas). Die zu erwartenden Bandengrößen der PCR-Produkte betragen 398 bp (β -Tubulin), 600 bp (*AtAAC1*), 589 bp (*PsGPT*) und 480 bp (*AtNTT1*).

3.2.1.2 Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile im Gewächshaus

Mit Hilfe der Gewächshausanzuchten sollte überprüft werden, ob die zusätzliche knollenspezifische Überexpression des AAC1 aus *Arabidopsis thaliana* im Hintergrund der doppelt transgenen Pflanzen zu einer weiteren Ertragsteigerung, im Vergleich zur Pflanzenlinie BGA31, führt. Die doppelt transgene BGA31-Linie, welche simultan den *PsGPT* und *AtNTT1* unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Promotors exprimiert, wies im Gewächshaus einen um 19% erhöhten Knollenertrag, einen um 23% erhöhten Knollenstärkegehalt und in einen im Vergleich zum Wildtyp um 44% gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze auf (Zhang *et al.*, 2008). Die ausgewählten transgenen ACGN-Linien 59, 61 und 82 wurden in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert, wo sie nach 15 bzw. 18 Wochen Anzucht geerntet wurden. Die Pflanzen der Ernte vom Juli 2011 (07.11) waren 15 Wochen und die Pflanzen der Ernte im Oktober 2012 (10.12) 18 Wochen alt.

Änderungen der Expression von Transportproteinen, die für den Stärkemetabolismus essentiell sind, könnten das Wachstum der oberirdischen grünen Pflanzenteile beeinflussen. In Abbildung 50 sind die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewicht) der beiden Anzuchten dargestellt. Eine eindeutige Tendenz war nicht zu beobachten. In beiden Anzuchten waren die Grüngewichte der transgenen Pflanzen, welche den AAC, den NTT und den GPT überexprimieren, mit dem Grüngewicht des Wildtyps nahezu identisch. Lediglich die Linie ACGN_59 wies in der Ernte vom Juli 2011 (07.11) im Vergleich zum Wildtyp ein signifikant niedrigeres Gewicht der oberirdischen grünen Pflanzenteile auf.

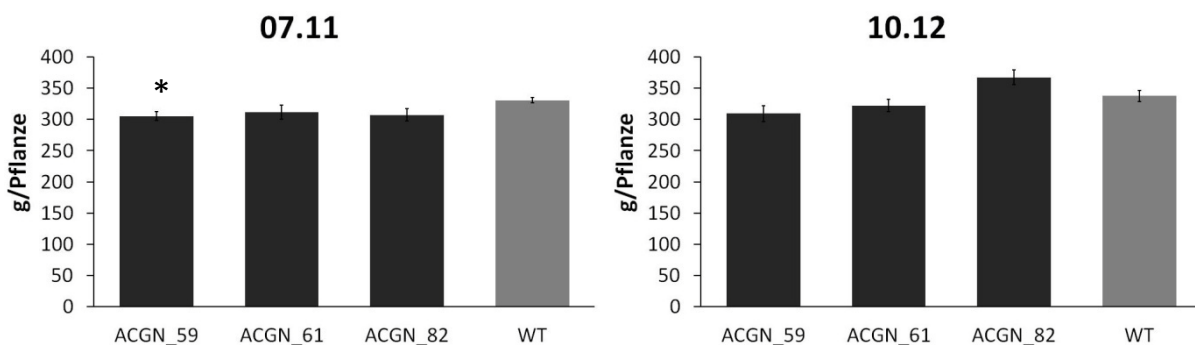


Abbildung 50: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Das Grüngewicht von transgenen ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Grüngewichts (g/Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 15 Wochen (07.11); 18 Wochen (10.12).

Die Ergebnisse der Stärkeanalysen in Blättern von ACGN- und Wildtyppflanzen von den beiden Ernten (07.11 und 10.12) sind in Abbildung 51 dargestellt. In der Anzucht vom Juli 2011 (07.11) gab es keine Unterschiede in dem Gehalt der Blattstärke im Vergleich zum Wildtyp. Aus den Analysen der Anzucht von 10.12 wird deutlich, dass der Stärkegehalt von zwei der drei ACGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Der Stärkegehalt der Blätter war in Linie ACGN_59 um 49% und in Linie ACGN_82 um 25% im Vergleich zum Wildtyp erhöht, diese Erhöhungen waren aber nicht signifikant. Der Stärkegehalt in den Blättern der Pflanzen vom Oktober 2012 war im Vergleich zum Juli 2011 deutlich erhöht, wobei die Pflanzen vom Oktober 2012 viel älter waren.

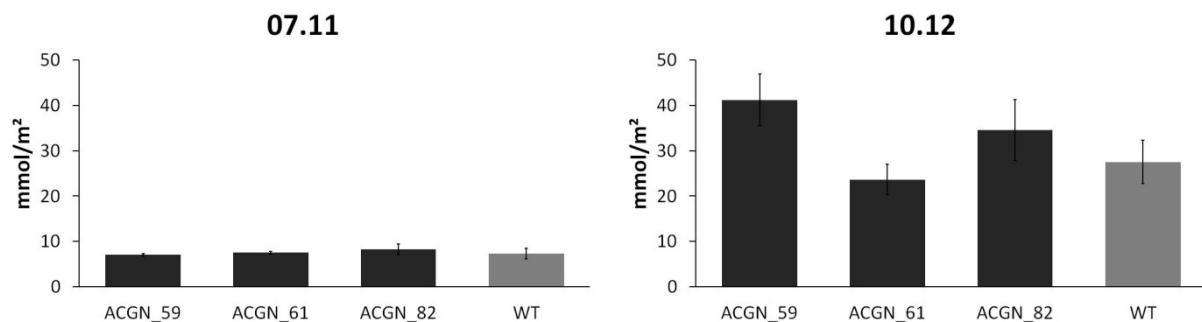


Abbildung 51: Stärkegehalt der Kartoffelblätter von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Der Stärkegehalt in Blättern von transgenen ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Blattstärkegehalts (mmol/m^2) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 15 Wochen (07.11); 18 Wochen (10.12).

3.2.1.3 Entwicklung der unterirdischen Pflanzenteile im Gewächshaus

Die Stärkebildung in den Amyloplasten der Kartoffelknollen ist sowohl durch die Zufuhr von Energie (durch NTT), als auch durch die Versorgung mit Kohlenstoffgrundgerüsten (durch GPT) co-limitiert (Zhang *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde bei den doppelt transgenen BGA-Pflanzen eine zusätzliche Erhöhung der Aktivität des mitochondrialen ADP/ATP-Transporter (AAC) beobachtet. Dieser sollte knollenspezifisch überexprimiert werden und die Auswirkung auf den Knollenertrag untersucht werden. Die Knollenerträge der ACGN-Pflanzen wurden nach Gewächshausanzuchten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. In Abbildung 52 sind die Ergebnisse der Ertragsanalysen der beiden Anzuchten (07.11 und 10.12) zusammengestellt. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass nur in der dreifach transgenen ACGN_59 Linie der Knollenertrag signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Diese Erhöhung lag bei 34%. Vergleicht man diese Erhöhung mit den Daten von Zhang *et al.*, (2008), so konnte nur in der ACGN_59 Linie eine zusätzliche Erhöhung des Knollenertrages aufgezeigt werden. Die Erhöhungen des Knollenertrages der anderen beiden Linien der Ernte Juli

2011 lagen bei 20%, was mit den veröffentlichten Daten von Zhang *et al.*, (2008) übereinstimmt, so dass eine zusätzliche Überexpression des AAC keine weitere Ertragsteigerung des Knollengewichts im Vergleich zu den zweifach transgenen BGA-Pflanzen zur Folge hat.

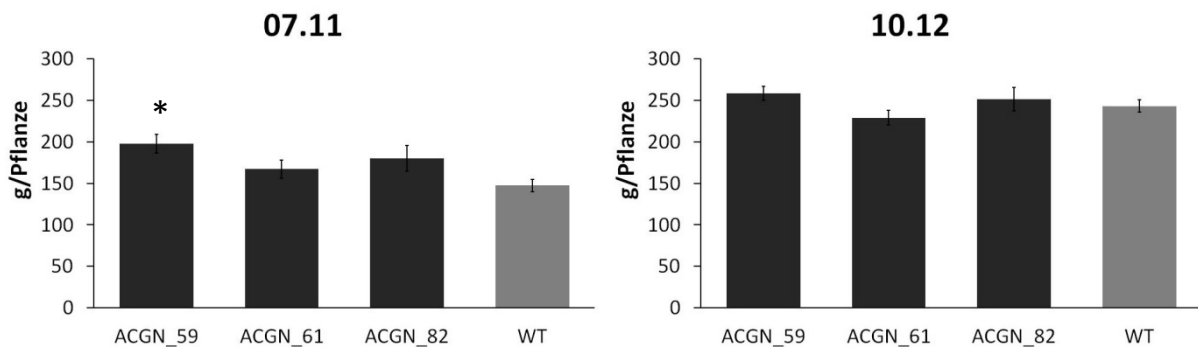


Abbildung 52: Knollenertrag von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Das Knollengewicht von transgenen ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Knollengewichts (g/Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 15 Wochen (07.11); 18 Wochen (10.12).

Zusätzlich wurde der Ernteindex bestimmt. In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der beiden Anzuchten (07.11 und 10.12) dargestellt. In der Ernte vom Juli 2011 (07.11) war der Ernteindex im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Die ACGN-Pflanzen der Ernte vom Oktober 2012 (10.12) zeigte eine leichte Erhöhung des Ernteindex im Vergleich zum Wildtyp, wobei nur die Erhöhung der ACGN_59 Linie signifikant war. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass in allen transgenen ACGN-Linien der Ernteindex im Vergleich zum Wildtyp leicht war erhöht.

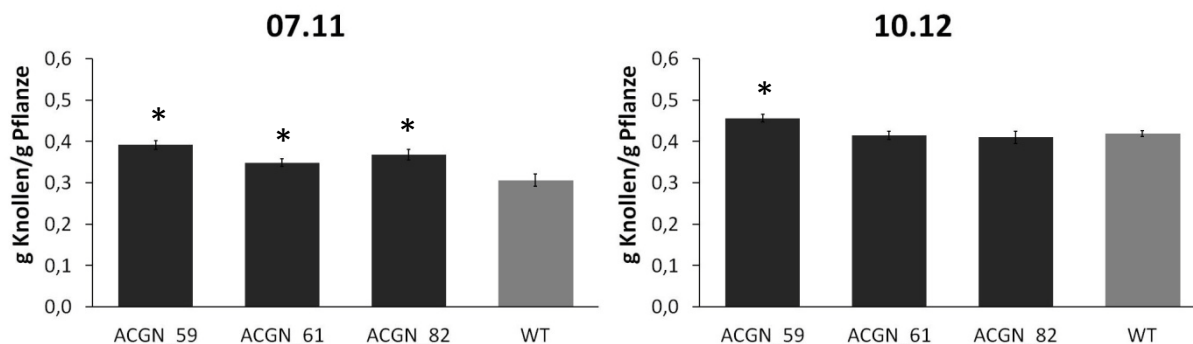


Abbildung 53: Ernteindex von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Der Ernteindex von transgenen ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Ernteindex (g Knollen/g Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n=5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 15 Wochen (07.11); 18 Wochen (10.12).

Es konnte keine weitere Steigerung des Knollenertrags in den ACGN Pflanzen festgestellt werden. Daher war es interessant zu sehen, ob die zusätzliche Überexpression des AAC Einfluss auf den Stärkegehalt in den Knollen der Pflanzen hat. Der Stärkegehalt in Kartoffelknollen wurde in den beiden Anzuchten (07.11 und 10.12) bestimmt. Den Ergebnissen aus Abbildung 54 ist zu entnehmen, dass in der Ernte vom Juli 2011 der Stärkegehalt in Knollen von ACGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp leicht gesteigert war. Jedoch war nur die Erhöhung der Linie ACGN_61 signifikant, während der Stärkegehalt in den Knollen der ACGN-Pflanzen der Ernte vom Oktober 2012 im Vergleich zum Wildtyp keine Änderungen aufwies. Ähnlich wie beim Knollenertrag konnten keine durchgängigen Änderungen der Stärkegehalte in Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

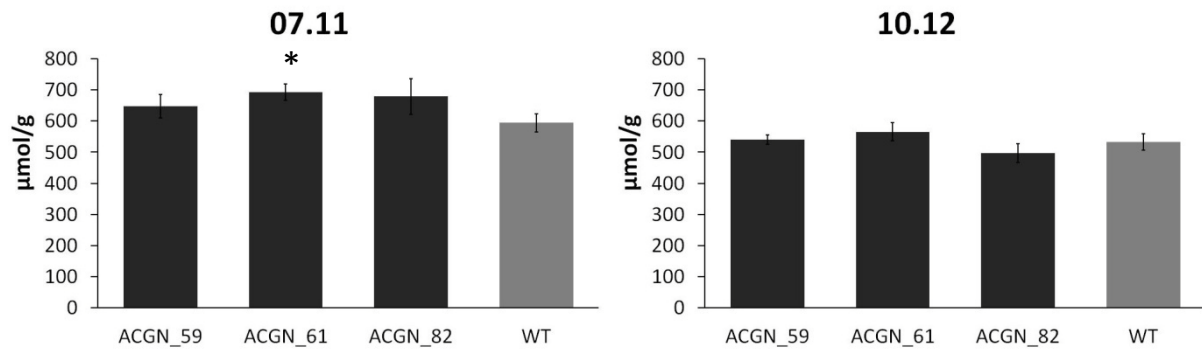


Abbildung 54: Stärkegehalt in den Knollen von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Der Gehalt an Stärke in den Knollen von transgenen ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Ernteindex ($\mu\text{mol/g}$) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 15 Wochen (07.11); 18 Wochen (10.12).

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 Abbildung 52 und Abbildung 54. Am Stärkeertrag pro Pflanze kann abgelesen werden, ob eine wirkliche Ertragssteigerung vorliegt.

Wie aus den Resultaten in Abbildung 55 zu entnehmen ist, zeigten die transgenen Kartoffelpflanzen keine durchgängige signifikante Erhöhung des Stärkeertrages pro Pflanze. Lediglich die Linie ACGN_59 zeigte einen um 44% gesteigerten Stärkeertrag im Vergleich zum Wildtyp. Die anderen ACGN-Linien zeigten im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine Tendenz, zu erhöhten Stärkeerträgen, jedoch waren diese Änderungen nicht signifikant. Die Linie ACGN_61 zeigte im Vergleich einen um 32% und die Linie ACGN_82 einen um 40% erhöhten Stärkeertrag in der Ernte vom 07.11. Vergleicht man diese Ertragserhöhung mit den Daten von Zhang *et al.*, (2008), lag die Ertragssteigerung der zweifach transgenen Pflanzen BGA31 ebenfalls bei 44%, so dass eine zusätzliche Überexpression des AAC keine weitere Ertragssteigerung des Knollengewichts im Vergleich zu den zweifach transgenen Pflanzen zur Folge hat.

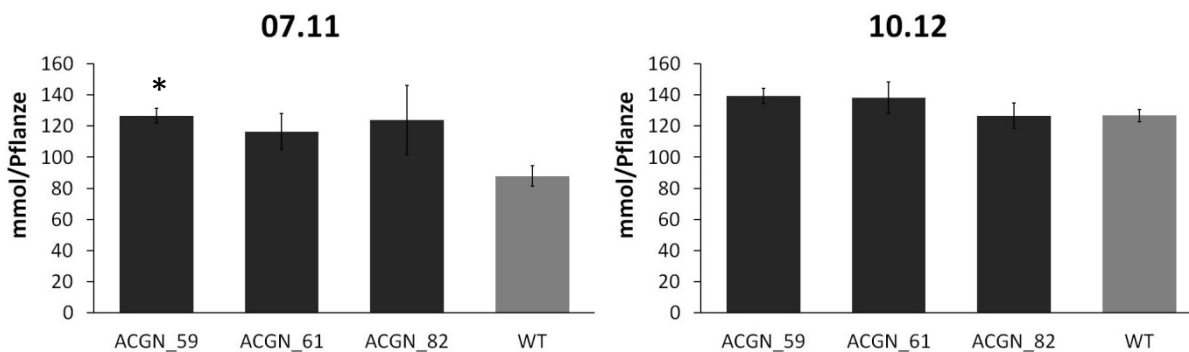


Abbildung 55: Gesamtstärkertrag von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Der Gesamtstärkertrag von transgenen ACGN-Kartoffelpflanzen, die den *AtAAC1*, den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung der Gesamtstärke (mmol/Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 15 Wochen (07.11); 18 Wochen (10.12).

3.2.2 Biotechnologische Ansatz zur Manipulation der *sink/source*-Kapazität

Die von Greiten (2008) untersuchten transgenen BGA-Kartoffelpflanzen mit erhöhter GPT- und NTT-Aktivität in den Knollen wiesen bei Anzuchten im Gewächshaus signifikante Steigerungen im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze im Vergleich zum WT auf. Diese Kartoffelpflanzen zeigten jedoch im Freilandversuch ein schlechteres Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile und auf eine früher einsetzende Seneszenz. Daraus ergab sich die Überlegung, die Isopentenyltransferase (IPT) aus *Agrobacterium tumefaciens* unter Kontrolle des Seneszenzspezifischen SAG12-Promotors überzuexprimieren. Bereits veröffentlichte Ergebnisse der Versuche, die Seneszenz mit dem SAG12-IPT-System zu verzögern, z.B. in Tabak (Ludewig *et al.*, 2000) waren erfolgreich. Der SAG12-Promotor ist bislang in Kartoffelpflanzen noch nicht untersucht worden. Zu diesem Zweck sollte zusätzlich die Aktivität des Promotors anhand einer GUS-Expression untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Auswirkung der verzögerten Seneszenz durch das SAG12-IPT-System in Kartoffelpflanzen analysiert werden. Die verzögerte Seneszenz könnte möglicherweise zu einer Ertragssteigerung führen. Eine verlängerte Aufrechterhaltung der Photosyntheseleistung der Blätter könnte zu einer längeren Versorgung der *sink*-Organe mit Saccharose führen. Um die Seneszenz in Kartoffelpflanzen zu verzögern, wurde der Seneszenz-spezifische SAG12-Promotor zusammen mit der kodierenden Sequenz der Isopentenyltransferase aus *Agrobacterium tumefaciens* in den Expressionsvektor pGWB1 kloniert; das Konstrukt erhielt den Namen pGWB1-SAG12-IPT. Um die Expression des SAG12-Promotors in Kartoffelpflanzen zu untersuchen, wurde dieser zusammen mit der Sequenz der β -Glucuronidase in den Expressionsvektor pGWB1 kloniert (pGWB1-SAG12-

GUS). Beide Konstrukte zur Transformation der Kartoffelpflanzen wurden von mir während meiner Diplomarbeit hergestellt (Wöstefeld 2010).

3.2.2.1 Analysen zur Aktivität des Seneszenz-spezifischen Promotors SAG12 in *Solanum tuberosum*

Die Blattseneszenz ist ein aktiver Prozess, der den Pflanzen die Remobilisierung von Reservestoffen und die Mobilisierung von Metaboliten vor dem Absterben des Blattes ermöglicht (Bleecker *et al.*, 1997). Die Seneszenz ist ein regulierter Prozess, der nach einem festgelegten Programm abläuft und die Expression spezifischer Gene erfordert. Es wurden bereits zwei Klassen von Genen identifiziert, die während der Seneszenz eine wichtige Rolle spielen: Zum einen Gene, die während der Seneszenz eine verminderte Expression aufweisen. Diese werden als *senescence down-regulated genes* (SDGs) bezeichnet. Zum anderen Gene, deren Expression während der Seneszenz induziert wird. Diese Gene werden als *senescence-associated genes* (SAGs) bezeichnet (Hensel *et al.*, 1993, Taiz *et al.*, 2000). Der Ablauf dieses Seneszenz-Programms ist von äußeren Faktoren abhängig und in seiner Geschwindigkeit modulierbar, kann aber nicht völlig unterdrückt oder verhindert werden (Nooden *et al.*, 1997). Cytokinine spielen in der Seneszenzhemmung eine wichtige Rolle. 1996 zeigten Gan und Amasino, dass durch die externe Zugabe von Cytokinin gelbe Blätter wieder grün wurden. Jedoch führt eine Überproduktion von Cytokininen zu unerwünschten Nebeneffekten, wie z.B. einen kleinen buschigen Phänotypen. Um eine Überproduktion der Cytokinine zu unterbinden, haben Gan und Amasino vor das *IPT*-Gen den Promotor des *SAG12*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und in Tabakpflanzen getestet (Gan *et al.*, 1996). Die Expression von *SAG12* ist hoch seneszenz-spezifisch. Da die Aktivität des *SAG12*-Promotors in *Solanum tuberosum* bisher nicht untersucht worden ist, sollte die Aktivität des Promotors mittels p*SAG12*-GUS Konstrukt untersucht werden. Anschließend wurden Wildtyp Kartoffelpflanzen der Sorte *Solanum tuberosum* cv. *Desirée* mit dem Konstrukt transformiert (s. 2.3.2).

3.2.2.1.1 Expressionsanalysen des Seneszenz-spezifischen Promotors SAG12 mit Hilfe von GUS in *Solanum tuberosum*

Zur Expressionsanalyse der β -Glucuronidase wurden Blattproben der transformierten Pflanzen genommen. Aus diesen Proben wurde die RNA extrahiert (s. 2.5.3) und die Konzentration bestimmt (s. 2.5.4). Zur Entfernung von noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (s. 2.5.5), um anschließend die RNA in cDNA umzuschreiben (s. 2.5.6). Diese cDNA diente als Matrize für die RT-PCR (s. 2.5.8).

Aus Abbildung 56 geht hervor, dass das β -Tubulin in allen getesteten Kartoffelpflanzen in den Blättern gleich stark exprimiert wurde. Das β -Tubulin ist ein *housekeeping*-Gen und wurde als quantitative Kontrolle verwendet und diente dem Nachweis, dass in allen PCR-Ansätzen eine vergleichbare Menge an cDNA vorlag. Wie aus dem Gelbild (Abbildung 56) deutlich hervorgeht, waren alle β -Tubulin Amplifikate mit einer Fragmentgröße von 398 bp vorhanden. Die Bandenintensität war bei allen untersuchten Kartoffelproben gleich stark, daher kann davon ausgegangen werden, dass in allen Proben die gleiche Menge an cDNA vorhanden war. Im unteren Teil der Abbildung ist das Gelbild der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate mit den GUS-spezifischen Primern abgebildet. Aufgrund der 1630 bp großen Banden bei den Linien GUS_8, 10 und 11 und der nicht vorhandenen Bande im Wildtyp wurde gezeigt, dass die gewählten GUS Linien das *GUS*-Gen exprimierten. Die unterschiedlich starken Bandenintensitäten der GUS-Pflanzen zeigten, dass das Gen zum analysierten Zeitpunkt aufgrund des Seneszenz-spezifischen Promotors unterschiedlich stark exprimiert wurde.

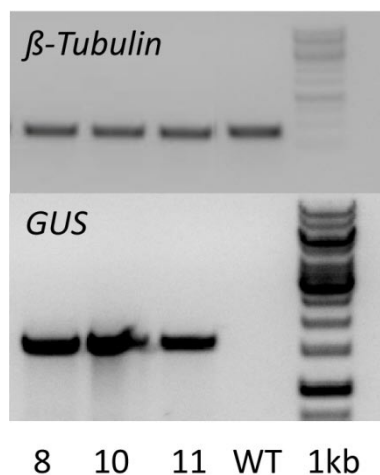


Abbildung 56: Expressionsanalyse von GUS in Kartoffelblättern von GUS-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Es wurde das Standard PCR-Programm mit den primerspezifischen Annealing Temperaturen und 30 Zyklen verwendet. Die Transkriptmengen der Gene wurde mit Hilfe einer PCR auf cDNA aus Blattmaterial mit den genspezifischen Primern nachgewiesen; 8, 10 und 11: Nummerierung der GUS-Pflanzen, die seneszenz-spezifisch GUS überexprimieren; WT: Wildtyp; 1kb-Leiter (Fermentas). Die zu erwartende Bandengrößen der PCR-Produkte betragen 398 bp (β -Tubulin) und 1630 bp (*GUS*).

3.2.2.1.2 Aktivität des Seneszenz-spezifischen Promotors SAG12 in Blättern von *Solanum tuberosum*

Kartoffelpflanzen altern sequentiell, das heißt, von unten nach oben. Der SAG12-Promotor wird bei einsetzender Seneszenz aktiv, daher wurden Blattproben zur Bestimmung der Promotoraktivität von jungen, mittelalten und alten Blättern verschieden alter Pflanzen genommen.

In Abbildung 57 sind die Ergebnisse der GUS-Färbung von 12 Wochen alten GUS-Pflanzen dargestellt. Die alten Blätter der Linien GUS_8, GUS_10 und GUS_11 zeigten eine deutliche Blaufärbung, das zeigt, dass der Promotor in den alten Blättern der 12 Wochen alten Pflanzen bereits aktiv war. In den jungen und mittelalten Blättern war keine Färbung zu erkennen, dies bedeutet, dass in diesen Blättern der Promotor nicht aktiv war. In den alten Blättern der 16 Wochen alten Pflanzen (Abbildung 58) war der Promotor in fast allen Blättern aktiv, was an der Blaufärbung der Blätter zu erkennen war.

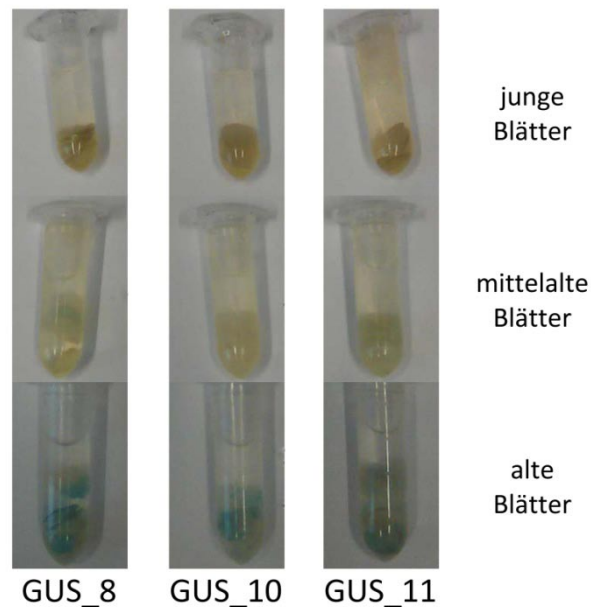


Abbildung 57: GUS-Färbung verschiedener Blattstufen der GUS-Pflanzen zur Analyse der SAG12-Promotor-Aktivität.

Darstellung der GUS-Färbung von Blattscheiben aus jungen Blättern, mittelalten und alten Blättern. Verwendet wurde je eine Pflanze der Linien GUS_8, GUS_10 und GUS_11. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Probennahme 12 Wochen alt.

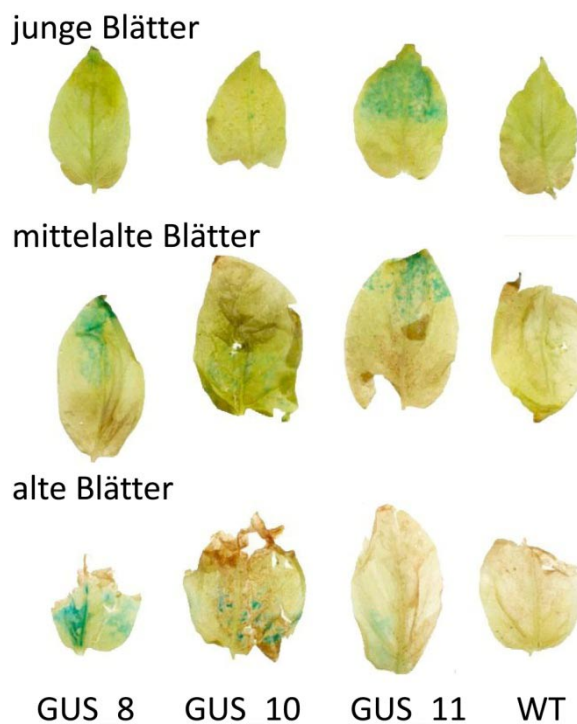


Abbildung 58: GUS-Färbung verschiedener Blattstufen der GUS-Pflanzen zur Analyse der SAG12-Promotor-Aktivität.

Darstellung der GUS-Färbung von jungen, mittelalten und alten Blättern. Verwendet wurde eine Pflanze der Linien GUS_8, GUS_10 und GUS_11. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Probennahme 16 Wochen alt.

Um die Promotoraktivität genauer zu untersuchen, wurde eine Quantifizierung der GUS-Aktivität durchgeführt (s. 2.6.8). Hierzu wurden elf Wochen und 14 Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden von oben nach unten in vier Parteien eingeteilt, wobei der obere Teil (Partie 1) den jungen Pflanzenteil widerspiegelt und der unterste Teil (Partie 4) den ältesten Pflanzenteil. Wie in Abbildung 59 deutlich zu erkennen ist, war die GUS-Aktivität in den elf Wochen alten Pflanzen nicht so hoch wie in den 14 Wochen alten Pflanzen. Wie zu erwarten war, wies der älteste Pflanzenteil (Partie 4) die höchste GUS-Aktivität auf. Dies zeigt, je senszenter der Pflanzenteil war, desto höher war auch die GUS-Aktivität und somit die Promotoraktivität.

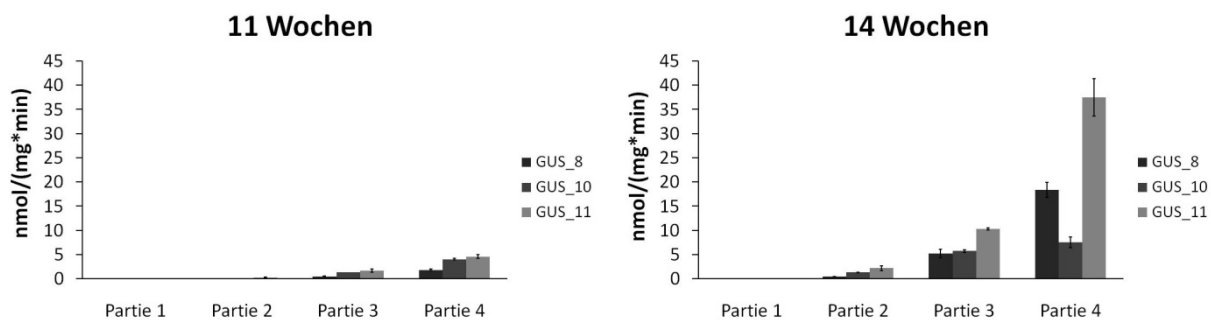


Abbildung 59: Quantifizierung der GUS-Aktivität in verschiedener Blattstufen der GUS-Pflanzen.

Die GUS-Aktivität von transgenen Kartoffelpflanzen GUS_8, GUS_10 und GUS_11, welche die GUS seneszenz-spezifisch überexprimieren, wurde analysiert. Zur Bestimmung der GUS-Aktivität (nmol/(mg*min)) wurden für die Bestimmung je n=3 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2.2.2 Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT in *Solanum tuberosum*

Die Isopentenyltransferase (IPT) ist das Schlüsselenzym für die Cytokininbiosynthese. Es ist der erste limitierende Schritt der Synthese von Cytokinin. Um die Wirkung von Cytokinen in Pflanzen besser untersuchen zu können, haben Gan und Amasino 1995 transgene Tabakpflanzen hergestellt, welche das IPT-Gen, das für eine bakterielle Isopentenyltransferase kodiert, unter Kontrolle des Seneszenz-spezifischen Promotors SAG12 exprimiert. Es handelt sich hierbei um ein autoreguliertes System, d.h. sobald die Seneszenz beginnt, wird der SAG12-Promotor aktiviert, was zur IPT-Bildung führt, was wiederum zur Bildung von Cytokinen führt. Cytokine führen schließlich zur Verzögerung der Seneszenz, wodurch der Promotor wieder inaktiviert wird, bis dieser Zyklus erneut beginnt.

Das SAG12-IPT Konstrukt zur Transformation der Kartoffelpflanzen habe ich während meiner Diplomarbeit hergestellt (Wöstefeld 2010). Anschließend wurden Wildtyp-Kartoffelpflanzen der Sorte *Solanum tuberosum* cv. *Desirée* mit dem Konstrukt transformiert (s. 2.3.2).

3.2.2.2.1 Expressionsanalysen der IPT in *Solanum tuberosum*

Zur Expressionsanalyse der IPT wurden Blattproben der transformierten Pflanzen genommen. Aus diesen Proben wurde die RNA extrahiert (s. 2.5.3) und die Konzentration bestimmt (s. 2.5.4). Zur Entfernung von noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (s. 2.5.5), um anschließend die RNA in cDNA umzuschreiben (s. 2.5.6). Diese cDNA diente als Matrize für die RT-PCR (s. 2.5.8). In Abbildung 60 ist eine Amplifikation des β -Tubulins in den Kartoffelpflanzen mit cDNA aus Blattgewebe zu sehen. Aus der Abbildung geht hervor, dass das β -Tubulin in allen getesteten Kartoffelpflanzen in den Blättern gleich stark exprimiert wurde. Das β -Tubulin ist ein *housekeeping*-Gen und wurde als quantitative Kontrolle verwendet. Es diente dem Nachweis, dass in allen PCR Ansätzen eine vergleichbare Menge an cDNA vorlag. Wie aus dem Gelbild deutlich hervorgeht, waren alle β -Tubulin Amplifikate mit einer Fragmentgröße von 398 bp vorhanden. Um die Expression der IPT aus *Agrobacterium tumefaciens* in den Kartoffelpflanzen zu analysieren, wurden Primerpaare verwendet, die spezifisch für die IPT waren. Im unteren Teil der Abbildung ist das Gelbild der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate mit den IPT-spezifischen Primern abgebildet. Aufgrund der 708 bp großen Bande bei den Linien IPT_7, 9, 32 und 46 und der nicht vorhandenen Bande im Wildtyp wurde gezeigt, dass die gewählten IPT Linien das IPT-Gen exprimierten. Die unterschiedlich starken Bandenintensitäten der IPT-Pflanzen zeigen, dass das Gen zum analysierten Zeitpunkt aufgrund des Seneszenz-spezifischen Promotors unterschiedlich stark exprimiert wurde.

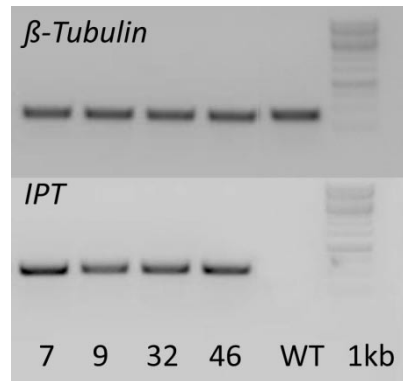


Abbildung 60: Expressionsanalyse der IPT in Kartoffelblättern von IPT-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Es wurde das Standard PCR-Programm mit den primerspezifischen Annealing Temperaturen und 28 Zyklen verwendet. Die Transkriptmengen der Gene wurde mit Hilfe einer PCR auf cDNA aus Blattmaterial mit den genspezifischen Primern nachgewiesen; 7, 9, 32 und 46: Nummerierung der IPT-Pflanzen, welche Seneszenz-spezifisch die IPT überexprimieren; WT: Wildtyp; 1kb-Leiter (Fermentas). Die zu erwartende Bandengrößen der PCR-Produkte betragen 398 bp (*β-Tubulin*) und 708 bp (*IPT*).

3.2.2.2 Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile im Gewächshaus

Mit Hilfe der Gewächshausanzuchten sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT aus *Agrobacterium tumefaciens* im Vergleich zum Wildtyp hat.

Die ausgewählten transgenen IPT-Linien 7, 9, 32 und 46 wurden in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert, wo sie nach 14 bis 18 Wochen Anzucht geerntet wurden. Die Pflanzen der Ernte vom November 2012 (11.12) waren 18 Wochen alt, die Pflanzen der Ernte im April 2013 (04.13) waren 16 Wochen und die vom Mai 2013 (05.13) waren 14 Wochen alt.

Die Verzögerung der Seneszenz durch die SAG12-IPT Expression könnte das Wachstum der oberirdischen grünen Pflanzenteile beeinflussen. Daher wurde das Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile bei den Ernten ermittelt. In Abbildung 61 sind die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewicht) von drei verschiedenen Ernten (11.12, 04.13 und 05.13) dargestellt. Eine eindeutige Tendenz in den drei Gewächshausanzuchten war nicht zu beobachten. In der Ernte vom November 2012 (11.12) waren die Grüngewichte der transgenen Pflanzen, welche die IPT überexprimieren, nahezu identisch mit dem Grüngewicht des Wildtyps. Lediglich die transgenen Pflanzen der beiden Ernten im Jahr 2013 zeigten niedrigere Grüngewichte im Vergleich zum Wildtyp, das heißt, die transgenen Pflanzen waren partiell tendenziell leichter als Wildtyppflanzen. Diese Reduktion zeigte sich bei den Linien IPT_9 und 46 signifikant in beiden Ernten (04.13 und 05.13), und die Linie IPT_7 zeigte eine signifikante Reduktion des Grüngewichts in der Ernte vom Mai 2013 (05.2013).

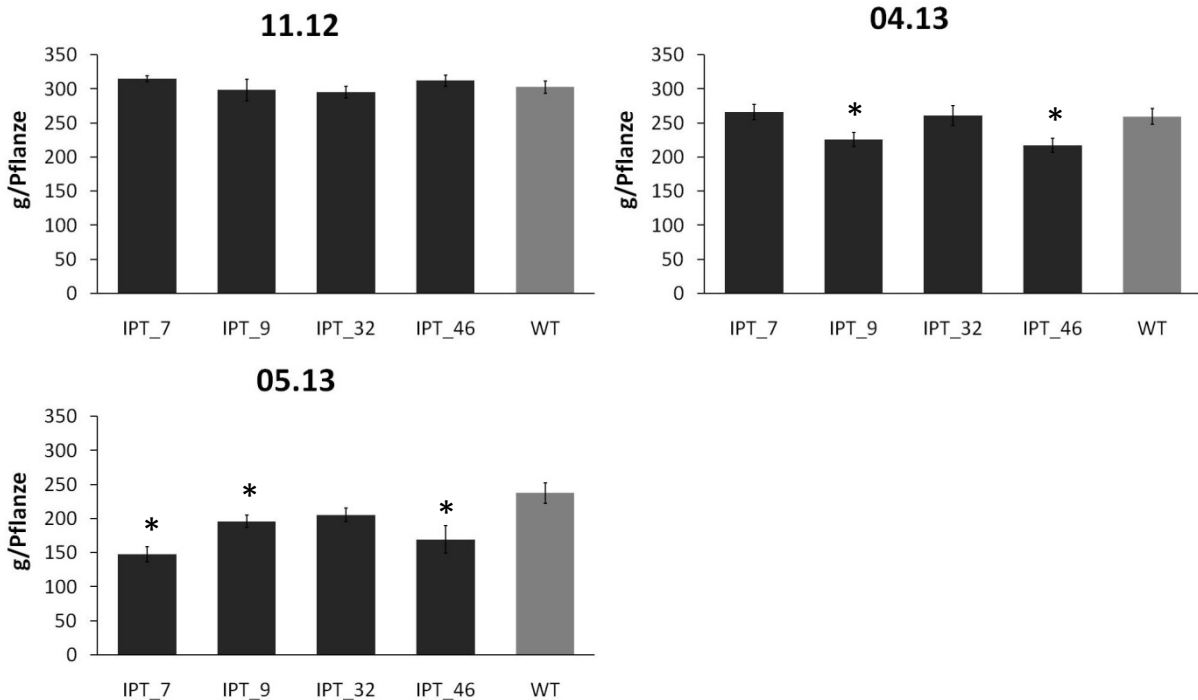


Abbildung 61: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Das Grüngewicht von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Grüngewichts (g/Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n=10$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

Mit zunehmender Seneszenz nimmt die CO_2 -Assimilation der Blätter ab (Jonik 2011). Um die Auswirkungen der Seneszenz-spezifischen Überexpression der IPT auf den Fortgang der Seneszenz in Kartoffelblätter näher zu analysieren, wurde die Assimilation untersucht.

In Abbildung 62 sind die Ergebnisse der CO_2 -Assimilationsmessungen bei $400 \mu\text{E}$ der IPT-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die Messung wurde am frühen Nachmittag vom sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt von oben, stellvertretend für die jungen Blätter, durchgeführt. Für die mittelalten Blätter wurde das 12. voll ausgebildetem Fiederblatt und für die alten seneszenten Blätter wurde das 18. Blatt, falls noch vorhandenen, gemessen. Wie aus den Daten vom November 2012 (11.12) ersichtlich wird, waren in allen IPT-Pflanzen nach vierzehnwöchiger Anzucht im Gewächshaus keine signifikanten Änderungen der CO_2 -Assimilation der jungen Blätter im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Betrachtet man dagegen die CO_2 -Assimilation der alten Blätter dieser Anzucht, war in allen IPT-Linien eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die Assimilation war in Linie IPT_7 um 133%, in IPT_9 um 105%, in IPT_32 um 78% und in Linie IPT_46 um 73% erhöht. Es konnte somit eine durchschnittliche Erhöhung um 97% in den älteren Blättern festgestellt werden. Die Assimilation der Pflanzen vom April 2013 (04.13) konnte die

Assimilation aufgrund eines Schädlingsbefalls (weiße Fliegen) nur noch in den jungen Blättern gemessen werden. Eine Messung der Pflanzen der Ernte vom Mai 2013 (05.13) war aufgrund des Schädlingsbefalls nicht mehr möglich. Es zeigte sich, dass in allen transgenen IPT-Linien eine deutliche Erhöhung der Assimilation im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten war. Die Assimilation war in Linie IPT_7 um 43%, in IPT_9 um 100%, in IPT_32 um 106% und in Linie IPT_46 um 158% erhöht. Diese Erhöhung war in den Linien IPT_9, 32 und 46 signifikant. Auffällig war, dass die CO₂-Assimilation in den älteren Wildtyppflanzen und auch in den älteren transgenen IPT-Pflanzen stark abnahm. In zwölf Wochen alten Wildtyppflanzen vom April 2013 (04.13) wurde bei 400 µE eine CO₂-Assimilation von 6,12±1,26 µmol/(m²s) gemessen, wobei in sechzehn Wochen alten Wildtyppflanzen der Anzucht vom November 2012 (11.12) eine Assimilation von nur noch 1,48±0,24 µmol/(m²s) gemessen wurde.

Es wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen der CO₂-Assimilation in Kartoffelblättern und der Seneszenz-Entwicklung der Pflanze bestand. Mit zunehmendem Alter und eintretender Seneszenz nahm die CO₂-Assimilation der Blätter ab, wobei die transgenen Pflanzen welche die IPT unter dem Seneszenz-spezifischen Promotor überexprimierten, eine deutlich höhere Assimilation im Vergleich zum Wildtyp zeigten.

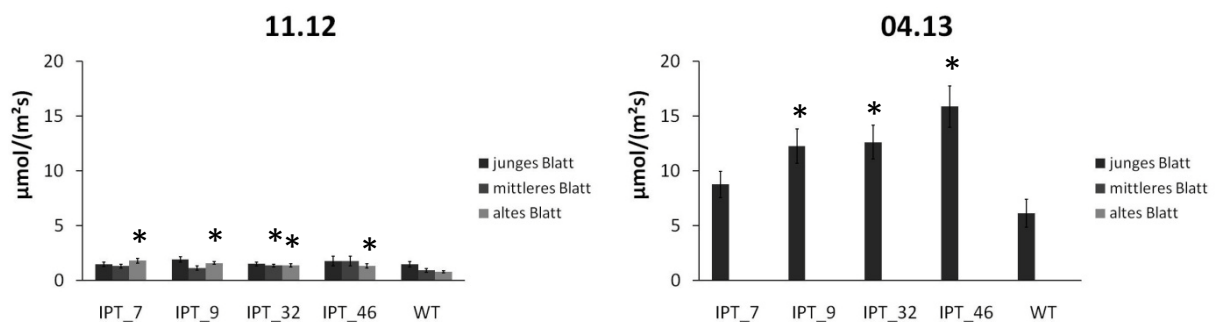


Abbildung 62: CO₂-Assimilation der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Die Assimilation von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimierten, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung der Assimilation (µmol/(m²s)) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n= 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; * = signifikant (p < 0,05). Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Messung: 16 Wochen (11.12); 14 Wochen (04.13); Lichtphase im Gewächshaus: 06:00-21:00 Uhr.

Neben der CO₂-Assimilation nimmt auch die Aktivität des Photosystems II (PSII) mit fortschreitender Seneszenz aufgrund des Chlorophyllabbaus und der Proteindegradation ab (John *et al.*, 1995, Oh *et al.*, 1997). Die Integrität des Photosystems II (PSII) lässt sich mit Hilfe des Verhältnisses von Fv zu Fm bestimmen (Krause *et al.*, 1991). Es gibt Auskunft über die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Pflanze und dient somit als Seneszenzmarker. Bei intaktem PSII liegt der Wert für das Fv/Fm-Verhältnis zwischen 0,8 und 0,84, nimmt aber mit fortschreitender Seneszenz ab (Oh *et al.*, 1996). In Abbildung 63 sind die Ergebnisse der PAM-Fluorometrie-Messung zur Bestimmung des Fv/Fm-Verhältnisses dargestellt. Die Messung wurde am späten Nachmittag vom sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt von oben, stellvertretend für die jungen Blätter, durchgeführt. Für die mittelalten Blätter wurden die 12. voll ausgebildeten Fiederblätter, und für die alten seneszenten Blätter wurden die 18. Blätter, falls noch vorhandenen, gemessen. Generell lag das Fv/Fm-Verhältnis zwischen 0,72 und 0,78, wobei die älteren Blätter in allen drei Anzuchten das niedrigste Verhältnis aufwiesen. Mit Ausnahme der Pflanzen vom April 2013 (04.13) gab es keine signifikanten Erhöhungen des Fv/Fm-Verhältnissen in IPT-Pflanzen gegenüber den Wildtyppflanzen. Das generell niedrige Fv/Fm-Verhältnis zeigte, dass die Seneszenz in allen Pflanzen fortgeschritten war.

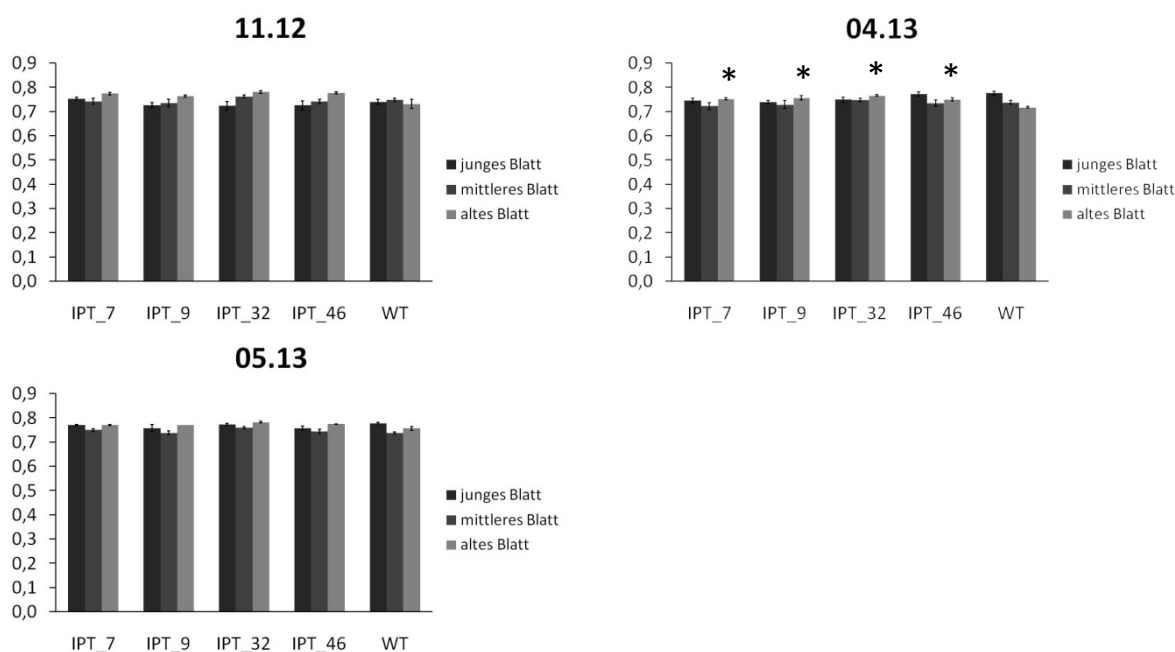


Abbildung 63: Fv/Fm-Verhältnis der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Das Fv/Fm-Verhältnis von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Fv/Fm-Verhältnisses wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n= 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; * = signifikant (p < 0,05). Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Messung: 16 Wochen (11.12); 14 Wochen (04.13).

Während der Seneszenz ist phänotypisch nur der Abbau des Chlorophylls durch Abnahme der Grünfärbung sichtbar. Der Abbau des Chlorophylls und die Auflösung der Chloroplasten (Nooden *et al.*, 1997) dient als Schutz des seneszierenden Gewebes vor photooxidativer Schädigung durch das Chlorophyll, das durch den Abbau der Chlorophyllbindeproteine freigesetzt wird (Hörtensteiner 1999, Matile 1992). Der Chlorophyllgehalt diente ebenso wie die CO₂-Assimilation und das Fv/Fm-Verhältnis als Marker für das Fortschreiten der Seneszenz in den Pflanzen. Das Probenmaterial wurde am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt von oben stellvertretend für die jungen Blätter genommen. Für die mittelalten Blätter wurden Blattproben von dem 12. voll ausgebildeten Fiederblatt und für die alten seneszenten Blätter wurden von dem, falls noch vorhanden, 18. Fiederblatt die Blattproben genommen.

In Abbildung 64 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Chlorophyllgehalte vom November 2012 (11.12) und vom Mai 2013 (05.13) dargestellt. Aus den Analysen der Anzucht vom 11.12 wird deutlich, dass der Chlorophyllgehalt in den mittelalten und alten Blättern der IPT-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht war. Der Chlorophyllgehalt in den mittelalten Blättern war in Linie IPT_7 um 149%, in IPT_9 um 137%, in IPT_32 um 189% und in Linie IPT_46 um 107% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In den alten Blättern war der Chlorophyllgehalt um 217% in Linie IPT_7, um 146% in Linie IPT_9, um 185% in IPT_32 und um 169% in Linie IPT_46 erhöht. In der Anzucht vom Mai 2013 (04.13) war der Blattchlorophyllgehalt in den jungen Blättern von Linie IPT_7 und in der Linie IPT_32 signifikant im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Generell waren die Chlorophyllgehalte in den alten und mittelalten Blättern der transgenen IPT Linien im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht. Es wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen dem Chlorophyllgehalt in Kartoffelblättern und der Entwicklung der Seneszenz der Pflanzen bestand. Mit zunehmendem Alter und eintretender Seneszenz nahm der Chlorophyllgehalt der Blätter ab, wobei die transgenen Pflanzen, welche die IPT unter dem Seneszenz-spezifischen Promotor überexprimierten, einen höheren Chlorophyllgehalt in den Blättern im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Dies war auch optisch zu erkennen (s. Abbildung 65).

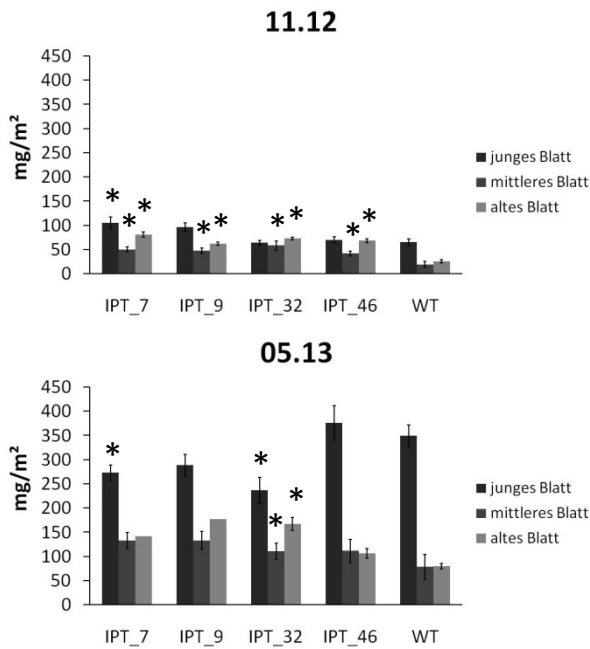


Abbildung 64: Chlorophyllgehalt der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.

Der Chlorophyllgehalt in Blättern von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts (mg/m^2) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 14 Wochen (05.13).

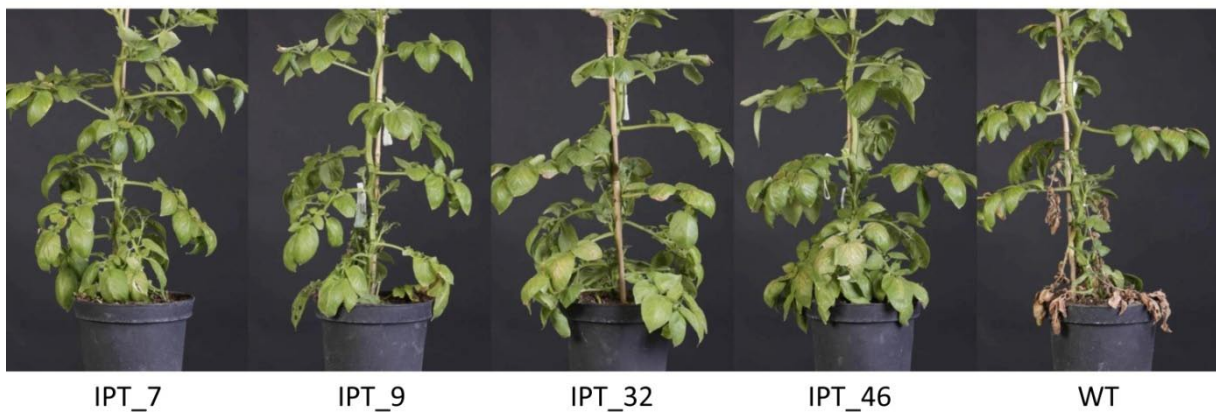


Abbildung 65: Repräsentativer Phänotyp von jeweils einer Pflanze der IPT-Linien und des Wildtyps.

Abgebildet ist jeweils die untere Hälfte der oberirdischen Pflanzenteile der transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren und der Wildtyp; Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Aufnahme: 13 Wochen.

Der Stärkegehalt in Blättern ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen spielt die Photosyntheserate eine wichtige Rolle. Zum anderen werden Kohlenhydrate durch z.B. Atmung und durch Photorespiration verbraucht, darüber hinaus werden Kohlenhydrate zu nicht-photosynthetisch aktiven Gewebe, sogenannten *sink*-Gewebe, transportiert. Aufgrund der höheren Assimilationsraten (s. Abbildung 62) der IPT Pflanzen war es wichtig, ob dies einen Einfluss auf den Stärkegehalt in den Blätter hatte. Zu diesem Zweck wurde der Gehalt an Stärke in den Blättern eine Woche vor der Ernte der Pflanzen analysiert. Das Probenmaterial wurde am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildetem Fiederblatt von oben, stellvertretend für die jungen Blätter, genommen. Für die mittelalten Blätter wurden Blattproben von dem 12. voll ausgebildetem Fiederblatt und für die alten seneszenten Blätter wurden von dem 18. Fiederblatt die Blattproben genommen, falls dies noch vorhanden war.

In Abbildung 66 sind die Ergebnisse der Stärkebestimmung vom November 2012 (11.12), April 2013 (04.13) und vom Mai 2013 (05.13) dargestellt. Aus den Analysen der Anzucht von 11.12 wird deutlich, dass der Stärkegehalt in den mittelalten und alten Blättern der IPT-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Der Stärkegehalt in den mittelalten Blättern war in Linie IPT_7 um 100%, in IPT_9 um 160%, in IPT_32 um 88% und in Linie IPT_46 um 211% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In den alten Blättern war der Stärkegehalt um 158% in Linie IPT_7, um 191% in Linie IPT_9, um 102% in IPT_32 und um 161% in Linie IPT_46 erhöht. In der Anzucht vom April 2013 (04.13), bei der zwei Wochen jüngere Pflanzen analysiert wurden, war der Stärkegehalt in den jungen und den mittelalten Blättern von Linie IPT_9 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Die Pflanzen der Anzucht vom Mai 2013 waren mit 14 Wochen die jüngsten in denen der Blattstärkegehalt in den mittelalten und alten Blättern im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht war. Generell war der Stärkegehalt in den alten und mittelalten Blättern der transgenen IPT Linien im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht.

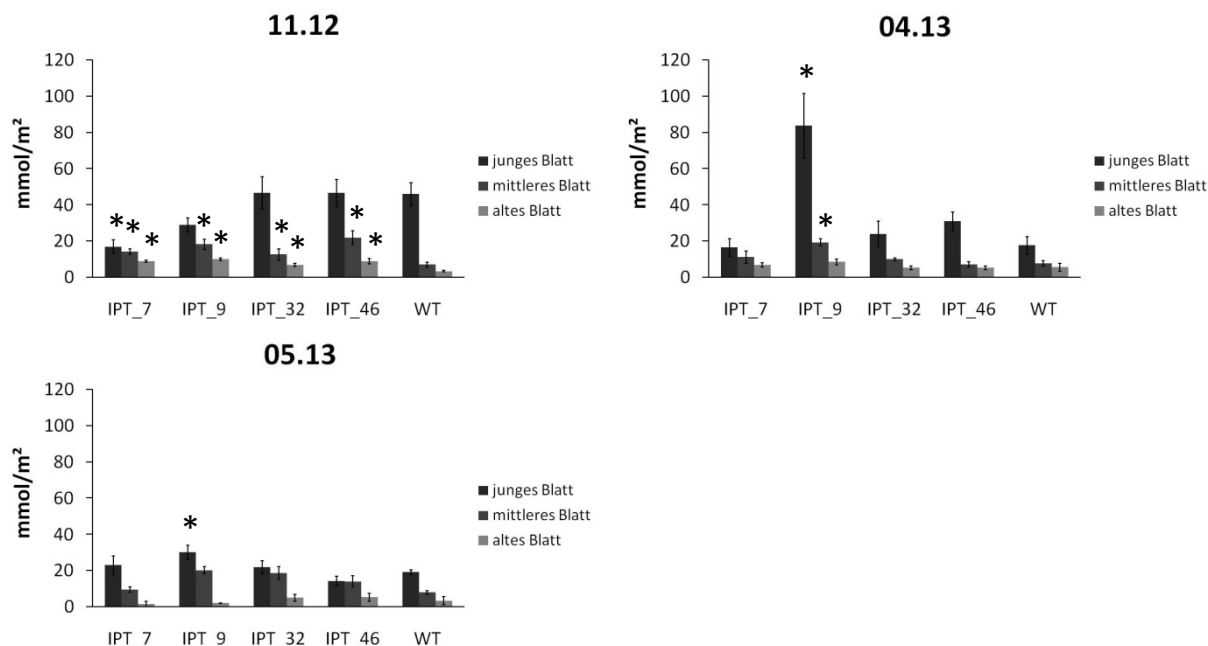


Abbildung 66: Stärkegehalt der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Stärkegehalt in Blättern von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung der Blattstärke (mmol Hexose/m²) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n = 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; * = signifikant (p < 0,05). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

Da die untersuchten IPT-Pflanzen in den älteren Blättern eine leicht erhöhte Akkumulation der Blattstärke aufwiesen, war es aufschlussreich, ob dies einen Einfluss auf andere Kohlenhydrate wie Glukose, Fruktose und Saccharose hat. Weiterhin zeigten Paul und Foyer, 2001, dass die Akkumulation von Zuckern die Blattseneszenz beschleunigt. Daher war es auch aus diesem Grund wichtig, die Gehalte der löslichen Zuckern der Blätter zu untersuchen. Die Gehalte der löslichen Zucker wurden eine Woche vor der Ernte der Pflanzen genommen und analysiert. Das Probenmaterial wurde am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt von oben stellvertretend für die jungen Blätter genommen. Für die mittelalten Blätter wurden Blattproben von dem 12. voll ausgebildetem Fiederblatt und für die alten seneszenten Blätter wurden, falls noch vorhandenen, vom 18. Fiederblatt die Blattproben genommen. Die Ergebnisse der Zuckeranalyse von jungen Blättern der drei Anzuchten ist in Abbildung 67 dargestellt.

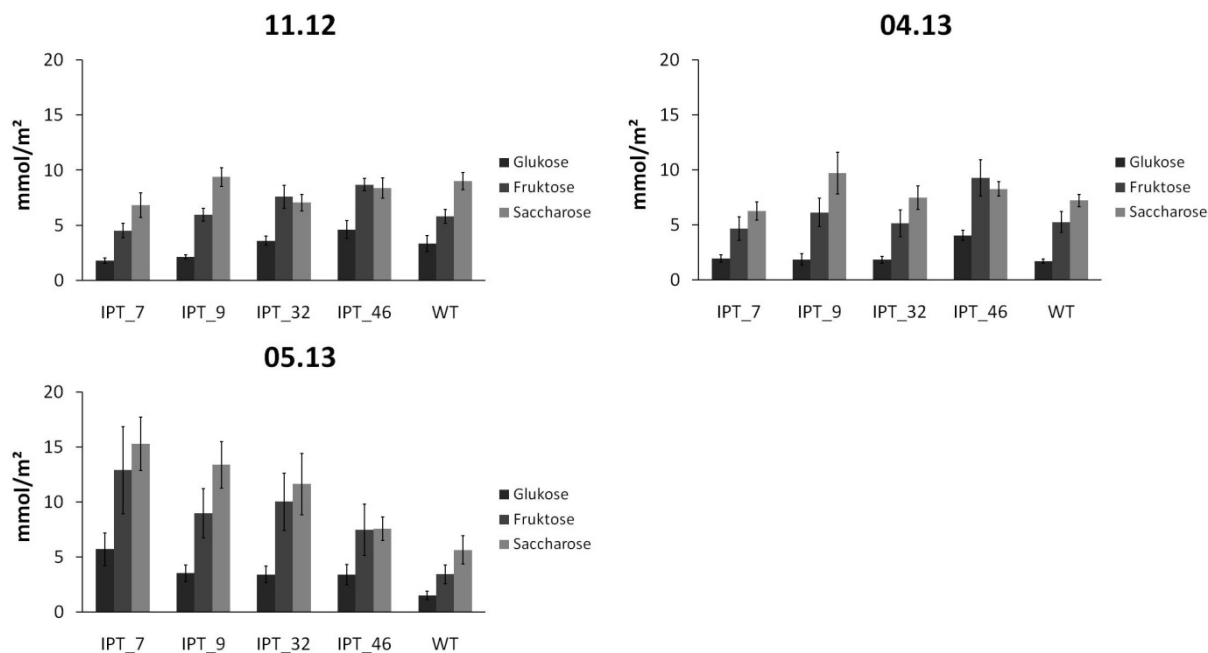


Abbildung 67: Zuckergehalt der jungen Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Zuckergehalt in jungen Blättern von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Blattzuckers (mmol /m²) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n= 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; *= signifikant (p < 0,05). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

Die Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose in den jungen Blättern der transgenen Pflanzen in der Ernte vom November 2012 (11.12) und in der Ernte vom April 2013 (04.13) waren denen des Wildtyps ähnlich. Lediglich die transgenen Pflanzen vom Mai 2013 (05.13) wiesen erhöhte Gehalte an Fruktose und Saccharose in den jungen Blättern auf (s. Abbildung 67). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den IPT- und Wildtyppflanzen. Da diese schwache Änderung jedoch nur bei einer Anzucht (04.13) auftrat und sich bei den anderen Anzuchten nicht bestätigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT keinen Einfluss auf die Akkumulation der löslichen Zucker in jungen Blättern hatte. Darüber hinaus gab es in den mittelalten Blättern der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Glukose-, Fruktose und Saccharosegehalt (Abbildung 68).

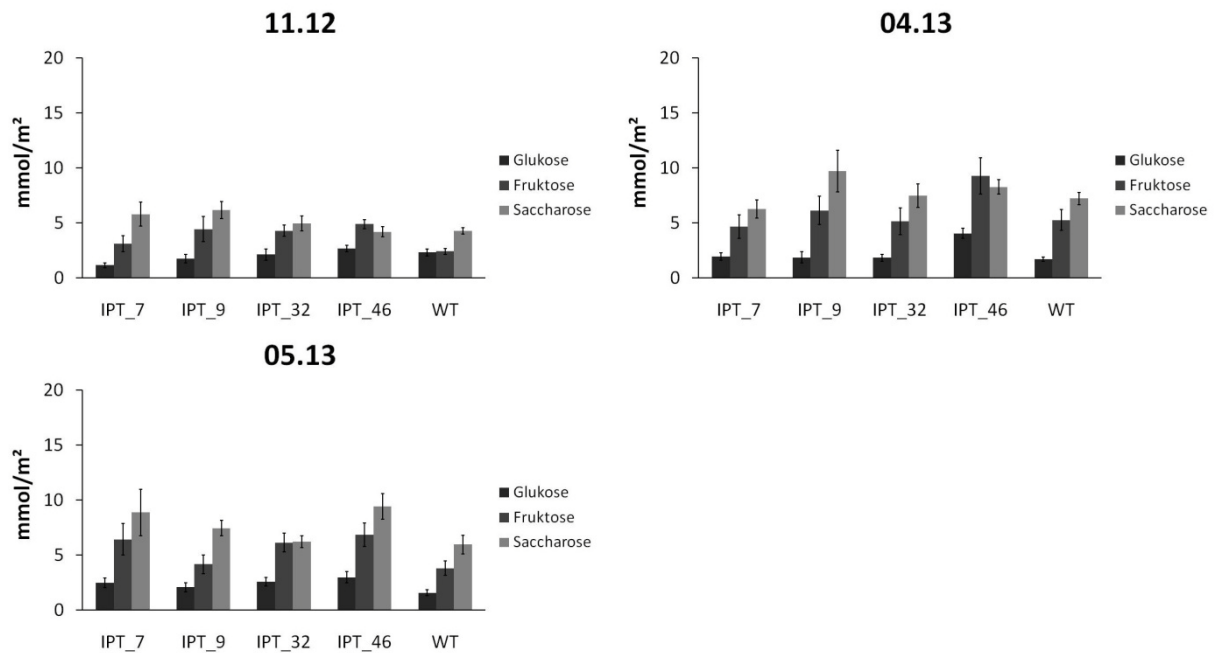


Abbildung 68: Zuckergehalt der mittelalten Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Zuckergehalt in mittelalten Blättern von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Blattzuckers (mmol /m²) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n= 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; *= signifikant (p < 0,05). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

In Abbildung 69 sind die Ergebnisse der Zuckeranalysen von den alten (seneszenten) Blättern der Anzuchten (11.12, 04.13 und 05.13) dargestellt. Es wird deutlich, dass die Zuckergehalte in den Anzuchten der transgenen Kartoffelpflanzen ähnlich zu denen des Wildtyps waren. Wie bei den mittelalten Blättern (s. Abbildung 68) gab es auch hier keine signifikanten Unterschiede bei den löslichen Zuckern zwischen transgenen Pflanzen und dem Wildtyp.

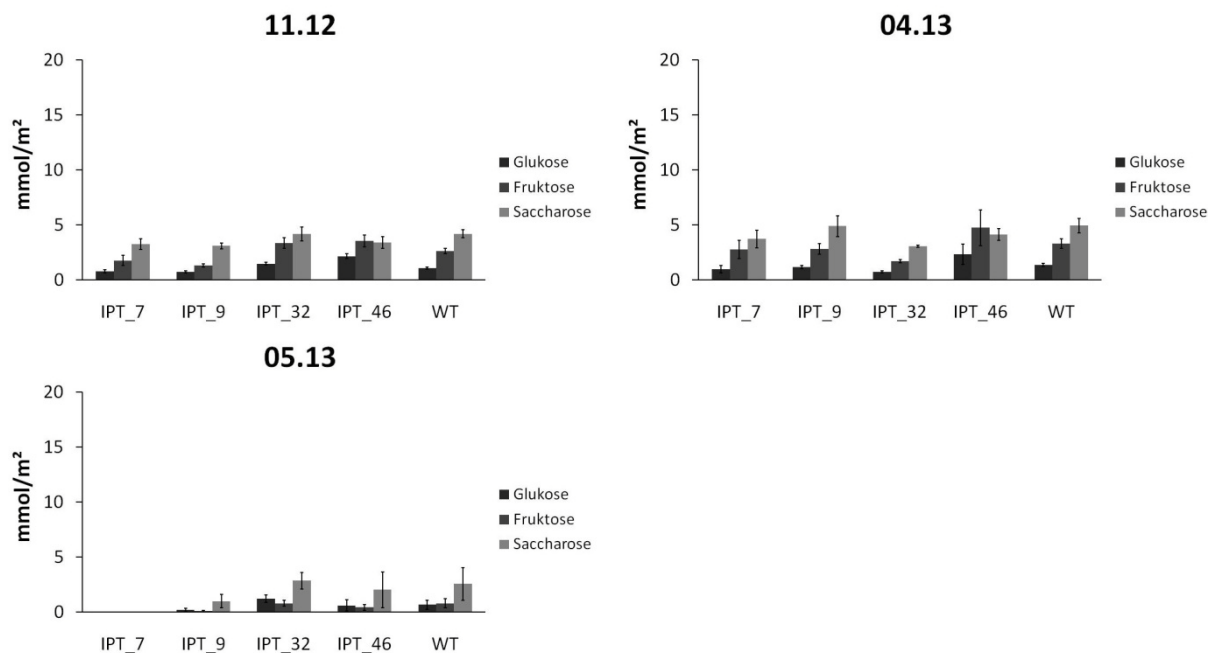


Abbildung 69: Zuckergehalt der alten Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Zuckergehalt in alten Blättern von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Blattzuckers (mmol /m²) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n= 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler;*= signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

3.2.2.2.3 Entwicklung der unterirdischen Pflanzenteile

Es sollte festgestellt werden, ob die Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT und die daraus resultierende verzögerte Seneszenz der transgenen Pflanzen einen Einfluss auf die Kartoffelknollenbildung und das Knollenwachstum hat. Zu diesem Zweck wurden die Knollenerträge der IPT-Pflanzen nach Gewächshausanzuchten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. In Abbildung 70 sind die Ergebnisse der Ertragsanalysen der verschiedenen Anzuchten (11.12, 04.13 und 05.13) zusammengestellt. In der Ernte vom November 2012 (11.12) war der Knollenertrag im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht. Die Ernte vom April 2013 (04.13) zeigte eine durchschnittliche Erhöhung des Knollenertrags der Linie IPT_7 um 15% und der Linie IPT_32 um 21% im Vergleich zum Wildtyp, wobei nur die Erhöhung der IPT_7 Linie signifikant war. In der Ernte vom Mai 2013 (05.13) konnte in den IPT-Linien ebenfalls eine Knollenertragssteigerung gezeigt werden. Die Knollenerträge der Linie IPT_7 waren um 33%, IPT_9 um 13%, IPT_32 um 41% und IPT_46 um 11% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Jedoch waren diese Erhöhungen nur in den Linien IPT_7 und IPT_32 signifikant. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass in allen transgenen IPT-Linien der Knollenertrag im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht war und diese Erhöhung in den 14 Wochen (05.13) alten Pflanzen im Vergleich zu den 16 Wochen (04.13) bzw. 18 Wochen (11.12) alten Pflanzen höher war. Demnach schienen die

Kartoffelpflanzen, welche die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimierten, eher mehr Knollenmasse pro Pflanze auszubilden als die Wildtyppflanzen.

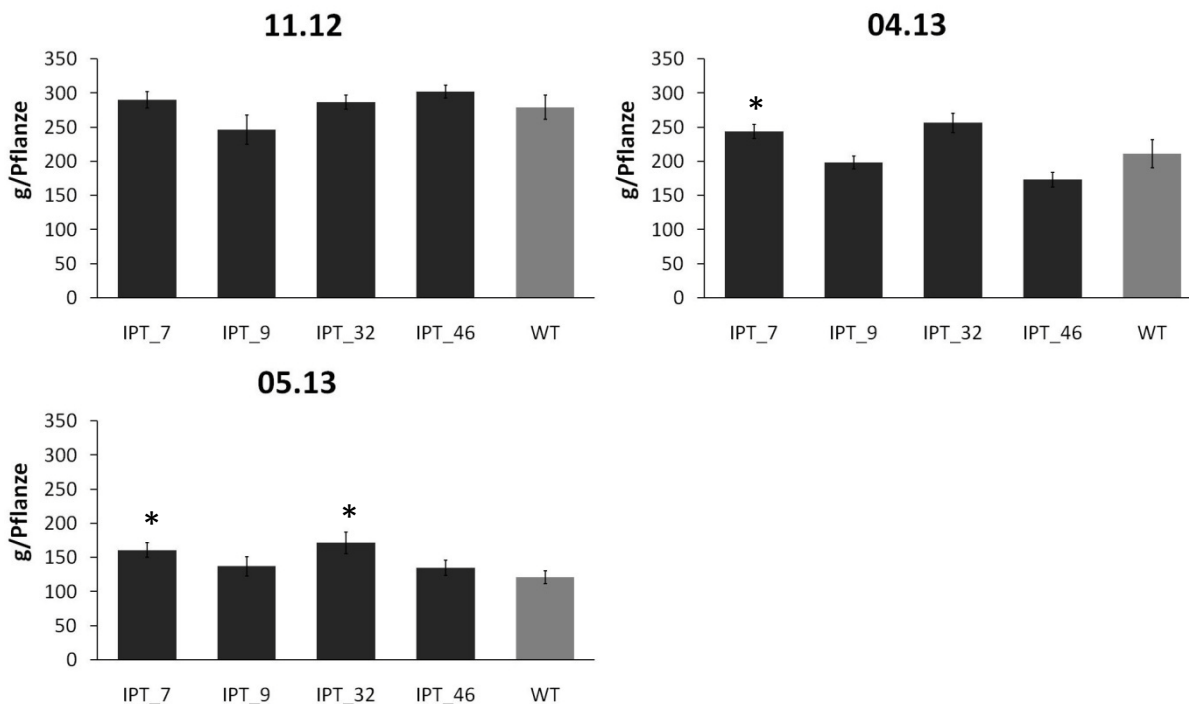


Abbildung 70: Knollenertrag von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Das Knollengewicht von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Knollengewichts (g/Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je n= 10 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler;*= signifikant (p < 0,05). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

Zusätzlich wurde der Ernteindex bestimmt. In Abbildung 70 sind die Ergebnisse der verschiedenen Anzuchten (11.12, 04.13 und 05.13) dargestellt. In der Ernte vom November 2012 (11.12) war der Ernteindex im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht. Die IPT-Pflanzen der Ernte vom April 2013 (04.13) zeigte eine leichte Erhöhung des Ernteindex im Vergleich zum Wildtyp, wobei nur die Erhöhung der IPT_7 Linie signifikant war. In der Ernte vom Mai 2013 (05.13) war der Ernteindex aller transgenen Linien signifikant erhöht. Der Ernteindex der Linie IPT_7 lag bei 0,52, der Linie IPT_9 bei 0,41, der Linie IPT_32 und der Linie IPT_46 bei 0,45. Dies entsprach einer Erhöhung um 20-50% im Vergleich zum Wildtyp mit einem Ernteindex von 0,34. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass in allen transgenen IPT-Linien der Ernteindex im Vergleich zum Wildtyp erhöht war und diese Erhöhung in den 14 Wochen (05.13) alten Pflanzen im Vergleich zu den 16 Wochen (04.13) bzw. 18 Wochen (11.13) alten Pflanzen erhöht war. Jedoch waren diese Erhöhungen nur in der Ernte vom Mai 2013 (05.13) signifikant.

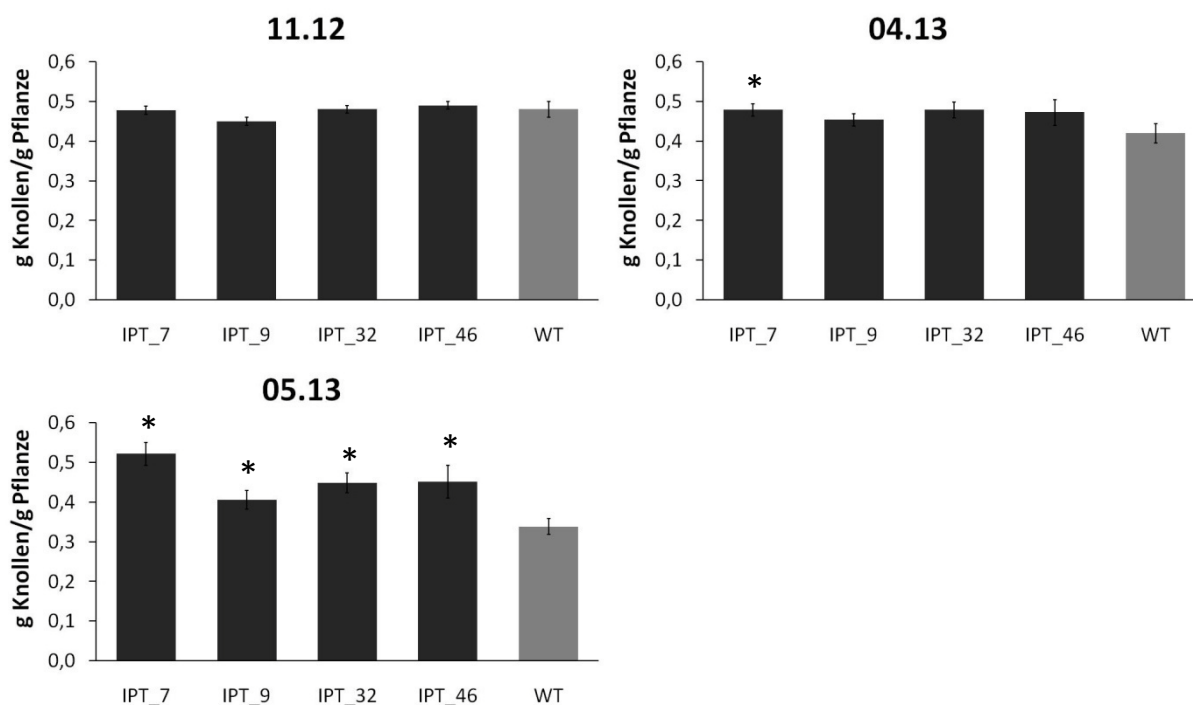


Abbildung 71: Ernteindex von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Ernteindex von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Ernteindex (g Knollen/g Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 10$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

Die Verzögerung der Seneszenz von Pflanzen durch das SAG12-IPT könnte nicht nur das Knollengewicht beeinflussen, sondern aufgrund der verlängerten Photosynthespanne und somit einem möglicherweise verlängerten Assimilatfluss in die Knolle, auch Auswirkungen auf den Metabolismus und auf den Stärkegehalt in den Knollen haben. Daher wurde der Stärkegehalt der Kartoffelknollen der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Durch diese Analyse sollte untersucht werden, ob eine Steigerung des Stärkegehalts vorlag.

Der Stärkegehalt in Kartoffelknollen wurde in den drei verschiedenen Anzuchten (11.12, 04.13 und 05.13) bestimmt. Den Ergebnissen aus Abbildung 72 ist zu entnehmen, dass in allen dargestellten Ernten der Stärkegehalt (in $\mu\text{mol Hexose/g}$) in den Knollen der IPT-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant gesteigert war.

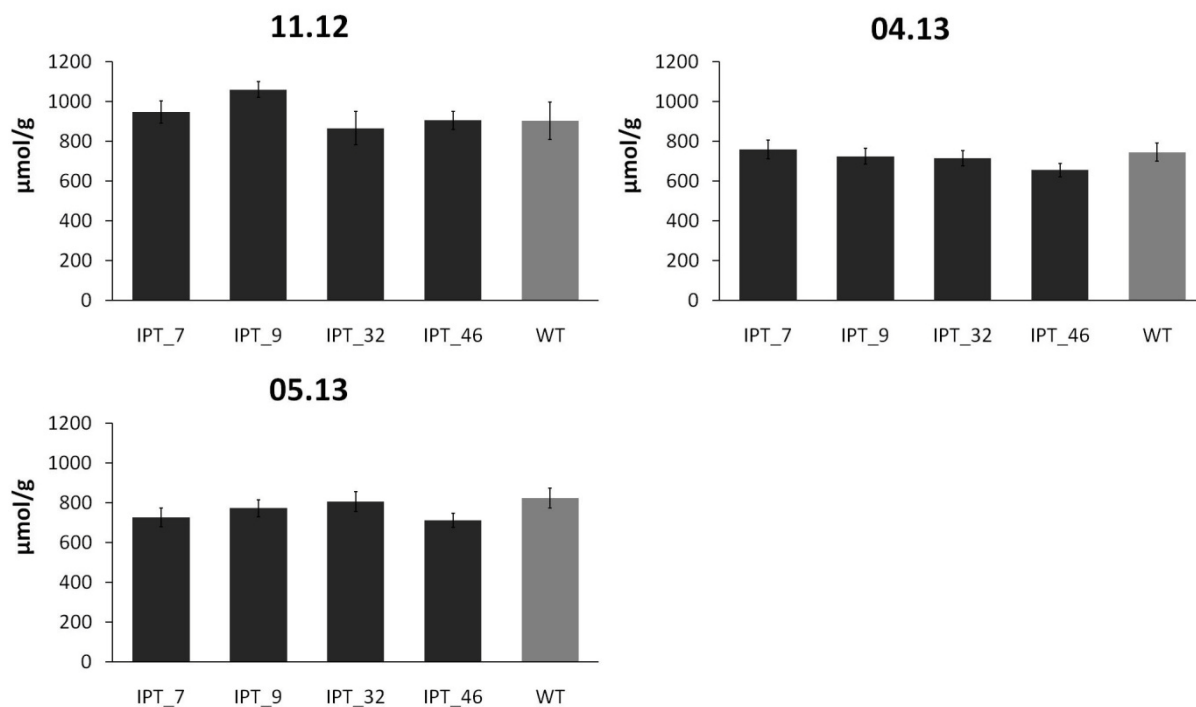


Abbildung 72: Stärkegehalt in den Knollen von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Gehalt an Stärke in den Knollen von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung der Knollenstärke ($\mu\text{mol Hexose/g}$) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 10$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

Neben dem Stärkegehalt wurde auch der Gehalt an löslichen Zuckern in Kartoffelknollen wurde analysiert, um festgestellt, ob die Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT einen Einfluss auf den Zuckergehalt der Knollen hat.

Wie aus der Abbildung 73 deutlich hervor geht, gab es bei den Ernten vom November 2012 (11.12), April 2013 (04.13) und Mai (05.13) leichte Schwankungen im Knollenzuckergehalt. Ähnlich wie beim Stärkegehalt der Knollen konnten keine durchgängigen Änderungen der Zuckergehalte in Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

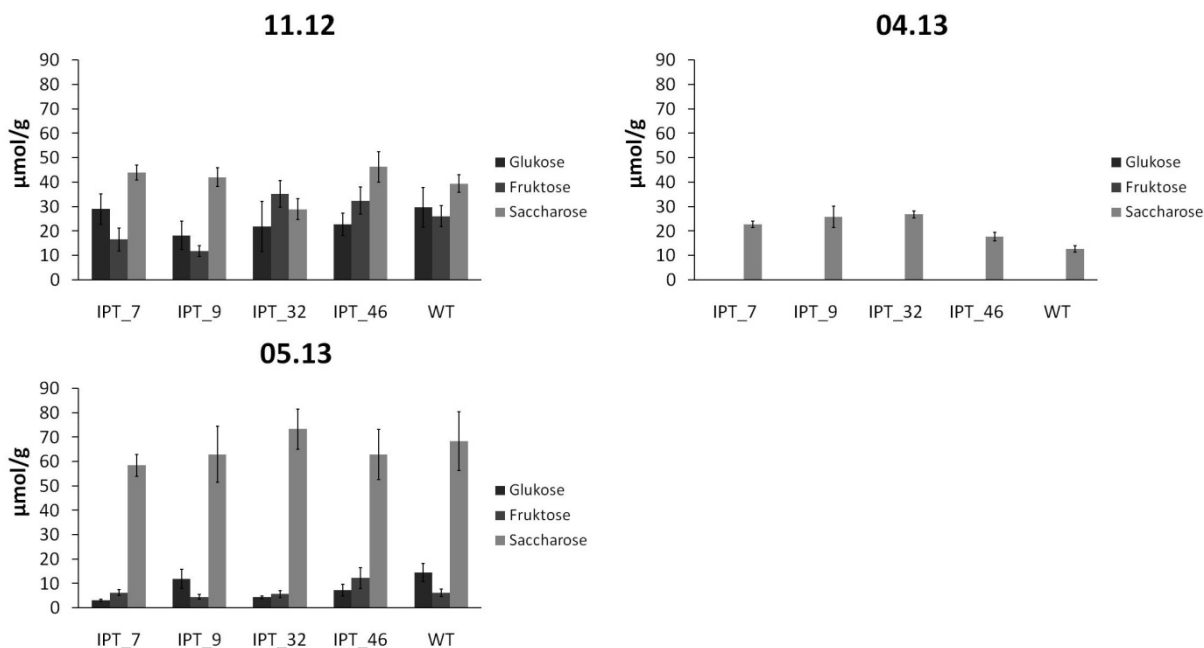


Abbildung 73: Zuckergehalt in den Knollen von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Zuckergehalt in den Knollen von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Knollenzuckers ($\mu\text{mol/g}$) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n=10$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

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 vorlag. Zur Analyse des Stärkeertrags pro Pflanze dienten die Ergebnisse der Ernten 11.12, 04.13 und 05.13. Die Ergebnisse sind in Abbildung 74 dargestellt.

Wie den Resultaten zu entnehmen ist, gab es in den transgenen Kartoffelpflanzen keine durchgängige Erhöhung des Stärkeertrages pro Pflanze. Der Stärkeertrag der transgenen Kartoffelpflanzen war in der Anzucht von November 2012 (11.12) Wildtyp-ähnlich. Dieses Ergebnis wurde in den Anzuchten vom April 2013 (04.13) und Mai 2013 (05.13) bestätigt. Die Ergebnisse der Ernten zeigen, dass die IPT-Pflanzen keinen eindeutig gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze aufwiesen.

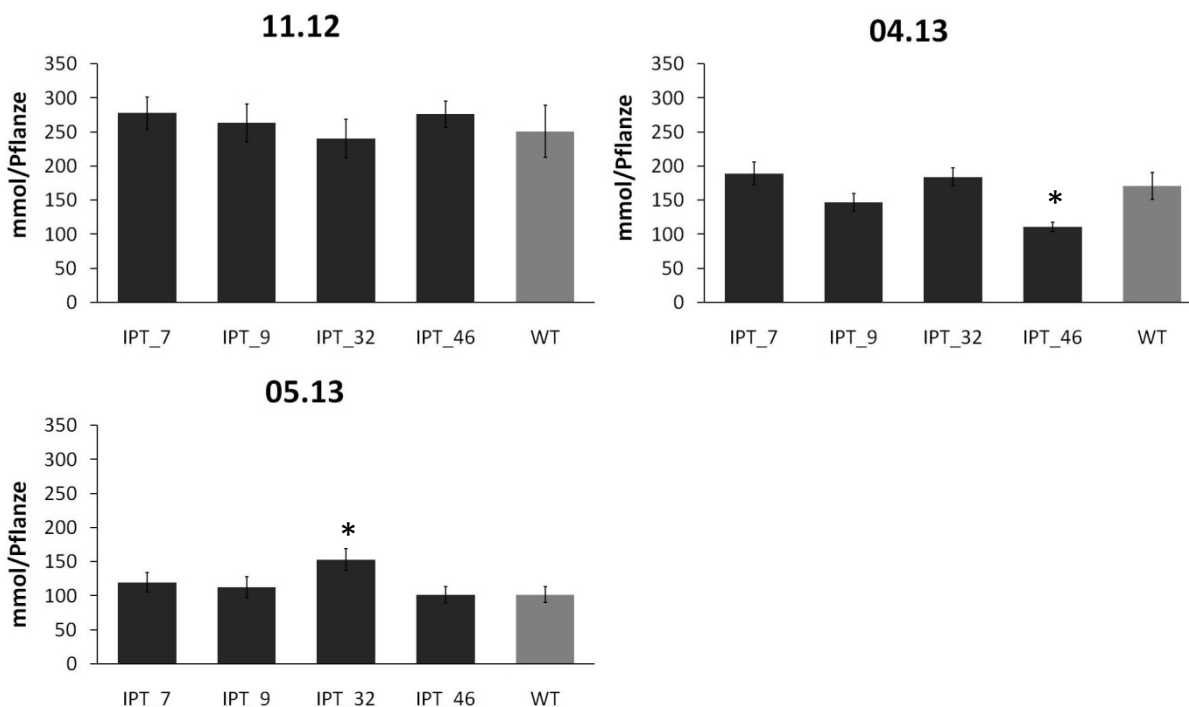


Abbildung 74: Gesamtstärkeertrag von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.

Der Gesamtstärkeertrag von transgenen IPT-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung der Gesamtstärke (mmol/Pflanze) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 10$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 18 Wochen (11.12); 16 Wochen (04.13); 14 Wochen (05.13).

3.2.2.3 Gleichzeitige Überexpression der IPT, des GPT und NTT in *Solanum tuberosum*

Die Stärkesynthese in den Amyloplasten hängt vom Import von Kohlenstoffgrundgerüsten und Energie ab. Um die Energie und die Kohlenstoffgrundgerüste in den Amyloplasten bereitzustellen, sind verschiedene Transporter notwendig. Zum einen der plastidäre Adenylat Transporter (NTT), welcher für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP in den Amyloplasten verantwortlich ist, zum anderen der Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator (GPT), welcher die Bereitstellung der Kohlenstoffgrundgerüste für die Stärkesynthese gewährleistet. Der Import von Energie und Kohlenstoffgrundgerüsten ist für die Stärkesynthese in Amyloplasten unabdingbar (Zhang *et al.*, 2008). Diese Pflanzen zeigten im Gewächshaus Steigerungen im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze im Vergleich zum WT. In Freilandversuchen wiesen diese transgenen Pflanzen hingegen eine leichte Verringerung im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp auf. Darüber hinaus zeigten sie insgesamt ein schlechteres Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile und eine früher einsetzende Seneszenz (Greiten 2008). Es ergab sich die Überlegung die Isopentenyltransferase (IPT) aus *Agrobacterium tumefaciens* unter Kontrolle des

Seneszenz-spezifischen SAG12-Promotors im GPT/NTT-Hintergrund überzuexprimieren. Bereits veröffentlichte Ergebnisse der Versuche, die Seneszenz mit dem SAG12-IPT-System zu verzögern, z.B. in Tabak (Ludewig *et al.*, 2000) und in Tomaten (Swartzberg *et al.*, 2006) waren erfolgreich. Transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* cv. Desirée) 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 pGWB1-SAG12-IPT und B33-pBin-AtNTT1 doppeltransformiert (s. 2.3.2). Die daraus resultierenden Pflanzen erhielten die Bezeichnung IGN (IPT, GPT, NTT1).

3.2.2.3.1 Expressionsanalyse der IPT in *Solanum tuberosum*

Zur Analyse der Expression des IPT-Gens wurde Blattgewebe der transformierten Pflanzen (s. Abbildung 75 rechts) sowie für die Analyse der Expression des GPT-Gens und NTT-Gens wurde Knollengewebe der transformierten Pflanzen (s. Abbildung 75 links) verwendet. Als Kontrolle dienten Wildtyppflanzen. Es wurde aus den Geweben die RNA extrahiert (s. 2.5.3) und die Konzentration bestimmt (s. 2.5.4). Zur Entfernung von noch vorhandenen DNA-Verunreinigungen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (s. 2.5.5) um anschließend die RNA in cDNA umzuschreiben (s. 2.5.6). Diese cDNA diente als Matrize für die PCR (s. 2.5.8).

Aus der Abbildung 75 geht hervor, dass das β -Tubulin in allen Knollenproben (links) und in allen Blattproben (rechts) gleich stark exprimiert wurde. Das β -Tubulin ist ein *housekeeping*-Gen und diente als quantitative Kontrolle. Die Gelbilder (Abbildung 75) zeigen deutlich, dass alle β -Tubulin Amplifikate mit einer Fragmentgröße von 398 bp mit ähnliche Bandenintensität vorhanden waren, so dass man davon ausgehen konnte, dass in allen Proben die gleiche Menge an cDNA vorhanden war. Die Gelbilder der Amplifikate von GPT und NTT aus Knollenproben (links) zeigten, dass in allen IGN Linien die Expression des GPT und NTT vorhanden war. Das Gelbild (rechts) der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate der IPT zeigte 525 bp großen Banden bei allen getesteten IGN-Linien. Die nicht vorhandenen Banden im Wildtyp zeigten, dass nur die gewählten IGN Linien das IPT-Transkript besaßen. Die unterschiedlich starken Bandenintensitäten der IGN-Pflanzen, zeigen, dass das IPT Gen zum analysierten Zeitpunkt aufgrund des Seneszenz-spezifischen Promotors unterschiedlich stark exprimiert wurde.

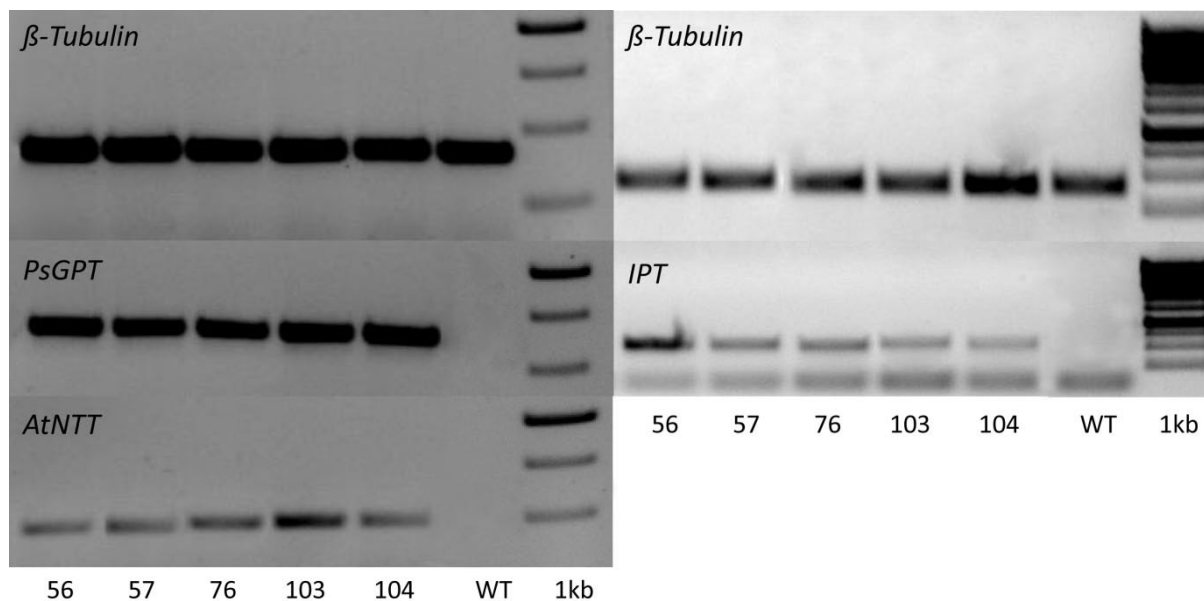


Abbildung 75: Expressionsanalysen des GPT, NTT und IPT mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.

Es wurde das Standard PCR-Programm mit den primerspezifischen Annealing Temperaturen und 30 Zyklen verwendet. Die Transkriptmengen der Gene wurde mit Hilfe einer PCR auf cDNA aus Knollengewebe (links) und aus Blattgewebe (rechts) nachgewiesen; 56, 57, 76, 103 und 104: Nummerierung der IGN-Pflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren. Die BGA31-Linie ist durch eine knollenspezifische Überexpression des *PsGPT* und *AtNTT1* charakterisiert. WT: Wildtyp; 1kb-Leiter (Fermentas). Die zu erwartenden Bandengrößen der PCR-Produkte betragen 398 bp (*β-Tubulin*), 589 bp (*PsGPT*), 480 bp (*AtNTT1*) und 708 bp (*IPT*).

3.2.2.3.2 Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile im Gewächshaus

Die ausgewählten dreifach transgenen IGN-Linien 56, 57, 103 und 104 wurden in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert. Nach vier Wochen wurde die eine Hälfte der Pflanzen in die Hochlichtkammer transferiert, die andere Hälfte blieb im Gewächshaus. Beide Anzuchten wurden nach 12 Wochen geerntet und miteinander verglichen. Aufgrund der höheren Lichtintensität der Hochlichtkammer sind die Pflanzen möglicherweise gestresst und könnten dadurch schneller seneszent werden. Die doppelt transgene Linie, welche simultan den *PsGPT* und *AtNTT1* unter Kontrolle des knollenspezifischen Promotors B33 exprimierten, wiesen im Gewächshaus 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 auf (Zhang *et al.*, 2008). Diese Kartoffelpflanzen zeigten jedoch im Freilandversuch diese Ertragssteigerung nicht, sondern ein schlechteres Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile und eine früher einsetzende Seneszenz.

Die Verzögerung der Seneszenz von Pflanzen durch die Seneszenz-spezifische Cytokininproduktion könnte das Wachstum der oberirdischen grünen Pflanzenteile beeinflussen. Daher wurde das

Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile bei den Ernten ermittelt. In Abbildung 76 sind die Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile (Grüngewicht) der beiden Anzuchten (Gewächshaus und Hochlichtkammer) dargestellt. Eine eindeutige Tendenz war nicht zu beobachten. In der Gewächshausanzucht waren die Grüngewichte der transgenen Pflanzen welche die IPT, den NTT und GPT überexprimieren mit dem Grüngewicht des Wildtyps nahezu. Lediglich die Linie IGN_104 der transgenen Pflanzen der Hochlichtanzucht zeigte ein leicht erhöhtes Grüngewicht im Vergleich zum Wildtyp. Vergleicht man die beide Anzuchten untereinander, so zeigte sich, dass die Pflanzen aus der Hochlichtkammer generell ein leicht höheres Grüngewicht im Vergleich zur Gewächshausanzucht zeigten.

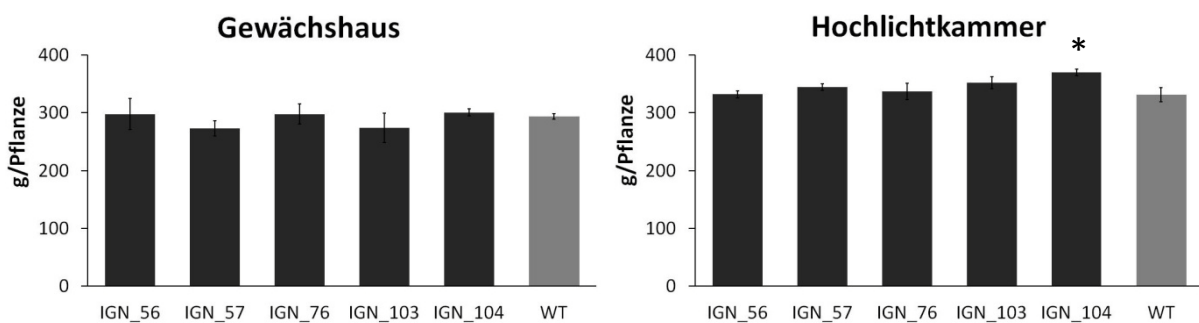


Abbildung 76: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.

Das Grüngewicht von transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Grüngewichts (g/Pflanze) wurden je n= 5 Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

Der Chlorophyllgehalt diente ebenso wie die CO_2 -Assimilation als Marker für den Fortschritt der Seneszenz in den Pflanzen. In Abbildung 77 sind die Ergebnisse der CO_2 -Assimilationsmessungen bei $400 \mu\text{E}$ und die Ergebnisse der Chlorophyllgehalte der IGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp aus der Hochlichtanzucht dargestellt. Die Messungen wurden am frühen Nachmittag vom sechsten voll ausgebildetem Fiederblatt von oben durchgeführt. Wie aus den Daten der CO_2 -Assimilation ersichtlich wird, zeigten alle IGN-Pflanzen nach zwölfwöchiger Anzucht eine signifikante Erhöhung der CO_2 -Assimilation der jungen Blätter im Vergleich zum Wildtyp. Die Assimilation war in Linie IGN_56 um 105%, in IGN_57 um 105%, in IGN_76 um 106%, in Linie IGN_103 um 153 % und in Linie IGN_104 um 130% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Der Chlorophyllgehalt der jungen Blätter war in zwei der fünf IGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. In Linie IGN_56 um 27% und in Linie IGN_103 um 22%. Die anderen Linien wiesen ähnlich Chlorophyllgehalte wie der Wildtyp auf.

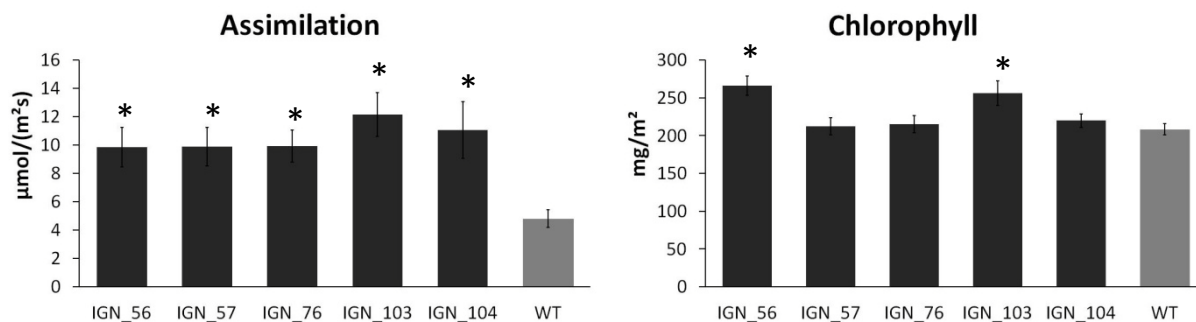


Abbildung 77: Assimilation und Chlorophyllgehalt der jungen Blätter von IGN und Wildtyppflanzen aus der Hochlichtkammeranzucht.

Die CO_2 -Assimilation und der Chlorophyllgehalt in jungen Blättern von transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Parameters Assimilation ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$) und des Chlorophyllgehalts (mg/m^2) wurden je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

Da die untersuchten einfach transgenen IPT-Pflanzen (3.2.2.2) in den Blättern eine leicht erhöhte Akkumulation der Blattstärke aufwiesen, war es interessant, ob dieser Trend auch bei den dreifach transgenen Kartoffelpflanzen zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurde der Gehalt an Stärke und Zucker in den Blättern der Pflanzen aus der Hochlichtanzucht analysiert. Das Probenmaterial wurde am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildetem Fiederblatt genommen. In Abbildung 78 sind die Ergebnisse der Stärke- und der Zuckerbestimmung dargestellt. Aus den Analysen wird deutlich, dass der Stärkegehalt in den Blättern der IGN-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht war. Der Stärkegehalt war in Linie IGN_56 um 310%, in IGN_57 um 185%, in IGN_76 um 173%, IGN_103 um 285% und in Linie IGN_104 um 278% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Blutzucker zeigten keine Unterschiede.

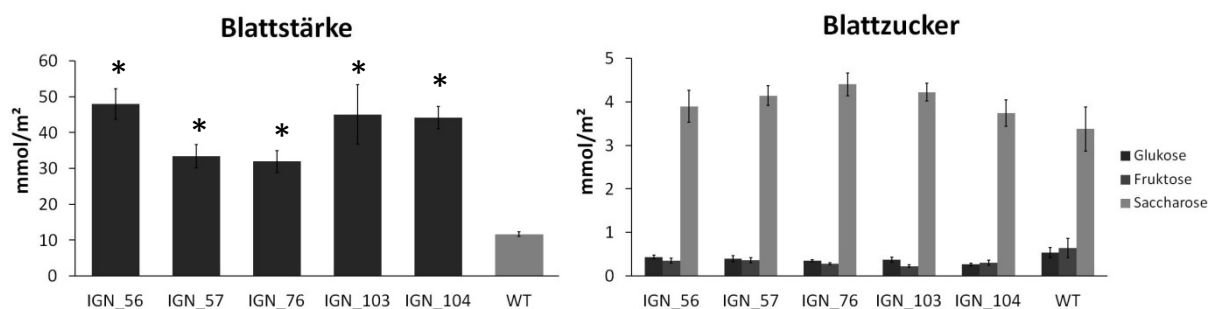


Abbildung 78: Stärke- und Zuckergehalt der Blätter von IGN und Wildtyppflanzen aus der Hochlichtkammeranzucht.

Der Stärke- und der Zuckergehalt in jungen Blättern von transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Parameter Stärkegehalt (mmol/m^2) und Zuckergehalt (mmol/m^2) wurden für die einzelnen unabhängigen Ernten je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

3.2.2.3.3 Entwicklung der unterirdischen Pflanzenteile

Es sollte festgestellt werden, ob die Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT und die daraus resultierende verzögerte Seneszenz der transgenen Pflanzen einen Einfluss auf die Kartoffelknollenbildung und das Knollenwachstum hat. Zu diesem Zweck wurden die Knollenerträge der IGN-Pflanzen nach einer Anzucht im Gewächshaus und in der Hochlichtkammer im Vergleich zum Wildtyp untersucht. In Abbildung 79 sind die Ergebnisse der Ertragsanalysen der beiden Anzuchten (Gewächshaus und Hochlichtkammer) zusammengestellt. In beiden Ernten war der Knollenertrag im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht. Demnach kann keine Aussage über die Wirksamkeit der zusätzlich exprimierten IPT gemacht werden.

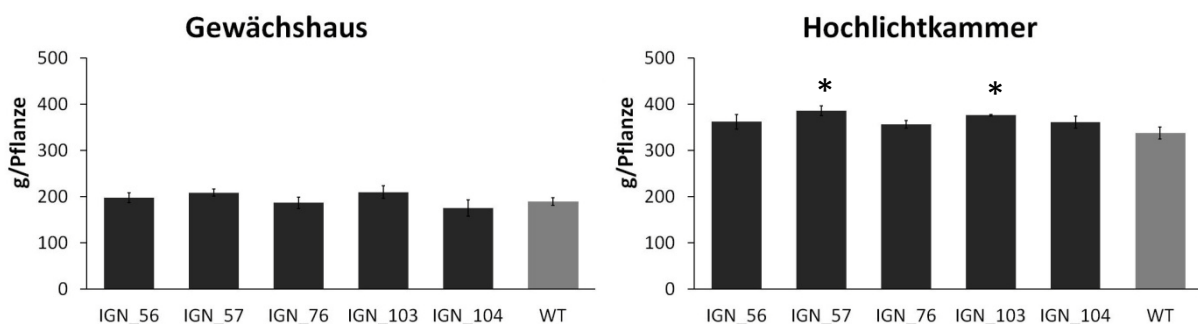


Abbildung 79: Knollenertrag von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.

Der Knollenertrag von transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Knollengewichts (g/Pflanze) wurden je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

Zusätzlich wurde der Ernteindex bestimmt. In Abbildung 80 sind die Ergebnisse der beiden Anzuchten (Gewächshaus und Hochlichtkammer) dargestellt. Auch beim Ernteindex zeigten sich keine signifikanten Änderungen. Vergleicht man die beiden Anzuchten untereinander, so zeigt sich, dass die Pflanzen aus der Hochlichtkammer einen höheren Ernteindex aufwiesen. Der Ernteindex lag im Durchschnitt bei allen Pflanzen aus der Hochlichtkammer bei 0,5, wobei der Ernteindex aus der Gewächshausanzucht bei 0,4 lag.

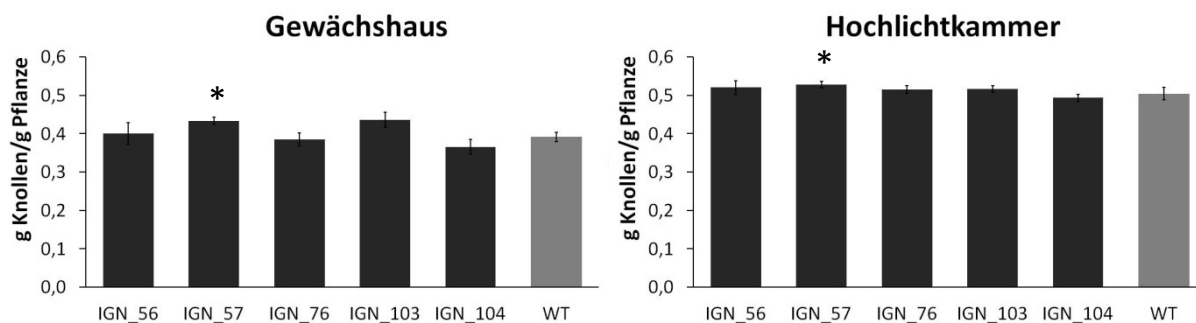


Abbildung 80: Ernteindex von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.

Der Ernteindex von transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Ernteindex (g Knollen/g Pflanze) wurden je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

Aufgrund der Verzögerung der Seneszenz durch die Seneszenz-spezifische Cytokininproduktion könnte es zu einem verlängertem Assimilatfluss in die Knollen führen. Daher wurde der Stärkegehalt der Kartoffelknollen der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Durch diese Analyse sollte untersucht werden, ob eine zusätzliche Steigerung des Stärkegehalts vorlag.

Den Ergebnissen aus Abbildung 81 ist zu entnehmen, dass in den beiden Ernten der Stärkegehalt (in $\mu\text{mol Hexose/g}$) in den Knollen der IGN-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant gesteigert war. In der Hochlichtanzucht war der Stärkegehalt in Linie IGN_56 um 21%, in IGN_57 um 24% und in IGN_76 um 17%, im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Linie IGN_103 zeigte keine Steigerung im Stärkegehalt und die Linie IGN_104 wies sogar einen um 11% verringerten Stärkegehalt im Vergleich zum Wildtyp auf. Auch in der Gewächshausanzucht hatte die Linie_104 den geringsten Stärkegehalt im Vergleich der dreifach transgenen Pflanzen untereinander. In der Gewächshausanzucht war der Stärkegehalt in Linie IGN_56 um 45%, in IGN_57 um 47%, in IGN_76 um 20% und Linie_103 um 15% erhöht im Vergleich zum Wildtyp.

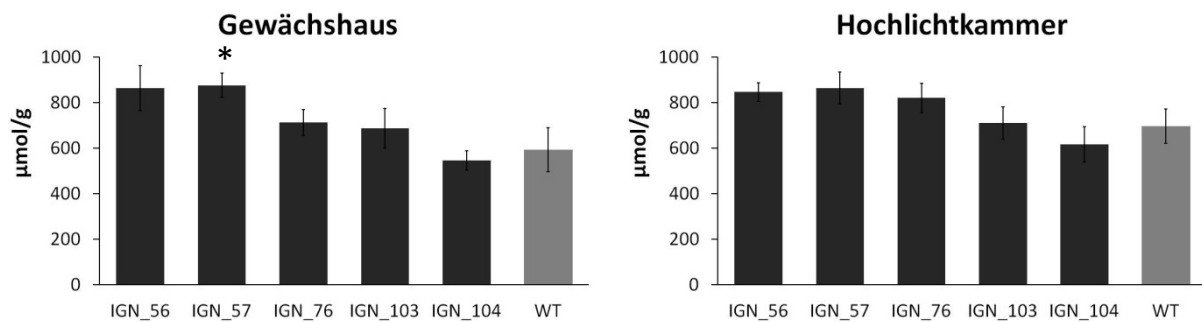


Abbildung 81: Stärkegehalt in Kartoffelknollen von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.

Der Stärkegehalt in den Kartoffelknollen von transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Stärkegehalts ($\mu\text{mol Hexose/g}$) wurden je $n=5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

Der Einfluss auf den Gehalt an löslichen Zuckern in Kartoffelknollen wurde ebenfalls analysiert.

Wie aus der Abbildung 82 deutlich hervor geht, gab es bei den beiden Anzuchten leichte Schwankungen im Knollenzuckergehalt. Es konnten jedoch keine konsistenten Änderungen der Zuckergehalte in Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

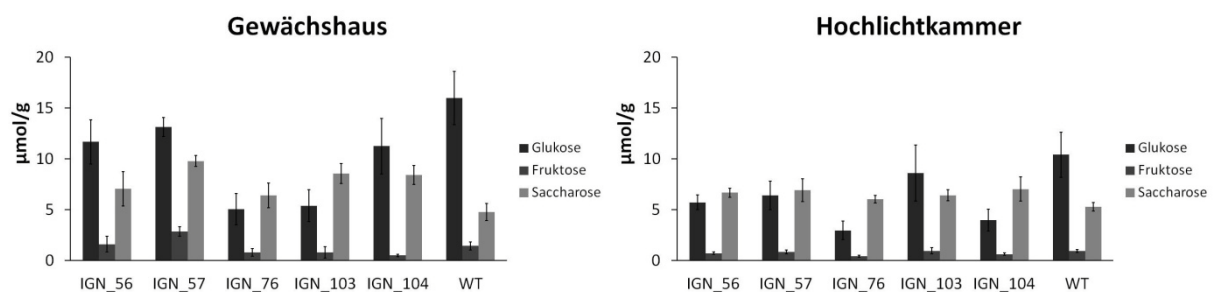


Abbildung 82: Zuckergehalt in Kartoffelknollen von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.

Der Zuckergehalt in Kartoffelknollen der transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung des Zuckergehalt ($\mu\text{mol/g}$) wurden je $n=5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

Wie bereits beschrieben, ist der Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze 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 wirkliche Ertragsteigerung vorliegt.

Wie aus den Resultaten in Abbildung 83 zu entnehmen ist, gab es in den transgenen Kartoffelpflanzen keine durchgängige signifikante Erhöhung des Stärkeertrages pro Pflanze. Lediglich die Linie IGN_57 zeigte einen um 40% gesteigerten Stärkeertrag im Vergleich zum Wildtyp. Die Linie IGN_56 zeigte einen um 29% gesteigerten Stärkeertrag und die Linie IGN_76 um 12%. Die anderen IGN-Linien zeigten Wildtypähnliche Stärkeerträge in der Anzucht in der Hochlichtkammer. Der Stärkeertrag der transgenen Kartoffelpflanzen war in der Gewächshausanzucht im Vergleich zur Anzucht Hochlichtkammer geringer. Die dargestellten Ergebnisse der beiden Anzuchten zeigten, dass die IGN-Pflanzen keinen eindeutig gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze aufwiesen. Auch in der Gewächshausanzucht zeigte die Linie IGN_57 einen gesteigerten Stärkeertrag um 47% im Vergleich zum Wildtyp. Die Linie IGN_56 zeigte einen gesteigerten Stärkeertrag um 38% und die Linie IGN_76 um 24%. Die anderen IGN-Linien zeigten Wildtyp-ähnliche Stärkeerträge in der Gewächshausanzucht. In beiden Anzuchten waren ähnliche Tendenzen im Stärkegehalt zu sehen.

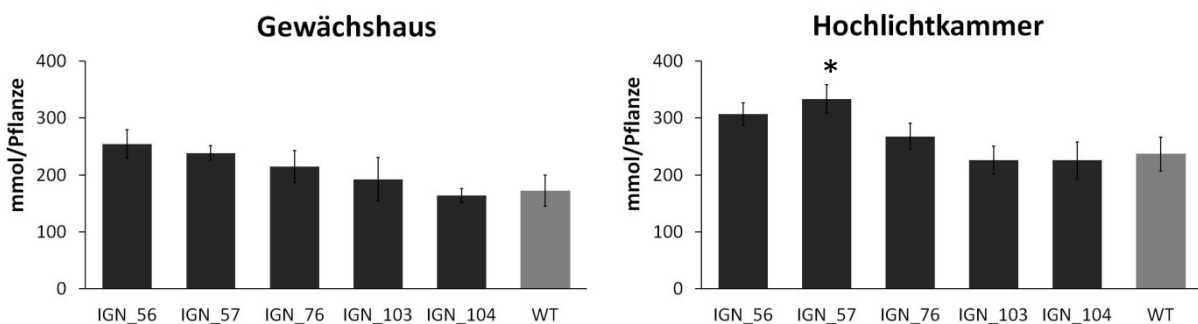


Abbildung 83: Gesamtstärkeertrag von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.

Der Gesamtstärkeertrag der transgenen IGN-Kartoffelpflanzen, die die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren sowie den *PsGPT* und den *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, und des Wildtyps (WT) wurde analysiert. Zur Bestimmung der Gesamtstärke (mmol Hexose/Pflanze) wurden je $n = 5$ Kartoffelpflanzen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; * = signifikant ($p < 0,05$). Pflanzenalter zum Erntezeitpunkt: 12 Wochen.

4 Diskussion

4.1 Entwicklungsabhängige Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus und biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanze *Beta vulgaris* (Zuckerrübe)

In diesem Teil der Arbeit standen die entwicklungsabhängigen Untersuchungen zum Kohlenstoffmetabolismus von Zuckerrübenpflanzen unter Gewächshausbedingungen im Fokus. Die Zuckerrübenpflanzen sollten hinsichtlich ihrer Entwicklung über einen Zeitraum von fünf Monaten auf verschiedene Parameter hin analysiert werden. Darüber hinaus sollten die Transkriptmengen verschiedener am Kohlenstoffmetabolismus beteiligter Gene untersucht werden. Zudem sollte analysiert werden, wie weit die Anzuchtbedingungen das Wachstum der Pflanzen im Gewächshaus im Vergleich zur Freilandanzucht beeinflussen. Zur Ertragssteigerung von Zuckerrüben sollten zwei biotechnologische Ansätze angewendet werden. Zum einen sollte die *source*-Kapazität, zum anderen die *sink*-Kapazität in Zuckerrübenpflanzen erhöht werden.

4.1.1 Zeitabhängige Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingungen

Die Ergebnisse der zeitabhängigen Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingungen zeigen, dass es eine Beziehung zwischen Grüngewicht, Grünfläche und Blattanzahl gab (s. 3.1.1.1). Mit zunehmendem Rübenalter nahmen das Grüngewicht, die Grünfläche und die Anzahl der Blätter zu. Je größer die Blattanzahl und Grünfläche waren, desto höher war das Grüngewicht. Nach fünfmonatiger Anzucht hatten die Pflanzen durchschnittlich 35 Blätter, wobei mit zunehmendem Pflanzenalter die Größe der nachwachsenden Blätter abnahm. Hierbei handelt es sich um ein bereits bekanntes Phänomen (Clark *et al.*, 1978). Wie unter optimalen Bedingungen im Freiland (mitzucker.de) bildeten die Zuckerrübenpflanze im Gewächshaus im Durchschnitt drei neue Blätter pro Woche aus. Nachdem die maximale Grünfläche bzw. das maximale Grüngewicht ausgebildet wurde, war ein stetiger Massezuwachs der Rübenpfahlwurzel zu beobachten (s. 3.1.1.3). Wenn Zuckerrübenpflanzen im Freiland den Blattbestandschluss erreichen, nimmt das Rübenwachstum deutlich zu (proplanta.de). Von Blattbestandschluss im Feld spricht man, wenn sich die Blätter der benachbarten Reihen berühren. Die Blätter wachsen schneller als der Rübenkörper (imar-agar.de); dies spiegeln auch die hier gewonnenen Daten wider. Nach Ausbildung der Grünfläche war eine stetige Gewichtszunahme der Rübenpfahlwurzel zu erkennen, wobei eine deutliche Akkumulation der Saccharose in der Rübenpfahlwurzel etwas zeitverzögert einsetzte. Der verstärkte Rübenaufbau

und die vermehrte Saccharoseeinlagerung in die Vakuolen der Rübenpfahlwurzel zeigen, dass mehr Saccharose ins *sink*-Gewebe transportiert wurde (s. 3.1.1.4). Um den erhöhten Saccharosefluss in die *sink*-Organe auszugleichen, wurde vermutlich der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese reduziert. Diese Annahme wird auch durch das Blattstärke/Blattzucker Verhältnis unterstützt (s. 3.1.1.2). In den jungen Rüben war das Blattstärke/Blattzucker Verhältnis am höchsten und nahm mit zunehmendem Alter ab. Die Umleitung der Assimilate in die Saccharosesynthese und in die Saccharosespeicherung in der Rübenpfahlwurzel, würden die niedrigeren Blattstärkegehalte mit zunehmendem Alter erklären. Auch die 24-h-Analysen des Blattstärkegehalts zeigten, dass mit zunehmendem Pflanzenalter weniger Blattstärke tagsüber synthetisiert wurde (s. 3.1.1.2).

Der Saccharosegehalt in den Rübenpfahlwurzeln erreichte nach fünfmonatiger Anzucht im Gewächshaus bis zu 19% vom Frischgewicht (s. 3.1.1.4), was den Anzuchten im Feld gleichkommt. Im Freiland angezogene Zuckerrübenpflanzen erreichen je nach Sorte zwischen 18-24% (KWS, 2014). Es wurden keine erkennbaren Unterschiede der Vakuolengröße mit zunehmendem Alter festgestellt (s. 3.1.1.6). Dies ist wahrscheinlich auf die Charakteristik des Rübenpfahlwurzelwachstums zurückzuführen, denn das Wachstum erfolgt nicht durch expandierende Zellen, sondern durch Zellteilung des primären und des sekundären Kambiums (Rapoport *et al.*, 1986). Der pH-Wert innerhalb der Vakuole konnte, wie erwartet, mittels Acridinorange Färbung als sauer eingestuft werden (s. 3.1.1.7). Eine weitere Eingrenzung des pH-Werts wurde nicht durchgeführt. Um mit Hilfe eines Saccharose-Protonen-Antiports Saccharose in die Vakuole zu transportieren, muss eine erhöhte Konzentration an Protonen zur Aufrechterhaltung des Protonengradienten über die Tonoplastenmembran in der Vakuole vorliegen, daher liegt normalerweise der pH-Wert von Vakuolen im sauren Bereich zwischen 5,0 und 5,5 (Taiz 1992).

Das Gewebe des Rübenkopfs und des Blattansatzes wies einen erhöhten lignifizierten Anteil auf (s. 3.1.1.6). Dieser Bereich der Rübe dient als Verankerung der Blätter und ist daher durch Lignin verstärkt. Die Quantifizierung zeigte, dass der Ligningehalt mit 0,15% bezogen auf das Trockengewicht, mit bereits veröffentlichten Daten übereinstimmt (Dongowski 1993).

Die Expression des GPTs in der Pfahlwurzel war unter den analysierten Bedingungen immer gleich stark. Der gleiche Trend war auch bei dem NTT, dem TMT1 und der AGPase zu beobachten (s. 3.1.1.5). Der GPT transportiert Glukose-6-phosphat im Gegentausch mit P_i oder Triosephosphaten aus dem Cytosol in die Amyloplasten (Kammerer *et al.*, 1998). Die Stärkesynthese erfolgt ausgehend von G6P in den Amyloplasten analog zur Stärkesynthese in Chloroplasten über die Enzyme plastidäre PGM und AGPase, sowie verschiedene Stärkesynthasen und Stärkeverzweigungsenzyme. Jedoch konnte keine Stärke in den Rübenpfahlwurzeln gefunden werden. G6P ist allerdings nicht nur Substrat für die Stärkesynthese, sondern kann auch im oxidativen Pentosephosphatweg weiter reagieren und ist z.B. Ausgang für die Fettsäuresynthese (Kammerer *et al.*, 1998). Es ist jedoch

ungeklärt, warum die AGPase in den Rübenpfahlwurzeln exprimiert ist, obwohl keine Stärke in den Rübenpfahlwurzeln nachweisbar war. Das Enzym ist zwar auf transkriptioneller Ebene nachweisbar, ob es aber auch aktiv bzw. funktionell war, ist unklar.

Die unveränderte Expression des NTT (s. 3.1.1.5) ist vermutlich auf die Versorgung der Amyloplasten mit Energie in Form von ATP zu erklären, denn der NTT transportiert ATP im Austausch mit ADP und P_i in die Amyloplasten (Kampfenkel *et al.*, 1995b, Trentmann *et al.*, 2008). ATP wird ebenfalls für die Fettsäuresynthese benötigt. Fettsäuren werden beispielsweise für den Aufbau von Membranen benötigt, welche für das Wachstum der Rübenpfahlwurzel essentiell sind.

Im Allgemeinen zeigen die Expressionen der analysierten Gene (s. 3.1.1.5), dass diese teilweise abhängig vom Entwicklungsstand der Rübe exprimiert wurden. Das sagt aber nichts über die Aktivität der entsprechenden Enzyme aus. Es gibt beispielsweise Transporter, die posttranslational modifiziert werden, wodurch deren Aktivität reguliert wird. Der TMT1 beispielsweise zeigte keine Expressionsänderung. Jedoch ist bekannt, dass die TMTs aus *Arabidopsis thaliana* von einer Mitogen-activated triple kinase (MAP3K) phosphoryliert werden, wodurch deren Aktivitäten erhöht werden (Wingenter *et al.*, 2011).

Zusammenfassend konnte ein kontinuierliches Wachstum der Zuckerrübenpflanzen beobachtet werden. Das Wachstum der Pflanzen lässt sich in drei Phasen einteilen: 1. Phase: Aufbau der Blattmasse; 2. Phase: Aufbau der Rübenmasse; 3. Phase: Akkumulation der Saccharose. Es wurden freilandähnliche Zuckergehalte in der Rübenpfahlwurzel gemessen. Darüber hinaus ähnelt das Wachstum der im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen dem im Freiland.

4.1.2 Lichtabhängige Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingung

Nachdem die Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Standardlichtbedingungen im Gewächshaus untersucht wurde, sollte der Einfluss verschiedener Lichtbedingungen analysiert werden. Um eine mögliche Wachstumslimitierung aufzudecken, wurden Zuckerrübenpflanzen im Gewächshaus unter „wenig“ Licht mit einer Lichtintensität von $\approx 150 \text{ mmol}/(\text{m}^2\text{s})$ ohne Zusatzbeleuchtung, unter „normal“ Licht von $\approx 220 \text{ mmol}/(\text{m}^2\text{s})$, welches in den anderen Experimenten als Standard verwendet wurde, und unter „viel“ Licht mit $\approx 300 \text{ mmol}/(\text{m}^2\text{s})$ angezogen und die Wachstumsparameter miteinander verglichen.

In den ersten zwei Monaten gab es keinen Unterschied im Grüngewicht der Zuckerrübenpflanzen unter den verschiedenen Lichtbedingungen. Es kristallisierte sich jedoch heraus, dass mit zunehmendem Alter und zunehmender Lichtintensität die Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile beschleunigt war. Parameter wie das Grüngewicht, Gesamtfläche der Blätter, sowie

die Anzahl der Blätter waren erhöht (s. 3.1.2.1). Das Pfahlwurzelgewicht nahm ebenfalls mit zunehmender Lichtintensität zu (s. 3.1.2.3).

Licht hat einen großen Einfluss auf die Blattentwicklung und spielt eine wichtige Rolle für eine Vielzahl von Genen und Transkriptionsfaktoren, welche an der Photosynthese beteiligt sind (Smith *et al.*, 2000). Daher war es nicht überraschend, dass mit zunehmender Lichtintensität auch die CO₂-Assimilation zunahm (s. 3.1.2.1). Blackman und Wilson (1951) zeigten, dass die Netto-Assimilation einen signifikanten Effekt auf den Stoffwechsel der Pflanzen hat und dass mit Anstieg der Lichtintensität die Netto-Assimilation erhöht war. Die höhere Lichtintensität führt wahrscheinlich zu einer erhöhten Netto-Assimilation und somit zu einer erhöhten *source*-Kapazität. Die erhöhte Lichtintensität führte vermutlich zu einer erhöhten Netto-Assimilation was zur verbesserten Versorgung der *sink*-Organe mit Saccharose zum Aufbau der jungen Blätter und der Rübenpfahlwurzel beitrug, was den beschleunigten Aufbau der Grünfläche bzw. des Grüngewichts und der Rübenpfahlwurzel möglicherweise erklärt. Die Erhöhung der *source*-Kapazität und die daraus resultierende beschleunigte Entwicklung und das beschleunigte Wachstum zeigen, dass das Rübenwachstum wahrscheinlich unter den analysierten Bedingungen *source*-limitiert war. Versuche mit erhöhten CO₂-Konzentrationen zeigten bei Zuckerrübenpflanzen ebenfalls ein beschleunigtes Wachstum der Blätter und der Rübe (Demmers-Derks *et al.*, 1998, Romanova *et al.*, 2002). Zusätzlich führte die höhere CO₂-Assimilation möglicherweise zu einer verstärkten Synthese von transitorischer Stärke in den Blättern. Diese Annahme wird durch die Zunahme des Blattstärkegehalts mit zunehmender Lichtintensität unterstützt. Erhöhten CO₂-Konzentrationen führten zu einer Erhöhung der Photosyntheseleistung der Zuckerrübenpflanzen, welche ebenfalls das Wachstum positiv beeinflussen (Long *et al.*, 2004). Ludewig und Sonnewald (2000) zeigten, dass Tabakpflanzen unter erhöhten CO₂-Bedingungen und der daraus folgenden höheren CO₂-Assimilation mehr Stärke in den Blättern akkumulierten.

Die Lichtintensität konnte jedoch nicht beliebig erhöht werden. Versuche mit höheren Lichtintensitäten haben gezeigt, dass eine Ertragserhöhung unter den hier gewählten Bedingungen ab einer Lichtintensität von 400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ nicht mehr möglich war. Pflanzen, denen noch mehr Licht zur Verfügung gestellt wurde, zeigten keine Ertragssteigerung mehr, sondern eher ein leicht vermindertes Wachstum (Rowold 2013). Im Freiland bilden Zuckerrüben bei einer durchschnittlichen Tagestemperatur von 18 °C rund drei Blätter pro Tag aus, wobei höhere Tagesdurchschnittstemperaturen sich negativ auf das Blattwachstum auswirken (mitzucker.de). Um die unterschiedlichen Lichtbedingungen im Gewächshaus gewährleisten, wurden Lichtquellen mit unterschiedlichen Abständen zu den Pflanzen verwendet, wobei die höchste Lichtintensität am nächsten zu den Pflanzen war. Dies hatte zur Folge, dass die Pflanzen unter „viel“ Licht aufgrund der

Wärmeabgabe der Lichtquelle einer höheren Umgebungstemperatur ausgesetzt waren und sich dies vermutlich negativ auf das Wachstum auswirkte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Lichtintensität einen großen Einfluss auf den Rübenpfahlwurzelbau hat. Die bisher gewählte Standardlicheinstellung sollte also erhöht werden, um eine Limitierung durch zu niedrige Lichtintensitäten ausschließen zu können.

4.1.3 Anbau- und Wachstumsphasen-abhängige Transkriptanalysen von *Beta vulgaris*

Neben den Transkriptmengen von verschiedenen Genen vor und während der Zuckerspeicherphase sollten auch die Wachstumsparameter der Zuckerrübenpflanzen im Freiland und im Gewächshaus aufgenommen werden, um Unterschiede im Wachstum zwischen Gewächshausrüben und Feldrüben näher zu analysieren.

Nach zweimonatiger Anzucht gab es keine Unterschiede in den analysierten Parametern, wie Grüngewicht, Grünfläche, Rübengewicht und Rübenlänge (s. 3.1.3). Nach fünfmonatiger Anzucht wiesen die Freilandrüben erhöhtes Grüngewicht, erhöhte Grünfläche und Stärkegehalte auf (s. 3.1.3.1), was auf mögliche Umwelteinflüsse, wie z.B. Lichtintensität und Standort der Pflanzen zurückzuführen sein könnte. Die Zuckerrüben im Gewächshaus bekamen im Vergleich zu den im Freiland angezogenen Pflanzen aufgrund der zusätzlichen vorhandenen Lichtstrahlung der Gewächshauslampen mehr Licht. Manderscheidt *et al.*, (2010) zeigten in Freilandversuchen, dass beschattete Zuckerrübenpflanzen eine deutlich größere Grünfläche aufwiesen. Aufgrund der vermutlich höheren Lichtintensität im Gewächshaus waren die Blätter der im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen kleiner. Darüber hinaus ist bekannt, dass Blätter von Schattenpflanzen im Vergleich zu Sonnenpflanzen größer sind und sich zusätzlich in ihrer Struktur unterscheiden (Sitte *et al.*, 1998). Darüber hinaus spielt bei der Entwicklung der Zuckerrübenblätter die Umgebungstemperatur eine große Rolle. Ideal für das Blattwachstum sind durchschnittliche Tagestemperaturen um die 18 °C (mitzucker.de). Im Juni und Juli herrschten im Gewächshaus im Vergleich zum Freiland deutlich höhere Temperaturen, was möglicherweise einen negativen Einfluss auf das Blattwachstum der Gewächshauspflanzen hatte.

Mit der größeren Grünfläche ist auch das höhere Grüngewicht der Freilandpflanzen zu erklären (s. 3.1.3.1), denn es gibt eine positive Korrelation zwischen Grüngewicht und Grünfläche. Je größer die Blattfläche ist, desto größer ist auch das Grüngewicht.

Generell gab es keine Unterschiede in der Blattanzahl und der Beziehung zwischen Blattlänge und Blattbreite (s. 3.1.3.1). Die Blattanzahl scheint also nicht von Umwelteinflüssen wie z.B. Standort der Pflanze abzuhängen. Vielmehr scheinen die Anzahl der Blätter, sowie das Blattlängen/Blattbreiten-

Verhältnis genetisch bedingt bzw. festgelegt zu sein. Die höheren Blattstärkegehalte (s. 3.1.3.2) der Freilandrüben sind vermutlich auf die wechselnden Wetterverhältnisse zurückzuführen. Im Freiland gibt es keine konstanten Lichtbedingungen wie im Gewächshaus, daher müssen Tage mit schlechten Lichtverhältnissen überbrückt werden. Darüber hinaus spielt aber auch die Blattbeschaffenheit eine wichtige Rolle. Schattenblätter beispielsweise haben in der Regel mehr Chlorophyll im Vergleich zu Sonnenblättern, sowie eine Steigerung der Leistungsfähigkeit des Photosystem II (Sitte *et al.*, 1998), wodurch der höhere Stärkegehalt in den Freilandrüben zu erklären ist. Der vermutlich höhere Chlorophyllgehalt in den Blättern der Freilandrüben und die daraus resultierende erhöhte Photosyntheseleistung führte somit vermutlich zur erhöhten Stärkesynthese, was den höheren Blattstärkegehalt erklärt.

Interessanterweise war der Saccharosegehalt der Pfahlwurzeln in den Gewächshausrüben und Freilandrüben gleich (s. 3.1.3.4), wobei das Rübengewicht und die Rübenlänge der im Freiland angezogenen Pflanzen deutlich erhöht waren (s. 3.1.3.3). In diesem Fall könnte die Topflimitierung eine Rolle spielen. Die Rüben haben im Topf nur begrenzten Raum, um sich zu entfalten und sind somit in ihrem Wachstum limitiert. Dies zeigte Jonik (2011) ebenfalls mit einer Beetanzucht bei Kartoffelpflanzen, dort war der Knollenertrag fast doppelt so hoch wie im Gewächshaus.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es eine Limitierung des Wachstums der im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen zu geben scheint. Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine Topflimitierung zurückzuführen. Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass man Zuckerrübenpflanzen im Gewächshaus kultivieren kann und ähnliche sowie reproduzierbare Ergebnisse bekommt, was für die in Zukunft anstehende Analyse von transgenen Zuckerrüben eine wichtige Voraussetzung ist.

4.1.3.1 Expressions- und phylogenetische Analyse der verschiedenen Transporter

Die Analyse von Micro-Arrays sollte Aufschluss über die Expression von am Kohlenstoffmetabolismus, sowie am Zuckertransport beteiligter Gene während der Zuckereinlagerungsphase geben. Dazu wurden die Transkriptmengen verschiedener Gene analysiert und verglichen. Die phylogenetischen Analysen verdeutlichen die Homologie der untersuchten Gene/Proteine von *Beta vulgaris* zu denen von *Arabidopsis thaliana*.

Ungewöhnlicherweise waren drei GPTs in Blättern im Vergleich zur Rübe hochreguliert (s. 3.1.3.5.1), denn normalerweise ist der GPT im heterotrophen Gewebe exprimiert. In heterotrophen Geweben ist der GPT wichtig, um G6P in die Amyloplasten zu transportieren, um beispielsweise als Ausgangsstoff für die Stärkesynthese oder für die Fettsäuresynthese zu dienen (Kammerer *et al.*, 1998). Die Funktion des GPT in Zuckerrübenblättern ist unklar.

Es gibt zwei Phosphoenolpyruvat/Phosphat Translokatoren (PPT), zwei Triosephosphat/Phosphat Translokatoren (TPT) und einem Xylulose-5-Phosphat/Phosphat Translokator (XPT), deren Expression in den Blättern im Vergleich zur Rübe hochreguliert war (s. 3.1.3.5.1). Es war nicht überraschend, dass diese Transporter in den Blättern der Zuckerrübenpflanzen stärker exprimiert wurden, da der PPT benötigt wird, um Phosphoenolpyruvat (PEP), eine Vorstufe für den Shikimatweg, über den aromatische Aminosäuren synthetisiert werden, aus dem Cytosol in die Plastiden zu importieren. Über den TPT werden die Triosephosphate aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert (Flügge *et al.*, 1989). Dort dienen die Triosephosphate als Ausgangsstoff für weitere wichtige metabolische Prozesse, wie z.B. die Saccharosesynthese. Über den XPT findet der Austausch von Pentosephosphaten zwischen dem Cytosol und den Chloroplasten statt (Eicks *et al.*, 2002).

Zwei *AtSUC1/2*-, drei *AtSUC3*-, sowie ein *AtSUC4*-ähnliches Homolog wiesen eine stärkere Expression in Rüben auf (s. 3.1.3.5.2). Die *AtSUC1/2* sind an der Beladung des Phloems beteiligt. Die größte Anzahl an SUCs befindet sich im *sink*-Gewebe (Sauer 2007). Daher war es nicht überraschend, dass diese eine stärkere Expression im Rübenpfahlwurzelgewebe aufwiesen. Der *AtSUC1/2* ist ein Saccharose/H⁺-Symporter (Delrot *et al.*, 1981, Komor *et al.*, 1977) und transportiert im Blatt die Saccharose aus dem Apoplasten in die Geleitzellen. Der *AtSUC4* ist ein tonoplastidärer Saccharose/H⁺-Symporter, welcher für den Export der Saccharose aus der Vakuole verantwortlich ist (Schneider *et al.*, 2012). Dieser Saccharoseexporter ist vermutlich wichtig, um im zweiten Vegetationsjahr die Energieversorgung in Form vom Saccharoseexport aus den Vakuolen zum Schossen zu gewährleisten (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

Darüber hinaus wurden zwei Homologe der Saccharose-Synthase (SuSy) mit einer deutlich höheren Expression im Blatt gefunden (s. 3.1.3.5.3). Saccharose kann durch die SuSy unter Aufnahme von Uridindiphosphat (UDP) in UDP-Glukose und Fruktose gespalten werden, wobei die Spaltprodukte u.a. für die Glykolyse oder für die Synthese von Zellwandpolysacchariden wichtig sind (Koch 2004). Des Weiteren spielt die Susy bei der Beladung des Phloems mit Saccharose eine wichtige Rolle. Die für den Transport benötigte Energie für den Protonengradienten stammt aus der Spaltung von einem Teil der ankommenden Saccharose, wobei die UDP-Glukose in den Geleitzellen durch die UGPase unter Verwendung von PP_i zu G1P und UTP umgesetzt wird (Lerchl *et al.*, 1995).

Zwei *AtSWEET1* Homologe weisen in jungen Rüben eine erhöhte Expression auf, wohingegen ein *AtSWEET9* Homolog in alten Rüben eine erhöhte Expression aufwies. Ein *SWEET16/17* ähnliches Gen zeigte die stärkste Expressionsänderung und somit die höchste Expression in Blättern (s. 3.1.3.5.4). In *Arabidopsis thaliana* gibt es 18 SWEETs, wobei die genaue Funktion der einzelnen SWEETs bisher nicht vollständig bekannt ist. Sicherlich ist ein Teil der SWEETs am Export der Saccharose aus den Mesophylzellen beteiligt. Anfangs wurden die SWEETs als Plasmamembran-Proteine und als Glukosetransporter beschrieben (Chen *et al.*, 2010). Erst vor kurzem wurde der *SWEET16* und der

SWEET17 aus *A. thaliana* als tonoplastidäre Proteine beschrieben (Chardon *et al.*, 2013, Klemens *et al.*, 2013, Xuan *et al.*, 2013), welche die Diffusion von Fruktose bzw. Glukose aus der Vakuole erleichtern. Darüber hinaus besitzen die SWEETs ebenfalls die Fähigkeit, Saccharose zu transportieren (Chen *et al.*, 2012).

Interessanterweise existieren in der Zuckerrübe vier TMTs, wohingegen in *Arabidopsis thaliana* nur drei TMTs bekannt sind (s. 3.1.3.5.5). Zwei TMT Homologe konnten dem TMT2 aus *Arabidopsis* zugeordnet werden. Diese waren in der Rübe gegenüber dem Blatt deutlich erhöht exprimiert. Die Tonoplast-Monosaccharid-Transporter (TMT) gehören zur Major-Facilitator-Superfamilie (MFS) (Wormit *et al.*, 2006). Sie wurden als Hexose/H⁺-Antiporter charakterisiert und vermitteln den Glukoseimport über den Tonoplasten in die Vakuole (Neuhaus 2007). Ursprünglich galten TMTs als reine Glukose- und Fruktosetransporter, neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass sie höchst wahrscheinlich ebenfalls am Saccharosetransport beteiligt sind (Schulz *et al.*, 2011). Möglicherweise ist die hohe Expression in Rübenpfahlwurzeln auf die Saccharoseeinlagerung in die Vakuolen zurückzuführen. In den Vakuolen der Rübenpfahlwurzel werden Zucker weit über den Konzentrationsausgleich akkumuliert; somit erfordert der Saccharose-Transport in die Vakuole eine Energetisierung des Tonoplasten (Martinoia *et al.*, 2000). Die Saccharose wird durch einen Saccharose/H⁺-vermittelten-Transport in die Vakuole transportiert. Jung *et al.*, (2014 eingereicht) identifizierten in Zuckerrüben den Tonoplast-Sugar-Transporter 2.1 (*BvTST2.1*). Der *BvTST2.1* gehört der TMT Familie aus *Arabidopsis* an. Dieser Transporter spielt für die Saccharosespeicherung in der Vakuole der Pfahlwurzel eine wichtige Rolle. Die Saccharose wird über den zusätzlichen TMT2-ähnlichenTransporter (*BvTST2.1*) über den Tonoplasten in die Vakuole transportiert (Jung *et al.*, 2014 eingereicht).

4.1.4 Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung

Züchter stehen heutzutage vor der Herausforderung, den Zuckerertrag der Zuckerrüben weiter zu steigern. Der Zuckergehalt und der Ertrag der Zuckerrüben korrelieren negativ miteinander, das heißt, steigern sie den Ertrag von Zuckerrüben, senken sie den Zuckergehalt. Andererseits haben Sorten mit höheren Zuckerkonzentrationen einen geringeren Ertrag. Um den Ertrag von Zuckerrübenpflanzen zu erhöhen, sollten zwei verschiedene biotechnologische Ansätze untersucht werden.

Es sollte zum einen die *source*-Kapazität mit Hilfe einer blattspezifischen Repression der AGPase aus *Beta vulgaris* erhöht werden. Möglicherweise verschiebt sich dabei der Assimilatfluss in Richtung Saccharosesynthese. Die AGPase katalysiert die Reaktion von G1P und ATP zu Pyrophosphat (PP_i) und ADP-Glukose, was als Substrat für die folgende Stärkesynthese dient (Smith *et al.*, 1997a). Wird die Expression der AGPase reprimiert, hat dies möglicherweise zur Folge, dass weniger Stärke synthetisiert werden kann und somit mehr Energie für die Saccharosesynthese zur Verfügung steht. Es wurde bereits beschrieben, dass in Chloroplasten die AGPase allosterisch und durch posttranslationale Redoxmechanismen reguliert wird, wodurch die Stärkesynthese sehr schnell an die Zuckerverfügbarkeit angepasst werden kann (Geigenberger 2003, Tiessen *et al.*, 2002). Darüber hinaus zeigten Jonik *et al.*, (2012), dass die Repression der AGPase in Blättern von Kartoffelpflanzen mit erhöhter *sink*-Stärke zu einem geringeren Stärkegehalt in den Blättern und zu einer erhöhten Zuckerexportkapazität führte. Es bleibt zu untersuchen, ob in Zuckerrüben der Assimilatfluss in die Blattstärkesynthese reduziert werden kann, was möglicherweise eine Erhöhung des Assimilatflusses in die Saccharosesynthese zur Folge haben könnte.

Zum anderen sollte die *sink*-Kapazität mit Hilfe einer rübenspezifischen Expression des mitochondrialen ADP/ATP-Transporters (AAC) aus *A. thaliana* erhöht werden. In der Rübenpfahlwurzel liegt eine bis zu 100-fach höhere Konzentration an Saccharose in der Vakuole als im Cytoplasma vor (Snyder *et al.*, 1966). Der Protonen-Antiport-gekoppelte Saccharoseimport in die Vakuole erfordert somit eine Energetisierung des Tonoplasten (Martinoia *et al.*, 2000), welche durch verschiedene Protonenpumpen bewirkt wird (Kluge *et al.*, 2003, Maeshima *et al.*, 2000, Rea *et al.*, 1987, Sze *et al.*, 1999). Jedenfalls ist für die Energetisierung der Tonoplastenmembran Energie in Form von ATP im Cytosol erforderlich. Der AAC exportiert das in den Mitochondrien gebildete ATP im Austausch mit ADP ins Cytosol und stellt somit die Energie für weitere anabolische Prozesse bereit, wie z.B. für die V-ATPasen zur Energetisierung des Tonoplasten, was zur Folge haben könnte, dass mehr Saccharose in die Vakuolen der Rübenpfahlwurzel eingelagert werden kann.

Die beiden Konstrukte zur Transformation der Zuckerrüben wurden im Rahmen dieser Arbeit fertiggestellt und für die Transformation der Pflanzen der Firma KWS (Einbeck) zur Verfügung

gestellt. Jedoch war es aufgrund einer verzögerten Bereitstellung der transgenen Pflanzen seitens der KWS nicht möglich, die Pflanzen im Rahmen dieser Arbeit zu analysieren. Es bleibt abzuwarten, ob diese beiden Ansätze Ertragssteigerungen der Zuckerrübenpflanzen zur Folge haben.

4.1.5 Fazit und Outlook

Die Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Standardlichtbedingungen im Gewächshaus zeigte ein kontinuierliches Wachstum der Zuckerrübenpflanzen. Darüber hinaus ähneln die Wachstumscharakteristika der im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen denen im Freiland. Es wurden z.B. freilandähnliche Zuckergehalte in der Rübenpfahlwurzel gemessen. Das Wachstum der Pflanzen lässt sich in drei Phasen einteilen:

erste Phase: Aufbau der Blätter

zweite Phase: Aufbau der Rübe

dritte Phase: verstärkte Akkumulation der Saccharose

Die Anzucht der Zuckerrübenpflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen im Gewächshaus zeigt, dass das Wachstum der gesamten Pflanze unter erhöhter Lichtintensität beschleunigt war. Die Lichtintensität kann jedoch nicht beliebig erhöht werden.

Bei dem direkten Vergleich von Gewächshaus und Freilandanzucht zeigten sich anfänglich keine Unterschiede im Pflanzenwachstum. Dies änderte sich nach fünfmonatiger Anzucht. Die Freilandrüben wiesen ein erhöhtes Grüngewicht, erhöhte Grünfläche und Stärkegehalte, sowie ein erhöhtes Rübenpfahlwurzelgewicht auf, was auf mögliche Umwelteinflüsse und auf eine mögliche Topflimitierung zurückzuführen ist. Es gab keine Unterschiede im Saccharosegehalt zwischen den im Gewächshaus angezogenen und im Freiland angezogenen Pflanzen.

Die Daten der Micro-Arrays zeigten, dass die Expression der am Kohlenstoffmetabolismus beteiligten Gene wie z.B. der Phosphattranslokatoren während der Zuckereinlagerungsphase im Vergleich zur Wachstumsphase erhöht war. Es gibt in Zuckerrübe zwei TMT2 Homologe, deren Expression während der Zuckereinlagerungsphase deutlich in der Rübe erhöht war. Das zusätzliche TMT2-homologe Protein ist vermutlich am Import von Saccharose in die Vakuole beteiligt.

Um den Ertrag von Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*) zu erhöhen, sollte zum einen die *source*-Kapazität mit Hilfe einer blattspezifischen Repression der AGPase aus *Beta vulgaris* erhöht werden, und zum anderen sollte die *sink*-Kapazität mit Hilfe einer rübenspezifischen Expression des mitochondrialen ADP/ATP-Transporters (AAC) aus *A. thaliana* erhöht werden. Die beiden Konstrukte zur Transformation der Zuckerrüben wurden im Rahmen dieser Arbeit fertiggestellt. Es bleibt abzuwarten, ob und wie die beiden Ansätze Ertragssteigerungen der Zuckerrübenpflanzen zur Folge haben.

Um beispielsweise transgene Zuckerrübenpflanzen unter Gewächshausbedingungen anzuziehen, sollten die Lichtintensität auf 300-350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ erhöht werden, um eine Limitierung des Wachstums und Ertrags durch die Lichtintensität zu vermeiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass man Zuckerrübenpflanzen im Gewächshaus kultivieren kann und ähnliche und reproduzierbare Ergebnisse wie im Freiland bekommt, was für die anstehende Analyse von transgenen Zuckerrüben eine wichtige Voraussetzung ist.

4.2 Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung der Nutzpflanze *Solanum tuberosum* (Kartoffel)

4.2.1 Auswirkungen der Manipulation der *sink*-Kapazität

In diesem Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen einer weiteren Manipulation der *sink*-Kapazität auf bereits im *sink* manipulierte Kartoffelpflanzen (BGA), die die beiden Metabolitransporter *PsGPT* und *AtNTT1* knollenspezifisch überexprimieren, analysiert werden.

Die BGA-Pflanzen wiesen in Gewächshausanzuchten einen im Vergleich zum Wildtyp um bis zu 44% gesteigerten Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze auf (Zhang *et al.*, 2008). Darüber hinaus stellte Zhang *et al.*, (2008) bei diesen Pflanzen eine zusätzliche Erhöhung der Aktivität des mitochondrialen ADP/ATP-Transporter (AAC) fest. Daher sollte der AAC1 aus *Arabidopsis thaliana* zusätzlich im Hintergrund der doppelt transgenen Pflanzen (BGA) ebenfalls unter der Kontrolle des knollenspezifischen B33-Promotors exprimiert und die resultierenden dreifachtransgenen Pflanzen (ACGN) analysiert werden.

4.2.1.1 ACGN-Pflanzen zeigten keine zusätzliche Ertragssteigerung

Die Untersuchungen der oberirdischen Pflanzenteile der ACGN-Pflanzen zeigten, dass die Manipulation der *sink*-Kapazität keine Änderung des Grüngewichts und des Stärkegehalts in den Blättern zur Folge hatte (s. 3.2.1.2). Dies ist auf die Verwendung des knollenspezifischen B33-Promotors zurückzuführen (Tjaden *et al.*, 1998, Zhang 2005). Ein Rückkopplungsmechanismus, bei dem mehr Saccharose zu den *sink*-Organen transportiert und deswegen weniger Blattstärke aufgebaut wird, war nicht zu beobachten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die ACGN-Pflanzen den möglicherweise höheren Saccharosefluss in die Knollen mit einer gesteigerten CO₂-Assimilation ausgeglichen haben, denn Zhang (2005) zeigte, dass in den doppelt transgenen BGA-Pflanzen die CO₂-Assimilation im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Dies war möglicherweise hier ebenfalls der Fall. Die CO₂-Assimilation der ACGN-Pflanzen wurde allerdings nicht analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Knollenertrag der dreifach transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erhöht war (s. Abbildung 55). Die Analysen der Stärkegehalte in den Kartoffelknollen, sowie der Gesamtstärkeertrag der ACGN-Pflanzen zeigten keinen durchgängigen Änderungen im Vergleich zum Wildtyp (s. Abbildung 54 und Abbildung 55). Lediglich die Linie ACGN_59 zeigte einen um 44% gesteigerten Gesamtknollenstärkeertrag im Vergleich zum Wildtyp. Vergleicht man diese Erhöhung mit den Daten von Zhang *et al.*, (2008), so stimmen die Daten mit veröffentlichten Werten der BGA-Pflanzen überein, so dass eine zusätzliche Überexpression des AAC keine weitere Ertragsteigerung

des Knollengewichts im Vergleich zu den zweifach transgenen BGA-Pflanzen zur Folge hatte. Im Wesentlichen wurden die Ergebnisse von Zhang *et al.*, (2008) reproduziert.

Dies deutet darauf hin, dass die von Zhang (2005) gemessene Erhöhung der AAC-Aktivität in den zweifach transgenen BGA-Pflanzen nicht limitierend für den NTT-vermittelten ATP-Import in die Amyloplasten war. In Hefe konnte gezeigt werden, dass die Expression der AACs vom Stoffwechsel abhängig ist. Dies bedeutet, wird mehr ATP im Cytosol verbraucht, wird die Expression und die Aktivität des AACs erhöht, um die ATP-Bereitstellung zu verstärken (Drgon *et al.*, 1992, Kolarov *et al.*, 1990). Eine Aktivitätserhöhung des AACs hat Zhang (2005) ebenfalls in den BGA-Pflanzen gefunden. Es könnte aber auch sein, dass die Überexpression des AAC nicht zur Erhöhung der Proteinmenge bzw. zur Aktivität geführt hat, denn die mitochondrialen ATP/ADP-Carrier machen bis zu 30% der Gesamtproteine der inneren Mitochondrienmembran aus (Picault *et al.*, 2004). Ob die Erhöhung der Expression des AAC zu einer erhöhten Transportaktivität führte, ist nicht analysiert worden, und es bleibt fraglich, wie weit und ob die Transportaktivität erhöht war.

Des Weiteren könnte eine mögliche Verschiebung des Assimilatflusses in die ATP-Synthese limitierend für die Stärkesynthese sein, da ein Teil der im *sink*-Gewebe ankommende Saccharose für die ATP-Synthese in den Mitochondrien verwendet wurde (Heldt 1999), der nicht mehr zur Stärkesynthese verwendet werden konnte.

Die Erhöhung des Ertrages ist möglicherweise auch durch das Gleichgewicht der *sink/source*-Kapazität limitiert. Wenn die Kapazität zur Aufnahme von Photoassimilaten in den *sink*-Organen erhöht wird, dann kann es sein, dass dies durch eine erhöhte *source*-Kapazität ausgeglichen wird. Die hier gewonnenen Ergebnisse deuten jedoch auf eine mögliche *source*-Limitierung in den transgenen BGA-Pflanzen hin, denn Jonik *et al.*, (2012) zeigten, dass die zusätzliche Erhöhung von *source*-Kapazität im Hintergrund der BGA-Pflanzen zu deutlichen Ertragssteigerungen führte.

Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der *sink*-Kapazität nicht unbegrenzt möglich ist und die bereits transgenen Pflanzen, welche den GPT und NTT knollenspezifisch überexprimieren, möglicherweise jetzt durch die *source*-Kapazität im Ertrag limitiert sind.

4.2.2 Auswirkungen der Manipulation der *sink/source*-Kapazität durch verzögerte Seneszenz

In diesem Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen einer verzögerten Seneszenz auf Kartoffelpflanzen analysiert werden. Aus diesem Grund sollte die Isopentenyltransferase (IPT) aus *Agrobacterium tumefaciens* unter Kontrolle des Seneszenz-spezifischen SAG12-Promotors im Wildtyphintergrund untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Aktivität des SAG12-Promotors in *Solanum tuberosum* mittels GUS-Reportergen-Analyse untersucht werden. Ferner sollten die Auswirkungen der

zusätzlichen Seneszenz-spezifischen Überexpression der Isopentenyltransferase (IPT) im Hintergrund der doppelt transgenen BGA-Pflanzen getestet werden. Die BGA-Pflanzen zeigten im Freiland eine verfrüht einsetzende Seneszenz (Greiten 2008), wodurch eventuell die Ertragseinbußen im Freiland zu erklären sind. Die Verzögerung der Seneszenz könnte möglicherweise zur verlängerten Aufrechterhaltung der Photosyntheseleistung der Blätter führen und somit zu einer längeren Versorgung der *sink*-Organe mit Saccharose. Die längere Versorgung der *sink*-Organe könnte möglicherweise zum Ausgleich des Ertragsverlust oder sogar zu zusätzlicher Ertragssteigerung führen.

4.2.2.1 Seneszenz-spezifische Aktivität des SAG12-Promotors in *Solanum tuberosum*

Zunächst musste die Funktion des SAG12-Promotors in *Solanum tuberosum* sichergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden WT-Kartoffelpflanzen mit dem pSAG12-GUS Konstrukt transformiert (s. 2.3.2). Das pSAG12-GUS Konstrukt ermöglicht es, die Aktivität des SAG12-Promotors zu untersuchen.

Die Funktionalität des SAG12-Promotors wurde bereits in Nachtschattengewächsen wie z.B. Tomate und Tabak gezeigt (Gan *et al.*, 1995, Ludewig *et al.*, 2000, Swartzberg *et al.*, 2006), daher war es nicht überraschend, dass die unter dem SAG12-Promotor exprimierte β -Glucuronidase in den seneszenten Blättern aktiv war. Die Ergebnisse zeigen, dass je senszenter der Pflanzenteil der GUS-Linien war, desto höher auch die GUS-Aktivität und somit die Promotoraktivität war. Kartoffelpflanzen altern von unten nach oben (Moll 1980), was auch die Analysen der gesamten Pflanzen zeigte, denn die GUS-Aktivität war von oben nach unten zunehmend.

Die Analysen zur Promotor-Aktivität in *Solanum tuberosum* haben gezeigt, dass der Promoter in den Pflanzen in den seneszenten Blättern aktiv war und mit fortschreitender Seneszenz der Pflanzen zunahm.

4.2.2.2 Ertragssteigerung durch erfolgreich verzögerte Seneszenz in IPT-Pflanzen

Solanum tuberosum cv. Désirée (Wildtyp) wurden mit dem pSAG12-IPT Konstrukt transformiert (s. 2.3.2). Die analysierten IPT-Linien zeigten unterschiedlich starke Expressionen, was vermutlich unter anderem auf die Autoregulation des SAG12-IPT Systems zurückzuführen ist. Sobald die Seneszenz beginnt, wird der SAG12-Promotor aktiviert, was zur IPT-Bildung führt, was wiederum zur Bildung von Cytokinin führt. Cytokinine führen schließlich zur Verzögerung der Seneszenz, wodurch der Promotor wieder inaktiviert wird, bis dieser Zyklus erneut beginnt (Gan *et al.*, 1995), d.h. je nachdem in welchem Stadium die Probennahme erfolgte, war die Expression unterschiedlich.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl der Kopien des Transgens in das Genom nicht analysiert wurde. Die Anzahl der Kopien im Genom, sowie die Position der Insertion spielen bezüglich der Expression ebenfalls eine wichtige Rolle (Altpeter *et al.*, 2005). Das bedeutet, je mehr Kopien ins Genom aufgenommen wurden, desto stärker ist möglicherweise die Expression und je nachdem ob die Insertion ins Genom an einer „aktiven“ Stelle erfolgte oder nicht, ist die Expression unterschiedlich stark.

Der Chlorophyllgehalt und der Stärkegehalt in den Blättern, das Fv/Fm-Verhältnis und die CO₂-Assimilation waren in den IPT-Linien erhöht. Dies war nicht überraschend, denn die Erhöhung dieser Parameter wurde bereits in anderen Versuchen mit IPT-exprimierenden Pflanzen gezeigt. Die Produktion der Cytokinin führt zur Hemmung der Expression der Seneszenz-assoziiertes Gene (SAGs) und fördert die Expression der Seneszenz-„down“ regulierten Gene (SDGs). Zu den SDGs gehören u.a. Chlorophyll a/b-Binde-Proteine (CAB) und RubisCO. Diese Gene spielen in der Photosynthese und anderen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle (Gan *et al.*, 1996). Eine höhere Expression der SDGs führt möglicherweise zur Erhöhung der Fv/Fm-Verhältnisse, des Chlorophyll- und des Stärkegehalts in Blättern der IPT-Pflanzen. Ludewig und Sonnewald (2000) sowie Schroeder *et al.*, (2001) wiesen ebenfalls höhere Chlorophyllgehalte in IPT-exprimierenden Tabakpflanzen nach. Auch Swartzberg *et al.*, (2006) zeigten, dass die alten Blätter der IPT-Tomatenpflanzen im Vergleich zum Wildtyp höhere Chlorophyllgehalte hatten. Der schwächere Chlorophyllabbau in den IPT-Linien zeigt, dass die Seneszenz in den IPT-Linien weniger fortgeschritten war. Die höhere CO₂-Assimilation in den IPT-Linien ist auf den höheren Chlorophyllgehalt und die höheren Fv/Fm-Verhältnisse zurückzuführen. Das erhöhte Fv/Fm-Verhältnis zeigt, dass das Photosystem II (PSII) in den IPT-Linien intakter war (Krause *et al.*, 1991). Je intakter das PSII ist, desto höher ist vermutlich die Photosyntheseleistung d.h. die CO₂-Assimilation. Die höhere CO₂-Assimilation führt möglicherweise zu einem verstärkten Aufbau von transitorischer Stärke in den Blättern der IPT-Pflanzen, denn Blackman und Wilson (1951) zeigten, dass die Netto-Assimilation einen signifikanten Effekt auf den Stoffwechsel der Pflanzen hat. Dies bedeutet, je höher die Netto-Assimilation ist, desto mehr transitorische Stärke kann aufgebaut werden. Darüber hinaus zeigten Ludewig und Sonnewald (2000) ebenfalls, dass transgene IPT-Tabakpflanzen mehr Stärke in den Blättern akkumulierten.

Die IPT-Linien wiesen beim Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile keine Änderungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Aufgrund der Verzögerung der Seneszenz durch das SAG12-IPT-System und die signifikant erhöhte CO₂-Assimilation in den Blättern der IPT-Linien wäre möglicherweise eine erhöhte Biomasse zu erwarten gewesen. Dieser Effekt könnte jedoch durch die Cytokininbiosynthese aufgehoben worden sein. Es könnte sein, dass in den jungen Pflanzen der SAG12-Promotor bereits aktiv war, was zur Produktion von Cytokinin führte und somit zum Erhalt der unteren alten Blätter wodurch möglicherweise weniger neue Blätter produziert wurden. Das SAG12 Gen gehört zu den

Seneszenz-assoziierten Gene der Klasse I, die schon in der frühen Blattentwicklung eine geringe Expression zeigen (Gan *et al.*, 1997). Darüber hinaus verbraucht die Synthese von Cytokinen viel Energie, denn für die Cytokininproduktion wird ATP, ADP und AMP verbraucht und könnte somit dem vermehrten Aufbau von Biomasse entgegenwirken. Die Cytokine in den transgenen Pflanzen sind nicht analysiert worden.

Die Kartoffelpflanzen, welche die IPT Seneszenz-spezifisch überexprimieren, schienen früher Knollen auszubilden als der Wildtyp, denn die jungen IPT-Linien zeigten einen höheren Knollenertrag. Dies ist möglicherweise auf die Expression der IPT zurückzuführen, denn Wildtypkartoffelpflanzen sind *sink*-limitiert. Studien mit Tabak, welche das SAG12-IPT-System exprimieren, haben gezeigt, dass diese früher blühen (Cowan *et al.*, 2005). Die IPT-Pflanzen blühten ebenfalls früher, was zur Folge hatte, dass es zu einer früher einsetzenden Knollenbildung kam, denn in Kartoffelpflanzen hängt die Knollenbildung mit der Blütenbildung zusammen. Navarro *et al.*, (2011) identifizierten das „Flowering locus T“ (FT)-Protein, welches u.a. in Kartoffelpflanzen ein wichtiges „Hormon“ zur Blüteninduktion darstellt. Kartoffelpflanzen mit einer Überexpression des (FT)-Proteins zeigten früher induzierte Blütenbildung und gleichzeitig auch früher einsetzende Knollenbildung (Navarro *et al.*, 2011). Auch die frühere Bildung der Knollenmasse könnte das niedrigere Grüngewicht der jungen IPT-Pflanzen hervorgerufen haben. Aufgrund der Umleitung der Photoassimilate in die verfrühte Knollenproduktion stand möglicherweise weniger Energie für die Produktion neuer Blätter zur Verfügung.

Es konnten beim Stärkegehalt und Zuckergehalt von Knollen der IPT-Linien keine signifikanten Änderungen beobachtet werden. Der erhöhte Gesamtstärkeertrag der jungen IPT-Pflanzen ist auf die beschleunigte Knollenbildung zurückzuführen. Diese Erhöhung war nur bei den jungen Kartoffelpflanzen zu beobachten.

4.2.2.3 Keine zusätzliche Ertragsteigerung durch erfolgreich verzögerte Seneszenz in IGN-Pflanzen

In diesem Teilabschnitt der Arbeit wurden dreifach transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* cv. Desirée) hergestellt und analysiert, welche den GPT aus *Pisum sativum* und den NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* unter der Kontrolle des knollenspezifischen B33-Promotors (Rocha-Sosa *et al.*, 1989), sowie die IPT aus *Agrobacterium tumefaciens* unter dem Seneszenz-spezifischen SAG12-Promotor überexprimieren.

Ähnlich wie bei den IPT-Pflanzen, ist die unterschiedlich starke Expression des NTT und der IPT in den verschiedenen IGN-Linien möglicherweise auf eine unterschiedliche Kopienanzahl im Genom der Pflanzen oder den Ort der Integration ins Genom zurückzuführen, darüber hinaus kann eine

unterschiedliche IPT-Expression vermutlich auf die Autoregulation des SAG12-IPT-Systems zurückgeführt werden (s. 4.2.2.2). In den dreifach transgenen IGN-Pflanzen waren, wie erwartet, der Chlorophyllgehalt, die CO₂-Assimilation und der Blattstärkegehalt der Blätter erhöht, denn das gleiche Phänomen wurde bereits in transgenen Tabakpflanzen gezeigt, welche die IPT ebenfalls unter dem Seneszenz-spezifischen SAG12-Promotor exprimieren (Ludewig *et al.*, 2000, Schroeder *et al.*, 2001). Auch Swartzberg *et al.*, (2006) zeigten dies an Tomatenpflanzen, welche das SAG12-IPT System exprimieren. Der schwächere Chlorophyllabbau und die höhere Assimilationen der IGN-Linien weisen auf eine Verzögerung der Seneszenz hin, denn der Seneszenzvorgang geht mit dem Abbau des Chlorophylls einher (Matile *et al.*, 1995), und die Photosyntheserate nimmt mit zunehmender Seneszenz normalerweise ab (Hensel *et al.*, 1993). Die Chloroplasten zeigen beim Abbau eine erhöhte Anzahl von vergrößerten Plastoglobuli, sowie den Abbau der Thylakoide (del Río *et al.*, 1998, Smart 1994), was die Abnahme der Photosyntheseleistung von seneszenten Pflanzen erklärt, denn die Aktivität des membranassoziierten Elektronentransports nimmt während der Seneszenz ab (Thomas *et al.*, 1980). In den IGN-Linien ist dieser Abbau eventuell aufgrund der Anwesenheit der Cytokinine verzögert, denn die Cytokinine könnten zur Repression der SAGs und zur Stimulierung der Expression der SDGs geführt haben. Die SDGs sind beispielsweise in die Photosynthese und andere zelluläre Funktion involviert (Gan *et al.*, 1995), welche möglicherweise auf die Photosyntheseleistung der IGN-Pflanzen einen positiven Einfluss haben könnten.

In den IGN-Linien konnte ebenfalls wie bei den IPT-Pflanzen ein deutlich gesteigerter Stärkegehalt in den Blättern gemessen werden, was möglicherweise auf die erhöhte CO₂-Assimilation zurückzuführen war (s. 4.2.2.2). Wie die IPT-Pflanzen wiesen die IGN-Linien keinen eindeutigen Trend beim Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile auf. Aufgrund der Verzögerung der Seneszenz und somit den Erhalt der alten Blätter sowie die signifikant erhöhte CO₂-Assimilation der IGN- Blätter, wäre eine deutlich erhöhte Biomasse der oberirdischen Pflanzenteile zu erwarten gewesen. Gan und Amasino (1995) zeigten in IPT-exprimierenden Pflanzen eine Zunahme der Biomasse. Dieser Effekt könnte jedoch durch die energieverbrauchende Cytokininbiosynthese beeinflusst worden sein (s. 4.2.2.2). Eine weitere mögliche Erklärung für das niedrigere Grüngewicht könnte die Umleitung der Photoassimilate in die Knollenmassenproduktion sein. Aufgrund der erhöhten *sink*-Kapazität wurden vermehrt Photoassimilate in die Knollen transportiert, womit möglicherweise weniger Energie für die Produktion neuer Blätter zur Verfügung stand.

Wie erwartet, war der Knollenertrag der IGN-Pflanzen und der Stärkegehalt in den Knollen der IGN-Linien erhöht (s. Abbildung 79 und Abbildung 81), was einem gesteigerten Gesamtstärkeertrag um bis zu 47% entsprach. Vergleicht man diese Ertragserhöhung mit den Daten von Zhang *et al.*, (2008), so war die Ertragssteigerung der zweifach transgenen BGA-Pflanzen mit 44% sehr ähnlich, so dass die verzögerte Seneszenz scheinbar keine deutliche Ertragsteigerung des Gesamtstärkeertrages zur Folge

hat. Im Wesentlichen wurden die Ergebnisse von Zhang *et al.*, (2008) reproduziert. Möglicherweise verbraucht die Aufrechterhaltung der alten Blätter so viel Energie, dass keine zusätzliche Ertragssteigerung mehr möglich war. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Kartoffelpflanzen den Seneszenzvorgang brauchen, denn während der Seneszenz werden durch koordinierte Degradierung von Makromolekülen, Nährstoffe wie Stickstoff, Kohlenstoff und Mineralien aus den Blättern „recycelt“ (Buchanan-Wollaston 1997). Diese „recyclten“ Nährstoffe werden in die reproduktiven Organe (Gan *et al.*, 1997) wie beispielsweise Knollen transportiert. Möglicherweise hat dieser Prozess in Kartoffelpflanzen eine größere Bedeutung für die Knollenbildung. Aufgrund der verzögerten Seneszenz durch die Isopentenyltransferase könnten weniger „recycelte“ Nährstoffe für die Knollenbildung zur Verfügung gestanden haben, was möglicherweise nicht durch die höhere Assimilation ausgeglichen werden konnte, denn die Aufrechterhaltung der alten Blätter verbraucht wegen der Cytokininproduktion ebenfalls Energie.

Die Ergebnisse der dreifach transgenen IGN-Pflanzen weisen auf eine verzögerte Seneszenz hin, jedoch wurde der Assimilatfluss anscheinend nicht im größeren Maße in die *sink*-Organe umgeleitet was im Endeffekt zu einer Null-Bilanz führte. Generell ist die Umleitung der Photoassimilate in die *sink*-Organe möglich, jedoch scheinbar nicht durch eine Verzögerung der Seneszenz, denn in Versuchen mit einer gezielten Umleitung des Assimilatflusses zeigten Jonik *et al.*, (2012), dass die gleichzeitige Erhöhung von *source*- und *sink*-Kapazität zu deutlichen Ertragssteigerungen führte.

4.2.3 Fazit und Outlook

Die Analysen zur SAG12-Promotor-Aktivität in *Solanum tuberosum* haben gezeigt, dass der Promotor in den Pflanzen in seneszenten Blättern aktiv war und mit zunehmendem Alter der Pflanzen stärkere Aktivität aufwies, d.h. je senescenter die Blätter waren, desto höher war auch die Promotor- und somit die GUS-Aktivität.

Die Ergebnisse der einfach transgenen Pflanzen, welche die Isopentenyltransferase unter dem SAG12-Promotor exprimierten, zeigten, dass die Seneszenz verzögert werden konnte. Die IPT-Pflanzen wiesen höhere Chlorophyllgehalte, höhere Fv/Fm-Verhältnisse, sowie höhere CO₂-Assimilationsraten der Blätter auf. Darüber hinaus gab es keine eindeutige Änderung beim Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile. Ähnlich wie beim Stärkegehalt der Knollen wurden auch keine durchgängigen Änderungen der Zuckergehalte in Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Die Analysen der dreifach transgenen IGN-Pflanzen zeigen, dass die Verzögerung der Seneszenz im Hintergrund der doppelt transgenen BGA-Pflanzen zu keiner weiteren Ertragsteigerung im Vergleich zu den BGA-Pflanzen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen, führte. Die IGN-Pflanzen zeigten ebenfalls höhere Chlorophyllgehalte, höhere CO₂-Assimilation, sowie höhere Stärkegehalte in den Blättern. Die IGN-Linien wiesen keine eindeutige Tendenz im Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile auf. Wie erwartet, war der Knollenertrag der IGN-Pflanzen und Stärkegehalt in den Knollen der IGN-Linien erhöht, was zu einem gesteigerten Gesamtstärkeertrag um bis zu 47% führte. Diese Ertragserhöhung ist denen von Zhang *et al.*, (2008) beschriebenen ähnlich. Diese Ertragssteigerung lag bei den zweifach transgenen BGA-Pflanzen bei bis zu 44%, so dass die verzögerte Seneszenz scheinbar keine weitere Ertragsteigerung des Gesamtstärkeertrages im Vergleich zu den zweifach transgenen BGA-Pflanzen unter Gewächshausbedingungen zur Folge hat.

Ob die zusätzliche Überexpression der Isopentenyltransferase (IPT) aus *Agrobacterium tumefaciens* unter Kontrolle des Seneszenz-spezifischen SAG12-Promotors im Hintergrund der doppelt transgenen Pflanzen den Ertragsverlust im Freiland verhindern kann, bleibt fraglich, dazu müssten die IGN-Pflanzen unter Freilandbedingungen analysiert werden.

5 Literaturverzeichnis

- Abel, S. and Theologis, A.** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, **111**, 9.
- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S. and Dix, P.J.** (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, **15**, 305-327.
- Bergmeyer, H.U.** (1970) *Methoden der enzymatischen Analyse*: Verlag Chemie Weinheim.
- Blackman, G. and Wilson, G.** (1951) Physiological and ecological studies in the analysis of plant environment VII. an analysis of the differential effects of light intensity on the net assimilation rate, leaf-area ratio, and relative growth rate of different species. *Annals of Botany*, **15**, 373-408.
- Bleecker, A.B. and Patterson, S.E.** (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **9**, 1169.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Buchanan-Wollaston, V.** (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 181-1991.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. and Pink, D.** (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 3-22.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L.** (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*: American Society of Plant Physiologists Rockville.
- Buckhout, T.J.** (1989) Sucrose transport in isolated plasma-membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Evidence for an electrogenic sucrose-proton symport. *Planta*, **178**, 393-399.
- Büttner, M. and Sauer, N.** (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1465**, 263-274.
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P.A., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., Léran, S., Ferrand, M. and Lacombe, B.** (2013) Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology*, **23**, 697-702.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W. and Chaudhuri, B.** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, **468**, 527-532.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R. and Frommer, W.B.** (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, **335**, 207-211.
- Clark, E.A. and Loomis, R.** (1978) Dynamics of leaf growth and development in sugarbeets. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists*, **20**.

- Cowan, A.K., Freeman, M., Björkman, P.-O., Nicander, B., Sitbon, F. and Tillberg, E.** (2005) Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta*, **221**, 801-814.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T. and Smith, A.M.** (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **26**, 89-100.
- del Río, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jiménez, A., López-Huertas, E. and Hernández, J.A.** (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, **116**, 1195-1200.
- Delrot, S. and Bonnemain, J.-L.** (1981) Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiology*, **67**, 560-564.
- Demmers-Derks, H., Mitchell, R., Mitchell, V. and Lawlor, D.** (1998) Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) yield and biochemical composition to elevated CO₂ and temperature at two nitrogen applications. *Plant, Cell & Environment*, **21**, 829-836.
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L. and Wipf, D.** (2012) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science*, **17**, 413-422.
- Dongowski, G.** (1993) Zur Gewinnung von Ballaststoffpräparaten aus extrahierten Zuckerrübenschnitzeln. *Food/Nahrung*, **37**, 364-373.
- Drgon, T., Sabova, L., Gavurnikova, G. and Kolarov, J.** (1992) Yeast ADP/ATP carrier (AAC) proteins exhibit similar enzymatic properties but their deletion produces different phenotypes. *Febs Letters*, **304**, 277-280.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M. and Steup, M.** (2007) Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial β -amylases. *Plant Physiology*, **145**, 17-28.
- Edwards, A., Marshall, J., Denyer, K., Sidebottom, C., Visser, R.G., Martin, C. and Smith, A.M.** (1996) Evidence that a 77-kilodalton protein from the starch of pea embryos is an isoform of starch synthase that is both soluble and granule bound. *Plant Physiology*, **112**, 89-97.
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.-I. and 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.
- Farrar, J., SCHOOT, C.v.d., Drent, P. and BEL, A.** (1992) Symplastic transport of Lucifer Yellow in mature leaf blades of barley: potential mesophyll-to-sieve-tube transfer. *New Phytologist*, **120**, 191-196.
- Feller, U. and Keist, M.** (1986) Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*. Lambers H, Neeteson JJ, Stulen I (Eds.) Marinus Neijhoff, Dordrecht, 219-234.
- Fettke, Eckermann N, Kötting O, Ritte G and M., S.** (2007) Novel starch-related enzymes and carbohydrates. *Cellular and Molecular Biology* **52**, 883-904.

- Fiore, C., Trezeguet, V., Le Saux, A., Roux, P., Schwimmer, C., Dianoux, A., Noel, F., Lauquin, G.-M., Brandolin, G. and Vignais, P.** (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie*, **80**, 137-150.
- Flügge, U.-I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W. and Lottspeich, F.** (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. *The EMBO Journal*, **8**, 39-46.
- Frommer, W.B. and Sonnewald, U.** (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *Journal of Experimental Botany*, **46**, 587-607.
- Gan, S. and Amasino, R.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gan, S. and Amasino, R.M.** (1996) Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bioessays*, **18**, 557-565.
- Gan, S. and Amasino, R.M.** (1997) Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology*, **113**, 313.
- Geigenberger, P.** (2003) Regulation von Wachstum und Kohlenhydratspeicherung durch Umweltfaktoren und physiologische Signale. Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Tätigkeitsbericht.
- Geigenberger, P., Stamme, C., Tjaden, J., Schulz, A., Quick, P.W., Betsche, T., Kersting, H. and 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.
- Geiger, D.R. and Servaites, J.C.** (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annual Review of Plant Biology*, **45**, 235-256.
- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.-M. and Baker, N.R.** (1990) The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. *Photosynthesis Research*, **25**, 249-257.
- Gluck, S., Cannon, C. and Al-Awqati, Q.** (1982) Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H⁺ pumps into the luminal membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **79**, 4327-4331.
- Gottwald, J.R., Krysan, P.J., Young, J.C., Evert, R.F. and 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*, **97**, 13979-13984.
- Graan, T. and Ort, D.R.** (1984) Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 14003-14010.
- Grbić, V.** (2002) Spatial expression pattern of SAG12: GUS transgene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiologia Plantarum*, **116**, 416-422.
- Greiten, C.** (2008) Untersuchungen von Sink/Source Verhältnissen in transgenen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), welche den PsGPT und AtNTT1 überexprimieren. Analysen von

Freilandanzuchten und Analysen von Kartoffeln, welche die AtATase2 überexprimieren: Universität zu Köln.

- Haferkamp, I., Hackstein, J.H., Voncken, F.G., Schmit, G. and 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.
- Hedrich, R. and Schroeder, J.I.** (1989) The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, **40**, 539-569.
- Heineke, D., Wildenberger, K., Sonnewald, U., Willmitzer, L. and Heldt, H.W.** (1994) Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. *Planta*, **194**, 29-33.
- Hejazi, M., Fettke, J., Haebel, S., Edner, C., Paris, O., Froberg, C., Steup, M. and Ritte, G.** (2008) Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *The Plant Journal*, **55**, 323-334.
- Heldt, H.-W. and Piechulla, B.** (2010) *Plant biochemistry*: Academic Press.
- Heldt, H.** (1999) *Pflanzenbiochemie* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Hendriks, J.H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. and Geigenberger, P.** (2003a) 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.
- Hendriks, J.H.M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. and Geigenberger, P.** (2003b) 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.
- Hensel, L., Grbic', V., Baumgarten, D. and Blecker, A.** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, **5**, 553-564.
- Hörtensteiner, S.** (1999) Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **56**, 330-347.
- Jauh, G.-Y., Phillips, T.E. and Rogers, J.C.** (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *The Plant Cell Online*, **11**, 1867-1882.
- John, I., Drake, R., Farrell, A., Cooper, W., Lee, P., Horton, P. and Grierson, D.** (1995) Delayed leaf senescence in ethylene deficient ACC oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *The Plant Journal*, **7**, 483-490.
- Jonik, C.** (2011) Biotechnologische Ansätze zur Ertragssteigerung in transgenen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) durch Manipulation der source/sink-Beziehung: Universität zu Köln.
- Jung, B., Ludewig, F., Schulz, A., Meißner, G., Wöstefeld, N., Flügge, U.-I., Pommerrenig, B., Wirsching, P., Sauer, N., Koch, W., Cuin, T.A., Marten, I., Hedrich, R. and Neuhaus, H.E.** (2014) Molecular characterization of the sucrose loader in sugar beet taproots. *Science*.

- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S. and Gutensohn, M.** (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate/ phosphate antiporter. *The Plant Cell*, **10**, 105-117.
- Kampfenkel, K., Möhlmann, T. and Batz, O.** (1995a) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *Febs Letters*, **374**, 351-355.
- Kampfenkel, K., Möhlmann, T., Batz, O., Montagu, M.V., Inzé, D. and Neuhaus, H.E.** (1995b) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *Febs Letters*, **374**, 351-355.
- Klemens, P.A., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le Hir, R., Bellini, C., Bedu, M., Chardon, F., Krapp, A. and Neuhaus, H.E.** (2013) Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **163**, 1338-1352.
- Klingenberg, M.** (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **270**, 1-1.
- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollmack, D. and Dietz, K.-J.** (2003) New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **35**, 377-388.
- Koch, K.** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 235-246.
- Koivistoinen, P. and Hyvönen, L.** (1985) The use of sugar in foods. *International Dental Journal*, **35**, 175-179.
- Kolarov, J., Kolarova, N. and Nelson, N.** (1990) A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 12711-12716.
- Komor, E., Rotter, M. and Tanner, W.** (1977) A proton-cotransport system in a higher plant: Sucrose transport in *Ricinus communis*. *Plant Science Letters*, **9**, 153-162.
- Kossmann, J., Abel, G.J., Springer, F., Lloyd, J.R. and Willmitzer, L.** (1999) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta*, **208**, 503-511.
- Kossmann, J. and Lloyd, J.** (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**, 171-226.
- Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M. and Ritte, G.** (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiology*, **137**.
- Krause, G. and Weis, E.** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Biology*, **42**, 313-349.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R. and Schumacher, K.** (2010) *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 3251-3256.

- Kruger, A.G.J.** (1997) *Carbohydrate synthesis and degradation*. In: *plant metabolism*: Addison Wesley Longman Limited.
- Kühn, C., Hajirezaei, M.-R., Fernie, A.R., Roessner-Tunali, U., Czechowski, T., Hirner, B. and Frommer, W.B.** (2003) The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology*, **131**, 102-113.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. and Ward, J.M.** (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *The Plant Cell Online*, **11**, 707-726.
- Leopold, A.** (1961) Senescence in plant development the death of plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value. *Science*, **134**, 1727-1732.
- Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M. and 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. *The Plant Cell*, **7**, 259-270.
- Leroch, M.** (2006) Molekulare, biochemische und physiologische Eigenschaften von Transportproteinen der MCF (mitochondrial carrier family) aus Pflanzen und Protisten. In *Biologie*. Kaiserslautern: Technische Universität Kaiserslautern.
- Linka, N., Hurka, H., Lang, B.F., Burger, G., Winkler, H.H., Stamme, C., Urbany, C., Seil, I., Kusch, J. and Neuhaus, H.E.** (2003) Phylogenetic relationships of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes. *Gene*, **306**, 27-35.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R.F.** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*, **8**, 457-463.
- Lizotte, P.A., Henson, C.A. and Duke, S.H.** (1990) Purification and characterization of pea epicotyl 3- α -amylase. *Plant Physiology*, **92**, 615-621.
- Lloyd, J.R., Kossmann, J. and Ritte, G.** (2005) Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science*, **10**, 1360-1385.
- Lohman, K.N., Gan, S., John, M.C. and Amasino, R.M.** (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **92**, 322-328.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A. and Ort, D.R.** (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the Future*. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 591-628.
- Lu, Y. and Sharkey, T.D.** (2004) The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*, **218**, 466-473.
- Ludewig, F. and Sonnewald, U.** (2000) High CO₂-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *Febs Letters*, **479**, 0014-5793.
- Maeshima, Y., Colorado, P.C., Torre, A., Holthaus, K.A., Grunkemeyer, J.A., Ericksen, M.B., Hopfer, H., Xiao, Y., Stillman, I.E. and Kalluri, R.** (2000) Distinct antitumor properties of a type IV

- collagen domain derived from basement membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 21340-21348.
- Manderscheid, R., Pacholski, A. and Weigel, H.-J.** (2010) Effect of free air carbon dioxide enrichment combined with two nitrogen levels on growth, yield and yield quality of sugar beet: Evidence for a sink limitation of beet growth under elevated CO₂. *European Journal of Agronomy*, **32**, 228-239.
- Martin, C. and Smith, A.M.** (1995) Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**, 971.
- Martinoia, E., Heck, U. and Wiemken, A.** (1981) Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*, **289**, 292-294.
- Martinoia, E., Kaiser, G., Schramm, M.J. and Heber, U.** (1987) Sugar transport across the plasmalemma and the tonoplast of barley mesophyll protoplasts. Evidence for different transport systems. *Journal of Plant Physiology*, **131**, 467-478.
- Martinoia, E., Massonneau, A. and Frangne, N.** (2000) Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology*, **41**, 1175-1186.
- Matile, P.** (1992) Chloroplast senescence. *Topics in Photosynthesis*, **12**, 413-440.
- Matile, P. and Kräutler, B.** (1995) Wie und warum bauen Pflanzen das Chlorophyll ab?? *Chemie in unserer Zeit*, **29**, 298-306.
- Moll, A.** (1980) Die Photosyntheserate während der Entwicklung der Kartoffelpflanze. *Potato Research*, **23**, 319-326.
- Müse, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V. and Schopfer, P.** (1997) Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*, **201**, 146-159.
- Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C.A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K. and Prat, S.** (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, **478**, 119-122.
- Neuhaus, H.E.** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *Febs Letters*, **581**, 2223-2226.
- Niewiadomski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U.S., Rosso, M.G., Ache, P., Flügge, U.I. and Schneider, A.** (2005) The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *The Plant Cell Online*, **17**, 760-775.
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. and Zeeman, S.C.** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, **303**, 87-89.
- Nooden, L., Guamet, J. and John, I.** (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **101**, 746-753.
- Oh, S.A., Lee, S.Y., Chung, I.K., Lee, C.-H. and Nam, H.G.** (1996) A senescence-associated gene of Arabidopsis thaliana is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, **30**, 739-754.

- Oh, S.A., Park, J.H., Lee, G.I., Paek, K.H., Park, S.K. and Nam, H.G.** (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **12**, 527-535.
- Paul, M.J. and Foyer, C.H.** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1383-1400.
- Picault, N., Hodges, M., Palmieri, L. and Palmieri, F.** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, **9**, 138-146.
- Preiss, Ball K, Smith-White B, Iglesias A and Kakefuda G, L.L.** (1991) Starch biosynthesis and its regulation. *Biochem Soc Trans*, **19**, 539-547.
- Rapoport, H. and Loomis, R.** (1986) Structural aspects of root thickening in *Beta vulgaris* L.: comparative thickening in sugarbeet and chard. *Botanical Gazette*, 270-277.
- Rea, P.A. and Sanders, D.** (1987) Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum*, **71**, 131-141.
- Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W. and Neuhaus, H.E.** (2004) Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **136**, 3524-3536.
- Richmond, A. and Lang, A.** (1957) Effect of Kinetin on protein content and survival of detached xanthium leaves. *Science*, **125**, 650-651.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L. and Frommer, W.B.** (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal*, **13**, 1.
- Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlowa, S., Haebelc, S., Kötting, O. and Steup, M.** (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *Febs Letters*, 4872–4876.
- Roberts, A. and Oparka, K.** (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. and Willmitzer, L.** (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *The EMBO journal*, **8**, 23.
- Romanova, A., Mudrik, V., Novichkova, N., Demidova, R. and Polyakova, V.** (2002) Physiological and biochemical characteristics of sugar beet plants grown at an increased carbon dioxide concentration and at various nitrate doses. *Russian Journal of Plant Physiology*, **49**, 204-210.
- Rowold, S.** (2013) Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus von Zuckerrüben (*Beta vulgaris*). In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Köln: Universität zu Köln.
- Sauer, N.** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *Febs Letters*, 2309–2317.
- Sauer, N. and 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. *The Plant Journal*, **6**, 67-77.

- Scheidig, A.** (2006) Molekulare Untersuchungen zum Stärkeabbau in vegetativen Pflanzenteilen: Universitätsbibliothek.
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., Schmitt, B., Batz, S., Wolf, S. and Hedrich, R.** (2012) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology*, **14**, 325-336.
- Schnepf, R.D.** (2006) European Union biofuels policy and agriculture: An overview: Congressional Research Service, Library of Congress.
- Schroeder, K.R., Stimart, D.P. and Nordheim, E.V.** (2001) Response of *Nicotiana glauca* to insertion of an autoregulated senescence-inhibition gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, 523-530.
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N. and Hedrich, R.** (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal*, **68**, 129-136.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. and Bresinsky, A.** (1998) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen.- 34. Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer.
- Smart, C.M.** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126**, 419-448.
- Smith, A.M., Denyer, K. and Martin, C.** (1997a) The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Biology*, **48**, 67-87.
- Smith, D.J. and Underwood, G.J.** (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology*, **36**, 321-333.
- Smith, P., Smith, J., Powlson, D., McGill, W., Arah, J., Chertov, O., Coleman, K., Franko, U., Frolking, S. and Jenkinson, D.** (1997b) A comparison of the performance of nine soil organic matter models using datasets from seven long-term experiments. *Geoderma*, **81**, 153-225.
- Snyder, F. and Tolbert, N.** (1966) Influence of nitrogen nutrition and season on photosynthetic incorporation of $C_{14}O_2$ into sucrose and other soluble compounds of the sugarbeet. *Botanical Gazette*, 164-170.
- Stitt, M., Herzog, B. and Heldt, H.W.** (1984) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate I. Coordination of CO_2 fixation and sucrose synthesis. *Plant Physiology*, **75**, 548-553.
- Straßburger** ed (2002).
- Swartzberg, D., Dai, N., Gan, S., Amasino, R. and Granot, D.** (2006) Effects of cytokinin production under two SAG promoters on senescence and development of tomato plants. *Plant Biology*, **8**, 579-586.
- Swartzberg, D., Hanael, R. and Granot, D.** (2011) Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biology*, **13**, 439-444.
- Sweetlove, L.J., Müller-Röber, B., Willmitzer, L. and Hill, S.A.** (1999) The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta*, **209**, 330-337.

- Sze, H., Li, X. and Palmgren, M.G.** (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell Online*, **11**, 677-689.
- Sze, H., Schumacher, K., Müller, M.L., Padmanaban, S. and Taiz, L.** (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump:VHA-genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends in Plant Science*, **7**, 157-161.
- Taiz, L.** (1992) The plant vacuole. *Journal of Experimental Biology*, **172**, 113-122.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2000) *Physiologie der Pflanzen*: Spektrum, Akad. Verlag.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2006) Stress physiology. *Plant Physiology*, **4**.
- Taylor, C., Bariola, P., Delcardayre, S., Raines, R. and Green, P.** (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *PNAS USA*, **90**, 5118–5122.
- Thomas, H. and Stoddart, J.L.** (1980) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**, 83-111.
- Tiessen, A., Hendriks, J.H., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E.M. and 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. *The Plant Cell Online*, **14**, 2191-2213.
- Tjaden, J., Möhlmann, T. and Kampfenkel, K.** (1998) Altered plastidic ATP/ADP-transporter 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. and Haferkamp, I.** (2008) Nonmitochondrial ATP/ADP transporters accept phosphate as third substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 36486-36493.
- Vreughdenhil, D.E.** (2007) *Potato biology and biotechnology* Amsterdam, Elsevier: Advances and Perspectives.
- W Patrick, J., C Botha, F. and G Birch, R.** (2013) Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnology Journal*, **11**, 142-156.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Gröner, F., Hebbeker, U. and Flügge, U.-I.** (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *The Plant Cell Online*, **12**, 787-801.
- Weiner, H., Stitt, M. and Heldt, H.W.** (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*, **893**, 13-21.
- Wingenter, K., Trentmann, O., Wünsch, I., Hörmiller, I.I., Heyer, A.G., Reinders, J., Schulz, A., Geiger, D., Hedrich, R. and Neuhaus, H.E.** (2011) A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal*, **68**, 890-900.
- Wingler, A., Von Schaewen, A., Leegood, R.C., Lea, P.J. and Quick, W.P.** (1998) Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology*, **116**, 329-335.

- Winnacker, A.L.** (1990) *Gene und Klone* Weinheim: VCH.
- Winter, H., Robinson, D.G. and Heldt, H.W.** (1993) Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta*, **191**, 180-190.
- Woolf, N.** (1969) Infrared emission from Planetary nebulae. *The Astrophysical Journal*, **157**, L37.
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E. and Neuhaus, H.E.** (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell Online*, **18**, 3476-3490.
- Wöstefeld, N.** (2010) Herstellung und Untersuchung von transgenen Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) mit erhöhter sink-Kapazität durch knollenspezifische Überexpression des AtAAC, PsGPT und AtNTT sowie Erstellung von Konstrukten zur Analyse und Verzögerung der Seneszenz. In Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich. Jülich: Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich.
- Xuan, Y.H., Hu, Y.B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D.C., Hou, B.-H. and Frommer, W.B.** (2013) Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, E3685-E3694.
- Yu, T.-S., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Fulton, D.C., Dunstan, H., Lue, W.-L., Hegemann, B., Tung, S.-Y., Umemoto, T. and Chapple, A.** (2005) α -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 9773-9779.
- Zeeman, S.C., Delatte, T., Messerli, G., Umhang, M., Stettler, M., Mettler, T., Streb, S., Reinhold, H. and Kötting, O.** (2007) Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Functional plant biology*, **34**, 465-473.
- Zhang, L.** (2005) Characterization of potato plants overexpressing plastidic transporters involved in starch metabolism: Universität zu Köln.
- Zhang, L., Häusler, R.E., Greiten, C., Hajirezaei, M.-R., Neuhaus, H.E., Flügge, U.-I. and 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.

Verwendete Internetquellen:

Biosicherheit, 2014

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

<http://www.biosicherheit.de/basisinfo/303.beta-familie.html>

imar-agar.de

<http://www.ima->

[agr.de/fileadmin/redaktion/download/pdf/Sachinfo_Zucker/Sachinfo_Zucker_4_Korrektur.pdf](http://www.ima-agar.de/fileadmin/redaktion/download/pdf/Sachinfo_Zucker/Sachinfo_Zucker_4_Korrektur.pdf)

KWS, 2014

http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.kws.de%2Fglobal%2Fshow_document.asp%3Fid%3Daaaaaaaaaagyjni%26download%3D1&ei=IkFUU93TFoX-PM3ggbgD&usg=AFQjCNGZDnk8teru1cbV4EBpS10n1Zw24Q&bvm=bv.65058239,d.Yms

mitzucker, 2014

<http://www.mitzucker.de/report-zuckerruebe>

proplanta, 2014

http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Pflanze/Geschichte-Zuckerruebe_article1353178372.html

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stärkeaufbaus in Chloroplasten.	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Stärkeabbaus in Chloroplasten.	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Saccharosesynthese im Cytosol.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Transportwege von Saccharose in der Rübenpfahlwurzel (Lalonde <i>et al.</i> , 1999) von <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe).	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bedeutung von GPT, NTT und AAC bei der Stärkesynthese in Amyloplasten.....	12
Abbildung 6: Regulation der Seneszenz mittels SAG12-IPT-System.	16
Abbildung 7: Darstellung einer Nano-Drop-Messung (http://www.ous- research.no/home/lothe/methods/5860)	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung der bei der Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose auftretenden Reaktionen.....	37
Abbildung 9: Zeitabhängige Entwicklung des Grüngewichts und der Grünfläche von <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe).	47
Abbildung 10: Zeitabhängige Entwicklung der Blattanzahl und der Blattfläche von <i>Beta vulgaris</i> (Zuckerrübe).	48
Abbildung 11: Einteilung der Blattstufen nach Blattgrößen (neun Wochen alte Zuckerrübe).	49
Abbildung 12: Entwicklungsabhängige Stärke- (alle drei Blattstufen) und Zuckergehalte (mittleres Blatt) in Rübenblättern.	50
Abbildung 13: Entwicklungsabhängiges Blattstärke/Blattzucker Verhältnis (mittleres Blatt) in Rübenblättern.	50
Abbildung 14: Zeitabhängige Entwicklung des Rübenpfahlwurzelgewichts und des Ernteindex.	51
Abbildung 15: Zeitabhängige Entwicklung der Rübenlänge und des Rübenumfangs pro Rübe in cm und das Verhältnis Rübenlänge/Rübenumfang.	52
Abbildung 16: Übersicht der Probenstellen für die Bestimmung der Zuckergehalte in den Rübenpfahlwurzeln.	53
Abbildung 17: Zeitabhängige Entwicklung des Rübensaccharosegehalts in Rübenpfahlwurzeln an verschiedenen Probenstellen in $\mu\text{mol/g}$	54
Abbildung 18: Expressionsanalysen des GPT, NTT, AGPase, TMT1, SUC1 und SUC2 von <i>Beta vulgaris</i> mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	55
Abbildung 19: Färbung des ligninhaltigen Gewebes von Pfahlwurzeln mittels Phloroglucin.....	56
Abbildung 20: Bestimmung der Menge an unlöslichen Stoffen in Zuckerrüben in % vom Frischgewicht und des Ligningehalt in % vom Trockengewicht.	57
Abbildung 21: Färbung zwei und drei Monate alter Zuckerrübenvakuolen mit 10 mM Acridinorange.	58
Abbildung 22: Lichtabhängige Entwicklung von drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen.	60

Abbildung 23: Grüngewicht und Grünfläche der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenrübenpflanzen.....	60
Abbildung 24: Blattanzahl und Assimilation (Blattstufe 2) der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen.	61
Abbildung 25: Blattstärke- und Blattsaccharosegehalt der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenrübenpflanzen.....	62
Abbildung 26: Rübengewicht der im Gewächshaus unter verschiedenen Lichtbedingungen angebauten zwei, drei, vier und fünf Monate alten Zuckerrübenrübenpflanzen.	64
Abbildung 27: Grüngewicht der in Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	65
Abbildung 28: Gesamtblattfläche der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	66
Abbildung 29: Blattanzahl der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	66
Abbildung 30: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	67
Abbildung 31: Blattsaccharosegehalte der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	68
Abbildung 32: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.	69
Abbildung 33: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.	70
Abbildung 34: Blattstärkegehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.	70
Abbildung 35: Blattzuckergehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten zwei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.	72
Abbildung 36: Blattzuckergehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten drei Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.	73
Abbildung 37: Blattzuckergehalt der im Gewächshaus und Freiland angebauten fünf Monate alten Zuckerrübenpflanzen im 24 Stunden Verlauf.	73
Abbildung 38: Rübengewicht der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	74
Abbildung 39: Rübenpfahlwurzellänge der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	75
Abbildung 40: Rübenpfahlwurzelumfang der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.	75
Abbildung 41: Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel der im Gewächshaus und im Freiland angebauten zwei und fünf Monate alten Zuckerrübensorten 7N und 8K.....	76

Abbildung 42: Phylogenetische Analyse von Phosphattranslokator Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (<i>Beta vulgaris</i>) im Vergleich mit Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
Abbildung 43: Phylogenetische Analyse von SUC/SUT Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (<i>Beta vulgaris</i>) im Vergleich mit SUC-Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
Abbildung 44: Phylogenetische Analyse von Saccharose Synthase Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (<i>Beta vulgaris</i>) im Vergleich mit Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
Abbildung 45: Phylogenetische Analyse von Sweet Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (<i>Beta vulgaris</i>) im Vergleich mit Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
Abbildung 46: Phylogenetische Analyse von TMT Homologen aus Zuckerrübenpflanzen (<i>Beta vulgaris</i>) im Vergleich mit Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
Abbildung 47: Klonierungsstrategie des blattspezifischen <i>AGPaseB</i> Antisense Konstrukts.....	85
Abbildung 48: Klonierungsstrategie des pfahlwurzel-spezifischen <i>AtAAC1</i> Konstrukts.....	87
Abbildung 49: Expressionsanalyse von AAC, GPT und NTT in Kartoffelknollen von ACGN-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	89
Abbildung 50: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.....	90
Abbildung 51: Stärkegehalt der Kartoffelblätter von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.....	91
Abbildung 52: Knollenertrag von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.	92
Abbildung 53: Ernteindex von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.....	93
Abbildung 54: Stärkegehalt in den Knollen von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.....	94
Abbildung 55: Gesamtstärkeertrag von ACGN und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.	95
Abbildung 56: Expressionsanalyse von GUS in Kartoffelblättern von GUS-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	97
Abbildung 57: GUS-Färbung verschiedener Blattstufen der GUS-Pflanzen zur Analyse der SAG12-Promotor-Aktivität.....	98
Abbildung 58: GUS-Färbung verschiedener Blattstufen der GUS-Pflanzen zur Analyse der SAG12-Promotor-Aktivität.....	99
Abbildung 59: Quantifizierung der GUS-Aktivität in verschiedener Blattstufen der GUS-Pflanzen.	99
Abbildung 60: Expressionsanalyse der IPT in Kartoffelblättern von IPT-Pflanzen mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	101
Abbildung 61: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	102
Abbildung 62: CO ₂ -Assimilation der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	103
Abbildung 63: Fv/Fm-Verhältnis der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	104

Abbildung 64: Chlorophyllgehalt der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus zwei verschiedenen Anzuchten.....	106
Abbildung 65: Repräsentativer Phänotyp von jeweils einer Pflanze der IPT-Linien und des Wildtyps.	106
Abbildung 66: Stärkegehalt der Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	108
Abbildung 67: Zuckergehalt der jungen Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	109
Abbildung 68: Zuckergehalt der mittelalten Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	110
Abbildung 69: Zuckergehalt der alten Kartoffelblätter von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	111
Abbildung 70: Knollenertrag von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.	112
Abbildung 71: Ernteindex von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.	113
Abbildung 72: Stärkegehalt in den Knollen von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.	114
Abbildung 73: Zuckergehalt in den Knollen von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.	115
Abbildung 74: Gesamtstärkeertrag von IPT und Wildtyppflanzen aus drei verschiedenen Anzuchten.....	116
Abbildung 75: Expressionsanalysen des GPT, NTT und IPT mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate.	118
Abbildung 76: Gewichte der oberirdischen grünen Pflanzenteile von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.....	119
Abbildung 77: Assimilation und Chlorophyllgehalt der jungen Blätter von IGN und Wildtyppflanzen aus der Hochlichtkammeranzucht.	120
Abbildung 78: Stärke- und Zuckergehalt der Blätter von IGN und Wildtyppflanzen aus der Hochlichtkammeranzucht.	120
Abbildung 79: Knollenertrag von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.	121
Abbildung 80: Ernteindex von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.	122
Abbildung 81: Stärkegehalt in Kartoffelknollen von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.	123
Abbildung 82: Zuckergehalt in Kartoffelknollen von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.	123
Abbildung 83: Gesamtstärkeertrag von IGN und Wildtyppflanzen aus einer Gewächshaus- und einer Hochlichtkammeranzucht.	124

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Vektoren, deren Herkunft und Resistenzen	19
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.....	20
Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika und deren Endkonzentrationen	21
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.....	21
Tabelle 5: PCR-Komponenten.....	32
Tabelle 6: PCR-Programm.....	32
Tabelle 7: PCR-Sequenzierungsprogramm	34
Tabelle 8: Übersicht der Zuckerrübenausaaten für die verschiedenen Zeitreihen.....	46

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	% (w/v)
°C	Grad Celsius
μ	mikro
3-PGA	3-Phosphoglycerat
<i>A. thaliana, At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAC	mitochondriale ADP/ATP-Transporter
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glukose-Pyrophosphorylase
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. vulgaris, Bv</i>	<i>Beta vulgaris</i>
B33	knollenspezifischer Patatin-Promotor
BG1	Pflanzenlinie mit GPT Überexpression
BGA	Pflanzenlinie mit GPT und NTT Überexpression
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (engl.:Cauliflower Mosaik Virus)
cDNA	copyDNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CO2	Kohlenstoffdioxid
cv.	Cultivar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat

DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxynukleosidtriphosphat
DPE 1	Disproportionierungsenzym 1
DPE2	Disproportionierungs-Enzym 2
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
etc.	et cetera (und so weiter)
EtOH	Ethanol
F1,6BP	Fruktose-1,6-Bisphosphat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
Fa.	Firma
FBPase	Fruktose-1,6-bisphosphatase
g	Gramm
G1P	Glukose-1-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
GAP	Gluceraldehyd-3-Phosphat
GBSS	granulagebundene Stärkesynthasen
ggfs.	gegebenenfalls
GPT	Glukose-6-Phosphat/Phosphat Translokator
GT	Glukosetransporter
GUS	β -Glucuronidase
GWD	Glukan-Wasser-Dikinase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HK	Hexokinase
Hyg	Hygromycin
IPT	Isopentenyltransferase
IRGA	Infrarotgasanalyse
ISA3	Stärke-Entzweigungsenzym Isoamylase 3

Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
KWS	KWS SAAT AG
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MEX	Maltoseexporter
MFS	Major-Facilitator-Superfamilie
Mg	Magnesium
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
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
Nos-ter	nos-Terminator
NTT	plastidären Adenylat-Translokator
OD	optische Dichte (Koeffizient, Wellenlänge des Lichtes an)
OPPW	Oxidativer Pentosephosphatweg
p	Wahrscheinlichkeit
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGI	Phosphoglukoisomerase
PGI	Phosphoglukoisomerase
PGM	Phosphoglukomutase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionen-Konzentration

Pi	Phosphatmoleküle
Pi	Orthophosphat
PPase	Pyrophosphatase
PPi	Pyrophosphat
PWD	Phosphoglukan-Wasser-Dikinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
RuBP	Ribulose-1,5-Bisphosphat
s	Sekunde
s.	siehe
SAG	Seneszenz-assoziierte Gene
SAG12	Promotor SAG12
SDG	Seneszenz-down regulierte Gene
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEP	Saccharose-Effluxproteine
SPP	Saccharosephosphat-Phosphatase
SS	Stärkesynthesen
SS	lösliche Stärkesynthase
StAbw	Standardabweichung
SUC/SUT	H ⁺ -Saccharose-Translokator
Suc6P	Saccharose-6-Phosphat
SuSy	Saccharosephosphat-Synthase
SUT	Saccharosetransporter
Taq	Thermus aquaticus
TMT	Tonoplast-Monosaccharid-Transporter
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokators
TPT	Triosphosphat/Phosphat-Translokator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	UDP-Glukose

UDPG	UDP-Glukose
UDPGase	UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
V-ATPase	ATPase vom V-Typus
V-Ppase	V-Pyrophosphatase
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyppflanzen
γg	γ -fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
z.B.	zum Beispiel
β	beta
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
λ	lamda
μE	Mikroeinsteinstrom ($\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2\text{s})$)

9 Anhang

9.1 Datenergänzung zur zeitabhängige Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingungen

Grünfläche pro Pflanze

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[cm ²]	STAF	[cm ²]	STAF	[cm ²]	STAF	[cm ²]	STAF
6 Wochen	402,90	40,76	127,15	25,34	830,50	109,36	1239,50	135,55
8 Wochen	461,90	56,16	740,90	114,11	810,30	51,72	1320,60	115,50
10 Wochen	1513,65	126,15	1488,80	192,97	2325,90	109,27	2095,35	117,95
12 Wochen	2636,30	248,81	1829,65	260,38	1398,80	146,90	1347,75	172,98
14 Wochen	2911,05	486,28	1366,25	304,62	1284,35	149,46	1851,99	124,41
16 Wochen	3405,58	235,43	1541,00	194,37	1800,55	140,42	1971,60	175,14
18 Wochen	2239,67	293,17	2298,20	172,82	2031,30	186,44	2477,04	204,65
20 Wochen	3265,55	181,38	2523,60	116,83	1765,65	321,42	3086,00	181,89
22 Wochen	3238,66	242,83	2892,20	482,17	1718,06	220,79	2438,40	280,67

Grüngewicht pro Pflanze

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[g]	STAF	[g]	STAF	[g]	STAF	[g]	STAF
6 Wochen	24,93	2,04	9,37	2,01	45,05	5,65	100,45	9,74
8 Wochen	33,38	4,40	53,27	7,04	37,73	3,30	91,18	5,92
10 Wochen	103,96	7,19	79,11	6,69	138,78	4,88	116,15	4,81
12 Wochen	175,53	11,67	92,89	9,89	82,28	6,84	65,61	8,78
14 Wochen	170,28	16,07	92,39	6,40	64,13	7,76	98,24	9,28
16 Wochen	177,34	20,93	91,09	11,11	107,34	8,20	132,00	15,61
18 Wochen	190,37	12,86	152,58	12,73	138,52	7,99	151,28	27,64
20 Wochen	198,24	6,54	154,84	13,99	119,76	16,37	175,33	21,02
22 Wochen	226,44	13,77	162,79	21,24	120,32	11,64	163,77	13,77

Blattanzahl pro Pflanze

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	Anzahl	STAF	Anzahl	STAF	Anzahl	STAF	Anzahl	STAF
6 Wochen	7,20	0,20	4,40	0,24	7,00	0,63	9,60	0,68
8 Wochen	8,00	0,32	9,40	0,51	7,20	0,37	10,00	0,32
10 Wochen	12,60	0,40	10,20	0,66	14,60	0,75	13,00	0,32
12 Wochen	16,60	0,87	15,00	1,18	13,40	0,60	14,20	0,49
14 Wochen	21,80	1,77	14,80	0,58	17,00	1,22	20,20	1,16
16 Wochen	19,40	1,81	16,60	0,93	23,00	0,71	23,00	1,10
18 Wochen	14,40	1,03	22,80	1,83	25,60	1,47	29,00	1,30
20 Wochen	22,40	0,51	25,20	0,58	28,60	2,25	33,00	2,28
22 Wochen	30,40	1,60	30,60	0,75	29,80	1,59	35,40	1,44

Verhältnis von Blattlänge/Blattbreite

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		STAF		STAF		STAF		STAF
6 Wochen	1,9	0,09	2,3	0,06	1,8	0,08	1,9	0,07
8 Wochen	1,9	0,11	2,2	0,17	1,9	0,07	1,9	0,10
10 Wochen	2,0	0,10	2,1	0,10	1,9	0,06	1,8	0,15
12 Wochen	1,7	0,10	2,0	0,12	1,8	0,06	2,3	0,06
14 Wochen	1,7	0,09	2,0	0,10	1,7	0,11	2,2	0,09
16 Wochen	1,8	0,10	2,0	0,06	1,7	0,05	2,1	0,07
18 Wochen	2,0	0,09	2,0	0,20	1,9	0,04	1,6	0,06
20 Wochen	1,8	0,05	1,7	0,09	2,0	0,12	1,7	0,08
22 Wochen	1,9	0,14	1,9	0,11	2,1	0,08	1,8	0,13

Rübenfahlwurzelgewicht pro Pflanze

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[g]	STAF	[g]	STAF	[g]	STAF	[g]	STAF
6 Wochen	4,78	0,43	1,55	0,45	11,26	1,53	30,64	2,36
8 Wochen	7,57	1,25	8,55	1,44	13,12	1,65	38,85	3,23
10 Wochen	46,47	4,36	27,17	2,49	84,46	7,46	77,83	7,75
12 Wochen	102,62	10,45	67,04	3,82	28,67	3,64	27,15	4,65
14 Wochen	248,90	20,62	111,97	12,45	48,40	6,62	121,94	14,96
16 Wochen	338,18	24,77	132,10	12,80	104,42	11,48	207,42	20,34
18 Wochen	374,52	27,18	239,04	10,23	193,37	11,56	505,26	31,23
20 Wochen	438,19	36,24	306,99	17,99	332,75	15,39	590,19	30,55
22 Wochen	529,93	42,93	384,78	37,49	353,54	12,22	694,46	15,77

Rübenlänge pro Pflanze

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[cm]	STAF	[cm]	STAF	[cm]	STAF	[cm]	STAF
6 Wochen	8,08	0,37	7,10	0,64	9,17	0,48	10,50	0,55
8 Wochen	8,80	0,44	5,57	0,17	10,50	0,22	13,67	0,71
10 Wochen	11,00	0,38	7,33	0,24	13,17	0,98	14,83	0,60
12 Wochen	11,93	0,38	9,29	0,26	11,25	0,63	8,83	0,54
14 Wochen	15,30	0,56	11,00	0,35	10,92	0,39	13,67	0,71
16 Wochen	16,29	0,49	13,67	0,61	13,57	0,30	15,50	0,32
18 Wochen	16,29	0,63	13,00	0,30	15,75	0,59	21,67	1,37
20 Wochen	18,29	0,67	19,21	1,18	21,00	1,83	23,83	1,16
22 Wochen	18,63	0,49	15,25	0,66	22,29	1,38	24,33	0,44

Rübenumfang pro Pflanze

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[cm]	STAF	[cm]	STAF	[cm]	STAF	[cm]	STAF
6 Wochen	2,50	0,18	1,30	0,12	6,17	0,21	8,92	0,27
8 Wochen	4,50	0,35	5,29	0,49	5,50	0,37	10,25	0,42
10 Wochen	10,06	0,29	8,89	0,39	14,17	0,21	14,08	0,88
12 Wochen	15,07	0,90	13,57	0,53	8,92	0,40	9,42	0,79
14 Wochen	21,15	0,75	15,22	0,48	11,58	0,60	17,25	0,59
16 Wochen	25,00	0,82	16,50	1,13	16,00	0,89	21,08	0,66
18 Wochen	27,07	0,96	21,89	0,71	20,56	0,53	28,92	1,03
20 Wochen	28,86	1,51	20,07	1,55	24,86	0,46	30,92	0,40
22 Wochen	28,94	0,89	26,58	1,26	24,21	0,57	34,92	0,82

Rübenradius pro Pflanze (mathematisch)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[cm]	STAF	[cm]	STAF	[cm]	STAF	[cm]	STAF
6 Wochen	0,40	0,03	0,21	0,02	0,98	0,03	1,42	0,04
8 Wochen	0,72	0,06	0,84	0,08	0,88	0,06	1,63	0,07
10 Wochen	1,60	0,05	1,42	0,06	2,26	0,03	2,24	0,14
12 Wochen	2,40	0,14	2,16	0,08	1,42	0,06	1,50	0,13
14 Wochen	3,37	0,12	2,42	0,08	1,84	0,10	2,75	0,09
16 Wochen	3,98	0,13	2,63	0,18	2,49	0,14	3,36	0,10
18 Wochen	4,31	0,15	3,49	0,11	3,27	0,08	4,60	0,16
20 Wochen	4,60	0,24	3,20	0,25	3,96	0,07	4,92	0,06
22 Wochen	4,61	0,14	4,23	0,20	3,86	0,09	5,56	0,13

Rübenvolumen pro Pflanze (mathematisch)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[cm ³]	STAF	[cm ³]	STAF	[cm ³]	STAF	[cm ³]	STAF
6 Wochen	1,34	0,14	0,31	0,04	9,44	1,14	22,30	1,84
8 Wochen	4,97	0,94	4,36	0,80	8,61	1,03	38,37	3,68
10 Wochen	29,80	2,18	15,73	1,60	70,06	5,38	78,77	9,20
12 Wochen	72,83	7,59	45,55	3,23	24,25	3,01	22,17	4,13
14 Wochen	186,05	17,16	68,58	5,71	39,93	4,81	110,64	13,44
16 Wochen	273,60	22,48	101,30	12,72	90,22	11,22	184,56	13,69
18 Wochen	320,21	25,98	166,63	11,22	176,53	8,51	477,99	34,36
20 Wochen	415,52	46,43	205,50	26,52	342,67	28,11	606,80	38,80
22 Wochen	419,55	34,08	294,58	41,00	345,90	23,18	790,85	44,01

Rübendichte pro Pflanze (mathematisch)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	[g/cm ³]	STAF	[g/cm ³]	STAF	[g/cm ³]	STAF	[g/cm ³]	STAF
6 Wochen	3,87	0,69	3,81	0,69	1,20	0,11	1,39	0,07
8 Wochen	1,57	0,08	1,99	0,11	1,53	0,06	1,03	0,07
10 Wochen	1,55	0,06	1,76	0,07	1,20	0,04	1,01	0,07
12 Wochen	1,39	0,05	1,49	0,06	1,18	0,06	1,27	0,06
14 Wochen	1,36	0,05	1,66	0,16	1,21	0,04	1,11	0,04
16 Wochen	1,25	0,04	1,37	0,09	1,13	0,04	1,12	0,04
18 Wochen	1,18	0,04	1,47	0,08	1,10	0,05	1,08	0,08
20 Wochen	1,09	0,07	1,63	0,20	0,99	0,06	0,98	0,04
22 Wochen	1,28	0,07	1,34	0,05	1,04	0,05	0,89	0,05

Blattstärke (junges Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF
6 Wochen	7,15	0,55	11,45	0,72	13,51	1,65	15,80	1,04
8 Wochen	4,74	0,45	10,69	0,96	12,35	1,03	13,38	0,60
10 Wochen	3,86	0,66	11,72	0,11	11,33	0,72	10,61	1,43
12 Wochen	4,23	0,38	10,97	0,95	5,02	0,24	5,50	0,72
14 Wochen	2,69	0,33	10,27	0,73	5,91	0,38	6,27	0,56
16 Wochen	1,79	0,32	9,21	0,89	5,66	0,31	8,25	0,88
18 Wochen	1,38	0,15	11,06	0,55	7,15	0,52	5,98	0,81
20 Wochen	1,09	0,14	10,51	0,83	6,49	0,17	4,95	0,58
22 Wochen	1,51	0,18	10,57	0,64	8,37	0,50	8,63	1,01

Blattstärke (mittelaltes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF
6 Wochen	8,71	0,51	13,13	0,79	18,99	1,28	15,76	1,03
8 Wochen	6,10	0,60	8,56	0,80	15,70	0,96	13,32	1,15
10 Wochen	5,35	0,45	11,24	0,45	11,70	0,45	8,59	0,45
12 Wochen	4,05	0,20	8,36	0,59	8,16	0,78	4,65	0,34
14 Wochen	1,98	0,35	7,81	0,32	5,86	0,57	5,93	0,56
16 Wochen	1,53	0,15	7,08	0,84	5,39	0,24	6,61	0,86
18 Wochen	1,42	0,31	8,35	0,75	4,65	0,39	4,75	0,49
20 Wochen	1,23	0,17	6,67	0,26	5,30	0,68	4,23	1,05
22 Wochen	1,29	0,06	6,27	0,61	5,48	0,45	5,67	0,66

Blattstärke (altes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²	STAF
6 Wochen	8,53	0,21	15,61	0,61	19,03	0,72	10,18	0,97
8 Wochen	6,41	0,65	10,29	0,42	14,14	0,64	13,94	1,19
10 Wochen	4,41	0,69	4,29	0,70	7,13	0,60	6,77	0,83
12 Wochen	3,94	0,71	5,04	1,18	7,56	0,34	4,40	1,09
14 Wochen	1,25	0,39	6,39	1,84	5,51	0,58	4,43	0,37
16 Wochen	1,01	0,07	4,14	0,81	5,56	0,79	3,93	0,37
18 Wochen	1,10	0,09	4,85	1,16	4,57	0,44	3,85	0,26
20 Wochen	1,03	0,13	3,58	1,32	3,12	0,37	3,34	0,51
22 Wochen	0,96	0,04	3,26	1,05	3,36	0,52	2,96	0,31

Blattglukose (junges Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²	STAF
6 Wochen	1,29	0,09	1,12	0,13	1,05	0,21	4,20	0,43
8 Wochen	1,19	0,16	1,66	0,13	1,51	0,15	1,93	0,04
10 Wochen	0,86	0,07	3,36	0,38	1,04	0,19	0,08	0,07
12 Wochen	1,07	0,15	1,49	0,11	1,43	0,34	0,05	0,02
14 Wochen	0,83	0,15	3,28	0,44	0,89	0,12	1,36	0,42
16 Wochen	0,57	0,06	14,02	1,27	0,98	0,07	1,67	0,07
18 Wochen	0,77	0,10	13,85	1,14	4,02	0,79	0,76	0,07
20 Wochen	0,57	0,06	5,61	0,25	1,99	0,28	1,48	0,09
22 Wochen	0,76	0,11	14,24	1,08	2,64	0,53	1,77	0,17

Blattglukose (mittelaltes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²	STAF
6 Wochen	0,73	0,07	0,72	0,09	0,98	0,09	1,20	0,17
8 Wochen	0,97	0,16	0,73	0,02	0,78	0,04	1,79	0,18
10 Wochen	0,69	0,08	0,83	0,09	0,94	0,10	0,10	0,11
12 Wochen	0,65	0,07	0,45	0,05	0,43	0,09	0,05	0,02
14 Wochen	0,90	0,31	1,33	0,14	0,56	0,09	0,62	0,06
16 Wochen	0,89	0,09	1,81	0,03	1,03	0,11	1,15	0,06
18 Wochen	0,63	0,07	2,05	0,21	0,99	0,13	0,70	0,03
20 Wochen	0,54	0,03	1,62	0,31	1,56	0,19	0,79	0,11
22 Wochen	0,76	0,14	2,43	0,19	2,97	0,26	1,15	0,18

Blattglukose (altes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²	STAF
6 Wochen	0,79	0,09	0,69	0,04	1,01	0,08	1,35	0,20
8 Wochen	0,55	0,16	0,60	0,08	0,88	0,07	1,16	0,29
10 Wochen	0,36	0,07	0,32	0,08	0,47	0,05	0,13	0,08
12 Wochen	0,38	0,15	0,58	0,03	0,17	0,04	0,10	0,02
14 Wochen	0,79	0,15	0,47	0,06	0,19	0,08	0,69	0,12
16 Wochen	0,69	0,06	0,53	0,06	0,38	0,31	0,90	0,10
18 Wochen	0,65	0,10	1,96	0,28	0,92	0,09	1,16	0,07
20 Wochen	0,55	0,06	1,39	0,16	1,60	0,14	1,30	0,12
22 Wochen	0,44	0,11	1,88	0,20	1,68	0,33	1,02	0,12

Blattfruktose (junges Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
	mmol/m ²	STAF	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²	STAF
6 Wochen	0,90	0,03	0,45	0,03	3,06	0,59	1,64	0,43
8 Wochen	1,01	0,07	1,51	0,04	0,93	0,12	0,75	0,10
10 Wochen	1,00	0,12	2,11	0,09	1,26	0,33	0,12	0,02
12 Wochen	0,83	0,14	0,78	0,04	1,83	0,51	0,28	0,08
14 Wochen	0,37	0,02	3,52	0,04	0,65	0,07	0,40	0,03
16 Wochen	0,46	0,07	5,09	0,87	0,33	0,03	0,57	0,07
18 Wochen	0,54	0,04	1,93	0,12	0,33	0,08	0,39	0,02
20 Wochen	0,66	0,12	1,11	0,20	0,60	0,08	0,72	0,03
22 Wochen	0,99	0,11	5,98	0,49	0,49	0,06	0,74	0,07

Blattfruktose (mittelaltes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4		STAF
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		
6 Wochen	0,80	0,06	0,47	0,04	0,93	0,08	0,90	0,09	
8 Wochen	0,77	0,04	0,57	0,05	0,80	0,06	0,87	0,08	
10 Wochen	0,71	0,10	0,85	0,17	0,88	0,10	0,13	0,04	
12 Wochen	0,53	0,08	0,39	0,08	0,48	0,06	0,43	0,12	
14 Wochen	0,39	0,06	0,54	0,15	0,35	0,08	0,78	0,07	
16 Wochen	0,46	0,04	0,41	0,05	0,44	0,09	0,64	0,10	
18 Wochen	0,46	0,06	2,21	0,18	0,44	0,07	0,98	0,16	
20 Wochen	0,76	0,13	1,10	0,08	0,76	0,23	1,31	0,34	
22 Wochen	0,64	0,06	1,85	0,08	2,25	0,28	0,70	0,09	

Blattfruktose (altes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4		STAF
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		
6 Wochen	0,67	0,11	0,60	0,06	0,98	0,08	0,60	0,08	
8 Wochen	0,50	0,05	0,45	0,02	0,60	0,07	0,76	0,05	
10 Wochen	0,42	0,06	0,38	0,09	0,87	0,11	0,12	0,15	
12 Wochen	0,41	0,05	0,78	0,05	0,29	0,03	0,26	0,06	
14 Wochen	0,41	0,13	0,53	0,06	0,65	0,31	1,03	0,19	
16 Wochen	0,75	0,09	0,73	0,15	0,44	0,03	1,18	0,16	
18 Wochen	0,80	0,15	3,74	0,46	1,46	0,06	1,74	0,16	
20 Wochen	0,87	0,07	2,83	0,36	2,93	0,20	1,93	0,23	
22 Wochen	0,74	0,14	3,01	0,09	2,74	0,37	2,18	0,25	

Blattsaccharose (junges Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4		STAF
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		
6 Wochen	0,30	0,03	0,84	0,02	1,08	0,18	1,77	0,18	
8 Wochen	0,51	0,09	0,83	0,07	0,82	0,10	1,42	0,06	
10 Wochen	0,50	0,04	1,65	0,22	1,04	0,14	4,17	0,94	
12 Wochen	0,56	0,03	1,73	0,09	0,98	0,16	3,05	0,39	
14 Wochen	1,56	0,10	1,66	0,12	0,77	0,06	1,66	0,06	
16 Wochen	2,69	0,16	3,17	0,48	1,28	0,15	1,85	0,18	
18 Wochen	2,14	0,15	2,03	0,45	1,43	0,18	2,81	0,16	
20 Wochen	1,41	0,25	2,34	0,20	1,61	0,02	2,19	0,31	
22 Wochen	1,50	0,08	3,10	0,22	1,82	0,19	2,00	0,21	

Blattsaccharose (mittelaltes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4		STAF
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		
6 Wochen	0,51	0,03	1,04	0,08	1,06	0,09	1,49	0,12	
8 Wochen	0,72	0,07	0,67	0,04	1,06	0,07	1,28	0,17	
10 Wochen	0,71	0,05	1,39	0,08	1,23	0,19	4,62	0,45	
12 Wochen	0,89	0,06	2,28	0,24	0,96	0,07	2,83	0,14	
14 Wochen	1,58	0,07	2,06	0,20	0,91	0,14	2,43	0,14	
16 Wochen	2,74	0,29	2,29	0,22	1,74	0,14	2,37	0,09	
18 Wochen	2,90	0,20	3,06	0,17	2,65	0,32	3,29	0,19	
20 Wochen	2,28	0,22	4,35	0,28	2,70	0,23	2,83	0,41	
22 Wochen	2,50	0,04	3,85	0,34	4,67	0,31	3,37	0,19	

Blattsaccharose (altes Blatt)

Alter	Zeitreihe 1		Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4		STAF
	mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		mmol/m ²		
6 Wochen	0,52	0,04	0,96	0,10	1,43	0,07	1,66	0,12	
8 Wochen	0,77	0,08	1,08	0,07	1,19	0,07	2,27	0,07	
10 Wochen	1,02	0,12	1,97	0,09	1,41	0,22	7,02	0,73	
12 Wochen	1,09	0,07	4,04	0,16	1,57	0,14	3,72	0,39	
14 Wochen	1,80	0,03	3,22	0,30	2,18	0,38	3,65	0,12	
16 Wochen	2,72	0,17	3,36	0,44	2,36	0,12	3,40	0,41	
18 Wochen	2,52	0,27	4,57	0,42	3,65	0,41	4,31	0,29	
20 Wochen	1,64	0,14	6,54	0,21	3,97	0,32	4,23	0,52	
22 Wochen	2,20	0,24	4,35	0,37	6,74	0,63	3,52	0,59	

Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[μ mol/g]	STAF	[μ mol/g]	STAF	[μ mol/g]	STAF
6 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
14 Wochen	Außen/Oben	307,53	21,82	-	-	-	-
16 Wochen	Außen/Oben	310,37	13,76	414,65	22,93	370,89	52,42
18 Wochen	Außen/Oben	359,79	15,83	400,73	28,36	528,16	87,76
20 Wochen	Außen/Oben	409,22	23,29	513,02	39,54	336,93	15,45
22 Wochen	Außen/Oben	542,58	40,33	607,94	42,78	460,37	31,35

Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Oben/Mitte	-	-	271,84	62,50	306,38	16,95
8 Wochen	Oben/Mitte	110,63	20,74	258,29	6,55	451,40	63,11
10 Wochen	Oben/Mitte	187,46	15,19	240,71	11,83	340,01	16,36
12 Wochen	Oben/Mitte	270,42	19,76	236,89	42,02	317,10	35,85
14 Wochen	Oben/Mitte	302,09	25,14	264,32	49,83	459,32	34,13
16 Wochen	Oben/Mitte	301,50	25,20	413,60	21,40	475,32	60,94
18 Wochen	Oben/Mitte	371,98	15,85	420,05	29,85	430,11	61,71
20 Wochen	Oben/Mitte	451,73	22,44	578,08	28,02	386,63	32,34
22 Wochen	Oben/Mitte	510,39	11,90	607,23	36,06	430,85	50,38

Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
14 Wochen	Außen/Mitte	258,42	22,50	-	-	-	-
16 Wochen	Außen/Mitte	278,87	18,06	413,55	23,18	433,56	16,29
18 Wochen	Außen/Mitte	307,96	9,77	408,55	23,20	729,05	29,65
20 Wochen	Außen/Mitte	433,43	28,19	529,10	53,50	549,21	59,13
22 Wochen	Außen/Mitte	468,99	19,92	511,13	49,75	603,73	91,12

Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Mitte/Mitte	241,65	5,44	-	-	-	-
14 Wochen	Mitte/Mitte	260,58	17,88	305,85	29,95	376,31	29,70
16 Wochen	Mitte/Mitte	250,47	25,56	413,60	21,40	319,56	29,75
18 Wochen	Mitte/Mitte	443,30	25,14	424,14	24,33	620,82	53,52
20 Wochen	Mitte/Mitte	524,58	16,51	483,94	31,91	512,49	66,10
22 Wochen	Mitte/Mitte	460,43	27,76	538,72	38,30	541,76	52,50

Saccharosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Spitze	-	-	-	-	283,13	16,95
8 Wochen	Spitze	-	-	-	-	347,77	69,24
10 Wochen	Spitze	175,39	10,53	208,66	15,43	376,91	28,04
12 Wochen	Spitze	233,53	12,90	296,94	25,22	496,64	1,72
14 Wochen	Spitze	228,76	8,59	346,43	58,22	358,26	20,85
16 Wochen	Spitze	296,97	13,51	392,10	39,05	403,36	36,85
18 Wochen	Spitze	293,48	8,59	443,79	30,14	515,97	35,84
20 Wochen	Spitze	388,62	13,27	456,75	20,58	511,10	56,68
22 Wochen	Spitze	415,40	32,99	554,55	40,23	365,21	38,16

Glukosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
14 Wochen	Außen/Oben	0,21	0,052	-	-	-	-
16 Wochen	Außen/Oben	0,56	0,021	1,86	0,195	2,49	1,133
18 Wochen	Außen/Oben	1,26	0,081	1,80	0,254	15,43	1,389
20 Wochen	Außen/Oben	0,39	0,069	2,03	0,325	4,83	2,548
22 Wochen	Außen/Oben	1,99	0,173	1,68	0,238	1,42	0,172

Glukosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Oben/Mitte	-	-	9,27	2,10	6,07	0,78
8 Wochen	Oben/Mitte	0,00	0,00	5,13	0,99	29,25	16,39
10 Wochen	Oben/Mitte	0,68	0,14	4,62	0,65	14,93	7,58
12 Wochen	Oben/Mitte	0,81	0,06	1,78	0,085	10,35	5,086
14 Wochen	Oben/Mitte	0,61	0,106	3,14	0,339	1,75	0,322
16 Wochen	Oben/Mitte	1,00	0,075	1,95	0,334	1,75	0,731
18 Wochen	Oben/Mitte	2,41	0,09	2,01	0,285	3,31	1,211
20 Wochen	Oben/Mitte	1,20	0,07	2,33	0,475	13,05	3,935
22 Wochen	Oben/Mitte	2,21	0,247	2,26	0,353	2,91	0,251

Glukosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
14 Wochen	Außen/Mitte	0,14	0,065	-	-	-	-
16 Wochen	Außen/Mitte	0,25	0,048	2,16	0,498	0,65	0,23
18 Wochen	Außen/Mitte	1,31	0,099	1,45	0,153	11,24	4,985
20 Wochen	Außen/Mitte	0,55	0,082	1,73	0,241	10,92	4,946
22 Wochen	Außen/Mitte	1,84	0,12	2,35	0,484	1,83	0,289

Glukosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Mitte/Mitte	0,69	0,04	-	-	-	-
14 Wochen	Mitte/Mitte	0,12	0,096	7,04	2,502	4,28	1,705
16 Wochen	Mitte/Mitte	1,22	0,072	2,52	0,247	1,74	0,171
18 Wochen	Mitte/Mitte	2,50	0,188	3,04	0,943	10,49	6,146
20 Wochen	Mitte/Mitte	2,35	0,277	1,81	0,317	21,66	7,224
22 Wochen	Mitte/Mitte	2,65	0,135	2,98	0,878	2,12	0,228

Glukosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Spitze	-	-	-	-	5,95	1,86
8 Wochen	Spitze	-	-	-	-	28,84	15,17
10 Wochen	Spitze	0,70	0,07	6,94	3,04	11,19	2,77
12 Wochen	Spitze	0,76	0,07	1,97	0,445	27,90	18,85
14 Wochen	Spitze	0,55	0,077	2,29	0,792	1,81	0,499
16 Wochen	Spitze	0,39	0,053	3,04	0,834	0,27	0,359
18 Wochen	Spitze	0,98	0,093	2,82	0,436	17,25	7,642
20 Wochen	Spitze	1,01	0,113	1,51	0,255	23,45	6,538
22 Wochen	Spitze	1,59	0,261	2,04	0,427	2,81	0,791

Fructosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Außen/Oben	-	-	-	-	-	-
14 Wochen	Außen/Oben	0,21	0,052	-	-	-	-
16 Wochen	Außen/Oben	0,56	0,021	6,48	0,931	1,48	0,333
18 Wochen	Außen/Oben	1,26	0,081	4,08	0,693	36,12	14,25
20 Wochen	Außen/Oben	0,39	0,069	4,58	0,958	17,12	8,539
22 Wochen	Außen/Oben	1,99	0,173	3,63	0,622	5,43	2,566

Fructosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Oben/Mitte	-	-	16,57	1,75	9,00	5,02
8 Wochen	Oben/Mitte	0,00	0,00	10,23	1,64	59,56	16,39
10 Wochen	Oben/Mitte	0,68	0,14	10,08	2,35	33,83	23,95
12 Wochen	Oben/Mitte	0,81	0,06	5,11	1,688	18,37	9,232
14 Wochen	Oben/Mitte	0,61	0,106	24,77	8,285	9,49	3,616
16 Wochen	Oben/Mitte	1,00	0,075	8,75	1,21	1,35	0,1
18 Wochen	Oben/Mitte	2,41	0,09	5,63	1,898	26,87	15,35
20 Wochen	Oben/Mitte	1,20	0,07	3,31	0,754	69,25	16,97
22 Wochen	Oben/Mitte	2,21	0,247	4,58	0,667	3,78	1,141

Fructosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Außen/Mitte	-	-	-	-	-	-
14 Wochen	Außen/Mitte	0,14	0,065	-	-	-	-
16 Wochen	Außen/Mitte	0,25	0,048	9,12	2,168	1,66	0,319
18 Wochen	Außen/Mitte	1,31	0,099	4,95	1,185	27,40	12,19
20 Wochen	Außen/Mitte	0,55	0,082	3,84	0,552	57,78	22,66
22 Wochen	Außen/Mitte	1,84	0,12	4,03	1,076	3,53	0,791

Fructosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
8 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
10 Wochen	Mitte/Mitte	-	-	-	-	-	-
12 Wochen	Mitte/Mitte	0,69	0,04	-	-	-	-
14 Wochen	Mitte/Mitte	0,12	0,096	5,17	0,87	2,05	0,21
16 Wochen	Mitte/Mitte	1,22	0,072	2,94	0,461	36,51	16,54
18 Wochen	Mitte/Mitte	2,50	0,188	3,57	0,908	16,12	10,55
20 Wochen	Mitte/Mitte	2,35	0,277	3,70	0,212	40,65	18,38
22 Wochen	Mitte/Mitte	2,65	0,135	1,48	0,17	3,63	0,624

Fructosegehalt in der Rübenpfahlwurzel

Alter	Proben- stelle	Zeitreihe 2		Zeitreihe 3		Zeitreihe 4	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
6 Wochen	Spitze	-	-	-	-	21,86	16,01
8 Wochen	Spitze	-	-	-	-	81,91	29,85
10 Wochen	Spitze	0,70	0,07	13,55	4,08	15,06	8,49
12 Wochen	Spitze	0,76	0,07	5,42	1,312	30,19	12,6
14 Wochen	Spitze	0,55	0,077	4,36	0,864	11,83	8,14
16 Wochen	Spitze	0,39	0,053	11,71	2,867	5,96	3,233
18 Wochen	Spitze	0,98	0,093	5,13	1,45	36,51	16,54
20 Wochen	Spitze	1,01	0,113	4,54	0,961	14,99	9,257
22 Wochen	Spitze	1,59	0,261	4,06	0,583	5,63	1,863

9.2 Datenergänzung zur zeitabhängige Ontogenese von *Beta vulgaris* unter Gewächshausbedingungen

Lichtexperiment (2 Monate)

Licht	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
wenig	1	0,91	0,27	0,83	0,29	0,88	0,08
normal	1	4,53	1,82	0,66	0,30	2,90	0,67
viel	1	0,41	0,08	0,18	0,09	1,85	0,58
wenig	2	0,37	0,08	0,29	0,08	1,05	0,17
normal	2	0,35	0,10	0,79	0,28	3,79	0,54
viel	2	0,41	0,30	0,18	0,09	1,85	0,55
wenig	3	0,18	0,02	0,21	0,04	1,13	0,20
normal	3	0,20	0,02	0,95	0,41	4,95	0,69
viel	3	2,71	1,00	0,91	0,28	2,50	0,60

Lichtexperiment (3 Monate)

Licht	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
wenig	1	1,61	0,33	0,91	0,16	0,93	0,12
normal	1	1,40	0,28	0,80	0,22	1,87	0,23
viel	1	0,14	0,12	0,80	0,12	1,90	0,41
wenig	2	0,77	0,24	1,08	0,30	1,45	0,23
normal	2	1,19	0,29	0,98	0,19	1,90	0,19
viel	2	0,14	0,08	0,80	0,34	1,90	0,33
wenig	3	1,12	0,13	1,33	0,09	2,25	0,36
normal	3	1,01	0,12	0,90	0,12	2,88	0,63
viel	3	0,85	0,29	0,41	0,10	1,64	0,22

Lichtexperiment (4 Monate)

Licht	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
wenig	1	2,15	0,38	0,89	0,05	0,89	0,20
normal	1	3,08	0,69	1,73	0,71	1,20	0,19
viel	1	0,30	0,33	0,66	0,25	3,16	0,26
wenig	2	0,91	0,02	0,59	0,07	1,39	0,20
normal	2	1,12	0,10	0,75	0,10	1,70	0,15
viel	2	0,30	0,13	0,66	0,10	3,16	0,61
wenig	3	0,68	0,20	0,77	0,36	2,12	0,45
normal	3	0,94	0,19	0,89	0,24	2,12	0,32
viel	3	3,28	0,72	1,15	0,17	1,71	0,40

Lichtexperiment (5 Monate)

Licht	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
wenig	1	0,38	0,06	0,12	0,08	1,56	0,25
normal	1	1,42	0,47	0,15	0,09	2,12	0,31
viel	1	3,00	0,66	0,71	0,16	3,50	0,38
wenig	2	0,68	0,15	0,13	0,03	2,09	0,37
normal	2	0,91	0,23	0,20	0,08	2,68	0,26
viel	2	3,00	1,25	0,71	0,25	3,50	1,05
wenig	3	2,29	0,79	0,53	0,19	3,11	0,77
normal	3	1,99	0,92	0,35	0,17	3,86	0,85
viel	3	1,71	0,43	0,57	0,24	2,01	0,24

9.3 Datenergänzung zur umgebungs- und zeitabhängige Entwicklung von *Beta vulgaris*

Rübenpfahlwurzel

		Glukose		Fruktose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Rübe 8K (Freil.)	2 Monate	1,32	0,16	0,42	0,08
Rübe 8K (Gewächs.)	2 Monate	1,06	0,11	0,24	0,02
Rübe 7N (Freil.)	2 Monate	1,39	0,22	0,30	0,08
Rübe 7N (Gewächs.)	2 Monate	0,34	0,07	0,17	0,02
Rübe 8K (Freil.)	5 Monate	1,61	0,32	0,12	0,03
Rübe 8K (Gewächs.)	5 Monate	1,88	0,23	0,89	0,12
Rübe 7N (Freil.)	5 Monate	0,53	0,11	0,31	0,05
Rübe 7N (Gewächs.)	5 Monate	0,90	0,05	0,36	n.d

Blattzucker Freiland 7N (2 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	4,54	0,20	5,11	0,49	1,74	0,13
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	1,83	0,12	3,20	0,34	2,27	0,08
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	2,41	0,11	3,28	0,22	3,15	0,24
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	3,05	0,29	4,41	0,61	1,29	0,09
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	1,14	0,22	1,97	0,26	1,28	0,06
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	0,39	0,08	1,18	0,22	1,75	0,10

Blattzucker Gewächshaus 7N (5 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	0,52	0,04	0,28	0,05	2,08	0,35
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	0,39	0,03	0,79	0,09	2,62	0,21
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	0,52	0,14	0,47	0,15	2,32	0,17
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	0,60	0,06	0,17	0,02	1,60	0,09
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	0,99	0,09	0,24	0,03	2,48	0,23
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	0,97	0,03	1,37	0,32	2,35	0,24

Blattzucker Freiland 7N (5 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	3,20	0,33	4,85	0,60	3,30	0,07
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	2,61	0,62	4,20	0,64	5,00	0,20
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	1,68	0,19	3,17	0,26	5,09	0,72
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	5,61	1,04	7,70	0,98	2,10	0,18
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	2,70	0,51	3,58	0,54	2,57	0,16
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	1,06	0,16	1,98	0,25	2,47	0,58

Blattzucker Gewächshaus 8K (2 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	4,65	0,44	3,00	0,30	1,33	0,10
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	1,65	0,25	1,42	0,14	1,77	0,25
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	1,60	0,17	1,13	0,23	2,29	0,22
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	3,01	0,55	1,60	0,23	1,14	0,04
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	1,37	0,61	1,16	0,18	0,74	0,12
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	0,74	0,19	0,42	0,03	1,19	0,10

Blattzucker Freiland 8K (2 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	3,92	0,15	4,17	0,47	2,48	0,18
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	2,97	0,32	4,48	0,63	3,80	0,28
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	2,81	0,40	3,63	0,66	4,71	0,47
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	3,13	0,50	4,35	0,69	1,53	0,19
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	3,22	0,32	3,86	0,22	2,20	0,20
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	1,80	0,16	3,12	0,41	2,99	0,18

Blattzucker Gewächshaus 8K (5 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	4,49	0,79	0,73	0,05	1,99	0,15
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	2,50	0,74	1,18	0,07	2,98	0,27
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	2,94	0,94	1,58	0,47	3,58	0,20
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	1,71	0,72	0,60	0,08	2,13	0,32
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	1,36	0,44	0,77	0,21	3,20	0,22
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	2,59	1,21	0,38	0,07	1,16	0,10

Blattzucker Freiland 8K (5 Monate)

Uhrzeit	Stelle	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Tag (15 Uhr)	Blatt 1	6,57	1,26	9,49	0,40	2,92	0,41
Tag (15 Uhr)	Blatt 2	6,87	0,65	9,07	0,69	3,72	0,35
Tag (15 Uhr)	Blatt 3	1,10	0,16	1,39	0,30	3,68	0,26
Nacht (23 Uhr)	Blatt 1	3,88	1,56	7,91	1,71	2,84	0,04
Nacht (23 Uhr)	Blatt 2	0,96	0,28	1,57	0,40	3,19	0,46
Nacht (23 Uhr)	Blatt 3	4,29	1,74	6,52	1,01	2,33	0,20

Blattzucker Freiland 24 Stunden
 (2 Monate)

Uhrzeit	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Zeit 1 (12:00)	1	12,78	1,03	17,62	1,81	2,94	0,24
Zeit 2 (15:00)	1	13,80	0,58	20,85	1,79	4,20	0,06
Zeit 3 (18:00)	1	13,41	1,19	20,48	1,78	3,87	0,67
Zeit 4 (21:00)	1	11,19	1,39	17,18	1,77	2,39	0,27
Zeit 5 (00:00)	1	8,35	0,82	13,49	1,35	3,13	1,35
Zeit 6 (03:00)	1	10,43	0,82	15,43	1,72	1,50	0,12
Zeit 7 (06:00)	1	9,53	1,47	13,26	1,55	1,47	0,23
Zeit 8 (09:00)	1	8,62	0,98	11,44	1,29	1,29	0,14
Zeit 9 (12:00)	1	10,84	1,71	11,07	1,05	1,25	0,09
Zeit 1 (12:00)	2	12,85	1,08	20,91	1,67	3,52	0,33
Zeit 2 (15:00)	2	11,93	0,54	20,14	1,29	3,92	0,15
Zeit 3 (18:00)	2	11,94	1,22	19,36	1,68	3,66	0,28
Zeit 4 (21:00)	2	10,37	0,95	19,05	2,10	2,77	0,21
Zeit 5 (00:00)	2	8,73	1,14	16,03	2,07	2,03	0,16
Zeit 6 (03:00)	2	8,79	1,37	15,80	2,39	2,00	0,24
Zeit 7 (06:00)	2	8,66	0,75	16,00	1,31	1,71	0,14
Zeit 8 (09:00)	2	8,50	1,41	16,13	1,33	2,16	0,20
Zeit 9 (12:00)	2	8,13	0,92	13,71	1,00	1,69	0,04
Zeit 1 (12:00)	3	11,64	1,46	22,88	2,07	5,22	0,77
Zeit 2 (15:00)	3	13,25	1,77	22,73	1,36	5,30	0,72
Zeit 3 (18:00)	3	11,96	0,81	21,90	1,77	4,54	0,22
Zeit 4 (21:00)	3	10,95	0,92	20,88	1,40	3,09	0,19
Zeit 5 (00:00)	3	8,01	1,23	17,81	2,04	2,26	0,17
Zeit 6 (03:00)	3	8,42	1,58	18,00	2,79	2,39	0,10
Zeit 7 (06:00)	3	9,21	1,18	20,04	2,89	2,56	0,30
Zeit 8 (09:00)	3	7,63	1,62	14,59	2,94	1,81	0,30
Zeit 9 (12:00)	3	7,99	1,83	15,32	2,49	1,69	0,16

Blattzucker Gewächshaus 24 Stunden
(2 Monate)

Uhrzeit	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Zeit 1 (12:00)	1	1,76	0,27	1,17	0,20	0,84	0,12
Zeit 2 (15:00)	1	1,66	0,52	1,45	0,40	0,89	0,06
Zeit 3 (18:00)	1	1,34	0,28	1,11	0,22	0,72	0,11
Zeit 4 (21:00)	1	1,85	0,43	1,25	0,32	0,99	0,11
Zeit 5 (00:00)	1	2,17	0,64	1,37	0,26	0,72	0,08
Zeit 6 (03:00)	1	1,35	0,28	0,91	0,32	0,50	0,07
Zeit 7 (06:00)	1	2,27	0,49	0,81	0,22	0,48	0,06
Zeit 8 (09:00)	1	1,49	0,44	0,72	0,16	0,50	0,05
Zeit 9 (12:00)	1	1,13	0,22	0,95	0,19	0,41	0,05
Zeit 1 (12:00)	2	0,76	0,05	0,41	0,05	0,93	0,17
Zeit 2 (15:00)	2	0,72	0,17	0,48	0,09	1,02	0,07
Zeit 3 (18:00)	2	0,54	0,08	0,57	0,10	0,90	0,08
Zeit 4 (21:00)	2	0,43	0,05	0,33	0,04	0,84	0,07
Zeit 5 (00:00)	2	0,66	0,06	0,52	0,14	0,69	0,05
Zeit 6 (03:00)	2	0,72	0,19	0,24	0,03	0,41	0,08
Zeit 7 (06:00)	2	0,59	0,06	0,28	0,02	0,36	0,02
Zeit 8 (09:00)	2	0,60	0,05	0,51	0,07	0,78	0,12
Zeit 9 (12:00)	2	0,44	0,06	0,52	0,07	0,47	0,06
Zeit 1 (12:00)	3	0,51	0,10	0,43	0,14	1,11	0,08
Zeit 2 (15:00)	3	0,40	0,06	0,22	0,06	1,18	0,08
Zeit 3 (18:00)	3	0,24	0,08	0,25	0,04	1,16	0,11
Zeit 4 (21:00)	3	0,55	0,24	0,39	0,11	1,13	0,09
Zeit 5 (00:00)	3	0,46	0,06	0,33	0,06	0,86	0,04
Zeit 6 (03:00)	3	0,27	0,04	0,15	0,04	0,68	0,02
Zeit 7 (06:00)	3	0,29	0,06	0,28	0,08	0,53	0,04
Zeit 8 (09:00)	3	0,32	0,04	0,39	0,11	0,79	0,02
Zeit 9 (12:00)	3	0,21	0,05	0,44	0,09	0,99	0,08

Blattzucker Freiland 24 Stunden
 (3 Monate)

Uhrzeit	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Zeit 1 (12:00)	1	4,52	1,02	5,70	0,55	2,59	0,15
Zeit 2 (15:00)	1	6,30	1,20	7,24	0,86	3,50	0,52
Zeit 3 (18:00)	1	8,26	1,07	7,69	0,95	1,76	0,43
Zeit 4 (21:00)	1	8,22	0,70	5,38	0,89	1,31	0,19
Zeit 5 (00:00)	1	10,76	0,89	3,98	0,50	0,95	0,07
Zeit 6 (03:00)	1	12,84	2,06	4,45	0,80	0,79	0,05
Zeit 7 (06:00)	1	2,85	1,48	5,63	0,63	1,53	0,11
Zeit 8 (09:00)	1	5,43	1,67	3,82	0,48	1,20	0,11
Zeit 9 (12:00)	1	3,56	0,33	4,53	0,35	1,30	0,08
Zeit 1 (12:00)	2	3,37	0,39	5,71	0,72	4,22	0,65
Zeit 2 (15:00)	2	5,51	0,76	8,30	1,16	6,04	0,50
Zeit 3 (18:00)	2	6,95	0,42	8,12	0,49	3,08	0,61
Zeit 4 (21:00)	2	10,38	1,61	6,66	0,60	1,68	0,39
Zeit 5 (00:00)	2	10,71	1,64	4,57	0,78	0,92	0,08
Zeit 6 (03:00)	2	16,76	1,94	6,10	0,58	0,85	0,06
Zeit 7 (06:00)	2	1,62	0,77	5,63	0,77	2,32	0,39
Zeit 8 (09:00)	2	5,39	1,04	5,41	0,72	1,18	0,20
Zeit 9 (12:00)	2	2,63	0,48	4,10	0,85	2,06	0,27
Zeit 1 (12:00)	3	3,10	0,52	5,91	1,08	4,54	0,46
Zeit 2 (15:00)	3	5,63	0,91	9,07	1,37	6,43	0,73
Zeit 3 (18:00)	3	7,76	1,32	9,16	0,65	4,69	1,13
Zeit 4 (21:00)	3	11,05	1,76	7,87	0,87	2,22	0,46
Zeit 5 (00:00)	3	15,49	1,32	6,43	0,94	0,80	0,08
Zeit 6 (03:00)	3	12,62	0,46	4,70	0,32	0,81	0,05
Zeit 7 (06:00)	3	0,72	3,82	6,91	0,87	2,61	0,29
Zeit 8 (09:00)	3	4,93	0,95	6,12	0,72	1,68	0,24
Zeit 9 (12:00)	3	2,37	0,28	4,34	0,43	2,52	0,20

Blattzucker Gewächshaus 24 Stunden
(3 Monate)

Uhrzeit	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Zeit 1 (12:00)	1	1,34	0,15	0,57	0,11	0,98	0,23
Zeit 2 (15:00)	1	1,73	0,27	0,65	0,09	1,17	0,19
Zeit 3 (18:00)	1	1,57	0,16	0,68	0,21	1,07	0,10
Zeit 4 (21:00)	1	1,46	0,11	0,58	0,18	1,16	0,15
Zeit 5 (00:00)	1	1,45	0,21	0,66	0,18	0,81	0,19
Zeit 6 (03:00)	1	1,47	0,20	0,63	0,12	0,42	0,03
Zeit 7 (06:00)	1	1,31	0,18	0,66	0,16	0,42	0,05
Zeit 8 (09:00)	1	1,54	0,12	0,56	0,13	0,75	0,10
Zeit 9 (12:00)	1	1,37	0,14	0,72	0,18	0,87	0,14
Zeit 1 (12:00)	2	0,98	0,09	0,49	0,06	1,26	0,08
Zeit 2 (15:00)	2	1,02	0,10	0,45	0,09	1,48	0,12
Zeit 3 (18:00)	2	1,18	0,16	0,45	0,08	1,42	0,06
Zeit 4 (21:00)	2	1,03	0,12	0,41	0,07	1,40	0,08
Zeit 5 (00:00)	2	1,21	0,17	0,49	0,10	1,00	0,15
Zeit 6 (03:00)	2	0,94	0,11	0,49	0,07	0,62	0,08
Zeit 7 (06:00)	2	0,93	0,12	0,48	0,07	0,52	0,05
Zeit 8 (09:00)	2	1,07	0,14	0,57	0,06	1,13	0,15
Zeit 9 (12:00)	2	1,04	0,13	0,60	0,11	1,17	0,14
Zeit 1 (12:00)	3	0,96	0,07	0,65	0,11	1,99	0,13
Zeit 2 (15:00)	3	0,84	0,12	0,61	0,07	2,13	0,15
Zeit 3 (18:00)	3	1,05	0,11	0,63	0,15	2,00	0,06
Zeit 4 (21:00)	3	0,90	0,12	0,41	0,05	2,02	0,11
Zeit 5 (00:00)	3	0,88	0,17	0,54	0,11	1,20	0,12
Zeit 6 (03:00)	3	0,74	0,16	0,44	0,11	0,89	0,04
Zeit 7 (06:00)	3	0,89	0,10	0,56	0,08	0,81	0,10
Zeit 8 (09:00)	3	0,81	0,15	0,47	0,08	1,34	0,14
Zeit 9 (12:00)	3	0,69	0,20	0,55	0,12	1,53	0,15

Blattzucker Freiland 24 Stunden
 (5 Monate)

Uhrzeit	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Zeit 1 (12:00)	1	1,62	0,42	1,79	0,38	3,08	0,38
Zeit 2 (15:00)	1	1,01	0,17	1,07	0,24	3,08	0,26
Zeit 3 (18:00)	1	1,90	0,25	2,30	0,52	3,32	0,39
Zeit 4 (21:00)	1	1,48	0,13	2,05	0,42	2,33	0,16
Zeit 5 (00:00)	1	1,38	0,15	1,89	0,27	1,72	0,07
Zeit 6 (03:00)	1	1,70	0,26	1,97	0,32	1,06	0,45
Zeit 7 (06:00)	1	1,08	0,47	1,65	0,47	1,38	0,19
Zeit 8 (09:00)	1	1,11	0,20	1,60	0,45	1,38	0,15
Zeit 9 (12:00)	1	1,75	0,14	1,67	0,36	2,90	0,18
Zeit 1 (12:00)	2	2,18	0,19	3,47	0,59	4,46	0,42
Zeit 2 (15:00)	2	1,23	0,12	1,30	0,12	3,18	0,22
Zeit 3 (18:00)	2	1,82	0,10	2,95	0,48	3,54	0,36
Zeit 4 (21:00)	2	1,81	0,16	3,60	0,39	2,96	0,20
Zeit 5 (00:00)	2	1,28	0,27	2,73	0,45	1,71	0,15
Zeit 6 (03:00)	2	1,88	0,35	3,25	0,47	0,95	0,17
Zeit 7 (06:00)	2	0,77	0,36	2,31	0,45	1,60	0,12
Zeit 8 (09:00)	2	1,02	0,19	1,95	0,27	2,29	0,30
Zeit 9 (12:00)	2	1,79	0,36	2,81	0,74	3,35	0,29
Zeit 1 (12:00)	3	1,55	0,45	3,47	0,85	5,23	0,19
Zeit 2 (15:00)	3	1,03	0,21	1,20	0,27	5,25	0,63
Zeit 3 (18:00)	3	1,24	0,08	2,05	0,30	6,31	0,71
Zeit 4 (21:00)	3	1,29	0,10	2,59	0,34	4,07	0,53
Zeit 5 (00:00)	3	1,00	0,20	2,71	0,41	2,44	0,41
Zeit 6 (03:00)	3	2,12	0,48	3,58	0,49	1,26	0,41
Zeit 7 (06:00)	3	0,90	0,39	2,86	0,88	2,49	0,49
Zeit 8 (09:00)	3	0,86	0,21	1,52	0,20	2,64	0,30
Zeit 9 (12:00)	3	1,21	0,26	2,01	0,26	4,66	0,56

Blattzucker Gewächshaus 24 Stunden
(5 Monate)

Uhrzeit	Blattstufe	Glukose		Fruktose		Saccharose	
		[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF	[$\mu\text{mol/g}$]	STAF
Zeit 1 (12:00)	1	3,22	2,01	1,34	0,76	1,60	0,12
Zeit 2 (15:00)	1	0,83	0,21	0,75	0,18	1,61	0,09
Zeit 3 (18:00)	1	2,06	0,47	1,39	0,25	1,04	0,18
Zeit 4 (21:00)	1	1,57	0,50	0,90	0,16	1,03	0,23
Zeit 5 (00:00)	1	1,64	0,41	1,24	0,46	0,78	0,06
Zeit 6 (03:00)	1	1,37	0,18	1,08	0,19	0,60	0,27
Zeit 7 (06:00)	1	1,59	0,24	1,03	0,23	1,40	0,26
Zeit 8 (09:00)	1	1,54	0,26	1,12	0,21	2,12	0,44
Zeit 9 (12:00)	1	1,27	0,22	1,14	0,33	2,00	0,27
Zeit 1 (12:00)	2	1,22	0,27	0,86	0,23	2,14	0,36
Zeit 2 (15:00)	2	1,09	0,22	0,77	0,23	2,43	0,23
Zeit 3 (18:00)	2	1,24	0,21	1,52	0,53	1,29	0,23
Zeit 4 (21:00)	2	1,57	0,54	1,12	0,32	0,96	0,23
Zeit 5 (00:00)	2	1,29	0,26	1,14	0,24	0,99	0,13
Zeit 6 (03:00)	2	1,07	0,20	0,67	0,14	0,51	0,09
Zeit 7 (06:00)	2	1,20	0,35	0,81	0,20	1,43	0,20
Zeit 8 (09:00)	2	2,00	0,31	1,53	0,24	2,27	0,41
Zeit 9 (12:00)	2	1,10	0,21	0,91	0,18	1,79	0,06
Zeit 1 (12:00)	3	1,12	0,21	1,08	0,29	2,28	0,14
Zeit 2 (15:00)	3	0,77	0,15	0,84	0,20	2,08	0,41
Zeit 3 (18:00)	3	1,49	0,27	1,52	0,37	1,80	0,15
Zeit 4 (21:00)	3	1,28	0,22	1,29	0,12	1,32	0,25
Zeit 5 (00:00)	3	1,24	0,11	1,22	0,11	1,06	0,24
Zeit 6 (03:00)	3	1,14	0,12	1,22	0,16	0,56	0,07
Zeit 7 (06:00)	3	1,19	0,13	1,52	0,21	2,19	0,32
Zeit 8 (09:00)	3	1,64	0,35	2,37	0,84	3,06	0,73
Zeit 9 (12:00)	3	1,21	0,33	1,40	0,47	2,12	0,21

10 Kurzzusammenfassung und Abstract

10.1 Kurzzusammenfassung

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*) und die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) sind wichtige Nutzpflanzen in Europa. Die beiden Rohstoffe Zucker und Stärke haben sowohl für die Nahrungsmittelindustrie, als auch für die industrielle Verarbeitung einen hohen Stellenwert, wodurch die Anforderungen an die Rohstoffpflanzen immer größer werden. Daher besteht ein Ziel der grünen Biotechnologie darin, den Ertrag der Pflanzen weiter zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit sollten Zuckerrübenpflanzen über ihre gesamte Entwicklung auf verschiedene Parameter und unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Zusätzlich sollten zwei verschiedene biotechnologische Ansätze zur Ertragsteigerung von Zuckerrübenpflanzen untersucht werden.

Die Wachstumscharakteristika der im Gewächshaus angezogenen Zuckerrübenpflanzen ähneln denen im Freiland. Jedoch zeigten die Pflanzen im Gewächshaus eine Wachstumslimitierung. Diese ist zum einen durch eine zu niedrig gewählte Lichtintensität und zum anderen durch die Anzucht im Topf bedingt. Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente zeigen, dass unter konstanten Bedingungen die Ergebnisse gut reproduzierbar sind. Generell kann das Rübenwachstum in drei Phasen eingeteilt werden:

Erste Phase: Aufbau der Blätter,
zweite Phase: Aufbau der Rübenpfahlwurzel,
dritte Phase: verstärkte Akkumulation der Saccharose.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der am Kohlenstoffmetabolismus beteiligten Gene, wie z.B. der Phosphattranslokatoren, während der Zuckereinlagerungsphase im Vergleich zur Wachstumsphase erhöht war. Interessanterweise gibt es in Zuckerrübe zwei TMT2 Homologe, deren Expression in der Rübe während der Zuckereinlagerungsphase deutlich erhöht war. Möglicherweise ist dieser am Import von Saccharose in die Vakuole beteiligt. Ein Ansatz zur Ertragssteigerung von *Beta vulgaris* war die Erhöhung der *source*-Kapazität, wobei die AGPase blattspezifisch reprimiert werden sollte. Der andere Ansatz beruhte auf der Erhöhung der *sink*-Kapazität. Es sollte der mitochondriale AAC rübenspezifisch überexprimiert werden. Die beiden Konstrukte zur Transformation der Zuckerrüben wurden im Rahmen dieser Arbeit fertiggestellt, jedoch war es nicht möglich, die Pflanzen in dieser Zeit zu analysieren. Es bleibt abzuwarten, ob und wie die beiden Ansätze Einfluss auf den Ertrag der Zuckerrübenpflanzen nehmen.

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation bestand darin, mit Hilfe von verschiedenen biotechnologischen Ansätzen, die Frage zu beantworten, ob eine zusätzliche Ertragssteigerung von bereits genetisch

veränderten Kartoffelpflanzen möglich ist. Ein Ansatz bestand darin, die *sink*-Kapazität von Kartoffelpflanzen weiter zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich der *AtAAC1* im Hintergrund der doppelt transgenen BGA-Pflanzen knollenspezifisch überexprimiert. Diese dreifachtransgenen ACGN-Pflanzen zeigten jedoch keine zusätzlichen Ertragsteigerungen im Vergleich zu den BGA-Pflanzen. Im Wesentlichen wurden die Ergebnisse von Zhang *et al.*, (2008) reproduziert.

Ein weiterer Ansatz bestand darin zu überprüfen, ob eine zusätzliche Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT im Hintergrund der BGA-Pflanzen zur Verhinderung der Ertragseinbußen im Freiland führt. Es wurden in dieser Arbeit die dreifach transgene IGN-Pflanzen hergestellt und in Gewächshausanzuchten auf ihre Seneszenz und den Ertrag hin analysiert. Darüber hinaus wurde die Aktivität des SAG12-Promotors und die Auswirkung der verzögerten Seneszenz im Wildtyphintergrund untersucht. Die Aktivität des Promotors ist auch in *Solanum tuberosum* Seneszenz-spezifisch. Auch eine erfolgreiche Verzögerung der Seneszenz durch das SAG12-IPT Konstrukt konnte in *Solanum tuberosum* gezeigt werden, was leichte Ertragssteigerungen in den IPT-Pflanzen zur Folge hatte. In den IGN-Pflanzen wurde ebenfalls die Seneszenz erfolgreich verzögert. Eine zusätzliche Ertragsteigerung durch die verzögerte Seneszenz war im Gewächshaus nicht nachweisbar. Es bleibt abzuwarten, ob durch die zusätzliche Seneszenz-spezifische Überexpression der IPT durch den SAG12-Promotor im Hintergrund der BGA-Pflanzen zur Verhinderung des Ertragsverlusts im Freiland führt. Dazu müssten die IGN-Pflanzen unter Freilandbedingungen analysiert werden.

10.2 Abstract

Sugar beet (*Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*) and potato (*Solanum tuberosum*) are important crop plants in Europe. The raw products of these plants, namely sugar and starch, play an important role in the food and materials industry. The improvement of these products and their quality is a major aim of green biotechnology. The aim of the thesis was to analyze the development and different parameters of sugar beet plants. Additionally we aimed to increase tap root yield and sugar content by alteration of the source/sink relationship of sugar beet.

The characteristics of the development stages of sugar beet grown in the greenhouse were similar to plants grown in the field. But plants grown in the greenhouse showed growth limitations due to low light intensity and pot size limitations. Moreover, all results were reproducible under the tested conditions. In general the growth of sugar beet plants can be divided in three phases:

First phase: leaf development

Second phase: tap root development

Third phase: sugar accumulation

It could be shown that different genes, which are involved in carbohydrate metabolism showed a higher expression during the sugar storage phase. Interestingly, sugar beet has two TMT2 homologues, which were highly expressed during the sugar storage phase. These sugar transporters maybe involved in sucrose uptake into tap root vacuoles. To increase tap root yield and sugar content we used two different approaches. One approach was to increase the source capacity by the leaf-specific repression of AGPase. The other approach was to enhance the sink capacity by the tap root-specific over expression of the mitochondrial AAC transporter. Both constructs were produced during this work, but the transformation is still going on. It remains to be seen which effects both approaches on the yield have.

An additional aim of this thesis was to analyze different biotechnological approaches to increase the starch content of genetically modified potato plants. One approach was to modify the sink capacity with the tuber-specific over expression of *AtAAC1* in the background of the transgenic BGA-potato plants. The resulting triple transgenic ACGN showed no additional yield in comparison to the double transgenic BGA-plants (Zhang *et al.*, 2008). A subsequent approach was to delay the senescence of the BGA-plants to overcome reduced yield in field trials. Therefore, we used a senescence-specific over expression of IPT in the BGA background. We analyzed the senescence-specific activity of the SAG12 promoter in potato plants and the influence of the senescence-specific over expression of IPT in wild-type background. The activity of the SAG12 promoter was shown to be senescence-specific and senescence was delayed in the IPT over expression in both wild-type background and double transgenic background (IGN-plants) but there was no increase of yield detectable in the greenhouse. Future work will focus on producing delayed senescence yield increases in the field.

11 Danksagungen und Formalia

11.1 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 für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herr Prof. Dr. Stanislav Kopriva bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

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

Bei Prof. Dr. E. Neuhaus und Herrn Prof. Dr. R. Hedrich 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.

Ich bedanke mich bei den gesamten BETAMORPHOSIS-Partnern für die sehr angenehme und nette Arbeitsatmosphäre, sowie die konstruktiven Diskussionen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Karsten Harms für die eingehenden Konversationen.

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

Bei Raphael Wemhöner möchte ich mich für die Unterstützung im Labor bedanken.

Dr. Claudia Jonik danke ich für die anfänglich große Unterstützung bei Laborarbeiten.

Dem Gärtnereiteam danke ich für die Betreuung der Kartoffel- und Zuckerrübenpflanzen.

Insbesondere gilt mein Dank Elke Hilgers, Dorien Engeländer, Raphael Wemhöner und Karsten Harms da Ihr zugleich nicht nur meine Aufpasser, Unterstützer und Moralischer wart, sondern auch Freunde wurdet.

Der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, aber auch für die Abwechslung während zahlreicher Kino-, Koch-, Grillabende oder beim Sport.

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

11.2 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.

Nicole Wöstefeld

Köln, Mai 2014

11.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Wöstefeld
Vorname:	Nicole
Geburtsdatum:	24. August 1983
Geburtsort:	Düren
E-Mail:	nicole.woestefeld@web.de



Ausbildung

Oktober 2010 – bis heute	Promotionsstudium an der Universität zu Köln Qualifikation: Doktor
September 2004 – Oktober 2010	Studium an der Fachhochschule Aachen Bioingenieurwesen Schwerpunkt: Biotechnologische Verfahren Qualifikation: Dipl. Ingenieur (FH)

Weiterbildungen

Oktober 2010 – bis heute	„Graduate School for Biological Science“ an der Universität zu Köln
2013	weiterführender Englisch-Kurs der Graduate School Advanced Scientific writing
2012	Englisch-Kurs der Graduate School Patent Kurs (Peter Schreier)

Lehre

August 2009- bis heute	Betreuung von Studenten im Rahmen von Praktika des Fachs Pflanzenphysiologie an der Universität zu Köln
Februar 2012 - Juni 2013	Betreuung einer Bachelorarbeit „ Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus von Zuckerrüben (<i>Beta vulgaris</i>) “
September 2012 - Januar 2013	Betreuung einer Bachelorarbeit „ Biotechnologischer Ansatz zur Verzögerung der Seneszenz von Kartoffelpflanzen (<i>Solanum tuberosum</i>) “
Oktober 2011 - Februar 2012	Betreuung einer Bachelorarbeit „ Analysen zum Kohlenstoffmetabolismus und zur Entwicklung der Nutzpflanzen Zuckerrübe (<i>Beta vulgaris</i>) und Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>) “

Tagungen und Meetings

April 2014	Konferenz Plant 2030 Status Seminar Poster und „Elevator Pitch“
Januar 2014	Forschergruppenmeeting Betamorphosis Vortrag
Oktober 2013	Deutsche Botanikertagung (Tübingen) Poster
September 2013	Forschergruppenmeeting Betamorphosis Vortrag
Juni 2013	Botanisches Institut Forschungskolloquium Vortrag
März 2013	Konferenz Plant 2030 Status Seminar Poster
Februar 2013	Forschergruppenmeeting Betamorphosis Vortrag
Februar 2013	Tagung Molekularbiologie der Pflanzen Poster
Oktober 2012	Forschergruppenmeeting Betamorphosis Vortrag

Schulischer Werdegang

August 2000 – Juli 2004	Rurtal Gymnasium, Düren Qualifikation: Abitur
August 1994 – Juli 2000	Realschule Bretzelnweg, Düren Qualifikation: Fachoberschulreife
August 1990 – Juli 1994	Katholische Grundschule, Birkesdorf

Kenntnisse/ Fertigkeiten

Fremdsprachen:	Englisch (Kenntnisse in Wort und Schrift)
EDV-Kenntnisse:	gute Kenntnisse in Word, PowerPoint und Excel sowie VectorNTI

Referenzen

Dr. Frank Ludewig
Botanisches Institut Universität zu Köln
 Zülpicher Straße 47 b, 50674 Köln, +49 (0)221-470 8223

Dr. Wolfgang Koch
KWS SAAT AG
 Grimsehlstr. 31, 37574 Einbeck, +49 (0) 5561-311-846