

**Untersuchungen zum Blatt- und Wurzelmetabolismus  
sowie zum Phloem- und Xylemtransport in Zusammenhang mit  
der Stickstoff-Effizienz bei Raps (*Brassica napus* L.)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Zewen Zhou**  
aus Guangdong, VR China

Göttingen 2000

D7

Referent:

Prof. Dr. H. W. Heldt

Korreferent:

Priv.-Doz. Dr. D. Heineke

Tag der mündlichen Prüfung:

02. 11. 2000

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Bedeutung von Raps als Kulturpflanze .....	1
1.2	Stickstoff-Problematik und -Effizienz bei Raps.....	1
1.3	Stickstoffassimilation und -transport in höheren Pflanzen .....	3
1.4	N-assimilierende Enzyme in der Pflanze .....	6
1.4.1	Nitratreduktase (NR) und Nitritreduktase (NiR) .....	6
1.4.2	Glutamin-Synthetase.....	7
1.4.3	Asparagin-Synthetase .....	8
1.5	Aminosäuretransport in der Pflanze.....	10
1.6	Die Samen-Speicherproteine von Raps.....	11
1.6.1	Regulation der Synthese der Samen-Speicherproteine.....	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....	14
2.1.1	Proben aus dem Feldversuch .....	14
2.1.2	Ausgewählte Winterraps-Genotypen.....	18
2.1.3	Transgene Rapspflanzen mit Änderungen der Glutaminsynthetase (GS) .....	18
2.1.4	Transgene Rapspflanzen mit Asparaginsynthetase A (AsnA) aus <i>E. coli</i> .....	19
2.2	Chloroform-Methanol-Extraktion von wasserlöslichen Metaboliten aus Blatt- und Wurzelgeweben.....	21
2.3	Chlorophyllbestimmung.....	21
2.4	Stärkebestimmung.....	21
2.5	Proteinbestimmung.....	22
2.5.1	Bestimmung nach Lowry et al. (1951) .....	22
2.5.2	Bestimmung nach Bradford (1976) .....	23
2.6	Optisch enzymatische Bestimmung von Glukose, Fruktose, Saccharose, Stärke, Malat und Nitrat .....	24
2.6.1	Glukose, Fruktose und Saccharose.....	24
2.6.2	Stärke .....	25
2.6.3	Malat.....	25
2.6.4	Nitrat.....	26

2.7	Phloemsaft-Gewinnung.....	26
2.8	Gewinnung von Wurzeldruck-Exudat (Xylemsaft).....	28
2.9	Chromatographische Bestimmung der Aminosäuren.....	28
2.10	Amperometrische Bestimmung von Kohlenhydraten .....	32
2.11	Konzentrationsbestimmung von Ionen und organischen Säuren durch ein HPLC-System.....	33
2.12	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.12.1	Vorbereitung der Gele .....	34
2.12.2	Probenauftragung und Durchführung der Elektrophorese.....	35
2.13	Western-Blot .....	36
2.13.1	Aufarbeitung der Proben.....	36
2.13.2	Trennung der Proteine durch die Gelelektrophorese .....	37
2.13.3	Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran .....	37
2.13.4	Kontrolle des Transfers.....	38
2.13.4.1	Amidoschwarz-Färbung.....	38
2.13.4.2	Coomassie-Färbung .....	38
2.13.5	Nachweis durch "Enhanced Chemiluminescence" (ECL).....	39
2.14	Enzymaktivitätsmessungen .....	40
2.14.1	Nitrat-Reduktase (NR).....	40
2.14.2	Asparagin-Synthetase (AsnS).....	42
2.14.3	Glutamin-Synthetase (GS).....	45
2.15	Bestimmung der photosynthetischen Aktivität .....	46
2.16	Auswertung der durchgeführten Experimente.....	46
3	Ergebnisse .....	48
3.1	Feldversuch mit unterschiedlichen Stickstoff-Düngungsstufen.....	48
3.1.1	Auswirkung der N-Düngung auf den Blatt- und Kornmetabolismus von Winterraps im Feldversuch.....	49
3.1.2	Aminosäuremuster im Blatt der Winterraps-Genotypen .....	50
3.1.3	Genetische Varianz unter den 36 Winterraps-Genotypen .....	50
3.1.4	Zusammenhang zwischen Blattmetabolismus und Proteingehalt bzw. N-Ertrag im Samen.....	56
3.2	Gewächshaus-Versuch mit 8 ausgewählten Winterraps-Genotypen.....	59
3.2.1	Metabolismus in verschiedenen Pflanzenteilen der	

Winterraps-Genotypen im Gewächshaus.....	60
3.2.1.1 N-Metabolismus in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln .....	61
3.2.1.2 C-Metabolismus in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln .....	63
3.2.1.3 Ionenkonzentrationen in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln.....	64
3.2.1.4 Aminosäuremuster in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln .....	66
3.2.1.5 Aminosäure- und Saccharosegehalte im Phloem- und Xylemsaft sowie im „source“-Blatt und in der Wurzel .....	67
3.2.2 Unterschiede zwischen den 8 ausgewählten Genotypen im Gewächshaus-Versuch.....	69
3.2.2.1 Netto-CO <sub>2</sub> -Assimilation sowie Frischgewicht von Sproß und Wurzel der 8 Rapsgenotypen .....	69
3.2.2.2 Metabolitgehalte und C/N-Verhältnisse in den Blättern der 8 Genotypen am Ende der Lichtperiode.....	71
3.2.2.3 Nitratreduktase- und Glutaminsynthetaseaktivität in den Blättern und den Wurzeln der 8 Genotypen.....	72
3.2.2.4 Phloem- und Xylemtransport der 8 Genotypen.....	75
3.2.3 Korrelation zwischen Nitratreduktase-Aktivität und der Summe der freien Aminosäuren in den Pflanzenteilen.....	77
3.3 Transgene Pflanzen mit Veränderungen der Glutaminsynthetase (GS).....	79
3.3.1 Metabolitgehalte und Glutaminsynthetase-Aktivität in den Blättern .....	80
3.3.2 Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft sowie Protein- und Ölgehalte im Samen der GS-transgenen Pflanzen.....	83
3.4 Transgene Pflanzen mit Expression der Asparagin-Synthetase A aus <i>E.coli</i> (AsnA) .....	84
3.4.1 Nachweis der Expression der AsnA aus <i>E. coli</i> in der Rapspflanze durch Western-Blot-Analyse .....	85
3.4.2 <i>In vitro</i> Enzymaktivitäten der Asparaginsynthetase, Glutaminsynthetase und Nitratreduktase der Rapspflanzen mit AsnA aus <i>E.coli</i> .....	87
3.4.3 Metabolitgehalte in Blättern und Wurzeln der Rapspflanzen mit AsnA	

---

aus <i>E. coli</i> unter Kontrolle des 35S-Promotors .....	89
3.4.4 Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen in Phloem- und Xylemsaft der transgenen Rapspflanzen mit AsnA aus <i>E. coli</i> .....	92
4 Diskussion.....	95
4.1 Hintergrund der Untersuchung zur Stickstoff-Effizienz bei Raps .....	95
4.2 Genetische Variation für die N-Effizienz bei Winterraps-Genotypen .....	96
4.3 Beitrag des Blattmetabolismus und des Phloemtransports zur N-Effizienz bei Winter-Raps.....	100
4.3.1 Aminosäuretransport bei Winterraps.....	101
4.3.2 Einfluß der Nitrat-Versorgung auf den N-Metabolismus und den N-Transport der Winterraps-Pflanzen.....	103
4.3.3 Einfluß der Ammonium-Ernährung auf den N-Metabolismus und den N-Transport der Raps-Pflanzen .....	105
4.4 Zur genetischen Manipulation der N-assimilierenden Enzyme bei Raps.....	107
4.4.1 Transgene Rapspflanzen mit Überexpression der cytosolischen oder plastidären Glutamin-Synthetase .....	107
4.4.2 Transgene Rapspflanzen mit „Antisense“-Hemmung der Glutamin-Synthetase.....	109
4.4.3 Transgene Rapspflanzen mit heterologer Expression der AsnA aus <i>E. coli</i> .....	110
4.4.4 Abschlußbemerkung.....	112
5 Zusammenfassung.....	113
6 Abkürzungsverzeichnis.....	116
7 Literaturverzeichnis .....	119

## **1 Einleitung**

### **1.1 Die Bedeutung von Raps als Kulturpflanze**

Raps (*Brassica napus* L.) gehört zur Familie der Cruciferen und der Gattung *Brassica*, in der sich ebenfalls Rübsen (*B. rapa*), Gemüsekohl (*B. oleracea*) und verschiedene andere Kulturarten finden. Charakteristisch für die Arten der Gattung *Brassica*, die in ihrer Erscheinungsform sehr unterschiedlich sein können, sind die sich von Thiohydroxaminsäureestern ableitenden Glucosinolate, die in allen Teilen der Pflanze vorkommen (Geisler 1980). *Brassica napus* L. ist ein amphidiploider Bastard, dessen Genom (AACC, n=19) sich aus dem Genom von *Brassica oleracea* (CC, n=9) und dem Genom von *Brassica rapa* (AA, n=10) zusammensetzt, welches verdoppelt wurde. In Europa ist Raps die wichtigste Öl-liefernde Kulturpflanze. Die Samen von Raps enthalten in Bezug auf Trockenmasse ca. 35% Lipide und 20-25% Proteine (Finlayson 1976). Rapsöl kann als Speiseöl, Bestandteil verschiedener Nahrungsmittel oder als Rohstoff für Industrieprodukte genutzt werden (Töpfer et al. 1995, Bona et al. 1999). Außerdem ist das Rapsschrot, das Nebenprodukt der entfetteten Rapssamen, mit einem Rohproteingehalt von über 30% ein wertvolles Futtermittel (Kaminska et al. 2000, Kokkonen et al. 2000, Mullan et al. 2000).

### **1.2 Stickstoff-Problematik und -Effizienz bei Raps**

Der Raps-Anbau ist ökologisch nicht unbedenklich. Um hohe Samenerträge zu erzielen, ist eine Stickstoffdüngung von 180-220 kgN/ha erforderlich. Das Problem hierbei ist, daß eine größere Stickstoffmenge, die entweder aus unvollständig aufgenommenem anorganischem N, aus vorzeitigem Blattfall (Vorernteverluste) oder aus Ernterückständen auf dem Feld stammt, in das Grundwasser gelangen könnte. Lickfett et al. (1994) berichteten, daß dies nicht nur bei hohen Stickstoffgaben, sondern auch bei extensiver Düngung der Fall sein kann. Bei praxisüblicher Stickstoffdüngung wurden Vorernteverluste von 16 kgN/ha (Aniol 1994) bis 25 kgN/ha (Schjoerring 1995) gemessen.

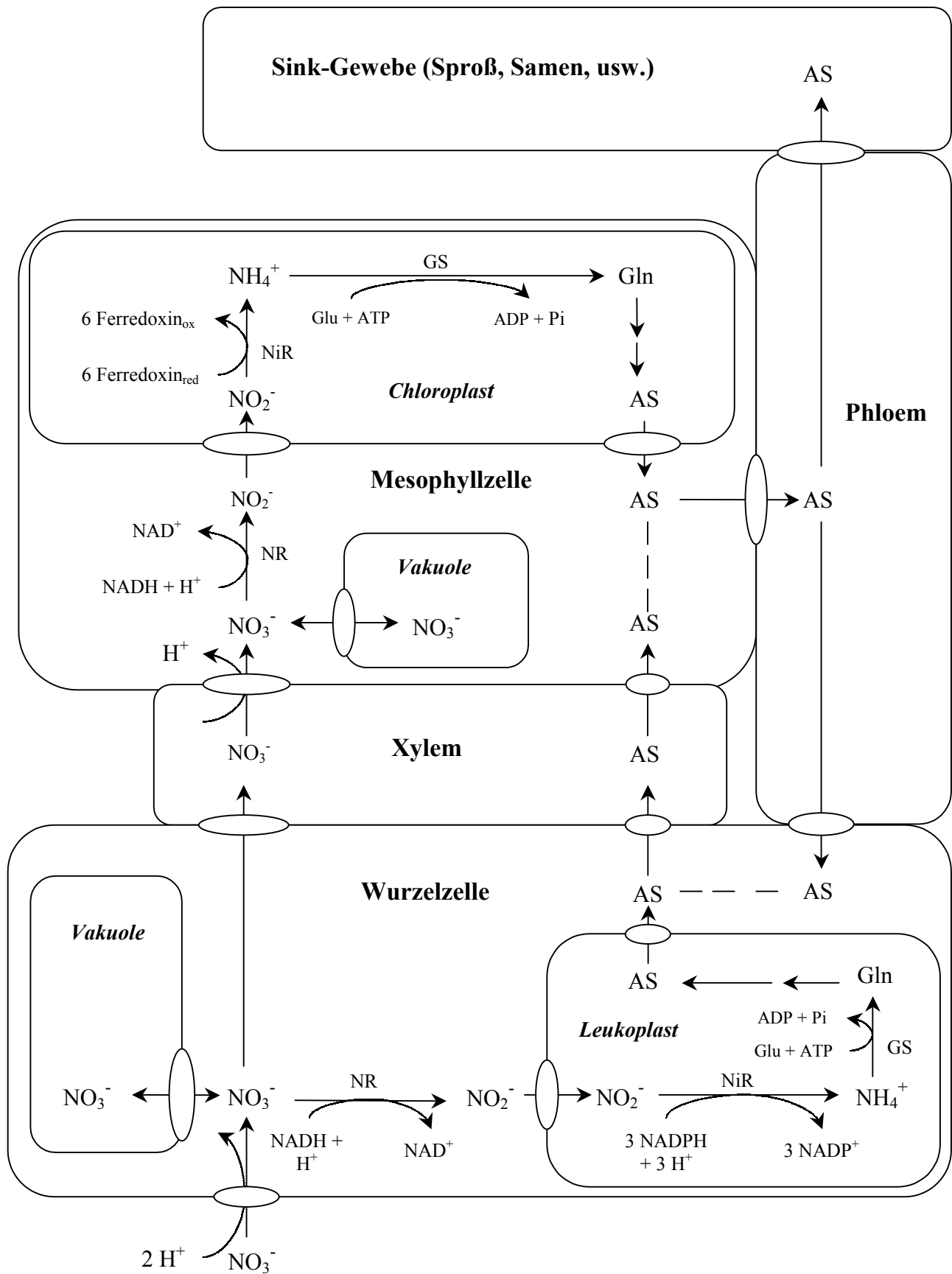
In der Literatur werden für die Nährstoffeffizienz eine Reihe verschiedener Definitionen verwendet (Sattelmacher et al. 1995). Stickstoffeffizienz ist u.a. definiert als die überdurchschnittliche Leistungsfähigkeit eines Genotyps unter Stickstoffmangel (Graham 1984) oder als Ertragsreaktion auf das zusätzliche Stickstoff-Angebot (Baligar et al. 1990). Zu einer hohen Stickstoffeffizienz führen dabei eine gute Stickstoffaufnahme (Aufnahmeeffizienz) und eine effiziente Umsetzung des aufgenommenen Stickstoffs in Kornertrag (Verwertungseffizienz). Die Stickstoff-Effizienz ist eines der komplexen Merkmale der Pflanzen und mit vielen Faktoren wie z.B. Chlorophyllgehalt, Entwicklung des Wurzelsystems, Resistenz bzw. Toleranz gegen Umweltstress und Schädlinge, Blühbeginn, Blühdauer, Trockenmasseproduktion, Stroh-N-Gehalt und Samen-N-Gehalt verbunden (Sattelmacher et al. 1994, Seiffert et al. 1999). Bei Raps ergaben mehrere Untersuchungen ein bemerkenswert gutes Aufnahmevermögen, aber nur eine unbefriedigende physiologische Verwertung (Kullmann 1987, Lickfett 1993, Aniol 1994, Dejoux et al. 2000). Dabei erwies sich die Verwertung innerhalb der Pflanze als um so schlechter, je höher die Stickstoffversorgung war (Kullmann 1987). Der N-Ernte-Index, der Anteil des Stickstoffs im Ernteprodukt am Gesamtstickstoff der Trockenmasse, kann als Maß für die Effektivität der N-Remobilisation betrachtet werden. Er beträgt beim Raps 0.8 ohne Berücksichtigung der Vorernteverluste und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie bei Getreide (Aniol 1994, Schjoerring 1995). Im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen hat Raps leicht erhöhte Vorernteverluste durch Blattfall (Aniol 1994). Werden die Vorernteverluste miteinbezogen, ergibt sich ein N-Ernte-Index bei Raps von nur noch 0.7 (Schjoerring 1995). Damit ist der N-Ernte-Index von Raps niedriger als der von Getreide, was eine geringere Effektivität der Stickstoffremobilisierung aus vegetativen Organen zum Samen anzeigt.

In dieser Hinsicht ist die landwirtschaftliche Nutzung von Rapsgenotypen mit höherer Stickstoff-Verwertungseffizienz wünschenswert. Die N-Verwertungseffizienz eines Genotyps kann nach Duncan und Baligar (1990) im wesentlichen durch die folgenden drei Aspekte beeinflusst werden: (1) Spiegel und Aktivität der N-verarbeitenden Enzyme, (2) Mobilisation und Translokation von N-haltigen Verbindungen, und (3) Speicherung von N-haltigen Substanzen.



### 1.3 Stickstoffassimilation und -transport in höheren Pflanzen

In Abbildung 1-1 werden die Nitratassimilation und der Aminosäuretransport in der Pflanze dargestellt. Obwohl die Pflanzen auch organischen Stickstoff nutzen können (Näsholm et al. 1998), ist anorganischer Stickstoff die Haupt-N-Quelle und notwendig für das Wachstum von Pflanzen (Haynes und Goh 1978). Anorganischer Stickstoff wird von den Pflanzen in Form von Nitrat oder Ammonium aus dem Boden oder der Nährlösung, bzw. in Form von Ammonium bei der Symbiose mit  $N_2$ -fixierenden Bakterien, aufgenommen und durch Energie-verbrauchende Reaktionen zu Aminosäuren assimiliert. Ein Teil des aufgenommenen Nitrats kann in den Vakuolen der Wurzelzellen oder nach Transport durch das Xylem auch in den Vakuolen der oberirdischen Gewebe vorübergehend gespeichert werden. Ein anderer Teil wird von der Nitratreduktase im Cytosol zu Nitrit und anschließend von der Nitritreduktase in Chloroplasten sowie Leukoplasten zu Ammonium reduziert, das dann, wie das direkt aufgenommene Ammonium, durch die Glutamin-Synthetase (GS) und Glutamat-Synthase (GOGAT) im Chloroplasten- bzw. Leukoplastenstroma assimiliert wird (Beevers und Hageman 1983). Auch das während der Photorespiration von der Glycin-Decarboxylase freigesetzte Ammonium wird auf diese Weise reassimiliert (Yamaha und Oaks 1987). In Pflanzen kann Ammonium u. a. auch durch den Phenylpropanoid-Stoffwechsel und den Abbau von Aminosäuren erzeugt werden (Joy 1988). Das entstehende Glutamat ist entweder Ausgangsprodukt oder bei den Transaminase-Reaktionen Amidgruppen-Donor für die Biosynthese von anderen Aminosäuren. Über das Phloem und das Xylem werden die Aminosäuren in der Pflanze zu den verschiedenen Organen transportiert (Cooper und Clarkson 1989). Glutamin, Glutamat, Aspartat und z.T. auch Asparagin sind die dominanten freien Aminosäuren an der Gesamtaminosäure-Konzentration der meisten Leguminosen und Getreidepflanzen (Lea und Mifflin 1980, Peoples und Gifford 1993).



**Abbildung 1-1.** Nitratassimilation und Aminosäuretransport in der Pflanze

(NR -Nitratreduktase, NiR -Nitritreduktase, GS -Glutaminsynthetase, AS -Aminosäuren)

Die primäre Assimilation von anorganischem Stickstoff zu Aminosäuren benötigt Kohlenstoffskelette in Form von Ketosäuren und Energie in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten. Die Ketosäuren sind sowohl in photosynthetisch aktiven als auch heterotrophen Geweben Intermediate des Atmungsstoffwechsels (Ireland 1990). Die Energie wird in photosynthetisch aktiven Geweben durch die Photosynthese, in heterotrophen Geweben und im Dunkeln durch die Veratmung (über den oxidativen Pentosephosphatweg) des gespeicherten Photosynthats bereitgestellt (Lee 1980, Aslam und Huffaker 1982, Andrews 1986). Umgekehrt führt Stickstoffmangel in der Pflanze zur Abnahme des Spiegels von photosynthetischen Strukturkomponenten wie Chlorophyll und Rubisco, sowie zur Reduktion der Photosynthese-Leistungsfähigkeit und der Carboxylierungseffizienz (Delgado et al. 1994).

Obwohl viele Kulturpflanzen-Arten (inklusive Raps) sowohl Nitrat als auch Ammonium nutzen können, besteht ein fundamentaler Unterschied zwischen Nitrat- und Ammonium-Ernährung, da Nitrat als Anion aber Ammonium als Kation aufgenommen wird (Peuke und Jeschke 1993). Die Rhizosphäre wird bei der Ammonium-Ernährung versauert bzw. bei der Nitrat-Ernährung alkalisiert (Marschner 1995, Taylor und Bloom 1998). Die Nitratreduktion zu Ammonium benötigt acht Elektronen und ist im pflanzlichen Stoffwechsel nach der CO<sub>2</sub>-Assimilation die Reaktion mit dem höchsten Energieverbrauch (Champigny 1995). Theoretisch könnte die Pflanze durch die Assimilation von Ammonium den hohen Energieverbrauch für die Nitratreduktion vermeiden. Trotzdem zeigen Ammonium-ernährte Pflanzen eine geringere Biomasseproduktion, Wachstumsstörungen sowie weitere physiologische und morphologische Funktionsstörungen. Der Begriff „Ammonium-Syndrom“ wurde von Mehrer und Mohr (1989) geprägt, die die „Ammonium-Toxizität“ an *Sinapis alba* L. untersuchten. Die Symptome bei Ammonium-Ernährung wurden von Chaillou et al. (1991) zusammengefaßt: 1) Der Gehalt mineralischer Kationen ist bei Ammonium-Ernährung geringer als bei Nitrat-Ernährung, weil Ammonium als Kation aufgenommen wird, aber als solches im Zuge der Assimilation umgewandelt wird. 2) Der Gehalt organischer Anionen sinkt unter Ammonium-Ernährung, da diese nur während der Nitrat-Reduktion gebildet werden (Chaillou et al. 1986). 3) Es kommt in

Ammonium-ernährten Pflanzen häufig zu einer Akkumulation freier Aminosäuren in Wurzeln und Sproß (Rosnitschek-Schimmel 1985). 4) Diese Pflanzen akkumulieren, besonders im Sproß, Zucker und Stärke (Chaillou et al. 1986). Eine gemischte Versorgung mit Nitrat und Ammonium führt dagegen im Vergleich zur Versorgung entweder mit Nitrat oder mit Ammonium allein zu einem signifikanten Anstieg von Wachstum und Ertrag (Cox und Reisenauer 1973, Ta und Ohira 1981, Below und Gentry 1987, Heberer and Below 1989, Hagin et al. 1990, Adriaanse und Human 1993, Cao und Tibbits 1993, Gill und Reisenauer 1993, Chen et al. 1998).

## **1.4 N-assimilierende Enzyme in der Pflanze**

### **1.4.1 Nitratreduktase (NR) und Nitritreduktase (NiR)**

Die Nitratreduktase höherer Pflanzen ist ein Homodimer, dessen Untereinheiten jeweils drei Domänen mit unterschiedlichen prosthetischen Gruppen enthalten: eine FAD-, eine Häm-Domäne des Cytochrom-b-Typs (Cyt-b<sub>557</sub>) und eine Molybdän-Cofaktor-Domäne (Redinbaugh und Campbell 1985). Die Molekülmasse einer Untereinheit beträgt je nach Spezies 99-104 kDa. Die Regulation der Nitratreduktase erfolgt sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene (zusammengefaßt von Daniel-Vedele und Caboche 1996). Der zelluläre Gehalt an Nitratreduktase-mRNA und -Protein sowie die Enzymaktivität der NR zeigen einen circadianen Rhythmus (Deng et al. 1990, 1991). Die Transkription der Nitrat-Reduktase ist durch Nitrat und Licht induzierbar und wird von den Produkten des N-Stoffwechsels, insbesondere von Glutamin und Glutamat, inhibiert. Kohlenhydrate wie Saccharose, Glukose und Fruktose können die Transkription und Aktivität der NR im Dunkeln induzieren (Cheng et al. 1992). Auf posttranslationaler Ebene wird die Nitratreduktase über Phosphorylierung eines Serin-Restes reguliert (Huber und Huber 1995). Durch Bindung eines „Inaktivator-Proteins“ an das phosphorylierte Enzym wird es inaktiviert (Glaab und Kaiser 1995).

Die in den Plastiden lokalisierte Nitritreduktase ist ein Monomer mit drei prosthetischen Gruppen: Ein 4Fe-4S-Zentrum, ein FAD und ein Sirohäm (Siegel und

Wirkerson 1989). Die NiR katalysiert eine der wenigen biologischen Reduktionen, bei denen sechs Elektronen übertragen werden. Als Elektronendonator dient reduziertes Ferredoxin, das als Produkt des photosynthetischen Elektronentransports von Photosystem I bereitgestellt wird. In geringem Umfang kann das für die Nitritreduktion im Blatt erforderliche Ferredoxin jedoch auch im Dunkeln durch NADPH reduziert werden. Im Dunkeln kann NADPH in den Chloroplasten durch den oxidativen Pentosephosphatweg bereitgestellt werden. Die Regulation der NiR-Expression erfolgt wie bei der NR in Abhängigkeit von Nitrat und Licht (Rajasekhar und Mohr 1986, Becker et al. 1992b).

### 1.4.2 Glutamin-Synthetase

In Pflanzen gibt es zwei Glutaminsynthetase-Isoformen, die cytosolische (GS1) und die plastidäre (GS2). Jede GS-Isoform hat eine spezifische Funktion bei der Assimilation und Reassimilation von Ammonium (Hirel et al. 1993). In C<sub>3</sub>-Pflanzen ist die Hauptaktivität der GS1 in den Wurzeln zu finden (Woodall et al. 1996), während in C<sub>4</sub>-Pflanzen im Sproß ebenfalls ein großer Teil der GS1-Aktivität vorhanden ist (Becker et al. 1992a). GS1 befindet sich hauptsächlich im Leitgewebe von Wurzel und Sproß und könnte mit der Bereitstellung des Stickstoffs in Form von Glutamin für den Ferntransport verbunden sein (Carvalho et al. 1992, Dubois et al. 1996, Lam et al. 1996), während GS2 sich im Stroma der Plastiden befindet bzw. die dominante GS-Isoform im Blatt und für die Ammonium-Assimilation und -Reassimilation zuständig ist (Hirel et al. 1993). Die Rolle der GS1 bei der N-Assimilation in verschiedenen Zelltypen der Wurzel und im Sproß ist bisher noch nicht endgültig geklärt, da die Untersuchung von transgenen Tabakpflanzen mit verminderter GS1-Aktivität im Phloem durch „Antisense“-Technik zeigte, daß die GS1 im Phloem eher mit der Produktion von Prolin verbunden ist (Brugière et al. 1999). Außerdem ist die GS1-Aktivität im Cortex von Maiswurzeln wichtig für die Assimilation von externem Ammonium (Sukanya et al. 1994). Die Expression von GS1 und GS2 wird von Licht, Metabolitkonzentrationen (Aminosäuren und Zucker), Art der N-Quelle (Nitrat oder Ammonium), Pathogen-Infektion sowie der Entwicklungsphase der Pflanze (wie

Keimung und Seneszenz) beeinflusst (zusammengefaßt von Cren und Hirel 1999). In *Brassica napus* wurden bereits zwei plastidäre und vier cytosolische cDNA-Klone der GS identifiziert (Ochs et al. 1999).

Die GS1 ist ein Octamer, je nach Pflanzen-Art mit einem Molekulargewicht der Monomere von 39 bis 45 kDa. Das Octamer besteht entweder aus einem oder mehreren unterschiedlichen Polypeptiden (Homomer/Heteromer). Die Zusammensetzung der Polypeptide und ihre relativen Anteile sind abhängig von der Entwicklungsphase und von der anorganischen N-Quelle (Nitrat oder Ammonium) (Mäck 1995, Brechlin et al. 1999, Cren und Hirel 1999, Brechlin et al. 2000). Die GS1 wird in der Wurzel von Mais von einer Multigen-Familie mit fünf Mitgliedern codiert, deren relative Expression in den verschiedenen Geweben der Wurzel sehr unterschiedlich ist (Li et al. 1993).

Auch die GS2 ist ein Octamer und kerncodiert. Das Molekulargewicht des Polypeptids von verschiedenen Pflanzen-Arten beträgt 43 bis 48 kDa (Forde und Cullimore 1989, Brechlin et al. 2000). Obwohl bei der GS2 bisher nur ein Gen bekannt ist, wurden ebenfalls bereits unterschiedliche GS2-Untereinheiten beobachtet (Mäck und Tischner 1994, Mäck 1995, Migge et al. 1996, Brechlin et al. 2000). Der N-Terminus aller GS2-Einheiten beinhaltet ein Signalpeptid von etwa 50 Aminosäuren, das für das „Targeting“ des Proteins in den Chloroplasten zuständig ist (Lightfoot et al. 1988). Die mRNA- und Proteinmenge der GS2 nehmen mit zunehmender Nitrat-Versorgung zu (Vézina und Langlois 1989, Sakakibara et al. 1992).

Die Schlüsselstellung der Glutamin-Synthetase im Stickstoffmetabolismus der Pflanze, ihre potentielle Beteiligung an einer Vielzahl von Stoffwechselwegen und die unterschiedlichen Isoenzyme machen sie zu einem attraktiven Ziel für eine genetische Manipulierung von Pflanzen (Lea und Forde 1994, Forde und Woodall 1995).

### **1.4.3 Asparagin-Synthetase**

Asparagin gehört zu den wichtigsten transportierten Aminosäuren in Leguminosen und Aktinorhiza-Pflanzen, die aufgrund der Symbiose mit N<sub>2</sub>-fixierenden Bakterien die primäre N-Assimilation in den Wurzeln durchführen (Lea

und Mifflin 1980, Sieciechowicz et al. 1988, Waterhouse et al. 1996). In vielen anderen Pflanzen wie z.B. Spinat (Riens et al. 1991), Gerste (Winter et al. 1992) bzw. Zucker- und Futterrüben (Winzer et al. 1996) ist Asparagin dagegen keine der Hauptaminosäuren in den Blättern und im Phloem. Unter gewissen Bedingungen, wie z.B. langen Dunkelperioden, Kohlenstoff-Limitation und Umweltstreß, steigt der Asparaginspiegel in der Pflanze an (Sieciechowicz et al. 1988, Brears et al. 1993, Chevalier et al. 1996, Shi et al. 1997, Lohaus et al. 1998). Es wird allgemein angenommen, daß die Asparagin-Synthetase in höheren Pflanzen hauptsächlich Glutamin-abhängig ist (Sieciechowicz et al. 1988, Shi et al. 1997). Dabei werden Asparagin und Glutamat aus Aspartat und Glutamin unter Verbrauch von ATP gebildet (Huber und Streeter 1985, Sieciechowicz et al. 1988). Instabilität des Enzyms und geringe Aktivität der Asparagin-Synthetase in Pflanzen erschweren bei vielen Pflanzen-Arten die Messung der Asparaginsynthetase-Aktivität (Sieciechowicz et al. 1988). Daher sind die Eigenschaften der pflanzlichen Asparagin-Synthetase bisher nur wenig bekannt. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß die Asparagin-Synthetase in vielen Pflanzen von kleinen Genfamilien mit zwei bis drei Mitgliedern codiert wird (Lam et al. 1996, Waterhouse et al. 1996, Lam et al. 1998). Die Expression der pflanzlichen Asparaginsynthetase wird ähnlich wie bei Nitratreduktase und Glutaminsynthetase durch Licht und Metabolite reguliert (Lam et al. 1996, Waterhouse et al. 1996, Shi et al. 1997, Lam et al. 1998).

In *E. coli* gibt es zwei unterschiedliche Formen der Asparagin-Synthetase (AsnA und AsnB). AsnA ist  $\text{NH}_4^+$ -abhängig und wird von dem Gen *asnA* codiert (Nakamura et al. 1981). AsnB ist Glutamin-abhängig und wird von *asnB* codiert (Scofield et al. 1990). AsnA aus *E. coli* ist ein Homodimer und katalysiert eine zur Glutamin-Synthetase analoge Reaktion, bei der aus Ammonium und Aspartat unter ATP-Verbrauch Asparagin gebildet wird (Sugiyama et al. 1992). Der von AsnB aus *E. coli* katalysierte Reaktionsverlauf ist dem der Asparagin-Synthetase aus höheren Pflanzen ähnlich (Sieciechowicz et al. 1988, Boehlein-Susan et al. 1994). Sowohl AsnB aus *E. coli* als auch die Asparagin-Synthetase höherer Pflanzen können unter bestimmten Bedingungen auch Ammonium als Substrat verwenden (Boehlein-Susan et al. 1994, Shi et al. 1997).

Nach Transformation von Tabakpflanzen mit AsnA aus *E. coli* konnte gezeigt werden, daß AsnA in Pflanzen aktiv ist und einen positiven Effekt auf das Wachstum und die Biomasseproduktion der Pflanzen hat (Dudits et al. 1991). Asparagin hat ein günstigeres N/C-Verhältnis (0.5) im Vergleich zu Glutamin (0.4) und könnte als eine günstigere Form des N-Transportes dienen. Daher ist die Transformation von Raps mit der AsnA aus *E. coli* auch für die Untersuchungen zur Stickstoff-Verwertungseffizienz in Raps interessant, da so ein weiterer Weg zur Ammonium-Assimilation in der Pflanze zur Verfügung stehen würde.

## 1.5 Aminosäuretransport in der Pflanze

Nach Wachstums- und Entwicklungs-Bedarf der Pflanzen werden die Metabolite (wie z.B. Aminosäuren und Saccharose) über das Phloem und das Xylem zu den verschiedenen Organen transportiert. Das Phloem und das Xylem bilden zusammen mit Parenchymzellen die Leitbündel. Das Phloem ist meist an der Außenseite der Leitbündel angeordnet, und transportiert Photoassimilate von den Bildungsorten (Source, wie z.B. Blatt) zu den Verbrauchs- oder Speicherorten (Sink, wie z.B. Wurzel, wachsender Sproß, Knolle, Frucht oder Samen). Das Phloem besteht aus Siebelementen, Geleitzellen und Phloemparenchymzellen. Siebelemente sind noch lebende Zellen, denen viele Zellstrukturen wie Zellkern, Ribosomen und Vakuolen fehlen, und bilden aneinandergereiht die Siebröhre. Die treibende Kraft des Phloemtransports ist die Differenz des osmotischen Potentials innerhalb der Siebelemente, die durch Beladung der Siebelemente im Bereich der Source-Gewebe erreicht wird („Druckstrom“-Theorie: Münch 1930). Die Geleitzellen sind lebende Pflanzenzellen mit vielen Mitochondrien. Sie sind über Plasmodesmen mit den Siebelementen verbunden. Je nach Pflanzen-Art und der Zahl der Plasmodesmata zwischen den Geleitzellen und den Bündelscheidenzellen erfolgt die Phloem-Beladung symplastisch (durch die Plasmodesmata) und/oder apoplastisch (mittels Transporter).

Das Xylem besteht aus verholzten Röhren, durch welche Wasser und darin gelöste Nährstoffe aus der Wurzel über den Transpirationsstrom in die Blätter gelangen. Die treibende Kraft ist die Wasserpotential-Differenz zwischen den Wurzeln



und den Transpirationsoberflächen wie z.B. den Blättern. Wie das Xylem beladen wird, ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Ergebnisse über die Anionen-Leitfähigkeit des Plasmalemmas der Xylemparenchymzellen von Gerste-Wurzeln verstärkten die Annahme, daß die Beladung des Xylems mit  $K^+$ ,  $NO_3^-$  und  $Cl^-$  ein passiver Prozeß ist (Köhler und Raschke 2000). Sowohl am Xylem-Beladungs-System als auch am Aufnahme-System von Aminosäuren in den Symplasten sind wahrscheinlich Aminosäure-Transporter beteiligt (Schobert und Komor 1990, Weston et al. 1995, Williams et al. 1996, Fischer et al. 1998, Delrot et al. 2000).

## 1.6 Die Samen-Speicherproteine von Raps

Die Proteine im Samen können in zwei Gruppen, Speicherproteine und „Housekeeping“-Proteine, eingeteilt werden. Die Speicherproteine sind der Hauptanteil der Samen-Proteine, während die „Housekeeping“-Proteine notwendig für den Stoffwechsel sind (Higgins 1984). Die Speicherproteine im Samen werden während der Samen-Entwicklung im großen Maße akkumuliert und bei der Keimung u. a. zur Lieferung von Stickstoff und Sulfat schnell abgebaut (Higgins 1984, DeLisle und Crouch 1989).

Im Samen von Raps gibt es zwei Haupt-Speicherproteine – das 12S Globulin Cruciferin und das 2S Albumin Napin, die jeweils 60% und 20-30% an den Gesamtproteinen ausmachen (Crouch und Sussex 1981, Sjö Dahl et al. 1995). Cruciferin ist ein salz-lösliches Hexamer mit einem Gesamt-Molekulargewicht von 300-350 kDa und enthält drei verschiedene Untereinheiten, cru1, cru2/3 und cru4 (Schwenke et al. 1983, Rödin und Rask 1990). Die drei Untereinheiten sind von drei entsprechenden Sub-Genfamilien codiert (Sjö Dahl et al. 1993). Napin von Raps ist wasser-löslich (13 kDa) und enthält zwei durch Disulfid-Verbindung gekoppelte Polypeptide (9 kDa und 4 kDa). Auch Napin ist von einer Multigen-Familie codiert (Higgins 1984, Josefsson et al. 1987, Scofield und Crouch 1987).

### 1.6.1 Regulation der Synthese der Samen-Speicherproteine

Die Samen-Speicherproteine werden während der Samen-Reifephase zuerst als Vorläufer (Preproteine) auf dem rauhen endoplasmatischen Reticulum (ER) der Cotyledon- und Achsenzellen des Embryos synthetisiert. Während und nach der Translation werden sie durch proteolytische Prozesse modifiziert (Crouch et al. 1983, Higgins 1984, Ericson et al. 1986, Murén et al. 1996). Weiter werden sie mittels des sekretorischen Wegs vom ER in die Vakuolen transportiert (Higgins 1984, Murén et al. 1996). In ausgereiften Samen befinden sich die Speicherproteine in den von Vakuolen herstammenden Protein-Körpern (Higgins 1984).

Die Synthese der Samen-Speicherproteine wird vom mRNA-Spiegel und von der Verfügbarkeit der Aminosäuren limitiert. Die Gen-Expression der Samen-Speicherproteine ist abhängig von der Entwicklungsphase, dem Gewebe, sowie weiteren genetischen und Umweltfaktoren (Higgins 1984, DeLisle und Crouch 1989). Speicherproteine werden hauptsächlich bei der Zellen-Expansionsphase der Samen-Entwicklung akkumuliert, wobei die Akkumulationsraten für verschiedene Speicherproteine unterschiedlich sind (Crouch und Sussex 1981, Yamagata et al. 1982). Die Qualität und Quantität der Samen-Speicherproteine werden von regulierenden Genen kontrolliert (Hansel et al. 1973, Ma und Nelson 1975, Dierks-Ventling 1981, Soave et al. 1981). Hormone (wie ABA, Crouch und Sussex 1981, DeLisle und Crouch 1989, Stålberg et al. 1996) und Metabolit-Level (wie Saccharose, Crouch und Sussex 1981) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synthese der Samen-Speicherproteine. Dabei werden die Akkumulation und Zusammensetzung der Samen-Speicherproteine von Umweltfaktoren wie Temperatur (Kolderup 1975, Thomson et al. 1979) und Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst (Finlayson et al. 1969, Abrol et al. 1971, Blagrove et al. 1976, Randall et al. 1979, Wrigley et al. 1980, Kirkman et al. 1982, Chandler et al. 1983, Shewry et al. 1983)

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen zur multifaktoriell beeinflussten N-Effizienz bei Raps sind sowohl ökonomisch als auch ökologisch von zunehmender Bedeutung. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Rapsgenotypen mit einem breiten genetischen Ursprung (Hybride, ältere Sorten, heutige Linien, neuere Zuchtstämme, Resynthese-Linien, und transgene Pflanzen) untersucht. Das Ziel war:

In Feldversuchen, (a) an einem sehr breiten Winterraps-Material das Ausmaß der genetischen Variation des Blatt-Metabolismus (Source-Leistungsfähigkeit) zu erfassen, und (b) die Korrelation zwischen Blatt-Metabolismus und Proteinertrag bzw. N-Effizienz zu beurteilen.

In Versuchen mit ausgewählten Winterrapsgenotypen unter Gewächshaus-Bedingungen, (a) den C- und N-Metabolismus in verschiedenen Raps-Organen (junge Blätter, „source“-Blätter, alte Blätter und Wurzeln) genauer zu charakterisieren, und (b) den Beitrag von Phloem- und Xylemtransport zur N-Effizienz der Winterrapsorten zu untersuchen.

In Versuchen mit transgenen Pflanzen die Auswirkung der Aktivitäts-Änderung von N-assimilierenden Enzymen (Überexpression oder „Antisense“-Hemmung der Glutaminsynthetase oder der Asparaginsynthetase) auf den Metabolismus sowie den Phloem- und Xylemtransport der Rapspflanzen zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Rapsgenotypen (*Brassica napus* L.) mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund bearbeitet, die entweder auf dem Feld oder im Gewächshaus angezogen wurden.

#### 2.1.1 Proben aus dem Feldversuch

In den Jahren 1996/1997, 1997/1998 und 1998/1999 wurde ein sehr breites Spektrum verschiedener Winterrapsgenotypen im Feld unter unterschiedlichen Stickstoffstufen mit jeweils zwei Wiederholungen ausgesät. In Tabelle 2-1 ist eine Übersicht der Proben aus den Feldversuchen dargestellt. Die Blattproben wurden während der Lichtperiode geerntet und analysiert. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Becker (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen) durchgeführt.

**Tabelle 2-1.** Übersicht der Proben aus den Feldversuchen

	<b>1996/1997</b>	<b>1997/1998</b>	<b>1998/1999</b>
Zahl der Genotypen	70	91	36
Zahl der Standorte	1 (Einbeck)	1 (Einbeck)	2 (Göttingen)
N-Düngungsstufen (kgN/ha)	N <sub>1</sub> = 100 N <sub>2</sub> = 240*	N <sub>0</sub> = 0 N <sub>2</sub> = 240	N <sub>0</sub> = 0 N <sub>2</sub> = 240
Wiederholungen	2	2	2

\* zum Teil analysiert

Die Namen und die Eigenschaften der verwendeten Genotypen sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

**Tabelle 2-2.** Liste der Genotypen aus den Feldversuchen

Nr.	Name	Eigenschaften/Bemerkungen	1996/1997	1997/1998	1998/1999
1	Express	heutige Linie, früh, kurz	x	x	x
2	Falcon	heutige Linie, sehr verbreitete Standardsorte	x	x	x
3	Marathon	heutige Linie, sehr ertragreich		x	x
4	Bristol	heutige Linie, sehr hoher Ölertrag, früh	x	x	x
5	Lirajet	heutige Linie, mittelfrüh, lang	x	x	x
6	DH Mansholts	DH-Linie aus alter Landsorte	x	x	x
7	Capitol	heutige Linie, nährstoffeffizient	x	x	x
8	Apex	heutige Linie, mit breiter Adaption	x	x	x
9	Alaska	heutige Linie, späte Blüte, frühe Reife	x	x	x
10	President	heutige Linie, sehr spät	x	x	
11	Prospa	heutige Linie, sehr früh	x	x	x
12	Mohican	heutige Linie, hoher Ölgehalt	x	x	x
13	WRG 136	neuer Zuchtstamm	x	x	
14	DSV 15	neuer Zuchtstamm, niedriger Proteingehalt	x	x	x
15	Oxidant	heutige Linie, spät abreifend	x	x	
16	Celt	heutige Linie	x	x	
17	Capricorn	heutige Linie	x	x	
18	Calibra	heutige Linie	x	x	
19	Honk	heutige Linie, früh	x	x	
20	Prelude	heutige Linie, kleines TKG, niedriger Ertrag	x	x	
21	NW 2532	neuer Zuchtstamm, früh	x	x	
22	NW 2553	neuer Zuchtstamm, mittel-spät	x	x	
23	Attila	heutige Linie	x	x	
24	H 683 C	2-Wege-Verbundhybride	x	x	
25	H 948 C	3-Wege-Verbundhybride	x	x	
26	AK 639	teilrestaurierte Hybride	x	x	x
27	AK 650	teilrestaurierte Hybride	x	x	
28	Magnum	heutige Linie (Liniensorte)	x	x	x
29	Amber	Liniensorte	x	x	
30	Laser	Liniensorte	x	x	

Nr.	Name	Eigenschaften/Bemerkungen	1996/1997	1997/1998	1998/1999
31	Zenith	Liniensorte	x	x	x
32	RNX 9508	Verbundhybride	x	x	
33	RNX 9505	Verbundhybride	x	x	x
34	RNX 9504	Verbundhybride	x	x	
35	Joker	restaurierte Hybride	x	x	x
36	Pronto	restaurierte Hybride	x	x	
37	S 3	Resynthese	x	x	x
38	S 9	Resynthese	x	x	
39	S 12	Resynthese	x	x	x
40	S 13	Resynthese	x	x	
41	S 27	Resynthese	x	x	x
42	S 29	Resynthese	x	x	
43	S 30	Resynthese	x	x	
44	Rasmus	heutige Linie		x	
45	Lisabeth	heutige Linie		x	x
46	Lizard	heutige Linie		x	x
47	Wotan	heutige Linie		x	
48	Licord	heutige Linie		x	x
49	Falcon x S 9	Falcon-msL x Resynthese	x	x	
50	Falcon x S 12	Falcon-msL x Resynthese	x	x	
51	Falcon x S 13	Falcon-msL x Resynthese	x	x	
52	DP-HB-4	neuer Zuchtstamm		x	
53	DP-HB-5	neuer Zuchtstamm		x	
54	RS 1	Resynthese	x	x	x
55	RS 2	Resynthese	x	x	
56	RS 3	Resynthese	x	x	x
57	RS 4	Resynthese	x	x	
58	RS 5	Resynthese	x	x	
59	RS 6	Resynthese	x	x	x
60	Hansen	heutige Linie	x	x	
61	Tarok	heutige Linie	x	x	x

<b>Nr.</b>	<b>Name</b>	<b>Eigenschaften/Bemerkungen</b>	<b>1996/1997</b>	<b>1997/1998</b>	<b>1998/1999</b>
62	Jazz	heutige Linie, geringer Ölgehalt, viel N im Korn?	x	x	
63	Chang	heutige Linie, klein, schwach, fast normaler Ertrag	x	x	
64	DP-HB-1	neuer Zuchtstamm, frühe Abreife, hoher Ölgehalt	x	x	x
65	DP-HB-2	neuer Zuchtstamm, spät und lang, kräftig	x	x	
66	DP-HB-3	neuer Zuchtstamm, wenige aber sehr große Körner	x	x	
67	Ascona	heutige Linie	x	x	
68	TED 23	neuer Zuchtstamm	x	x	
69	TH 82/96	Verbundhybride	x	x	
70	TH 91/96	Verbundhybride	x	x	
71	Quedlinburger	ältere Sorte		x	x
72	Olimpiade	ältere Sorte		x	
73	Ramses	ältere Sorte		x	
74	Gesunder	ältere Sorte		x	
75	Giessener Höhenraps	ältere Sorte		x	x
76	Heimer	ältere Sorte, Öl (++)		x	x
77	Hektor	ältere Sorte		x	x
78	Janetzki Schlesischer	ältere Sorte		x	x
79	Lembkes Normal	ältere Sorte		x	x
80	Marex	ältere Sorte		x	x
81	Mirander	ältere Sorte		x	
82	Norde	ältere Sorte		x	
83	DH Samurai	heutige Linie		x	x
84	Sarepta	ältere Sorte		x	
85	Synra	ältere Sorte		x	
86	Viktor	ältere Sorte, Öl (++)		x	
87	TH 75/96	Verbundhybride		x	
88	TH 76/96	Verbundhybride		x	
89	TH 81/96	Verbundhybride		x	
90	TH 83/96	Verbundhybride		x	
91	TEC 21	neuer Zuchtstamm		x	
92	SLM 046	sehr ertragreich	x		

Nr.	Name	Eigenschaften/Bemerkungen	1996/1997	1997/1998	1998/1999
93	S 31	Resynthese	x		
94	S 35	Resynthese	x		
95	S 39	Resynthese	x		
96	S 101	Resynthese	x		
97	Falcon x S 3	Falcon-ms x Resynthese	x		
98	Falcon x S 29	Falcon-ms x Resynthese	x		
99	Falcon x S 31	Falcon-ms x Resynthese	x		

### 2.1.2 Ausgewählte Winterraps-Genotypen

Aufgrund der Ergebnisse aus den Feldversuchen im Jahr 1997 wurden acht Genotypen (Apex, Bristol, DP-HB-1, Express, Falcon, Lirajet, RS3 und S27) ausgewählt, die in Laborexperimenten genauer charakterisiert wurden. Diese acht Genotypen wurden auf Hydrokultur mit Nährlösungen von zwei Konzentrationen (0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  und 4 mM  $\text{NO}_3^-$ , siehe Tab. 2-5) im Gewächshaus mit zusätzlicher Belichtung (HQI-TS250 Lampe, 250W, täglich 6.00-21.00 Uhr) angezogen.

### 2.1.3 Transgene Rapspflanzen mit Änderungen der Glutaminsynthetase (GS)

Hierfür wurde mit transgenen Pflanzen (C10-26, E8-1 und F2-1), die von der Arbeitsgruppe Dr. Möllers (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt wurden, gearbeitet. Diese Pflanzen wurden in Plastiktöpfen mit Komposterde im Gewächshaus mit zusätzlicher Belichtung (HQI-TS250 Lampe, 250W, täglich 6.00-21.00 Uhr) angezogen.

Die Transformation der Sommerrapssorte "Drakkar" bzw. Winterrapssorte "Falcon" wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* GV3101pMP90 durchgeführt (Wallbraun 1997). Das Ausgangsmaterial für die Klonierungen waren cDNA-Klone der plastidären (BnGSL1) und der cytosolischen (BnGSR1) Glutamin-Synthetase, jeweils aus dem A-Genom von *Brassica napus*. Als erster Schritt der Klonierung wurden die cDNA-Klone der Glutamin-Synthetase sowohl in "sense"- als auch in



"antisense"-Orientierung in die Expressionskassette des Vektors pRT101 ligiert und mit dem Promoter und dem Polyadenylierungssignal des 35S CaMV-Gens versehen. Die chimären Gene wurden dann in die T-DNA des Transformationsvektors pBIN19 kloniert.

**Tabelle 2-3.** Liste der bearbeiteten transgenen Rapspflanzen mit Änderungen der GS

transgene Pflanze	Ausgangspflanze	Eigenschaft (nach Wallbraun 1997)
C10-26	Drakkar	cytosolische GS (GSR1) überexprimiert
E8-1	Drakkar	plastidäre GS (GSL1) überexprimiert
F2-1	Falcon	"antisense"-Hemmung der plastidären GSL1

#### 2.1.4 Transgene Rapspflanzen mit Asparaginsynthetase A (AsnA) aus *E. coli*

Diese Pflanzen wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe Dr. Möllers (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Sie wurden auf Hydrokultur (Tab. 2-4-A) mit zwei unterschiedlichen Nährlösungen (4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> oder 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; siehe Tab. 2-5) oder in Plastiktöpfen mit Komposterde (Tab. 2-4-B) im Gewächshaus mit zusätzlicher Belichtung (HQI-TS250 Lampe, 250W, täglich 6.00-21.00 Uhr) angezogen.

Das AsnA-Gen aus *E. coli* ohne Transitpeptid unter Kontrolle des 35S-Promotors (Vektor pRTAsnA, Firma AgrEvo, Frankfurt) wurde in den binären Vektor pBIN19 in „sense“-Orientierung kloniert. Die Transformation der Sommerrapsorte "Drakkar" erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens* GV3101pMP90 (Wallbraun 1997).

**Tabelle 2-4-A.** Transgene Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* ohne Transitpeptid

transgene Pflanze	Ausgangspflanze	Eigenschaft (nach Wallbraun 1997)
H 18-6	Drakkar	1 Kopie nach Southern-Blot-Analyse
H 18-8	Drakkar	3 Kopien nach Southern-Blot-Analyse
H 24-2	Drakkar	1 Kopie nach Southern-Blot-Analyse

Das AsnA-Gen aus *E. coli* mit Transitpeptid für den Chloroplasten unter Kontrolle des 35S-Promotors (Vektor p35StpASN, Firma AgrEvo, Frankfurt) wurde in den binären Vektor pBIN19 (pAsnAtpBIN) oder pRE1 (pAsnAtpRE, DNA Cloning Service, Hamburg) in „sense“-Orientierung kloniert. Die Transformation der Sommerrapsorte "Drakkar" erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens* GV3101pMP90 (Seiffert 2000).

**Tabelle 2-4-B.** Transgene Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* mit Transitpeptid

transgene Pflanze	Ausgangspflanze	Eigenschaft (nach Seiffert 2000)
AsnAtp 14	Drakkar	Western-Blot-Analyse: <i>positiv</i>
AsnAtp 63	Drakkar	Western-Blot-Analyse: <i>positiv</i>
AsnAtp 86	Drakkar	Western-Blot-Analyse: <i>positiv</i>
AsnAtp 154	Drakkar	Western-Blot-Analyse: <i>positiv</i>
AsnAtp 215	Drakkar	Western-Blot-Analyse: <i>positiv</i>

**Tabelle 2-5.** Zusammensetzung der Nährlösungen für Rapspflanzen auf Hydrokultur im Gewächshaus

		4 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.5 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
<i>Makroelemente:</i>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2 mM	0.25 mM	
	NH <sub>4</sub> Cl			4 mM
	KCl	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.7 mM	0.7 mM	0.7 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM	1 mM	1 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.2)	0.3 mM	0.3 mM	0.3 mM
<i>Spurenelemente:</i>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	27.8 μM	27.8 μM	27.8 μM
	MnCl <sub>2</sub>	5.5 μM	5.5 μM	5.5 μM
	ZnSO <sub>4</sub>	0.46 μM	0.46 μM	0.46 μM
	CuSO <sub>4</sub>	0.19 μM	0.19 μM	0.19 μM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.072 μM	0.072 μM	0.072 μM
<i>Fe-Na-EDTA:</i>	FeCl <sub>3</sub>	48 μM	48 μM	48 μM
	Na <sub>2</sub> EDTA	27.4 μM	27.4 μM	27.4 μM

## 2.2 Chloroform-Methanol-Extraktion von wasserlöslichen Metaboliten aus Blatt- und Wurzelgeweben

Die Blattscheiben oder Wurzelabschnitte wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Ein ca. 200 mg Aliquot wurde mit 5 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (Chloroform : Methanol = 1.5 : 3.5 (v/v)) versetzt und gemischt. Nach mindestens 30 min Inkubation auf Eis wurden 4 ml hochreines H<sub>2</sub>O zugegeben. Danach wurde die Probe 2 min gemischt und 5 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die hydrophile Oberphase wurde in einen Rundkolben überführt, die Unterphase nochmals mit 3 ml H<sub>2</sub>O wie oben ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die vereinigten wässrigen Oberphasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 1.5 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, durch einen Cellulose-Nitrat-Filter (Porengröße 0.45 µm) in Micro-Reagiergefäße filtriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

## 2.3 Chlorophyllbestimmung (nach Arnon 1949)

Die chloroformhaltige Unterphase der Chloroform-Methanol-Extraktion (siehe 2.2.) der Blattgewebe wurde mit 96% Ethanol auf 10 ml aufgefüllt, gut geschüttelt, und für 10 min bei 4300 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Extinktion der klaren Überstände wurde bei 652 nm gegen einen Blindwert (96% Ethanol) bestimmt. Hoch konzentrierte Proben wurden mit 96% Ethanol verdünnt, bis eine Extinktion zwischen 0.1-0.3 erreicht wurde. Den Berechnungen des Chlorophyll-Gehaltes liegt ein Extinktionskoeffizient von 36 ml•mg<sup>-1</sup>•cm<sup>-1</sup> zugrunde. Das Pellet wurde für die Stärke- und Proteinbestimmung (siehe 2.4. und 2.5.1.) bei 4°C aufbewahrt.

## 2.4 Stärkebestimmung (modifiziert nach Stitt und Heldt 1981)

Der quantitative Stärkenachweis beruht auf dem sukzessiven Abbau der Stärkekörner zu Glukoseeinheiten, die sich optisch-enzymatisch oder durch HPLC erfassen lassen.

Die Stärkegehalte wurden aus den hydrophoben Unterphasen der Chloroform-Methanol-Extrakte (siehe 2.3.) bestimmt. Das Pellet wurde zuerst mit Ethanol gewaschen, um Chloroform und Chlorophyll möglichst vollständig zu entfernen. Nach der Resuspension mit 2 ml 0.2 N KOH wurde das Volumen bestimmt und anschließend im Schüttelwasserbad bei 80°C für 3 h inkubiert. Durch Zugabe von 1 N Essigsäure (ca. 350 µl) wurde der pH-Wert auf 4.5-5.0 eingestellt. Dann wurde die Probe zur guten Homogenisation im Ultraschallbad für 10 min behandelt, und für die weitere enzymatische Aufspaltung oder für die Proteinbestimmung (siehe 2.5.) bereitgestellt.

Enzymatische Aufspaltung (2 Ansätze pro Probe): 100 µl Aliquot und 400 µl Reaktionsmedium wurden zusammengegeben und bei 50°C für mindestens 3 h inkubiert. Danach wurde die Probe 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand für die Bestimmung des Glukosegehalts (enzymatisch siehe 2.6.; durch HPLC siehe 2.10.) verwendet.

<i>Reaktionsmedium:</i>	50 mM	Natriumacetat (pH 4.8)
	23 nKat	Amyloglukosidase
	33 nKat	α-Amylase

## 2.5 Proteinbestimmung

### 2.5.1 Bestimmung nach Lowry et al. (1951)

Der Proteingehalt wurde aus der Unterphase der Chloroform-Methanol-Extraktion nach Aufarbeitung zur Stärkebestimmung (siehe 2.4.) bestimmt.

*Stammlösungen:*

- A) 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1 N NaOH (w/v)
- B) 2% Na-K-Tartrat (w/v)
- C) 1% CuSO<sub>4</sub> (w/v)
- D) Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

*Arbeitslösung 1: (frisch)*

Eine Mischung von Stammlösungen A, B und C (A:B:C = 99:0.5:0.5)

*Arbeitslösung 2:*

Verdünnte Stammlösung D (Stammlösung D : H<sub>2</sub>O = 1:2)

700 µl der Arbeitslösung 1 und 150 µl der verdünnten Probe wurden gemischt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Dann wurden 100 µl der Arbeitslösung 2 zugegeben und geschüttelt. Nach einer mindestens 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und anschließenden 2 min Zentrifugation wurden die Extinktionen der Proben bei 578 nm bestimmt. Um die Eigenabsorption der Proben berücksichtigen zu können, wurde ein Blindwert gemessen. Hierfür erfolgte die Zugabe der Arbeitslösung 2 vor Zugabe der Probelösung. Die Proteingehalte wurden mittels einer parallel erstellten Eichkurve (0-45 µg Rinderserumalbumin) bestimmt.

**2.5.2 Bestimmung nach Bradford (1976)**

Die Proteingehalte der Proben für die Western-Blot-Analyse oder Enzymaktivitätsmessungen wurden mit dieser Methode bestimmt.

Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliantblue G-250 oder Servablau-G liegt in saurer Lösung in zwei Formen vor, einer blauen und einer orangen Form. Proteine binden bevorzugt die blaue Form, wobei ein Komplex entsteht, dessen Extinktionskoeffizient um vieles größer ist als der des freien Farbstoffes.

*Lösungen:* 1) 70 mg Coomassie Brilliantblue G-250 (Servablau-G) wurden in 50 ml 96%igen Ethanol gelöst  
2) 100 ml 86%ige Phosphorsäure wurden mit 600 ml H<sub>2</sub>O verdünnt

*Farbreagenz:* Lösung 1) und 2) wurden zusammen gemischt und dann mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt, gut gemischt und wenn nötig filtriert. Eine Eichkurve wurde anschließend im Bereich von 0-15 µg Protein (Rinderserumalbumin) erstellt. Im Mittel wurde eine Extinktion von ca. 52 E pro mg Protein erhalten. Das Farbreagenz ist lichtgeschützt mehrere Wochen haltbar.

50  $\mu\text{l}$  Probelösung wurden mit 1 ml Farbreagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Blindwert wurden 50  $\mu\text{l}$  des Puffers der Probe mit 1 ml Farbreagenz gleichzeitig versetzt und inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

## 2.6 Optisch enzymatische Bestimmung von Glukose, Fruktose, Saccharose, Stärke, Malat und Nitrat

Verwendet wurden die Extrakte aus der Chloroform-Methanol-Extraktion (siehe 2.2.). Die Messungen erfolgten an einem Spektralphotometer (Kontron Uvikon 922). Falls die verwendeten Enzyme in Ammoniumsulfat gelöst waren, wurden sie zuerst 8 min (13000 rpm, 4°C) zentrifugiert und das Sediment in dem jeweiligen Reaktionspuffer resuspendiert.

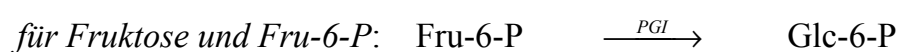
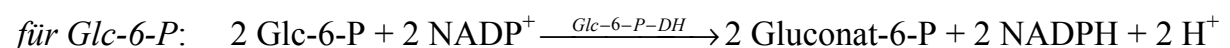
Die Metabolitkonzentrationen ( $c$ ) sind den Extinktionsänderungen ( $\Delta E$ ) proportional und berechnen sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \quad [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}], \quad d = \text{Schichtdicke der Küvette (1 cm)}$$

Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) für NAD(P)H (bei 334 nm und 25°C, Referenz 405 nm) beträgt  $6.18 \cdot 10^3 \text{ [M} \cdot \text{cm]}^{-1}$ , für APADH<sub>2</sub> (bei 366 nm und 25°C, Referenz 436 nm)  $9.1 \cdot 10^3 \text{ [M} \cdot \text{cm]}^{-1}$ .

### 2.6.1 Glukose, Fruktose und Saccharose (modifiziert nach Bergmeyer 1983)

Meßprinzip:



Testansatz (600 $\mu$ l):	100 mM	Imidazol (pH 6.9)
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1.1 mM	ATP
	0.5 mM	NADP
	19 nKat	Glukose-6-P-Dehydrogenase (Glc-6-P-DH)
10-20 $\mu$ l		Probe
	41 nKat	Hexokinase
	19 nKat	Phosphoglucose-Isomerase (PGI)
	650 nKat	$\beta$ -Fruktosidase (Invertase)

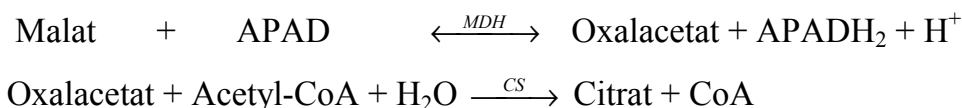
Durch die Reihenfolge der Enzymzugaben war es möglich, Glukose, Fruktose und Saccharose in einem Testansatz nacheinander zu bestimmen. Fruktose und Fruktose-6-P ergaben ein Meßsignal. Die Extinktionzunahme bei 334 nm war der jeweiligen Konzentration direkt proportional. Aber es ist zu beachten, daß pro Mol gespaltener Saccharose 2 Mole NADPH entstehen.

### 2.6.2 Stärke

Der Testansatz ist analog zu 2.6.1. Hierbei wurden nur Glc-6-P-DH und Hexokinase zugegeben.

### 2.6.3 Malat (modifiziert nach Bergmeyer 1983)

Meßprinzip:



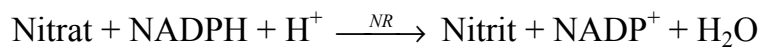
Durch die Verwendung des stärker als NAD oxidierend wirkenden APADs wird die Bildung von Oxalacetat begünstigt, denn normalerweise liegt das Gleichgewicht der MDH-Reaktion in der Zelle weit auf der Seite der Edukte.

Die Malatkonzentration ist der Extinktionszunahme bei 366 nm proportional.

Testansatz (600µl):	100 mM	Triethanolamin (pH 8.5)
	0.17 mM	APAD
	0.17 mM	Acetyl-CoA
	60 nKat	Citrat-Synthase (CS)
	10-40 µl	Probe
	250 nKat	Malat-Dehydrogenase (MDH)

#### 2.6.4 Nitrat

Meßprinzip:



Testansatz (600 µl):	100 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.3)
	0.17 mM	NADPH
	10-30 µl	Probe
	0.8 nKat	Nitratreduktase (NR)

Die Nitratkonzentration ist der Extinktionabnahme bei 334 nm proportional.

#### 2.7 Phloemsaft-Gewinnung (nach Lohaus 1995)

Die Gewinnung des Phloemsaftes aus intakten Rapspflanzen wurde mit der Laser-Aphidenteknik, die von Barlow und McCully im Jahr 1972 erstmals beschrieben wurde, in einem klimatisierten Raum bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von mindestens 80% durchgeführt. Dabei wurden die Pflanzen während der Lichtperiode mit einer 400 W Hg-Hochdruck-Dampflampe beleuchtet. Für Raps wurden die Blattläuse von Blumenkohl verwendet. Für die Probengewinnung wurden Rapspflanzen zum Zeitpunkt des Blühbeginns verwendet.

Die verwendeten Blattläuse wurden mit einem weichen Zeichenpinsel von ihren Futterpflanzen in einen Plastikkäfig gesammelt. Um eine starke Verunreinigung des Blattes mit Honigtau zu verhindern, wurden 10-20 Blattläuse angesetzt. Dazu wurde dann der Plastikkäfig an einer leicht zugänglichen Stelle der Blattunterseite einer



Versuchspflanze befestigt. Aus technischen Gründen konnte Siebröhrensaft normalerweise nur in der Nähe des Blattrands gewonnen werden, da sonst das Objektiv des Mikroskops an das Blatt stößt. Nach ca. 2 h, einem Zeitraum, der sicherstellte, daß die Blattläuse ihren Stechrüssel in das Siebröhrensystem injiziert hatten, wurde der Käfig entfernt. Das Blatt wurde mit der Unterseite nach unten in eine weich ausgekleidete, durch einen Mikromanipulator bewegliche Plastikhalterung eingespannt. Anschließend wurde das Blatt so plaziert, daß der Stechrüssel der Blattlaus genau auf das Kreuz (die Mitte) des Okular-Mikrometers fokussiert war. Um eine Beschädigung des Blattes durch die Hitze des Laserblitzes zu vermeiden, wurde es parallel zum Strahl ausgerichtet. Zwischen Objektiv und Stechrüssel durften sich keine anderen Gliedmaßen der Blattlaus befinden. Um zu vermeiden, daß die Blattläuse ihren Stechrüssel aus der angestochenen Siebröhre zog, durfte sie weder stark geblendet noch Vibrationen ausgesetzt werden.

Der Aphidenkörper wurde durch einen Laserblitz, der durch das 40x Objektiv des Mikroskops geleitet wurde, von der inserierten Stechborste getrennt. Der verwendete Laser war mit einem Neodym-Glas Stab (LG 760, Länge 75 mm, Durchmesser 4 mm; Schott, Mainz) ausgestattet, dessen Wellenlänge 1.06  $\mu\text{m}$  betrug. Die Ladespannung war variabel einstellbar und betrug für die hier verwendeten Blattläuse 1200-1300 V. Die Ausgangsenergie des Laserblitzes war 1 Joule, wobei die Puls-Auslösung manuell erfolgte und die Puls-Dauer 150  $\mu\text{sec}$  betrug.

Durch den Laserstrahl schmolz die Chitinummantelung, die Stechborste wurde abgeschnitten und ihr vorderer Teil verblieb im Siebröhrensystem. Der Insektenkörper wurde mit einem Pinsel entfernt. Der aus der verbliebenen Stechborste austretende Phloemsaft wurde unmittelbar danach mit einer Mikrokapillare (Einmal-Kapillarpipetten, 3.2 cm, 0.5  $\mu\text{l}$ ; Fa. Desaga, Deutschland) aufgefangen. Die Mikrokapillare wurde so plaziert, daß ihre Oberkante plan mit dem Blatt abschloß. Der untere Teil der Kapillare wurde von einer mit einem Mikromanipulator beweglichen Plastikhalterung umschlossen. Ohne das Blatt zu bewegen, wurden die restlichen Blattläuse mit einem Pinsel vom Blatt entfernt, da Honigtautropfen der Blattläuse zur Verunreinigung der Kapillare führen könnten.

Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen wurden im Phloemsaft mittels HPLC gemessen (siehe 2.9. und 2.10.).

## **2.8 Gewinnung von Wurzeldruck-Exudat (Xylemsaft) (modifiziert nach Salt et al. 1995)**

Die hierbei verwendeten Pflanzen wurden auf Hydrokultur im Gewächshaus bis zum Blühbeginn angezogen. Die Gewinnung des Xylemsaftes wurde während der Lichtperiode durchgeführt. Mit einem Messer wurde der Stengel der Pflanzen ca. 5 cm oberhalb der Wurzeln durchgeschnitten, wobei keine Blätter mehr auf dem übrigen Teil des Stengels verbleiben sollten. Um Kontamination aus den geschädigten Zellen zu vermindern, wurde der erste Tropfen der Exudate verworfen. Dann wurde der durch den Wurzeldruck herauskommende Saft in Mikro-Reagiergefäßen gesammelt und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Es wurde nur Proben in den ersten 45 min nach dem Abschnitt gesammelt.

Aminosäure-, Zucker- und Ionenkonzentrationen wurden im Xylemsaft mittels HPLC gemessen.

## **2.9 Chromatographische Bestimmung der Aminosäuren (nach Riens 1992)**

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren wurden durch „High Performance Reversed Phase Liquid Chromatography“ (HPLC) qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Die Aminosäuren wurden zunächst mit o-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptoethanol bei 15°C zu fluorophoren apolaren Indolderivaten umgesetzt. Die Derivatisierung der Aminosäuren mit diesem Fluoreszenzfarbstoff setzt die Nachweisgrenze um das 20fache gegenüber der herkömmlichen Ninhydrin-Derivatisierung herab. Iminosäuren (Prolin) lassen sich nicht derivatisieren und so mit dieser Methode nicht nachweisen. Der Nachweisbereich lag bei 0.2-20 µM. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad.

Derivatisierungsreagenz:

- 1) *OPA-Stock-Lösung*:      16 mM    o-Phthaldialdehyd (OPA)  
                                     88% (v/v)    Methanol  
                                     0.11 M      K-Borat (pH 10.4)  
                                     1.1% (v/v)    Mercaptoethanol

2) *Arbeitslösung*: 0.5 ml OPA-Stock-Lösung und 1 ml Kaliumborat (1 M, pH 10.4) durchmischen, dann in vier HPLC-Röhrchen verteilen.

OPA-Stock-Lösung ist lichtgeschützt bei 4°C eine Woche haltbar, aber bei der Benutzung wurde jeweils noch 5 µl Mercaptoethanol zugesetzt, falls sie älter als 24 h war.

Das Auftragen der Proben auf die Säule wurde mit einem automatisch gesteuerten Probengeber (Autosampler 2157, Fa. Pharmacia LKB, Schweden) vereinheitlicht. Die Säulentemperatur wurde durch einen Ofen (2155 HPLC Column Oven, Fa. Pharmacia LKB, Schweden) bei 35°C konstant gehalten. Um die Genauigkeit der Geräte (Pumpe und Autosampler) überprüfen zu können, wurde ein interner Standard ( $\alpha$ -Aminobuttersäure mit 16.7 µM Endkonzentration) bei der Vorbereitung den zu messenden Proben- und Standardlösungen zugesetzt. Die Proben wurden vorher durch 0.45 µm Cellulose-Nitrat-Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert und bei Bedarf mit HPLC-H<sub>2</sub>O verdünnt.

Standardlösungen:

*AS-Mix* (je 200 µM): jeweils 200 µl von 1 mM Asparagin, 1 mM Glutamin, 1 mM Tryptophan, 1 mM  $\gamma$ -Aminobuttersäure, und 1 mM Phosphoserin zusammen mischen.

*Sigma-Mix* (amino acid standard solutions A2161, for fluorescence detection, je 25 µM außer L-Cystein mit 12.5 µM): L-Alanin, L-Arginin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamat, Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin und L-Valin.

*Standard 3* (STD 3, Endkonzentration 20 µM): 800 µl Sigma-Mix, 100 µl K-Borat (1 M, pH 10.4), und 100 µl AS-Mix mischen.

*Standard 2* (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ): 290  $\mu\text{l}$  STD 3 und 290  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  mischen

*Standard 1* (Endkonzentration 4  $\mu\text{M}$ ): 120  $\mu\text{l}$  STD 3 und 480  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  mischen.

*Interner Standard* (Endkonzentration 16.7  $\mu\text{M}$ ): 10  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Aminobuttersäure (L- $\alpha$ -Amino-n-Butyric acid, Sigma) und 50  $\mu\text{l}$  Proben- oder Standardlösung zusammengenommen.

20  $\mu\text{l}$  Derivatisierungsarbeitslösung und 20  $\mu\text{l}$  Probe- oder Standardlösung (mit internem Standard) wurden gemischt und 1 min derivatisiert. Davon wurden 20  $\mu\text{l}$  auf eine C-18 Reversed Phase Säule (Superspher, 100 RP 18 endcapped, 4  $\mu\text{m}$ , 4 x 125 mm; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Das Säulenmaterial besteht aus Octadecylsilicat. Um Verunreinigungen der Säule zu verhindern, wurde eine Vorsäule (LiChrospher 100 RP 18e, 5  $\mu\text{m}$ , Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Gesamtaminosäure-Konzentration betrug im Derivatisierungsansatz maximal 0.5 mM.

Ein Gradient aus Acetonitril und Phosphatpuffer eluierte die Aminosäurederivate von dem apolaren Säulenmaterial. Der Gradient wurde durch einen Gradientenmischer (Low Pressure Mixer, Ternary, Fa. Pharmacia LKB) und eine Pumpe (HPLC-Pumpe 2248, Fa. Pharmacia LKB) erzeugt. Die Elutionslösungen wurden vor der Benutzung 10 min mit Helium entgast.

Elutionslösungen:

*Stockpuffer* [18 mM Natriumphosphat, 1.71 mM EDTA (freie Säure), pH 7.1]: 3 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (suprapur) und 1.25 g EDTA (freie Säure) in 2.5 L HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  geben, lange rühren und mit 50% NaOH den pH-Wert auf 7.06-7.08 einstellen.

*Lösung A*: 95% Stockpuffer (v/v), 5% Acetonitril (v/v)

*Lösung B*: 50% Stockpuffer (v/v), 50% Acetonitril (v/v)

*Lösung C*: 70% Acetonitril (v/v) in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$

Die Anregung der Derivatisierungsprodukte erfolgte bei 330 nm. Die Emission des Eluats wurde bei 408 nm direkt am Säulenausgang durch einen Fluoreszenzdetektor (Fluoreszenzdetektor 2144, Fa. Pharmacia LKB) bei einer

Empfindlichkeit von 200 nA kontinuierlich gemessen. Die Fluoreszenzintensität der Aminosäurederivate war abhängig vom Alter der Derivatisierungsreagenzien, der Lampe des Fluoreszenzdetektors sowie der Säule, und sehr empfindlich gegenüber geringen pH-Wert-Änderungen. Einige der gebildeten Aminosäurederivate waren sehr instabil (Cooper et al. 1984).

Verlauf des Gradienten:

<i>Zeit (min)</i>	<i>Lösung A (%)</i>	<i>Lösung B (%)</i>	<i>Lösung C (%)</i>	<i>Flußrate (ml/min)</i>
0	100	0	0	0.9
12	81	19	0	0.9
20	81	19	0	0.9
38	52	48	0	0.9
41	52	48	0	0.9
48	32	68	0	0.9
51	0	0	100	1.2
66	0	0	100	1.2
68	100	0	0	0.9
78	100	0	0	0.9

Jede Meßsequenz (max. 31 Läufe) erforderte eine eigene Kalibrierung. Die Kalibrierung erfolgte mit HPLC-H<sub>2</sub>O als Blindwert und drei Konzentrationen von verschiedenen Aminosäuren (Standard 1, 2 und 3); hierbei wurden die entsprechenden Konzentrationen an Glutamin, Asparagin, Tryptophan,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Phosphoserin zugesetzt. Die Linearität der Eichgerade wurde in einem Bereich von 1-50  $\mu$ M überprüft.

Durch ein Computerprogramm (HPLC-Manager, Fa. Pharmacia LKB) wurden die Pumpe, der Autosampler und die Meßsequenz gesteuert und die Daten des Fluoreszenzdetektors kontinuierlich gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Integrationsprogramm (PeakNet Version 5.1, Chromatographie Datenstation, Dionex GmbH, Idstein, Deutschland).

## 2.10 Amperometrische Bestimmung von Kohlenhydraten

Die Probe wurde zunächst über eine Vorsäule (CarboPac<sup>TM</sup>, PA 10, 4 mm (10-32), P/N 46115, S/N 1438; Dionex Chromatography) gereinigt und dann von einer Anionenaustauscher-Säule (CarboPac<sup>TM</sup>, PA 10, 4x250 mm (10-32), P/N 46110, S/N 1538; Dionex Chromatography) aufgetrennt. Die Elution erfolgte isokratisch mit 160 mM NaOH (7.5 ml 50% NaOH in 1800 ml HPLC-H<sub>2</sub>O), wobei das H<sub>2</sub>O zuvor 20 min mit Helium entgast wurde, um die Bildung des schwerlöslichen Natriumhydrogencarbonats zu verhindern. Die Flußrate (1 ml/min) und die Elutionsdauer (z.B. 15 min pro Lauf) wurden mit einer Pumpe (Shimadzu-liquid-chromatograph LC-9A) gesteuert. Die elektrochemische Detektion der getrennten Kohlenhydrate erfolgte über eine amperometrische Zelle (ESA, #5040, Bedford, USA) mit einer Goldelektrode. Ein Amperometer (Coulchem II, ESA, Bedford, USA) steuerte die Spannungspulse und war für die Messung der Stromstärken erforderlich.

<i>Puls Modus:</i>	<i>Spannung</i>	<i>Dauer</i>	<i>Meßverzögerung</i>
Messung	50 mV	500 ms	400 ms
Reinigung	700 mV	540 ms	
Regenerierung	-800 mV	540 ms	

Die Nutzung der hoch reinen Substanzen (NaOH von Fa. Baker, England) und HPLC-H<sub>2</sub>O ist notwendig, um die Basislinie zu stabilisieren. Die Kalibrierung erfolgte mit den Konzentrationen zwischen 25 µM und 500 µM von Zuckern (wie z.B. Glukose, Fruktose und Saccharose) in HPLC-H<sub>2</sub>O. Diese Methode ist nicht für Kohlenhydrate spezifisch, sondern detektiert jede oxidierbare Substanz. Beispielsweise ergibt die Puffersubstanz (MES) bei Apoplastensaft-Proben ein von der Konzentration abhängiges Meßsignal, welches im Chromatogramm das Saccharosesignal überlagert. In diesem Fall ist eine spezifische Kalibrierung erforderlich, dafür beinhalten die Standardlösungen neben den Kohlenhydraten auch die MES-Puffersubstanz in entsprechenden Konzentrationen. Die Proben sind in dem Autosampler mit einer Kühlung auf 10°C für 24 Stunden stabil. Die Daten wurden auf einen Computer

gespeichert, und die Auswertung erfolgte über ein Integrationsprogramm (PeakNet Version 5.1, Chromatographie Datenstation, Dionex GmbH).

### **2.11 Konzentrationsbestimmung von Ionen und organischen Säuren durch ein HPLC-System**

Die hierbei verwendeten Proben waren die Blatt- und Wurzelextrakte aus der Chloroform-Methanol-Extraktion sowie die Xylemsaftproben. Dabei konnten die Konzentrationen der Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , und  $\text{Ca}^{2+}$ ) oder der Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) sowie einiger organischer Säuren (Malat, Oxalat) nach dem Prinzip des Ionenaustausches durch "High Performance Ion Chromatography" bestimmt werden.

Die Anionen wurden über eine IonPac AS4A-Säule (Fa. Dionex, Idstein, Deutschland) in Kombination mit einer AS4A-Säule aufgetrennt. Beiden Säulen war eine IonPac 4A-SC-Säule (Fa. Dionex) vorgeschaltet. Die Elution erfolgte isokratisch mit 1.8 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 1.7 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

Die Kationen wurden über eine Dionex CS 12A-Säule, der gleichfalls eine Vorsäule (Dionex CG 12A) vorgeschaltet war, aufgetrennt. Hierbei erfolgte die Elution isokratisch mit 40 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Eine Gradientenpumpe (GP 40 Gradient Pump, Fa. Dionex) erzeugte eine konstante Flußrate von 2 ml/min für die Elution sowohl der Kationen als auch der Anionen. Die Proben wurden über eine Probenschleife mit einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  aufgetragen. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad. Die Elutionslösungen wurden vor der Benutzung 10 min mit Helium entgast.

Die Ionen wurden über ihre elektrischen Leitfähigkeiten nachgewiesen. Neben einem Leitfähigkeitsdetektor (CD 20 Conductivity Detector, Fa. Dionex, Idstein, Deutschland) bildete ein jeweiliges Suppressorsystem einen weiteren Teil der Detektionseinheit (für Anionen: Dionex Anion Self-Regenerating Suppressor ASRS-II 4-mm, und für Kationen: Dionex-Ultra 4-mm). Die Suppressorsysteme verringerten zum einen auf chemischem Wege die hohe Grundleitfähigkeit der als Eluenten fungierenden Elektrolyten, zum anderen überführten sie die zu analysierenden Ionen in

eine stärker leitende Form. Beides hatte eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit der Detektion zur Folge. Die Identifikation der Ionen erfolgte über ihre Retentionszeit, ihre Quantifizierung mit Hilfe von Eichgraden in einem Konzentrationsbereich zwischen 200 und 2000  $\mu\text{M}$  für Anionen und zwischen 50 und 500  $\mu\text{M}$  für Kationen.

Die Steuerung der Pumpe und die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Computerprogramm (PeakNet Version 5.1, Chromatographie Datenstation, Dionex GmbH).

## 2.12 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sie erfolgte in Anlehnung an die Methode von Laemmli (1970).

### 2.12.1 Vorbereitung der Gele

Hierbei wurden Minigele verwendet. Die Gel-Dicke betrug 1 mm. Die Länge des Sammelgels war 1 cm und die des Trenngels ca. 6 cm.

Zusammensetzung der Stammlösungen:

*30% Acrylamid Stock:* 75 g Acrylamid und 2 g N,N-Methylenbisacrylamid in  $\text{H}_2\text{O}$  auf 250 ml lösen.

*Lower Gel Stock:* 36.3 g Tris und 0.8 g SDS (Sodium dodecyl sulfate) in  $\text{H}_2\text{O}$  auf 200 ml lösen, dabei mit HCl auf pH 8.8 einstellen.

*Upper Gel Stock:* 12 g Tris und 0.8 g SDS in  $\text{H}_2\text{O}$  auf 200 ml lösen, dabei mit HCl auf pH 6.8 einstellen.

*10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS):* 10 mg APS in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  lösen (frisch).

*TEMED:* N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

- die Glasplatten für das Gießen des Gels wurden mit Ethanol gereinigt und 2 cm vom oberen Rand markiert.
- Trenngel-Ansatz (für 4 Gele von 11% Acrylamid-Endkonzentration)



Lower Gel Stock	6 ml
30% Acrylamid Stock	8.8 ml
H <sub>2</sub> O	9.2 ml
10% (w/v) APS	160 µl
TEMED	20 µl

- das Trenngel bis 2 cm zum oberen Rand gießen
- mit 100 µl Isobutanol überschichten, 45 min stehenlassen
- mit H<sub>2</sub>O das Isobutanol wegspülen
- Sammelgel-Ansatz (für 4 Gele von 4.5% Acrylamid-Endkonzentration)

Upper Gel Stock	2.6 ml
30% Acrylamid Stock	1.54 ml
H <sub>2</sub> O	6 ml
10% (w/v) APS	60 µl
TEMED	10 µl

- das Sammelgel bis zum Rand gießen und Kamm luftblasenfrei hineinstecken; 60 min stehenlassen.

### 2.12.2 Probenauftragung und Durchführung der Elektrophorese

Zur Denaturierung der Proteine wurden die mit Probenpuffer versetzten Proben und Markerproteine bei 95°C für 5 min inkubiert. Dann wurden sie zur Sedimentierung der unlöslichen Bestandteile 5 min zentrifugiert. Pro Tasche konnten max. 20 µl Probevolumen aufgetragen werden, wobei die Proteinmenge jeder Tasche für Western-Blot 10 µg betrug. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel, und wurde beendet, wenn die von Bromphenolblau markierte Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Probenpuffer:	Tris-HCl (pH 6.8)	15 mM
	SDS	5% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	2% (v/v)
	Glycerin	20% (v/v)
	Bromphenolblau	0.25% (w/v)
Elektrodenpuffer:	Tris (pH nicht eingestellt)	50 mM
	Glycin	380 mM
	SDS	0.1% (w/v)

Für Western-Blot und Coomassie-Färbung wurde ein Ansatz der folgenden Markerproteine als Molekulargewichtsmarker bei der Elektrophorese verwendet:

Markerproteine:	Phosphorylase B	94 kDa
	BSA	66 kDa
	Ovalbumin	43 kDa
	Carboanhydrase	29 kDa
	Trypsininhibitor	20.1 kDa
	$\alpha$ -Lactoalbumin	14.2 kDa

## 2.13 Western-Blot

Hierbei wurde die Expression von Asparagin-Synthetase A (AsnA) aus *E. coli* in Rapstransformanten (siehe 2.1.4.) auf Protein-Ebene überprüft.

### 2.13.1 Aufarbeitung der Proben

Blatt- und Wurzelproben wurden zuerst in flüssigem Stickstoff fein zermörsert und in Micro-Reagiergefäßen eingewogen. Sofort nach dem Auftauen der Proben (auf Eis) wurde Extraktionspuffer (400  $\mu$ l für je 100 mg Blattmaterial bzw. 200  $\mu$ l für je 100 mg Wurzelmaterial) zugesetzt, durchgemischt, und bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Bestimmung des Proteingehalts (Bradford, siehe 2.5.2.) für die Gelelektrophorese verwendet.



## 2.13.4 Kontrolle des Transfers

### 2.13.4.1 Amidoschwarz-Färbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Spur der Markerproteine von der Blotmembran abgeschnitten, für 1 min in Amidoschwarzlösung angefärbt und für 15 min entfärbt. Nach dem Spülen mit H<sub>2</sub>O wurde der Membranabschnitt zwischen Whatmanpapier getrocknet. Der andere Teil der Membran wurde für die Behandlung mit Antikörpern weiter bearbeitet (2.13.5.).

Amidoschwarzlösung:	0.1% (w/v) Amidoschwarz
	45% (v/v) Isopropanol
	10% (v/v) Essigsäure
Entfärber:	90% (v/v) Isopropanol
	2% (v/v) Essigsäure

### 2.13.4.2 Coomassie-Färbung

Nach dem Transfer wurde das Gel noch mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt, um den Transfereffekt zu überprüfen. Hierfür wurde das Gel in der Färbelösung für 30 min unter Schütteln inkubiert, wobei die Proteine fixiert und angefärbt wurden. Anschließend erfolgte die Entfärbung (mit Schütteln) durch zwei- bis dreimaliges Wechseln des Entfärbers, so lange bis der Hintergrund des Gels nahezu farblos war.

Färbelösung:	Coomassie Blue R-250 (Serva Blau R)	0.25% (w/v)
	Methanol	40% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Entfärber:	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)

### 2.13.5 Nachweis durch "Enhanced Chemiluminescence" (ECL)

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 60 min in Blocklösung inkubiert und anschließend 3-malig für 10 min in TBS-T Puffer gewaschen. Dann wurde der primäre Antikörper (in TBS-Puffer mit 1% BSA entsprechend verdünnt, siehe unten) für 60 min mit der Membran zusammen inkubiert und wiederum 3-mal 10 min in TBS-T Puffer gewaschen. Danach wurde für die Reaktion mit dem sekundären Antikörper (Protein A-HRP Conjugate, Bio-RAD; bei Benutzung in TBS-Puffer 1:20000 verdünnt) analog verfahren. Somit ist die Membran für den ECL-Test vorbereitet.

*primärer Antikörper:* Polyklonaler Antikörper gegen die Asparagin-Synthetase aus *E. coli*, freundlicherweise von der Firma AGREVO zur Verfügung gestellt, fand in einer Verdünnung von 1:1000 Verwendung. Mit 0.02%  $\text{NaN}_3$  kann die Antikörper-Lösung bei 4°C gelagert und mehrmals verwendet werden.

*Verdünnungspuffer für primären Antikörper:* 1% (w/v) BSA und 0.02% (w/v)  $\text{NaN}_3$  in TBS-Puffer

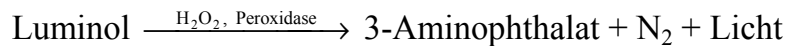
*TBS-Puffer:* 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.9% (w/v) NaCl

*Blocklösung:* 5% (w/v) "dry milk" (Naturaflo, Magermilchpulver, instant, 1% Fett) in TBS-Puffer

*TBS-T Puffer:* 0.05% (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer

Der Nachweis der AsnA-spezifischen Banden erfolgte mit Hilfe des "Enhanced Chemiluminescence"-Kit von Amersham (ECL Western blotting detection reagents). Hierfür wird der sekundäre Antikörper durch die Reaktion der Peroxidase, die an den letzteren gekoppelt ist, nachgewiesen. Die Peroxidase und  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalysieren unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol, welches dabei angeregt wird, Licht zu emittieren (Chemilumineszenz). Die Lichtemission wird durch Phenole verstärkt und erreicht 5-20 min nach Reaktionsstart ihr Maximum. Diese Reaktion hat eine Halbwertszeit von ca. 60 min.

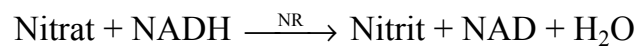
Zur Detektion wurde die mit dem Antikörper beschichtete Seite der Nitrocellulosemembran mit einer Lösungsmischung aus "ECL Western blotting detection reagents" 1 und 2 (Mischungsverhältnis 1:1) für 1 min inkubiert. Dann wurde die Membran in Frischhaltefolie luftblasenfrei verpackt und für 20 s bis 10 min auf Röntgenfilm (X-OMAT, Fa. Kodak) exponiert. Der Film wurde anschließend entwickelt (Entwickler und Fixierer, Fa. Kodak).



## 2.14 Enzymaktivitätsmessungen

### 2.14.1 Nitrat-Reduktase (NR) (modifiziert nach Kaiser et al. 1992)

Meßprinzip:



Die Aktivität wurde über die Bestimmung des Nitrits gemessen, das durch einen Farbstest quantifiziert wurde. Dabei wurde Sulfanilsäure durch salpetrige Säure diazotiert und das entsprechende Diazoniumsalz mit  $\alpha$ -Naphthylamin zu einem pinkfarbenen Azofarbstoff gekoppelt.

Probenextraktion:

Blatt- und Wurzelmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in Mikro-Reagiergefäße überführt. Nach dem Auftauen auf Eis wurde der Extraktionspuffer mit einem Verhältnis von ca. 1:4 (w/v) zugegeben und durchgemischt. Dieses Homogenat wurde später für die Aktivitätsmessung in den Testansatz zugesetzt.

Extraktionspuffer:	HEPES (pH 7.5)	100 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM
	Magnesiumacetat	5 mM
	Triton-X 100	0.1% (v/v)
	Rinderserumalbumin	0.5% (w/v)
	Natriummolybdat	5 µM
	Polyvinylpolypyrrolidon	1% (w/v)
	Dithiothreitol*	5 mM
	Leupeptin*	25 µM
	FAD*	20 µM
	PMSF*	0.5 mM

\* Diese Substanzen wurden dem Puffer frisch zugegeben.

Testansatz (300 µl):

Reaktionsmedium A oder B	235 µl
Additive	15 µl
Probenhomogenat	50 µl

Nach dem Start mit 50 µl Probenhomogenat wurden die Ansätze für 0-12 min bei 30°C inkubiert. Es erfolgte eine Zugabe von 100 µl Stop-Mix und 15 min Inkubation im Dunkeln. Dann wurden sie mit 600 µl Farbmix versetzt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Extinktion bei 540 nm nach 2 min Zentrifugation bestimmt (Kontron Uvikon 932). Die Auswertung erfolgte über eine Eichkurve im Bereich von 0-15 nmol Nitrit.

Nach der Zugabe von Stop-Mix wurde die Reaktion mit Zinkacetat abgestoppt und das überschüssige NADH durch Phenazinmethosulfat bei Inkubation im Dunkeln oxidiert, da es den Farbttest stören würde.

Bei Inkubation mit Reaktionsmedium A wird die maximale Aktivität erfaßt, Medium B gibt die Hemmung der Nitrat-Reduktase durch physiologische

Konzentrationen an Magnesium wieder. Der Aktivierungszustand der NR errechnet sich wie folgt: Aktivierungszustand (%) = B/A • 100.

<i>Reaktionsmedium:</i>	A	B
106 mM HEPES (pH 7.5)	+	+
6 mM Kaliumnitrat	+	+
6 mM EDTA	+	-
13 mM Magnesiumacetat	-	+

<i>Additive:</i>	50 mM HEPES (pH 7.5)
	330 µM Leupeptin*
	200 µM FAD*
	5 mM DTT*
	100 µM Natriummolybdat
	10 mM NADH*

Die Additive dienen der Stabilisierung des empfindlichen Enzyms. Die Substanzen mit "\*" wurden frisch angesetzt.

<i>Stop-Mix*:</i>	0.6 M Zinkacetat (ZnAc)
	0.2 mM Phenazinmethosulfat (PMS)

\* 0.6 M ZnAc ist nur im Dunkeln für 24 h haltbar. Vor Gebrauch wurden die zwei Lösungen zum Stop-Mix gemischt (0.6 M ZnAc : 0.2 mM PMS = 1:3 (v/v)).

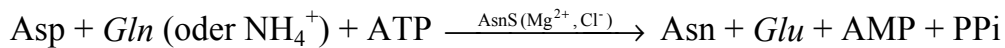
<i>Farbmix*:</i>	1% (w/v) Sulfanilamid in 2 N HCl
	0.02% (w/v) N-Naphthylethylendiamindihydrochlorid

\* Vor Gebrauch wurden gleiche Volumina der zwei Lösungen zum Farbmix gemischt (Hagemann und Reed, 1980).

#### 2.14.2 Asparagin-Synthetase (AsnS) (modifiziert nach Lohaus 1995, Bükler 2000)

Hierbei wurde die AsnS-Aktivität von den Proben der Rapstransformanten mit Asparagin-Synthetase A (AsnA) aus *E. coli* (siehe 2.1.4.) bestimmt.



**Meßprinzip:**

In *E. coli* gibt es zwei unterschiedliche AsnS-Formen: Eine ist  $\text{NH}_4^+$ -abhängig und wird von dem Gen *asnA* codiert (Nakamura et al. 1981); die andere ist Gln-abhängig und wird von *asnB* codiert (Scofield et al. 1990). Obwohl die bislang untersuchten Asparagin-Synthetasen aus Pflanzen Gln-abhängig waren, konnten die meisten davon *in vitro* unter einer hohen  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration die Synthese von Asn katalysieren (Shi et al. 1997).

AsnS ist wie Nitrat-Reduktase ein sehr instabiles und sensitives Enzym, was bei der Durchführung der Experimente berücksichtigt werden mußte. Die Aktivität wurde durch die Asn-Bildung gemessen, die mittels des HPLC-Systems bestimmt wurde.

**Probenextraktion:**

Blatt- und Wurzelmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in Mikro-Reagiergefäße überführt. Nach dem Auftauen auf Eis wurde der Extraktionspuffer mit einem Verhältnis von ca. 1:4 (w/v) zugegeben und durchgemischt. Das Homogenat wurde bei 5000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand auf eine Sephadex G-25 Säule aufgetragen. Durch eine 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C wurde das Säuleneluat in anhängende Micro-Reagiergefäße gesammelt und nach der Volumenbestimmung für den Enzymtest verwendet.

**Extraktionspuffer:**

1) <i>Extraktionspuffer ohne Additive:</i>	50 mM	Hepes-KOH (pH 7.8)
	10% (v/v)	Glycerin
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	0.1% (v/v)	Triton-X 100

2) <i>Additive</i> (frisch zugeben):	25 mM	2-Mercaptoethanol
	1 mM	DTT
	1 mM	Aminooxyacetat
	2 mM	Benzamidin
	2 mM	Aminocapronat
	0.5 mM	PMSF
	1 mM	ATP
	1 mM	Asp

#### Vorbereitung der Sephadex G-25 Säule:

Die Sephadex G-25 Säulen (Amersham Pharmacia columns PD-10) wurden vor dem Auftragen der Proben mit 25-30 ml Extraktionspuffer ohne Additive äquilibriert und für 5 min bei 1000 rpm leer zentrifugiert.

Durch die Sephadex G-25 Säule wurde das Enzym von störenden Substanzen wie z. B. ATP abgetrennt.

#### Testansatz:

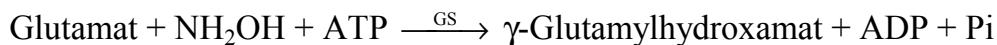
200 µl Reaktionsmedium (+/- ATP) wurde mit 50 µl Probe versetzt und bei 30°C inkubiert. Nach 0 min, 15 min, und 30 min wurde die Reaktion mit 40 µl 72% HClO<sub>4</sub> (10% Endkonzentration) gestoppt und für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurde

<i>Reaktionsmedium</i> (frisch ansetzen):	<u>mit ATP</u>	<u>ohne ATP</u>
5 mM Asp	+	+
5 mM Gln oder 5 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Cl	+	+
1 mM DTT	+	+
1 mM Aminooxyacetat	+	+
2 mM Benzamidin	+	+
2 mM Aminocapronat	+	+
0.5 mM PMSF	+	+
5 mM ATP	+	-

der Ansatz mit 1 M  $K_2HPO_4$ -5 M KOH (ca. 80  $\mu$ l) neutralisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis und einer anschließenden 5 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm wurde der Überstand für die Bestimmung der Asn-Konzentration verwendet.

### 2.14.3 Glutamin-Synthetase (GS) (modifiziert nach Shapiro und Stadtman 1970)

Meßprinzip:



Das entstandene  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat (L-glutamic acid- $\gamma$ -monohydroxamate) bildet mit  $Fe^{3+}$ -Ionen einen bräunlichen Farbkomplex, der ein Absorptionsmaximum bei 535 nm besitzt.

Probenextraktion:

<i>Extraktionspuffer:</i>	50 mM	Hepes-KOH (pH 7.4)
	10% (v/v)	Glycerin
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	0.1% (v/v)	Triton-100
	25 mM	2-Mercaptoethanol*
	1 mM	DTT*
	2 mM	Benzamidin*
	2 mM	Aminocapronat*
	0.5 mM	PMSF*

\* Diese Substanzen wurden frisch zugegeben.

Blatt- und Wurzelmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und ca. 200 mg in Micro-Reagiergefäße eingewogen. Dann wurde 1 ml Extraktionspuffer zugesetzt und durchgemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand für den Enzymaktivitätstest verwendet.

Testansatz (1 ml):

<i>Reaktionsmedium</i> (550 $\mu$ l):	<u>mit ATP</u>	<u>ohne ATP</u>
50 mM Hepes-KOH (pH 7.4)	+	+
10 mM MgCl <sub>2</sub>	+	+
1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	+	+
10 mM Hydroxylamin (NH <sub>2</sub> OH)	+	+
100 mM Na-Glutamat*	+	+
10 mM ATP*	+	-

\* Diese Substanzen wurden frisch zugegeben.

Nach 5 min Vorinkubation der Reaktionsmedien bei 37°C wurden 20  $\mu$ l Probe zugegeben und weiter bei 37°C für 15-30 min inkubiert. Durch Zugabe von 430  $\mu$ l Farbmix wurde die Reaktion abgestoppt. Nach einer 2 minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Extinktion des Überstandes bei 535 nm bestimmt. Die Gehalte an  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat wurden durch eine parallel gemessene Eichgerade (0-1.2  $\mu$ mol  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat) bestimmt. Die Ansätze ohne ATP-Zugabe dienten als Blindwerte.

<i>Farbmix:</i>	370 mM FeCl <sub>3</sub>
	667 mM HCl
	200 mM Trichloressigsäure

## 2.15 Bestimmung der photosynthetischen Aktivität

Die photosynthetische Aktivität wurde mittels eines tragbaren Gaswechsellporometers (LCA3, Fa. ADC, Hoddesdon, Großbritannien) gemessen.

## 2.16 Auswertung der durchgeführten Experimente

Die angegebenen Ergebnisse geben einen typischen Verlauf aller durchgeführten Experimente oder zusammengefaßte Ergebnisse wieder. Im letzteren

Fall werden der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (SD) als mittlerer Fehler der Einzelmessungen ( $x_i$ ) angegeben. Alle Experimente wurden mit einer Stichprobe von mindestens  $n=3$  durchgeführt, wenn dies im Text nicht anders angegeben ist.

$$\text{Mittelwert } (\bar{x}) = \frac{\sum \text{Einzelmessungen}}{\text{Anzahl der Einzelmessungen}}$$

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

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Rapsgenotypen untersucht, die einen breiten genetischen Ursprung (Hybride, ältere Sorten, heutige Linien, neuere Zuchtstämme, Resynthese-Linien, transgene Pflanzen) hatten und unter unterschiedlichen Bedingungen (Feldanzucht, Gewächshaus) angezogen wurden. Das Ziel war es, a) an einem sehr breiten Winterraps-Material das Ausmaß der genetischen Variation für die N-Effizienz und die damit zusammenhängenden Parameter zu erfassen, und b) die Auswirkung der genetischen Veränderungen der N-Assimilationsenzyme (Glutaminsynthetase oder Asparaginsynthetase) in transgenen Pflanzen zu untersuchen.

#### 3.1 Feldversuch mit unterschiedlichen Stickstoff-Düngungsstufen

Die N-Effizienz von Sommerraps wurde unter Feldbedingungen in Kanada (Grami und LaCroix 1977) und Australien (Yau und Thurling 1987) untersucht. Grami und LaCroix (1977) verglichen zwei Sorten mit unterschiedlichem Proteingehalt in den Samen. Yau und Thurling (1987) untersuchten 40 Sorten unter drei N-Stufen und fanden signifikante Sortenunterschiede für die N-Nutzungs- und N-Aufnahme-Effizienz. Die Ergebnisse dieser an Sommerraps durchgeführten Arbeiten lassen grundsätzlich erwarten, daß auch in europäischem Winterraps eine erhebliche Variation der N-Effizienz gefunden werden kann. Ergebnisse aus Feldversuchen zur genetischen Variation der N-Effizienz von Winterraps sind allerdings, abgesehen von einem kurzen Kongreßbericht (Voskerusa 1974), bisher aus der Literatur nicht bekannt.

Deshalb wurden in den Jahren 1997, 1998 und 1999 Blattmaterialien von zahlreichen Winterrapsgenotypen, die im Feldversuch mit verschiedenen N-Düngungen (N=0, 100 und 240 kgN/ha) angebaut wurden, während der Lichtperiode geerntet und analysiert. Zu den Genotypen gehörten heutige Linien, Hybride, Resynthese-Linien, neue Zuchtstämme und ältere Sorten. Die Ergebnisse werden im folgenden zusammengefaßt. Dabei wird der Zusammenhang von Blatt- und Samenparametern besonders berücksichtigt.

### 3.1.1 Auswirkung der N-Düngung auf den Blatt- und Kornmetabolismus von Winterraps im Feldversuch

In Tabelle 3-1 sind die Auswirkungen der N-Düngungsstufen auf die Winterrapspflanzen zusammengefaßt. Auf Grund unterschiedlicher Umweltfaktoren (Boden, Klima, Grundwasser, usw.) schwanken die Werte zwischen verschiedenen Versuchsjahren. Dennoch lassen sich verschiedene Tendenzen aufzeigen. Die untersuchten Genotypen unter höherer Düngungsstufe hatten insgesamt einen höheren Nitratgehalt, eine höhere Nitratreduktase-Aktivität und Aminosäurekonzentration im Blatt bzw. einen höheren Proteingehalt und N-Ertrag im Samen. Die Summe C (aus Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose, Malat und freien Aminosäuren) im Blatt ist unter N=100 kgN/ha am höchsten und unter N=240 kgN/ha am niedrigsten. Im Vergleich mit N=0 kgN/ha steigt die  $\Sigma$ Aminosäuren im Blatt bei N=240 kgN/ha um 61%, der Proteingehalt im Samen um 19% und der N-Ertrag im Samen um 77%. Dagegen sank der N-Ernte-Index (Anteil des Stickstoffs im Samen im Verhältnis zum Stickstoff in der Gesamtpflanze) mit der Erhöhung der Düngungsstufe. Unter höherer Düngungsstufe wie 240 kgN/ha wurde der Stickstoff mehr in den vegetativen Teilen abgelagert.

**Tabelle 3-1.** Auswirkung der N-Düngungsstufen auf die Winterrapspflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller untersuchten Genotypen aus drei Versuchsjahren.

Düngungsstufe (kgN/ha)	<u>N=0</u>	<u>N=100*</u>	<u>N=240</u>
Nitratgehalt im Blatt ( $\mu\text{mol/g FG}$ )	0.6 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.9	18.5 $\pm$ 17.3
NR-Aktivität im Blatt (nmol Nitrit/g FG/min)	38.3 $\pm$ 8.0	**	59.4 $\pm$ 15.7
$\Sigma$ Aminosäuren im Blatt ( $\mu\text{mol/g FG}$ )	6.4 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.1	10.3 $\pm$ 3.0
Summe C im Blatt ( $\mu\text{mol/g FG}$ )	622 $\pm$ 132	931 $\pm$ 192	470 $\pm$ 211
Proteingehalt im Samen (%)***	18.1 $\pm$ 1.9	20.0 $\pm$ 0.6	21.5 $\pm$ 1.2
N-Ertrag im Samen (kgN/ha)***	87 $\pm$ 24	112 $\pm$ 30	154 $\pm$ 27
N-Ernte-Index (%)***	73.7 $\pm$ 3.3	68.6 $\pm$ 9.3	66.0 $\pm$ 6.8

\* N=100 wurde nur im Jahr 1997 durchgeführt (Tab. 2-1).

\*\* nicht bestimmt

\*\*\* Daten von B. Kessel (im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts)

### 3.1.2 Aminosäuremuster im Blatt der Winterraps-Genotypen

Viele Pflanzen zeigen bestimmte Aminosäuremuster, z.B. spielt Glutamat in vielen Getreidearten oder Asparagin in Leguminosen eine große Rolle. In Tabelle 3-2 ist das Aminosäuremuster im Blatt der Rapspflanzen dargestellt. Glutamat, Aspartat, Glutamin und Serin sind die Hauptaminosäuren im Blatt der Rapspflanzen. Diese Aminosäuren hatten einen Anteil von etwa 75% am Gesamtaminosäuregehalt im Blatt. Dies galt für alle drei Düngungsstufen.

**Tabelle 3-2.** Aminosäuremuster im Blatt der Rapspflanzen auf dem Feld unter drei Düngungsstufen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Genotypen aus drei Versuchsjahren.

Düngungsstufe (kgN/ha)	<u>N=0</u>	<u>N=100*</u>	<u>N=240</u>
ΣAminosäuren im Blatt (μmol/g FG)	6.4 ± 0.4	6.1 ± 0.1	10.3 ± 3.0
glu (%)	42.5	44.3	33.1
gln(%)	11.2	9.3	13.8
asp (%)	15.7	18.0	12.8
asn (%)	0.8	0.6	1.2
ser (%)	9.2	8.2	12.6
gly (%)	3.0	1.9	4.4
thr (%)	3.9	6.3	7.9
arg (%)	2.0	0.4	1.5
ala (%)	4.2	4.3	3.9
andere Aminosäuren (%)	7.5	6.7	8.7

\* N=100 wurde nur im Jahr 1997 durchgeführt (Tab. 2-1)

### 3.1.3 Genetische Varianz unter den 36 Winterraps-Genotypen

Da die Düngungsstufe N=100 kgN/ha nur im Jahr 1997 durchgeführt wurde, und nur eine Schnittmenge von 36 Genotypen in beiden Jahren 1998 und 1999 angebaut wurde, sind in den nächsten Abschnitten nur die Daten dieser 36 Genotypen, die mit zwei Düngungsstufen (N=0 und N=240 kgN/ha) und an sechs Standorten



untersucht wurden, zur Analyse der genetischen Variation der Winterraps-Genotypen zusammengefaßt. Die 36 Genotypen gliedern sich folgendermaßen auf (Tab. 3-3).

---

**Tabelle 3-3.** Gliederung der 36 Winterraps-Genotypen

---

	<u>Namen der zugeordneten Genotypen</u>
<i>Hybride:</i>	AK639, RNX9505, Joker
<i>neuer Zuchtstamm:</i>	DSV15, DP-HB-1
<i>heutige Linie:</i>	Express, Falcon, Marathon, Bristol, Lirajet, DH Samourai, Capitol, Apex, Alaska, Prospa, Mohican, Magnum, Zenith, Lisabeth, Lizard, Licord, Tarok
<i>ältere Sorte:</i>	DH Mansholts, Quedlinburger, Giessener Höhenraps, Heimer, Hektor, Janetzki Schlesischer, Lembkes Normal, Marex
<i>Resynthese-Linie:</i>	S3, S12, S27, RS1, RS3, RS6

---

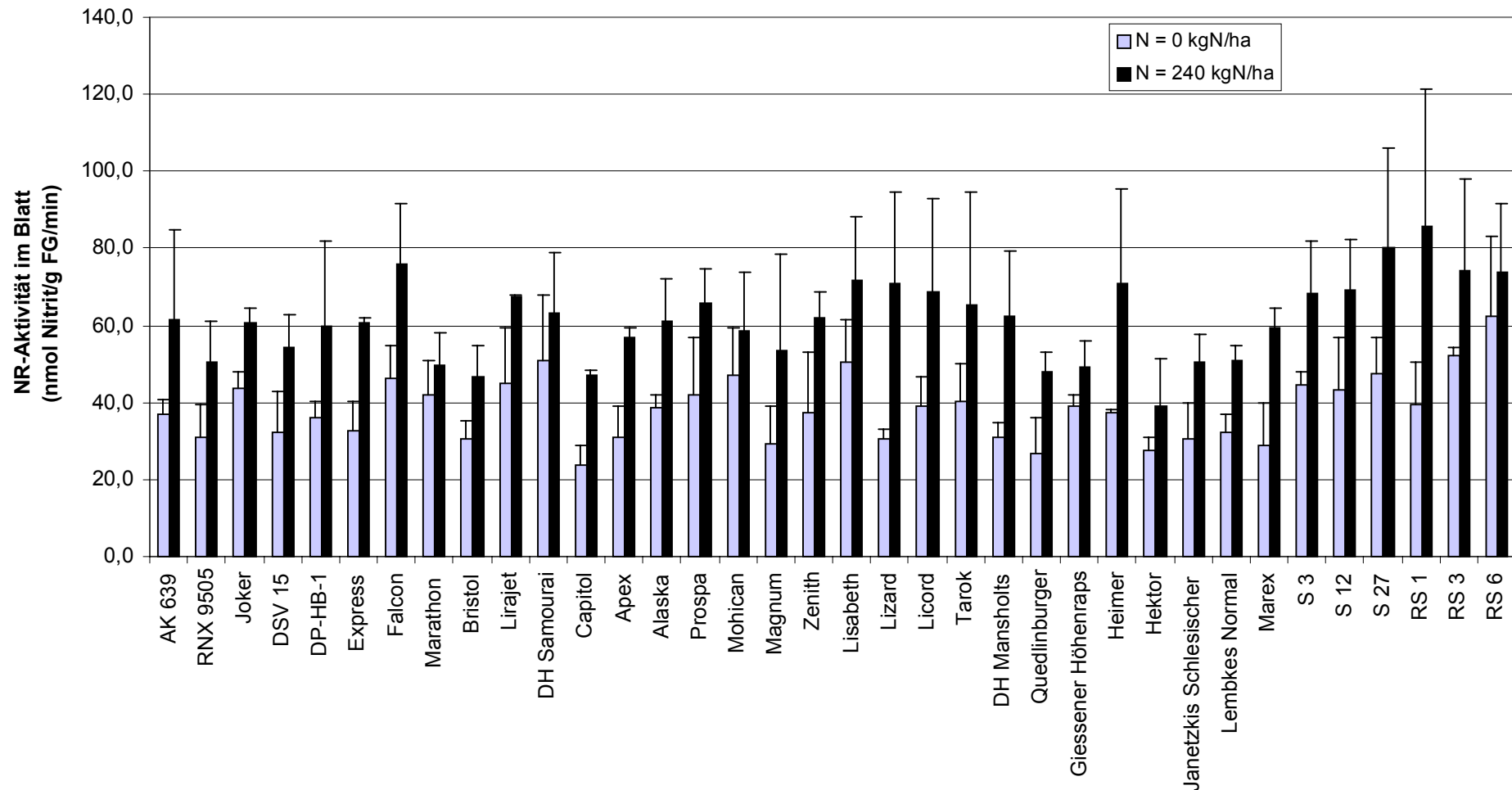
In den Abbildungen 3-1, 3-2, und 3-3 sind die Nitratreduktase-Aktivität, die Summe der freien Aminosäuren und die Summe C im Blatt jedes Genotyps dargestellt. Es zeigte sich eine breite genetische Varianz: Die Nitratreduktase-Aktivität im Blatt variierte unter N=0 kgN/ha zwischen 23.9 (Capitol) und 62.2 nmol Nitrit/g FG/min (RS6), unter N=240 kgN/ha zwischen 39.1 (Hektor) und 85.8 nmol Nitrit/g FG/min (RS1). Die Summe der freien Aminosäuren im Blatt variierte unter N=0 kgN/ha zwischen 5.1 (Apex) und 9.6 µmol/g FG (RS3), unter N=240 kgN/ha zwischen 9.9 (DP-HB-1) und 17.2 µmol/g FG (RS3). Die Summe C (aus Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose, Malat und freien Aminosäuren) im Blatt variierte unter N=0 kgN/ha zwischen 504 (RS6) und 1157 µmol/g FG (Lisabeth), unter N=240 kgN/ha zwischen 409 (DH Samourai) und 758 µmol/g FG (RS3). Unter der höheren Düngungsstufe (N=240 kgN/ha) zeigten sich höhere Nitratreduktase-Aktivitäten (durchschnittlich 160%), erhöhte Aminosäuregehalte (durchschnittlich 191%), aber weniger Kohlenhydrate (Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose und Malat; durchschnittlich 76%) im Blatt als unter der niedrigen Düngungsstufe (N=0 kgN/ha, 100%).

Im Vergleich zu den anderen Genotypen (Hybriden, neuere Zuchtstämme, heutige Linien und ältere Sorten) zeigten die Resynthese-Linien im Blatt durchschnittlich eine höhere Nitratreduktase-Aktivität und höhere Aminosäure-Gehalte. Im Samen zeigten sie einen höheren Proteingehalt aber einen niedrigeren N-Ertrag (Tab. 3-4).

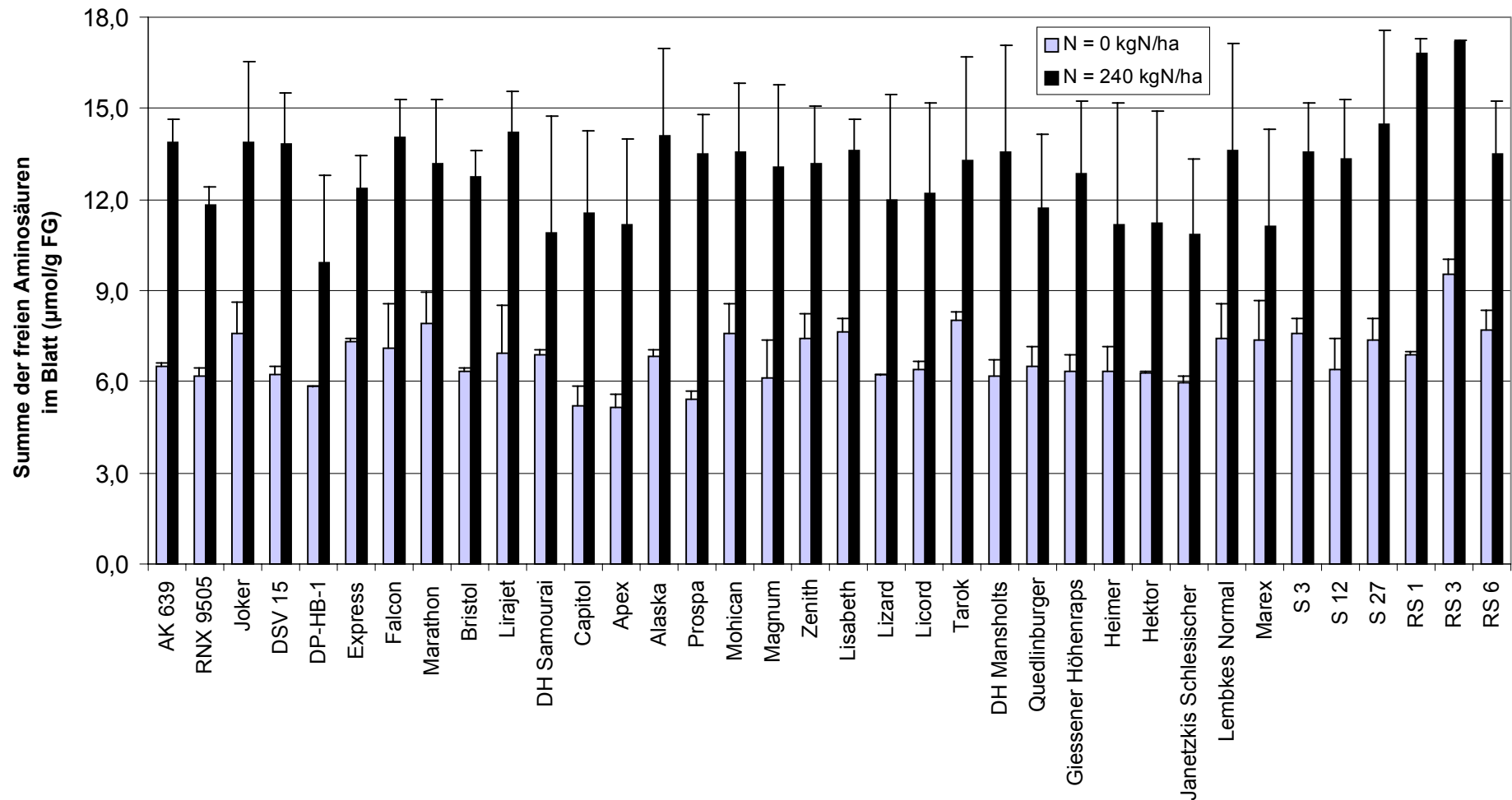
**Tabelle 3-4.** Vergleich zwischen den Resynthese-Linien und den anderen Genotypen (Hybriden, neuere Zuchtstämme, heutige Linien und ältere Sorten). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller zugehörigen Genotypen unter beiden Düngungsstufen.

	<b>Resynthese-Linien</b>	<b>andere Genotypen</b>
NR-Aktivität (nmol Nitrit/g FG/min)	61.7 ± 4.2	47.5 ± 7.1
Summe der Aminosäuren (µmol/g FG)	11.2 ± 1.1	9.6 ± 0.8
Summe C im Blatt (µmol/g FG)	640 ± 97	580 ± 79
Proteingehalt im Samen (% in TG)*	21.8 ± 1.2	19.0 ± 1.1
N-Ertrag im Samen (kgN/ha)*	115 ± 13	135 ± 12

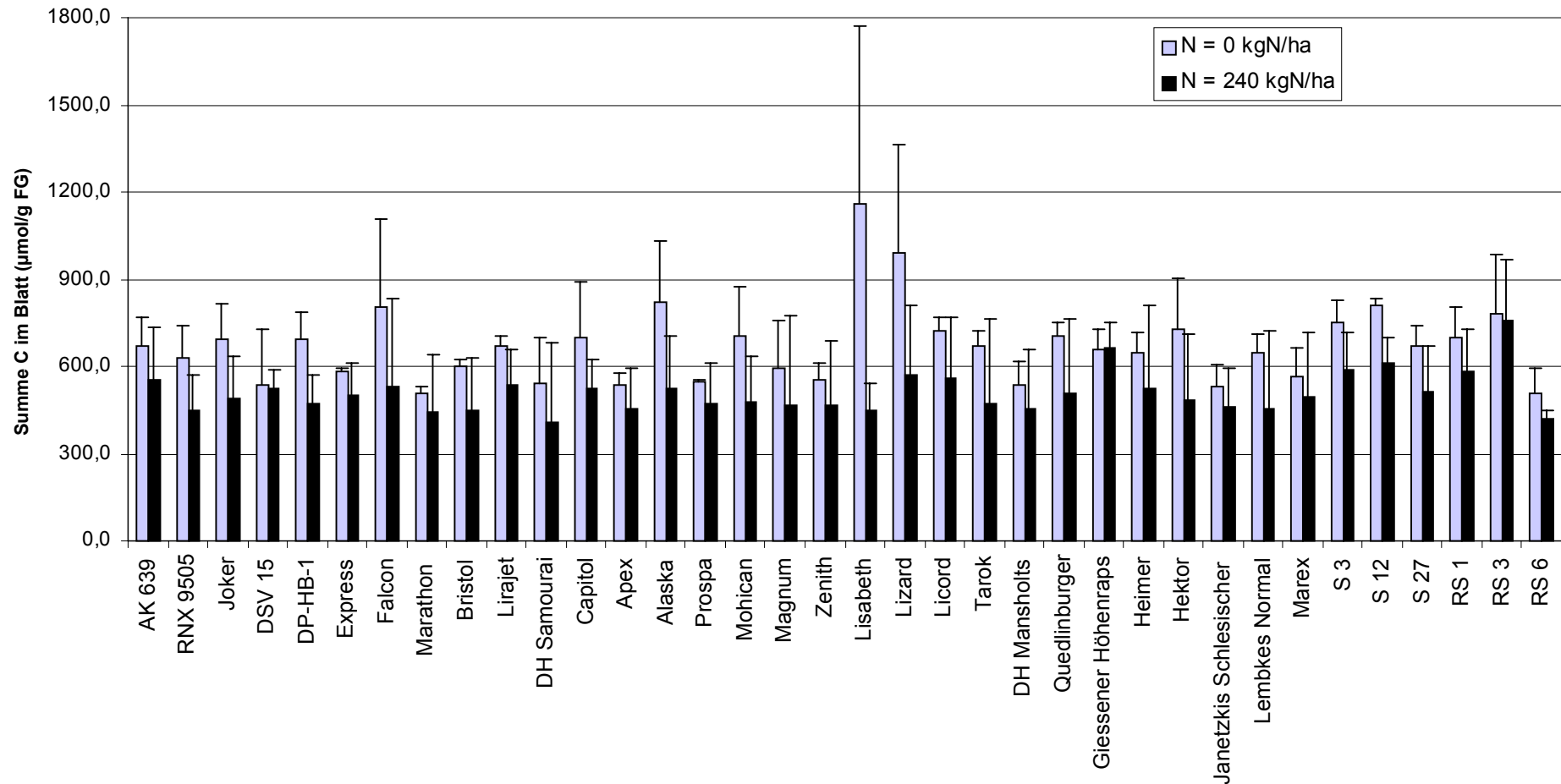
\* Daten von B. Kessel (im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts)



**Abbildung 3-1.** Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) der Nitratreduktase-Aktivität im Blatt von jedem der in den Jahren 1998 und 1999 untersuchten 36 Genotypen. Die Werte unter N=0 kgN/ha variierten zwischen 23.9 (Capitol) und 62.2 nmol Nitrit/g FG/min (RS6), unter N=240 kgN/ha zwischen 39.1 (Hektor) und 85.8 nmol Nitrit/g FG/min (RS1).



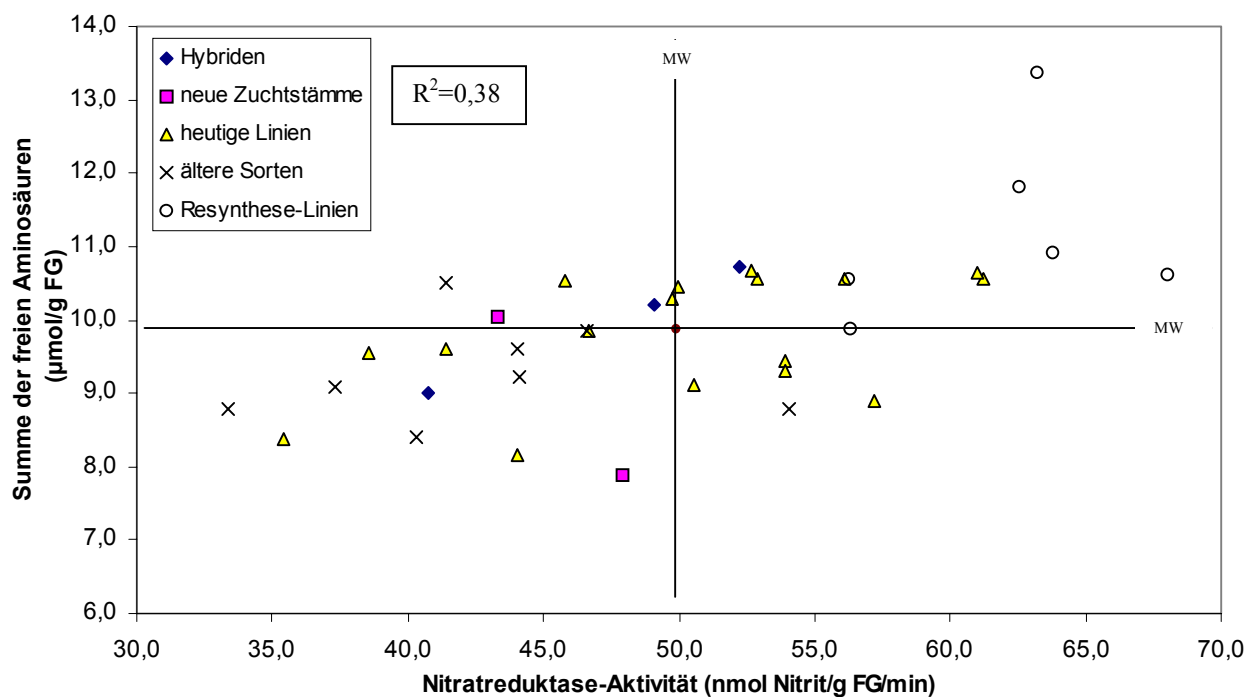
**Abbildung 3-2.** Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) der Summe der freien Aminosäuren im Blatt von jedem der in den Jahren 1998 und 1999 untersuchten 36 Genotypen. Die Werte unter N=0 kgN/ha variierten zwischen 5.1 (Apex) und 9.6 µmol/g FG (RS3), unter N=240 kgN/ha zwischen 9.9 (DP-HB-1) und 13.4 µmol/g FG (RS3).



**Abbildung 3-3.** Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) der Summe C (aus Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose, Malat und freien Aminosäuren) im Blatt von jedem der in den Jahren 1998 und 1999 untersuchten 36 Genotypen. Die Werte unter N=0 kgN/ha variierten zwischen 504 (RS6) und 1157 µmol/g FG (Lisabeth), unter N=240 kgN/ha zwischen 409 (DH Samourai) und 758 µmol/g FG (RS3).

### 3.1.4 Zusammenhang zwischen Blattmetabolismus und Proteingehalt bzw. N-Ertrag im Samen

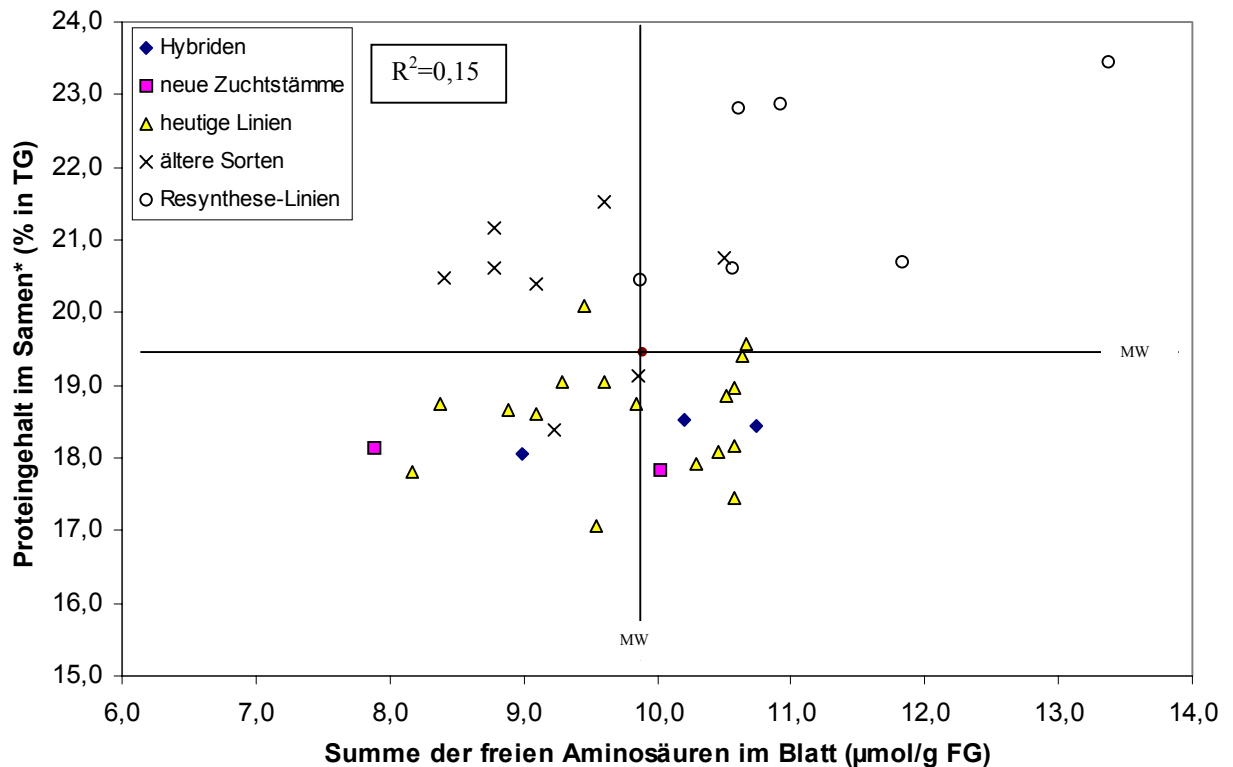
Für die 36 Winterraps-Genotypen, die in beiden Jahren 1998 und 1999 untersucht wurden, ist der Zusammenhang zwischen Blattmetabolismus und Proteingehalt bzw. N-Ertrag im Samen in den folgenden Abbildungen dargestellt. Der Wert für jeden Genotyp ist der Mittelwert aller seiner Meßwerte aus je sechs Anbauflächen unter zwei Düngungsstufen (N=0 kgN/ha und N=240 kgN/ha).



**Abbildung 3-4.** Die Nitratreduktase-Aktivität im Blatt im Verhältnis zur Summe der freien Aminosäuren im Blatt. Dargestellt sind die Daten der 36 Winterraps-Genotypen, die in den Jahren 1998 und 1999 mit insgesamt sechs Wiederholungen angebaut wurden. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus den beiden Düngungsstufen (N=0 kgN/ha und N=240 kgN/ha).

Die Nitratreduktase-Aktivität und die Summe der freien Aminosäuren zeigten eine positive Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0.38 (Abb. 3-4). Die

Summe der freien Aminosäuren im Blatt zeigte keine Korrelation zum Proteingehalt im Samen (Abb. 3-5,  $R^2=0.15$ ), zur Summe C (aus Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose, Malat und freien Aminosäuren) im Blatt (Abb. 3-6,  $R^2=0.12$ ) und zum N-Ertrag im Samen (Abb. 3-7,  $R^2=0.01$ ).

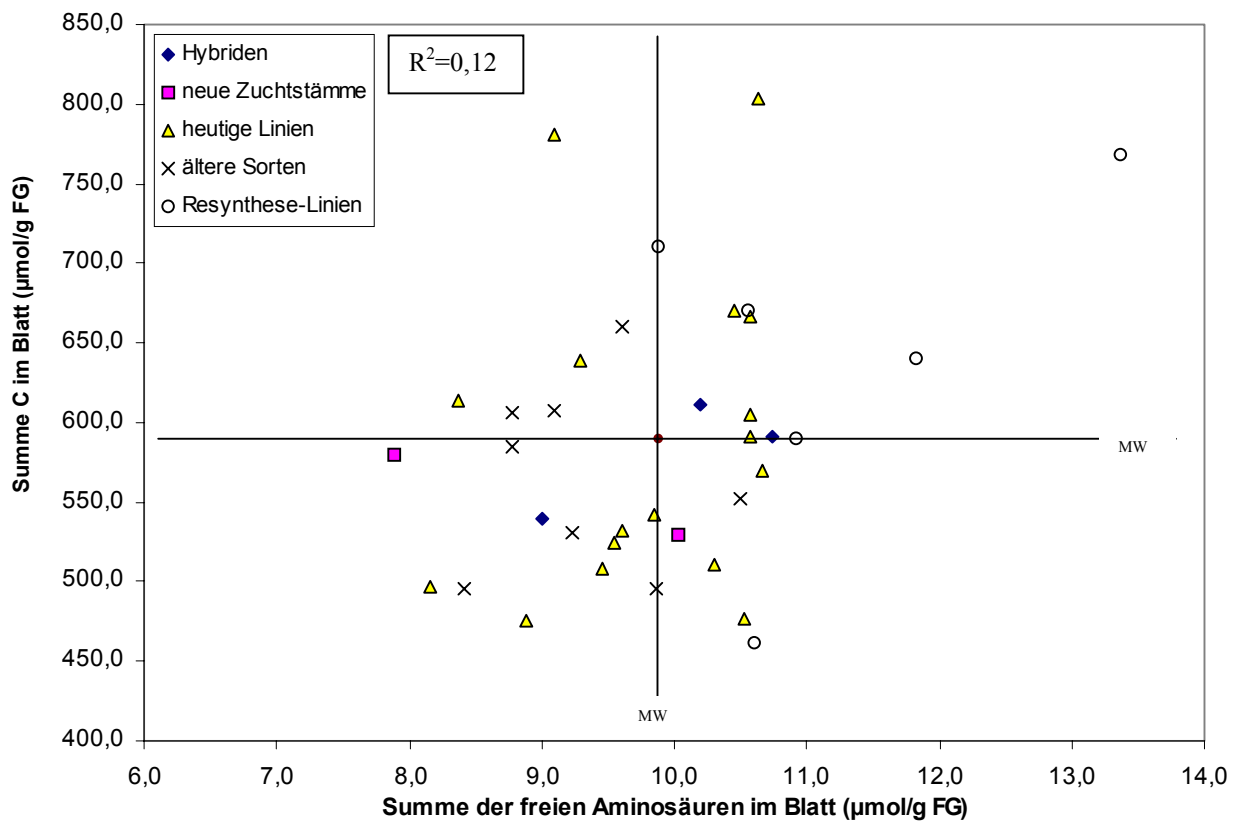


**Abbildung 3-5.** Die Summe der freien Aminosäuren im Blatt im Verhältnis zum Proteingehalt im Samen. Dargestellt sind die Daten der 36 Winterraps-Genotypen, die in den Jahren 1998 und 1999 mit insgesamt sechs Wiederholungen angebaut wurden. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus den beiden Düngungsstufen ( $N=0$  kgN/ha und  $N=240$  kgN/ha).

\* Daten von B. Kessel (im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts)

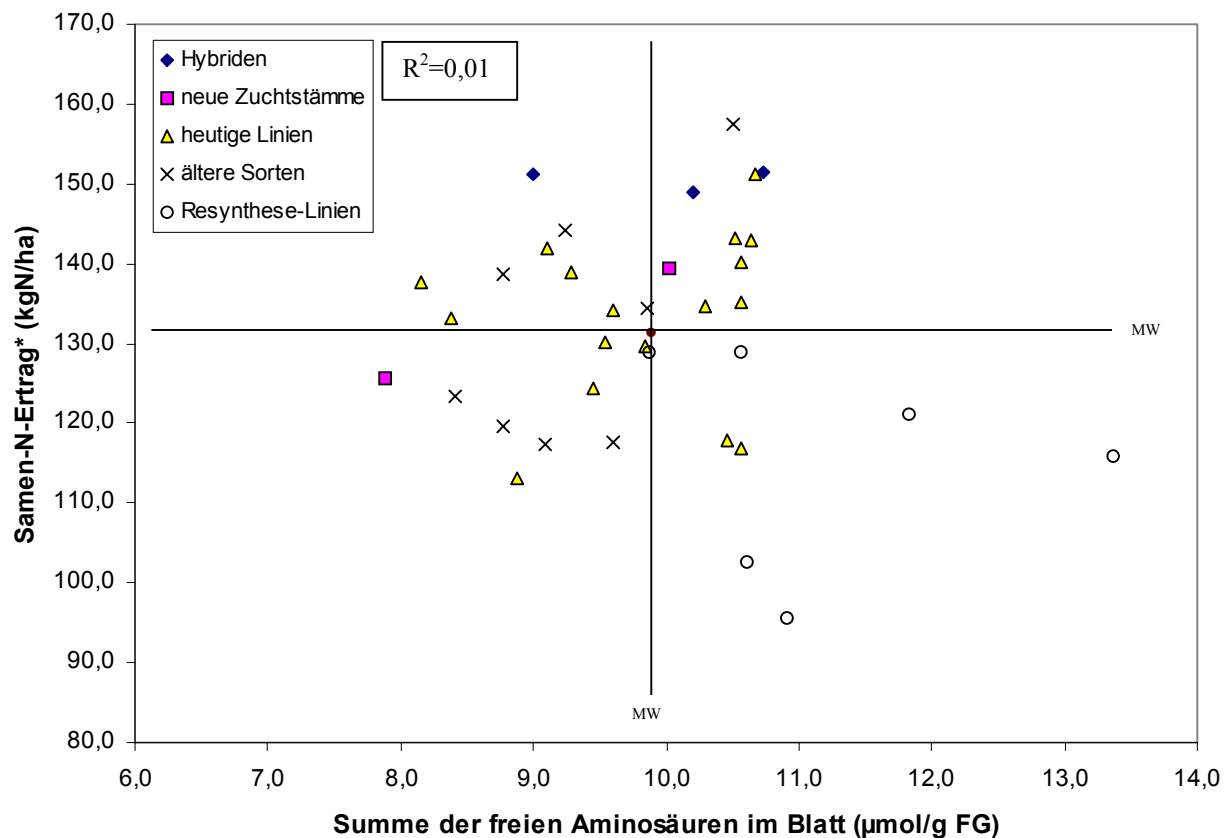
Dabei zeigten alle sechs Resynthese-Linien eine erhöhte NR-Aktivität und Gesamtaminosäure-Gehalte im Blatt sowie erhöhte Proteingehalte im Samen, aber niedrigere Samen-N-Erträge. Die Summe C war nur bei einer der sechs Resynthese-Linien unterdurchschnittlich. In den Hybriden und neuen Zuchtstämmen ist die NR-

Aktivität und die Summe C im Blatt sowie der Proteingehalt im Samen tendenziell unterdurchschnittlich, aber der Samen-N-Ertrag überdurchschnittlich. Bei den meisten älteren Sorten waren die NR-Aktivität und der Gesamtaminosäure-Gehalt im Blatt unterdurchschnittlich, aber der Proteingehalt im Samen überdurchschnittlich; während die Summe C im Blatt und der Samen-N-Ertrag gleichmäßig verteilt wurden. Bei den heutigen Linien zeigte sich keine einheitliche Tendenz bei der NR-Aktivität, im Gesamtaminosäure-Gehalt und in der Summe C im Blatt sowie im Samen-N-Ertrag und im Proteingehalt im Samen.



**Abbildung 3-6.** Die Summe der freien Aminosäuren im Blatt im Verhältnis zur Summe C (aus Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose, Malat und freien Aminosäuren) im Blatt. Dargestellt sind die Daten der 36 Winterraps-Genotypen, die in den Jahren 1998 und 1999 mit insgesamt sechs Wiederholungen angebaut wurden. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus den beiden Düngungsstufen (N=0 kgN/ha und N=240 kgN/ha).





**Abbildung 3-7.** Die Summe der freien Aminosäuren im Blatt im Verhältnis zum N-Ertrag im Samen. Dargestellt sind die Daten der 36 Winterraps-Genotypen, die in den Jahren 1998 und 1999 mit insgesamt sechs Wiederholungen angebaut wurden. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus den beiden Düngungsstufen (N=0 kgN/ha und N=240 kgN/ha).

\* Daten von B. Kessel (im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts)

### 3.2 Gewächshaus-Versuch mit 8 ausgewählten Winterraps-Genotypen

Bei Raps ist über den Zusammenhang von Aminosäuregehalten im Blatt, Stickstoff-Transport im Phloem und Proteinspeicherung im Samen bisher aus der Literatur noch wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden aus den im Versuchsjahr 1997 auf dem Feld angebauten Genotypen acht (Apex, Bristol, DP-HB-1, Express, Falcon, Lirajet, RS3 und S27) ausgewählt, um den Einfluß von Aminosäuregehalten im Blatt und in Wurzeln, sowie dem Stickstoff-Transport im Phloem und im Xylem auf die Proteinspeicherung im Samen genauer zu untersuchen. Die Sortenauswahl beruht

auf den Ergebnissen von B. Kessel (2000) zum Proteingehalt im Samen (Tab. 3-5): Die Genotypen Apex, Bristol, DP-HB-1, Express, Falcon und Lirajet zeigten unter beiden Düngungsstufen (100 und 240 kgN/ha) im Jahre 1997 sowie in anderen Versuchsjahren deutlich niedrigere Proteingehalte im Samen als RS3 und S27. Die Pflanzen dieser acht Genotypen wurden auf Hydrokultur im Gewächshaus mit zusätzlicher Belichtung angezogen. Die Nährlösung enthielt entweder 0.5 mM oder 4 mM  $\text{NO}_3^-$ . Das unterschiedliche N-Angebot wurde gewählt, da bereits Gerath und Schweiger (1991) sehr große Unterschiede in der Reaktion auf die N-Versorgung bei Winterraps beobachteten. Blatt- und Wurzelmaterialien wurden am Ende der Licht- und Dunkelperioden geerntet; Phloemsaft- und Xylemsaftproben wurden während der Lichtperioden gesammelt.

Tabelle 3-5. Proteingehalt im Samen\* der 8 ausgewählten Genotypen bei 3 Düngungsstufen in allen 3 Versuchsjahren. Die Einheit ist *Protein in % vom Trockengewicht (TG)*.

	<i>0 kgN/ha</i>		<i>100 kgN/ha</i>	<i>240 kgN/ha</i>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
	<u>1998</u>	<u>1999</u>	<u>1997</u>	<u>1997</u>	<u>1998</u>	<u>1999</u>		
Apex	16.8	14.7	18.7	20.9	20.3	19.4	18.5	2.1
Bristol	17.0	14.0	17.5	20.0	18.9	18.4	17.6	1.9
DP-HB-1	17.5	16.0	18.1	19.9	21.1	18.0	18.4	1.6
Express	17.2	15.9	18.5	21.1	22.4	19.4	19.1	2.2
Falcon	19.2	15.6	18.7	19.6	21.7	19.4	19.0	1.8
Lirajet	17.5	14.1	17.9	19.3	21.8	19.3	18.3	2.3
RS 3	23.5	20.5	23.6	24.8	25.5	24.3	23.7	1.6
S 27	23.6	19.6	22.9	23.2	24.4	24.0	22.9	1.6

\* Daten von B. Kessel (im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts)

### 3.2.1 Metabolismus in verschiedenen Pflanzenteilen der Winterraps-Genotypen im Gewächshaus

Verschiedene Pflanzenteile unterscheiden sich in ihren Funktionen sowie ihrem Metabolismus. Daher wurden Proben aus den Blättern bei drei Altersphasen (junges Blatt, „source“-Blatt und altes Blatt), aus den Wurzeln sowie aus Phloem- und

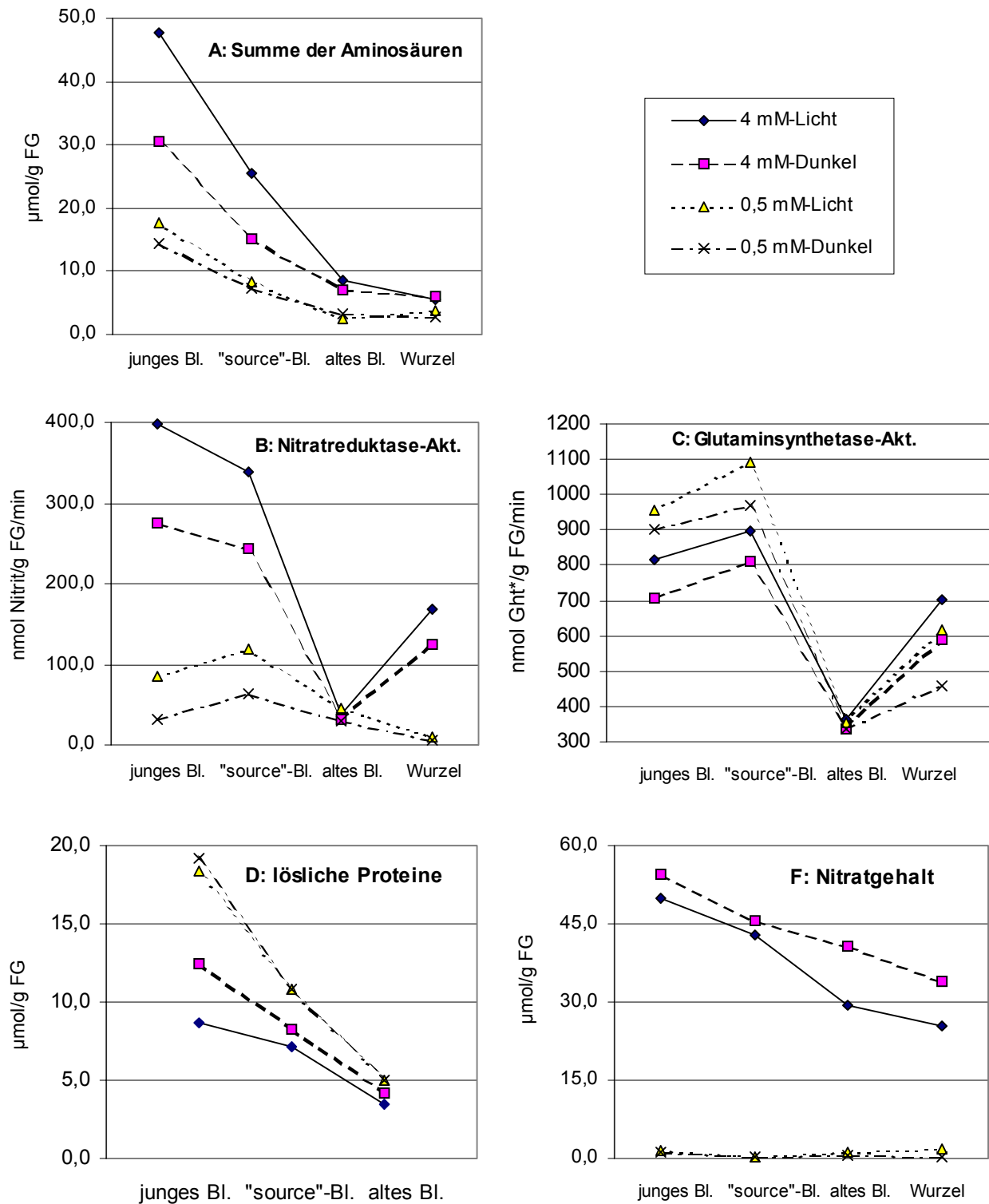
Xylemsaft analysiert. Die ausgewählten acht Genotypen zeigten im Gewächshaus in Hydrokultur nicht solche großen Unterschiede, wie sie bei Pflanzen aus den Feldversuchen beobachtet wurden. Daher sind im folgenden die gemittelten Werte der acht ausgewählten Genotypen dargestellt.

### **3.2.1.1 N-Metabolismus in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln**

Wie in Abbildung 3-8-A gezeigt, ist die Summe der freien Aminosäuren in den jungen Blättern am höchsten, gefolgt von den „source“-Blättern und am niedrigsten in den Wurzeln. Unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  haben die Pflanzen mehr freie Aminosäuren als unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$ , aber in den alten Blättern und den Wurzeln ist dies nicht so deutlich wie in den jungen und „source“-Blättern. Am Ende der Lichtperiode haben die Pflanzen mehr freie Aminosäuren als am Ende der Dunkelperiode.

Die Nitratreduktase-Aktivität (Abb. 3-8-B) ist in den Pflanzen unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  höher als unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  bzw. während der Lichtperiode höher als während der Dunkelperiode. In den alten Blättern ist die Aktivität nicht abhängig von den Nitratbedingungen sowie vom Licht/Dunkel-Wechsel. Unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  ist die NR-Aktivität in den jungen Blättern am höchsten und in den alten Blättern am niedrigsten, während sie unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  in den „source“-Blättern am höchsten und in den Wurzeln am niedrigsten ist.

Die Glutaminsynthetase-Aktivität (Abb. 3-8-C) ist in den „source“-Blättern am höchsten, während sie in den alten Blättern am niedrigsten ist. Der Licht/Dunkel-Wechsel und die N-Ernährung beeinflussen die Aktivität nicht sehr stark. Im Vergleich mit 4 mM  $\text{NO}_3^-$  ist die Enzymaktivität unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  in den Blättern höher, aber in Wurzeln niedriger. Ähnlich wie die Nitratreduktase-Aktivität ist die Glutaminsynthetase-Aktivität während der Lichtperiode erhöht.



**Abbildung 3-8.** Stickstoff-Metabolismus in den jungen, "source" und alten Blättern sowie in den Wurzeln der ausgewählten Rapsgenotypen bei Nitrat-Ernährung. Dargestellt sind die gemittelten Werte aller acht Genotypen (n=4).

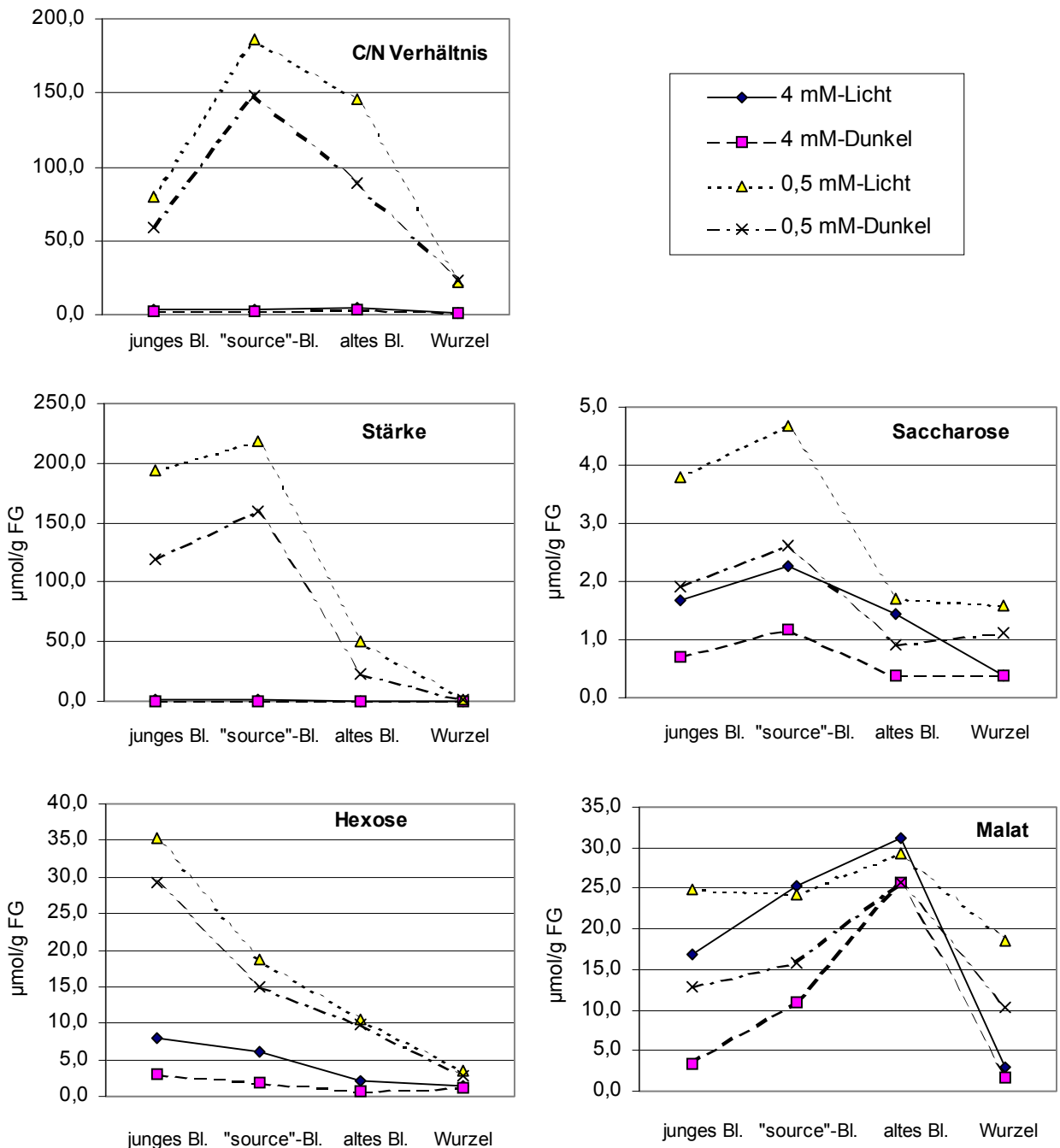
\* Ght =  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat

Der Gehalt der löslichen Proteine (Abb. 3-8-D) ist in jungen Blättern am höchsten und in den alten Blättern am niedrigsten. Am Ende der Dunkelperiode ist der Gehalt der löslichen Proteine in der Pflanze leicht erhöht im Vergleich zum Ende der Lichtperiode.

Der Nitratgehalt (Abb. 3-8-F) in der Pflanze ist unter  $0.5 \text{ mM NO}_3^-$  sehr gering ( $0.2\text{-}3.0 \text{ }\mu\text{mol/g FG}$ ), während er unter  $4 \text{ mM NO}_3^-$   $25\text{-}60 \text{ }\mu\text{mol/g FG}$  beträgt. Dabei ist der Gehalt in den jungen Blättern am höchsten und in den Wurzeln am niedrigsten. Die Pflanzen unter  $4 \text{ mM NO}_3^-$  haben sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln am Ende der Dunkelperiode mehr Nitrat als am Ende der Lichtperiode.

### **3.2.1.2 C-Metabolismus in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln**

Die gemittelten Werte der Kohlenstoff-Gehalte (Stärke, Saccharose, Hexosen und Malat) von allen acht Genotypen wurden in Abbildung 3-9 dargestellt. Rapspflanzen enthalten am Ende der Lichtperiode mehr Stärke, Saccharose, Hexosen und Malat als am Ende der Dunkelperiode. Die Unterschiede sind in alten Blättern und in Wurzeln nicht so ausgeprägt. Die Gehalte der C-Verbindungen in den Wurzeln sind am niedrigsten. Der Gehalt von Stärke oder Saccharose ist in „source“-Blättern am höchsten, während der von Hexosen in den jungen Blättern oder von Malat in den alten Blättern am höchsten ist. Die Pflanzen unter  $4 \text{ mM NO}_3^-$  haben weniger Kohlenhydrate als die unter  $0.5 \text{ mM NO}_3^-$ , mit Ausnahme des Malatgehalts in den „source“ und in den alten Blättern. Daraus ergibt sich, daß die Pflanzen unter  $0.5 \text{ mM NO}_3^-$  ein sehr viel höheres C/N Verhältnis haben als unter  $4 \text{ mM NO}_3^-$ .

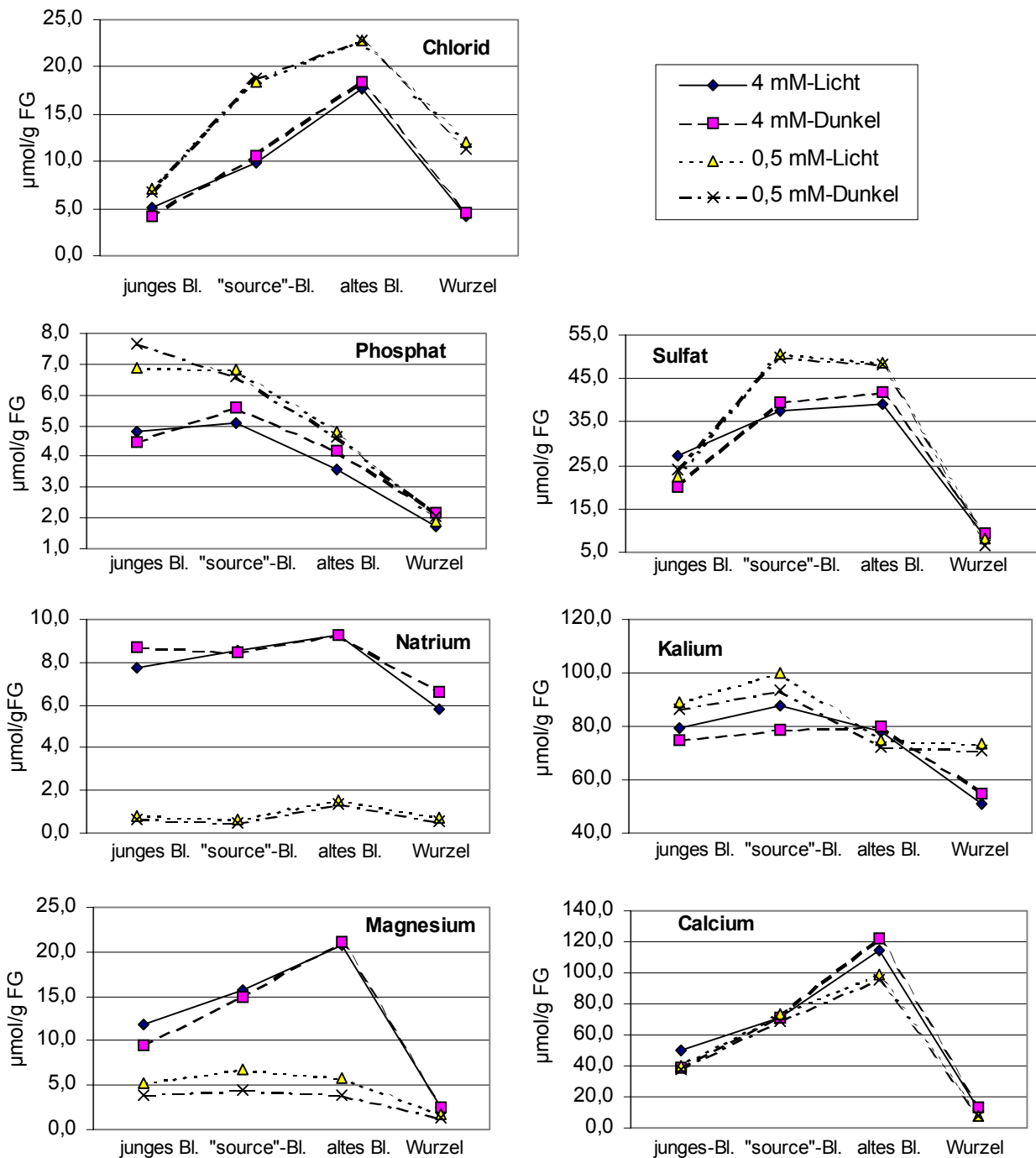


**Abbildung 3-9.** Kohlenhydrat-Gehalte in den jungen, "source" und alten Blättern sowie in den Wurzeln der ausgewählten Rapsgenotypen bei Nitrat-Ernährung. Dargestellt sind die gemittelten Werte aller acht Genotypen (n=4).

### 3.2.1.3 Ionenkonzentrationen in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln

Im Gegensatz zu den Metabolit-Gehalten zeigen die anorganischen Ionen in den Pflanzen keinen einheitlichen diurnalen Rhythmus (Abb. 3-10). Die Pflanzen unter 4

mM  $\text{NO}_3^-$  haben mehr Natrium und Magnesium, aber weniger Chlorid, Phosphat, Sulfat und Kalium als die unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$ . Obwohl die 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$ -Nährlösung weniger Calcium enthielt, hat es ein ähnliches Niveau unter beiden Nitratbedingungen (Tab. 2-5).



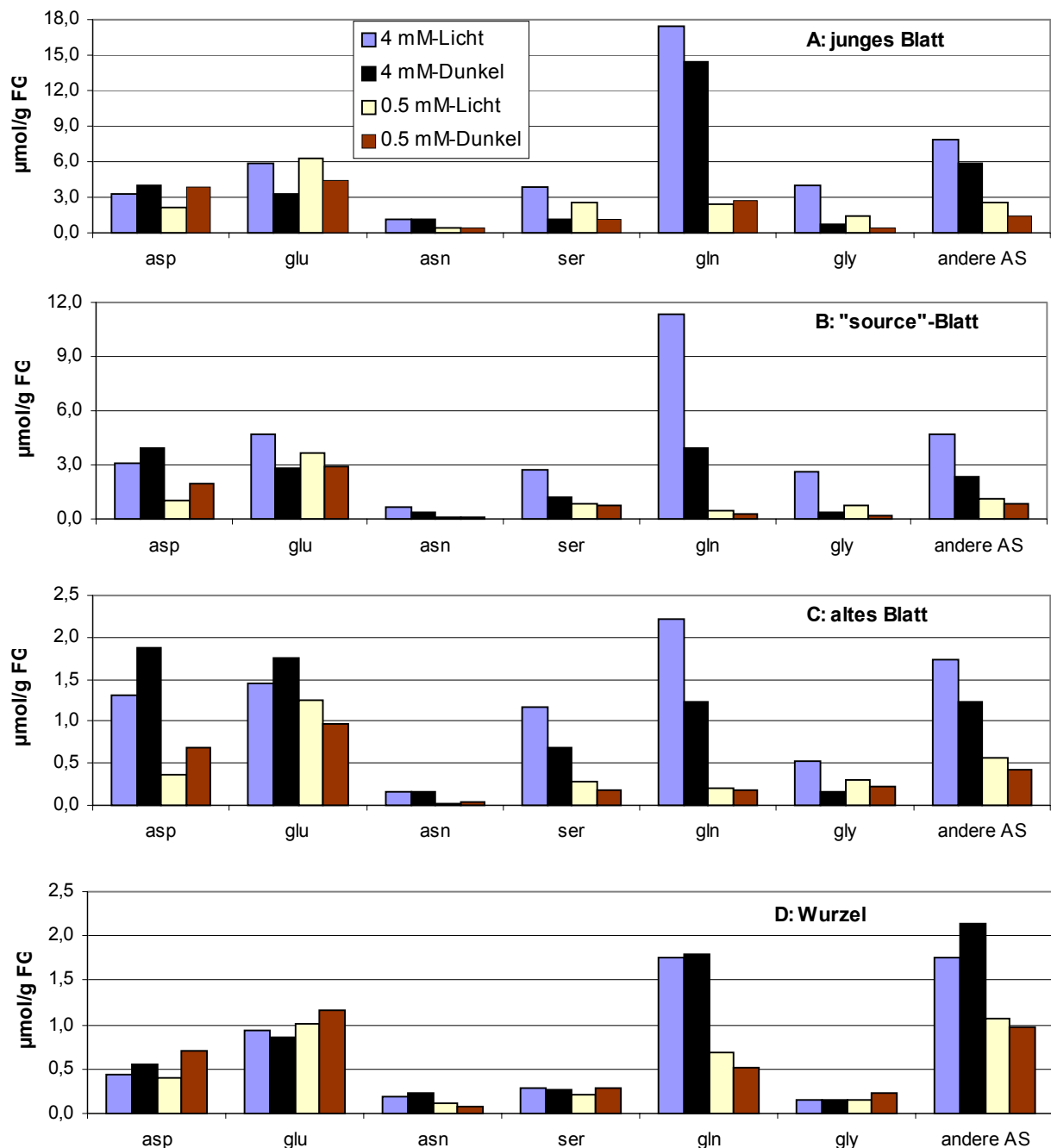
**Abbildung 3-10.** Ionenkonzentrationen in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln der ausgewählten Rapsgenotypen bei Nitrat-Ernährung. Dargestellt sind die gemittelten Werte aller acht Genotypen (n=4).

Die Verteilungsmuster der Ionen in den Pflanzenteilen sind sehr unterschiedlich: Der Chlorid-Gehalt ist in den alten Blättern am höchsten und in den jungen Blättern am niedrigsten. Der Phosphat-Gehalt ist in den jungen Blättern unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  oder in den „source“-Blättern unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  am höchsten und in den Wurzeln am niedrigsten. Der Sulfat-Gehalt ist in den „source“-Blättern bei 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  oder in den alten Blättern bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  am höchsten, und in den Wurzeln am niedrigsten. Der Natrium-Gehalt ist in den vier unterschiedlichen Pflanzenteilen jeweils ähnlich. Der Kalium-Gehalt ist in den „source“-Blättern am höchsten und in den Wurzeln am niedrigsten. Der Magnesium-Gehalt ist in den alten Blättern bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  und in den „source“-Blättern bei 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  am höchsten, und in den Wurzeln am niedrigsten. Der Calcium-Gehalt ist in den alten Blättern am höchsten und in den Wurzeln am niedrigsten.

#### **3.2.1.4 Aminosäuremuster in den jungen, „source“ und alten Blättern sowie in den Wurzeln**

In Abbildung 3-11 wurden die gemittelten Werte der Aminosäuregehalte in den Pflanzenteilen unter verschiedenen Bedingungen dargestellt. Wie schon bei den Feldversuchen zeigt sich, daß unter Gewächshaus-Bedingungen Glutamat, Glutamin, Aspartat und Serin die Hauptaminosäuren in den Rapspflanzen sind. Die Aminosäuremuster sind sehr unterschiedlich zwischen den Pflanzenteilen und zwischen den beiden Stickstoff-Niveaus: Am Ende der Lichtperiode ist unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  der Glutamin-Gehalt, aber unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  der Glutamat-Gehalt bei allen vier Pflanzenteilen am höchsten. Im Vergleich mit den jungen und den „source“-Blättern sind die Anteile der anderen Aminosäuren (thr, arg, ala, gaba, tyr, val, met, trp, ile, phe, leu und lys) in den alten Blättern und den Wurzeln erhöht. Am Ende der Dunkelperiode ist das Aminosäuremuster anders als am Ende der Lichtperiode, zeigt aber keine einheitliche Tendenz. Im Vergleich zum Ende der Lichtperiode ist der Aspartat-Gehalt am Ende der Dunkelperiode trotz der Abnahme des Gesamtaminosäure-Gehalts eindeutig erhöht.





**Abbildung 3-11.** Aminosäuremuster in den jungen, "source" und alten Blättern sowie in den Wurzeln der ausgewählten Rapsgenotypen bei Nitrat-Ernährung. Dargestellt sind die gemittelten Werte aller acht Genotypen (n=4). „andere AS“ = thr, arg, ala, gaba, tyr, val, met, trp, ile, phe, leu und lys.

### 3.2.1.5 Aminosäure- und Saccharosegehalte im Phloem- und Xylemsaft sowie im „source“-Blatt und in der Wurzel

Da der Transport von Metaboliten und Ionen im Phloem- und Xylemsystem

erfolgt, wurden die Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloem- und Xylemsaft mit denen im „source“-Blatt und in der Wurzel während der Lichtperiode verglichen (Tab. 3-6).

**Tabelle 3-6.** Aminosäure- und Saccharosegehalte im Phloem- und Xylemsaft sowie im „source“-Blatt und in der Wurzel während der Lichtperiode unter 0.5 mM bzw. 4 mM  $\text{NO}_3^-$ -Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte und SD aller 8 Genotypen (n=4).

	Phloemsaft (mM)		„source“-Blatt ( $\mu\text{mol/g FG}$ )		Xylemsaft (mM)		Wurzel ( $\mu\text{mol/g FG}$ )	
	4 mM	0.5 mM	4 mM	0.5 mM	4 mM	0.5 mM	4 mM	0.5 mM
[ $\text{NO}_3^-$ ]:								
Saccharose:	814 $\pm 170$	1852 $\pm 301$	2.3 $\pm 1.1$	4.7 $\pm 1.2$	0.06 $\pm 0.03$	0.25 $\pm 0.1$	0.4 $\pm 0.1$	1.6 $\pm 0.3$
$\Sigma$ Aminosäuren:	535 $\pm 156$	378 $\pm 62$	25 $\pm 6$	8.3 $\pm 2.0$	4.8 $\pm 1.1$	2.5 $\pm 0.5$	5.5 $\pm 1.1$	3.7 $\pm 0.5$
glu (%)	<b>26</b>	<b>26</b>	16	<b>47</b>	2.0	4.7	17	<b>28</b>
gln (%)	17	15	<b>38</b>	5.7	<b>75</b>	<b>46</b>	<b>32</b>	19
asp (%)	9.8	10	11	13	3.1	16	8.0	11
asn (%)	3.9	3.0	2.1	0.7	3.3	1.9	3.4	3.1
ser (%)	11	8.7	9.2	11	1.3	3.2	5.3	5.7
gly (%)	0.8	1.5	8.7	9.1	0.9	2.7	2.9	4.1
his (%)	1.4	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0
thr (%)	5.2	5.3	3.9	5.5	3.6	3.7	4.4	6.3
arg (%)	1.2	1.2	1.6	0.3	1.4	0.8	1.1	2.2
ala (%)	1.5	1.5	3.9	3.3	0.6	1.8	7.0	6.6
gaba (%)	0.0	0.3	0.1	0.2	0.8	3.2	2.7	2.7
tyr (%)	1.5	2.0	0.2	0.2	0.5	1.1	0.6	0.5
val (%)	5.7	6.8	1.3	1.8	2.4	5.1	4.8	3.6
met (%)	0.3	0.2	0.4	0.2	0.4	1.9	1.1	0.5
trp (%)	0.6	1.3	0.2	0.2	0.1	0.8	1.2	0.7
ile (%)	4.7	5.4	1.3	1.5	1.8	3.4	1.9	2.7
phe (%)	2.1	2.7	0.2	0.0	0.2	0.6	0.4	0.0
leu (%)	2.9	2.7	0.2	0.3	0.8	1.3	1.2	1.4
lys (%)	5.7	5.0	1.2	0.5	2.3	2.0	1.5	2.0

Die Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloem- und Xylemsaft, in den „source“-Blättern und in den Wurzeln reagieren auf die Stickstoffversorgung mit einer gleichen Tendenz: Im Vergleich mit 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  zeigen sich bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  höhere Aminosäurekonzentrationen aber niedrigere Saccharosekonzentrationen.

Alle in Blatt und Wurzel vorhandenen Aminosäuren werden auch im Phloem und im Xylem transportiert, aber die jeweiligen Anteile der einzelnen Aminosäuren am Gesamtaminosäure-Gehalt sind unterschiedlich: In „source“-Blättern und in Wurzeln unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  ist der Anteil von Glutamin am höchsten, während unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  der von Glutamat am höchsten ist. Unter beiden Stickstoffbedingungen ist der Anteil von Glutamat im Phloemsaft am höchsten. Im Xylemsaft ist Glutamin die dominierende Aminosäure mit einem Anteil an der Gesamtaminosäure-Konzentration von 75% unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  und von 46% unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$ . Die Änderung des Aminosäuremusters im Phloemsaft zwischen 0.5 mM und 4 mM  $\text{NO}_3^-$  ist nicht so stark wie die im „source“-Blatt, in den Wurzeln und im Xylemsaft.

### **3.2.2 Unterschiede zwischen den 8 ausgewählten Genotypen im Gewächshaus-Versuch**

Die im Gewächshaus angezogen acht Genotypen gehören zu unterschiedlichen Gruppen (Tab. 3-3). Sie unterscheiden sich nicht nur im Proteingehalt im Samen, sondern auch in ihrer Photosyntheseleistung, in ihren Metabolitgehalten und in den Aktivitäten von N-assimilierenden Enzymen sowie im Phloem- und Xylemtransport. Diese Unterschiede sind im folgenden zusammengefaßt.

#### **3.2.2.1 Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation sowie Frischgewicht von Sproß und Wurzel der 8 Rapsgenotypen**

Als Kriterium der Photosyntheseleistung dient die Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation. Außerdem wird das Frischgewicht von Sproß und Wurzel zur Mitte der Blüte angegeben. Die Messung der  $\text{CO}_2$ -Assimilation wurde im Gewächshaus durchgeführt. Da sich die Parameter wie Lichtstärke und  $\text{CO}_2$ -Konzentration änderten, wurden in

Tabelle 3-7 nur die Werte bei Lichtstärken von  $470 \pm 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von  $375 \pm 15 \mu\text{bar}$  dargestellt.

Die Pflanzen unter  $4 \text{ mM NO}_3^-$  zeigten nur eine geringfügig höhere Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation pro  $\text{m}^2$  als die unter  $0.5 \text{ mM NO}_3^-$ . Zu sehen war ein Unterschied bei Falcon, Lirajet, RS3 und S27. Obwohl es Unterschiede zwischen den Genotypen gibt, zeigten die Resynthese-Linien (RS3 und S27) keine höhere Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation ( $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) als die anderen untersuchten Genotypen. Die Frischgewichte der Pflanzen unter  $4 \text{ mM NO}_3^-$  waren dagegen viel höher als unter  $0.5 \text{ mM NO}_3^-$ .

**Tabelle 3-7.** Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation und Biomasse der acht Genotypen unter  $0.5 \text{ mM}$  und  $4 \text{ mM NO}_3^-$  im Gewächshaus. Die Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation wurde bei Lichtstärken von  $470 \pm 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von  $375 \pm 15 \mu\text{bar}$  gemessen ( $n=6-9$  Blätter). Als Biomasse wurden die Mittelwerte der Frischgewichte der Pflanzen ( $n=4$ ) zur Mitte der Blüte angegeben.

	Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation ( $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )		Frischgewicht (Sproß und Wurzel) (g)	
	<u>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>	<u>0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>	<u>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>	<u>0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>
Apex	$15.7 \pm 1.5$	$14.8 \pm 0.6$	$151 \pm 8$	$95 \pm 18$
Bristol	$14.8 \pm 1.5$	$14.3 \pm 2.3$	$148 \pm 11$	$94 \pm 3$
DP-HB-1	$12.5 \pm 1.8$	$13.3 \pm 0.4$	$140 \pm 13$	$81 \pm 10$
Express	$15.1 \pm 1.1$	$14.3 \pm 1.4$	$166 \pm 12$	$116 \pm 23$
Falcon	$15.4 \pm 1.1$	$12.0 \pm 3.2$	$198 \pm 19$	$103 \pm 18$
Lirajet	$15.0 \pm 1.1$	$9.8 \pm 2.2$	$166 \pm 21$	$107 \pm 12$
RS3	$15.0 \pm 0.6$	$11.4 \pm 0.8$	$170 \pm 20$	$113 \pm 24$
S27	$14.0 \pm 1.6$	$11.4 \pm 1.0$	$164 \pm 18$	$97 \pm 29$

### 3.2.2.2 Metabolitgehalte und C/N-Verhältnisse in den Blättern der 8 Genotypen am Ende der Lichtperiode

In Tabelle 3-8 sind die Metabolitgehalte ( $\mu\text{mol/g}$  FG) und C/N-Verhältnisse in den Blättern der acht Genotypen ( $n=4$ ) unter zwei Nitratbedingungen (4 mM oder 0.5 mM) dargestellt. Dabei wurden die Meßwerte der jungen, "source"- und alten Blätter gemittelt. Wegen der großen Unterschiede zwischen den drei Altersphasen der Blätter werden keine Standardabweichung angegeben. Die Unterschiede der Metabolitgehalte in den Wurzeln sind sehr gering und daher nicht dargestellt.

Es zeigt sich eine starke Variationsbreite der Metabolitgehalte in den Pflanzen der acht Genotypen. Die Variabilität der Gehalte der  $\Sigma$ Aminosäuren und Nitrat ist unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  weniger ausgeprägt als unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$ , während es eine umgekehrte Tendenz im Fall von C-haltigen Verbindungen gibt. Unter 4 mM  $\text{NO}_3^-$  ist das C/N-Verhältnis in den Blättern der Sorte Express (2.5) wegen der niedrigeren Kohlenstoff-Gehalte am niedrigsten, und von Bristol (6.0) auf Grund höherer Gehalte von Kohlenstoff-Verbindungen am höchsten. Unter 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  ist das C/N-Verhältnis in den Blättern von Bristol (47) auf Grund geringerer Kohlenstoff-Gehalte und höherer Aminosäure-Gehalte am niedrigsten, und von RS3 (305) auf Grund höherer Kohlenstoff-Gehalte und geringerer Aminosäure-Gehalte am höchsten. Daher ist der Unterschied der C/N-Verhältnisse zwischen den Genotypen bei 0.5 mM  $\text{NO}_3^-$  größer als der bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$ . Bei den Aminosäuregehalten und C/N-Verhältnissen im Blatt zeigen die Resynthese-Linien (RS3, S27) keine deutlichen Unterschiede gegenüber den anderen Rapssorten unter den Gewächshaus-Bedingungen.

**Tabelle 3-8.** Metabolitgehalte und C/N-Verhältnisse in den Blättern der 8 Genotypen am Ende der Lichtperiode. Dargestellt sind die Mittelwerte aller drei Altersphasen der Blätter. Die Einheit für die Metabolitgehalte ist  $\mu\text{mol/g FG}$ .  $\Sigma\text{C}$  ist aus Stärke, Hexose, Saccharose, Malat und Amino-C, bzw.  $\Sigma\text{N}$  ist aus Amino-N und Nitrat berechnet.

<b>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<i>Apex</i>	<i>Bristol</i>	<i>DP-HB-1</i>	<i>Express</i>	<i>Falcon</i>	<i>Lirajet</i>	<i>RS 3</i>	<i>S 27</i>
Stärke	1.7	1.4	0.9	1.0	1.7	1.5	0.9	0.6
Saccharose	2.8	2.6	1.5	1.1	1.8	1.7	1.6	1.3
Hexose	6.9	6.6	3.5	2.9	7.4	2.4	11.9	1.3
Malat	30	41	24	17	24	17	23	21
$\Sigma\text{Aminosäure}$	27	29	28	25	27	30	25	27
Nitrat	41	34	48	45	42	35	25	56
$\Sigma\text{C}$	324	373	259	228	294	247	303	228
$\Sigma\text{N}$	82	80	91	91	81	80	66	97
C/N-Verhältnis	5.2	<b>6.0</b>	3.1	<b>2.5</b>	3.9	3.4	4.6	2.6
<b>0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>								
Stärke	107	80	175	189	151	146	196	189
Saccharose	3.3	2.3	2.4	4.0	3.0	3.3	4.7	4.2
Hexose	20	8.7	12	23	25	16	51	18
Malat	34	32	28	21	27	24	20	25
$\Sigma\text{Aminosäure}$	13.6	12.8	9.1	9.2	9.0	7.1	6.9	8.6
Nitrat	2.5	2.9	0.7	0.3	0.8	0.2	0.3	1.5
$\Sigma\text{C}$	994	734	1300	1441	1234	1137	1650	1431
$\Sigma\text{N}$	19.1	18.1	12.0	10.5	11.4	8.3	8.0	11.6
C/N-Verhältnis	67	<b>47</b>	112	136	147	169	<b>305</b>	117

### 3.2.2.3 Nitratreduktase- und Glutaminsynthetaseaktivität in den Blättern und den Wurzeln der 8 Genotypen

Die Aktivitäten der Nitratreduktase (NR) und Glutaminsynthetase (GS) wurden in den jungen, „source“ und alten Blättern und den Wurzeln der acht Genotypen gemessen. In den Tabellen 3-9 und 3-10 werden die Aktivitäten im Blatt (gemittelte Werte aus allen drei Altersphasen der Blätter) und in der Wurzel angegeben.

**Tabelle 3-9.** Maximale Aktivität der Nitratreduktase (ohne Hemmung durch  $Mg^{2+}$ ) in den Blättern und Wurzeln der 8 Genotypen am Ende der Licht- und Dunkelperiode. Die Blatt-Werte sind Mittelwerte aller drei Altersphasen des Blattes. Die Einheit ist *nmol Nitrit/g FG/min*.

4 mM $NO_3^-$	Lichtende			Dunkelende		
	Blatt	Wurzel	Blatt/Wurzel	Blatt	Wurzel	Blatt/Wurzel
Apex	267	199	1.3	<b>200</b>	<b>234</b>	0.9
Bristol	279	190	1.5	177	124	1.4
DP-HB-1	207	171	1.2	145	178	0.8
Express	304	147	2.1	204	77	2.6
Falcon	<b>276</b>	<b>217</b>	1.3	194	125	1.6
Lirajet	305	143	2.1	219	116	1.9
RS 3	214	146	1.5	<b>149</b>	<b>77</b>	1.9
S 27	<b>216</b>	<b>133</b>	1.6	177	74	2.4
Sorten-MW	259	170	1.5	183	126	1.5
<b>0.5mM <math>NO_3^-</math></b>						
Apex	123	11	11.2	62	5	12.4
Bristol	122	14	8.7	53	5	10.6
DP-HB-1	116	9	12.8	42	3	14.0
Express	60	11	5.5	27	4	6.8
Falcon	80	8	10.0	39	6	6.5
Lirajet	66	13	5.1	46	5	9.2
RS 3	54	11	4.9	30	3	10.0
S 27	44	9	4.9	35	14	2.5
Sorten-MW	83	11	7.5	42	6	7.0

Die NR-Aktivität ist in den auf Hydrokultur unter 0.5 mM  $NO_3^-$  angezogenen Rapspflanzen niedrig, insbesondere in den Wurzeln. Auf Hydrokultur unter 4 mM  $NO_3^-$  angezogen ist die NR-Aktivität pro Gramm Frischgewicht in den Blättern etwa 1.5fach höher als in den Wurzeln. Unter 0.5 mM  $NO_3^-$  angezogen ist die Aktivität dagegen in den Blättern etwa 7fach höher als in den Wurzeln. Die Variation der NR-Aktivität zwischen den Genotypen ist unter 0.5 mM  $NO_3^-$  größer als unter 4 mM  $NO_3^-$ .

Wenn die Aktivitäten in den Blättern und den Wurzeln zusammen berücksichtigt werden, ist bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> am Ende der Lichtperiode die Aktivität der Sorte S27 am niedrigsten (175 nmol Nitrit/g FG/min) und die von Falcon am höchsten (247 nmol Nitrit/g FG/min), sowie am Ende der Dunkelperiode die Aktivität von RS3 am niedrigsten (113 nmol Nitrit/g FG/min) und die von Apex am höchsten (217 nmol Nitrit/g FG/min). Bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist die Aktivität in den Resynthese-Linien (RS3, S27) gegenüber den anderen Rapsgenotypen ebenfalls wie bei 4 mM Nitrat nicht erhöht.

**Tabelle 3-10.** Glutaminsynthetase-Aktivität in den Blättern und Wurzeln der 8 Genotypen am Ende der Licht- und Dunkelperiode. Die Blatt-Werte sind Mittelwerte aller drei Altersphasen des Blattes. Die Einheit ist *nmol  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat/g FG/min*.

4 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Lichtende			Dunkelende		
	Blatt	Wurzel	MW	Blatt	Wurzel	MW
Apex	815	893	<b>854</b>	438	652	545
Bristol	848	677	762	573	394	484
DP-HB-1	796	876	836	497	486	492
Express	808	656	732	348	259	<b>304</b>
Falcon	656	874	765	735	866	<b>801</b>
Lirajet	664	651	657	821	693	757
RS 3	402	448	<b>425</b>	699	601	650
S 27	547	533	540	830	746	788
<b>0.5mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>						
Apex	815	761	<b>788</b>	812	550	681
Bristol	849	641	745	771	529	650
DP-HB-1	816	676	746	903	547	<b>725</b>
Express	768	527	647	740	373	557
Falcon	860	483	671	728	389	558
Lirajet	881	694	<b>788</b>	770	479	625
RS 3	638	479	<b>559</b>	546	350	<b>448</b>
S 27	778	663	721	615	437	526

Im Gegensatz zur NR-Aktivität ist der Einfluß der Stickstoff-Versorgung oder des Licht/Dunkel-Wechsels auf die GS-Aktivität in den Rapspflanzen sehr gering. Am



Ende der Lichtperiode ist die GS-Aktivität von RS3 bei beiden Stickstoffbedingungen am niedrigsten und von Apex am höchsten. Generell ist die GS-Aktivität in den Resynthese-Linien (RS3, S27) gegenüber den anderen Genotypen nicht erhöht.

### 3.2.2.4 Phloem- und Xylemtransport der 8 Genotypen

Die Konzentrationen der Hauptmetabolite im Phloem- und Xylemsaft der acht Genotypen sind in den Tabellen 3-11-A und -B dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (SD): für Xylemsaft n=4, für Phloemsaft bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> n=4-6 und bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> n=2-3.

Die Konzentrationen der Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen im Phloem- und Xylemsaft der acht Genotypen zeigen eine große Variation. Bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist die Konzentration der Gesamtaminosäuren (ΣAS) im Phloemsaft von der Resynthese-Linie S27 mit 766 mM am höchsten und vom Genotyp Apex mit 307 mM am niedrigsten; bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist es dagegen umgekehrt, beim Genotyp S27 ist sie mit 294 mM am niedrigsten und beim Genotyp Apex mit 495 mM am höchsten. Die Konzentration der Saccharose im Phloemsaft variiert bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 489 (Bristol) und 1062 mM (DP-HB-1), und bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 1514 (RS3) und 2420 mM (Apex). Das Saccharose/ΣAminosäure-Verhältnis im Phloemsaft liegt bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 1.1 (RS3) und 2.7 (Apex), bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 4.0 (Lirajet) und 6.3 (S27). Die Konzentration der ΣAS im Xylemsaft ist bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 4.0 (Lirajet) bis 7.3 mM (S27), bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 1.8 (Lirajet) bis 3.1 mM (S27). Die Nitrat-Konzentration im Xylemsaft liegt bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 4.7 und 17.4 mM, bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 0.3 und 3.8 mM. Die Ammoniumkonzentration im Xylemsaft ist bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 0.36 bis 1.05 mM, bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 0.06 bis 0.19 mM. Die Konzentrationen der Kohlenhydrate im Xylemsaft sind sehr niedrig, besonders bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Die Hexosen-Konzentration ist 0.05-0.1 mM bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und 0.1-0.4 mM bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Die Malat-Konzentration ist 0.3-1.7 mM bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und 3.9-5.5 mM bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> liegt das Saccharose/ΣAminosäure-Verhältnis im Xylemsaft zwischen 0.01 und 0.03, bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zwischen 0.05 und 0.17.

Die Resynthese-Linien (RS3, S27), die in den Feldversuchen insgesamt höhere Proteingehalte im Samen aber niedrigere Samen-N-Erträge aufwiesen, zeigten unter Gewächshaus-Bedingungen beim Phloem- und Xylemtransport ebenso wie beim C- und N-Metabolismus im Blatt und in der Wurzel keine deutlichen Unterschiede zu anderen Genotypen. Nur ihre Gesamtaminosäure-Konzentrationen im Phloemsaft bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> waren in den Resynthese-Linien höher als in den anderen Linien.

**Tabelle 3-11-A.** Gesamtaminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft der 8 Genotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen jedes Genotyps: bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> n=4-6 und bei 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> n=2-3.

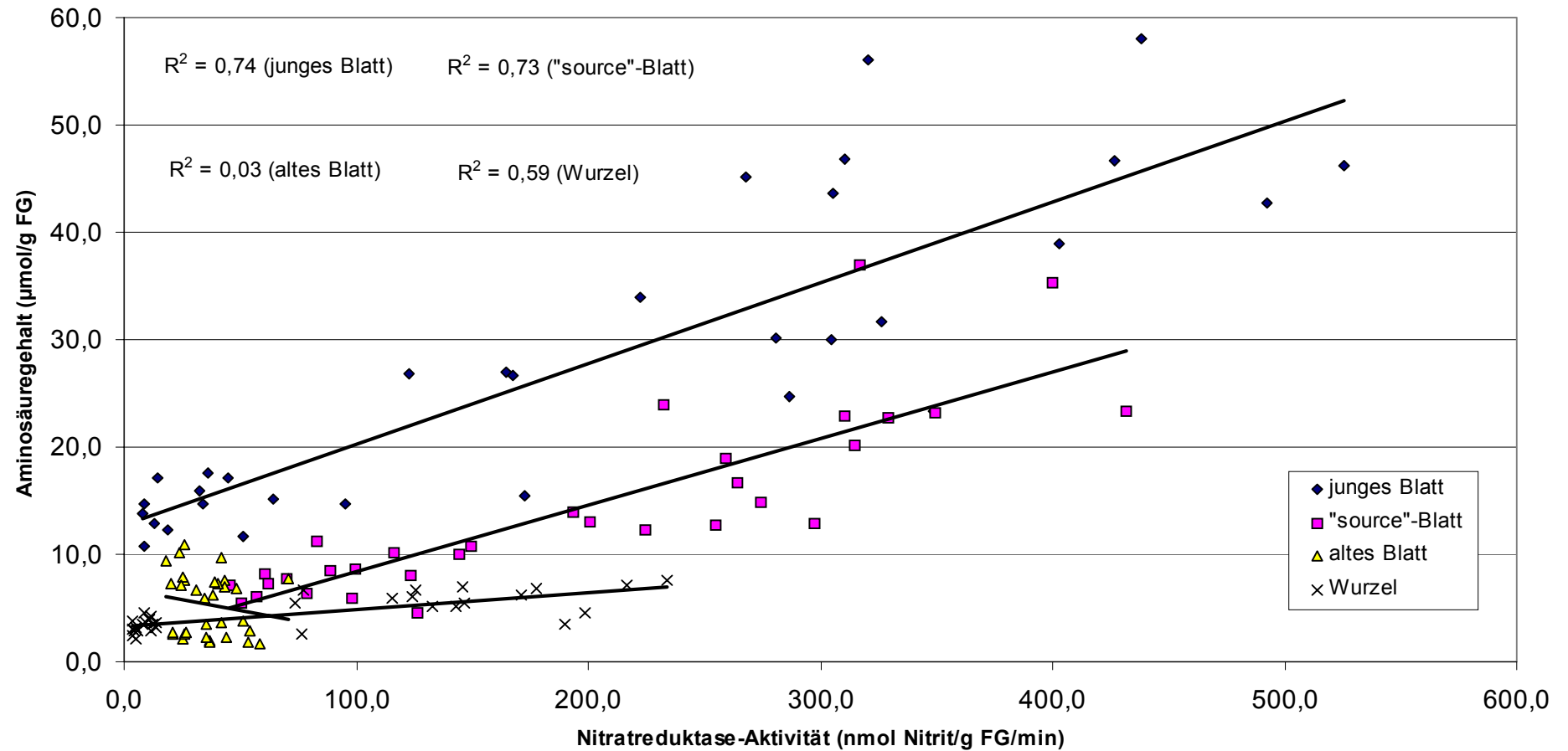
<i>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	<b>ΣAS (mM)</b>	<b>Saccharose (mM)</b>	<b>Saccharose/ΣAS</b>
Apex	<b>307</b> ± 105	767 ± 140	<b>2.7</b>
Bristol	439 ± 255	<b>489</b> ± 90	1.4
DP-HB-1	675 ± 115	<b>1062</b> ± 75	1.6
Express	398 ± 87	953 ± 117	2.5
Falcon	366 ± 101	824 ± 132	2.3
Lirajet	649 ± 189	759 ± 114	1.2
RS 3	738 ± 104	791 ± 161	<b>1.1</b>
S 27	<b>766</b> ± 208	867 ± 97	1.2
<b><i>0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i></b>			
Apex	<b>495</b> ± 129	<b>2420</b> ± 140	4.9
Bristol	400 ± 82	2213 ± 221	5.7
DP-HB-1	343 ± 26	1610 ± 23	4.6
Express	369 ± 80	1730 ± 68	4.9
Falcon	306 ± 75	1575 ± 108	6.0
Lirajet	381 ± 89	1520 ± 1126	<b>4.0</b>
RS 3	437 ± 77	<b>1514</b> ± 314	4.5
S 27	<b>294</b> ± 38	1923 ± 182	<b>6.3</b>

**Tabelle 3-11-B.** Gesamtaminosäure-, Saccharose-, Nitrat- und Ammoniumkonzentrationen im Xylemsaft der 8 Genotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen jedes Genotyps (n=4).

<i>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	$\Sigma$ AS (mM)	Saccharose (mM)	Nitrat (mM)	Ammonium (mM)
Apex	4.3 ± 0.1	0.04 ± 0.01	9.1 ± 3.6	0.60 ± 0.05
Bristol	4.3 ± 0.3	0.04 ± 0.02	8.1 ± 0.1	0.66 ± 0.03
DP-HB-1	4.0 ± 0.3	0.02 ± 0.01	12.0 ± 0.3	<b>1.05</b> ± 0.08
Express	4.0 ± 0.4	0.05 ± 0.03	<b>17.4</b> ± 0.9	1.04 ± 0.05
Falcon	6.2 ± 0.6	0.06 ± 0.02	<b>4.7</b> ± 0.1	<b>0.36</b> ± 0.03
Lirajet	<b>4.0</b> ± 0.2	0.06 ± 0.01	4.9 ± 0.3	0.45 ± 0.04
RS 3	4.3 ± 0.1	0.13 ± 0.04	7.9 ± 0.1	0.74 ± 0.12
S 27	<b>7.3</b> ± 0.1	0.08 ± 0.04	10.4 ± 3.4	0.81 ± 0.03
<hr/>				
<i>0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>				
Apex	2.4 ± 0.8	0.17 ± 0.01	2.0 ± 0.5	0.08 ± 0.01
Bristol	2.1 ± 0.1	0.17 ± 0.02	<b>3.8</b> ± 0.2	0.10 ± 0.01
DP-HB-1	2.0 ± 0.2	0.11 ± 0.01	2.9 ± 0.1	<b>0.06</b> ± 0.01
Express	3.1 ± 0.3	0.26 ± 0.02	3.3 ± 0.5	0.08 ± 0.01
Falcon	2.6 ± 0.3	0.35 ± 0.07	3.6 ± 0.9	0.10 ± 0.01
Lirajet	<b>1.8</b> ± 0.1	0.24 ± 0.06	1.1 ± 0.8	0.09 ± 0.02
RS 3	2.5 ± 0.8	0.44 ± 0.12	<b>0.3</b> ± 0.1	<b>0.19</b> ± 0.03
S 27	<b>3.1</b> ± 0.2	0.24 ± 0.12	0.6 ± 0.3	0.13 ± 0.06

### 3.2.3 Korrelation zwischen Nitratreduktase-Aktivität und der Summe der freien Aminosäuren in den Pflanzenteilen

Im Feldversuch zeigte sich eine positive Korrelation zwischen NR-Aktivität und der Summe der freien Aminosäuren im Blatt. Daher ist in Abbildung 3-12 die NR-Aktivität im Verhältnis zur Summe der freien Aminosäuren in den verschiedenen Pflanzenteilen dargestellt. Eine positive Korrelation zeigt sich besonders in den jungen und den "source"-Blättern mit jeweils einem Bestimmtheitsmaß von etwa 0.7. Sowohl die NR-Aktivität als auch die AS-Gehalte in den alten Blättern sind sehr niedrig und zeigen kaum eine Korrelation. In den Wurzeln ist dagegen eine positive Korrelation vorhanden ( $R^2=0.59$ ).



**Abbildung 3-12.** Nitratreduktase-Aktivität im Verhältnis zur Summe der freien Aminosäuren in den Pflanzenteilen der 8 Genotypen. Dargestellt sind die Werte der 8 Genotypen unter allen Bedingungen (0,5 mM und 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Ende der Licht- und Dunkelperiode).

### 3.3 Transgene Pflanzen mit Veränderungen der Glutaminsynthetase (GS)

Glutaminsynthetase ist eines der wichtigen N-Assimilationsenzyme. Das Enzym katalysiert eine ATP-verbrauchende Reaktion, wodurch eine Amidgruppe auf Glutamat übertragen wird und Glutamin entsteht. In der Pflanze wird Ammonium sowohl während der Nitrat-Reduktion als auch während der Photorespiration erzeugt. Um die Stickstoffeffizienz bei Raps mit Hilfe Gentechnik-gestützter Züchtung zu optimieren, wurde mittels genetischer Transformation die Aktivität der Glutaminsynthetase in Raps modifiziert. Von der Vielzahl regenerierter transgener Pflanzen wurden nach den Ergebnissen von Northern-Blot, Western-Blot und Enzymaktivität die Klone C10-26, E8-1 und F2-1 (Tab. 3-12) ausgewählt, um den Zusammenhang zwischen GS-Aktivität, Gln-Gehalt im Blatt, Gln-Konzentration im Phloemsaft und Proteingehalt im Samen zu untersuchen. C10-26 sind Transformanten mit Überexpression der cytosolischen Glutaminsynthetase (GSR1). E8-1 sind Transformanten mit der Überexpression der plastidären Glutaminsynthetase (GSL1). F2-1 sind Transformanten mit "antisense"-Hemmung der plastidären Glutaminsynthetase (GSL1) (Wallbraun 1997). Die Ausgangssorte für C10-26 und E8-1 ist die Sommerrapssorte "Drakkar", und für F2-1 die Winterrapssorte "Falcon".

**Tabelle 3-12.** Zusammenfassung der für die biochemischen Untersuchungen ausgewählten transgenen Pflanzen (Wallbraun 1997).

Pflanze	Transgen	Northern-Blot	Western-Blot	GS-Aktivität
C10-26	GSR1sense	200%	+	310% (GS1)
E8-1	GSL1sense	310%	+	230% (GS2)
F2-1	GSL1antisense	nicht bestimmt	-	64% (GS2)

+ = im Vergleich zur Ausgangssorte deutlich erhöhtes Signal

- = im Vergleich zur Ausgangssorte deutlich verringertes Signal

GS1 = cytosolische GS, GS2 = plastidäre GS

Von jedem transformierten Konstrukt wurden drei Pflanzen eines Klons untersucht. Dabei ging es um die Frage, inwieweit die genetischen Veränderungen der GS

sich auf den N-Metabolismus und weiter auf den C-Metabolismus auswirken. Dazu wurden die Metabolitgehalte in "source"-Blättern und die Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft analysiert. Diese Daten wurden mit den GS-Aktivitäten in den Blättern und den Protein- und Ölgehalten im Samen verglichen.

### 3.3.1 Metabolitgehalte und Glutaminsynthetase-Aktivität in den Blättern

Die Pflanzen der jeweiligen Ausgangssorte wurden zusammen mit den transgenen Pflanzen unter gleichen Bedingungen bearbeitet und untersucht. In folgenden Tabellen sind die Metabolitgehalte und die Glutaminsynthetase-Aktivität in Blättern der Pflanzen mit einer Überexpression der cytosolischen oder plastidären Glutaminsynthetase (Tab. 3-13) sowie der Pflanzen mit einer „antisense“-Hemmung der plastidären GS (GSL1, Tab. 3-14) im Vergleich zur Ausgangssorte dargestellt.

Im Vergleich zur Ausgangssorte Drakkar zeigten die cytosolische GS-überexprimierenden Pflanzen (C10-26) keine deutliche Änderung der Metabolitgehalte in den Blättern. Der Gesamtaminosäuregehalt war niedriger als der der Ausgangssorte. Der relative Anteil von Glutamin am Gesamtaminosäuregehalt in C10-26 ist leicht erhöht, aber der absolute Gehalt nicht. Die Kohlenhydratgehalte in C10-26 waren insgesamt erhöht. Der Protein- und Nitratgehalt sowie das Saccharose/ $\Sigma$ Aminosäure-Verhältnis in den Blättern von C10-26 veränderten sich nicht im Vergleich zur Ausgangssorte.

Bei den plastidäre GS-überexprimierenden Pflanzen (E8-1) war der Gesamtaminosäuregehalt in den Blättern erhöht. Dabei stiegen die Gehalte und die Anteile von Glutamin, Asparagin und Serin an, während die von Glutamat und Aspartat sanken. Der Protein- und Nitratgehalt in den Blättern von E8-1 blieb unverändert. Die Kohlenhydratgehalte und das Saccharose/ $\Sigma$ Aminosäure-Verhältnis waren in den Blättern von E8-1 niedriger als in der Kontrolle.

Die hier nicht dargestellten Daten der Transformanten mit GS-Überexpression am Ende der Dunkelperiode zeigen gleichfalls keine deutliche Auswirkung der Überexpression auf den C- und N-Metabolismus der Rapspflanzen.

**Tabelle 3-13.** Metabolitgehalte und Glutaminsynthetase-Aktivität in Blättern der GS-überexprimierenden Pflanzen und ihrer Ausgangssorte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gehalte am Ende der Lichtperiode sind angegeben (n=3). Die Einheit für Protein ist *mg/g FG*, für andere Metabolite *μmol/g FG*. In C10-26 ist die cytosolische, in E8-1 die plastidäre Glutaminsynthetase überexprimiert.

	<b>Drakkar</b>	<b>C10-26</b>	<b>E8-1</b>
<i>glu</i>	3.8 ± 0.3 (45%)	3.0 ± 0.4 (50%)	3.5 ± 0.8 (36%)
<i>gln</i>	<b>0.3 ± 0.1</b> (3.8%)	<b>0.3 ± 0.1</b> (5.6%)	<b>0.8 ± 0.2</b> (8.4%)
<i>asp</i>	1.8 ± 0.1 (21%)	1.2 ± 0.1 (19%)	1.7 ± 0.3 (18%)
<i>asn</i>	0.08 ± 0.02 (0.9%)	0.06 ± 0.02 (1.0%)	0.14 ± 0.03 (1.5%)
<i>ser</i>	0.9 ± 0.2 (10%)	0.44 ± 0.04 (7.2%)	1.4 ± 0.3 (14%)
<i>gly</i>	0.2 ± 0.06 (2.8%)	0.2 ± 0.02 (3.1%)	0.3 ± 0.1 (3.0%)
ΣAminosäure	<b>8.5 ± 0.8</b> (100%)	<b>6.1 ± 0.8</b> (100%)	<b>9.5 ± 2.0</b> (100%)
Protein	31 ± 1	26 ± 2	31 ± 5
Nitrat	13 ± 1	12 ± 1	14 ± 5
Stärke	49 ± 4	58 ± 14	25 ± 2
Glukose	16 ± 1	28 ± 2	8.0 ± 1
Fruktose	18 ± 1	23 ± 1	8.7 ± 1
Saccharose	8.6 ± 0.2	6.1 ± 0.5	5.3 ± 0.5
Malat	24 ± 2	20 ± 2	28 ± 2
Saccharose/ΣAminosäure	1.01	1.01	0.56
GS-Aktivität *	100% **	310% (GS1)	230% (GS2)

\* Daten von Wallbraun (1997) im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts

\*\* für C10-26: GS1, für E8-1: GS2

**Tabelle 3-14.** Metabolitgehalte und Glutaminsynthetase-Aktivität in Blättern der GSL1-antisense-gehemmten Pflanzen (F2-1) und ihrer Ausgangssorte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gehalte am Ende der Lichtperiode sind angegeben (n=3). Die Einheit für Protein ist *mg/g FG*, für andere Metabolite  $\mu\text{mol/g FG}$ .

	<b>Falcon</b>	<b>F2-1</b>
<i>glu</i>	1.9 ± 0.2 (15%)	2.6 ± 0.2 (17%)
<i>gln</i>	<b>2.3 ± 0.5</b> (19%)	<b>2.4 ± 0.2</b> (16%)
<i>asp</i>	2.1 ± 0.4 (17%)	3.0 ± 0.5 (20%)
<i>asn</i>	0.3 ± 0.04 (2.6%)	0.3 ± 0.00 (2.0%)
<i>ser</i>	1.6 ± 0.4 (13%)	2.1 ± 0.04 (14%)
<i>gly</i>	1.7 ± 0.5 (14%)	1.5 ± 0.6 (10%)
ΣAminosäure	<b>12.1 ± 2.3</b> (100%)	<b>14.9 ± 1.6</b> (100%)
Protein	33 ± 2	39 ± 1
Nitrat	72 ± 1	41 ± 4
Stärke	32 ± 2	35 ± 5
Glukose	13 ± 1	22 ± 1
Fruktose	15 ± 1	24 ± 1
Saccharose	3.9 ± 0.1	4.5 ± 0.4
Malat	24 ± 2	21 ± 1
Saccharose/ΣAminosäure	0.32	0.30
GS-Aktivität*	100% (GS2)	64% (GS2)

\* Daten von Wallbraun (1997) im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts

Auch im Falle der "antisense"-Hemmung der plastidären Glutaminsynthetase zeigten sich keine deutlichen Auswirkungen auf die Metabolitgehalte: Der Gesamtaminosäuregehalt oder das Aminosäuremuster änderten sich kaum. Während in den



Blättern bei F2-1 der Proteingehalt leicht erhöht war, sank der Nitratgehalt. Die Gehalte von Stärke und Saccharose waren leicht erhöht, von Hexosen stärker erhöht und von Malat verringert. Das Saccharose/ $\Sigma$ Aminosäure-Verhältnis zeigte ebenfalls keine großen Unterschiede.

### 3.3.2 Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft sowie Protein- und Ölgehalte im Samen der GS-transgenen Pflanzen

Die im Blatt synthetisierten Metabolite werden durch das Phloem in andere Pflanzenteile wie Samen transportiert. Daher sind in den Tabellen 3-15 und 3-16 die Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft sowie die Protein- und Ölgehalte im Samen der GS-transgenen Pflanzen dargestellt. Ähnlich wie in den Blättern, zeigen die genetischen Veränderungen, sowohl der Überexpression als auch

**Tabelle 3-15.** Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft sowie Protein- und Ölgehalte im Samen der GS-überexprimierenden Pflanzen und ihrer Ausgangssorte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben. Für Phloemsaft ist n=5-11, für Protein- und Ölgehalte im Samen ist n=4-7. In C10-26 ist die cytosolische, in E8-1 die plastidäre Glutaminsynthetase überexprimiert.

<i>Phloemsaft</i>	<b>Drakkar</b>	<b>C10-26</b>	<b>E8-1</b>
<i>glu</i> (%)	15.6 ± 7.6	12.6 ± 10.2	20.1 ± 10.4
<i>gln</i> (%)	20.2 ± 20.8	17.7 ± 8.4	14.4 ± 16.6
<i>asp</i> (%)	6.5 ± 2.6	6.3 ± 3.6	7.9 ± 4.1
<i>asn</i> (%)	3.9 ± 2.3	4.2 ± 2.9	4.8 ± 4.9
<i>ser</i> (%)	6.3 ± 3.2	5.4 ± 2.7	6.8 ± 5.5
<i>gly</i> (%)	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.9	0.5 ± 0.3
$\Sigma$ Aminosäure (mM)	289 ± 139	291 ± 176	207 ± 215
	(100%)	(100%)	(100%)
Saccharose (mM)	2242 ± 2216	2010 ± 680	1485 ± 1083
Saccharose/ $\Sigma$ Aminosäure	7.8	6.9	7.2
<i>Samen</i>			
Proteingehalt (% in TG)*	22.1 ± 1.2	28.4 ± 1.7	25.1 ± 2.3
Ölgehalt (% in TG)*	43.3 ± 1.7	37.2 ± 2.2	41.1 ± 2.0

\* Daten von Wallbraun (1997) im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts

der antisense-Hemmung, keine deutliche Auswirkung auf die Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen sowie die Aminosäuremuster im Phloemsaft. Der Glutaminanteil im Phloemsaft ist sehr variabel und von vielen lokalen Bedingungen abhängig, so daß ein Einfluß der Glutaminsynthetase-Aktivität auf den Gln-Gehalt im Phloemsaft nicht erkennbar ist. Es läßt sich keine Korrelation zwischen den GS-Aktivitäten und den Aminosäurekonzentrationen im Phloemsaft ableiten.

**Tabelle 3-16.** Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft der GSL1-antisense-gehemmten Pflanzen (F2-1) und ihrer Ausgangssorte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben (n=9-11).

	Falcon	F2-1
<i>glu</i> (%)	26.9 ± 11.1	23.6 ± 6.1
<i>gln</i> (%)	14.8 ± 5.0	27.6 ± 9.6
<i>asp</i> (%)	14.2 ± 7.6	9.1 ± 2.1
<i>asn</i> (%)	5.4 ± 3.2	3.6 ± 1.2
<i>ser</i> (%)	13.3 ± 8.0	12.9 ± 2.9
<i>gly</i> (%)	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3
ΣAminosäure (mM)	398 ± 186	412 ± 98
Saccharose (mM)	1092 ± 268	1320 ± 322
Saccharose/ΣAminosäure	2.7	3.2

### 3.4 Transgene Pflanzen mit Expression der Asparagin-Synthetase A aus *E.coli* (AsnA)

In *E. coli* gibt es zwei Asparaginsynthetase-Formen: eine (AsnA) ist  $\text{NH}_4^+$ -abhängig und von *asnA* codiert (Nakamura et al. 1981), die andere (AsnB) ist Gln-abhängig und von *asnB* codiert (Scofield et al. 1990). Die AsnA aus *E. coli* katalysiert eine analoge Reaktion zur pflanzlichen GS, in der Asparagin aus Aspartat und Ammonium unter Verbrauch von ATP produziert wird (Sugiyama et al. 1992). Aus diesem Grund wurden, zur Einführung eines alternativen Wegs für die Ammonium-

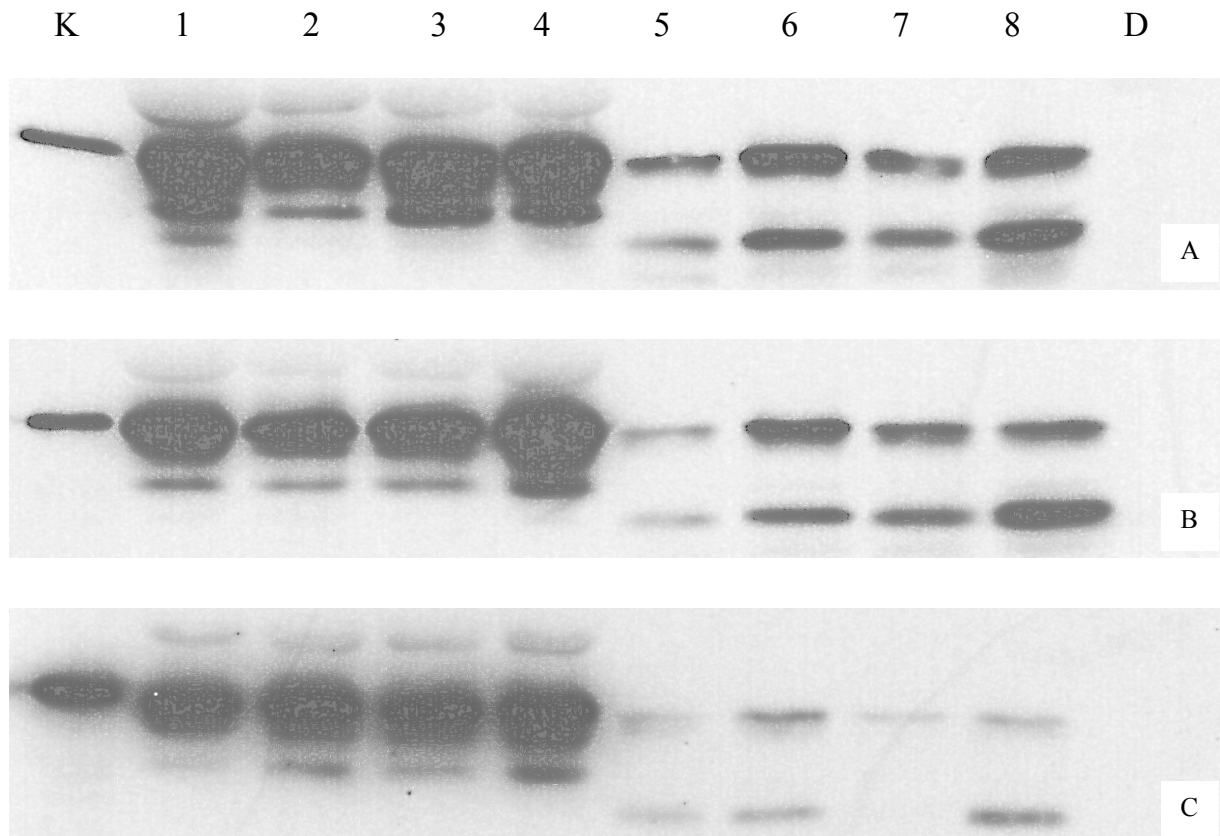
Bindung in der Rapspflanze, Transformanten mit *asnA* in sense aus *E. coli* erzeugt (Wallbraun 1997).

Aus den Transformanten wurden drei transgene Klone H18-6, H18-8 und H24-2 biochemisch charakterisiert. Die Pflanzen wurden zusammen mit ihrer Ausgangssorte Drakkar im Gewächshaus auf Hydrokultur (4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) mit zusätzlicher Belichtung angezogen. Blatt-, Wurzel-, Phloemsaft- und Xylemsaftproben wurden gewonnen und analysiert.

Unter Gewächshaus-Bedingungen zeigten die transgenen Pflanzen keine phänotypischen Unterschiede zur Ausgangssorte. Die Pflanzen auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Nährlösung wuchsen schlecht und waren viel kleiner als die auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Nährlösung angezogenen Pflanzen. Die NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ernährung führte auch zu früherem Blattabwurf.

#### **3.4.1 Nachweis der Expression der AsnA aus *E. coli* in der Rapspflanze durch Western-Blot-Analyse**

Bei der Elektrophorese wurden je 10 µg Protein aus einem Blatt- oder Wurzel-extrakt aufgetragen. Die Expression der AsnA aus *E. coli* in den Rapspflanzen wurde nach dem Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen und der anschließenden Inkubation mit den polyklonalen Antikörpern gegen AsnA aus *E. coli* sowie den sekundären Antikörpern durch "Enhanced Chemiluminescence" nachgewiesen (Abb. 3-13). Ein Signal war in allen Blatt- und Wurzelproben der Transformanten H18-6 (Bild A), H18-8 (Bild B) und H24-2 (Bild C) zu sehen. Die Proben der Ausgangssorte Drakkar ergaben kein positives Signal. Obwohl das Gen *asnA* aus *E. coli* unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors ist, scheint es auf der translationalen Ebene eine unterschiedliche Expression in Blättern und in Wurzeln der Rapspflanzen zu geben. Die Signale der Blattproben sind stärker als die der Wurzelproben. Anhand der Ergebnisse ist kein Unterschied zwischen Licht- und Dunkelproben zu erkennen. Aber die Signale der Wurzelproben bei Ammonium-Ernährung sind einheitlich stärker als die bei Nitrat-Ernährung. Dies wurde noch bei zwei anderen Wiederholungen nachgewiesen.



**Abbildung 3-13.** Western-Blot Analyse zum Nachweis der Expression der AsnA aus *E. coli*.

Bild A: H18-6, Bild B: H18-8, Bild C: H24-2.

Bahn K: aufgereinigtes AsnA-Protein aus *E.coli* als Kontrolle, ca. 37 kDa; Bahn D: Proben von der Ausgangsorte Drakkar (Bild A, Blattprobe am Ende der Lichtperiode auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Bild B, Wurzelprobe am Ende der Lichtperiode auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Bild C, Blattprobe am Ende der Dunkelperiode auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); Bahn 1: Blattprobe am Ende der Lichtperiode auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Bahn 2: Blattprobe am Ende der Lichtperiode auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; Bahn 3: Blattprobe am Ende der Dunkelperiode auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Bahn 4: Blattprobe am Ende der Dunkelperiode auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; Bahn 5: Wurzelprobe am Ende der Lichtperiode auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Bahn 6: Wurzelprobe am Ende der Lichtperiode auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; Bahn 7: Wurzelprobe am Ende der Dunkelperiode auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Bahn 8: Wurzelprobe am Ende der Dunkelperiode auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

(Bei der Elektrophorese wurden 10 µg Protein je Tasche aufgetragen. Der polyklonale Antikörper ergab einige unspezifische Signale.)

### 3.4.2 *In vitro* Enzymaktivitäten der Asparaginsynthetase, Glutaminsynthetase und Nitratreduktase der Rapspflanzen mit *AsnA* aus *E. coli*

Die *AsnA* aus *E. coli* ist  $\text{NH}_4^+$ -abhängig (Nakamura et al. 1981). Obwohl die bislang untersuchten Asparaginsynthetasen aus Pflanzen Gln-abhängig sind, konnten die meisten von ihnen *in vitro* unter einer hohen  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration die Synthese von Asn katalysieren (Shi et al. 1997). Im vorigen Abschnitt 3.4.1 ist die Expression der *AsnA* aus *E. coli* in den Rapspflanzen nachgewiesen worden. In diesem und den kommenden Abschnitten wird gezeigt, inwieweit die Expression der *AsnA* aus *E. coli* in Rapspflanzen ihren Aminosäuremetabolismus beeinflusste. Aufgrund der aufwendigen Messungen werden die Ergebnisse gemischter Proben aus jeweils vier Pflanzen angegeben.

In den folgenden Tabellen sind die Enzymaktivitäten der Asparaginsynthetase, der Glutaminsynthetase und der Nitratreduktase in den Pflanzen mit der *AsnA* aus *E. coli* im Vergleich mit ihrer Ausgangssorte dargestellt. Da *asnA* unter Kontrolle des 35S Promotors konstitutiv exprimiert ist, wurden die Meßwerte am Ende der Licht- und Dunkelperiode gemittelt.

Bei *in vitro* Enzymtests zeigen die transgenen Pflanzen mit der *AsnA* aus *E. coli* im Vergleich mit ihrer Ausgangssorte eine erhöhte Asparaginsynthetase-Aktivität in den Blättern und den Wurzeln. Die Asparaginsynthetase-Aktivität (Gln als Substrat) der transgenen Klone ist bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  5-20fach höher und bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  7-50fach höher als die der Ausgangssorte Drakkar. Bei Aktivitätsmessungen mit  $\text{NH}_4^+$  als Substrat ist die Asparaginsynthetase-Aktivität der transgenen Pflanzen noch überwiegend höher als die der Ausgangssorte (Tab. 3-17-A).

Außerdem wurde die Asparaginsynthetase-Aktivität im Blatt fünf anderer transgener Rapspflanzen bestimmt, bei denen das *asnA*-Gen aus *E. coli* mit einem Transitpeptid für Transport in den Chloroplasten verbunden war. Die Pflanzen wurden parallel mit ihrer Ausgangssorte Drakkar auf Komposterde im Gewächshaus angezogen. Tabelle 3-17-B zeigt, daß die Enzymaktivität (Gln als Substrat) im Blatt dieser transgenen Pflanzen 18-80fach höher war als in der Ausgangssorte Drakkar. Die Aktivitätsmessungen mit Ammonium als Substrat zeigten eine noch höhere Aktivität.

**Tabelle 3-17-A.** Asparaginsynthetase-Aktivität in Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* und der Ausgangssorte Drakkar. Die Meßwerte gemischter Blatt- und Wurzelproben aus jeweils 4 Pflanzen sind dargestellt. Im Reaktionsansatz wurde Gln oder  $\text{NH}_4^+$  als Substrat zugegeben. Die Einheit ist *nmol Asn/mg Protein/h*.

<i>Akt. mit Gln</i>	<b>Drakkar</b>		<b>H18-6</b>		<b>H18-8</b>		<b>H24-2</b>	
	<u>Blatt</u>	<u>Wurzel</u>	<u>Blatt</u>	<u>Wurzel</u>	<u>Blatt</u>	<u>Wurzel</u>	<u>Blatt</u>	<u>Wurzel</u>
4 mM $\text{NO}_3^-$	3.2	1.9	69	38	70	31	61	10
4 mM $\text{NH}_4^+$	1.4	5.0	74	51	47	63	69	33
<i>Akt. mit <math>\text{NH}_4^+</math></i>								
4 mM $\text{NO}_3^-$	0.3	0.7	166	104	117	78	177	119
4 mM $\text{NH}_4^+$	0.1	1.1	185	97	105	92	116	84

**Tabelle 3-17-B.** Asparaginsynthetase-Aktivität im Blatt von Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* und einem Transitpeptid für Transport in den Chloroplasten, und der Ausgangssorte Drakkar. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei Messungen. Im Reaktionsansatz wurde Gln oder  $\text{NH}_4^+$  als Substrat zugegeben. Die Einheit ist *nmol Asn/mg Protein/h*.

	<u>Drakkar</u>	<u>AsnAtp 14</u>	<u>AsnAtp 63</u>	<u>AsnAtp 86</u>	<u>AsnAtp 154</u>	<u>AsnAtp 215</u>
<i>Akt. mit Gln</i>	1.4	107	66	26	54	67
<i>Akt. mit <math>\text{NH}_4^+</math></i>	1	323	253	56	313	274

Die GS-Aktivität in den Blättern liegt bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  zwischen 35 (H24-2) und 57  $\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamat/g FG/h}$  (Drakkar), bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  zwischen 33 (Drakkar) und 43  $\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamat/g FG/h}$  (H18-6). Die Aktivität in den Wurzeln ergibt bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  Werte zwischen 22 und 24  $\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamat/g FG/h}$ , bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  zwischen 16 und 24  $\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamat/g FG/h}$ . Die transgenen Pflanzen zeigten keine deutlichen Veränderungen der GS-Aktivität in den Blättern oder Wurzeln (Tab. 3-18).

Die Nitratreduktase-Aktivität bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  liegt in den Blättern zwischen 127 (H18-8) und 229 nmol Nitrit/g FG/h (Drakkar), in den Wurzeln zwischen 73 (H18-8) und 98 nmol Nitrit/g FG/h (H18-6). Die NR-Aktivität bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  ist sehr gering (Tab. 3-19). Zudem ist keine Änderung der NR-Aktivität in den transgenen Pflanzen zu erkennen.

**Tabelle 3-18.** Glutaminsynthetase-Aktivität in Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* und der Ausgangssorte Drakkar. Dargestellt sind die Meßwerte gemischter Blatt- oder Wurzelproben aus jeweils 4 Pflanzen. Die Einheit ist  $\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamat/g FG/h}$ .

<b>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Drakkar</b>	<b>H18-6</b>	<b>H18-8</b>	<b>H24-2</b>
Blatt	57	46	52	35
Wurzel	24	22	22	23
<b>4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>				
Blatt	33	43	39	40
Wurzel	20	24	29	16

**Tabelle 3-19.** Maximale Nitratreduktase-Aktivität in Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* und der Ausgangssorte. Dargestellt sind die Meßwerte gemischter Blatt- oder Wurzelproben aus jeweils 4 Pflanzen. Die Einheit ist  $\text{nmol Nitrit/g FG/min}$ .

<b>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Drakkar</b>	<b>H18-6</b>	<b>H18-8</b>	<b>H24-2</b>
Blatt	229	178	127	185
Wurzel	92	98	73	91
<b>4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>				
Blatt	18	23	14	17
Wurzel	7	8	8	6

### 3.4.3 Metabolitgehalte in Blättern und Wurzeln der Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* unter Kontrolle des 35S-Promotors

Zur Untersuchung der Auswirkungen der eingeführten AsnA aus *E. coli* in den Rapspflanzen (H18-6, H18-8 und H24-2) wurden die Metabolitgehalte in Blättern und Wurzeln analysiert. Im Vergleich zur Ausgangssorte Drakkar zeigten die transgenen Pflanzen keine veränderten Metabolitgehalte, sowohl bei variierter Stickstoff-Ernährung (Nitrat oder Ammonium) als auch bei Licht/Dunkel-Wechsel (am Ende der Licht- oder Dunkelperiode). Die Ergebnisse am Ende der Lichtperiode sind in den Tabellen 3-20-A und -B angegeben.

**Tabelle 3-20-A.** Metabolitgehalte in Blättern und Wurzeln der Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* im Vergleich mit der Ausgangssorte auf 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> am Ende der Lichtperiode. Dargestellt sind die Meßwerte der gemischten Blatt- oder Wurzelproben aus jeweils vier Pflanzen. Die Einheit ist  $\mu\text{mol/g FG}$ , für Protein  $\text{mg/g FG}$ .

	Blatt - Lichtperiode				Wurzel - Lichtperiode			
	Drakkar	H18-6	H18-8	H24-2	Drakkar	H18-6	H18-8	H24-2
glu (%)	25	28	25	25	16	15	18	18
gln (%)	26	20	23	16	33	33	28	31
asp (%)	18	28	15	17	5.7	5.7	8.2	6.0
asn (%)	1.3	1.2	2.6	1.3	2.6	2.6	2.3	1.9
ser (%)	10	12	10	15	3.8	3.4	3.3	3.8
gly (%)	3.6	3.2	3.2	4.4	2.9	2.2	2.1	2.7
$\Sigma$ Aminosäure	18.6	13.5	13.7	13.4	5.8	6.5	4.3	3.7
Protein	29	29	29	26	7.4	7.0	10.8	7.5
Nitrat	9	6	10	10	19	19	15	17
Stärke	76	65	48	47	0.4	0.3	0.7	0.5
Glukose	10.4	4.0	4.3	4.5	2.9	2.6	2.4	2.0
Fruktose	5.6	3.1	4.0	3.6	0.2	0.3	0.2	0.4
Saccharose	3.0	2.1	1.8	1.8	0.9	0.9	1.1	1.0
Malat	17	17	20	19	3.1	6.3	2.7	2.2
Saccharose $\Sigma$ Aminosäure	0.16	0.16	0.13	0.13	0.15	0.13	0.27	0.26

Die transgenen Pflanzen hatten bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und am Ende der Lichtperiode weniger Gesamtaminosäuren und Kohlenhydrate im Blatt als die Ausgangssorte Drakkar. Der Anteil von Asparagin an den Gesamtaminosäuren im Blatt war bei H18-6 und H24-2 unverändert, bei H18-8 verdoppelt. Trotzdem zeigten die Aminosäuremuster allgemein keine großen Unterschiede. Der Metabolitgehalt der Wurzeln war ebenfalls unverändert (Tab. 3-20-A).



**Tabelle 3-20-B.** Metabolitgehalte in Blättern und Wurzeln der Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* im Vergleich mit der Ausgangssorte auf 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> am Ende der Lichtperiode. Dargestellt sind die Meßwerte der gemischten Blatt- oder Wurzelproben aus jeweils vier Pflanzen. Die Einheit ist  $\mu\text{mol/g FG}$ , für Protein  $\text{mg/g FG}$ .

	Blatt - Lichtperiode				Wurzel - Lichtperiode			
	Drakkar	H18-6	H18-8	H24-2	Drakkar	H18-6	H18-8	H24-2
glu (%)	9	19	13	28	13	14	13	17
gln (%)	51	33	31	22	28	27	33	29
asp (%)	2.6	5.1	3.6	8.3	5.4	5.6	5.1	5.3
asn (%)	2.0	3.4	1.7	2.2	2.6	2.6	2.7	2.5
ser (%)	11	12	17	10	9.5	6.5	8.6	6.4
gly (%)	1.6	1.3	2.4	1.7	1.9	1.9	1.8	1.7
$\Sigma$ Aminosäure	29.3	19.2	14.9	10.1	11.3	8.6	12.4	8.1
Protein	35	31	29	28	16	14	18	15
Nitrat	0.2	0.7	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
Stärke	100	19	70	18	0.9	1.0	1.4	1.3
Glukose	17	9	17	5	2.2	2.0	2.3	1.6
Fruktose	12	7	14	4	0.1	0.3	0.7	0.3
Saccharose	4.1	3.2	4.5	2.3	3.1	3.0	3.9	2.3
Malat	1.5	1.4	1.4	5.1	0.6	0.1	*	0.6
<u>Saccharose</u>								
$\Sigma$ Aminosäure	0.14	0.17	0.30	0.23	0.27	0.35	0.31	0.28

\* nicht gemessen

Aufgrund der Ammonium-Abhängigkeit der AsnA aus *E. coli* war zu erwarten, daß die transgenen Pflanzen bei der Ammonium-Ernährung Vorteile gegenüber der Ausgangssorte besäßen. Trotzdem zeigten die transgenen Pflanzen bei 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ebenso wie bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> keine erhöhten Asparagin-Werte. Die Gesamtaminosäuregehalte im Blatt am Ende der Lichtperiode nahmen ab (Tab. 3-20-B). Die Gehalte der anderen Metabolite und die Aminosäuremuster im Blatt sowie die Metabolitgehalte

in der Wurzel waren im Vergleich zur Kontrolle Drakkar verändert oder ohne gemeinsame Tendenz.

#### **3.4.4 Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen in Phloem- und Xylemsaft der transgenen Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli***

In Tabellen 3-21 und 3-22 sind die Saccharose- und Aminosäurekonzentrationen sowie die Aminosäuremuster im Phloem- und Xylemsaft der transgenen Rapspflanzen dargestellt. Im Xylemsaft wird sowohl Nitrat als auch Ammonium transportiert. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen besteht kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf den Phloem- und Xylemtransport für Aminosäuren und Saccharose zwischen den transgenen Pflanzen und der Ausgangssorte, sowohl bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$  als auch bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$ . Die Aminosäurekonzentration im Phloem- und Xylemsaft der Rapspflanzen bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  ist erheblich höher als die bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$ , während die entsprechenden Saccharosekonzentrationen nicht so stark erhöht sind. Aus diesem Grund ist das Saccharose/ $\Sigma$ Aminosäure-Verhältnis bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  niedriger als bei 4 mM  $\text{NO}_3^-$ . Dieses Phänomen gilt ebenfalls für die Gehalte von Gesamtaminosäuren und Saccharose in Blatt und Wurzel der Rapspflanzen.

**Tabelle 3-21.** Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft der Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* im Vergleich mit der Ausgangssorte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben (n=3-7).

<b>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Drakkar</b>	<b>H18-6</b>	<b>H18-8</b>	<b>H24-2</b>
<i>glu</i> (%)	25	24	22	24
<i>gln</i> (%)	19	24	20	24
<i>asp</i> (%)	12	8	11	11
<i>asn</i> (%)	3.2	2.3	3.6	3.4
<i>ser</i> (%)	11	11	7	10
<i>gly</i> (%)	1	1	1	1
ΣAminosäure (mM)	316 ± 126 (100%)	476 ± 137 (100%)	351 ± 137 (100%)	338 ± 38 (100%)
Saccharose(mM)	824 ± 160	970 ± 116	745 ± 395	741 ± 162
<u>Saccharose</u> ΣAminosäure	2.6	2.0	2.1	2.2
<b>4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>				
<i>glu</i> (%)	2.2	7.2	3.4	5.1
<i>gln</i> (%)	51	39	36	47
<i>asp</i> (%)	0.3	1.8	0.5	1.7
<i>asn</i> (%)	2.9	3.8	3.4	4.1
<i>ser</i> (%)	13	9	14	9
<i>gly</i> (%)	1	1	1	1
ΣAminosäure (mM)	847 ± 320 (100%)	975 ± 725 (100%)	768 ± 236 (100%)	629 ± 202 (100%)
Saccharose (mM)	815 ± 324	1281 ± 357	1181 ± 133	1083 ± 53
<u>Saccharose</u> ΣAminosäure	1.0	1.3	1.5	1.7

**Tabelle 3-22.** Aminosäure-, Nitrat-, Ammonium- und Saccharosekonzentrationen im Xylemsaft der Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* im Vergleich mit der Ausgangssorte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben (n=4).

<b>4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Drakkar</b>	<b>H18-6</b>	<b>H18-8</b>	<b>H24-2</b>
<i>glu</i> (%)	3.8	2.0	4.1	5.2
<i>gln</i> (%)	47	53	50	46
<i>asp</i> (%)	21	19	18	17
<i>asn</i> (%)	2.8	2.8	2.6	3.0
<i>ser</i> (%)	2	2	2	3
<i>gly</i> (%)	1	1	2	2
ΣAminosäure (mM)	3.2 ± 0.9 (100%)	4.8 ± 1.4 (100%)	2.3 ± 0.08 (100%)	2.9 ± 0.05 (100%)
Nitrat (mM)	1.2 ± 0.6	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.7	2.5 ± 1.3
Ammonium (mM)	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.03
Saccharose (mM)	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.13 ± 0.06	0.18 ± 0.08
$\frac{\text{Saccharose}}{\Sigma\text{Aminosäure}}$	0.04	0.02	0.05	0.06
<b>4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>				
<i>glu</i> (%)	1.6	1.8	2.4	0.8
<i>gln</i> (%)	70	66	61	76
<i>asp</i> (%)	5	6	11	5
<i>asn</i> (%)	3.0	3.2	3.0	2.9
<i>ser</i> (%)	2	3	2	2
<i>gly</i> (%)	1	1	1	1
ΣAminosäure (mM)	16.9 ± 2.3 (100%)	13.0 ± 1.1 (100%)	16.8 ± 3.7 (100%)	25.9 ± 4.9 (100%)
Nitrat (mM)	0.62 ± 0.32	0.84 ± 0.32	0.55 ± 0.19	1.36 ± 0.81
Ammonium (mM)	1.02 ± 0.02	1.14 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.94 ± 0.01
Saccharose (mM)	0.20 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.15 ± 0.06	0.11 ± 0.04
$\frac{\text{Saccharose}}{\Sigma\text{Aminosäure}}$	0.01	0.01	0.01	0.004

## 4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Blattmetabolismus, Phloemtransport, Proteinspeicherung im Samen und N-Effizienz bei verschiedenen Rapsgenotypen zu untersuchen. Daher wurden verschiedene photosynthetisch aktive Organe und Transport-Gewebe in verschiedenen Winterraps-Genotypen in Feldversuchen, sowie in ausgewählten Genotypen und in transgenen Pflanzen unter Gewächshausbedingungen analysiert.

### 4.1 Hintergrund der Untersuchung zur Stickstoff-Effizienz bei Raps

Raps ist die wichtigste Öl-liefernde Kulturpflanze in Europa. Der Anbau von Raps ist zur Zeit noch für die Umwelt problematisch: Einerseits ist die N-Düngung für die Ertragsbildung notwendig, andererseits kann der in vegetativen Pflanzenteilen (wie Blatt, Stroh und Wurzel) verbleibende Stickstoff leicht mineralisiert werden und in Form von Nitrat die Trinkwasservorkommen belasten. Daher ist die Untersuchung der Stickstoff-Effizienz ein Forschungsgebiet mit zunehmender Bedeutung für die Landwirtschaft, sowohl ökonomisch als auch ökologisch (Duncan und Baligar 1990, El Bassan 1990, Barrow 1993). Die Stickstoffeffizienz ist eine multifaktoriale und sehr komplexe Eigenschaft. Nach Duncan und Baligar (1990) sind für die N-Verwertungseffizienz innerhalb der Pflanze die folgenden drei Aspekte von wesentlicher Bedeutung: a) Spiegel und Aktivität der N-verarbeitenden Enzyme, b) Mobilisation und Transport von N-haltigen Verbindungen, und c) Speicherung der N-haltigen Verbindungen. Bis zu Beginn des Projektes war über die Mobilisation und den Transport N-haltiger Verbindungen bei *Brassica* nur wenig bekannt.

Untersuchungen an Weizen (Röbbelen 1994) zeigten, daß eine züchterische Bearbeitung des Zieles N-Effizienz nicht einfach ist. Bei Mais ist die genetische Variation der N-Effizienz schon mehrfach untersucht worden (Muruli und Paulsen 1981; Wiesler und Horst 1992, 1994; Seitz et al. 1993; Presterl und Groh 1994; Landbeck 1995). Der Anbau N-effizienter Maissorten führte zu einer verminderten Nitratauswaschung aus den Feldern (Wiesler und Horst 1993). Die bei Mais erzielten

Ergebnisse sind jedoch nicht ohne weiteres auf Raps übertragbar, da Raps eine Kulturpflanze mit höherem Öl- und Proteingehalt im Samen ist.

## 4.2 Genetische Variation für die N-Effizienz bei Winterraps-Genotypen

Über die genetische Variation der N-Effizienz von Sommerraps unter Feldbedingungen gab es bereits verschiedene Untersuchungen. Grami und LaCroix (1977) verglichen zwei Sorten mit unterschiedlichem Proteingehalt in den Samen und fanden Unterschiede zwischen den beiden Sorten beim N-Gehalt in den Pflanzenteilen wie den Wurzeln, Sprossen und Schoten. Yau und Thurling (1987) untersuchten 40 Sorten unter drei N-Stufen und fanden signifikante Sortenunterschiede für die Nutzungs- und Aufnahmeeffizienz. Die Ergebnisse dieser an Sommerraps durchgeführten Arbeiten lassen grundsätzlich vermuten, daß auch im Winterraps eine erhebliche Variation für N-Effizienz zu erwarten war. Allerdings hat Winterraps eine längere Vegetationsdauer und einen anderen Entwicklungsablauf als Sommerraps.

Jensen et al. (1997) berichteten, daß die N-Nutzungseffizienz bei einer Winterrapssorte unter Feldbedingungen von 47% bei 100 kgN/ha unter Beregnungs-Bedingung bis zu 34% bei 200 kgN/ha unter Nicht-Beregnungs-Bedingung variierte. Außerdem wurden Untersuchungen zur photosynthetischen N-Nutzungseffizienz in Blättern (Jensen et al. 1996) und Schoten (Mogensen et al. 1997) mit einer Winterrapssorte bei unterschiedlichen Wasserversorgungen durchgeführt.

Ein größerer Sortenvergleich bei unterschiedlichem N-Angebot wurde bei Winterraps bisher nur in Gefäßversuchen durchgeführt. Barszczak et al. (1993) fanden zwischen sieben Sorten sowohl Unterschiede im Samen-Ertrag unter N-Mangel als auch in der Reaktion auf eine Steigerung des Stickstoff-Angebots. Sehr große Unterschiede in der Reaktion auf die N-Versorgung beobachteten auch Gerath und Schweiger (1991) sowie Gerath und Balko (1995) und unterteilten daraufhin die untersuchten Genotypen in drei Reaktions-Typen: 1) höchste Erträge nur bei höchster N-Düngung, 2) höchste Erträge schon bei mittlerer N-Düngung und kein weiterer Ertragsanstieg durch zusätzliche N-Düngung, und 3) höchste Erträge schon bei mittlerer N-Düngung und Ertragsrückgang bei höherer N-Düngung. Vergleichende

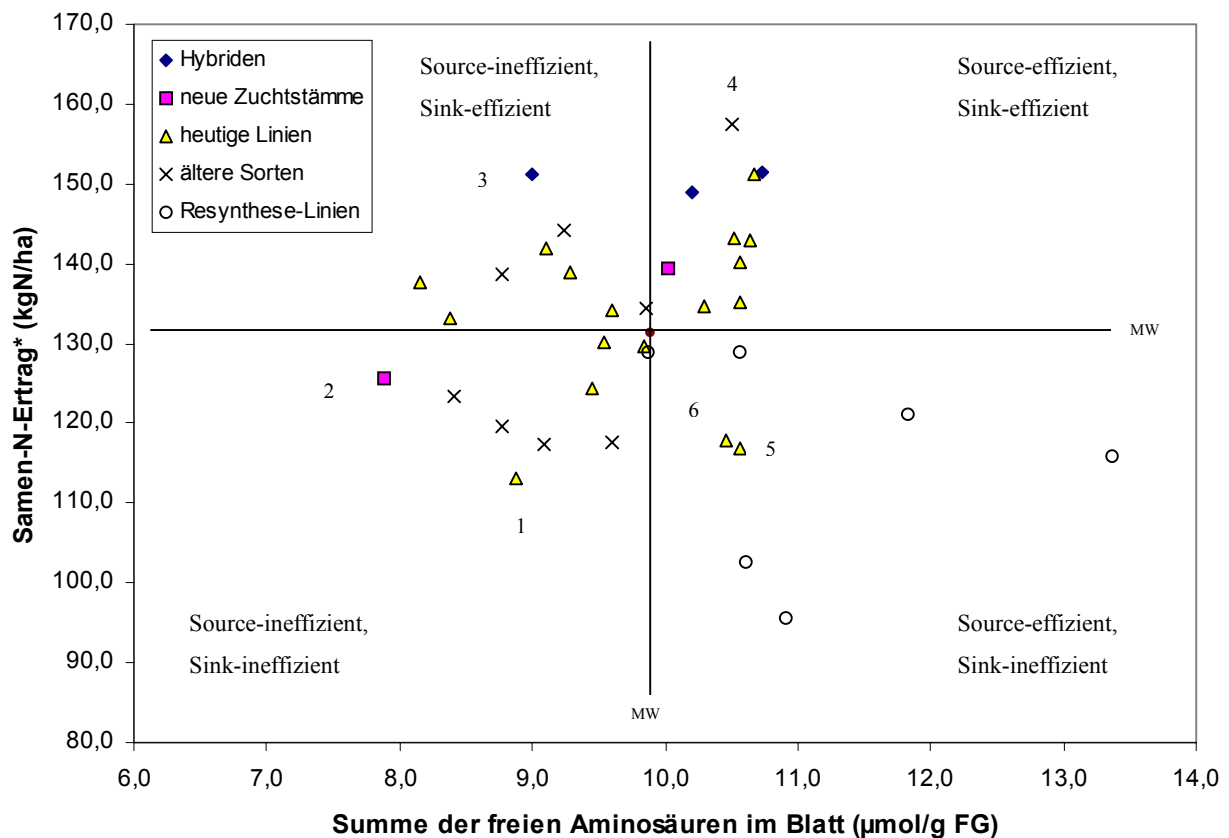
Untersuchungen aus Feldversuchen zur genetischen Variation der N-Effizienz von verschiedenen Winterraps-Genotypen sind bisher aus der Literatur jedoch noch nicht bekannt.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Becker (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen) sind zahlreiche Genotypen von Winterraps in drei Versuchsjahren (1996/1997, 1997/1998 und 1998/1999) auf dem Feld untersucht worden. Anhand der Ertragsergebnisse des Versuchsjahrs 1999 konnte Kessel (2000) festlegen, daß sich die Genotypen nach einem Stickstoff-Effizienz-Schema nur in zwei der vier möglichen Gruppen (ineffizient und non-responder, ineffizient und responder, effizient und non-responder, sowie effizient und responder) einteilen: 1.) in eine ertragsschwächere Gruppe (ineffizient und non-responder), in der hauptsächlich Resynthese-Linien und ältere Sorten vertreten sind, die in beiden N-Düngungsstufen nur unterdurchschnittliche Kornerträge liefern und; 2.) in eine ertragsstarke Gruppe (effizient und responder), mit neueren Linien und Hybriden, die in beiden N-Düngungsstufen überschnittliche Kornerträge liefern.

Aufgrund der Ergebnisse in den Jahren 1998 und 1999 zeigten diese Genotypen darüber hinaus eine breite genetische Variation im Blatt-Metabolismus: Die Nitratreduktase-Aktivität im Blatt (Abb. 3-1) schwankte unter N=0 kgN/ha zwischen 24 (Capitol, heutige Linie) und 62 nmol Nitrit/g FG/min (RS6, Resynthese-Linie), unter N=240 kgN/ha zwischen 39 (Hektor, ältere Sorte) und 86 nmol Nitrit/g FG/min (RS1, Resynthese-Linie). Die Summe der freien Aminosäuren im Blatt (Abb. 3-2) variierte unter N=0 kgN/ha zwischen 5.1 (Apex, heutige Linie) und 9.6 µmol/g FG (RS3, Resynthese-Linie), unter N=240 kgN/ha zwischen 9.9 (DP-HB-1, neuer Zuchtstamm) und 13.4 µmol/g FG (RS3). Die Summe C (aus Stärke, Glukose, Fruktose, Saccharose, Malat und freien Aminosäuren) im Blatt (Abb. 3-3) lag unter N=0 kgN/ha zwischen 504 (RS6) und 1157 µmol/g FG (Lisabeth, heutige Linie), unter N=240 kgN/ha zwischen 409 (DH Samourai, heutige Linie) und 758 µmol/g FG (RS3). Die Resynthese-Linien zeigten im Vergleich zu den anderen Genotypen insgesamt eine höhere Nitratreduktase-Aktivität und höhere Aminosäuregehalte im Blatt sowie einen höheren Proteingehalt im Samen aber einen niedrigeren Samen-N-Ertrag (Tab. 3-4).

In Bezug auf die Kriterien von Samen-N-Ertrag und Stroh-N-Ertrag können die Genotypen ebenso in vier Gruppen aufgeteilt werden: 1) N-Düngung bewirkt eine nur geringe Steigerung von Samen-N-Ertrag und Stroh-N-Ertrag, 2) N-Düngung bewirkt eine starke Steigerung von Samen-N-Ertrag und Stroh-N-Ertrag, 3) N-Düngung bewirkt hauptsächlich eine Steigerung von Samen-N-Ertrag und, 4) N-Düngung bewirkt hauptsächlich eine Steigerung von Stroh-N-Ertrag (Kessel 2000). In Anlehnung an das oben beschriebene Unterteilungs-Schema und unter Berücksichtigung der NR-Aktivität und der Summe der freien Aminosäuren im Blatt, sowie dem Samen-N-Ertrag könnten die untersuchten Genotypen in einem ähnlichen Schema in vier Gruppen aufgeteilt werden: 1.) Source-ineffizient/Sink-ineffizient, 2.) Source-ineffizient/Sink-effizient, 3.) Source-effizient/Sink-ineffizient, und 4.) Source-effizient/Sink-effizient (Abb. 4-1). Dieses Einteilungs-Schema für die N-Effizienz der Winterraps-Genotypen beruht auf folgenden Annahmen: 1) Bei Rapspflanzen gehören die Blätter zu den Source-Organen und die reifenden Samen zu den Sink-Organen. Die Samen erhalten ihre meisten N-Verbindungen aus den Blättern über das Phloem. Dazu zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der NR-Aktivität und der Summe der freien Aminosäuren im Blatt (Abb. 3-4). Die NR-Aktivität ist einer der drei wesentlichen Aspekte für die Bewertung von Stickstoff-Effizienz (Duncan und Baligar 1990). 2) Die auf dem Feld zurückbleibenden Ernterückstände und die abgeworfenen Blätter beinhalten noch hohe Stickstoff-Mengen und könnten nach der Ernte zur Nitratauswaschung beitragen (Lickfett et al. 1994). 3) Ein Genotyp mit höherem Samen-N-Ertrag hat insgesamt eine höhere Sink-Kapazität und kann daher während des Wachstums- und Entwicklungsablaufs mehr Stickstoff aufnehmen, verwerten und in den Samen speichern. Im diesem Schema liegen alle sechs Resynthese-Linien in der Gruppe von „Source-effizient/Sink-ineffizient“, während die meisten Hybriden und neuen Zuchtstämme „Sink-effizient“ bzw. die meisten älteren Sorten „Source-ineffizient“ sind. Nur zwei der 17 untersuchten heutigen Linien gehören zu der Gruppe „Source-effizient/Sink-ineffizient“, die anderen heutigen Linien sind in den übrigen drei Gruppen gleichmäßig verteilt.





**Abbildung 4-1.** Einteilung der 36 in den Jahren 1998 und 1999 untersuchten Winter-  
raps-Genotypen nach ihren Aminosäuregehalten im Blatt und Samen-N-Ertrag (6  
Orte). Dargestellt sind die gemittelten Werte beider N-Bedingungen (N=0 und N=240  
kgN/ha).

1-, „DH Samourai“, 2-, „DP-HB-1“, 3-, „RNX9505“, 4-, „Lembkes Normal“, 5-, „Lirajet“,  
6-, „Alaska“. \* Daten aus Kessel (2000) im Rahmen der Arbeit eines DFG-Projekts

Auch unter Gewächshaus-Bedingungen zeigten die acht Winterraps-Genotypen genetische Variationen des Blatt- und Wurzel-Metabolismus sowie des Phloem- und Xylemtransports, sowohl bei geringer N-Versorgung (0.5 mM Nitrat) als auch bei hoher N-Versorgung (4 mM Nitrat). Zwischen den Genotypen sind Unterschiede im Metabolitgehalt (Tab. 3-8), in der Aktivität N-assimilierender Enzyme wie Nitrat-reduktase (Tab. 3-9) und Glutaminsynthetase (Tab. 3-10) sowie im Phloem- und Xylemtransport (Tab. 3-11-A und -B) erkennbar. Unter Gewächshaus-Bedingungen zeigten die Resynthese-Linien (RS3 und S27) andere Eigenschaften als im Feldversuch. Im Gewächshaus auf Hydrokultur sind bei den Resynthese-Linien

gegenüber den anderen Genotypen keine deutlichen Unterschiede mehr erkennbar. Lediglich die Aminosäure-Konzentration im Phloem von RS3 und S27 war unter 4 mM Nitrat leicht erhöht (Tab. 3-11-A). Die „überoptimalen“ Bedingungen im Gewächshaus führten vermutlich dazu, daß die Unterschiede der Genotypen nicht mehr so stark ausgeprägt waren.

### **4.3 Beitrag des Blattmetabolismus und des Phloemtransports zur N-Effizienz bei Winter-Raps**

Nach der N-Aufnahme in Form von Nitrat oder Ammonium aus dem Boden oder der Nährlösung, bzw. in Form von Ammonium bei Symbionten, wird der anorganische Stickstoff durch energie-verbrauchende Reaktionen zu Aminosäuren assimiliert. Die Assimilation von Ammonium erfolgt normalerweise in den Wurzeln, während die Nitratassimilation, abhängig von der Art und Umwelt-Bedingungen, entweder in den Wurzeln oder nach dem Xylem-Transport in den Blättern stattfindet (Andrews 1986). Die im Blatt synthetisierten Aminosäuren können über das Phloem zu den Sink-Organen transportiert werden.

Lohaus und Möllers (2000) verglichen zwei *Brassica napus* L. Genotypen (DSV15, Duplo) und einen *B. carinata* Genotyp (BRA1151/90) unter Gewächshaus-Bedingungen und fanden, daß der Proteingehalt im Samen mit dem Aminosäuretransport im Phloem korreliert. Ein Winterraps-Genotyp DSV15 mit dem niedrigsten Proteingehalt im Samen zeigte auch die geringste Aminosäure-Konzentration im Phloemsaft, sowie die geringste Nitratreduktase-Aktivität im Blatt. Dagegen zeigten der Sommerraps-Genotyp Duplo mit mittlerem Proteingehalt im Samen und der *B. carinata* Genotyp BRA1151/90 mit hohem Proteingehalt im Samen entsprechend höhere Werte. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den Mais-Genotypen (Illinois-Low-Protein und Illinois-High-Protein) gefunden (Lohaus et al. 1998). Untersuchungen an *Brassica juncea* und *B. campestris* (Suresh et al. 1996) zeigten eine positive Korrelation zwischen Blatt-N-Gehalt und photosynthetischer CO<sub>2</sub>-Fixierung sowie eine negative Korrelation zwischen photosynthetischer N-Nutzungs-Effizienz und dem Blatt-N-Gehalt. Die Arbeiten von McNeal et al. (1972) mit Weizen und von Clements (1973) mit Weidegras (*Phalaris tuberosa* L.) deuteten

auf einen negativen Zusammenhang zwischen dem Samen-Ertrag und dem Proteingehalt im Samen hin.

Bei den zahlreichen Rapsgenotypen war lediglich eine positive Korrelation zwischen der Nitratreduktase-Aktivität und dem Aminosäuregehalt in den jungen Blättern (Gewächshausversuche), in den „source“-Blättern (Feld- und Gewächshausversuche) sowie in den Wurzeln (Gewächshausversuche) zu erkennen (Abb. 3-4 und 3-12). In den alten Blättern (Gewächshausversuche) zeigte sich keine Korrelation mehr, da in seneszenten Blättern die Nitratreduktase-Aktivität sehr gering ist und die Proteine zu Aminosäuren abgebaut werden. Zwischen dem Proteingehalt im Samen, dem N-Ertrag im Samen, dem Aminosäuregehalt im Blatt und der Aminosäurekonzentration im Phloem-saft zeigte sich keine Korrelation (Abb. 3-5 und 3-7, Tab. 3-4, 3-5, 3-8 und 3-11-A).

#### 4.3.1 Aminosäuretransport bei Winterraps

Phloem und Xylem bilden das Verbindungssystem zwischen verschiedenen Organen der Pflanzen und sind für den Ferntransport unterschiedlicher Substanzen wie z.B. Metabolite, Ionen, Hormone usw. verantwortlich. Ergebnisse aus Versuchen an Bäumen (Gessler et al. 1998, Peuke et al. 1998, Weber et al. 1998, Youssefi et al. 2000) sowie Weizen und Bohne (Saravitz et al. 1998) zeigten, daß der Phloem- und Xylemtransport von der Pflanzen-Entwicklungsphase abhängig ist. Die Konzentrationen und die relativen Anteile der transportierten Substanzen im Phloem- und Xylemsaft sind unterschiedlich in verschiedenen Pflanzenteilen bzw. bei unterschiedlichen Ernährungs-Bedingungen.

Obwohl freie Aminosäuren sowohl im Phloem als auch im Xylem transportiert werden, sind die relativen Konzentrationen der Aminosäuren im Phloem viel höher als die im Xylem, z.B. ist die Aminosäure-Konzentration im Xylem von *Urtica* 3-20 mM (Rosnitschek-Shimmel 1985), von Fichte 3.4-12.7 mM, von Buche 2.4-8.6 mM (Gessler et al. 1998), von Mais-Genotypen 0.6-2.4 mM (Lohaus et al. 1998) und von den hier untersuchten Winterraps-Genotypen 4.0-7.3 mM (Tab. 3-11-B). Die Aminosäure-Konzentration im Phloem ist dagegen von Zucker- und Futterrüben 100-

200 mM (Winzer et al. 1996), von Mais-Genotypen 40-120 mM (Lohaus et al. 1998) und von den hier untersuchten Winterraps-Genotypen 300-770 mM (Tab. 3-11-A). Damit ist die Aminosäure-Konzentration im Phloem der Rapspflanzen höher als die verschiedener anderer Pflanzen-Arten (Tab. 4-1). Das deutet darauf hin, daß Raps eine hohe Leistungsfähigkeit für die N-Assimilation und den Aminosäure-Transport im Phloem hat.

**Tabelle 4-1.** Aminosäurekonzentration im Phloemsaft verschiedener Kulturpflanzen

	<u>Aminosäuren im Phloem (mM)</u>
Winterraps (Tab. 3-11-A)	300-770
Mais (Lohaus et al. 1998)	40-120
Spinat (Riens et al. 1991)	ca. 160
Gerste (Winter et al. 1992)	150-200
Zucker- und Futterrüben (Winzer et al. 1996)	100-200

Mit Hilfe der nicht-wässrigen Faktionierung wurde gezeigt, daß etwa 65% der Aminosäuren im Cytosol der Mesophyllzellen von Raps lokalisiert sind (Lohaus und Möllers 2000). Unter der Annahme, daß das Volumen des Cytosols etwa 38 µl/g FG beträgt (Winter et al. 1993 und 1994, Leidreiter et al. 1995), können die cytosolischen Aminosäurekonzentrationen berechnet und mit denen im Phloem von Raps verglichen werden. Bei Winterraps ist die Gesamtaminosäure-Konzentration im Phloem etwa 1.3-2.7fach höher als die im Cytosol der Mesophyllzellen (Tab. 4-2). Dabei ist der Gradient bei 0.5 mM Nitrat höher als bei 4 mM Nitrat. Dies deutet auf eine effizientere Mobilisierung der Aminosäuren unter geringer N-Versorgung hin.

Aus einem Vergleich der Aminosäure-Muster (Tab. 3-6, besonders die Anteile von Gln und Glu) zwischen Phloem und „source“-Blatt sowie zwischen Xylem und Wurzel ergibt sich, daß die jeweiligen Anteile der einzelnen Aminosäuren am Gesamtaminosäure-Gehalt in Blatt, Wurzel, Phloem und Xylem unterschiedlich sind. In „source“-Blättern unter 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist der Anteil von Glutamin (38%) am höchsten, während unter 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> der von Glutamat (47%) am höchsten ist. Im Phloemsaft ist der Anteil von Glutamat (26%) unter beiden Stickstoffbedingungen am höchsten. In

den Wurzeln ist, ähnlich wie in „source“-Blättern, unter 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> der Anteil von Glutamin (32%) am höchsten, während unter 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> der von Glutamat (28%) am höchsten ist. Im Xylemsaft (Wurzeldruckexudat) ist Glutamin die dominierende Aminosäure mit einem Anteil an der Gesamtaminosäure-Konzentration von 75% unter 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> oder von 46% unter 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Der Unterschied des Aminosäuremusters im Phloemsaft zwischen 0.5 mM und 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist nicht so stark wie der in „source“-Blättern, in den Wurzeln und im Xylemsaft.

**Tabelle 4-2.** Gesamtaminosäure-Konzentrationen im Cytosol der Mesophyll-Zellen und im Phloem von „source“-Blättern. Zur Berechnung wurden folgende Werte angenommen: Volumen des Cytosols ist 38 µl/g FG und 65% der Gesamtaminosäuren im Gewebe sind im Cytosol.

	4 mM Nitrat		0.5 mM Nitrat	
	Phloem (mM)	Cytosol (mM)	Phloem (mM)	Cytosol (mM)
Apex	307	397	495	185
Bristol	439	633	400	171
DP-HB-1	675	323	343	137
Express	398	344	369	149
Falcon	366	605	306	174
Lirajet	649	398	381	79
RS3	738	390	437	103
S27	766	392	294	145
<b>MW</b>	<b>535</b>	<b>428</b>	<b>378</b>	<b>142</b>

#### 4.3.2 Einfluß der Nitrat-Versorgung auf den N-Metabolismus und den N-Transport der Winterraps-Pflanzen

Nitrat wird nicht nur als Nährstoff von Pflanzen aufgenommen und verwertet, sondern ist selbst auch an der Regulation der entsprechenden Stoffwechselwege in der Pflanze beteiligt (Bernier et al. 1993, Crawford 1995, Stitt 1999). Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß Nitrat die Transkription des hoch-affinen (*NRT2*) (Amarasingh et al. 1998, Filleur et al. 1998, Krapp et al. 1998, Lejay et al.

1999) und des niedrig-affinen (*NRTI*) (Tsay et al. 1993, Filleur et al. 1998, Lauter et al. 1998, Lejay et al. 1999) Nitrat-Aufnahme-Systems, der Nitratreduktase (*NIA*) (Vaucheret et al. 1990, Gowri et al. 1992, Hoff et al. 1994, Migge et al. 1997, Scheible et al. 1997a), der Nitritreduktase (*NII*) (Hoff et al. 1994, Migge et al. 1997, Scheible et al. 1997a) und der Enzyme der Ammonium-Assimilation über den GOGAT-Weg (*GLN2*, *GLN1*, *GLU*) induziert (Redinbaugh und Campbell 1993, Sakakibara et al. 1997, Scheible et al. 1997a). Dieser Anstieg des Transkript-Levels wurde von einer Zunahme der Nitrat-Aufnahme-Rate (Amarasingh et al. 1998, Gojon et al. 1998, Krapp et al. 1998, Lejay et al. 1999), der Nitratreduktase-Proteinmenge und -Aktivität (Vaucheret et al. 1990, Hoff et al. 1994, Scheible et al. 1997a), sowie der Aktivitäten von Nitritreduktase und Glutaminsynthetase (Scheible et al. 1997a) begleitet. Erhöhte Nitrat-Versorgung führt zum Anstieg der löslichen N-Verbindungen in den Blättern, den Wurzeln sowie im Phloem und im Xylem der Pflanzen (Winzer et al. 1996).

Die Nitrat-Assimilation ist mit der CO<sub>2</sub>-Assimilation eng verbunden. Untersuchungen an Tabak-Mutanten und -Transformanten mit verringerter Nitratreduktase-Aktivität zeigten, daß die Akkumulation des Nitrats zur Akkumulation von Malat und  $\alpha$ -Oxoglutarat führt. Dabei wurden die Expression und die Aktivität der Enzyme, die für die Synthese von Malat und  $\alpha$ -Oxoglutarat zuständig sind, entsprechend erhöht. Die Saccharose-Synthese wurde dagegen nicht von der Nitrat-Akkumulation beeinflusst (Scheible et al. 1997a und 1997b).

Die in dieser Arbeit untersuchten Winterraps-Genotypen zeigten eine ähnliche Tendenz in der Reaktion auf Nitrat-Versorgung wie sie bereits in anderen Untersuchungen (Yau und Thurling 1987, Gerath und Schweiger 1991, Aniol 1994, Gerath und Balko 1995) beobachtet wurden. Die in Feldversuchen ermittelten Werte aller untersuchten Winterraps-Genotypen zeigten, daß Winterraps unter höherer N-Düngung (N=240 kgN/ha) insgesamt einen höheren Nitratgehalt, eine höhere Nitratreduktase-Aktivität und Aminosäurekonzentration im Blatt bzw. einen höheren Proteingehalt und N-Ertrag im Samen, aber eine niedrigere Summe C im Blatt und einen niedrigeren N-Ernte-Index hatten als unter geringerer N-Düngung (N=0 kgN/ha, Tab. 3-1, Abb. 3-1, 3-2 und 3-3).

Auch bei Gewächshaus-Versuchen mit ausgewählten Genotypen unter 0.5 mM bzw. 4 mM Nitrat zeigte sich, daß die Pflanzen unter 4 mM Nitrat höhere Aminosäuregehalte, höhere NR-Aktivitäten und höhere Nitratgehalte, aber niedrigere Stärke-, Saccharose- und Hexosengehalte in den Blättern und den Wurzeln hatten. Daher sind die C/N-Verhältnisse unter 4 mM Nitrat niedriger als unter 0.5 mM Nitrat (Abb. 3-8 und 3-9). Diese Ergebnisse stimmen mit denen bei Zucker- und Futterrüben erzielten Ergebnissen überein (Winzer et al. 1996). Darüber hinaus zeigten die Konzentrationen im Phloem und Xylem eine ähnliche Abhängigkeit von der Nitrat-Versorgung wie sie in den Blättern und Wurzeln beobachtet wurde. Unter 4 mM Nitrat waren mehr N-Verbindungen (im Phloem Aminosäuren; im Xylem Nitrat, Ammonium und Aminosäuren) aber weniger Kohlenhydrate (wie Saccharose) im Phloem und Xylem vorhanden als unter 0.5 mM Nitrat (Tab. 3-11-A und -B).

### **4.3.3 Einfluß der Ammonium-Ernährung auf den N-Metabolismus und den N-Transport der Raps-Pflanzen**

Wie bereits beschrieben, können viele Kulturpflanzen-Arten sowohl Nitrat als auch Ammonium nutzen. Zwei unterschiedliche Aufnahme-Systeme sowie mehrere Ammonium-Transporter wurden in der Wurzel bereits gefunden und charakterisiert (Ullrich et al. 1984, Lee et al. 1992, Wang et al. 1993, Barneix und Causin 1996, Gazzarrini et al. 1999, von Wirén et al. 2000). Die gleichzeitige Verfügbarkeit von Nitrat und Ammonium führte zu einem signifikanten Anstieg des Wachstums und des Ertrags, im Vergleich zur Versorgung mit Nitrat oder Ammonium allein (Cox und Reisenauer 1973, Ta und Ohira 1981, Below und Gentry 1987, Heberer and Below 1989, Hagin et al. 1990, Adriaanse und Human 1993, Cao und Tibbits 1993, Gill und Reisenauer 1993, Chen et al. 1998). Wenn Ammonium jedoch als einzige N-Quelle verfügbar ist, zeigen viele Pflanzen-Arten Symptome von Ammoniumtoxizität (Cox und Reisenauer 1973, Findenegg 1987, Beltrano et al. 1999) und eine niedrigere Resistenz gegen Pathogen-Befall (Duffy und Defago 1999). Auch bei Raps konnten verschiedene Einflüsse des Ammoniums auf das Pflanzenwachstum beobachtet werden. Insgesamt wuchsen die Rapspflanzen bei 4 mM Ammonium-Nährlösung schlechter und waren bei Blühende kleiner als die bei 4 mM Nitrat-Ernährung (bei

Weizen: Polesskaya et al. 1999, bei *Paspalum vaginatum* Schwartz: Beltrano et al. 1999). Die Ammonium-Ernährung führt ebenfalls zu früherem Blattabwurf.

Obwohl in Blatt und Wurzel der Ammonium-ernährten Rapspflanzen die NR-Aktivität (Tab. 3-19) sehr niedrig war, blieb die GS-Aktivität dagegen auf dem gleichen Niveau wie bei Nitrat-ernährten Pflanzen (Tab. 3-18). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Claussen und Lenz (1999) mit Himbeeren, Blaubeeren und Erdbeeren gezeigt. Im Vergleich mit Nitrat-Ernährung waren die Gesamtaminosäure- und die Protein-Gehalte in Blatt und Wurzel (Tab. 3-20-A und -B) sowie die Gesamtaminosäure-Konzentrationen in Phloem (Tab. 3-21) und Xylem (Tab. 3-22) der Ammonium-ernährten Rapspflanzen erheblich erhöht. Parallel dazu war der Anteil von Glutamin an den Gesamtaminosäuren bei Ammonium-Ernährung im Blatt, im Phloem und im Xylem deutlich höher. In der Wurzel blieb der Anteil von Glutamin dagegen gleich. Der Anteil von Asparagin war kaum verändert. Ähnliche Ergebnisse für die Aminosäurekonzentration im Xylem zeigten Finnemann und Schjoerring (1999). In Wurzeln von Mais (Lee et al. 1992) und Blättern von *Paspalum vaginatum* (Beltrano et al. 1999) Ammonium-ernährter Pflanzen wurden ebenfalls höhere Aminosäurekonzentrationen gemessen als bei Nitrat-Ernährung.

Die Ammonium-Ernährung führte auch zur Änderung des C-Metabolismus in den Rapspflanzen. Ähnlich wie bei *Paspalum vaginatum* (Beltrano et al. 1999) ist der Saccharose-Gehalt im Blatt und in der Wurzel bzw. der Glukose- und Fruktose-Gehalt im Blatt unter Ammonium-Ernährung erhöht. Dagegen ist der Malat-Gehalt im Blatt und in der Wurzel verringert (Tab. 3-20-A und -B).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß das direkt aus der äußeren Nährlösungen aufgenommene oder während der Nitratreduktion in den Wurzeln erzeugte Ammonium in den Wurzeln assimiliert und nicht über das Xylem in den Sproß transportiert wird (Andrews 1986, Sechley et al. 1992, Oaks 1994, Glass and Siddiqi 1995, Marschner 1995, Lam et al. 1996). Aber die Allgemeingültigkeit dieser Ergebnisse ist fraglich, da andere Untersuchungen ergaben, daß im Xylemsaft von Weizen-, Mais- und Gerstepflanzen die Ammoniumkonzentration bis zu 2 mM betrug (Cramer und Lewis 1993, Mattsson und Schjoerring 1996, Mattsson et al. 1998). Im Xylemsaft (Wurzeldruckexudat) der Rapspflanzen ist ebenfalls Ammonium vorhanden



(Tab. 3-11-B und 3-22, Finnemann und Schjoerring 1999). Das durch das Xylem in den Sproß transportierte Ammonium könnte wie das von der Photorespiration und der Nitrat-Reduktion im Blatt erzeugte Ammonium in den Chloroplasten assimiliert werden (Kamachi et al. 1992). Finnemann und Schjoerring (1999) zeigten, daß ein Zusammenhang zwischen der Ammonium-Translokation im Xylem und der Gesamt-GS-Aktivität in der Wurzel besteht. Die Hemmung der GS-Aktivität in der Wurzel führte zum Anstieg des Ammonium im Xylem.

#### **4.4 Zur genetischen Manipulation der N-assimilierenden Enzyme bei Raps**

Glutamin-Synthetase (GS) und Asparagin-Synthetase (AsnS) gehören zu den wichtigsten Enzymen der N-Assimilation in Pflanzen. Um die Auswirkungen der genetischen Veränderungen dieser Enzyme auf den Metabolismus von Raps zu untersuchen, wurden im Rahmen des Forschungs-Projekts Rapspflanzen mit der Überexpression der cytosolischen oder plastidären Glutamin-Synthetase, mit der „Antisense“-Hemmung der plastidären GS sowie mit der heterologen Expression der AsnA aus *E. coli* erzeugt (Wallbraun 1997, Seiffert 2000) und biochemisch charakterisiert.

##### **4.4.1 Transgene Rapspflanzen mit Überexpression der cytosolischen oder plastidären Glutamin-Synthetase**

Es wird allgemein angenommen, daß jede GS-Isoform eine spezifische Funktion bei der Assimilation und Reassimilation des Ammoniums hat. Die Aktivität der jeweiligen Isoformen wird durch verschiedene Prozesse wie Nitrat-Reduktion, Photorespiration oder Stickstoff-Zirkulation beeinflusst. Die GS-Isoformen im Blatt der Pflanzen werden in zwei Gruppen (GS1 und GS2) unterteilt: GS1 befindet sich hauptsächlich im Cytosol der Geleitzellen des Phloems und ist mit der Bereitstellung des Stickstoffs in Form von Gln für die Phloembeladung verbunden, während GS2 sich im Stroma der Chloroplasten befindet bzw. die dominante GS-Isoform im Blatt und für die Ammonium-Assimilation und -Reassimilation zuständig ist (Carvalho et al. 1992, Hirel et al. 1993, Dubois et al. 1996, Lam et al. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Überexpression der cytosolischen oder der plastidären GS in Rapspflanzen durch Northern-Blot und Western-Blot Analysen nachgewiesen werden und spiegelte sich in der Erhöhung der GS-Aktivität wider (Tab. 3-12, Wallbraun 1997).

Im Blatt der hier untersuchten GS1-überexprimierenden Rapspflanzen (C10-26) waren im Vergleich zur Ausgangssorte (Drakkar) die Gehalte der Gesamtaminosäuren, der löslichen Proteine und der Kohlenhydrate, bzw. der Anteil der einzelnen Aminosäuren nicht erhöht (Tab 3-13). Auch die Aminosäure- und Saccharosekonzentrationen im Phloemsaft (Tab. 3-15) der GS1-überexprimierenden Rapspflanzen waren kaum verändert.

Im Vergleich zur Kontrolle (Drakkar) war der Gesamtaminosäuregehalt in den Blättern der GS2-überexprimierenden Rapspflanzen (E8-1) erhöht. Dabei stiegen die Gehalte und die Anteile von Glutamin, Asparagin und Serin an, während die von Glutamat und Aspartat sanken. Der Protein- und Nitratgehalt in den Blättern von E8-1 blieb dabei unverändert. Die Kohlenhydratgehalte und das Saccharose/ $\Sigma$ Aminosäure-Verhältnis waren in den Blättern von E8-1 niedriger. Trotzdem waren unter Berücksichtigung der Standardabweichung die Änderungen der Metabolitgehalte im Blatt (Tab. 3-13) und im Phloem (Tab. 3-15) der GS2-überexprimierenden Rapspflanzen (E8-1) ebenso wie die der GS1-überexprimierenden Pflanzen (C10-26) insgesamt nicht signifikant. Dies weist darauf hin, daß die vorhandene Aktivität des Enzyms kein limitierender Faktor für die Ammonium-Assimilation ist.

Ergebnisse über Änderungen der GS1-Aktivität in Pflanzen sind jedoch nicht einheitlich. Transgene Rapspflanzen mit Expression der GS1 aus *Glycine max* zeigten höhere GS-Aktivitäten und niedrigere Ammonium-Konzentration im Blatt und in der Wurzel, bzw. eine größere Toleranz gegen das Herbizid Phosphinothricin (Downs et al. 1994). Die Überexpression der cytosolischen GS in Tabak führte zu einer Aktivitätssteigerung der GS im Blatt (Hémon et al. 1990, Hirel et al. 1992, Temple et al. 1993) und in der Wurzel (Hirel et al. 1992). In der Arbeit von Vincent et al. (1997) wurde das gleiche Konstrukt, das Hirel et al. (1992) für die Tabaktransformation benutzten - die cytosolische GS aus *Glycine max* unter Kontrolle des 35S-Promotors - via *Agrobacterium rhizogenes* in *Lotus corniculatus* L. transformiert. Dabei wurde im

Blatt der transgenen Pflanzen die Erhöhung der Gesamt-Aktivität der GS, in der Wurzel der transgenen Pflanzen die Zunahme der Konzentrationen der freien Aminosäuren sowie die Abnahme der löslichen Kohlenhydrate unter 12 mM Ammonium-Nährlösung beobachtet. Der Anteil von Gln an der Gesamtaminosäurekonzentration war trotzdem in den transgenen Pflanzen von *Lotus corniculatus* nicht erhöht.

Sehr ähnliche Ergebnisse wie in GS2-überexprimierenden Rapspflanzen (E8-1) wurden bei GS2-überexprimierenden Tabakpflanzen beobachtet. Die Überexpression der plastidären GS in Tabakpflanzen führte zur Erhöhung der GS2-Aktivität, der Gehalte von freien Aminosäuren wie Glu und Gln im Blatt sowie zu erhöhten Wachstumsraten und Biomasse-Produktion. Der Ammoniumgehalt im Blatt nahm gleichzeitig ab. Die Konzentration der löslichen Proteine blieb jedoch unverändert (Migge et al. 2000). Außerdem zeigten die GS2-überexprimierenden Tabakpflanzen eine erhöhte Toleranz gegen die Photoinhibition bei hoher Licht-Intensität (Kozaki und Takeba 1996).

#### **4.4.2 Transgene Rapspflanzen mit „Antisense“-Hemmung der Glutaminsynthetase**

In Bakterien sind „Antisense“-RNAs ein natürlich vorkommender Mechanismus zur Regulation der Gen-Expression (Simons 1988). Mit diesem biologischen Phänomen als Vorbild wurde die „Antisense“-Technologie entwickelt. Ecker und Davis (1986) berichteten als erste von einer gelungenen „Antisense“-Hemmung in pflanzlichen Zellen. Seitdem fand diese Technik immer mehr Anwendung. Eine der bekanntesten Anwendungen ist die „Antimatsch“-Tomate, wobei die Fruchtreifung durch „Antisense“-Hemmung des Polygalakturonase-Gens verzögert ist (Sheehy et al. 1988).

Im Rahmen dieses Projekts wurde die plastidäre Isoform der Glutaminsynthetase mit Hilfe der „Antisense“-Technik gehemmt. Hierzu wurden die vollständigen cDNA-Klone in „antisense“-Orientierung hinter den 35S-Promotor gekoppelt und via *Agrobacterium*-Transformation in das Rapsgenom inseriert. In regenerierten „Antisense“-Pflanzen konnte eine Reduktion der plastidären

Enzymaktivität bis zu 52% gezeigt werden, die mit einer Verminderung der Proteinmenge, gezeigt im Western-Blot, einherging (Wallbraun 1997). Davon wurden die „Antisense“-Pflanzen (F2-1) mit der Rest-GS2-Aktivität von 64% (Tab. 3-12) biochemisch charakterisiert. Im Vergleich zur Ausgangssorte zeigten die GS2-„Antisense“-Rapspflanzen keine Unterschiede im Phänotyp unter Gewächshaus-Bedingungen. In den „Antisense“-Pflanzen waren keine deutlichen Änderungen in den Metabolit-Gehalten (wie z. B. Aminosäuren, Saccharose und Hexosen) (Tab. 3-14) und im Phloemtransport (Tab. 3-16) erkennbar. Vermutlich ist die Hemmung der GS2-Aktivität nicht genügend, um deutliche Änderung auszulösen.

In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse über die Auswirkung der „Antisense“-Hemmung der GS auf den Pflanzenstoffwechsel. Transgene Luzernepflanzen mit nur 20% GS1-Transkript zeigten keine Reduktion der GS-Aktivität und der GS1-Proteinmenge (Temple et al. 1998). GS1-„Antisense“-Tabak zeigte dagegen niedrigere GS1-mRNA-Spiegel und GS-Aktivitäten in Mittelrippen, Stengeln und Wurzeln sowie niedrigere GS-Proteinmengen in den Geleitzellen des Phloems. Trotzdem kam es nicht zur Änderung der Glutamin-Konzentration, sondern zur Änderung der Prolin-Konzentration. Dies wurde so gedeutet, daß die GS im Phloem eine Rolle bei der Regulation der Prolin-Produktion spielt (Brugière et al. 1999). GS2-„antisense“-Tabak zeigte niedrigere Leistungen in der Photorespiration und daher eine geringere Toleranz gegen die Photoinhibition bei hoher Licht-Intensität (Kozaki und Takeba 1996), bzw. konnte nicht unter natürlicher Bedingung mit 35 Pa CO<sub>2</sub> sondern nur unter 300 Pa CO<sub>2</sub> wachsen (Migge und Becker 2000). Bei diesen Untersuchungen mit GS2-„antisense“-Tabak wurden keine Messungen der Glutamin-Konzentration durchgeführt.

#### **4.4.3 Transgene Rapspflanzen mit heterologer Expression der AsnA aus *E. coli***

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, katalysiert die AsnA aus *E. coli* eine analoge Reaktion zur Glutamin-Synthetase, wobei Ammonium und Aspartat unter Verbrauch von ATP Asparagin bilden (Sugiyama et al. 1992). Daher wurde im Rahmen dieses Projekts das *asnA*-Gen aus *E. coli* unter Kontrolle des 35S-Promotors

mittels *Agrobacterium* in Rapspflanzen transformiert (Wallbraun 1997, Seiffert 2000), um neben der pflanzeigenen Asparagin-Synthetase und Glutamin-Synthetase einen weiteren Weg für die Ammonium-Assimilation in Raps einzuführen.

In Western-Blot Analysen wurde eindeutig die Expression der *AsnA* aus *E. coli* in Rapspflanzen nachgewiesen (Abb. 3-13). Obwohl das *AsnA*-Gen aus *E. coli* unter Kontrolle des 35S-Promotors in die Rapspflanze eingebracht wurde, zeigten sich Unterschiede in der Proteinmenge in den unterschiedlichen Organen und in Abhängigkeit von der N-Ernährung. Die Signale der Blattproben sind stärker als die der Wurzelproben, und die Signale der Wurzelproben bei Ammonium-Ernährung sind stärker als die bei Nitrat-Ernährung (Abb. 3-13). Das deutet darauf hin, daß die Expression der *AsnA* aus *E. coli* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in der Rapspflanze eine gewisse Gewebe- (in Tabak: Jefferson et al. 1987, Cannon et al. 1990; in Reis: Battraw und Hall 1990; in Raps: Stefanov et al. 1994) und Ernährungsspezifität (Nitrat oder Ammonium) hat, bzw. einer translationalen Regulation unterworfen ist.

Im Vergleich zur Kontrolle (Drakkar) führte die in den Rapspflanzen exprimierte *AsnA* aus *E. coli* zu einer 5-20fachen Aktivitäts-Steigerung der Asparagin-Synthetase *in vitro* (Tab. 3-17-A). Die Aktivität der Glutamin-Synthetase (Tab. 3-18) und der Nitratreduktase (Tab. 3-19) waren dagegen unverändert. Im Gewächshaus waren keine phänotypischen Veränderungen der transgenen Pflanzen sichtbar. Weiter zeigte die eingeführte *AsnA* aus *E. coli* in den transgenen Pflanzen (H18-6, H18-8 und H24-2) keine deutlichen Auswirkungen auf die Metabolitgehalte (Tab. 3-20-A und -B), weder bei Nitrat- noch bei Ammonium-Ernährung sowie weder am Ende der Lichtperiode noch am Ende der Dunkelperiode. Die Anteile von Asparagin sowie anderer Aminosäuren am Gesamtaminosäuregehalt im Blatt waren unverändert. Bei 4 mM Ammonium-Ernährung zeigten die transgenen Pflanzen keine Vorteile gegenüber der Ausgangssorte. Ebenfalls ist kein großer Unterschied zwischen den transgenen Pflanzen und der Kontrolle in den Phloem- (Tab. 3-21) und Xylem-Konzentrationen (Tab. 3-22) zu finden. Dies deutet darauf hin, daß die pflanzeigene Aktivität der Asparagin-Synthetase nicht limitierend für die Ammonium-Assimilation ist. Da die Ammonium-Assimilation vermutlich in erster Linie in Plastiden stattfindet, wurde die

AsnA aus *E. coli* mit Transitpeptid, welches die Expression in den Plastiden ermöglicht, in Rapspflanzen exprimiert. Dies hatte eine mehrfache (18-80 fach) Aktivitätssteigerung zur Folge (Tab. 3-17-B). Auch diese Aktivitätssteigerung führte zu keiner Erhöhung des Asparagin-Gehaltes in den Blättern (Seiffert 2000). Die Überexpression der Asparagin-Synthetase in Tabak zeigte dagegen einen positiven Effekt. Die konstitutive Expression der AS1 aus Erbse in Tabak führte zur 10-100 fachen Akkumulation von Asparagin in den Blättern (Brears et al. 1993). Auch die Expression der AsnA aus *E. coli* in Tabak führte zur effizienteren CO<sub>2</sub>-Fixierung, sowie zu erhöhten Wachstums- und Entwicklungsraten (Dudits et al. 1991).

#### **4.4.4 Abschlußbemerkung**

Anhand der Ergebnisse der transgenen Rapspflanzen, wobei die genetische Veränderung der Glutamin-Synthetase oder Asparagin-Synthetase in Raps nur eine Veränderung der entsprechenden Enzymexpression und -aktivität aber keinen deutlichen Einfluß auf den Aminosäuregehalt im Blatt und im Phloem auslöste, deuten darauf hin, daß die Aktivitäten von Glutamin-Synthetase und Asparagin-Synthetase kein limitierender Faktor für die N-Assimilation in Raps sind. Die Verbesserung der N-Effizienz ist zu komplex, als daß die Veränderung der Aktivität eines Enzyms dies bewirken könnte.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen N-Assimilation, Phloemtransport, Proteinspeicherung im Samen und N-Effizienz bei verschiedenen Rapsgenotypen untersucht.

### 1) *Genetische Variation der Stickstoff-Verwertungseffizienz bei Winterraps*

Sowohl auf dem Feld als auch im Gewächshaus zeigten die untersuchten Winterrapsgenotypen unter verschiedenen N-Versorgungsbedingungen starke genetische Variationen für die Netto-CO<sub>2</sub>-Assimilation und Biomasse, die Metabolitgehalte, die Aktivitäten der N-assimilierenden Enzyme wie Nitratreduktase und Glutaminsynthetase sowie für den Phloem- und Xylemtransport.

Dabei zeigten die Resynthese-Linien im Vergleich zu den anderen Winterraps-Genotypen bei Feldversuchen insgesamt eine höhere Nitratreduktase-Aktivität und höhere Aminosäuregehalte im Blatt sowie einen höheren Proteingehalt im Samen, aber einen niedrigeren Samen-N-Ertrag. Im Gewächshaus auf Hydrokultur waren bei den Resynthese-Linien (RS3, S27) gegenüber den anderen Linien keine deutlichen Unterschiede mehr zu erkennen.

### 2) *Einteilung der auf dem Feld untersuchten Winterraps-Genotypen unter Berücksichtigung der „Source“- und „Sink“-Kapazität*

Unter Berücksichtigung der Summe der freien Aminosäuren im Blatt (Source) und dem Samen-N-Ertrag (Sink) können die 36 in den Jahren 1998 und 1999 untersuchten Winterraps-Genotypen in vier mögliche Gruppen (Source-ineffizient/Sink-ineffizient, Source-ineffizient/Sink-effizient, Source-effizient/Sink-ineffizient und Source-effizient/Sink-effizient) eingeteilt werden (Abb. 4-1). Dabei liegen alle sechs Resynthese-Linien in der Gruppe von „Source-effizient/Sink-ineffizient“, während die meisten Hybriden und neuen Zuchtstämme „Sink-effizient“ bzw. die meisten älteren Sorten „Source-ineffizient“ sind.

### 3) *Korrelationen zwischen den untersuchten Parametern für die N-Verwertungseffizienz bei verschiedenen Winterraps-Genotypen*

In den Feld- oder Gewächshausversuchen war eine positive Korrelation zwischen NR-Aktivität und Aminosäuregehalt in den jungen und den „Source“- Blättern sowie in den Wurzeln zu finden, in den alten Blättern jedoch nicht.

Der Proteingehalt im Samen, der Samen-N-Ertrag, sowie der Aminosäuregehalt im Blatt und im Phloem korrelierte nicht miteinander.

### 4) *Aminosäuremuster und -transport bei Winterraps*

Bei Raps sind Glutamat, Glutamin, Aspartat und Serin die Hauptaminosäuren in den Blättern und Wurzeln sowie im Phloemsaft, während Glutamin im Xylemsaft dominant ist.

Im Vergleich zu den anderen Pflanzen-Arten zeigten die Rapspflanzen sehr viel höhere Aminosäure-Konzentrationen im Phloem, was auf eine hohe Leistungsfähigkeit für die N-Assimilation und Aminosäure-Transport hinweist.

Der Aminosäure-Konzentrationsgradient zwischen Phloem und Cytosol der Mesophyllzellen ist bei 0.5 mM Nitrat höher als bei 4 mM Nitrat. Daher ist die Mobilisierung der Aminosäuren unter geringerer N-Versorgung effizienter.

### 5) *Reaktion des Stoffwechsels der Rapspflanze auf Nitrat-Versorgung*

Im Vergleich zur geringeren Nitrat-Versorgung zeigten die Rapspflanzen unter höherer Nitrat-Versorgung insgesamt, **a)** höhere NR-Aktivität in den Blättern und Wurzeln, **b)** höhere Gehalte der N-haltigen Metabolite aber niedrigere Gehalte der Kohlenhydrate in den Blättern und Wurzeln sowie im Phloem- und Xylemsaft, **c)** höheren Proteingehalt und N-Ertrag im Samen aber niedrigeren N-Ernte-Index.

Die GS-Aktivität in den Blättern und Wurzeln wurde von Nitrat-Versorgung nur wenig beeinflusst.

Das Aminosäuremuster im Phloem war im Vergleich zu denen in „Source“-Blatt, Wurzel und Xylem von der Nitrat-Versorgung wenig beeinflusst.



### 6) *Reaktion des Stoffwechsels der Rapspflanze auf Ammonium-Ernährung*

Die Rapspflanzen bei 4 mM Ammonium wuchsen schlechter, warfen die Blätter früher ab und waren bei Blühende kleiner als die bei 4 mM Nitrat.

Die GS-Aktivität in Blatt und Wurzel wurde kaum von der N-Form (Nitrat oder Ammonium) beeinflusst, während die NR-Aktivität in den Ammonium-ernährten Rapspflanzen erwartungsgemäß sehr niedrig ist.

Im Vergleich mit Nitrat-Ernährung waren die Gesamtaminosäure- und Protein-Gehalte in Blatt und Wurzel sowie die Gesamtaminosäure-Konzentrationen in Phloem und Xylem der Ammonium-ernährten Rapspflanzen erheblich erhöht. Parallel war der Anteil von Glutamin an den Gesamtaminosäuren bei Ammonium-Ernährung im Blatt, im Phloem und im Xylem deutlich höher, aber in der Wurzel nicht. Der Anteil von Asparagin war dagegen kaum verändert.

### 7) *Auswirkungen der N-assimilierenden Enzyme auf N-Verwertungseffizienz bei Raps*

Bei den GS1- und GS2-überexprimierenden Rapspflanzen waren trotz der erhöhten GS-Aktivität die Änderungen der Metabolit-Gehalte im Blatt und im Phloemsaft gegenüber der Ausgangssorte nicht signifikant.

Auch die GS2-„Antisense“-Rapspflanzen zeigten keine phänotypischen Änderungen und trotz der geringeren GS2-Aktivität keine deutlichen Änderungen in den Metabolit-Gehalten im Blatt und im Phloemsaft.

Im Vergleich zur Ausgangssorte zeigten die transgenen Rapspflanzen mit AsnA aus *E. coli* zwar **a)** erhöhte Aktivitäten der Asparagin-Synthetase aber **b)** keine Vorteile bei 4 mM Ammonium-Ernährung und keine phänotypischen Veränderungen im Gewächshaus, **c)** keine deutlichen Auswirkungen auf die Metabolitgehalte in Blatt und Wurzel sowie im Phloem- und Xylemsaft, auch nicht auf den Gehalt von Asparagin.

Vermutlich sind die Aktivitäten dieser Enzyme nicht limitierend für die N-Assimilation. Die Verbesserung der Stickstoffeffizienz ist zu komplex, als daß die Veränderung der Aktivität eines Enzyms dies bewirken könnte.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Akt.	Aktivität
Ala (ala)	Alanin
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APAD(H <sub>2</sub> )	Acetylpyridinadenindinukleotid (reduziert)
APS	Ammoniumpersulfat
Arg (arg)	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn (asn)	Asparagin
AsnA	Asparaginsynthetase A
AsnB	Asparaginsynthetase B
AsnS	Asparaginsynthetase
Asp (asp)	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bl.	Blatt
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA
CS	Citrat-Synthase
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2'-Aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraacetat
ER	endoplasmatisches Reticulum
Fa.	Firma
FAD(H <sub>2</sub> )	Flavinadenindinucleotid (reduziert)

FG	Frischgewicht
Fru-6-P	Fruktose-6-Phosphat
gaba	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Glc-6-P	Glukose-6-Phosphat
Gln (gln)	Glutamin
Glu (glu)	Glutamat
Gly (gly)	Glycin
GOGAT	Glutamatsynthase
GS	Glutaminsynthetase
GS1	cytosolische Glutaminsynthetase
GS2	plastidäre Glutaminsynthetase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-Ethansulfonsäure
His (his)	Histidin
HPLC	high performance liquid chromatography
Ile (ile)	Isoleucin
Kat	Katal (Enzymeinheit, mol/s)
K-Borat	Kaliumborat
Leu (leu)	Leucin
Lys (lys)	Lysin
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Met (met)	Methionin
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NAD(H)	Nicotinamid-Adenindinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (reduziert)
NiR	Nitritreduktase
NR	Nitratreduktase
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PGI	Phosphoglukose-Isomerase
Phe (phe)	Phenylalanin

---

Pi	anorganisches Phosphat
PPi	Pyrophosphat
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylylsulfonsäure
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser (ser)	Serin
TG	Trockengewicht
Thr (thr)	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp (trp)	Tryptophan
Tyr (tyr)	Tyrosin
Val (val)	Valin
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

## 7 Literaturverzeichnis

- Abrol YP, Uprety DC, Ahuja VP, Naik MS. (1971)** Soil fertility levels and protein quality in wheat grains. *Aust J Agric Res* 22: 197-202.
- Adriaanse FG, Human JJ. (1993)** Effect of time of application and nitrate:ammonium ratio on maize grain yield, grain N concentration and soil mineral N concentration in a semi-arid region. *Field Crops Res* 34: 57-70.
- Amarasingh BHRR, de Bruxelles GL, Braddon M, Onyeocha I, Forde BG, Udvardi MK. (1998)** Regulation of GmNRT2 expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta* 206: 44-52.
- Andrews M. (1986)** The partitioning of nitrate assimilation between the root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ* 9: 511-519.
- Aniol H. (1994)** Stickstoffverteilung in erntereifen Rapsbeständen. *Raps* 3: 144-147.
- Arnon DI. (1949)** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-15.
- Aslam M, Huffaker RC. (1982)** *In vivo* nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings in light and darkness. *Plant Physiol* 70: 1009-1013.
- Baligar VC, Duncan RR, Fageria NK. (1990)** Soil-plant interactions on nutrient use efficiency in plants. *In: Baligar VC, Duncan RR (Hrsg). Crops as enhancers of nutrient use.* Academic Press, San Diego.
- Barlow CA, McCully ME. (1972)** The ruby laser as an instrument for cutting the stylets of feeding aphids. *Can J Zool* 50: 1497-1498.
- Barneix AJ, Causin HF. (1996)** The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth (review). *J Plant Physiol* 149(3-4): 358-362.
- Barrow NJ. (1993)** Plant nutrition - from genetic engineering to field practice. Kluwer, Dordrecht.
- Barszczak Z, Barszczak T, Foy CD. (1993)** Effect of moisture, nitrogen rates, and soil acidity on seed yield and chemical composition of winter oilseed rape cultivars. *J Plant Nutr* 16(1): 85-96.
- Batraw MJ, Hall TC. (1990)** Histochemical analysis of CaMV 35 promoter- $\beta$ -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol* 15: 527-538.
- Becker TW, Caboche M, Carrayol E, Hirel B. (1992a)** Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. *Plant Mol Biol* 19(3): 367-379.

- Becker TW, Foyer C, Caboche M. (1992b)** Light-regulated expression of the nitrate-reductase and nitrite-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient *aurea* mutant of tomato. *Planta* 188: 39-47.
- Beevers L, Hageman RH. (1983)** Uptake and reduction of nitrate: bacteria and higher plants. *In*: Läuchli IA, Bielski RL (Hrsg). *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 15A: 351-376. Springer, Berlin.
- Below FE, Gentry LE. (1987)** Effect of mixed N nutrition on nutrient accumulation, partitioning, and productivity of corn. *J Fert Issues* 4: 79-85.
- Beltrano J, Ronco MG, Barreiro R, Montaldi ER. (1999)** Plant architecture of *Paspalum vaginatum* Schwartz modified by nitrate and ammonium nutrition. *Peswuisa Agropecuaria Brasileira* 34(7): 1159-1166.
- Bergmeyer HU. (1983)** *Methods of Enzymatic Analysis*. 3<sup>rd</sup> edn, Verlag Chemie, Weinheim.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P. (1993)** Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5: 1147-1155.
- Blagrove RJ, Gillespie JM, Randall PJ. (1976)** Effect of sulfur supply on the seed globulin composition of *Lupinus angustifolius*. *Aust J Plant Physiol* 3: 173-184.
- Boehlein-Susan K, Richards-Nigel GJ, Schuster-Sheldon M. (1994)** Glutamine-dependent nitrogen transfer in *Escherichia coli* asparagine synthetase B: Searching for the catalytic triad. *J Biol Chem* 269(10): 7450-7457.
- Bona S, Mosca G, Vamerli T. (1999)** Oil crops for biodiesel production in Italy. *Renewable Energy* 16(1-4): 1053-1056.
- Bradford MM. (1976)** A Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brears T, Liu C, Knight TJ, Coruzzi GM. (1993)** Ectopic overexpression of asparagine synthetase in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 103: 1285-1290.
- Brechlin P, Mäck G, Burba M, Tischner R. (1999)** Changes in the isoform pattern and subunit composition of cytosolic glutamine synthetase (GS 1) in sugar beet leaves dependent on leaf age. *J Plant Physiol* 155: 497-502.
- Brechlin P, Unterhalt A, Tischner R, Mäck G. (2000)** Cytosolic and chloroplastic glutamine synthetase of sugarbeet (*Beta vulgaris*) respond differently to organ ontogeny and nitrogen source. *Physiol Plant* 108: 263-269.
- Brugière N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B. (1999)** Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* 11(10): 1995-2011.

- Büker M. (2000)** Einfluß der Asparaginsynthetase auf die Stickstoffassimilation und das Proteinspeicherverhalten von verschiedenen Maissorten (*Zea mays* L.). Dissertation, Universität Göttingen.
- Cannon M, Platz J, O'Leary M, Sookdeo C, Cannon F. (1990)** Organ-specific modulation of gene expression in transgenic plants using antisense RNA. *Plant Mol Biol* 15: 39-47.
- Cao W, Tibbits TW. (1993)** Study of various  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  mixtures for enhanced growth of potatoes. *J Plant Nutr* 16: 1691-1704.
- Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R. (1992)** Detection of cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods. *Plant Physiol* 100: 1591-1594.
- Chaillou S, Morot-Gaudry J-F, Salsac L, Lesaint C, Jolivet BE. (1986)** Compared effects of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  on growth and metabolism of French bean. *Physiol Vég* 24: 679-687.
- Chaillou S, Vessey JK, Morot-Gaudry JF, Raper Jr CD, Henry LT, Boutin J-P. (1991)** Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *J Exp Bot* 42: 189-196.
- Champigny M-L. (1995)** Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynthesis Res* 46: 117-127.
- Chandler PM, Higgins TJV, Randall PJ, Spencer D. (1983)** Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency: rates of legumin synthesis and levels of legumin mRNA. *Plant Physiol* 71: 47-54.
- Chen JG, Cheng SH, Cao WY, Zhou X. (1998)** Involvement of endogenous plant hormones in the effect of mixed nitrogen source on growth and tillering in wheat. *J Plant Nutr* 21: 87-97.
- Cheng CL, Acedo GN, Christinsin M, Conkling MA. (1992)** Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1861-1864.
- Chevalier C, Bourgeois E, Just D, Raymond P. (1996)** Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant J* 9: 1-11.
- Claussen W, Lenz F. (1999)** Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant Soil* 208(1): 95-102.
- Clements RJ. (1973)** Selection for crude protein content in *Phalaris tuberosa* L. *Aust J Agric Res* 24: 21-58.

- Cooper HD, Clarkson DT. (1989)** Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals – A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrition uptake. *J Exp Bot* 40(216): 753-762.
- Cooper JD, Ogden G, McIntosh J, Turnell DC. (1984)** The stability of the o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: An investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Anal Biochem* 142: 98-102.
- Cox WJ, Reisenauer HW. (1973)** Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. *Plant Soil* 38: 363-380.
- Cramer MD, Lewis OAM. (1993)** The influence of nitrate and ammonium nutrition on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants. *Ann Bot* 72: 359-365.
- Crawford NM. (1995)** Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7: 859-868.
- Cren M, Hiral B. (1999)** Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol* 40: 1187-1193.
- Crouch ML, Sussex IM. (1981)** Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. *Planta* 153: 64-74.
- Crouch ML, Tenbarge KM, Simon AE, Ferl R. (1983)** cDNA clones for *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. *J Mol App Gen* 2: 273-283.
- Daniel-Vedele F, Caboche M. (1996)** Molecular analysis of nitrate assimilation in higher plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sciences, Workshop report* 319: 961-968.
- Dejoux JF, Recous S, Meynard JM, Trinsoutrot I, Leterme P. (2000)** The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant Soil* 218(1-2): 257-272.
- Delgado E, Mitchell RAC, Parry MA, Driscoll SP, Mitchell VJ, Lawlor DW. (1994)** Interacting effects of CO<sub>2</sub> concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves. *Plant Cell Environ* 17: 1205-1213.
- DeLisle AJ, Crouch ML. (1989)** Seed storage protein transcription and mRNA levels in *Brassica napus* during development and in response to exogenous abscisic acid. *Plant Physiol* 91: 617-623.



- Delrot S, Atanassova R, Maurousset L. (2000)** Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* 1465(1-2): 281-306.
- Deng MD, Moureaux T, Leydecker M-T, Caboche M. (1990)** Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* 180: 257-261.
- Deng MD, Moureaux T, Cherel I, Boutin J-P, Caboche M. (1991)** Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol Biochem* 29: 239-247.
- Dierks-Ventling C. (1981)** Storage proteins in *Zea mays* (L.): interrelationships of albumins, globulins and zeins in the *opaque-2* mutation. *Eur J Biochem* 120: 177-182.
- Downs CG, Christey MC, Davies KM, King GA, Seelye JF, Sinclair BK, Stevenson DG. (1994)** Hairy roots of *Brassica napus*. 2. glutamine synthetase overexpression and the response to phosphinothricin. *Plant Cell Reports* 14(1): 41-46.
- Dubois F, Brugière N, Sangwan RS, Hirel B. (1996)** Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol Biol* 31(4): 803-817.
- Dudits D, Paulovics K, Kalman K, Györgyey J, Nagy F, Bako L, Horvath G, Eckes P, Donn G. (1991)** Transgenic plants expressing a prokaryotic ammonium dependent asparagine synthetase. PCT-Int. Patent Application WO91/11524.
- Duffy BK, Defago G. (1999)** Macro- and microelement fertilizers influence the severity of *Fusarium* crown and root rot of tomato in a soilless production system. *Hortscience* 34(2): 287-291.
- Duncan RR, Baligar VC. (1990)** Genetics, breeding and physiological mechanism of nutrient uptake and use efficiency: an overview. *In*: Baligar VC, Duncan RR (Hrsg). *Crops as enhancers of nutrient use*. Academic Press, San Diego.
- Ecker J, Davis R. (1986)** Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5372-5376.
- El Bassan N. (Hrsg) (1990)** Genetic aspects of plant mineral nutrition. Kluwer, Dordrecht.
- Ericson ML, Rödin J, Lenman M, Glimelius K, Josefsson L-G, Rask L. (1986)** Structure of the rapeseed 1.7S storage protein, napin, and its precursor. *J Biol Chem* 261: 14576-14581.

- Filleur S, Daniel-Vedele F. (1998)** Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207: 461-489.
- Findenegg GR. (1987)** A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. *Plant Soil* 103: 239-244.
- Finlayson AJ. (1976)** The seed protein contents of some *Cruciferae*. In: Vaughan JG, McLeod AJ, Jones BMG (Hrsg). *The biology and chemistry of the Cruciferae*, pp 279-306. Academic Press, New York.
- Finlayson AJ, Bhatti RS, Christ CM. (1969)** Species and varietal differences in the proteins of rape seed. *Can J Bot* 47: 679-685.
- Finnemann J, Schjoerring JK. (1999)** Translocation of  $\text{NH}_4^+$  in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiol Plant* 105: 469-477.
- Fischer WN, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breikreuz K, Frommer WB. (1998)** Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci* 3: 188-195.
- Forde BG, Cullimore JV. (1989)** The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. In: Miflin BJ (Hrsg). *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Vol 6, pp 247-296. Oxford Univ Press, Oxford.
- Forde BG, Woodall J. (1995)** Glutamine synthetase in higher plants: molecular biology meets plant physiology. In: Wallsgrave RM (Hrsg). *Amino acids and their derivatives in higher plants*. Cambridge University Press.
- Gazzarrini S, Lejay T, Gojon A, Ninnemnn O, Frommer WB, von Wirén N. (1999)** Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 11(5): 937-947.
- Geisler G. (1980)** In: *Pflanzenbau – Ein Lehrbuch*, Verlag Paul Parey.
- Gerath H, Balko C. (1995)** The influence of genotype and donor plant on the nitrogen efficiency of DH-lines of winter rape. *Proc Internl Rapeseed Congress* 9: 813-815.
- Gerath H, Schweiger W. (1991)** Improvement of the use of nutrients in winter rape - A strategy of economically and ecologically responsible fertilizing. *Proc Internl Rapeseed Congress* 8: 1197-1201.
- Gessler A, Schneider S, Weber P, Hanemann U, Rennenberg H. (1998)** Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N - A comparison between the roots of Norway spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees grown under field conditions. *New Phytologist* 138(3): 385-399.

- Gill MA, Reisenauer HM. (1993)** Nature and characterization of ammonium effects on wheat and tomato. *Agron J* 85: 874-879.
- Glaab J, Kaiser WM. (1995)** Inactivation of nitrate reductase involves NR-protein phosphorylation and subsequent 'binding' of an inhibitor protein. *Planta* 195: 514-518.
- Glass ADM, Siddiqi MY. (1995)** Nitrogen absorption by plant roots. *In: Srivastava HS, Singh RP (Hrsg). Nitrogen Nutrition in Higher Plants*, pp 21-56. Associated Publishing Co., New Delhi.
- Gojon A, Dapoigny L, Lejay L, Tillard P, Rufty TW. (1998)** Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on  $^{15}\text{NO}_3^-$ -uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant Cell Environ* 21: 43-53.
- Gowri G, Kenis JD, Ingemarsson B, Redinbaugh MG, Campbell WH. (1992)** Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol Biol* 18: 55-64.
- Graham RD. (1984)** Breeding characteristics in cereals. *In: Tinker PB, Läuchli A (Hrsg). Advances in plant nutrition*. Praeger Publ., New York.
- Grami B, LaCroix LJ. (1977)** Cultivar variation in total nitrogen uptake in rape. *Can J Plant Sci* 57: 619-624.
- Hagemann RH, Reed AJ. (1980)** Nitrate reductase from plants. *Methods Enzymol* 69: 270-280.
- Hagin J, Olson SR, Shaviv A. (1990)** Review of interaction of ammonium-nitrate and potassium nutrition of crops. *J Plant Nutr* 13: 1211-1226.
- Hansel LW, Tsai C-Y, Nelson OE. (1973)** The effect of the *floury-2* gene on the distribution of protein fractions and methionine in maize endosperm. *Cereal Chem* 50: 383-394.
- Haynes RJ, Goh KM. (1978)** Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol Rev* 53: 465-510.
- Heberer JA, Below FE. (1989)** Mixed nitrogen nutrition and productivity of wheat grown in hydroponics. *Ann Bot* 63: 643-650.
- Hémon P, Robbins MP, Cullimore JV. (1990)** Targeting of glutamine synthetase to the mitochondria of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 15: 895-904.
- Higgins TJV. (1984)** Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 191-221.
- Hirel B, Marsolier MC, Hoarau A, Hoarau J, Brangeon J, Schafer R, Verma DPS. (1992)** Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in

- tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. *Plant Mol Biol* 20: 207-218.
- Hirel B, Miao GH, Verma DPS. (1993)** Metabolic and developmental control of glutamine synthetase genes in legume and non-legume plants. *In: Verma DPS (Hrsg). Control of plant gene expression*, pp 443-458. CRC Press, Boca Raton, FL. USA.
- Hoff T, Truong HN, Caboche M. (1994)** The use of mutants and transgenic plants to study nitrate metabolism. *Plant Cell Environ* 17: 486-506.
- Huber SC, Huber JL. (1995)** Metabolic activators of spinach leaf nitrate reductase: Effects on enzymatic activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. *Planta* 196: 180-189.
- Huber TA, Streeter JG. (1985)** Purification and properties of asparagine synthetase from soybean root nodules. *Plant Sci* 42: 9-17.
- Ireland R. (1990)** Amino acid and ureide biosynthesis. *In: Dennis DT, Turpin DH (Hrsg). Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp 407-421. Longman, Essex.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987)** GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Jensen CR, Mogensen VO, Mortensen G, Andersen MN, Schjoerring JK, Thage JH, Koribidis J. (1996)** Leaf photosynthesis and drought adaptation in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aust J Plant Physiol* 23(5): 631-644.
- Jensen LS, Christensen L, Mueller T, Nielsen NE. (1997)** Turnover of residual  $N^{15}$ -labelled fertilizer N in soil following harvest of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* 190(2): 193-202.
- Josefsson L-G, Lenman M, Ericsson ML, Rask L. (1987)** Structure of a gene encoding the 1.7S storage protein, napin, from *Brassica napus*. *J Biol Chem* 262: 12196-12201.
- Joy KW. (1988)** Ammonium, glutamine and asparagine: A carbon-nitrogen interface. *Can J Bot* 66(10): 2103-2109.
- Kaiser WM, Spill D, Brendle-Behnisch E. (1992)** Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach-leaf nitrate reductase. *Planta* 186: 236-240.
- Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K. (1992)** Vascular bundle-specific location of glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol* 99: 1481-1486.

- Kaminska BZ, Brzoska F, Skraba B. (2000)** High-protein fraction of 00 type rapeseed meal in broiler nutrition. *J Animal Feed Sci* 9(1): 123-136.
- Kozaki A, Takeba G. (1996)** Photorespiration protects C<sub>3</sub> plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560.
- Kessel B. (2000)** Genetische Variation und Vererbung der Stickstoffeffizienz bei Winterraps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Universität Göttingen.
- Kirkman MA, Shewry PR, Mifflin BJ. (1982)** The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of barley seeds. *J Sci Food Agric* 33: 115-127.
- Köhler B, Raschke K. (2000)** The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiol* 122(1): 243-254.
- Kokkonen T, Tuori M, Leivonen V, Syrjala-Qvist L. (2000)** Effect of silage dry matter content and rapeseed meal supplementation on dairy cows. 1. Milk production and feed utilisation. *Animal Feed Sci Techn* 84(3-4): 213-228.
- Kolderup F. (1975)** Effects of temperature, photoperiod and light quantity on protein production in wheat grains. *J Sci Food Agric* 26: 583-592.
- Krapp A, Fraiser V, Scheible WR, Quesada A, Gojon A, Stitt M, Caoche M, Daniel-Vedele F. (1998)** Expression studies of Nrt2:1Np, a putative high affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *Plant J* 6: 723-732.
- Kullmann A. (1987)** Quantitative Untersuchungen zur Stickstofftranslokation in vegetativen und generativen Teilen der Raps pflanze (*Brassica napus*) als Grundlage der Ertragsbildung. Dissertation, Universität Kiel.
- Laemmli UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. (1996)** The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 569-593.
- Lam HM, Hsieh MH, Coruzzi GM. (1998)** Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 345-353.
- Landbeck M. (1995)** Untersuchungen zur genetischen Verbesserung von Körnermais unter Produktionsbedingungen mit reduzierter Stickstoffversorgung. Dissertation, Universität Hohenheim.

- Lauter FR, Ninneman O, Bucher M, Riesmeier J, Frommer WB. (1998)** Preferential expression of an ammonium transporter and of two nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8139-8144.
- Lea PJ, Forde BG. (1994)** The use of mutants and transgenic plants to study the amino acid metabolism. *Plant Cell Environ* 17: 541-556.
- Lea PJ, Mifflin B. (1980)** Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. *In: Mifflin BJ (Hrsg). The Biochemistry of Plants: Amino Acids and Derivatives*, pp 569-607. Academic, New York.
- Lee RB. (1980)** Sources of reductant for nitrate assimilation in non-photosynthetic tissue: a review. *Plant Cell Environ* 3: 65-90.
- Lee RB, Purves JV, Ratcliffe RG, Saker LR. (1992)** Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *J Expt Bot* 43(256): 1385-1396.
- Leidreiter K, Kruse A, Heineke D, Robinson DG, Heldt HW. (1995)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) leaves. *Bot Acta* 108: 439-444.
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. (1999)** Molecular and functional characterisation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J* 18(5): 509-519.
- Li MG, Villemur R, Hussey PJ, Silflow CD, Gantt JS, Snustad DP. (1993)** Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 23: 401-407.
- Lickfett T. (1993)** Auswirkungen vermindelter Produktionsintensität in zwei Rapsfruchtfolgen auf Elemente des N-Haushaltes im System Boden-Pflanze. Dissertation, Universität Göttingen
- Lickfett T, Wildenhayn M, Przemek E. (1994)** Zu viel Nitrat nach Raps - was tun? *DLG-Mitteilungen* 8: 32-33.
- Lightfoot DA, Green NK, Cullimore JV. (1988)** The chloroplast located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol Biol* 11: 191-202.
- Lohaus G. (1995)** Vom Source zum Sink: Phloemtransport verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Dissertation, Universität Göttingen.
- Lohaus G, Büker M, Hußmann M, Soave C, Heldt HW. (1998)** Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois Low Protein and Illinois High Protein strains of maize. *Planta* 205: 181-188.

- Lohaus G, Möllers C. (2000)** Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta*, im Druck.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AC, Randall RJ. (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Ma Y, Nelson OE. (1975)** Amino acid composition and storage proteins in two new high lysine mutants in maize. *Cereal Chem* 52: 412-419.
- Mäck G. (1995)** Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of  $\text{NH}_4^+$ . *Planta* 196: 231-238.
- Mäck G, Tischner R. (1994)** Activity of the tetramer and octamer of glutamine synthetase isoforms during primary leaf ontogeny of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 194: 353-359.
- Marschner M. (1995)** Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press Ltd, London.
- Mattsson M, Husted S, Schjoering JK. (1998)** Influence of nitrogen nutrition and metabolism on ammonia volatilization in plants. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 51(1): 35-40.
- Mattsson M, Schjoerring JK. (1996)** Ammonia emission from young barley plants: influence of nitrogen source, light/dark cycles and inhibition of glutamine synthetase. *J Exp Bot* 47: 477-484.
- McNeal, FH, Berg MA, McGuire CF, Stewart VR, Balcridge DE. (1972)** Grain and plant nitrogen relationships in eight spring wheat crosses, *Triticum aestivum* L. *Crop Sci* 12: 599-602.
- Mehrer I, Mohr H. (1989)** Ammonium toxicity: Description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiol Plant* 77: 545-554.
- Migge A, Becker TW. (2000)** Greenhouse-grown conditionally lethal tobacco plants obtained by expression of plastidic glutamine synthetase antisense RNA may contribute to biological safety. *Plant Sci* 153(2): 107-112.
- Migge A, Carrayol E, Hirel B, Becker TW. (2000)** Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210(2): 252-260.
- Migge A, Carrayol E, Kunz C, Hirel B, Fock H, Becker TW. (1997)** The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration. *J Exp Bot* 48: 1175-1184.

- Migge A, Meya G, Carrayol E, Hirel B, Becker TW. (1996)** Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and nitrogen. *Planta* 200: 213-220.
- Mogensen VO, Jensen CR, Mortensen G, Andersen MN, Schjoerring JK, Thage JH, Koribides J. (1997)** Pod photosynthesis and drought adaptation of field grown rape (*Brassica napus* L). *Eur J Agron* 6(3-4): 295-307.
- Mullan BP, Pluske JR, Allen J, Harris DJ. (2000)** Evaluation of Western Australian canola meal for growing pigs. *Aust J Agric Res* 51(5): 547-553.
- Münch E. (1930)** Die Stoffwechselbewegungen in der Pflanze. Fischer Verlag, Jena.
- Murén E, Ek B, Björk J, Rask L. (1996)** Structural comparison of the precursor and the nature form of napin, the 2S storage protein in *Brassica napus*. *Eur J Biochem* 242: 214-219.
- Muruli BI, Paulsen GM. (1981)** Improvement of nitrogen use efficiency and its relationship to other traits in maize. *Maydica* 26: 63-73.
- Nakamura M, Yamada M, Hisota Y, Sugimoto K, Oka A, Takanami M. (1981)** Nucleotide sequence of the *asnA* gene coding for asparagine synthetase of *E. coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 9: 4669-4676.
- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högberg M, Högberg R. (1998)** Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914-916.
- Oaks A. (1994)** Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can J Bot* 72: 739-750.
- Ochs G, Schock G, Trischler M, Kosemund K, Wild A. (1999)** Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 39(3): 395-405.
- Peoples MB, Gifford RM. (1993)** Long-distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. *In: Dennis DT, Turpin DH (Hrsg). Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp 434-447. Wiley, New York.
- Peuke AD, Jeschke WD. (1993)** The uptake and flow of C, N, and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I. Grown with ammonium or nitrate as nitrogen source. *J Exp Bot* 264: 1167-1176.
- Peuke AD, Jeschke WD, Dietz KJ, Schreiber L, Hartung W. (1998)** Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*-I-carbon and nitrogen uptake and inflows. *New Phytologist* 138(4): 675-687.
- Polesskaya OG, Glazunova MA, Alekhina ND. (1999)** Respiration and photosynthesis in wheat plants as related to their growth and nitrogen status



- under various conditions of nitrogen supply. *Russian J Plant Physiol* 46(2): 152-158.
- Presterl T, Groh S. (1994)** Bedeutung der Stickstoff-Aufnahme und -Verwertungseffizienz für die Anpassung von Mais an unterschiedliche Düngungsniveaus. *Vortr Pflanzenzüchtung* 28: 208-210.
- Rajasekhar VK, Mohr H. (1986)** Appearance of nitrite reductase in cotyledons of the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling as affected by nitrate, phytochrome and photooxidative damage of plastids. *Planta* 168: 369-376.
- Randall PJ, Thomson JA, Schroeder HE. (1979)** Cotyledonary storage proteins in *Pisum sativum*. IV. Effects of sulfur, phosphorus, potassium and magnesium deficiencies. *Aust J Plant Physiol* 6: 11-24.
- Redinbaugh MG, Campbell WH. (1985)** Quaternary structure and composition of squash NADH:nitrate reductase. *J Biol Chem* 260: 3380-3385.
- Redinbaugh MG, Campbell WH. (1993)** Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root: primary response to nitrate. *Plant Physiol* 101: 1249-1255.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW. (1991)** Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* 97: 227-233.
- Röbbelen G. (1994)** Plant breeding for improved nitrogen assimilation. *Nova Acta Leopoldina NF* 70: 371-391.
- Rödin J, Rask L. (1990)** The relationship between mature chains and their precursors of cruciferin, the 12S storage protein of *Brassica napus*. *Plant Sci* 70: 57-63.
- Rosnitschek-Shimmel I. (1985)** The influence of nitrogen nutrition on the accumulation of free amino acids in root tissue of *Urtica dioica* and their apical transport in xylem sap. *Plant Cell Physiol* 26: 215-219.
- Sakakibara H, Kawabata S, Hase T, Sugiyama T. (1992)** Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Plant Cell Physiol* 33: 1193-1198.
- Sakakibara H, Kobayashi K, Deji A, Sugiyama T. (1997)** Partial characterisation of the signaling pathway for the nitrate-dependent expression of genes for nitrogen-assimilatory enzymes using detached maize leaves. *Plant Cell Physiol* 38: 837-843.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. (1995)** Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol* 109: 1427-1433.

- Saravitz CH, Deviennebarret F, Raper CD, Chaillou S, Lamaze T. (1998)** Nitrate uptake rate by soybean and wheat plants determined by external nitrate concentration and shoot-mediated demand. *Internl J Plant Sci* 159(2): 305-312.
- Sattelmacher B, Horst WJ, Becker HC. (1994)** Factors that contribute to genetic variation for nutrient efficiency of crop plants. *Z Pflanzenernähr Bodenk* 157: 215-224.
- Scheible WR, Gonzales-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboche M, Stitt M. (1997a)** Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9: 783-798.
- Scheible WR, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M, Stitt M. (1997b)** Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J.* 11: 671-691.
- Schjoerring JK. (1995)** Dynamics of nitrogen utilisation in *Brassica napus*. Workshop on *Brassica napus* L-4. Eucarpia, Helsingør.
- Schobert C, Komor E. (1990)** Transfer of amino acids and nitrate from the roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. *Planta* 181: 85-90.
- Schwenke KD, Raab B, Plietz P, Damaschun G. (1983)** The structure of the 12S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Die Nahrung* 27: 165-167.
- Scofield MA, Lewis WS, Schuster SM. (1990)** Nucleotide sequence of *Escherichia coli asnB* and deduced amino acid sequence of asparagine synthetase B. *J Biol Chem* 265: 12895-12902.
- Scofield SR, Crouch ML. (1987)** Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from *Brassica napus*. *J Biol Chem* 262: 12202-12208.
- Sechley KA, Yamaya T, Oaks A. (1992)** Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int Rev Cyt* 134: 85-163.
- Seiffert B. (2000)** Molekularbiologische Untersuchungen zur Stickstoffeffizienz bei *Brassica napus* L. Dissertation, Universität Göttingen.
- Seiffert B, Ecke W, Lohaus G, Wallbraun M, Zhou Z, Möllers C. (1999)** Strategies for the investigation of N-efficiency in oilseed rape. *In: Gissel-Nielsen G, Jensen A (Hrsg). Plant nutrition – molecular biology and genetics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.*
- Seitz G, Landbeck M, Geiger HH. (1993)** Improvement of nitrogen efficiency under low input conditions. Abstracts of the 16th Maize and Sorghum Conference. Eucarpia, Bergamo.
- Shapiro BU, Stadtman ER. (1970)** Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol* 17A: 910-922.

- Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR. (1988)** Reduction of polyglucuronase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8805-8809.
- Shewry PR, Franklin J, Parmar S, Smith SJ, Mifflin BJ. (1983)** The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. *J Cereal Sci* 1: 21-31.
- Shi LF, Twary SN, Yoshioka H, Gregerson RG, Miller SS, Samac DA, Gantt JS, Unkefer PJ, Vance CP. (1997)** Nitrogen assimilation in alfalfa: Isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell* 9: 1339-1356.
- Sieciechowicz KA, Joy KW, Ireland RJ. (1988)** The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* 27: 663-671.
- Siegel LM, Wilkerson JO. (1989)** Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. *In: Wray JL, Kinghorn JR (Hrsg). Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*, pp 263-283. Oxford Science Publications, Oxford.
- Simons RW. (1988)** Naturally occurred antisense control – A brief review. *Gene* 72: 35-44.
- Sjödahl S, Gustavsson H-O, Rödin J, Lenman M, Höglund A-S, Rask L. (1993)** Cruciferin gene families are expressed coordinately but with tissue-specific differences during *Brassica napus* seed development. *Plant Mol Biol* 23: 1165-1176.
- Sjödahl S, Gustavsson H-O, Rödin J, Rask L. (1995)** Deletion analysis of the *Brassica napus* cruciferin gene *cru 1* promoter in transformed tobacco: promoter activity during early and late stages of embryogenesis is influenced by *cis*-acting elements in partially separate regions. *Planta* 197: 264-271.
- Soave C, Tardini L, Di Fonzo N, Salamini F. (1981)** Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the *opaque-2* and *opaque-6* loci. *Cell* 27: 403-410.
- Stålberg KM, Ellerström M, Ezcurra I, Ablov S, Rask L. (1996)** Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta* 199: 515-519.
- Stefanov I, Fekete S, Bogre L, Pauk J, Feher A, Dudits D. (1994)** Differential activity of the mannopine synthase and the CaMV 35S promoter during development of transgenic rapeseed plants. *Plant Sci* 95: 175-186.
- Stitt M. (1999)** Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biol* 2: 178-186.
- Stitt M, Heldt HW. (1981)** Physiological rates of starch breakdown in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 68: 755-761.

- Sugiyama A, Kato H, Nishioka T, Oda J. (1992)** Overexpression and purification of asparagine synthetase from *Escherichia coli*. *Biosci Biotech Biochem* 56: 376-379.
- Sukanya R, Li MG, Snustad DP. (1994)** Root- and shoot-specific response of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonia. *Plant Mol Biol* 26: 1935-1946.
- Suresh K, Lakkineni KC, Nair TVR. (1996)** Relationship between leaf nitrogen and photosynthetic characteristics in *Brassica juncea* and *B. campestris*. *J Agron Crop Sci - Zeitschrift für Acker und Pflanzenbau* 177(2): 107-113.
- Ta TC, Ohira K. (1981)** Effects of various environmental and medium conditions on the response of Indica and Japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. *Soil Sci Plant Nutr* 27: 347-355.
- Taylor AR, Bloom AJ. (1998)** Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant Cell Environ* 21: 1255-1263.
- Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C. (1998)** Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol Biol* 37(3): 535-547.
- Temple SJ, Knight TJ, Unkefer PJ, Sengupta-Gopalan C. (1993)** Modulation of glutamine synthetase gene expression in tobacco by the introduction of an alfalfa glutamine synthetase gene in sense and antisense orientation: molecular and biochemical analysis. *Mol Gen Genet* 236: 315-325.
- Thomson JA, Millerd A, Schroeder HE. (1979)** Genotype-dependent patterns of accumulation of seed storage proteins in *Pisum*. In: *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*, Vol. I, IAEA-SM-230/61, pp 231-240. Int. Atomic Energy Agency, Vienna.
- Töpfer R, Martini N, Schell J. (1995)** Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268: 681-686.
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann A, Crawford NM. (1993)** The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate inducible nitrate transporter. *Cell* 72: 705-713.
- Ullrich WR, Larsson M, Larsson CM, Lesch S, Novacky A. (1984)** Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiol Plant* 61: 369-376.
- Vaucheret H, Chabaud M, Kronenberger J, Caboche M. (1990)** Functional complementation of tobacco and *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants by transformation with the wild-type alleles of the tobacco structural genes. *Mol Gen Genet* 220: 468-474.

- Vézina LP, Langlois JR. (1989)** Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Physiol* 90: 1129-1133.
- Vincent R, Fraasier V, Chaillou S, Limami MA, Deleens E, Phillipson B, Douat C, Boutin JP, Hirel B. (1997)** Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* 201(4): 424-433.
- von Wirén N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillisen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB. (2000)** Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J* 21: 167-175.
- Voskerusa J. (1974)** Sortenunterschiede der Wachstumsdynamik bei Winterraps bei unterschiedlicher Ernährung. *Proc Internl Rapeseed Congress* 4: 137-140.
- Wallbraun M. (1997)** Genetische Modifizierung der Glutamin-Synthetase-Aktivität in *Brassica napus* L. Dissertation, Universität Göttingen.
- Waterhouse RN, Smyth AJ, Massonneau A, Prosser IM, Clarkson DT. (1996)** Molecular cloning and characterisation of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: Dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant Mol Biol* 30: 883-897.
- Weber P, Stoermer H, Gessler A, Schneider S, von Sengbusch D, Hanemann U, Rennenberg H. (1998)** Metabolic responses of Norway spruce (*Picea abies*) trees to long-term forest management practices and acute  $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$  fertilization: transport of soluble non-protein nitrogen compounds in xylem and phloem. *New Phytologist* 140(3): 461-475.
- Weston K, Hall JL, Williams LE. (1995)** Characterization of amino-acid transport in *Ricinus communis* roots using isolated membrane vesicles. *Planta* 196: 166-173.
- Wiesler F, Horst WJ. (1992)** Differences between maize cultivars in yield formation, nitrogen uptake and associated depletion of soil nitrate. *J Agron Crop Sci* 168: 226-237.
- Wiesler F, Horst WJ. (1993)** Differences among maize cultivars in the utilization of soil nitrate and the related losses of nitrate through leaching. *Plant Soil* 151: 193-203.
- Wiesler F, Horst WJ. (1994)** Root growth and nitrate utilization of maize cultivars under field conditions. *Plant Soil* 163: 267-277.
- Williams LE, Bick JA, Neelam A, Weston KN, Hall JL. (1996)** Biochemical and molecular characterization of sucrose and amino acid carriers in *Ricinus communis*. *J Exp Bot* 47: 1211-1216.

- Winter H, Lohaus G, Heldt HW. (1992)** Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiol* 99: 996-1004.
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW. (1993)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* 191: 180-190.
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW. (1994)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193: 530-535.
- Winzer T, Lohaus G, Heldt HW. (1996)** Influence of phloem transport, N-fertilization and ion accumulation on sucrose storage in the taproots of fodder beet and sugar beet. *J Exptl Bot* 47(300): 863-870.
- Woodall J, Boxall JG, Forde BG, Pearson J. (1996)** Changing perspectives in plant nitrogen metabolism: the central role of glutamine synthetase. *Sci Prog* 79: 1-26.
- Wrigley CW, du Cros DL, Archer MJ, Downie PG, Roxburgh CM. (1980)** The sulfur content of wheat endosperm proteins and its relevance to grain quality. *Aust J Plant Physiol* 7: 755-766.
- Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, Kasai Z. (1982)** Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol* 70: 1094-1100.
- Yamaha T, Oaks A. (1987)** Synthesis of glutamate by mitochondria – an anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Plant Physiol* 70: 749-756.
- Yau SK, Thurling N. (1987)** Variation in nitrogen response among spring rape (*Brassica napus*) cultivars and its relationship to nitrogen uptake and utilization. *Field Crops Res* 16: 139-155.
- Youssefi F, Brown PH, Weinbaum SA. (2000)** Relationship between tree nitrogen status, xylem and phloem sap amino acid concentrations, and apparent soil nitrogen uptake by almond trees (*Prunus dulcis*). *J Horticultural Sci Biotechn* 75(1): 62-68.

## **Herzlichen Dank an...**

Frau Dr. Gertrud Lohaus für die Betreuung, interessierte Anregungen, Diskussionen und alle Hilfe bei der Durchführung und beim Schreiben dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Heldt für die Unterstützung und seine häufige Frage „Wie geht’s? Wie geht Ihre Arbeit voran?“

Priv.-Doz. Dr. Dieter Heineke für die Übernahme des Korreferats und die Hilfe

Dr. Thilo Winzer, Christian Knop, Jens Tilsner und Michaela Strauß für das Durchlesen eines Teils bzw. der ganzen Arbeit

Melanie Hußmann, Marion Gottschall, Christiane, Birgit und Monika Raabe für die Hilfe beim Probenernten auf dem Feld bzw. bei den zahlreichen Messungen

Gerd Mader für die technische Unterstützung

Anne Brandeck für die Hilfsbereitschaft und das Lächeln

Herrn Wedemeyer für die Hilfe bei der Versorgung der Pflanzen und der Blattläuse im Gewächshaus

Herrn Heise, Herrn Rureinski, Katharina Pawlowski, Sigrun Reumann, Helmut, Friedrich Kauder und Meike, Andrea Nickel, Maren, Anita, Helma, Yolanda, Barbara, Jens, Meik, Andrea Hattenbach, Maria Koch, Mareike, Olga, Marsha, Marion, Alex, u. a. für die Hilfe und die freundliche Atmosphäre

Prof. Dr. H. Becker, Dr. Christian Möllers, Michael Wallbraun, Bettina Kessel und Beatrix Seiffert für die Zusammenarbeit im Rapsprojekt

Die Freunde, wie z.B. meine Landsleute und Tischtennis-GegnerInnen, die hier nicht konkret genannt werden, für den Spaß während der Freizeit in den vergangenen Jahren

Meine Eltern und Geschwister für die besondere Unterstützung und das Verständnis

Die Erziehungskommission der Volksrepublik China und die Hanns-Seidel-Stiftung für das Stipendium

## Lebenslauf

24. Nov. 1964 Geboren in Chaoyang, Prov. Guangdong, VR China
09. 1971 – 07. 1976 Besuch der Grundschule in Chaoyang, Prov. Guangdong
09. 1976 – 07. 1981 Besuch der Mittelschule in Chaoyang, Prov. Guangdong
09. 1981 – 07. 1985 Studium der Genetik und Kulturpflanzenzüchtung an der Agrarwissenschaftlichen Universität Südchina, Guangzhou, VR China. *Abschluß*: Bachelor's Degree
09. 1985 – 07. 1988 Studium der Pflanzenphysiologie und Biochemie an der Agrarwissenschaftlichen Universität Südchina, Guangzhou, VR China. *Abschluß*: Master's Degree. *Thema der Arbeit*: "Isolation of rice chloroplast DNA and construction of physical maps of fragments involved in the gene for ribosomal protein S12"
08. 1988 – 09. 1994 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Fakultät für Biologie der Agrarwissenschaftlichen Universität Südchina, Guangzhou, VR China
10. 1994 – 01. 1996 Deutsch-Intensivkurs an der Tongji-Universität in Shanghai, VR China
03. 1996 – 06. 1996 Deutsch-Sprachkurse am Goethe-Institut in München, Deutschland
07. 1996 – 02. 1997 Aufbaustudium im Institut für Biochemie der Pflanze an der Universität Göttingen, Deutschland
04. 1997 Beginn der experimentellen Arbeit zu der vorliegenden Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum Blatt- und Wurzelmetabolismus sowie zum Phloem- und Xylemtransport in Zusammenhang mit der Stickstoff-Effizienz bei Raps (*Brassica napus* L.)“