

**Auswirkungen von Nitrat auf die Blühinduktion von  
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn.**

Irene Loef  
(Diplombiologin)

# **Inaugural-Dissertation**

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Irene Loef

aus Andernach

Tag der mündlichen Prüfung:

**Auswirkungen von Nitrat auf die Blühinduktion von  
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn.**

Gutachter :

Prof. Dr. Mark Stitt

Prof. Dr. Thomas Rausch

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Rolle der Blühinduktion der Pflanze	1
1.1.1. Einfluß von physiologischen oder genetischen Signalwegen auf die Blühinduktion	1
1.1.2. Der Einfluß des Kohlenhydratstatus auf die Blühinduktion	4
1.1.3. An der Blühinduktion beteiligte Genetischen Signalwege	4
1.2. Biochemische und genetische Auswirkungen beim Pflanzenwachstum als Antwort auf Veränderungen in der Nitratzufuhr	9
1.3. Ansätze und Ziele dieser Doktorarbeit	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Pflanzenmaterial	16
2.2. Chemikalien	16
2.3. Pflanzenanzucht	16
2.3.1. Nährmedien	16
2.3.2. Sterilisation der Samen	17
2.3.3. Aussaat der Samen	18
2.4. Dokumentation und Ernte	18
2.4.1. Blühverlaufsdokumentation	18
2.4.2. Ernte	18
2.4.3. Aufbereitung des Pflanzenmaterials	19
2.4.4. Ethanolische Extraktion	19
2.4.4.1. Aufbereitung des Sediments	19
2.5. Bestimmung verschiedener Inhaltsstoffe aus den ethanolischen Extrakten	20
2.5.1. Bestimmung des Gesamtaminosäuregehaltes	20
2.5.2. Bestimmung der Einzel-Aminosäuren	21
2.5.3. Bestimmung des Nitratgehaltes	22
2.5.4. Metabolitenbestimmungen mit Hilfe enzymatische gekoppelter Meßverfahren	22
2.5.4.1. Messung der Kohlenhydrate	23
2.5.4.2. Messung von Malat	23

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Identifikation von Glutamin als N-Quelle	26
3.2.	Auswirkungen von unterschiedlichen Nitratkonzentrationen auf das Blühverhalten von <i>Arabidopsis thaliana</i> cv Columbia bei verschiedenen Lichtregimen	31
3.2.1.	Erhöhtes Nitratangebot führt bei Kurztagbedingungen zu einer Verzögerung der Blühinduktion	31
3.2.2	Erhöhte Nitratkonzentrationen führen bei höher Blattzahl und Biomasse zur Blühinduktion	32
3.2.3	Der interne Nitratgehalt spiegelt den externen Nitratgehalt im Medium wieder	35
3.2.4	Die Gesamtaminosäuren reagieren stärker auf die Tageslänge als auf das externe Nitratangebot	37
3.2.5	Malat reagiert uneinheitlich	38
3.2.6	Die Kohlenhydrate zeigen mit abnehmender Tageslänge eine verstärkte Abhängigkeit vom Nitratspiegel	39
3.2.7	Einzelaminosäuren reagieren unterschiedlich auf Nitrat und Tageslängen	42
3.2.7.1	Glutamin	43
3.2.7.2	Glutamat	43
3.2.7.3	Aspartat	44
3.2.7.4	Asparagin	45
3.2.7.5	Aminosäuren aus der Photorespiration	46
3.2.7.6	Aromatische Aminosäuren	48
3.2.7.7	Alanin und aliphatische Aminosäuren	50
3.2.7.8	Von Aspartat abstammende Aminosäuren – Lysin, Methionin und Threonin	52
3.2.7.9	Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus – Arginin und Citrullin	53

3.2.7.10	Hisitidin	55
3.2.7.11	$\gamma$ -Aminobuttersäure	55
3.3	Blühinduktion bei Landsberg erecta und verschiedene Blühmutanten unter verschiedenen Nitratkonzentrationen	58
3.3.1	Blühverlauf bei Landsberg erecta unter verschiedene Nitratregminen	58
3.3.1.1	Blühverlaufskurven und Biomassen bei Landsberg erecta	59
3.3.1.2	Nitrat, Gesamtaminosäuren und Malat	61
3.3.1.3	Lösliche Zucker und Stärke	63
3.3.1.4	Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat	64
3.3.1.5	Aminosäuren aus der Photorespiration	65
3.3.1.6	Aromatische Aminosäuren	67
3.3.1.7	Alanin und aliphatische Aminosäuren	68
3.3.1.8	Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus	69
3.3.1.9	Aminosäuren, die sich von Aspartat ableiten	70
3.3.1.10	Histidin	71
3.3.1.11	$\gamma$ -Aminobuttersäure	72
3.2.2.	<i>tfl1</i>	73
3.2.4	<i>leafy-1</i>	85.
3.2.5.	<i>fd-1</i>	95
3.2.6.	<i>fwa-1</i>	104
3.2.7.	<i>fve-1</i>	112
3.2.8.	<i>fy-1</i>	120
3.3	C24 und ANRI	131

---

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>156</b>
4.1	Wirkung von Nitrat auf die Blühinduktion	158
4.2	Einfluß von Nitrat auf die Blühinduktion unter verschiedenen Photoperioden	159
4.3	Die Beeinflussung der Blühinduktion durch Nitrat läuft bei verschiedenen frühblühenden Wildtypen ähnlich ab	164
4.4	Verschiedene Blühmutanten zeigen keine Beeinflussung durch Nitrat	166
4.3.1	<i>tfl1</i>	167
4.3.2	<i>lfy-1</i>	170
4.3.3	<i>fd-1</i>	172
4.3.4	<i>fwa-1</i>	173
4.3.5	<i>fve-1</i>	175
4.3.6	<i>fy-1</i>	177
4.4	<i>ANR1</i>	180
4.5	Abschließende Diskussion	184
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>190</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>191</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>194</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Rolle der Blühinduktion der Pflanze

Die Entwicklung der Blüte ist für die Pflanze ein fundamentaler Vorgang, da sie es dem Organismus Pflanze ermöglicht, Genmaterial an eine nächste Generation weiterzugeben. Da Pflanzen im Gegensatz zu Tieren ihren Standort nicht verlassen können, sind sie darauf angewiesen, physiologische Signale zu registrieren, die darüber Auskunft geben, ob die äußeren Umstände günstig zur Entwicklung einer Blüte sind, um die zur Verfügung stehenden Ressourcen ausnutzen zu können. Blühen ist dabei zunächst das obligate Entwicklungsprogramm des Apikalmeristems einer Pflanze, bis das vegetative Programm gestartet wird (Sung et al. 1992). Dieser „default“-Vorgang wird aber zunächst von einem Blührepressor oder einem Promotor der vegetativen Entwicklung unterdrückt (Koornneff et al. 1998).

### 1.1.1 Einfluß von physiologischen oder genetischen Signalwegen auf die Blühinduktion

Die Blühinduktion wird dabei über verschiedene Wege beeinflusst, zum einen physiologische Faktoren, zum anderen auch genetische Signalwege. Es ist bekannt, daß sich die Blühentwicklung im Sproßapikalmeristem abspielt, wobei dieses mehrere Entwicklungsstadien durchläuft. Signale, die blühstimulierend wirken, werden dabei im Blatt wahrgenommen, was dann zur Ausschüttung von blühfördernden Faktoren führt (Araki et al. 1998). Man geht davon aus, daß es sich um chemische Stoffe handelt, die über das Phloem transportiert werden. Die vom Blatt abgegebenen Stoffe wirken als Blühstimulus auf den Sproßapex ein. Zunächst muß das Meristem dabei die Kompetenz erlangen, bei Einfluß unterschiedlicher Signale eine Blüte zu bilden und damit von der juvenilen Phase in die adulte Phase zu gelangen (Taiz & Zaiger 1998). Läuft dann einmal das festgelegte Programm – also Blühinduktion – ab, so ist das Meristem darauf festgelegt, selbst bei Entfernung aus den normalen physiologischen und umweltbedingten Zusammenhang. Dies hat man mittels Pfropfexperimente (Singer & McDaniel 1986, McDaniel 1996) herausgefunden. Singer und McDaniel haben 1986 durch das Pfropfen von Sproßspitzen bei verschiedenen Tabakvarietäten gezeigt, daß z.B. die Anzahl an Nodien, die ein Meristem vor der Blüte

produziert, auf der Stärke des Blühsignals aus den Blättern und der Fähigkeit des Meristems, darauf zu antworten, beruht.

Neben der Beeinflussung, die aus den Blättern kommt, spielen wahrscheinlich auch Signale aus der Wurzel heraus eine Rolle. Es ist zu vermuten, daß die Wurzel einen oder mehrere Inhibitoren der Blühinduktion produziert (Taiz & Zaiger 1998). Dies läßt den Schluß zu, daß die Signale, die vom Blatt ausgehen, während der photoperiodischen Induktion sowohl in den Sproßapex als auch in die Wurzel transportiert werde. Als Antwort darauf produzieren die Wurzeln chemische Signale, die die Blühinduktion modulieren (Taiz & Zaiger 1998). Dazu gehören aber auch Blühstimulanzen aus der Gruppe der Phytohormone wie Gibberrellinsäure und Cytokine. Lejeune et al. haben 1994 gezeigt, daß der Cytokiningehalt im Xylemexudat aus den Wurzeln von *Sinapsis alba* während der photoperiodischen Blühinduktion deutlich ansteigt.

Bei der Blühinduktion wird zum einen der Entwicklungsstand der Pflanze, aber auch die Umweltfaktoren wie Licht registriert (Koornneeff et al. 1998, Simpson et al. 1999). Bei den entsprechenden Photoperioden wird ein Blühstimulus von den Blättern zum apikalen Meristem transportiert und setzt dort die Blühinduktion in Gang (Bernier et al. 1993). Dabei geht es um die Länge der Dunkelphase, die einen Einfluß zeigt (Taiz & Zaiger 1998, Hamner & Bonner 1938), nicht um die Länge der Lichtperiode, und außerdem um die Wellenlänge des einwirkenden Lichtes. In *Arabidopsis thaliana* wirken zwei Wellenlängen bei der Blühinduktion mit. Zum einen handelt es sich um die rote (660 nm) bzw. fernrote (720 nm) Wellenlänge, die über Phytochrome wahrgenommen wird (Clack et al. 1994), zum anderen um die blaue Wellenlänge (520 nm), die über Cryptochrome wahrgenommen wird (Bagnall et al. 1996, Lin et al. 1996). Für *Arabidopsis* hat man fünf Phytochrome-Gene gefunden, dabei ist *PHYA* an der positiven Regulation der Blühinduktion beteiligt (Bagnall et al. 1995). *PHYB* hemmt dagegen die Blühinduktion, *phyb*-Mutanten blühen früher als der Eltern-Wildtyp (Reed et al. 1993, Bagnall et al. 1995). *CRY1* und *CRY2* als Vertreter der Cryptochrome fördern die Blühinduktion bei *Arabidopsis thaliana* (Bagnall et al. 1996). Dabei können Pflanzen aufgrund ihrer Antwort auf die Photoperioden in verschiedene Klassen unterteilt werden, die tageslängenunempfindlichen Pflanzen und die Kurztag- bzw. Langtagpflanzen (Vince-Prue 1975). Die beiden letzteren Klassen können erneut unterteilt werden in die Pflanzen, die nur bei Kurztag oder Langtag blühen ( qualitative Kurztag/Langtag-pflanzen)

und die Pflanzen, deren Blühinduktion durch Kurztag bzw. Langtag gefördert werden (quantitative Kurztag/Langtagpflanzen) (Taiz & Zaiger 1998).

Pflanzen reagieren sehr stark auf Umwelteinflüsse und reagieren entweder mit einer Förderung oder einer Verzögerung der Blühinduktion (Coupland 1995). Bei *Arabidopsis thaliana* handelt es sich um eine fakultative Langtagpflanze, die unter Laborbedingungen mit einer Tageslänge von 16 h in 3 Wochen blüht, bei einer Tageslänge von 10 h jedoch 6 Wochen benötigt (Coupland 1995). Bei dieser kurzen Tageslänge kommt es zu einer Erhöhung von Blattzahl und Biomasse, ein Hinweis darauf, daß nicht die Entwicklung verzögert ist, sondern die vegetative Phase verlängert ist.

Auch Vernalisation = Lagerung bei niedrigen Temperaturen hat einen starken Einfluß auf das Blühen. So ist von einigen *Arabidopsis*-Ecotypen, die in großen Höhen oder aus Bergregionen stammen, bekannt, daß sie unter Laborbedingungen eine sehr späte Blühinduktion zeigen. Werden sie jedoch über einen längeren Zeitraum hinweg niedrigen Temperaturen ausgesetzt, so tritt die Blüte wesentlich früher ein (Reeves et al. 2000). Ein Teil der bekannten spätblühenden *Arabidopsis*-Ecotypen zeigt dominante Allele am *Frigida-Locus*, die zu spätem Blühen führen, dieser Phänotyp kann durch niedrige Temperaturen aufgehoben werden (Reeves et al. 2000). In den letzten Jahren ist klar geworden, daß das Blühzeit-Gen *Flowering Locus C* eine zentrale Rolle bei der Vernalisationsantwort spielt. Bei spätblühenden Pflanzen, die infolge Vernalisation zu früherem Blühen neigen, zeigte sich ein hoher *FLC*-mRNA-Spiegel hauptsächlich in Wurzeln und in der Sproßspitze, bei Vernalisation sind diese Spiegel niedriger. Das Gen kodiert einen *MADS*-Box-Transkriptionsfaktor, der die Umschaltung von vegetativer zu generativer Phase unterdrückt. Es hat sich gezeigt, daß Vernalisation zu einer Demythilierung der DNA führt, die danach transkribiert werden kann. Vermutlich sind die Methylasen kälteempfindlich und werden somit durch die Vernalisation inaktiviert, sodaß bei nachfolgenden DNA-Replikationen die neusynthetisierten DNA-Stränge unmethyliert bleiben. Da die Notwendigkeit von Vernalisation durch Gibberellin-Gabe umgangen werden kann, geht man davon aus, daß einer der Schlüsselenzyme der Gibberellin-Biosynthese durch Methylierung zunächst inaktiviert ist (Burn et al. 1993). Die Reaktion auf Vernalisation scheint eine spezifische Anpassung zu sein und ist bei vielen höheren Pflanzen vorzufinden (Ratcliffe 1961).

Zu den chemischen Stoffen, die die Blühinduktion beeinflussen und steuern, gehören die Polyamine. Die photoperiodische Induktion der Langtagpflanze *Sinapsis alba* korreliert mit einem Anstieg an Putrescin, einem prominenten Vertreter der Polyamine im Phloem. Im Gegenzug bewirkt Besprühen der Blätter mit einem Inhibitor der Putrescinsynthese ein Herabsetzen der Putrescinkonzentration im Phloem und unterbindet Blüten (Havelange et al. 1996).

### 1.1.2 Der Einfluß des Kohlenhydratstatus auf die Blühinduktion

Blühen wird auch durch Nährstoffversorgung beeinflusst (Marschner 1995). Stärkemutanten wachsen im Vergleich zu ihrem Eltern-Wildtyp langsamer unter kurzen Photoperioden und zeigen eine verzögerte Blühinduktion (Bernier et al. 1993, Corbesier et al. 1998). Mutanten mit einem Defekt im Stärkemetabolismus wie *phosphoglucomutase* (pgm) (Caspar et al. 1985) und *ADP glucose pyrophosphorylase 1* (adg1) (Lin et al. 1986) haben keine Stärke im Blatt und blühen unter Kurztagbedingungen verzögert. Aber auch *starch excess 1* (sex1) (Caspar et al. 1993) und *carbohydrate accumulation mutant 1* (cam1) (Eimert et al. 1995) blühen verzögert, obwohl sie erhöhte Stärkekonzentrationen in den Blättern haben. Der Phänotyp des Spätblühens beruht dabei nicht auf der fehlenden Stärkeakkumulation und dem damit verbundenen langsameren Wachstum, sondern eher auf der Unfähigkeit, die gespeicherten Kohlenhydrate zu mobilisieren (Bernier et al. 1993, Eimert et al. 1995). Der genaue Mechanismus des Einflusses von Kohlenhydraten auf die Blühinduktion ist jedoch noch unklar.

### 1.1.3 An der Blühinduktion beteiligte Genetischen Signalwege

Diese Umgebungsfaktoren wirken teilweise auf einige Signalwege, deren molekulare Genetik bekannt ist. Bei *Arabidopsis thaliana* haben sich bisher drei Signalwege für Blühinduktion ergeben. Bei einem dieser Signalwege blühen die Mutanten spät unter Langtagbedingungen, sind aber nicht verzögert unter Kurztagbedingungen und reagieren nicht auf Vernalisation, man zählt diese Gene zum Photoperiodengesteuerten Signalweg. Dazu gehören die Gene *CONSTANS* (CO), *GIGANTEA* (GI), *LONG HYPOCOTYL* (LHY), *FT*, *FWA*, *FD* und *FHA* (Ratcliffe et al. 2001, Koornneeff et al. 1991, Simpson et al. 1999). Gene wie *FT*, *FWA* und *FD* werden mittlerweile in eine Subgruppe eingeordnet, diese Mutanten blühen spät unter Langtagbedingungen und etwas verzögert unter Kurztagbedingungen (Araki et al. 1998,

Simpson et al. 1999). Ein zweiter Signalweg beinhaltet Mutanten, die hingegen nicht auf Veränderungen in der Photoperiode reagieren und unter alle Tageslängen blühen, dafür aber empfindlich gegenüber Vernalisation sind. Zu diesem autonomen Signalweg gehören Gene wie *LUMINIDEPENDENS (LD)*, *FY,FCA* und *FVE* (Ratcliffe et al. 2001, Koornneeff et al. 1991, Simpson et al. 1999). Ein dritter Signalweg mit *Gibberellin responsive* und *Gibberellin insensitive (GAI)* ist gibberellinabhängig und reagiert bei Mutation stärker auf Photoperiodenveränderungen als der Wildtyp (Wilson et al. 1992, Aukerman et al. 1999, Onouchi et al. 2000, Reeves et al. 2000). Die Mutante *ga1-3* ist z.B. eine reine Langtagpflanze (Wilson et al. 1992). Gibberelline sind notwendig für die Blühinduktion unter nichtinduktiven Bedingungen (Martinez-Zapater et al. 1994) und aktivieren dabei den *LEAFY*-Promotor (Blazquez et al. 1998).

Bei den spätblühenden Mutanten geht man davon aus, das ein einzelner genetischer Signalweg betroffen ist, der Blühen als Antwort auf Langtag fördert. (Reeves et al. 2000). Durch Vergleich verschiedenener Allele bei Blühzeitgenen von Cap verde Islands und Landsberg erecta-Ecotypen fand man einen Locus mit dem Namen *EARLY DAYLENGTH INSENSITIVE*, der frühes Blühen verursacht (Reeves et al. 2000).

Bei einigen dieser Gene ist mittlerweile die Aufgabe und Struktur des Genprodukts bekannt. So spielt *GI* wahrscheinlich eine Rolle bei der Kontrolle der Expression von Tagesgang-regulierten Genen als Antwort auf Lichteinfluß.(Reeves et al. 2000).

*CO* ist ein Protein, das ein Zinkfingermotiv aufweist, ein Charakteristikum für Proteine, die an die DNA binden (Coupland 1995, 1997). Es hat sich gezeigt, daß *CO* nachweisbar ist, bevor andere Gene wie *LEAFY* oder *APETALAI* im Blühprimordium expremiert werden (Coupland 1997) Constitutive Expression von *CO* führt zu frühem Blühen und bestätigt damit die fördernde Wirkung von *CO* (Simon et al. 1996).

Bei *FWA* geht man davon aus, daß es downstream von der Regulation des C-Transportes zum Apex fungiert (Roldan et al. 1997). *FWA* agiert zusammen mit anderen Genen, unter anderem *LEAFY*, redundant im Sproßapikalmeristem, um downstream-Gene wie *APETALAI* zu regulieren. Bei der Regulation des eigentlichen Blühens hat *FWA* weder eine positive noch fördernde Rolle. Falls es am Blühen beteiligt ist, dann in der Hinsicht, daß es die Aktivität von fördernden Signalwegen und/oder downstream-Komponenten während der frühen

Entwicklung oder der frühen juvenilen Phase unterdrücken oder dagegen arbeiten könnte (Araki et al. 1998).

*fve*-Mutanten zeigen sowohl unter Dauerlicht wie auch unter Kurztagbedingungen eine erhöhte Blattzahl zum Zeitpunkt der Blüte im Vergleich zum Wildtyp, was darauf hinweist, daß FVE unter beiden Photoperioden notwendig zur Blühförderung ist. Jedoch scheint der FVE-Locus nicht an der Photoperiodenkontrolle der Phasenverschiebung von vegetativ nach reproduktiv zu sein, gerade aufgrund der oben beschriebenen Photoperiodenempfindlichkeit (Martinez-Zapater et al. 1995). Lange Photoperioden und der FVE-Locus könnten Pflanzenentwicklung und Internodienstreckung über parallele und additive Signalwege fördern. Er könnte ebenso die Festlegung des Blüentwicklungsprogramms in den Lateralmeristemen fördern (Martínez-Zapater et al. 1995). Die *fve*-Mutanten zeigen ebenso Symptome von reduzierten Gibberellinkonzentrationen, aber in wesentlich geringerem Ausmaß wie *gal*- oder *gai*-Mutanten (Martínez-Zapater et al. 1995).

Die bisher beschriebenen Gene aus den verschiedenen Signalwegen werden als Blühzeit-Gene beschrieben, die in zwei Klassen eingeteilt werden. Die erste Klasse dient zur Hochregulation von „Floral meristem identity“-Genen wie *LEAFY*. Diese Gene stammen aus mehreren unabhängigen Signalwegen wie dem autonomen Signalweg mit *FCA/FVE*, dem Photoperioden-Signalweg mit *CO/GI* und dem Gibberellin-abhängigem Signalweg mit Gibberellin responsive/Gibberellin insensitive. *LFY* scheint für alle drei Signalwege ein Zielgen zu sein (Reeves et al. 2000). Man hat herausgefunden, daß *LEAFY*-Expression ein neues Blühprimordium anzeigt, es unterdrückt Blattformation und Internodienstreckung und verstärkt die Expression von *APETALA1* und *CAULIFLOWER* (zwei weitere „Floral meristem identity“-Gene). Außerdem steuert es zusammen mit *UNUSUAL FLOWER ORGANS* die Entwicklung von Petalen und Stamen (Pidkowitch et al. 1999).

Eine zweite Klasse von Blühzeitgenen stammt hauptsächlich aus dem Photoperioden-Signalweg und beinhaltet Gene wie *FT* und *FWA*. Diese sind nicht an der transkriptionellen Regulation von *LEAFY* beteiligt, sondern an der Antwort auf *LEAFY*-Aktivität (Reeves et al. 2000).

Bei *Arabidopsis* scheint die erste Antwort auf die Blühinduktion eine transkriptionelle Aktivierung von „Floral meristem identity“-Genen in den Blühmeristemen zu sein, die an der

Sproßspitze gebildet werden (Weigel et al. 1995). Zu diesen Floral Meristem identity-Genen gehören *LEAFY*, *APETALA1*, *CAULIFLOWER*, *APETALA2* und *UNUSUAL FLOWER ORGANS*.

Bei konstitutiver Expression des *LEAFY*-Gens kommt es zur Umwandlung zumindest einiger Blühstände in Infloreszenzen, während Mutationen diesen Phänotyp meist nur verstärken. Ausnahme ist *APETALA1*, dieses Gen kann im mutierten Zustand bei Doppelmutanten den *lfy*-Phänotyp etwas unterdrücken. Dies weist darauf hin, daß *LEAFY APETALA1* induziert und das die gemeinsamen Aktivitäten von *LEAFY* und *APETALA1* zusammen effektiver bei der Umwandlung von Sproßmeristemen in Blühmeristeme sind als *LEAFY* alleine (Weigel et al. 1995). *LEAFY* wird auch von Gibberellinen beeinflusst (Blazquez et al. 1997, Blazquez et al. 1998) wobei das Gibberellin-Signal wahrscheinlich Teil eines Signalweges ist, der Blühen in der Abwesenheit von externen blühinduktiven Stimuli fördert. Die Gibberelline spielen dabei nicht nur als Aktivator des *LEAFY*-Promotors eine Rolle, sondern beeinflussen ebenso die Kompetenz, auf das *LEAFY*-Signal zu reagieren. Dabei spielen Gibberelline eine stärkere Rolle beim Blühen unter Kurztagbedingungen als unter Langtagbedingungen.

Neben *LEAFY* und den oben genannten Genen gibt es auch noch *TERMINAL FLOWER1*, das bei der Blühinduktion eine wichtige Rolle spielt. Durch Unterdrückung der Blühinduktion ermöglicht es der Pflanze, zunächst eine vegetative Phase zu durchlaufen (Ratcliffe et al. 1998). Das *TFL*-Gen agiert im Sproßapikalmeristem und verhindert eine Umwandlung des Sproß-Apikalmeristems zu einem Blühmeristem (Onouchi et al. 1998) und reprimiert die Transkription von *LFY* und *API* im Sproßmeristem (Simon et al. 1996). Es ist damit einer der Gene, die zur Kontrolle der Identität der Infloreszenz-Meristeme im Sproßapex von *Arabidopsis thaliana* notwendig sind (Ohshima et al. 1997). Während *LEAFY* und *APETALA1* bereits früh während der Blühentwicklung agieren (Mandel et al. 1992, Weigel et al. 1992) und für die korrekte Entwicklung der Blütenorgane notwendig sind, wird *TERMINAL FLOWER1* während der Blüte im Sproßmeristem expremiert (Bradley et al. 1997). Damit ergibt sich eine antagonistische Wirkung zwischen *TERMINAL FLOWER1* einerseits und *LEAFY* und *APETALA1* andererseits, um die Identität von Infloreszenz-Meristemen und Blühmeristemen festzulegen bzw. die Umwandlung vom einen in das andere zu fördern (Alvarez et al. 1992, Schultz & Haughn 1993, Weigel & Nilsson 1995). Es ist gezeigt worden, daß das *TERMINAL FLOWER1*-Protein Sequenzähnlichkeit zu

Phosphatidylethanolamin-bindenden Proteinen in Tieren zeigt, die an Membranproteinkomplexe binden können (Bradley et al. 1996, Pidkowitch et al. 1999).

Das nachfolgende Modell soll die Interaktion der verschiedenen Gene bei der Blühinduktion darstellen:

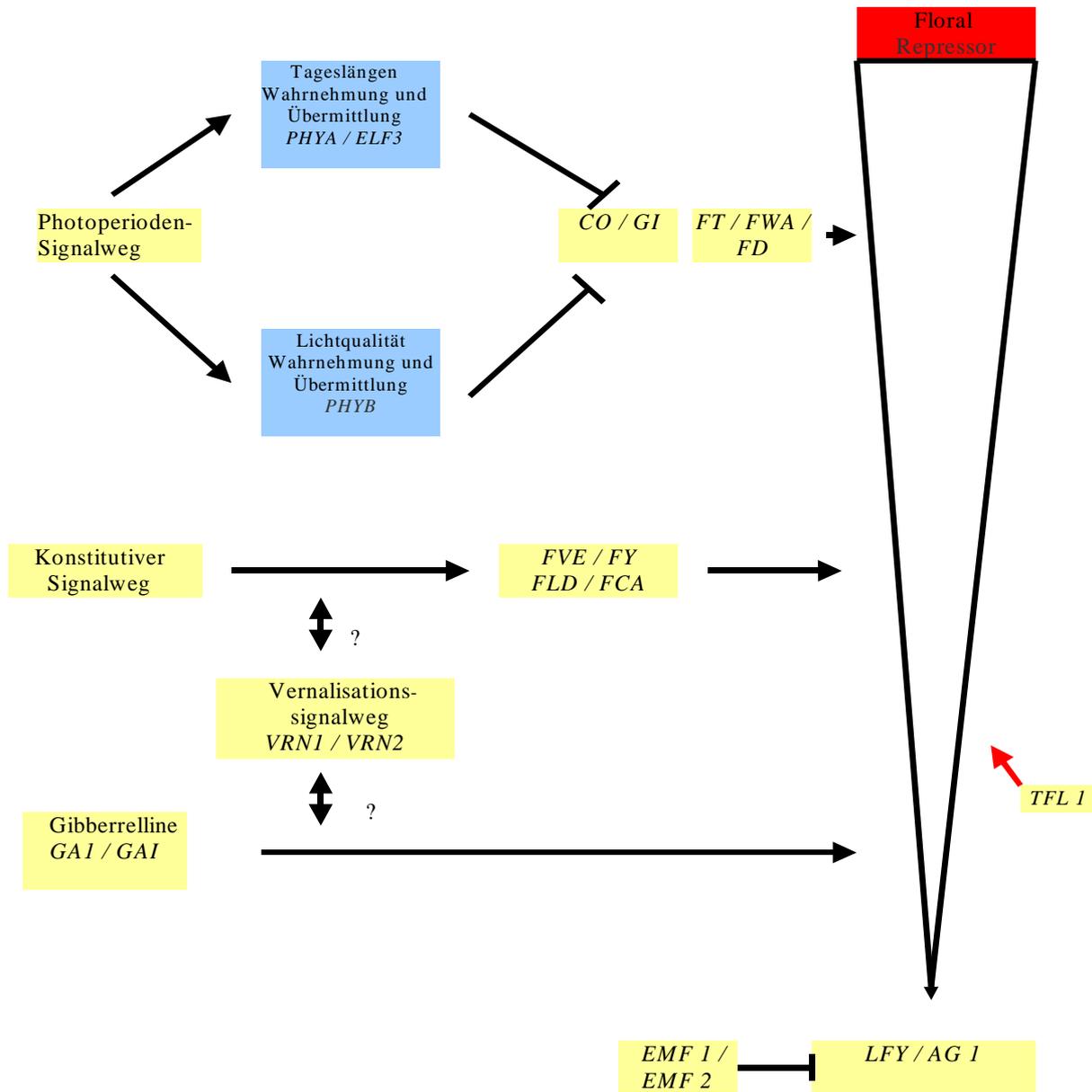


Abb 1/1: das Modell wurde aus zwei Modellen aus Simpson et al. 1998 und Koornneeff et al 1998 zusammengesetzt. TFL beeinflusst wahrscheinlich die Aktivität eines Inhibitors bzw. Blührepressors, indem es diesem stabilisiert (Alvarez et al. 1992).. LEAFY ist ein sogenanntes Floral meristem identity“-Gen, das am Aufbau der Blüte beteiligt ist. fwa und fd reagieren beide auf Photoperioden. Diese Mutanten reagieren mit verzögerter Blühinduktion unter Langtagbedingungen und etwas verzögert unter Kurtagbedingungen . und werden deswegen nach Simpson et al. (1999) in eine Subgruppe zum photoperiodisch gesteuerten Signalweg gestellt. da die anderen Mutanten aus diesem Signalweg nur bei Langtagbedingungen mit verzögerter Blühinduktion reagieren. fve und fy sind spätblühende Mutanten, deren Phänotyp durch Vernalisation aufgehoben werden kann (Koornneeff et al. 1991). Weitere Erklärung siehe Einleitung und Diskussion. Der indirekte Einfluß des Vernalisationssignalweges auf den konstitutiven bzw. Gibberellin-gesteuerten Signalweges wird von den beiden zugrundeliegenden Modellen unterschiedlich bewertet, daraus ergibt sich das Fragezeichen bei den Pfeilen des Vernalisationsweges.

Die Rolle von physiologischen Faktoren wie Photoperiode oder Vernalisation bei der Blühinduktion sind gut erschlossen, es gibt aber keine physiologischen oder genetischen Untersuchungen zum Einfluß von Nährstoffen auf die Blühinduktion. Es ist zwar bekannt, daß Kohlenhydrate wie z.B. Stärke die Blühinduktion beeinflussen. Inwieweit das für andere Nährstoffe wie z.B. Nitrat gilt, ist bisher noch nicht näher untersucht worden.

Da aber Nitrat eine der wichtigsten Nährstoffe ist und oftmals limitierend auf das Wachstum einwirken kann, ist davon auszugehen, daß es eine wichtige Rolle in der Blühinduktion spielt. Ziel der Doktorarbeit ist es, Kenntnisse der Stickstoffbeeinflussung auf die Blühinduktion am Beispiel von Nitrat zu erarbeiten.

## **1.2 Biochemische und genetische Auswirkungen beim Pflanzenwachstum als Antwort auf Veränderungen in der Nitratzufuhr**

Wachstum und Entwicklung von Pflanzen wird weitgehend bestimmt durch das Angebot an zur Verfügung stehenden Grundlagen wie Wasser, Licht und Nährstoffe. Stickstoff ist das wichtigste mineralische Nährelement für Pflanzenwachstum und ist dabei meist in Form von Nitrat mit Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 100 mM für die Pflanzen verfügbar (Marschner 1995, Crawford 1995). Zusammen mit der  $\text{CO}_2$ -Fixierung in der Photosynthese stellt die Nitratassimilation für die Pflanze einen fundamentalen Prozess dar, um autotroph zu sein. Neben den höheren Pflanzen sind auch Bakterien, Pilze und Algen zur Umwandlung organischen Stickstoffs in eine biologisch nutzbare, organische Form fähig.

Die Nitratassimilation in Pflanzen beginnt über eine aktive Aufnahme von Nitrat mittels Nitrat-Protonen-Symport aus dem umliegenden Bodengewebe in die Wurzel hinein. Daran sind nieder- und hochaffine Transporter beteiligt (Crawford 1995). Nitrat wird in der Wurzel und nach Transport im Xylem auch im Sproß reduziert. Die Reduktion läuft dabei über das zytosolische Enzym Nitratreduktase (NR) ab, das der geschwindigkeitsbestimmende und damit regulierende Schritt in der Nitratassimilation zu sein scheint (Beever & Hagemann 1969, Layzell 1990).

Stehen ausreichend Nitrat und Photosyntheseprodukte zur Verfügung, so wird die NR-Aktivität als limitierender Faktor für Wachstum, Entwicklung sowie Proteinsynthese in Pflanzen und weiteren nitratassimilierenden Organismen angesehen (Solomonson & Barber 1990). Die weiteren Enzyme in der Nitratassimilation wie Nitritreduktase und Glutaminsynthetase sind hingegen nicht limitierend. Dies hat seinen Grund darin, daß sowohl Nitrit als auch Ammonium in höheren Konzentrationen toxisch wirken und somit so schnell wie möglich abgebaut werden müssen.

Nitrat induziert und reguliert somit als Substrat durch seine Verfügbarkeit die Expression der am Nitratassimilationsweg beteiligten Gene für Nitratreduktase, Nitritreduktase und Nitrattransporter, dies ist für filamentöse Pilze (Crawford & Arst 1993, Marzluf 1993) und Chlamydomonas (Fernandez & Cardenas 1989) nachgewiesen. Diese Induktion der Gene erfordert dabei nicht die Neusynthese der Proteine, dies läßt eine konstitutive Expression des Signalweges vermuten (Gowri et al. 1992). Außerdem scheint es wichtig für die Stabilität der NR-mRNA zu sein (Ferrario et al. 1995).

Neben Nitrat als Substrat hat auch Licht eine regulierende Wirkung auf die Expression von Nitrat- und Nitritreduktase, die sich post-transkriptionell auswirkt. Dabei wird der Lichteffect wahrscheinlich durch Phytochrom vermittelt, zumindest ist dies für etiolierten Pflanzen nachgewiesen (Schuster & Mohr 1990, Neiningen et al. 1992). In transgenen Pflanzen mit konstitutiv exprimierter nia-mRNA sinkt die NR-Aktivität und der Gehalt an NR-Protein im Dunkeln ab (Vincentz & Caboche 1991). Neben dieser direkten Beeinflussung durch Licht tritt auch noch eine circadiane Kontrolle der NR-Genexpression auf. Werden Pflanzen in kontinuierlichem Tag/Nacht-Zyklus angezogen, so variiert die nia-Transkriptmenge in diesen Blättern sehr stark (Deng et al. 1990, Bowsher et al. 1991, Pilgrim et al. 1993). Dabei ist sie gegen Ende der Nacht (Tabak, Tomate, *Nicotiana plumbaginifolia*) bzw. zu Beginn der Photoperiode (*Arabidopsis thaliana*, Mais) am höchsten und fällt gegen Ende der Lichtphase auf nicht detektierbare Mengen ab. Die tageszeitliche Fluktuationskontrolle scheint in *Nicotiana plumbaginifolia* transkriptionell zu sein (Vincentz & Caboche 1991, Vaucheret et al. 1992), in *Arabidopsis thaliana* hingegen posttranskriptionell (Pilgrim et al. 1993).

Licht wirkt sich nicht nur direkt auf die Induktion der NR als wichtigstes Enzym der Nitratassimilation aus, sondern auch indirekt über die Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch die Photosynthese. Es ist eine Induktion der NR durch

metabolisierbare Zucker wie Glukose, Fruktose und Saccharose nachgewiesen (Cheng et al. 1992, Vincentz et al. 1993). Mittels Expressionsstudien von Reportergenen, die unter Kontrolle des Tabak *nia1* bzw. Arabidopsis *nia1*-Promotors standen, konnte dies bewiesen werden (Cheng et al. 1992, Vincentz et al. 1993).

Neben den bisher beschriebenen positiven Einflüssen auf die NR als Hauptenzym der Nitratassimilation gibt es, dies ist zumindest bei filamentösen Pilzen gezeigt worden, auch eine Reprimierung der NR durch Glutamin (Crawford & Arst 1993, Marzluf 1993). Bei Tabakblättern wurde gezeigt, daß der Tagesgang der *nia*-Transkriptmenge negativ mit der Glutaminkonzentration im Gewebe korreliert (Deng et al. 1991). Ebenso unterdrücken exogen angebotenes Glutamin oder Asparagin spezifisch Ammoniumaufnahme in Weizen (Causin & Barnaix 1994). Glutamin gehört mit Glutamat, Aspartat und Asparagin zu den N-Speichernden Aminosäuren und dienen als Speicher- und Transportverbindungen für organisch gebundenen Stickstoff in der Pflanze (Lam et al. 1995). In Mais wurde gezeigt, daß niedrige Glutamin- oder Asparaginspiegel den Netto-N-Aufnahme stimulieren (Lee et al. 1994), ebenso in Spinatzellkulturen (Shiraishi et al. 1992, Ogawa et al. 1999) Außerdem reprimieren Glutamin und Asparagin die Induktion der Nitritreduktase (Wray 1993).

Bei limitierter externer Stickstoffversorgung kommt es häufig zu einer Änderung der Biomasseallokation, z.B. eine Absenkung des Sproß/Wurzel-Verhältnisses (Ågren & Ingestad 1987, Rufty et al. 1990, Clarkson & Touraine 1994, Ameziane et al. 1995). Das Wurzelwachstum wird dabei wesentlich stärker gefördert als das Sproßwachstum. Zugleich führen hohe lokale Nitratkonzentrationen an der Wurzel zu einer Hemmung des Wurzelwachstums, wie an Tabakpflanzen mit stark reduzierter Nitratreduktase-Aktivität nachgewiesen wurde (Scheible 1996, Scheible et al. 1997b). Lokal appliziertes Nitrat führt zur Induktion des ANR1-Genproduktes, einem Transkriptionsfaktor, der das Wachstum von Lateralwurzeln als Antwort auf Nitratzufuhr beeinflusst (Zhang et al. 1998).

Gesteigerte Nitratfütterung hingegen führt zu erhöhter Aufnahme von Nitrat und Ammonium (Crawford 1995, Hoff et al. 1994), erhöhten Aminosäurekonzentrationen (Ferrario et al. 1995), Veränderungen im pH und in der Ionenbalance und veränderten Konzentrationen der organischen Säuren wie Malat, dessen Metabolismus ist eng verknüpft mit der Assimilation von Nitrat und Ammonium (Kaiser & Förster 1989, Martinoia & Rentsch 1994) Außerdem nehmen die Konzentrationen an Speicherkohlenhydraten wie Stärke ab (Fichtner & Schultze

1992, Stitt & Schultze 1994), während Proteinkonzentrationen steigen, zudem sind die Phytohormone beeinflusst.

Die Beeinflussung des Pflanzenwachstums durch das externe Stickstoffangebot läßt den Schluß zu, daß Stickstoff selbst direkt in Form des organischen Nitrats bzw. indirekt über seine reduzierten Derivate oder auch über das C/N-Verhältnis an Wachstumsvorgängen beteiligt ist. (Trewavas 1985, McIntyre 1997). Das Nitrat selbst als Signalgeber fungiert, läßt sich z.B. bei der Induktion der an der Nitratassimilation beteiligten Enzyme und zugleich der Induktion der Synthese von organischen Säuren sowie einer Inhibierung der Stärkesynthese erkennen, die Induktion erfolgt sehr rasch innerhalb von bis zu 30 min (Scheible 1996). Außerdem wurde anhand von NR-Tabak-Mutanten mit 50% NR-Aktivität im Vergleich zu ihrem entsprechenden Wildtyp *Nicotiana tabacum* gezeigt, daß diese Mutanten genauso gut wuchsen wie der Wildtyp (Scheible et al. 1997b) und ähnliche Protein- oder Aminosäurespiegel wie der Wildtyp aufwiesen. Die Wuchsraten waren dabei unabhängig von hoher oder niedriger Nitratversorgung (Scheible et al. 1997b). Erhöhte Nitratzufuhr führt zur Inhibierung der Blühinduktion und Blattseneszenz bzw. Blattabwurfs und zur Bevorzugung des Sproßwachstums gegenüber dem Wurzelwachstum. Umgekehrt kommt es bei verringerter Nitratzufuhr zur Blühinduktion, außerdem treten Blattseneszenz und Blattabwurf verfrüht auf, das Blattwachstum wird reduziert und das Wurzelwachstum wird gegenüber dem Sproßwachstum bevorzugt (Trewavas 1983).

Stickstoffhaushalt und Kohlenhydrathaushalt sind eng miteinander gekoppelt, dies ist notwendig, da bis zu 55% des assimilierten Kohlenstoffs zur Assimilation von Stickstoff verwendet wird (Huppe & Turpin 1994). Der fixierte Kohlenstoff dient zum einen als Kohlenstoffskelett, der in Form organischer Säuren für den Einbau des organischen Stickstoffs in Aminosäuren benötigt wird. Die organischen Säuren dienen gleichzeitig zur Erhaltung von osmotischem Potential und pH-Homeostase während der Nitratreduktion (Davies 1986).  $\alpha$ -Oxoglutarat dient dabei als Akzeptor für Ammonium im GOGAT-Weg, Malat agiert als Gegenion und Ersatz für Nitrat, um Alkalisierung zu vermeiden (Ben-Zioni 1970, Stitt 1999). Die Stickstoffaufnahme und die Nitratreduktion sind zudem engerieverbrauchend, die Energie wird durch Respiration von Kohlenhydraten bereitgestellt (Crawford 1995).

Auch diese enge Kopplung von Kohlenstoffmetabolismus und Nitratassimilation führt dann auch zu bestimmten Effekten, die eine Steuerung durch Nitrat, entweder direkt oder indirekt, vermuten lassen. So ist bekannt, daß es bei externer Nitratapplikation zu einer raschen Zunahme der Nitrataufnahme kommt (Jackson et al. 1973, Siddiqui et al. 1990, Laine et al. 1995) und die Aktivitäten von NR (Gowri et al. 1992) und NiR (Faure et al. 1991) sich erhöhen. Auch aus den nachfolgenden Synthesewegen werden Enzyme wie Glutaminsynthetase und GOGAT (Hayakawwa et. al. 1992, Sakakibara et. al. 1992) in ihrer Aktivität verstärkt.

Zwischen hohen Nitratgaben und Stärkesynthese gibt es eine negative Korrelation (Huber 1983, Chu et al. 1992, Fichtner 1993). Während der vegetativen Phase akkumuliert die Pflanze entweder Nitrat oder Stärke (Waring et al. 1985, Fichtner 1993). Dies läßt sich damit erklären, daß für die Nitratmetabolisierung C-Skelette notwendig sind, zum anderen ohne Nitrat jedoch auch die Kohlenhydrate vollständig umgesetzt werden können. So ist bisher nachgewiesen, daß Nitrat beispielsweise die Stärkesynthese im Sproß hemmt (Scheible et al. 1997). Der Karbontransport in die Wurzel wird in Pflanzen mit hohem Nitratgehalt in den Blättern inhibiert.

Aminosäuren und Amide sind die ersten stabilen Produkte der Assimilation von anorganischem Stickstoff (Oaks 1994) und bilden die Grundlage der Proteine. Veränderungen in der Konzentration bestimmter Aminosäuren oder im Gesamtaminosäurespiegel sind an der Regulation vieler Prozesse beteiligt, die zum N-Metabolismus der Pflanze gehören (Atilio & Causin 1996). Eine hohe Nitratzufuhr erhöht die Konzentration an freien Aminosäuren in den Blättern vieler Pflanzenarten (Barnaix et al. 1984).

Hohe Nitratkonzentrationen führen zu einer Verzögerung der Blühinduktion (Bernier 1993), während Nitratlimitierung das Einsetzen der Blüte fördert. Der Einfluß von Nitrat per se auf diesen Vorgang ist bisher jedoch noch nicht näher untersucht worden, es ist also nicht bekannt, auf welche Art und Weise Nitrat in den Mechanismus der Blühinduktion bzw. der Blühformation eingreift.

### 1.3 Ansätze und Ziele dieser Doktorarbeit

Um den Einfluß von Nitrat ermitteln zu können, muß zunächst eine Strategie erarbeitet werden, die es ermöglicht, die Signalwirkung von Nitrat zu beobachten und gleichzeitig die klassische Problematik der Änderung vieler Parameter, die mit Pflanzendüngung normalerweise einhergeht, zu umgehen.

Deswegen wird zunächst als N-Quelle eine Aminosäure gesucht, die an sich wenig Einfluß auf Wachstumsparameter und Metabolitenspiegel hat, aber Nitrat als N-Quelle substituieren kann. Mit dieser Basis kann dann der N-Spiegel in seiner Konzentration geändert werden.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den Einfluß von Nitrat auf die Blühinduktion zu ermitteln. Dazu wurden verschiedene Ansätze gewählt:

- 1.) Zunächst wird eine Strategie entwickelt, die es ermöglicht, die Rolle von Nitrat als Signalgeber bei der Blühinduktion zu ermitteln, ohne es als N-Quelle verwenden zu müssen. Dazu werden zunächst verschiedene Aminosäuren auf ihre Qualifikation als N-Quelle getestet. Anstelle der Verwendung von Mutanten wird damit eine biochemische Strategie entwickelt, die den Vorteil hat, unabhängig von einem bestimmten Genotyp zu funktionieren.
- 2.) Nitrat wird in unterschiedlichen Konzentrationen und gleichzeitig unter verschiedenen Photoperioden angeboten. Es ist bekannt, daß *Arabidopsis thaliana* eine fakultative Langtagpflanze ist, die unter Kurztagbedingungen eine deutliche Verzögerung der Blühinduktion zeigt. Dies stellt eine Möglichkeit dar, das Zusammenspiel zwischen Nitrat als Nährstoff und Licht zu ermitteln und zugleich festzustellen, wie stark die jeweilige Gewichtung ist.
- 3.) Es werden verschiedene bekannte Blühmutanten mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen angezogen, um festzustellen, in welchem Maße Nitrat als einer der wichtigsten Nährstoffe das Blühverhalten steuert, wenn Gene aus den verschiedenen Signalwegen der Blühinduktion mutiert sind, bzw. ob eine Mutation unabhängig von der externen Nitratversorgung greift. Dazu gehören *tfl1* als

Blührepressor-Mutante, *fwa* und *fd* als Mutanten aus dem Photoperiodengesteuerten Signalweg, *fve* und *fy* aus dem autonomen Signalweg und *lfy* als Vertreter der „floral meristem identity“-Gene.

- 4.) In einem weiteren Testansatz wird eine definierte Mutante, welche eine Mutation im MADS-Bos Gen ANR1 aufweist, ebenfalls unter verschiedenen Nitratkonzentrationen angezogen, um zu sehen, in welchem Ausmaß die Mutation in dem sogenannten ANR1-Gen, daß die Wurzelarchitektur unter verschiedene Nährstoffangeboten bei Arabidopsis steuert (Zhang & Forde, 1998) die Blühinduktion beeinflusst. Dieses Gen bewirkt eine Induktion der Lateralwurzeln bei lokal begrenzten Nitratangeboten. Wie in diesem Fall der Zusammenhang zwischen Sproß und Wurzelverhältnissen gegeben ist, sollte in dieser Testreihe ermittelt werden.

Die Testreihen werden hauptsächlich bei drei Nitratkonzentrationen durchgeführt 1 mM Nitrat als niedrige Nitratversorgung, 10 mM Nitrat als ausreichende und 35 mM Nitrat als überoptimale Nitratversorgung. Um eine Signalwirkung von Nitrat ermitteln zu können, ohne auf die N-Quelle Nitrat allein angewiesen zu sein, beinhalten die Anzuchtmedien zusätzlich 4 mM Glutamin. In Vortests hat sich gezeigt, daß Glutaminbeigabe zu einer rascheren Blüte führt, ohne Biomasse oder wesentliche Inhaltsstoffe wie Nitratgehalt, Kohlenhydrate oder Aminosäuren groß zu beeinflussen. Da die Tests auf Agarplatten durchgeführt werden und damit die Gefahr des Austrocknens besteht, wird die negative Wirkung von Glutamin auf die Nitratreduktase in Kauf genommen, wenn auf der anderen Seite eine raschere Ermittlung der Daten möglich ist. Außerdem werden bei den Testreihen zu Punkt 3.) und 4.) zwei Kontrollbedingungen verwendet. Zum einen ist dies eine Mangelbedingung mit 0,5 mM Nitrat. Theoretisch sollte mit sehr niedrigen Nitratspiegeln eine rasche Blühinduktion eintreten. Die zweite Kontrollbedingung ist 10 mM Nitrat ohne Glutaminzusatz. Dies dient dazu, festzustellen, in welchem Maße Glutamin tatsächlich eine blühfördernde Wirkung im gewählten System hat.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Pflanzenmaterial**

Als Pflanzenmaterial diente *Arabidopsis thaliana*, genauer die Ökotypen Columbia Col-0 , C24 und Landsberg erecta (bezogen von Lehle Seeds, Texas, USA)

Die Blühmutanten mit Ler als Hintergrund wurden entweder von Nottingham Arabidopsis Stock Centre England, oder Ohio Stock Centre, USA, bezogen. Die ANR-Mutanten wurden freundlicherweise von Prof. Dr.Brian Forde (Universität Lancaster, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

### **2.2 Chemikalien**

Enzyme und Enzymsubstrate wurden bei der Firma Roche (vormals Boehringer) Mannheim bezogen. Die im Aminosäurestandard eingesetzten Aminosäuren stammten von der Firma Sigma (München). Ninhydrin wurde von der Firma J.T.Baker (Debenter, Holland) bezogen. Als Agar wurde Agar für Zellkultur von der Firma Sigma (München) verwendet. Alle anderen Chemikalien stammten, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt) , Sigma (München) oder Fluka (Buchs, Schweiz).

### **2.3 Pflanzenanzucht**

#### **2.3.1 Nährmedien**

Zur Pflanzenanzucht wurden Nährmedien aus Stocklösungen verschiedener Salze hergestellt, diese waren zuvor mit bidestilliertem Wasser angesetzt worden. Die Nährmedien wurden ebenfalls mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Die angesetzten Nährmedien wurden nach Zugabe von Agar, Saccharose und Fe-EDTA autoklaviert. MES wurde als 1 M Stammlösung, Glutamin als 0,4 M Stammlösung angesetzt, beide Lösungen wurden mit pH 5,6 eingestellt. Sowohl MES als auch Glutamin wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Lösungen zugegeben, nachdem diese auf ca. 60°C abgekühlt waren. Die fertigen Lösungen wurden danach zügig auf die sterilen Platten (Falcon Petri Dish 100x15 mm, Becta Dickison Laboratories, USA/France) verteilt (33 ml/Platte).

Die gegossenen Platten wurden verschlossen und stehengelassen, bis der Agar ausgehärtet war. Danach wurden sie mit halb offenem Deckel für 30 Minuten aufgestellt, um überflüssige Flüssigkeit auszutrocknen. Die Platten wurden bis zur weiteren Verwendung kopfüber bei 4°C gelagert, um das Ansammeln von Kondenswasser auf den gegossenen Platten zu vermeiden.

Zusammensetzung der verwendeten Medien:

<i>End-Konz- Nitrat</i>	<i>0,5 mM</i>	<i>1 mM</i>	<i>10mM</i>	<i>35 mM</i>	<i>10 mM</i>
KNO	0,5 mM	1 mM	10 mM	35 mM	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	5 mM	5 mM	1 mM	1 mM	1 mM
MgCl <sub>2</sub>			4 mM		
KCl	5 mM	5 mM			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
NaFeEDTA	8 mg/l	8mg/l	8mg/l	8mg/l	8mg/l
Saccharose	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%
Oligoelemente	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,5 ml/l
Mes	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM
Glutamin	0 mM	4 mM	4 mM	4 mM	0 mM
Agar	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %

Die verwendete KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung wurde mit Phosphorsäure auf pH 5,6 eingestellt.

Zusammensetzung der Oligoelemente-Lösung:

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	150 mM
MnSO <sub>4</sub>	35 mM
ZnSO <sub>4</sub>	2,5 mM
CuSO <sub>4</sub>	1,5 mM
NiCl <sub>2</sub>	1 mM
HMoO <sub>4</sub>	0,75 mM
CoCl <sub>2</sub>	0,05 mM

### 2.3.2 Sterilisation der Samen

Die bei 4°C gelagerten Samen wurden zunächst in entsprechender Menge abgenommen (1000 Samen wiegen ca. 20 mg) und danach sterilisiert. Dazu wurden sie 10 – 12 Minuten mit NaOCl 5,25 % (v/v) gebeizt und danach 3 – 4mal mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen. Zum Schluß wurde das Waschwasser möglichst vollständig abgenommen und steriler Agar (0,15 % (w/v in H<sub>2</sub>O)) hinzugegeben.

### **2.3.3 Aussaat der Samen**

Die Aussaat erfolgte mit sterilen Pasteurpipetten, dabei wurden für die Blühinduktionsversuche 4 Samen pro Platte ausgebracht. Die Platten wurden danach mit Micropore-Klebeband verschlossen, um auf der einen Seite Gasaustausch mit der Umgebung zu ermöglichen, auf der anderen Seite Kontamination von außen zu vermeiden. Die Platten wurden kopfüber und im Dunkeln für 4 – 5 Tage bei 4°C gelagert, um eine Synchronisation der Samenkeimung zu erreichen. Danach wurden sie in horizontaler Lage in die Araschränke ausgebracht. Die Lichtintensität betrug 100 – 120  $\mu\text{E}$  (je nach Experiment) und 20°C. Die Anzuchten erfolgten bei 8 h Licht / 16 h Dunkel, 12 h Licht / 12 h Dunkel sowie 16 h Licht / 8 h Dunkel. Genauere Angaben erfolgen im Ergebnisteil. Es war keine zusätzliche Luftfeuchtigkeit eingestellt.

## **2.4 Dokumentation und Ernte**

### **2.4.1 Blühverlaufsdokumentation**

Pro Nitratbedingung und Lichtdauer wurden 30 bis 60 Platten ausgebracht. Um eine rasche Ergebnisdokumentation zu ermöglichen, wurden pro Bedingung Gruppen mit 8 – 16 Samen = 3 - 4 Platten gebildet. Pflanzen, die Krüppelwachstum zeigten oder erst sehr spät mit dem Wachstum begannen, wurden nicht in die Beobachtungen einbezogen. Die Zählung der Blühansätze erfolgte 3 – 4 Stunden nach Lichtbeginn. Gezählt wurde ab dem ersten, mit bloßem Auge erkennbarem Auftauchen von Knospenansätzen in der Mitte der Blattrosette.

### **2.4.2 Ernte**

Zur Ernte (30 – 90 Minuten nach Lichtbeginn, um auch in den Mangelbedingungen Nitrat messen zu können) wurden die zuvor ausgewählten Platten geöffnet, mit Wasser versetzt und wieder zurück in den Araschrank gestellt, um so lange wie möglich die Licht- und Temperaturbedingungen aufrechtzuerhalten. Die Zugabe von Wasser führt zu einer Aufweichung des Agars sodaß bei der weiteren Ernte der Wurzelverlust gering gehalten werden konnte. Danach wurden die Pflanzen mit Hilfe einer Pipette vorsichtig aus dem Agar

gezogen und zweimal in bidestilliertem Wasser gewaschen. Dabei wurde, soweit notwendig, überschüssiger Agar aus den Wurzeln entfernt. Nach dem Waschen wurden die Pflanzen auf Saugpapier getrocknet und die Blattanzahl ermittelt. Die Pflanzen wurden danach in Sproß und Wurzel getrennt, beide Gewebe gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sproßgewebe war dabei alles oberhalb des Wurzel, es wurde nicht in Rosettengewebe und Blüte getrennt. Pro Replikat wurden 2 – 3 Pflanzen eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei – 80°C gelagert.

### **2.4.3 Aufbereitung des Pflanzenmaterials**

Zur Vorbereitung der nachfolgenden ethanolischen Extraktion wurde das Pflanzenmaterial in vorgekühlten Mörsern bis zur Homogene gemörsert und danach in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Schraubdeckel-Eppis) abgewogen (30 - 40 mg). Dabei wurde jeweils das genaue Gewicht notiert.

### **2.4.4 Ethanolische Extraktion**

Zur Extraktion von Aminosäuren, Zuckern, Stärke und Nitrat wurde eine ethanolische Extraktion durchgeführt. Dabei wurde ein Teil abgewogenes Pflanzenmaterial mit 5 Teilen ethanolischer Lösung bzw. Puffer versetzt. Die Suspension wurde 20 Minuten bei 80°C inkubiert. Durchgeführt wurden zwei Extraktionsschritte mit 80% Ethanol in 10 mM Hepes-KOH pH 7,5, ein Extraktionsschritt mit 50 % Ethanol in 10 mM Hepes-KOH pH 7,5 und ein weiterer Extraktionsschritt mit 10 mM Hepes-KOH pH 7,5. Nach der Inkubation wurden die Mikroreaktionsgefäße je 5 Minuten bei 4°C und 14 000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Mikroreaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Das Sediment wurde erneut extrahiert, bis alle Extraktionsschritte durchgeführt waren. Die so gewonnenen Überstände wurden vereinigt und für weitere Messungen verwendet, das Pellet diente zur Stärkebestimmung.

#### **2.4.4.1 Aufbereitung des Sediments**

Zur Bestimmung von Stärke wurde das Pellet zunächst mit bidestilliertem Wasser gewaschen und danach 5 Minuten bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der

Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen . Das Pellet wurde mit 4-5 Teilen bidestilliertem Wasser versetzt und 3 Stunden bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlen der Suspension wurde das gleiche Volumen 50 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 5 mit 1,4 U Amyloglukosidase aus *Aspergillus niger* und 2 U  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas hinzugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und danach für 2 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Enzyme abzutöten. Vor der Messung der durch die hydrolytische Spaltung entstandenen Glukose wird die Suspension 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert.

## **2.5 Bestimmung verschiedener Inhaltsstoffe aus den ethanolischen Extrakten**

### **2.5.1 Bestimmung des Gesamtaminosäuregehaltes**

Zur Ermittlung des Gesamtaminosäuregehaltes wurden die im Extrakt vorhandenen Aminosäuren mit Ninhydrin derivatisiert, die gewonnenen Verbindungen weisen ein Absorbptionsmaximum bei 570 nm auf.

Die zur Derivatisierung verwendeten Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Lösung 1: 1 % Ninhydrin in 70 % Ethanol,

Lösung 2: 0,2 % Ascorbinsäure in 1 M Citrat, pH 5,2 . Die Lösungen sind bei – 80°C längere Zeit lagerbar. Als Standard diente Glutamin in verschiedenen Konzentrationen, in 52,5 % Ethanol angesetzt. Diese Ethanolkonzentration ergab sich aus dem Ethanolanteil der Pflanzenproben.

Der Probenansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 – 20  $\mu$ l Probe,
- 50  $\mu$ l 52,5 % Ethanol,
- 50  $\mu$ l Citrat / Ascorbinsäure,
- 100  $\mu$ l 1% Ninhydrin in 70 % Ethanol

Der Ansatz wurde gemischt und 20 Minuten bei 95°C inkubiert. Zum Abkühlen wurden die Mikroreaktionsgefäße auf Eis gestellt und die Proben danach in eine 96-Well-Platte pipettiert. Gemessen wurde bei 570 nm am Anthos II-Elisareader.

### 2.5.2 Bestimmung der Einzel-Aminosäuren

Die proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Prolin und Cystein) wurden mit Hilfe einer reversed-phase-HPLC (high performance liquid chromatography) aufgetrennt und ihre Konzentrationen mit Hilfe von Aminosäurestandards bestimmt. Der Nachweis der Aminosäuren beruht dabei auf der Bindung von o-Phtalsäuredialdehyd (OPA) an die primäre Aminogruppe der Aminosäuren, wodurch ein fluoreszierendes Derivat entsteht, das mit Hilfe eines Fluorometers (SFM 25, Kontron, München, Excitationswellenlänge 330 nm, Emissionswellenlänge 450 nm) gemessen und mittels eines Datensystems (450 MT, Kontron, München) ausgewertet wurde. Die Vorsäulenderivatisierung erfolgte automatisiert unter Verwendung eines Probengebers (Autosampler 465, Kontron) : In 35 µl Probe wurden 35 µl Derivatisierungsreagenz injiziert, 100 Sekunden bei 4°C derivatisiert und 20 – 40 µl dieses Ansatzes über Vor- und Trennsäule aufgetrennt. Die Trennung erfolgte auf einer Hypersil ODS-Säule (3 µm Partikelgröße, 150 mm Länge, 4,6 mm Innendurchmesser, Knauer GmbH, Berlin, Raumtemperatur). Als Probematerial dienten dabei ethanolische Extrakte, die eingeeignet wurden und in bidestilliertes Wasser aufgenommen wurden.

Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines Gradienten aus beiden Laufmitteln, der sich wie folgt zusammensetzt:

0 – 2 Minuten	isokratische Phase mit 100 % A, 0 % B
2 – 11 Minuten	linearer Gradient von 0 % B auf 10 % B
11 – 17 Minuten	isokratische Phase mit 10 % B
17 – 27 Minuten	linearer Gradient von 10 % B auf 50 % B
27 – 38 Minuten	linearer Gradient von 50 % B auf 60 % B
38 – 44 Minuten	linearer Gradient von 60 % B auf 100 % B
44 – 46 Minuten	isokratische Phase mit 100 % B, 0 % A
46 – 48 Minuten	linearer Gradient von 100 % B auf 0 % B
48 – 60 Minuten	isokratische Phase mit 100 % A, 0 % B

verwendete Lösungen waren dabei:

Derivatisierungsreagenz:

5 % (g/v) OPA / Methanol/ 0,8 M Borat-KOH-Puffer pH 10,4 / 3-Mercaptopropionsäure  
( 10 : 90 :1, v:v:v)

**Laufmittel A.:**

1000 ml 10 mM Na-Phosphatpuffer, mit Phosphorsäure auf pH 6,8 eingestellt

2.4ml Tetrahydrofuran

**Laufmittel B:**

50 % Na-Phosphatpuffer 40 mM, mit Phosphorsäure auf pH 6,8 eingestellt

150 ml Methanol

100 ml Acetonitril

**2.5.3 Bestimmung des Nitratgehaltes**

Zur Bestimmung des Nitratgehaltes in den Proben wurde eine HPLC-Methode (high performance liquid chromatography) verwendet. Die Auftrennung erfolgte dabei auf einer schwachen Anionenaustauschersäule auf Silicagelbasis (VYDAC 302 IC). Als Laufmittel diente ein Puffer mit 45 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 2,7. Als Standard wurde 100  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur und bei einer Flußrate von 1,6 ml/ Minuten. Die Proben wurden je nach Nitratgehalt des Agars entweder eingeengt oder 10 – 20fach verdünnt im Autosampler (Autosampler SA 360, Kontron, München) vorgelegt, wobei 20  $\mu\text{l}$  auf der Säule aufgetrennt wurden. Bei niedrigen Nitratgehalten im Agar war eine Einengung der betroffenen Pflanzenproben notwendig, da sonst das entstehende Ethanol signal das eigentliche Nitratsignal überlagert hätte. Die Absorption bei 210 nm wurde mit einem UV-Detektor erfaßt und die sich ergebende Absorptionsänderung mit einem Datensystem (450 MT, Kontron, München) ausgewertet.

**2.5.3 Metabolitenbestimmungen mit Hilfe enzymatisch gekoppelter Meßverfahren**

Die Metabolite wurden mit Hilfe enzymatischer Substratanalyse nach Lowry und Passoneau, 1972, modifiziert nach Stitt et al., 1984 und Wirtz et al., 1980 durchgeführt. Bei Einsatz von NADH war die Meßwellenlänge 334 nm und die Referenzwellenlänge 405 nm, bei Verwendung von APAD war die Meßwellenlänge 570 nm. Die Reaktionen fanden in Polystyrol Microtiterplatten (Microtest Plate mit 96 Wells, Sarstedt, USA) statt und wurden mittels eines Microtiterplatten-Readers (Anthos HTII, Typ 12.500, Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Österreich) verfolgt und mit Hilfe

der Biolise-Software ausgewertet. Gemessen wurde die Bildung bzw. der Verbrauch von NADH / NADPH bzw. APAD und die daraus sich ergebende Absorptionsänderung.

Die in Amoniumsulfat präzipitierten Hilfsenzyme wurden vor den Tests abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Enzyme im jeweiligen Testpuffer resuspendiert.

#### **2.5.4.1 Messung der Kohlenhydrate**

Glukose, Fruktose und Saccharose wurden in einem Ansatz sukzessive nacheinander bestimmt. Als Reaktionspuffer diente 100 mM Imidazol-HCl, pH 6,9 mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 500 µM NADP, 1,2 mM ATP und 1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Auf 200 µl Reaktionsansatz kamen 20 µl ethanolischer Extrakt. Die Reaktion wurde dann sukzessive gestartet durch Zugabe von 1 U Hexokinase zur Messung von Glukose, 1 U Phosphoglukoisomerase zur Messung von Fruktose und 100 U Invertase zur Messung von Saccharose.

Die beim Stärkeverdau entstandenen Hexoseäquivalente Glukose wurden nach dem gleichen Prinzip bestimmt, dabei wurden 40 µl ethanolischer Extrakt eingesetzt.

#### **2.5.4.2 Messung von Malat**

Bei der Malatmessung wurde ein Hepespuffer pH 8,5 mit einer Konzentration von 100 mM, 330 µM APAD (Acetylpyridinadenindinukleotid) und 330 µM Acetyl-CoA verwendet. Zudem enthielt der Ansatz 0,3 U Citratsynthase aus Schweineherz. Auf 200 µl Reaktionsansatz kamen 20 µl ethanolischer Extrakt. Nach 5 Minuten Preinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,6 U Malat-Dehydrogenase gestartet. Die Messung erfolgte bei 366 nm (der molare Extinktionskoeffizient von APAD liegt bei dieser Wellenlänge bei 9100 M<sup>-1</sup>).

### 3. Ergebnisse

Ziel der Doktorarbeit ist es, den Einfluß von Nitrat auf das Blühverhalten von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen. Neben der Entwicklung einer Strategie, die es durch Substituierung von Nitrat durch Aminosäuren ermöglicht, die Signalwirkung von Nitrat zu ermitteln, enthält die Arbeit drei weitere Ansätze, um die Rolle von Nitrat bei der Blühinduktion zu ermitteln:

Zunächst wird jedoch eine Strategie ermittelt, die es ermöglicht, den Einfluß von Nitrat als Signalstoff zu ermitteln, ohne es als N-Quelle verwenden zu müssen. Dazu werden verschiedene Aminosäuren auf ihre Qualifikation als Ersatz-N-Quelle ausgetestet. Ziel ist es, die Stickstoffversorgung der Pflanzen sicherzustellen, ohne daß die Signalwirkung der angewandten Nitratkonzentrationen dadurch beeinflußt wird.

Im ersten Ansatz werden Columbia-Samen auf drei verschiedenen Nitratkonzentrationen – 1 mM Nitrat als niedrige N-Versorgung, 10 mM Nitrat als ausreichende N-Versorgung und 35 mM Nitrat als hohe N-Versorgung - ausgebracht. Zusätzlich zu den Nitratkonzentrationen enthält das Agarmedium noch jeweils 4 mM Glutamin, das die erste N-Versorgung der keimenden Samen sicherstellt. Gln dient dabei als konstitutive Ersatz-N-Quelle, die es ermöglicht, Nitrat spezifisch als Signalstoff zu betrachten, ohne das es als N-Quelle dienen muß, was die Interpretation erschweren würde. Gln sichert damit das Wachstum der Pflanze insofern, als die Wuchsrate unabhängig vom Nitrat ist. Dabei wird der Effekt von Nitrat auf das Blühen unter drei verschiedenen Lichtregimen beobachtet, um zu sehen, wie stark Nitratsensing von der Tageslänge beeinflußt wird.

Im zweiten Ansatz werden *Landsberg erecta* und verschiedene, bereits definierte Blühmutanten unter einem gegebenen Lichtregime bei den oben genannten Nitratbedingungen sowie 0,5 mM Nitrat ohne Glutaminbeigabe als Mangelbedingung sowie 10 mM Nitrat ohne Glutaminbeigabe als 10 mM-Bedingung ohne Gln angezogen. Dabei wird *Landsberg erecta* als Wildtyp verwendet, da die meisten bekannten Mutanten *Landsberg erecta* als Hintergrund haben. Die Mangelbedingung mit 0,5 mM Nitrat dient dabei als Simulation von konventionellem Nitratmangel. Hier wird ermittelt, inwieweit sich dieser Mangel auf das Blühverhalten auswirkt. Die letzte Bedingung dient zur Ermittlung des Glutamineinflusses auf das Nitratsensing. Ziel ist es, inwieweit das Nitratsignal bei bekannten

Blühmutanten gegenüber dem Eltern-Wildtyp greift bzw. ob die Mutation unabhängig vom Nitratsignal wirkt. Dabei wird nur ein Lichtregime verwendet, um das System nicht zu kompliziert zu machen.

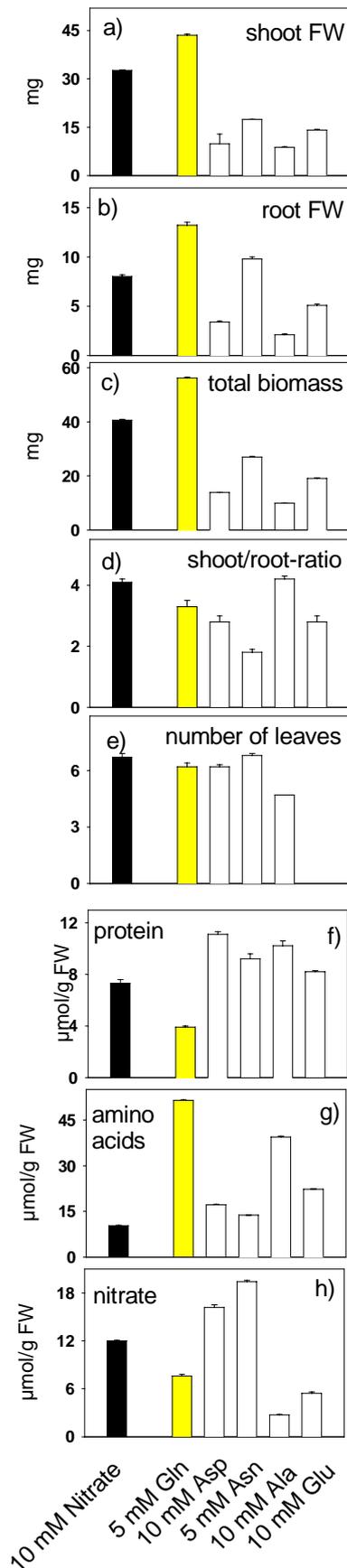
Im dritten Ansatz werden ANR1-Transformanten ebenfalls unter einem Lichtregime und fünf verschiedenen Nitratbedingungen angezogen. ANR1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in den Wurzeln expremiert wird und die Entwicklung der Lateralwurzeln in Abhängigkeit von der externen Nitratversorgung mit beeinflusst. Damit soll ermittelt werden, in welchem Maße Vorgänge in der Wurzel die Blühinduktion beeinflussen. Dabei wirkt das Nitratsignal indirekt über die Wurzel ein.

Bei den drei letztgenannten Ansätzen wurden im Verlaufe der Blühinduktion – es zeigten dabei 50 – 80 % der Pflanzen einen Blühansatz, die Blüte war aber nicht geöffnet – Ernten durchgeführt, um ethanolsche Extrakte zu erhalten und daraus Metaboliten messen zu können. Der genaue Zeitpunkt für jede Ernte wird in der Legende der einzelnen graphen angegeben. Dabei ist zu berücksichtigen, das daß Pflanzenmaterial 30 – 90 min nach Lichtbeginn geerntet wurde. Dies war notwendig, um auch in den Bedingungen mit niedrigen Nitratversorgungen noch Nitrat nachweisen zu können. Da die Ernten zu Beginn der jeweiligen Blühinduktion immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden – die Blühknospen waren sichtbar, aber Elongation des Internodiums bzw. Aufgehen der Blüte hat noch nicht stattgefunden – waren die geernteten Pflanzen im selben physiologischem Alter. Die Messung der Inhaltsstoffe der ethanolschen Extrakte gab Aufschluß darüber, in welchem Maße die externe Nitratfütterung Änderungen im internen Bereich bewirkte, inwieweit also der Nitratgehalt beeinflusst wurde, ob Gln sich als konstitutive N-Quelle eignete und wie organische Säuren, Kohlenhydrate und Aminosäuren reagierten. Ziel dieser Ernten war es, zu belegen, daß die Änderungen im Verlauf der Blühkurven auf einer Verschiebung des Blühens im Vergleich zum Wachstum und zur Entwicklung der Pflanze beruht und nicht auf einem schnelleren oder langsameren Wachstum der Pflanze. Damit können die absoluten Werte bei den verschiedenen Behandlungen nicht miteinander verglichen werden.

Die Bezeichnung Blüte bezieht sich immer auf den Blühansatz, also die gerade sichtbaren Blütenknospen. Pflanzen, die eine geöffnete, weiße Blüte zeigten, wurden nicht geerntet.

Glutamin wird im nachfolgenden als Gln abgekürzt.

### 3.1 Identifikation von Glutamin als N-Quelle

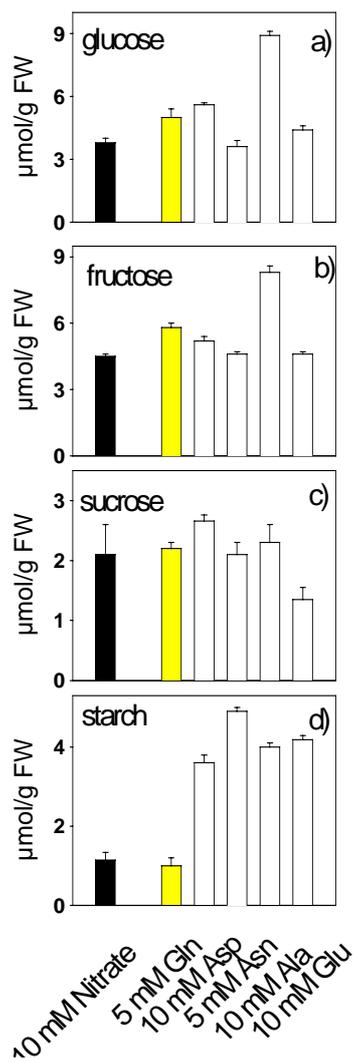


**Abbildung 3/1:** Die Graphen zeigen das Sproßgewicht, Wurzelgewicht, die Gesamtbiomasse, das Sproß/Wurzel-Verhältnis, die Anzahl der Blätter, die Konzentration an Protein, Aminosäuren und Nitrat bei *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die 21 Tage alt waren. Angezogen wurden die Pflanzen auf 10 mM Nitrat bzw. auf 0,2 mM Nitrat + 5 mM Gln oder 10 mM Asparagin oder 5 mM Aspartat oder 10 mM Alanin oder 10 mM Glutamat.

Um die Rolle von Nitrat als Signalstoff auf das Blühen testen zu können, ohne es als N-Quelle zu benötigen, wurden zunächst mehrere Aminosäuren auf ihre Eignung als alternative N-Quelle getestet. Dazu gehörten neben Glutamin auch Aspartat, Asparagin und Glutamat. Dabei wurden Arabidopsis-Pflanzen auf Platten angezogen, die ein Medium mit den betreffenden Aminosäuren und einer niedrigen Nitratkonzentration (0,2 mM Nitrat) enthielten, um herauszufinden, ob sie ein Wachstum wie bei hohen Nitratkonzentrationen (10 mM Nitrat) bewirken können, ohne dabei deutliche Nebeneffekte oder Veränderungen im Aussehen der Pflanzen zu bewirken. Diese Tests wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Gabi Meyer zu Hörste durchgeführt. Es wurden Daten zu Frischgewicht (Abb. 3/1 a-c), Sproß/Wurzel-Verhältnis (Abb. 3/1d), Blattanzahl (Abb. 3/1e), Protein (Abb. 3/1f), den Aminosäuren (Abb. 3/1 g) sowie die Konzentrationen von Nitrat (Abb. 3/1h) und Kohlenhydraten (Abb. 3/2a-d) ermittelt.

Diese Vortests wurden auf Agarplatten durchgeführt, bei einem Lichtregime von 12 h und einer Lichtintensität von 80 µE/m<sup>2</sup>. Die

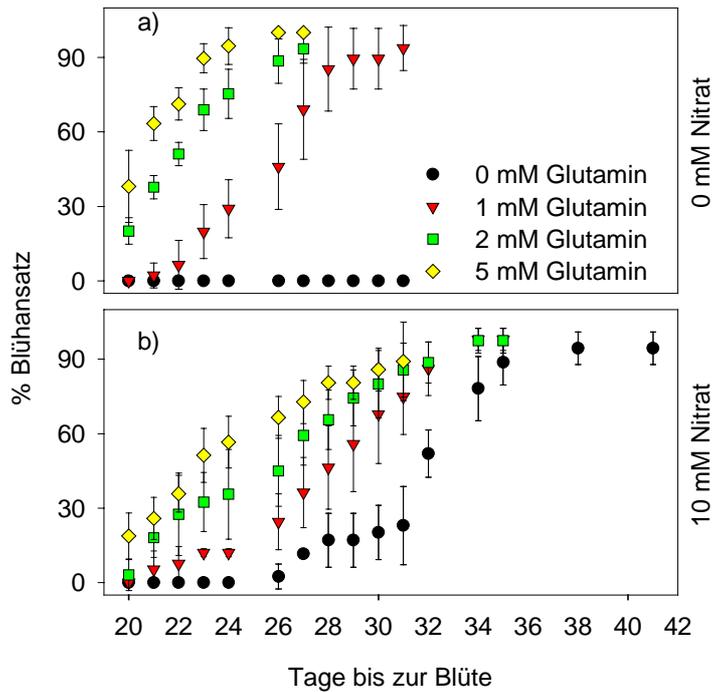
Aminosäuren wurden in Gegenwart von 0,2 mM Nitrat angeboten. Vergleicht man die Werte der 10 mM-Bedingung ohne Gln von 10 mM Nitrat mit denen von 5 mM Gln, so zeigen sich hierbei die meisten Übereinstimmungen. Es hat sich gezeigt, daß Gln dabei in den Stoffwechsel einfließt und dabei sowohl die Biomassen, hierbei hauptsächlich die des Sproßes, das Sproß/Wurzel-Verhältnis und die Konzentration der Gesamtaminosäuren beeinflusst.



**Abbildung 3/2:** Die Graphen zeigen die Konzentrationen der Kohlenhydrate bei *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die 21 Tage alt waren. Angezogen wurden die Pflanzen auf 10 mM Nitrat bzw. auf 0,2 mM Nitrat + 5 mM Gln oder 10 mM Asparagin oder 5 mM Aspartat oder 10 mM Alanin oder 10 mM Glutamat.

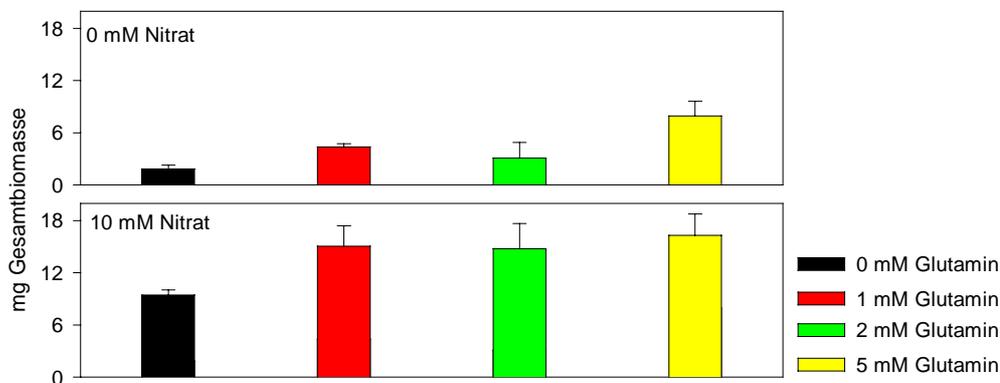
In einer Glutaminkonzentrationsreihe, durchgeführt in Gegenwart von 0 mM Nitrat (die Mediumkontamination betrug ca. 50 µM) (Abb. 3/3a) und 10 mM Gln Nitrat (Abb. 3/3b), zeigte sich in beiden Fällen mit steigender Glutaminkonzentration eine Verschiebung der Blühinduktion nach vorne hin im Vergleich zur 10 mM-Bedingung ohne Gln. Ohne jegliche N-Quelle kam es dabei zu dem erwarteten Absterben der Pflanzen. Da bereits bei 5 mM Gln in beiden Nitratkonzentrationen ein deutlicher Effekt zu sehen war, sich bei dieser

Konzentration in anderen Vortests aber auch einiges in Biomasse (Abb. 3/1a-c), Sproß/Wurzel-Verhältnis (Abb. 3/1d) und Konzentration der Gesamtaminosäuren (Abb. 3/1g) änderte, wurde die Arbeitskonzentration in den weiteren Tests auf 4 mM Gln gesenkt, um zum einen den positiven Effekt von Glutamin auf das Blühen beizubehalten und zum anderen die Beeinflussung der oben genannten Parameter etwas zu senken



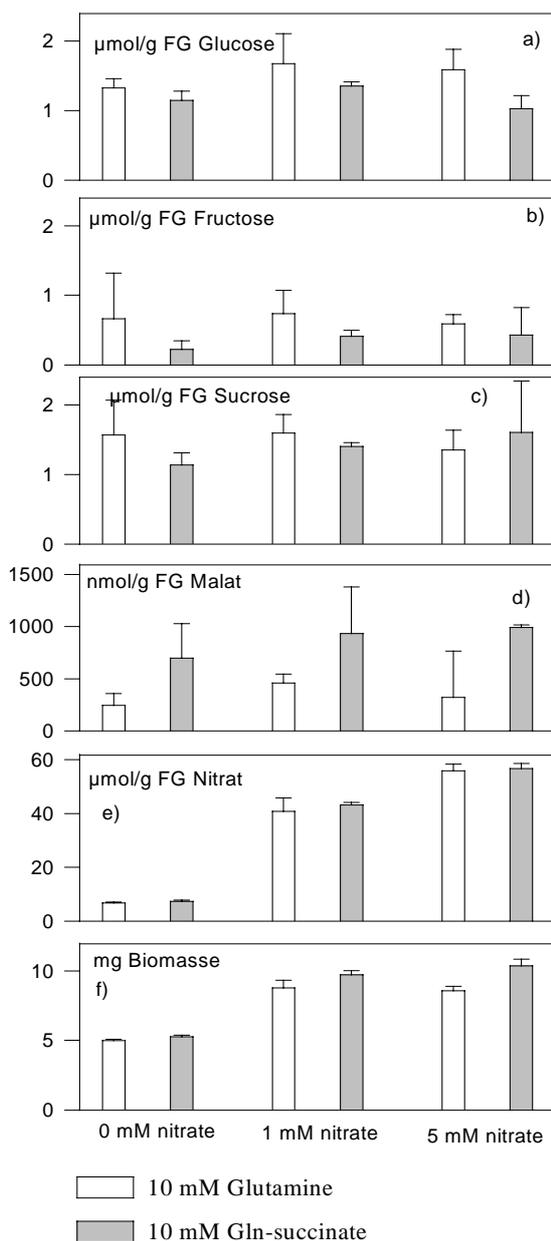
**Abbildung 3/3:** Die Graphen zeigen die Blühverlaufs-kurven für 0 / 1 / 2 / und 5mM Gln , jeweils in Gegenwart von 0 und 10 mM Nitrat bei Arabidopsis thaliana-Pflanzen. Die Belichtungsdauer betrug 12 h, die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  ( $n = 4-5$ ).

Bei niedrigen Gln-Konzentrationen – 0 und 1 mM Gln – begannen die Pflanzen in Gegenwart von 10 mM Nitrat entweder schneller oder zum gleichen Zeitpunkt zu blühen (Abb. 3/3b) wie bei 0 mM Nitrat (Abb. 3/3a), hier förderte Nitrat die Blühinduktion.



**Abbildung 3/4:** Die Graphen zeigen die Gesamtbiomassen für für 0 / 1 / 2 und 5 mM Gln von 14 Tagen alten Arabidopsis thaliana-Pflanzen, die aus den Blühverlaufs-kurven (Abb 3/3) stammen. Neben den verschiedenen Gln-Konzentrationen enthielt das Medium entweder 0 mM oder 10 mM Nitrat. Die Belichtungsdauer betrug 12 h, die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  ( $n = 5-6$  und die Temperatur  $20^\circ\text{C}$ ).

Bei den beiden anderen Gln-Konzentrationen – 2 und 5 mM Gln – hingegen hemmt die hohe Nitratkonzentration (Abb. 3/3b) die Blühinduktion im Vergleich zu Gln als alleinige N-Quelle (Abb. 3/3a). Wie sich aus den Daten ergab, hatte Glutamin in Gegenwart von 0 mM Nitrat eine leicht fördernde Wirkung auf die Entwicklung der Biomasse, der sich vor allem ab 5 mM Gln deutlich ausprägte (Abb. 3/4a) (dabei muß berücksichtigt werden, daß die Pflanzen ungefähr eine Woche vor dem Beginn der Blühverlaufskurven geerntet wurden). In Gegenwart von 10 mM Nitrat zeigte sich zwischen 0 mM Gln und allen anderen Konzentrationen ein leichter Unterschied. Dabei differierten die verschiedenen Glutaminkonzentrationen nicht sehr stark voneinander (Abb. 3/4b). Bei niedrigen Nitratkonzentration zeigten die Pflanzen ein Verarmungswachstum, dieser N-Mangel konnte durch Glutaminbeigabe kompensiert werden.



**Abbildung 3/5:** Die Graphen zeigen die Konzentrationen der Kohlenhydrate, von Nitrat und Malat und die Gesamtbiomasse von 13 Tagen alten Pflanzen, die in Gegenwart von 10 mM Gln bzw. 10 mM Gln-Succinat angezogen wurden. Als Nitratkonzentrationen wurden 0 mM, 1 mM und 5 mM Nitrat verwendet. Belichtungsdauer war 12 h, Belichtungsintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Temperatur 20°C.

Um auszuschließen, daß die Wirkung von Glutamin auf einen pH-Effekt beruht und damit zu Problemen im Wachstum der Pflanzen führt, wurden Testreihen durchgeführt, bei denen neben Glutamin auch Glutamin-Succinat angeboten wurde, beides jeweils in der Gegenwart unterschiedlicher Nitratkonzentrationen.

Es zeigte sich, daß weder die Kohlenhydrate (Abb. 3/5a-c), noch Nitrat (Abb. 3/5e), Biomasse (Abb. 3/5f) bzw. noch einzelne Aminosäuren (Daten nicht gezeigt) unterschiedlich in Bezug auf Gln oder Gln-Succinat reagierten, lediglich Malat zeigte in Gegenwart von Gln-Succinat eine tendenzielle Zunahme (Abb. 3/5d).

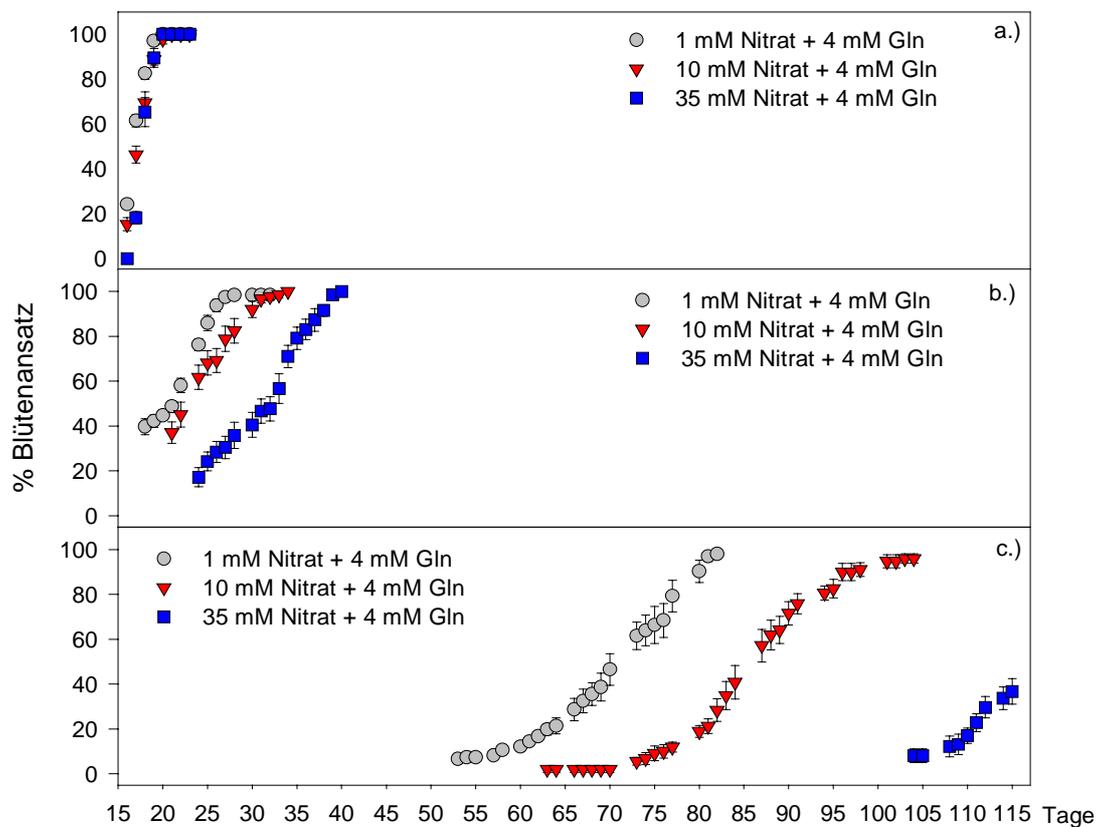
**Fazit:**

Gln wirkt sich nicht negativ auf den internen pH-Wert der Gewebe aus, dies bedeutet, die blühfördernde Wirkung nicht auf einer Streßantwort seitens der Pflanze beruht.

### 3.2 Auswirkung von unterschiedlichen Nitratkonzentrationen auf das Blühverhalten von *Arabidopsis thaliana* cv Columbia bei verschiedenen Lichtregimen

#### 3.2.1 Erhöhtes Nitratangebot führt bei Kurztagbedingungen zu einer Verzögerung der Blühinduktion

Verwendet wurden als Nitratkonzentrationen 1 mM, 10 mM und 35 mM Nitrat mit jeweils 4 mM Glutaminbeigabe als erste N-Versorgung für die keimenden Samen. Die Lichtdauer reichte von 8 h Licht / 16 h Dunkel als Kurztag über 12 h Licht / 12 h Dunkel als intermediäre Tageslänge bis zu 16 h Licht / 8 h Dunkel als Langtag. Es ist bekannt, daß *Arabidopsis thaliana* eine Langtagpflanze ist, deren Blühinduktion bei Kurztag stark verzögert ist.



**Abbildung 3/6:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv Columbia unter verschiedenen Nitratangeboten und unterschiedenen Zeitregimen (a: 16 h Licht / 8 h Dunkel, b: 12 h Licht / 12 h Dunkel, c: 8 h Licht / 16 h Dunkel, 20°C, ) Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 6-8), Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

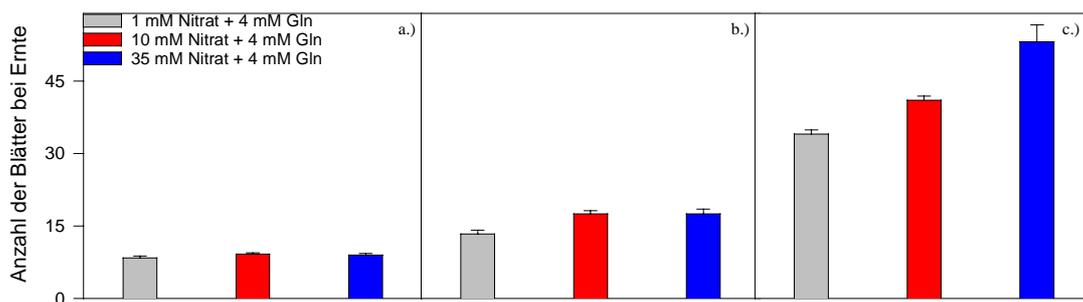
Bei 16 h Licht, also Langtagbedingung trat keine deutliche Trennung der Blühverlaufskurven für die unterschiedlichen Nitratbedingungen auf, hier war der Lichteffekt stärker als der Nitratinfluß auf das Blühen (Abb. 3/6a).

Bei 12 h Licht als Langtagbedingung trat eine erste Auftrennung der Blühverlaufskurven auf, aber weitaus geringer ausgeprägt als unter den nachfolgenden Kurztagbedingungen, die Blühverlaufskurven mit 1 mM Nitrat und 10 mM Nitrat lagen sehr eng beieinander. Die Kurve für 35 mM Nitrat war hingegen schon deutlich abgesetzt (Abb. 3/6b).

Der Abbruch der Kurve mit 35 mM Nitrat bei 8 h Licht ergab sich aus einem Austrocknen der Platten, d.h., hier trat ein weiterer, in diesem Fall ungewollter, Effekt auf. Es ist aber zu erkennen, das gerade bei Kurztag eine deutliche Verzögerung der Blühinduktion mit zunehmender Nitratkonzentration auftrat (Abb. 3/6c).

### 3.2.2 Erhöhte Nitratkonzentrationen führen bei höherer Blattzahl und Biomasse zur Blühinduktion

Bei Langtagbedingungen zeigten sich zwischen den drei Nitratkonzentrationen kaum Unterschiede in der Anzahl der Blätter (Abb. 3/7a). Bei der intermediären Tageslänge (Abb. 3/7b) traten leichte Unterschiede zwischen 1 mM Nitrat und 10 mM Nitrat, jedoch nicht zwischen 10 mM Nitrat und 35 mM Nitrat auf.

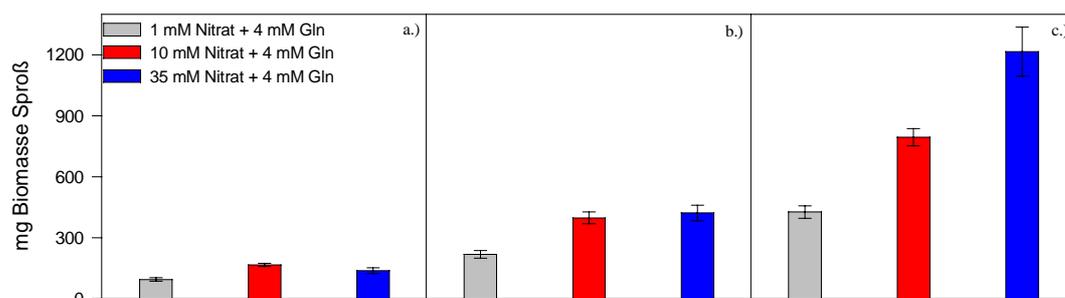


**Abbildung 3/7:** der Graph zeigt die Anzahl der Blätter der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 10 – 15). Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

Bei der Kurztagbedingung zeigte sich mit zunehmender externer Nitratkonzentration eine Steigerung der Blattzahl (Abb. 3/7c). Aus diesen Daten ergibt sich, daß bei der Blühinduktion mit zunehmender Nitratkonzentration eine echte Verschiebung eingetreten ist, da zum

jeweiligen Erntezeitpunkt sowohl die Anzahl der Blätter als auch die Biomassen (siehe nachfolgende Graphen) angestiegen sind aufgrund einer verlängerten vegetativen Phase und einem höheren Alter der Pflanze.

Dieser Kurvenverlauf zeigte sich auch bei der Sproßmasse. Die Biomasse stieg an, da die Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte mit kürzerer Photoperiode älter waren. Beim Sproßgewicht zeigte sich bereits bei der Langtagbedingung eine Zunahme der Biomasse zwischen 1 mM Nitrat und den beiden höheren Nitratkonzentrationen (Abb. 3/8a). Bei dem intermediären Tagesgang mit 12 h Licht trat diese Verteilung ebenfalls auf, wobei die Werte der Biomassen höher lagen (Abb. 3/8b). Hier ergab sich eine Zunahme der Biomasse mit steigender Nitratvorgang. Zwischen den beiden höheren Nitratkonzentrationen war die Steigerung jedoch nur schwach ausgeprägt.

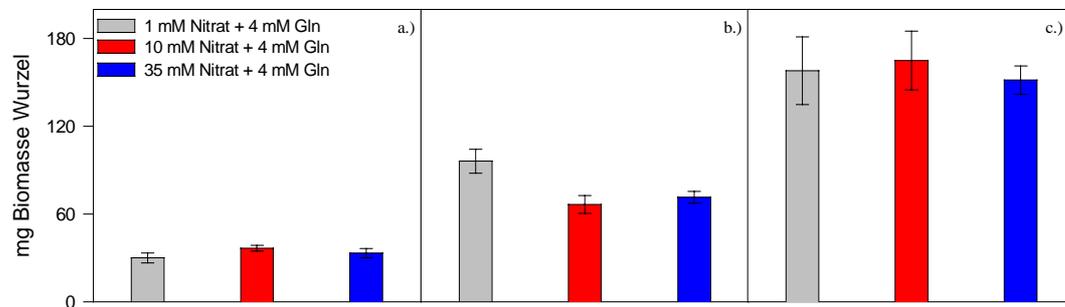


**Abbildung 3/8:** der Graph zeigt die Biomasse des Sproßes in mg der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Belichtungsintensität war 100µ E/m<sup>2</sup>. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 10 – 15).

Bei 8 h Licht waren dann die Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen am deutlichsten, hier fand mit zunehmender Steigerung der Nitratkonzentration eine durchgehende Zunahme der Sproßbiomasse statt (Abb. 3/8c). Es ist dabei zu beachten, daß die Pflanzen bei 12 h und 8 h Photoperiode zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet wurden und damit kein direkter Vergleich der absoluten Werte möglich ist.

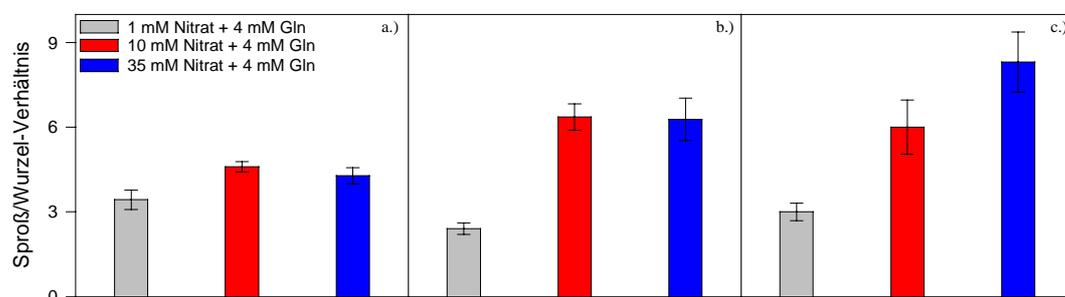
Eine Zunahme an Biomasse mit abnehmender Tageslänge zeigte sich auch bei der Wurzelbiomasse, jedoch traten hier kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Nitratkonzentrationen auf. Die Wurzelbiomassen stiegen von Langtagbedingungen (Abb. 3/9a) über intermediäre Tageslänge (Abb. 3/9b) zu kurzer Photoperiode (Abb. 3/9c) deutlich an.

Gemessen wurden die Wurzelbiomassen, um daraus das Sproß/Wurzel-Verhältnis ermitteln zu können.



**Abbildung 3/9:** der Graph zeigt die Biomasse der Wurzel in mg der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ . Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 10 - 15$ ).

Die notwendigen Nitratkonzentrationen, die zu einer Hemmung der Blühinduktion führen, sind ähnlich denen, die Änderungen im Sproß/Wurzel-Verhältnis bewirken. Aus den gegebenen Sproß- und Wurzelbiomassen lassen sich damit auch die Sproß/Wurzel-Verhältnisse ermitteln. Bei 16 h Lichteinwirkung zeigte sich tendenziell ein leichter Anstieg des Sproß/Wurzel-Verhältnisses von 1 mM Nitrat nach 10 mM Nitrat, von 10 mM Nitrat nach 35 mM Nitrat zeigte sich keine Veränderung (Abb. 3/10a).



**Abbildung 3/10:** der Graph zeigt das Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ . Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 10 - 15$ ).

Dieses Bild ergab sich ebenfalls für die mittlere Photoperiode mit 12 h Licht. Dabei ergab sich hier für die beiden höheren Nitratkonzentration, 10 mM Nitrat und 35 mM Nitrat, jedoch eine Zunahme des Sproß/Wurzel-Verhältnisses (Abb. 3/10b), da die jeweiligen Biomassen von Sproß und Wurzel aufgrund zunehmenden Alters der Pflanzen anstiegen. Bei Kurztagbedingungen ergab sich eine deutliche Steigerung des Sproß/Wurzel-Verhältnisses mit zunehmender externer Nitratversorgung (Abb. 3/10c). Damit zeigte sich insgesamt, daß eine Zunahme mit steigender Nitratkonzentration bei Kurztagbedingungen am deutlichsten hervortritt.

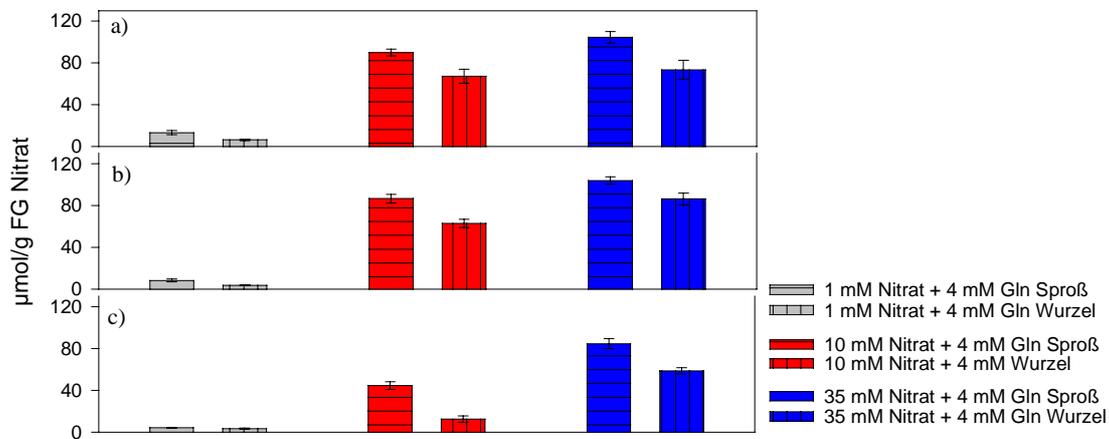
**Fazit:**

Die bisher gefundenen Daten zu Blattzahl, den Biomassen und dem Sproß/Wurzel-Verhältnis zeigen, daß sich mit steigender Nitratversorgung die jeweiligen Daten ansteigen. Dabei wird diese Tendenz mit Verkürzung der Photoperiode stärker. Der Anstieg bei Blattzahl und die Biomassen zeigen, daß es hier zu einer Verlängerung der vegetativen Phase kommt. Die Verschiebung der Blühinduktion mit steigendem Nitratspiegel verstärkt sich ebenfalls mit kürzerer Photoperiode und läuft parallel mit einer Verschiebung des Sproß/Wurzel-Quotienten als klassische Antwort auf steigende Nitratversorgung.

**3.2.3 Der interne Nitratgehalt spiegelt den externen Nitratgehalt im Medium wieder**

Bei Langtagbedingungen (Abb. 3/11a) spiegelte der interne Nitratspiegel die externe Nitratversorgung wieder, je höher die externe Konzentration, desto höher war auch der interne Nitratgehalt. Die Abwesenheit einer Hemmung der Blühinduktion bei Langtagbedingungen beruht nicht auf einen nicht ansteigenden internen Nitratspiegel bei zunehmender externer Nitratversorgung hier traten deutliche Unterschiede auf. Dabei war der Unterschied zwischen 1 mM Nitrat und 10 mM Nitrat größer als der Unterschied zwischen 10 mM Nitrat und 35 mM Nitrat, die Pflanzen waren bei allen drei Nitratbedingungen gleich alt zum Zeitpunkt der Ernte. Bei der intermediären Tageslänge mit 12 h Licht zeigte sich dasselbe Bild, je höher der externe Nitratgehalt, desto höher stiegen die internen Konzentrationen (Abb. 3/11b). Auch hier traten zwischen 1 mM Nitrat und 10 mM Nitrat deutlichere Unterschiede auf als zwischen 10 mM Nitrat und 35 mM Nitrat. Dabei ist zu beachten, daß der zeitliche

Unterschied bei 12 h Photoperiode zwischen den Ernten zwischen 1 und 10 mM Nitrat auch größer ist als zwischen 10 mM und 35 mM Nitrat (siehe Legende).



**Abbildung 3/11:** der Graph zeigt die Nitratkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ). Belichtungsintensität war  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$ .

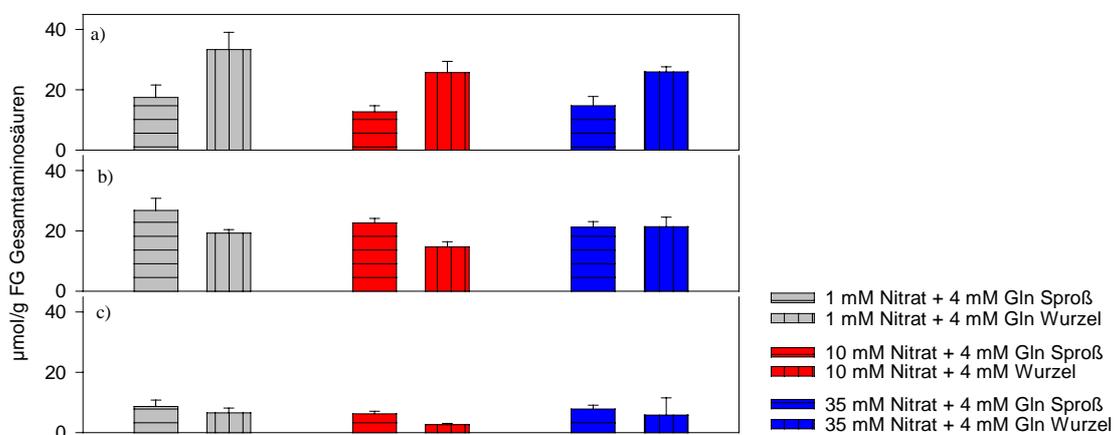
Bei der Kurztagbedingung (Abb. 3/11c) nahm der interne Nitratgehalt ebenfalls entsprechend der externen Nitratversorgung zu, hierbei traten im Gegensatz zu den beiden anderen Photoperioden jedoch deutlichere Unterschiede zwischen allen drei internen Nitratkonzentrationen auf. Bei allen drei Nitratkonzentrationen zeigte sich im Sproß jeweils ein höherer Gehalt als in der Wurzel, dies gilt für alle Photoperioden. Ausnahme ist die niedrige Versorgung mit 1 mM Nitrat bei Kurztagbedingungen, hier traten zwischen Sproß und Wurzel kaum Unterschiede auf. Bei 8 h Licht (Kurztag) ist bei 35 mM Nitrat zu bedenken, daß die geernteten Pflanzen zwar im blühenden Stadium waren, die Ernte jedoch zu einem sehr frühen Stadium innerhalb des Blühverlaufs stattfinden mußte, da die Agarplatten begannen, auszutrocknen.

### Fazit:

Der interne Nitratgehalt verändert sich parallel von der externen Nitratversorgung, steigende externe Nitratversorgung führt zu zunehmenden internen Nitratspiegeln. Dabei ist dies unabhängig von der Photoperiode, ebenso wird die Verteilung auf die Gewebe nicht beeinflusst. Die Tageslänge beeinflusst jedoch die hemmende Wirkung von hohen Nitratspiegeln auf die Blühinduktion. So zeigt sich bei Langtagbedingungen kaum ein Zusammenhang zwischen dem internen Nitratspiegeln und den Blühverlaufskurven, während

bei der intermediären Tageslänge bereits eine deutliche Ausprägung der Nitrathemmung bei 10 mM und 35 mM Nitrat auf die Blühinduktion zu sehen ist. Bei Kurztagbedingungen ist der hemmende Effekt von Nitrat am deutlichsten zu sehen. Da Nitrat diese deutliche Signalwirkung zeigt, ergibt sich daraus, daß Gln eine gute Ersatz-N-Quelle darstellt.

### 3.2.4 Die Gesamtaminosäuren reagieren stärker auf die Tageslänge als auf das externe Nitratangebot



**Abbildung 3/12:** der Graph zeigt die Konzentration der Gesamtaminosäuren der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.

Bei den Gesamtaminoäuren ergab sich ein anderes Bild als bei Nitrat. Die Konzentrationen der Gesamtaminosäuren reagierten bei Langtagbedingungen nicht auf die extern angebotenen Nitratkonzentrationen (Abb. 3/12a). Bei niedriger Nitratversorgung (1 mM Nitrat) waren die Konzentrationen der Gesamtaminosäuren sogar etwas höher als bei 10 mM und 35 mM Nitrat als externes Nitratangebot. Bei dieser Tageslänge war der Konzentration an Gesamtaminosäuren in der Wurzel höher als im Sproß. Bei intermediärer Tageslänge zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen externer Nitratversorgung und interner Konzentration an Gesamtaminosäuren (Abb. 3/12b), hier trat jedoch kaum ein Unterschied der Gesamtaminosäuren bei niedriger Nitratversorgung und den beiden anderen Bedingungen auf. Die Konzentration an Gesamtaminosäuren war im Sproß höher als in der Wurzel.

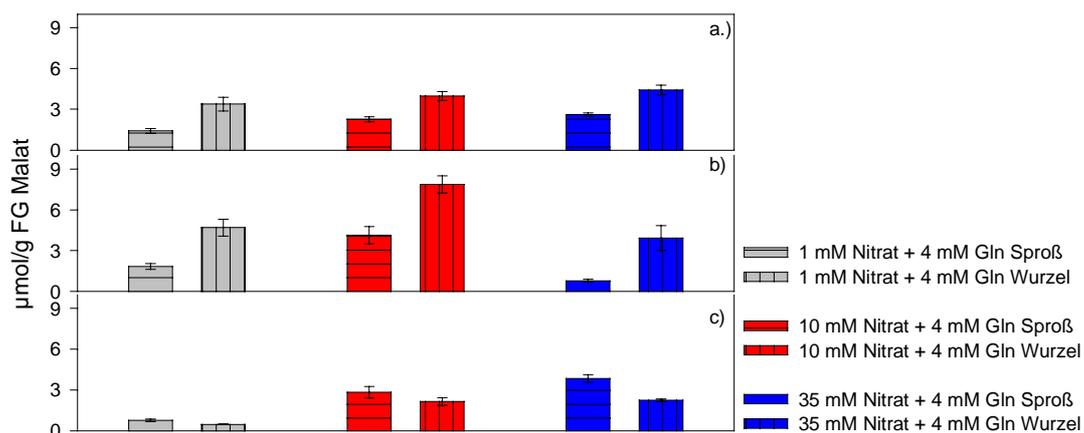
Ausnahme war die 35 mM Nitrat-Bedingung, hier wiesen beide Gewebe die gleiche Konzentration an Gesamtaminosäuren auf. Auch bei Kurztag zeigten die Gesamtaminosäuren keine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot. Der Sproß wies eine höhere Konzentration an Gesamtaminosäuren auf als die Wurzel. Es zeigte sich insgesamt keine Abhängigkeit vom Nitratangebot, jedoch nahmen die Spiegel der Gesamtaminosäuren mit kürzerer Photoperiode und damit höherem Pflanzenalter insgesamt ab (Abb. 3/12c).

### Fazit:

Die Gesamtaminosäuren zeigen kaum eine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot, erhöhte externe Nitratversorgung bewirkt keinen Anstieg der Gesamtaminosäuren, eher eine leichte Abnahme. Jedoch reagieren die Gesamtaminosäuren stark die Dauer der Photoperiode. Je kürzer die Tageslänge, desto stärker sinkt der Anteil an Gesamtaminosäuren in der Pflanze. Außerdem kommt es zu einer Verschiebung der Verhältnisse in den beiden Geweben Sproß und Wurzel, bei Langtagbedingungen ist der Hauptanteil in den Wurzeln, bei intermediärem und kurzem Tagesgang im Sproß zu finden.

### 3.2.5 Malat reagiert uneinheitlich

Malat wird als Gegenion zu Nitrat in seiner Synthese wird durch Nitrat stimuliert (Scheible et al. 1997a).



**Abbildung 3/13:** der Graph zeigt die Malatkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.

Unter Langtagbedingungen (Abb. 3/13a) ergab sich keine Abhängigkeit des Malatspiegels vom externen Nitratangebot. Der Malatgehalt lag dabei in der Wurzel höher als im Sproß. Bei der mittleren Tageslänge mit 12 h Licht zeigte sich zunächst ein tendenzieller Anstieg der Malatkonzentrationen von 1 mM Nitrat nach 10 mM Nitrat (Abb. 3/13b). In Gegenwart von 35 mM Nitrat setzte sich diese Tendenz jedoch nicht fort, es kam hingegen zu einem Absinken der Malatspiegel in beiden Geweben. Auch hier wies die Wurzel eine höhere Malatkonzentration als der Sproß vor. Bei Kurztagbedingungen nahm der Malatspiegel parallel zum steigenden externen Nitratangebot zu, außerdem fand eine Verschiebung der Konzentration an Malat in den Sproß statt (Abb. 3/13c).

### **Fazit:**

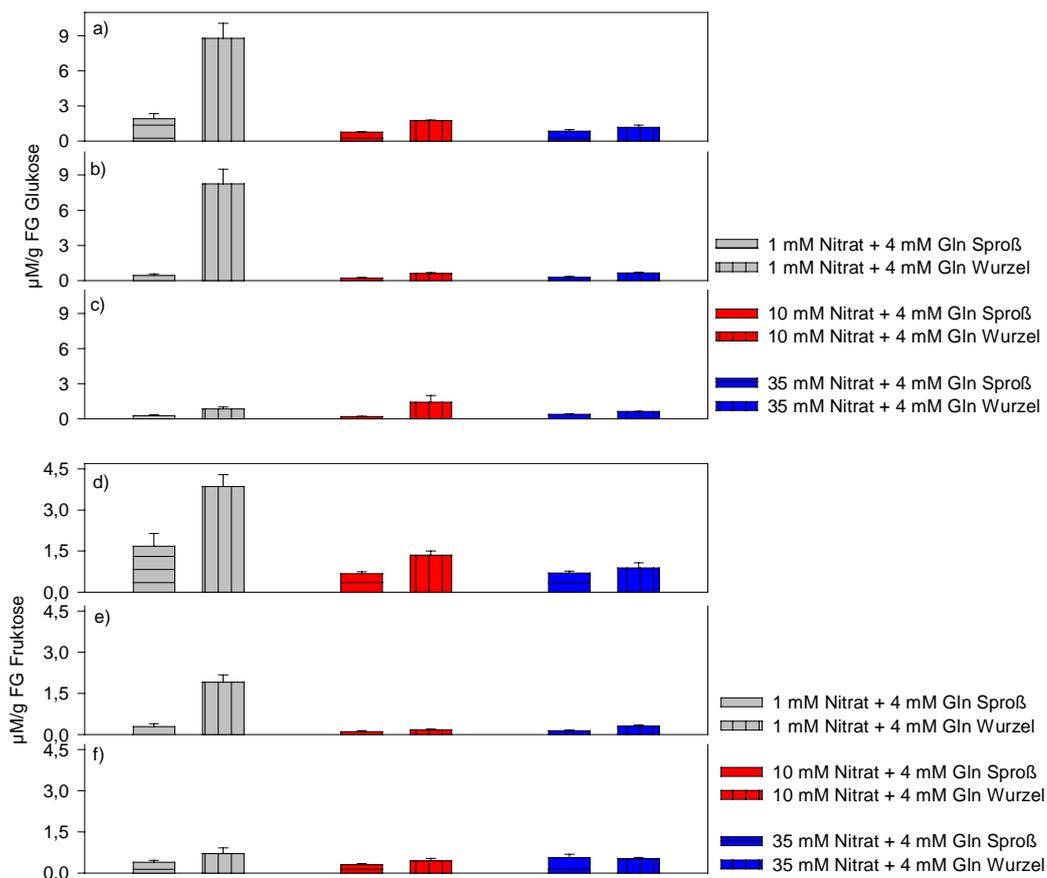
Bei Langtagbedingungen und intermediärem Tagesgang ergibt sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem externen Nitratangebot und den internen Malatspiegeln. Bei diesen Tageslängen fand sich der Hauptanteil in der Wurzel. Bei Kurztag zeigt sich ein paralleler Verlauf zwischen Nitratkonzentration und Malatkonzentration, zudem kommt es hier zu einer Umverteilung, der Hauptanteil ist bei dieser Photoperiode im Sproß zu finden. Malat zeigt in seinen Konzentrationen keine Abhängigkeit von der Photoperiode. Allerdings hat Malat nicht nur Pufferfunktion bei der Nitrataufnahme, sondern wird auch im Glyoxylat-Zyklus synthetisiert. Damit wird es nicht nur von Nitrat direkt gesteuert, sondern auch durch andere Prozesse in der Pflanzenzelle, die eine direkte Nitratabhängigkeit verschleiern.

### **3.2.6 Die Kohlenhydrate zeigen mit abnehmender Tageslänge eine verstärkte Abhängigkeit vom Nitratspiegel**

Bei der nachfolgenden Besprechung der Kohlenhydrate ist zu beachten, daß die Ernte 30 – 90 min nach Lichtbeginn stattfand. Zu diesem Zeitpunkt wird die Kohlenhydratsynthese erst in Gang gesetzt, sodaß die Zucker bzw. Stärkespiegel noch sehr niedrig liegen. Im nachfolgenden wurden aber auch Bedingungen mit sehr niedrigen externen Nitratkonzentrationen mit einbezogen. Nitrat steigt von Beginn der Lichtperiode an in seiner internen Konzentration zunächst an, fällt dann aber bereits nach 3-4 h bei einer Photoperiode von 12 h Tageslänge in *Nicotiana plumbaginifolia* bei einer Nitratzufuhr von 12 mM Nitrat wieder ab (Scheible 1996). Da bei *Arabidopsis thaliana* die Nitrat- und Kohlenhydratspiegel

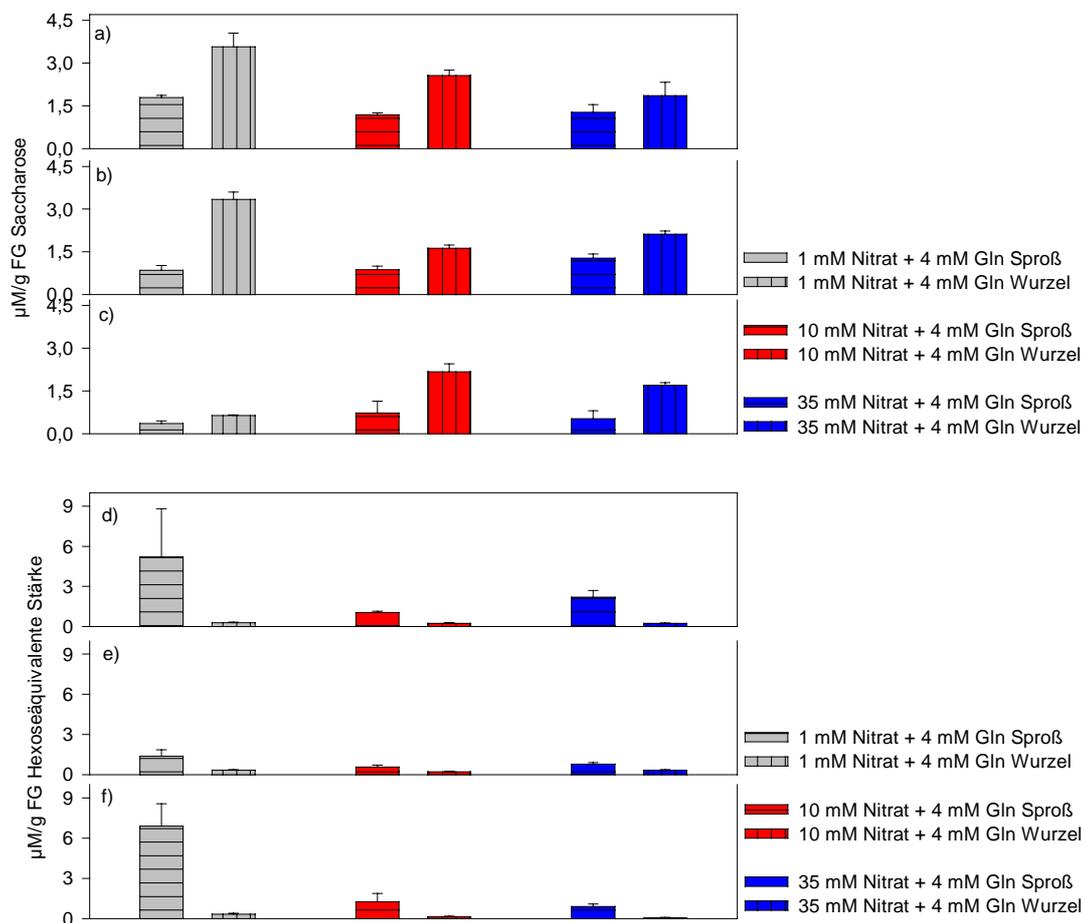
wesentlich niedriger liegen als bei *Nicotiana plumbaginifolia*, wurde dieser frühe Erntezeitpunkt gewählt, um Nitrat messen zu können.

Betrachtet man die Konzentrationen der reduzierenden Zucker Glukose und Fruktose, so zeigte sich bei Langtag in beiden Fällen ein hoher Kohlenhydratspiegel bei dem niedrigen Nitratangebot von 1 mM (Abb. 3/14a+d). Mit zunehmender Nitratkonzentration nahmen Glukose und Fruktose deutlich ab. In beiden Fällen fand sich die höhere Konzentration des reduzierenden Zuckers in der Wurzel. Beim intermediären Teagesgang lagen die Kohlenhydratwerte bei einer externen Nitratversorgung mit 1 mM Nitrat ebenfalls sehr hoch, die Konzentrationen der beiden Zucker waren bei 10 mM Nitrat und 35 mM Nitrat gerade noch meßbar (Abb. 3/14b+e), da hier die Pflanzen älter waren und damit mehr Kohlenhydrate verbraucht wurden. Die Verteilung der Zucker lag zugunsten der Wurzel. Bei Kurztagbedingungen zeigte sich kaum ein Unterschied im Zuckergehalt zwischen den verschiedenen Nitratkonzentrationen (Abb. 3/14c+f).



**Abbildung 3/14:** der Graph zeigt die Konzentration an Glukose und Fruktose der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a+d.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b+e) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c+f) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a+d) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b+e) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c+f) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.

Bei Saccharose zeigte sich ein Abnehmen der Konzentrationen mit steigender Nitratkonzentration unter Langtagbedingungen (Abb. 3/15a). Dies trat hauptsächlich in der Wurzel auf, da der Sproßanteil geringer war, lagen im Sproßgewebe die Werte eher im gleichen Bereich. Bei 12 h Tageslänge zeigte die Saccharosekonzentration von 1 mM externer Nitratversorgung nach 10 mM Nitrat eine Abnahme, und stieg dann nach 35 mM externen Nitratangebot wieder leicht an (Abb. 3/15b), obwohl die Pflanzen mit zunehmender externer Nitratversorgung zu jeweils späteren Zeitpunkten geerntet wurden (siehe Legende). Dies zeigte sich nur in der Wurzel, der Sproß wies kaum Unterschiede auf. Bei 8 h Tageslänge nahm die Kohlenhydratkonzentration mit zunehmender Nitratkonzentration leicht zu, auch wirkte sich dies fast ausschließlich auf die Wurzel aus (Abb. 3/15c).



**Abbildung 3/15:** der Graph zeigt die Konzentration an Saccharose und Stärke der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a+d) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b+e) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c+f) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a+d) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b+e) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c+f) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

Stärke wies bei Langtagbedingungen hohe Konzentrationen bei 1 mM Nitrat auf, diese sanken mit zunehmender Nitratversorgung ab (Abb. 3/15d). Bei der intermediären Tageslänge (12 h Licht) lagen alle Stärkewerte recht niedrig, aber mit steigender Nitratversorgung ergab sich auch hier eine tendenzielle Abnahme der Stärkekonzentrationen (Abb. 3/15e). Bei der kurzen Photoperiode ergab sich wiederum eine hohe Stärkekonzentration bei geringer Nitratversorgung, diese nahm mit steigender externer Nitratkonzentration ab (Abb. 3/15f), da unter anderem die Pflanzen bei der Ernte verschieden alt waren und damit mehr Stärke verbrauchten. Die Verteilung der Stärke auf die beiden Gewebe wurde weder durch Nitrat noch durch die Photoperiode beeinflusst.

### **Fazit:**

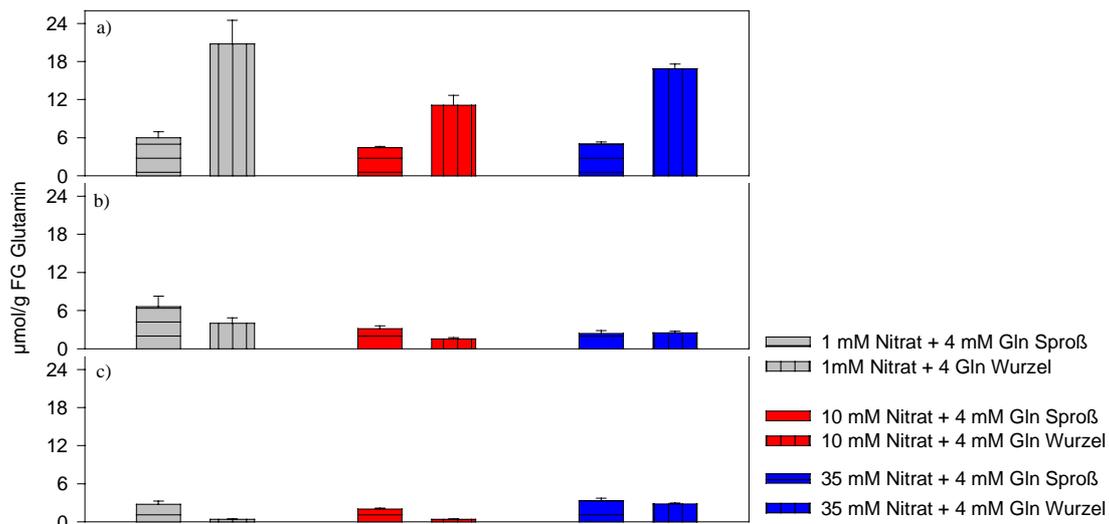
Mit steigender Nitratkonzentration kam es zu einer Abnahme der Kohlenhydratkonzentration bei Langtagbedingungen. Dies zeigte sich besonders deutlich bei den reduzierenden Zuckern und auch bei Stärke, Saccharose wurde am geringsten beeinflusst. Bei Kurztagbedingungen ergab sich bei den reduzierenden Zuckern hingegen keine Korrelation zwischen Zuckergehalt und Nitratspiegel. Saccharose zeigte bei kurzer Photoperiode einen leichten Konzentrationsanstieg mit zunehmender externer Nitratversorgung, Stärke wiederum sank bei 8 h Tageslänge mit ansteigender Nitratversorgung und damit zunehmenden Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte ab. Es ist nachgewiesen, daß eine Pflanze entweder Nitrat oder Stärke akkumuliert (Scheible et al. 1997a), das zeigte sich auch hier bei einem externen Nitratangebot von 1 mM Nitrat, dieser Effekt war bei der kurzen Photoperiode von 8 h Licht besonders ausgeprägt. Da sich bei den niedrigen Nitratkonzentrationen (1 mM extern angebotenes Nitrat) die Kohlenhydrate anhäufen, kann ausgeschlossen werden, daß hier die Blühinduktion als Folge eines Kohlenhydratmangels induziert wird.

### **3.2.7 Einzelaminosäuren reagieren unterschiedlich auf Nitrat und Tageslängen**

Bei Darstellung der Gesamtaminosäuren hat sich gezeigt, daß die Gln-Fütterung erfolgreich war und die Gesamtaminosäuren unabhängig von der externen Nitratversorgung hoch waren. Unabhängig davon können einzelne Aminosäuren sehr wohl stark von der externen Nitratversorgung abhängig sein. Deswegen wurden neben den Gesamtaminosäuren auch die einzelnen Aminosäuren mittels HPLC gemessen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Aminosäurekonzentration und externer Nitratzufuhr zu ermitteln.

### 3.2.7.1 Glutamin

Glutamin zeigte bei Langtagbedingungen hohe, aber ungleichmäßig verteilte Konzentrationen vor allem in der Wurzel auf, während der Sproß unabhängig vom externen Nitratangebot immer gleich niedrig war (Abb. 3/16a). Dabei konnte meßtechnisch nicht berücksichtigt werden, in welchem Maße das aufgenommene Gln diesen Spiegel beeinflusst.



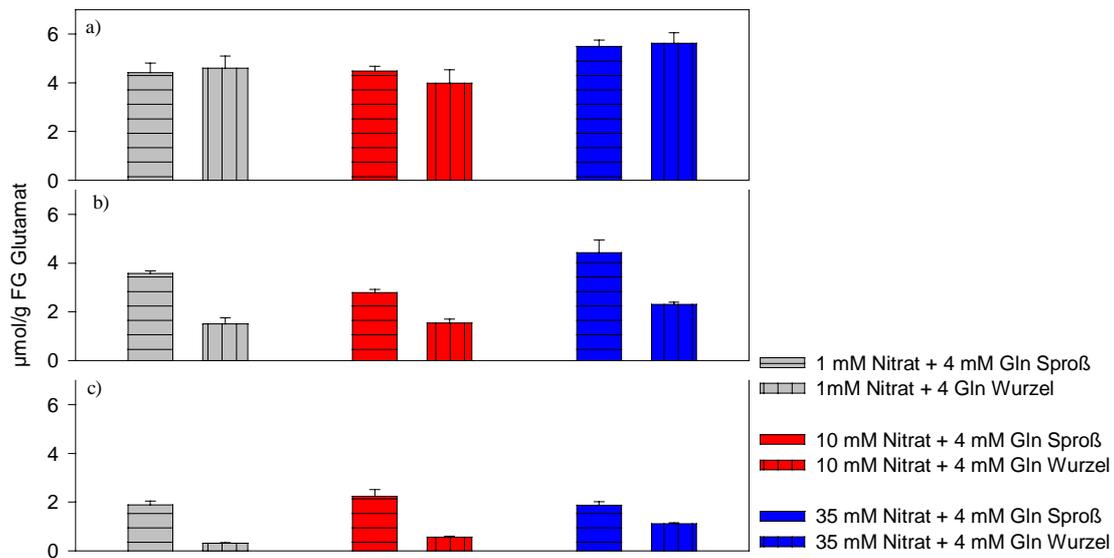
**Abbildung 3/16:** der Graph zeigt die Glutaminkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ). Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

Es zeigte sich, daß der Glutamingehalt kaum durch die externe Nitratversorgung beeinflusst wurde. Bei intermediärer Tageslänge mit 12 h Licht nahmen die Werte hingegen mit zunehmender Nitratversorgung leicht ab. Dabei war der Sproßgehalt zunächst etwas höher als der Wurzelgehalt, beim höchsten externen Nitratangebot war die Verteilung in den beiden Geweben jedoch gleich (Abb. 3/16b). Bei Kurztagbedingungen war die Glutaminkonzentration unabhängig vom externen Nitratangebot in beiden Geweben sehr niedrig (Abb. 3/16c).

### 3.2.7.2 Glutamat

Bei der Langtagbedingung zeigte sich kaum eine Abhängigkeit der Glutamatkonzentration vom externen Nitratangebot, die Aminosäure war dabei gleichmäßig auf Sproß und Wurzel verteilt (Abb. 3/17a). Bei der mittleren Photoperiode mit 12 h Licht trat eine Aufspaltung der

Glutamatverteilung bezüglich der Gewebe zugunsten des Sproßes auf, jedoch keine Abhängigkeit von der externen Nitratversorgung (Abb. 3/17b).

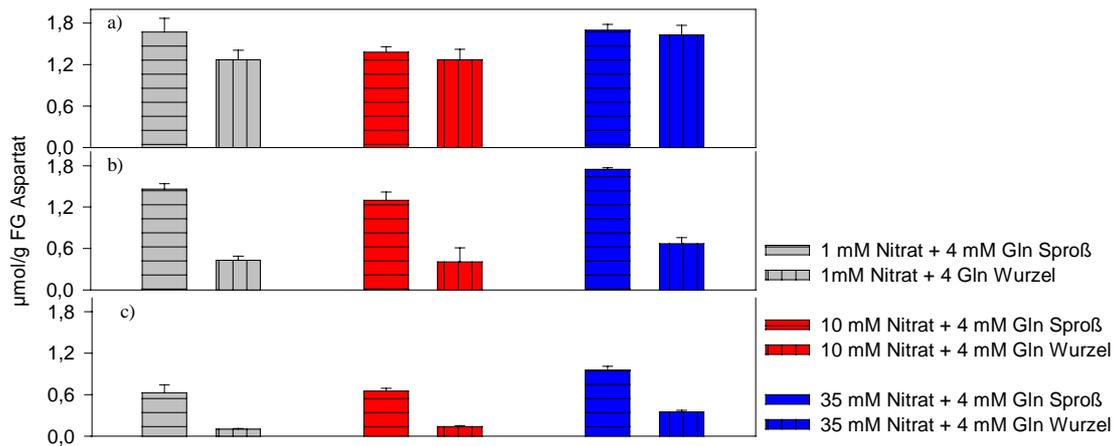


**Abbildung 3/17:** der Graph zeigt die Glutamatkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100µ E/m<sup>2</sup>.

Bei Kurztagbedingungen mit 8 h Licht waren die Sproßwerte bei allen Nitratangeboten gleich; bei den Wurzelwerten lag nur der Glutamatgehalt bei 35 mM Nitrat etwas höher als die der beiden anderen Nitratversorgungen (Abb. 3/17c).

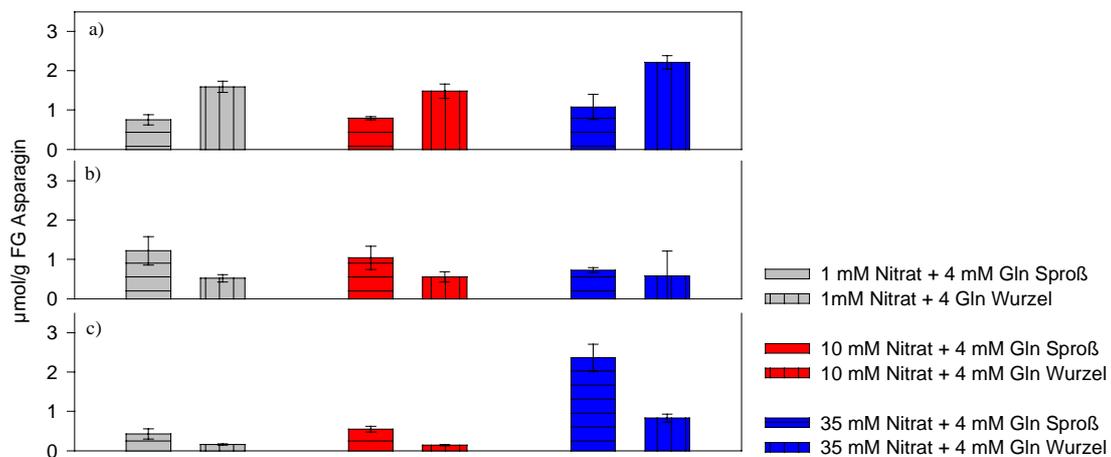
### 3.2.7.3 Aspartat

Aspartat verhielt sich wie Glutamat. Bei Langtagbedingungen zeigten beide Gewebe nahezu die gleichen Konzentrationen, es ergab sich keine Abhängigkeit vom externen Nitrat Spiegel (Abb. 3/18a). Bei einer Tageslänge von 12 h sanken die Wurzelkonzentrationen im Verhältnis zum Sproß deutlich ab, ohne daß sich eine Nitratsteuerung ergab (Abb. 3/18b). Bei kurzer Photoperiode hatte die externe Nitratkonzentration ebenfalls keinen Einfluß auf die Aspartatkonzentration, auch hier lag die höhere Konzentration der Aminosäure im Sproß (Abb. 3/18c).



**Abbildung 3/18:** der Graph zeigt die Aspartatkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.

### 3.2.7.4. Asparagin



**Abbildung 3/19:** der Graph zeigt die Asparaginkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a.) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b.) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c.) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a.) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b.) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c.) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.

Bei der Langtagbedingung zeigte sich im Asparaginspiegel keine Beeinflussung durch die externe Nitratangebote. Der Hauptanteil an Asparagin lag in der Wurzel, die enthielt fast doppelt so viel Asparagin wie das Sproßgewebe. Die Asparaginkonzentrationen in beiden Geweben waren bei 35 mM Nitrat leicht erhöht gegenüber den beiden anderen externen

Nitratangeboten (Abb. 3/19a). Bei mittlerer Tageslänge mit 12 h Licht ergab sich tendenziell eine leichte Konzentrationsabnahme mit zunehmender Nitratkonzentration. Der Wurzelgehalt war niedriger als im Sproß (Abb. 3/19b). Bei Kurztagbedingungen lagen die Asparaginwerte bei 1 mM und 10 mM externem Nitratangebot gleich niedrig, obwohl die Pflanzen unterschiedlich alt waren, es ergab sich keine Abhängigkeit vom Nitratangebot. Bei 35 mM Nitrat stiegen die Werte für beide Gewebe deutlich an. Der Asparagingehalt im Sproß war höher als in der Wurzel (Abb. 3/19c). Bei kurzer Photoperiode zeigten die Asparaginwerte keine Abhängigkeit vom externen Nitratspiegel, davon ausgenommen war die 35 mM-Bedingung, diese stieg deutlich an.

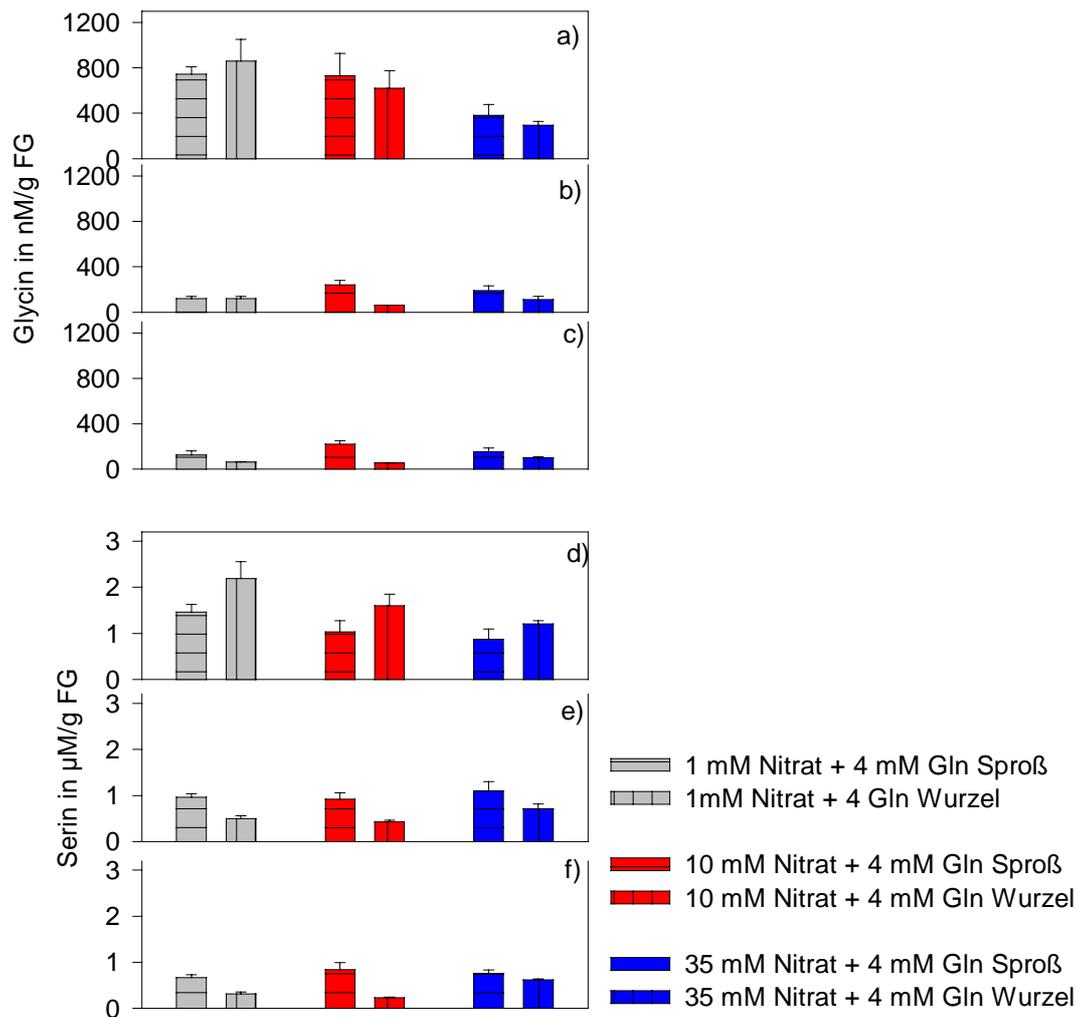
### **Fazit:**

Die N-haltigen Aminosäuren zeigten keine Abhängigkeit von der externen Nitratversorgung, sie stiegen in Gegenwart von 1 mM Nitrat als niedrige externe Nitratversorgung sogar an. Glutamin und Asparagin wiesen unter Langtagbedingungen jeweils höhere Wurzel- als Sproßkonzentrationen auf. Glutamat und Aspartat zeigten bei 16 h Tageslänge in beiden Geweben gleiche Anteile auf. Bei den anderen beiden Tageslängen lag der Hauptanteil aller vier Aminosäuren im Sproß. Die N-haltigen Aminosäuren nehmen mit kürzerer Tageslänge und damit längerer vegetativer Phase in ihren Konzentrationen ab, sie werden „verbraucht“.

### **3.2.7.5 Aminosäuren aus der Photorespiration**

Glycin und Serin werden während der Photorespiration im Peroxisom produziert. Dies gilt natürlich nur für die grünen Gewebe der Pflanze, also hauptsächlich für die Blätter. Im nichtgrünen Gewebe werden Serin und Glycin aus 3-Phosphoglycerat synthetisiert. Aus diesem Grund werden die beiden Gewebe getrennt behandelt.

Glycin nahm unter Langtagbedingungen im Sproß nur in Gegenwart von sehr hohen Nitratkonzentrationen gegenüber den beiden anderen Nitratangeboten ab (Abb. 3/20a). Bei intermediärer Tageslänge ergab sich im Sproß kein Zusammenhang zwischen interner Glycinkonzentration und externem Nitratangebot (Abb. 3/20b), dies galt auch für den Kurztag mit 8 h Licht (Abb. 3/20c).



**Abbildung 3/20:** der Graph zeigt die Glycin- und Serinkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a+d) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b+e) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c+f) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a+d) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b+e) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c+f) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ). Belichtungsintensität war  $100 \mu\text{E/m}^2$ .

Serin nahm bei 16 h Tageslänge mit ansteigender Nitratversorgung im Sproß ab (Abb. 3/20d). Wie bei Glycin ergab sich bei einer Tageslänge von 12 h keine Korrelation zwischen Aminosäurespiegel und externem Nitratangebot (Abb. 3/20e), dies galt auch bei der kurzen Photoperiode (Abb. 3/20f).

Tabelle 1: die Tabelle zeigt das Glycin/Serin-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei 16 h Licht / 8 h Dunkel sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei 12 h Licht / 12 h Dunkel bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei 8 h Licht / 16 h Dunkel sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

	Glycin / Serin		
	16 h	Lichtdauer 12 h	8h
1 mM NO <sub>3</sub> /4mM Gln Sproß	0,50 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,18 ± 0,04
10 mM NO <sub>3</sub> /4 mM Gln Sproß	0,7 ± 0,03	0,26 ± 0,07	0,28 ± 0,04
35 mM NO <sub>3</sub> /4 mM Gln Sproß	0,39 ± 0,09	0,17 ± 0,08	0,22 ± 0,07

Aufgrund dieser besprochenen Werte ergab sich auch beim Glycin/Serin-Verhältnis als Maß für die Photorespiration bei keiner der drei Photoperioden eine Korrelation mit dem externen Nitratspiegel. Es ergab sich auch kein direkter Zusammenhang mit der Länge der Photoperiode, man kann aber sagen, daß bei Langtagbedingung die Glycin/Serin-Quotienten etwas höher waren. (Tab1).

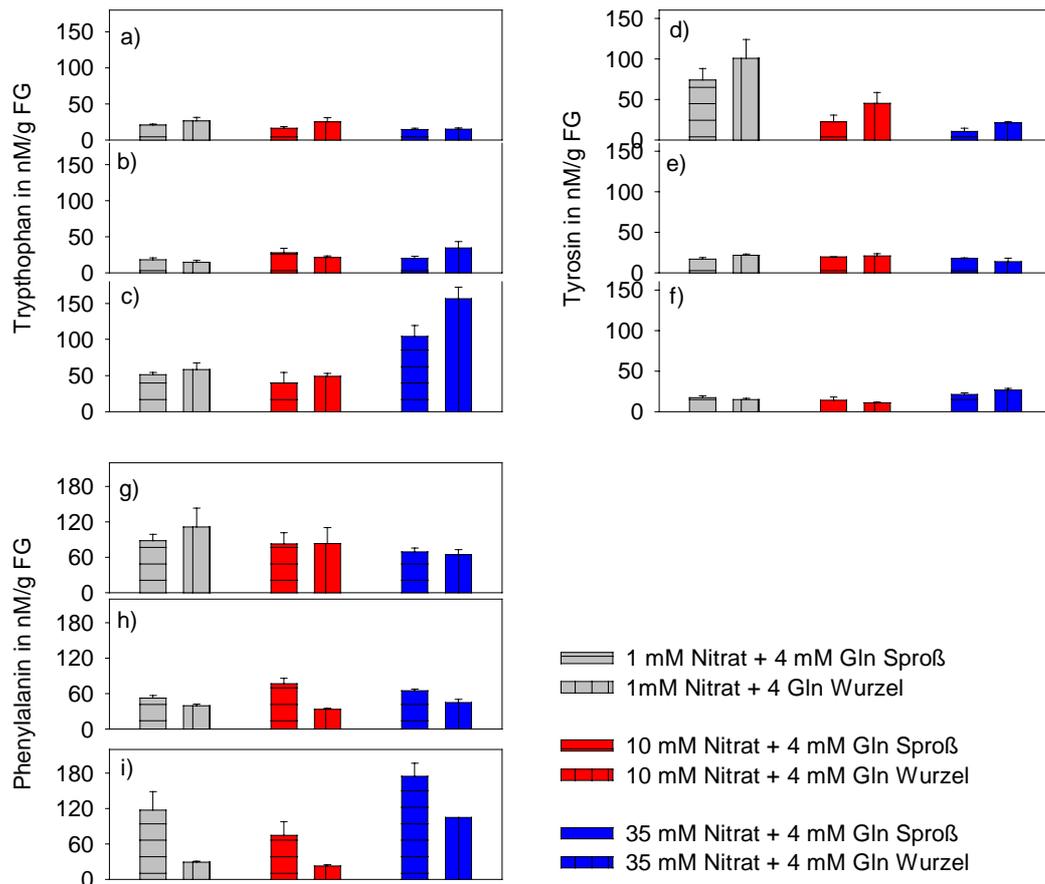
Bei den Glycin-Wurzelwerten kam es bei 16 h Tageslänge zu einer Abnahme mit ansteigendem Nitratangebot. Beim intermediären Tagesgang ergab sich kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern Aminosäurespiegel und Nitratangebot, dies galt ebenso beim Kurztag. Dasselbe Bild ergab sich für die Serinwerte (Abb. 3/20a-f).

### Fazit:

Glycin und Serin nahmen bei Langtagbedingungen mit zunehmender Nitratversorgung in beiden Geweben ab. Es ergab sich auch eine Abnahme in Abhängigkeit von der Tageslänge.

### 3.2.7.6. Aromatische Aminosäuren

Bei Langtagbedingungen nahm die Sproßkonzentration von Tryptophan mit steigendem Nitratangebot leicht ab, der Wurzelspiegel reagierte nur bei hoher Nitratkonzentration mit einer Abnahme (Abb. 3/21a). Bei mittlerer Tageslänge von 12 h reagierte der Sproß uneinheitlich (Abb. 3/21b), die Wurzelkonzentration stieg mit extern ansteigender Nitratversorgung und zunehmenden Pflanzenalter an.



**Abbildung 3/21:** der Graph zeigt die Konzentration an Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a+d+g) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b+e+h) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c+f+i) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a+d+g) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b+e+h) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c+f+i) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n =4-5). Belichtungsintensität war 100 $\mu$  E/m<sup>2</sup>.

Bei kurzer Photoperiode zeigten sowohl Sproß als auch Wurzel keinen eindeutigen Zusammenhang der Tryptophankonzentration mit dem Nitratangebot, die Wurzel wies höhere Spiegel auf als der Sproß (Abb. 3/21c).

Tyrosin nahm bei 16 h Tageslänge in beiden Geweben mit steigender Nitratkonzentration ab, die Wurzel wies höhere Konzentration auf als der Sproß (Abb. 3/21d). Bei mittlerer Photoperiode ergab sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen externer Nitrat- und Tyrosinkonzentration (Abb. 3/21e), auch die Gewebeverteilung war unregelmäßig. Das gleiche Bild ergab sich auch für die kurze Photoperiode (Abb. 3/21f).

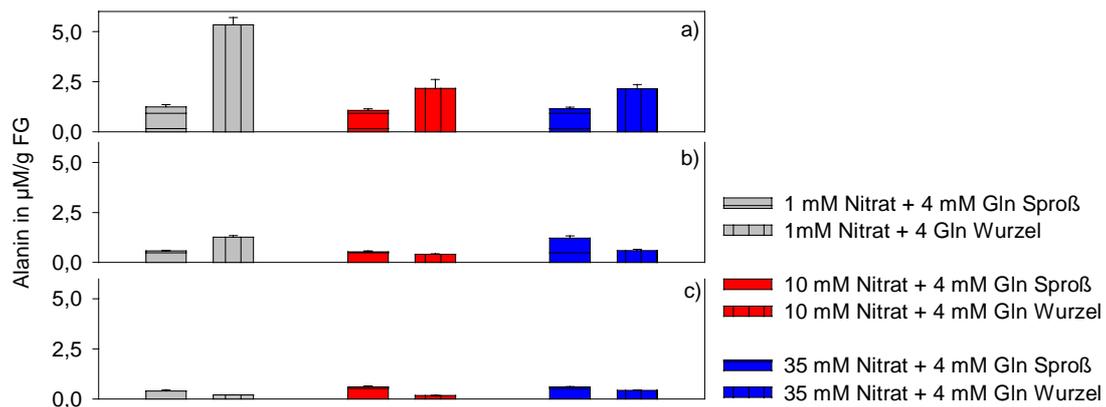
Bei 16 h Tageslänge nahm die Phenylalaninkonzentration in beiden Geweben mit ansteigender Nitratversorgung ab (Abb. 3/21g), die Gewebeverteilung war jedoch nicht durchgängig. Bei mittlerer Tageslänge war keine Steuerung durch den externen Nitratpool zu

erkennen (Abb. 3/21h), auch ergab sich keine klare Linie in Bezug auf die Verteilung auf Sproß und Wurzel. Dies galt auch für die kurze Photoperiode (Abb. 3/21i).

### Fazit:

Die aromatischen Aminosäuren reagieren uneinheitlich auf das zunehmende Nitratangebot. Tyrosin und Phenylalanin nehmen unter Langtagbedingungen mit ansteigendem Nitratangebot ab. Tryptophan nimmt mit Verkürzung der Photoperiode zu. Tyrosin und Phenylalanin verhalten sich uneinheitlich in Bezug auf die Länge der Photoperiode. Phenylalanin weist meist einen höheren Sproßanteil auf.

### 3.2.7.7. Alanin und aliphatische Aminosäuren

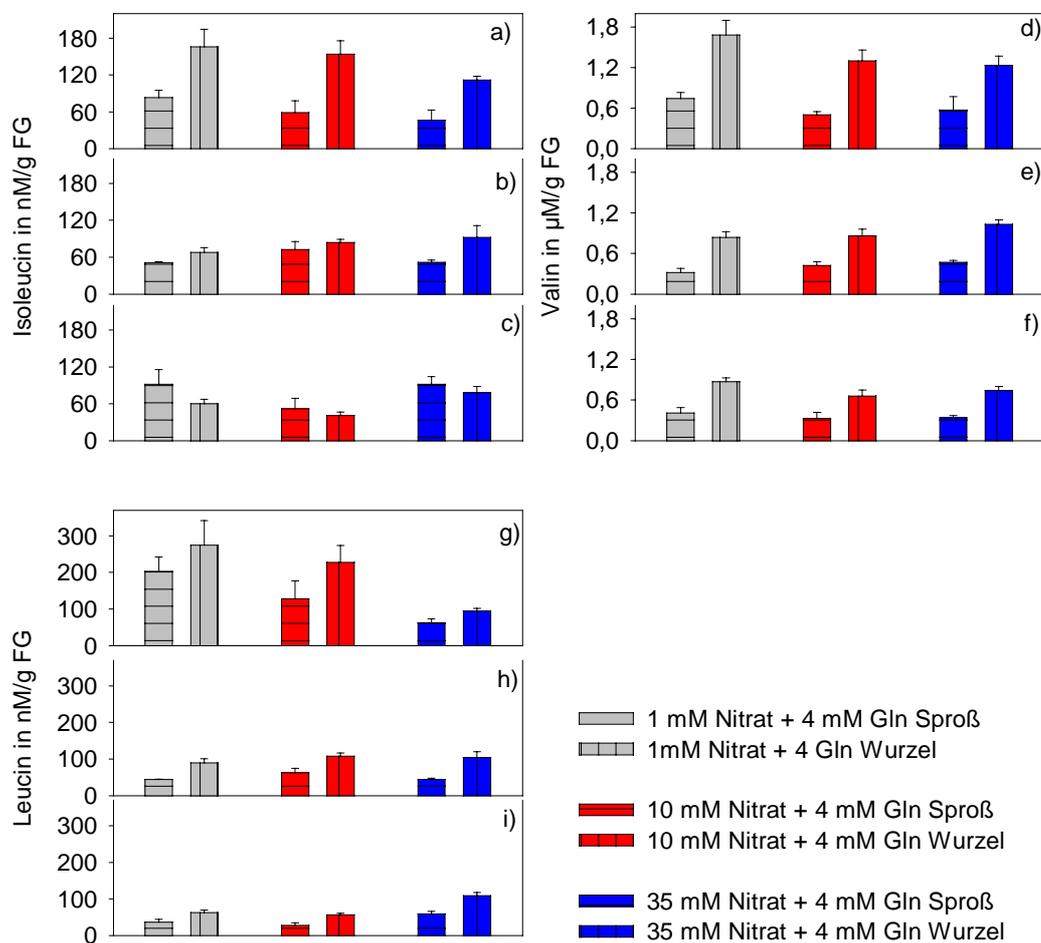


**Abbildung 3/22:** der Graph zeigt die Konzentration an Alanin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n =4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.

Bei 16 h Tageslänge nahm die Wurzelkonzentration bei Alanin von 1 mM Nitrat zu den beiden anderen Nitratkonzentrationen ab, die Sproßkonzentrationen veränderten sich kaum (Abb. 3/22a). Bei mittlerer Photoperiode ergab sich kein Zusammenhang zwischen den internen Alaninkonzentrationen und dem externen Nitratangebot (Abb. 3/22b), auch die Gewebeverteilung war ungleichmäßig. Dies ergab sich auch für die kurze Photoperiode (Abb. 3/22c).

Valin zeigte bei Langtagbedingungen keine Abhängigkeit vom externen Nitratpool (Abb. 3/23d). Die Wurzel wies die höheren Konzentrationen auf. Diese Bild ergab sich auch für die beiden anderen Photoperioden (Abb. 3/23b+c).

Isoleucin nahm bei 16 h Tageslänge mit ansteigenden Nitratkonzentrationen in beiden Geweben ab, der Wurzelanteil lag über dem des Sproßes (Abb. 3/23a). Bei mittlerer Tageslänge zeigte der Sproß uneinheitliche Isoleucinwerte, die Wurzel nahm mit zunehmender Nitratkonzentration zu (Abb. 3/23b). Bei kurzer Photoperiode reagierten sowohl Sproß als auch Wurzel uneinheitlich (Abb. 3/23c).



**Abbildung 3/23:** der Graph zeigt die Konzentration an Isoleucin, leucin und Valin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a+d+g) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b+e+h) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c+f+i) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a+d+g) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b+e+h) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c+f+i) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n =4-5). Belichtungsintensität war 100 µE/m<sup>2</sup>.



Lysin zeigte bei 16 h Tageslänge in seinen Konzentrationen keinen Zusammenhang mit dem externen Nitratangebot (Abb. 3/24a). Außerdem trat keine bestimmte Verteilung zwischen Sproß und Wurzel auf. Diese Bild setzte sich bei den anderen beiden Photoperioden fort (Abb. 3/24b+c).

Auch Methionin reagierte unter Langtagbedingungen nicht auf das ansteigende Nitratangebot, die Wurzelkonzentration war höher als die des Sprosses (Abb. 3/24g). Auch bei intermediärer Tageslänge zeigte sich keine Korrelation zwischen externem Nitratangebot und internen Methioninkonzentrationen, die Verteilung zwischen Sproß und Wurzel glich sich stärker aneinander an (Abb. 3/24h). Dasselbe galt für die kurze Photoperiode (Abb. 3/24i).

Threonin zeigte bei langer Photoperiode im Sproß keine Abhängigkeit zum externen Nitratangebot (Abb. 3/24d), die Wurzelkonzentration nahm mit zunehmenden Nitratangebot zu. Bei 12 h Tageslänge drehte sich das Bild, die Sproßkonzentration nahm parallel zur Nitratkonzentration zu, die Wurzel reagierte uneinheitlich (Abb. 3/24e). Bei 8 h Tageslänge ergab sich das gleiche Bild wie beim intermediären Tagesgang (Abb. 3/24f).

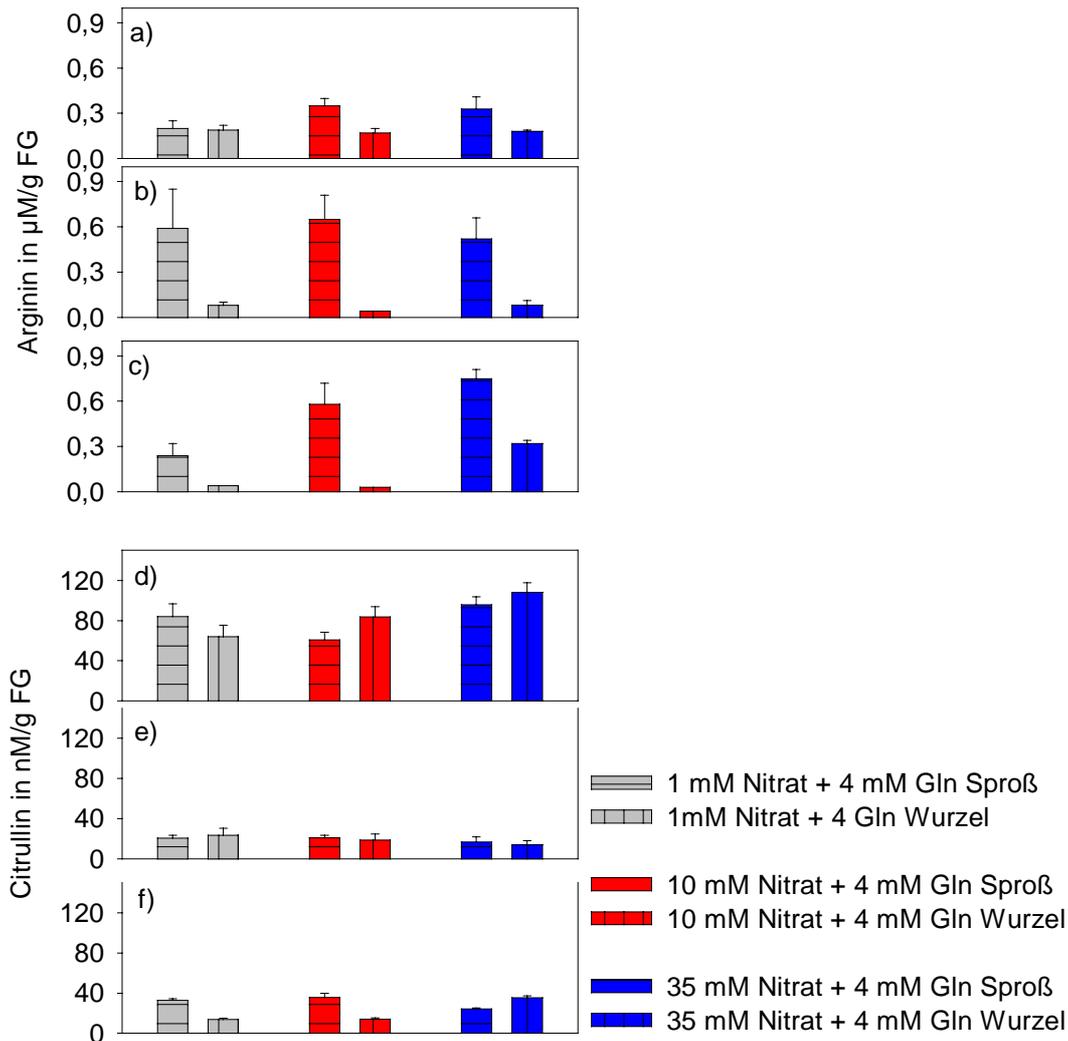
#### **Fazit:**

Die sich von Aspartat abzweigenden Aminosäuren zeigen weder in Bezug auf Nitrat noch auf Tageslänge eine ausgeprägte Abhängigkeit.

#### **3.2.7.9. Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus – Arginin und Citrullin**

Arginin zeigte unter Langtagbedingungen kaum eine Reaktion auf eine externe Veränderung des Nitratangebotes (Abb. 3/25a). Die Verteilung war zugunsten des Sprosses. Dieses Bild ergab sich auch für die 12 h Photoperiode (Abb. 3/25b). Unter Kurztagbedingungen nahm die Sproßkonzentration an Arginin mit ansteigendem Nitratangebot zu, für die Wurzel ergab sich kein Zusammenhang zwischen interner Aminosäurekonzentration und externer Nitratkonzentration (Abb. 3/25c).

Unter Langtagbedingungen nahmen die Wurzelwerte von Citrullin mit ansteigendem Nitratangebot zu, bei den Sproßwerten ergab sich kein solcher Zusammenhang (Abb. 3/25d). Bei 12 h Tageslänge zeigte sich bei den Wurzelwerten eine Konzentrationsabnahme mit zunehmenden Nitratpool (Abb. 3/25e). Der Sproß reagierte uneinheitlich. Unter Kurztagbedingungen ergab sich für beide Gewebe keine externe Nitratsteuerung (Abb. 3/25f).



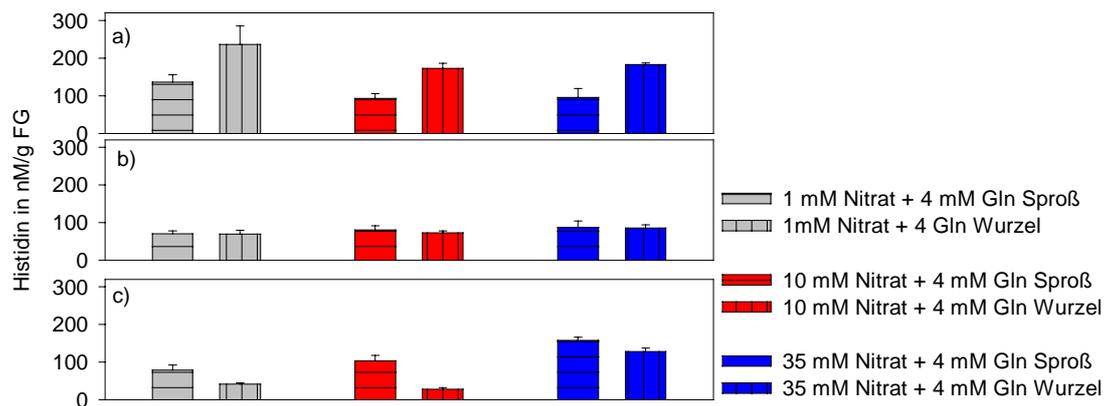
**Abbildung 3/25:** der Graph zeigt die Konzentration an Arginin und Citrullin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a+d) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b+e) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c+f) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ . Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a+d) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b+e) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c+f) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n=4-5$ ). Belichtungsintensität war  $100 \mu\text{E/m}^2$ .

### Fazit:

Die Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus zeigen keine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot. Auch die Tageslänge zeigt keinen Einfluß auf die internen Konzentrationen.

### 3.2.7.10. Histidin

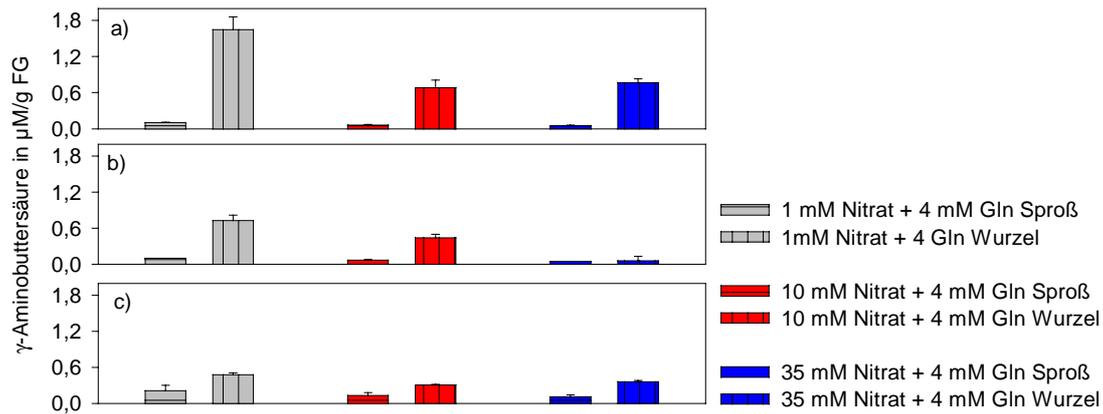
Im Langtag ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem Nitratangebot und den Histidinkonzentrationen in beiden Geweben (Abb. 3/26a). Bei 12 h Tageslänge stiegen die Konzentrationen von Sproß und Wurzel tendenziell mit zunehmenden Nitratkonzentrationen an (Abb. 3/26b). Bei Kurztag zeigte sich im Sproß eine Zunahme der Histidinkonzentration mit ansteigendem Nitratangebot, die Wurzel zeigte keine Beeinflussung (Abb. 3/26c).



**Abbildung 3/26:** der Graph zeigt die Konzentration an Histidin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n =4-5). Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

### 3.2.7.11. $\delta$ -Aminobuttersäure = GABA

Bei 16 h Tageslänge trat kein Zusammenhang zwischen den GABA-Werten und dem externen Nitratangebot auf, die Wurzel wies höhere Konzentrationen als der Sproß auf (Abb. 3/27a). Bei 12 h Tageslänge nahmen Sproß und Wurzelanteile mit zunehmender Nitratkonzentration tendenziell ab (Abb. 3/27b), die Verteilung war dieselbe wie beim Langtag. Unter Kurztagbedingungen zeigte der Sproß eine tendenzielle Konzentrationsabnahme mit steigendem Nitratangebot, die Wurzel reagierte uneinheitlich (Abb. 3/27c).



**Abbildung 3/27:** der Graph zeigt die Konzentration an  $\gamma$ Aminobuttersäure der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei a) liegen 16 h Licht / 8 h Dunkel vor, bei b) 12 h Licht / 12 h Dunkel und bei c) 8 h Licht / 16 h Dunkel. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Bei a) sind die Pflanzen bei allen Nitratbedingungen 22 Tage alt, bei b) bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 27 Tage, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 33 Tage, bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 37 Tage. Bei c) sind sie bei 1 mM Nitrat + 4 mM Gln 75 Tage alt, bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln 82 Tage und bei 35 mM Nitrat + 4 mM Gln 116 Tage. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ). Belichtungsintensität war 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

Bei  $\delta$ -Aminobuttersäure wies die Wurzel immer die höhere Konzentration auf, unabhängig vom Nitratangebot oder von der Tageslänge.

### Fazit:

Die Aminosäuren zeigten kaum eine Abhängigkeit in ihrer Konzentration vom externen Nitratangebot, die meisten der Aminosäuren reagierten aber auf kürzere Photoperioden mit abnehmenden Konzentrationen. Ausnahme war Arginin, dieses nahm mit abnehmender Tageslänge zu. Wenn sich ein Zusammenhang zwischen der internen Aminosäurekonzentration und der externen Nitratversorgung ergab, dann trat dies meist bei der Langtagsbedingung ein. Dies galt für Glycin, Serin, Tyrosin und die aliphatischen Aminosäuren, diese nahmen bei 16 h Licht alle mit zunehmender Nitratkonzentration ab.

**Fazit aus dem ersten Hauptversuch:**

1. Nitrat führt zu einer Hemmung der Blühinduktion, dieser Effekt ist unter Kurztagbedingungen am deutlichsten zu sehen, bei den anderen Photoperioden wirkt die Tageslänge gegen den Nitratinfluß. So kommt es bei Langtagbedingungen zu einer raschen Blüte, obwohl der interne Nitratgehalt hoch ist.
2. Anhand der Daten zu Blattzahl und Biomasse wird ersichtlich, daß die Verzögerung der Blühinduktion auf einer Verlängerung der vegetativen Phase beruht.
3. Der interne Nitratgehalt wird nur vom externen Nitratgehalt und nicht von der Photoperiode gesteuert, hohe externe Nitratspiegel bewirken steigende interne Nitratkonzentrationen. Bei den Gesamtaminosäuren ergibt sich keine Abhängigkeit vom externen Nitratspiegel, wohl aber von der Tageslänge. Ebenso nehmen die reduzierenden Zucker und Saccharose mit kürzerer Photoperiode und damit längerer vegetativer Phase ab, während Stärke zumindest bei niedrigen Nitratkonzentrationen zunimmt.

Matt et al. (1998) haben gezeigt, daß dies bei Kurztagbedingungen auch für Tabak gilt. Nitrat nimmt dabei bei Tabak während der Lichtperiode ab, während die Gesamtaminosäuren zunehmen. Die Kohlenhydrate nehmen bis auf Stärke ab, letztere nimmt zu. Dabei ist zu beachten, daß in der vorliegenden Arbeit nur ein Zeitraum (30 – 90 min nach Lichtbeginn) erfaßt wurde. Die einzelnen Aminosäuren zeigen keine direkte Abhängigkeit vom externen Nitratpool. Als allgemeine Aussage gilt, daß unter Langtagbedingungen die Aminosäuren mit steigendem Nitratangebot abnehmen, bei intermediärer Tageslänge gibt es keine einheitliche Reaktion und bei Kurztag steigen sie in Bezug auf die Nitratkonzentrationen leicht an.

Insgesamt bestätigen die Messungen der Metaboliten, daß der interne Nitratgehalt dem externen Nitratgehalt folgt. Weder die Gesamtaminosäuren noch die einzelnen Aminosäuren reagieren mit deutlichen Veränderungen, wenn die Nitratversorgung sich ändert. Dies gilt ebenfalls für die Kohlenhydrate.

### **3.3 Blühinduktion bei Landsberg erecta und verschiedenen Blühmutanten unter verschiedenen Nitratkonzentrationen**

#### **3.3.1 Blühverlauf bei Landsberg erecta unter verschiedenen Nitratregimen**

In diesem Teil wird die mögliche Steuerung von Nitrat auf die Blühinduktion bereits charakterisierter Blühmutanten, die aus verschiedenen Signalwegen stammen (siehe Einleitung) untersucht. Das Ziel ist es, festzustellen, ob eine der getesteten Mutationen die Hemmung der Blühinduktion durch Nitrat aufhebt, dies wäre ein Hinweis, daß Nitrat die Blühinduktion über einen der charakterisierten Signalwege steuert. Diese Blühmutanten haben Landsberg erecta als Hintergrund, deswegen wird zunächst eine Darstellung der Daten zu Landsberg erecta gegeben. Neben der bereits verwendeten Hauptversuchsreihe mit 1 mM , 10 mM und 35 mM Nitrat mit 4 mM Gln als jeweiligem Zusatz ging es um die Beantwortung zweier weiterer Fragen:

- 1.) Wie beeinflusst konventioneller Nitratmangel die Blühinduktion? Dazu wird 0,5 mM Nitrat ohne Glutaminzusatz als Mangelbedingung eingesetzt.
- 2.) Wirkt Glutamin selbst oder seine Derivate blühfördernd? Ein Vergleich dieser Behandlung mit der Behandlung, die 10 mM Nitrat + 4 mM Gln beinhaltet, sollte Aufschluß darüber geben, ob Glutamin-Fütterung selbst einen Einfluß auf die Blühinduktion hat. Dazu wird 10 mM Nitrat ohne Glutaminzusatz verwendet.

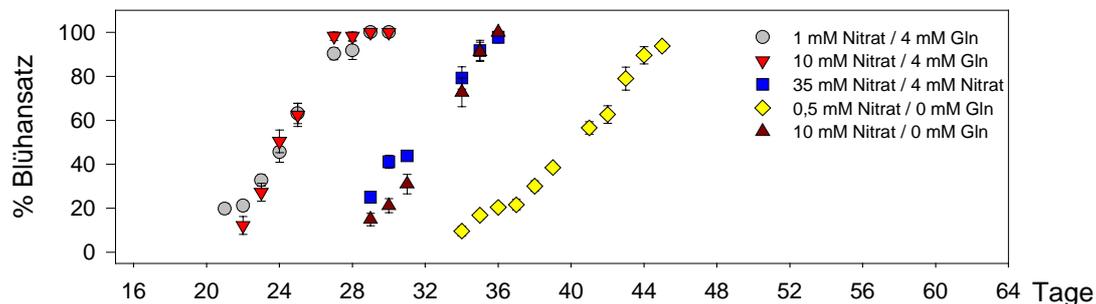
Um das System nicht zu kompliziert zu gestalten, wurde nur ein Zeitregime – 12 h Photoperiode – verwendet. Bei Columbia hat sich gezeigt, daß unter diesen Tagesbedingungen die Hemmung durch hohe Nitratkonzentrationen bereits greift, auf der anderen Seite umgeht man das Problem, daß die Platten aufgrund langer Versuchszeiten austrocknen könnten.

Alle nachfolgenden Graphiken sind jeweils in der Skala angepaßt, um zum einen Ler und Mutante miteinander vergleichen zu können, aber auch die einzelnen Mutanten untereinander. Die Stärkegraphiken weichen davon ab, hier sind die Unterbrechungen so gewählt worden,

daß Wildtyp und Mutante möglichst günstig miteinander vergleichbar sind. Die Gesamtskala wurde jedoch nicht verändert. Glutamin wird im nachfolgenden als Gln abgekürzt.

### 3.3.1.1 Blühverlaufskurven und Biomassen bei *Landsberg erecta*

In Anwesenheit von steigenden Nitratkonzentrationen, jeweils mit Glutamin, kam es bei Ler zu einer Verzögerung der Blühinduktion. Dabei verliefen die Kurven für 1 mM Nitrat und 10 mM Nitrat, fast parallel, während bei überoptimaler Versorgung mit 35 mM Nitrat + 4 mM Gln die Kurve deutlich verzögert war gegenüber den anderen beiden Kurven (Abb. 3/28). Dieser Kurvenverlauf ergab sich auch bei Col (Abb. 3/6b). Beide Ökotypen sind in der Literatur als frühblühend beschrieben worden. Die Verzögerung der Blühinduktion bei zunehmender Nitratkonzentration beruhte auf einer Verlängerung der vegetativen Phase. Die Blattzahl stieg in Gegenwart von Gln mit steigender Nitratkonzentration von 1 mM Nitrat bis nach 35 mM Nitrat an (Abb. 3/29a). Hier zeigte sich ein deutlicherer Nitrategiefluß als bei Col (Abb. 3/7b), bei diesem waren die Unterschiede bei den Blattzahlen zwischen den einzelnen Nitratkonzentrationen nicht so ausgeprägt bei dieser Tageslänge. Bei Col zeigte sich der Nitrategiefluß nur zwischen 1 mM Nitrat + 4 mM Gln und 10 mM Nitrat + 4 mM Gln.



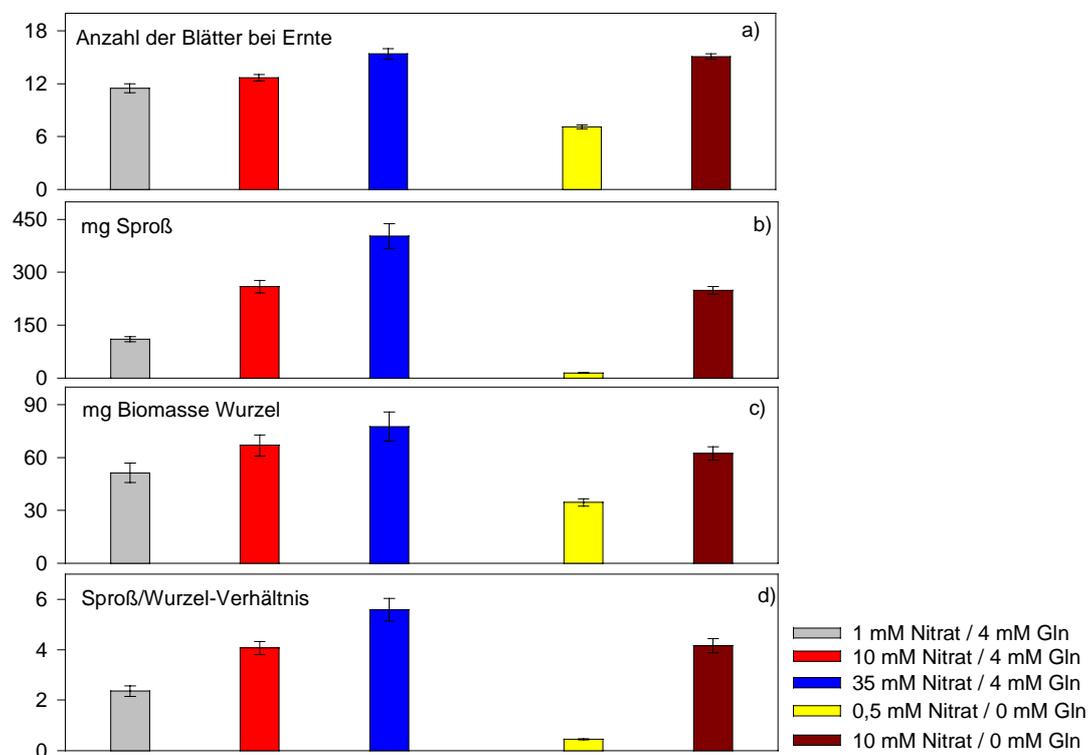
**Abbildung 3/28:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* unter verschiedenen Nitratangeboten. Die Lichtintensität betrug  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$ , die Lichtdauer 12 h, die Temperatur durchweg  $20^\circ\text{C}$ . Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ).

Die Blühverlaufskurve zur Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war am weitesten nach hinten verschoben, diese Kurve erweckte zuerst den Eindruck, daß hier eine Hemmung des Blühens eintrat. Es ist jedoch wichtig, sich daran zu erinnern, daß diese Pflanzen wesentlich langsamer wachsen als Pflanzen, die mit einer adequaten Nitratkonzentration versorgt werden. Unter diesen Umständen ergibt sich ein völlig anderes Bild, wenn Blühverlauf und physiologischer Status miteinander in bezug gesetzt werden.

Sowohl Blattzahl (Abb. 3/29a) als auch die Biomassen (Abb. 3/29b+c) und das Sproß/Wurzel-Verhältnis (Abb. 3/29d) waren bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) niedriger als bei den anderen Bedingungen, sodaß die Blühinduktion unter Berücksichtigung

dieser physiologischer Daten sogar verfrüht eingetreten war. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigte eine stärkere Hemmung der Blühinduktion gegenüber der entsprechenden Bedingung

mit Gln. Grundsätzlich ergab sich auch bei Ler eine Verzögerung der Blühinduktion durch Verlängerung der vegetativen Phase bei Steigerung der externen Nitratversorgung. Dies trat auch ohne Glutaminzusatz auf, wurde aber durch Glutaminbeigabe deutlich sichtbar, da Nitrat eher als Signalstoff von der Pflanze verwendet wurde. Die Blattzahl und die Biomasse wurde durch das Weglassen von Gln kaum beeinflusst, obwohl die Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte älter waren als die Pflanzen aus der vergleichbaren Ernte mit Gln, ein Hinweis darauf, daß Gln-Zusatz nicht die vegetative Phase verkürzt, sondern das Wachstum beschleunigt.



**Abbildung 3/29:** Der Graph zeigt die Anzahl der Blätter, die beiden Biomassen für Sproß und Wurzel sowie das Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 10 - 15$ ).

Vergleicht man die beiden Bedingungen ohne Gln, so zeigte sich, daß die Pflanzen bei 10 mM Nitrat als externe N-Versorgung im Vergleich zur Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) verspätet blühten, sie wiesen zum Zeitpunkt der Blüte ein 10-15faches Sproßgewicht auf

(Abb. 3/29b). Auch aus diesen beiden Bedingungen ergibt sich, daß ein Anstieg der externen Nitratkonzentrationen zu einer Verzögerung der Blühinduktion führt.

Bei der Wurzelbiomasse ergab sich dieselbe Verteilung der Biomassen wie beim Sproß in der Hauptversuchsreihe (Abb. 3/29c). Nur die Biomasse bei 0,5 mM Nitrat ohne Glutamin war höher im Vergleich zu den anderen Bedingungen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen 10 mM Nitrat mit oder ohne Gln, beide Bedingungen wiesen die gleiche Wurzelbiomasse auf. Die sich daraus ergebenden Folgerungen sind bereits beim Sproßgewicht erklärt.

Da sowohl bei Sproß als auch bei Wurzel mit steigender externer Nitratkonzentration eine Zunahme der Biomasse eintrat, kam es bei der Hauptversuchsreihe zu einer Zunahme des Sproß/Wurzel-Verhältnisses mit steigender Nitratversorgung (Abb. 3/29d). Aus den niedrigen Biomassewerten für Sproß und Wurzel bei Mangelernährung (0,5 mM Nitrat) ergab sich das zu erwartende niedrige Sproß/Wurzel-Verhältnis. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wies in etwa das Sproß/Wurzel-Verhältnis wie die entsprechende Bedingung mit Gln auf, hier fand also keine Beeinflussung statt.

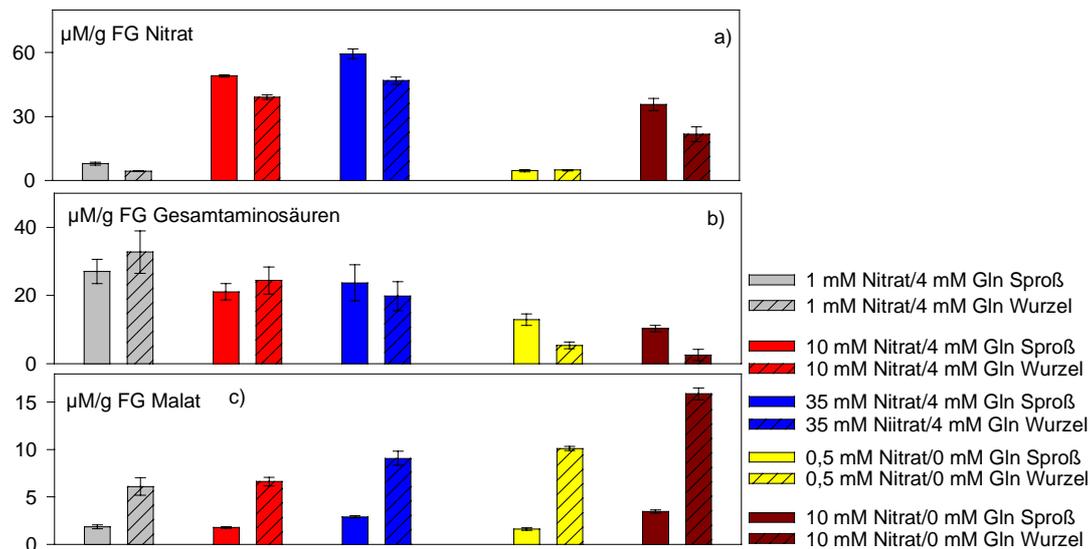
#### **Fazit:**

Die Blattzahl und die Biomassen sowie das Sproß/Wurzel-Verhältnis stiegen mit zunehmender externer Nitratversorgung an. Bei niedriger externer Nitratversorgung ergaben sich niedrige Blattzahl und niedrige Biomassen, die Pflanzen blühten damit in einem physiologisch jüngeren Stadium als die anderen Bedingungen. Glutaminzugabe führte zwar zu einer früheren Blüte, bewirkt aber keine verkürzte vegetative Phase, sondern ein beschleunigtes Wachstum und wirkte sich nicht auf das Sproß/Wurzel-Verhältnis aus. Die Veränderungen im Blühverhalten traten als Antwort auf Nitratversorgungen auf, die ebenfalls das Sproß/Wurzel-Verhältnis beeinflussen.

#### **3.3.1.2 Nitrat, Gesamtaminosäuren und Malat**

Der interne Nitratspiegel spiegelte die externe Nitratversorgung wieder bei den drei Hauptbedingungen – 1 mM, 10 mM und 35 mM Nitrat (jeweils mit 4 mM Gln) -, der Sproß wies jeweils die höheren Konzentrationen auf (Abb. 3/30a). Die Konzentrationen der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) lagen kaum unter denen der niedrigen Nitraternährung mit

1 mM Nitrat/ 4 mM Gln, obwohl die Pflanzen bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wesentlich älter waren als bei der niedrigen Nitraternahrung. Die Nitratspiegel der 10 mM-Bedingung ohne Gln waren niedriger als die der vergleichbaren Bedingung mit Glutamin. Dies kann daran liegen, die Pflanzen älter waren, als die Blühinduktion einsetzte, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß insgesamt mehr N verbraucht worden ist.



**Abbildung 3/30:** der Graph zeigt den Nitratgehalt der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

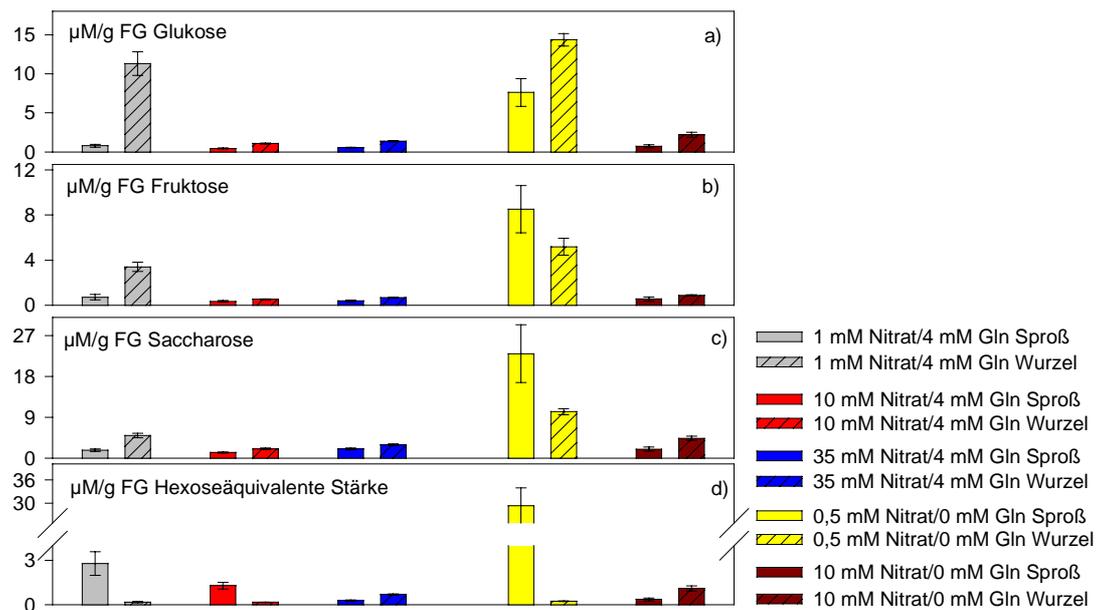
Bei den Gesamtaminosäuren zeigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen der internen Konzentration und den angebotenen Nitratkonzentrationen (Abb. 3/30b). In Gegenwart von Glutamin waren die Gesamtaminosäurespiegel in beiden Geweben hoch, sanken mit steigender Nitratversorgung jedoch leicht ab. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies deutlich niedrigere Konzentrationen an Gesamtaminosäuren auf und zeigte eine klare Gewebeverteilung zugunsten des Sproßes. Auch die Gesamtaminosäurespiegel der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen deutlich unter der Vergleichsbedingung mit Gln. Aus diesen beiden Bedingungen läßt sich also erkennen, daß die Gln-Fütterung zu einem Anstieg in der Konzentration der Gesamtaminosäuren führte.

In Gegenwart von Glutamin zeigte sich bei Malat sowohl für Sproß als auch für Wurzel bei der überoptimalen Nitratversorgung eine höhere Konzentration im Vergleich zu den beiden

anderen Nitratbedingungen (Abb. 3/30c). Insgesamt ergab sich keine eindeutige Beeinflussung durch den externen Nitratspiegel. Bei Mangeler-nährung zeigten sich ähnliche Werte für Sproß und Wurzel wie für die drei Bedingungen mit Gln. Die hier vorliegenden Malatspiegel waren höher als der vorhandene interne Nitratspiegel vermuten ließ, dies hängt damit zusammen, daß Malat nicht nur als Gegenion zu Nitrat synthetisiert wird, sondern auch in anderen Prozessen entsteht. Für die 10 mM-Bedingung ohne Gln ergaben sich deutlich höhere Konzentrationen an Malat für beide Gewebe im Vergleich zur Bedingung mit Gln, die Pflanzen sind allerdings auch älter als bei der Gln-haltigen Bedingung. Die Abwesenheit von Gln führte zu einem Anstieg von Malat, auch dies verlief nicht parallel mit dem internen Nitratspiegel. Bei Malat gilt unabhängig vom externen Nitratangebot und der An- bzw. Abwesenheit von Glutamin, daß der Sproß eine niedrigere Konzentration vorwies als die Wurzel.

### **3.3.1.3 Lösliche Zucker und Stärke**

Bei ansteigender Nitratversorgung in Gegenwart von Gln nahmen die reduzierenden Zucker, Saccharose und Stärke ab (Abb. 3/31 a-d). Saccharose reagierte insgesamt kaum auf eine Veränderung im externen Nitratangebot (Abb. 3/31c). Der Hauptanteil lag bei den reduzierenden Zuckern und Saccharose in der Wurzel, bei Stärke im Sproß. Bei Mangeler-nährung (0,5 mM Nitrat) stiegen alle Kohlenhydratspiegel deutlich an und lagen sogar höher als die Werte der niedrigen Nitraternährung mit 1 mM Nitrat/4 mM Gln, obwohl die Pflanzen älter waren und damit theoretisch mehr Zucker hätten verbrauchen können. Bei Glukose blieb die Gewebeverteilung gleich bei allen Bedingungen (Abb. 3/31a), bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war der Hauptanteil an Fruktose und Saccharose im Sproß zu finden (Abb. 3/31b,c). Bei Stärke wiederum war die Verteilung in der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) gleich der in den anderen Bedingungen (Abb. 3/31d). Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen die Konzentrationen für die reduzierenden Zucker und Saccharose etwas höher als die entsprechenden Konzentrationen in Gegenwart von Nitrat und Gln. Bei Stärke verschob sich der Hauptanteil aus dem Sproß in die Wurzel im Vergleich zur 10 mM-Nitrat-Bedingung mit Gln. Bei Vergleich der beiden Bedingungen ohne Gln zeigte sich mit ansteigender Nitratkonzentration ein Abnehmen der Kohlenhydratkonzentrationen ähnlich wie in der Hauptversuchsreihe.



**Abbildung 3/31:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Glukose, Fruktose, Saccharose sowie Stärke der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 - 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

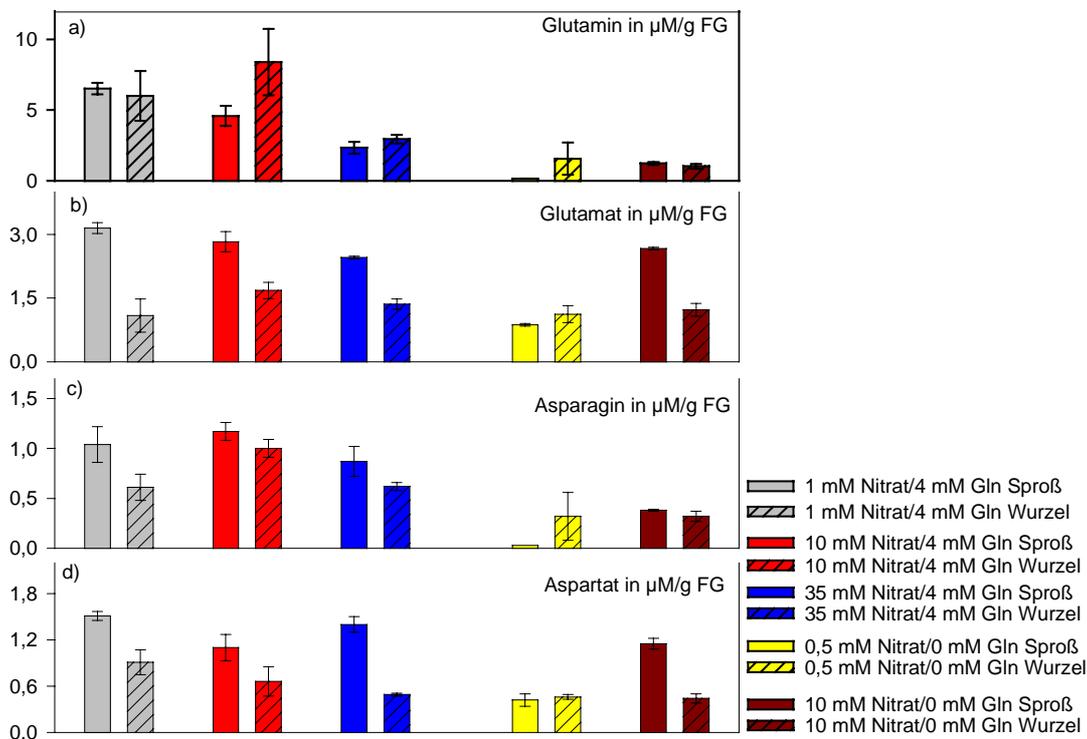
### Fazit:

Niedrige Nitratspiegel führen zu einer Anhäufung von Kohlenhydraten, dies ist bereits für Tabak nachgewiesen (Scheible et al. 1997). Die An- oder Abwesenheit von Glutamin scheint sich auf die Verteilung der Kohlenhydrate auszuwirken, es kommt teilweise zu einer Umkehrung der Verteilung der Stärke auf die beiden Gewebe.

#### 3.3.1.4 Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat

Diese N-haltigen Aminosäuren reagierten nicht oder nur mit einer leichten Abnahme auf zunehmende Nitratkonzentrationen, sofern das Medium zusätzlich Gln enthielt. Die Gewebeverteilung war ungleichmäßig. Glutamin war tendenziell stärker in der Wurzel vertreten (Abb. 3/32a), was vermutlich auf die Gln-Fütterung zurückgeht, die anderen drei Aminosäuren zeigten einen höheren Sproßanteil (Abb. 3/32 b-d). In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wiesen alle vier Aminosäuren die geringsten Konzentrationen auf, der Mangel an Nitrat als Grundbaustoff führte zu einer Absenkung der Aminosäurespiegel. Glutamin und Asparagin reagierten besonders stark mit niedrigen Spiegeln auf die

Mangelernährung, Glutamat und Aspartat wiesen höhere Spiegel als die anderen beiden Aminosäuren auf.

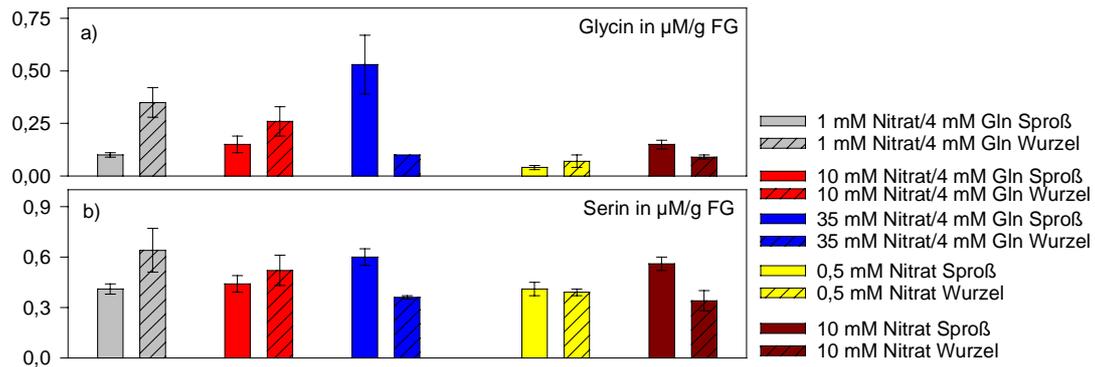


**Abbildung 3/32:** der Graph zeigt die Konzentrationen der Aminosäuren Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wiesen Sproß und Wurzel ähnliche Spiegel auf. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln sanken die beiden Aminosäuren Glutamin und Asparagin im Vergleich zur Gln-haltigen Bedingung deutlich ab, die Gln-Fütterung förderte also die Synthese dieser beiden Aminosäuren. Glutamat und Aspartat hingegen reagierten nicht auf die Abwesenheit von Gln, ihre Synthese ist nicht direkt betroffen.

### 3.3.1.5 Aminosäuren aus der Photorespiration

Glycin und Serin werden im grünen Gewebe im Zusammenhang mit der Photorespiration synthetisiert, in der Wurzel entstehen sie aus 3-Phosphoglycerat. Glycin reagierte im Sproßgewebe tendenziell mit einer Zunahme bei ansteigendem Nitratangebot, wenn gleichzeitig Gln angeboten wurde. Die Wurzel reagierte hingegen mit einer Konzentrationsabnahme unter den beschriebenen Bedingungen (Abb. 3/33a).



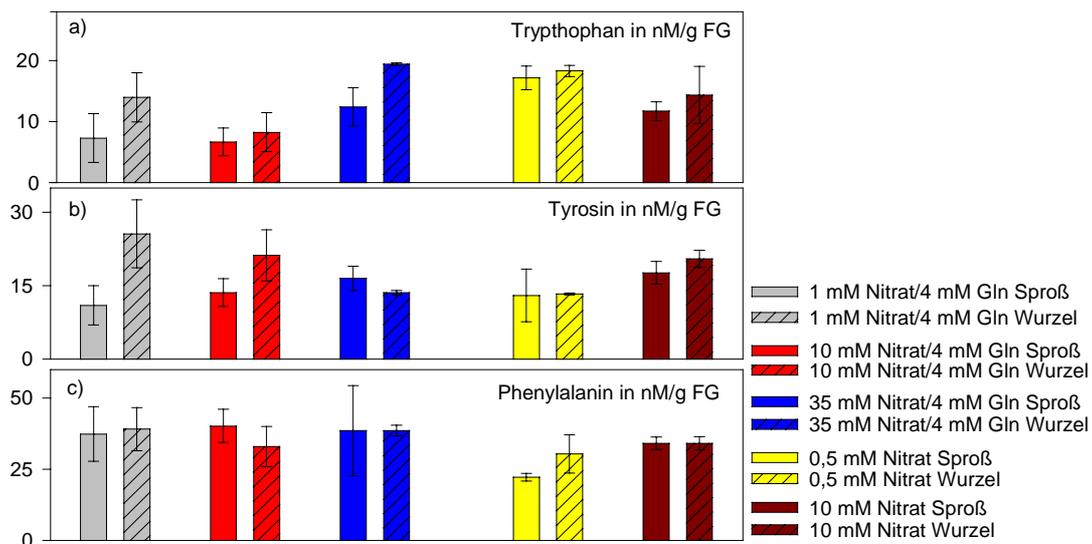
**Abbildung 3/33:** der Graph zeigt die Konzentrationen der Aminosäuren Glycin und Serin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E/m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies in beiden Geweben die niedrigsten Glycinkonzentrationen auf, mangelnde Nitratversorgung führte zu einer Inhibierung der Glycinsynthese. Die Werte der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen niedriger als die Vergleichswerte in der entsprechenden Bedingung mit Gln, aufgrund höherem Pflanzenalter wurde die Aminosäure verbraucht. Beim Vergleich der beiden Bedingungen ohne Gln zeigte sich kein ausgeprägter Unterschied, wohl zeigten beide Bedingungen jedoch niedrigere Glycinspiegel als die Bedingungen mit Gln auf und zwar unabhängig vom externen Nitratspiegel. Hier hatte weniger Nitrat einen Einfluß auf die Synthese, wohl aber die An- oder Abwesenheit von Gln.

Serin reagierte kaum auf die Zunahme der Nitratkonzentrationen in Anwesenheit von Gln, dies betraf beide Gewebe. Auch bei Mangelernährung sind die Serinkonzentrationen vergleichbar mit denen der anderen Nitratangebote (Abb. 3/33b). Auch die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigte kaum andere Serinkonzentrationen als zum einen die vergleichbare Bedingung mit Gln wie zum anderen die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat). Daraus ergibt sich, daß Serin weder von der vorliegenden Nitratkonzentration noch von der An- bzw. Abwesenheit von Gln sehr beeinflusst wird.

### 3.3.1.6 Aromatische Aminosäuren

In Gegenwart von Gln reagierte Tryptophan nicht auf das externe Nitratangebot, dies gilt für beide Gewebe (Abb. 3/34a). Bei Mangelernährung stiegen die Konzentrationen in beiden Geweben im Vergleich zu den anderen Nitratangeboten leicht an, beide Gewebe wiesen den gleichen Spiegel auf. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wies höhere Aminosäurekonzentrationen als die Bedingung mit Gln auf. Bei den Bedingungen ohne Gln zeigte sich eine leichte Abnahme an Tryptophan mit steigendem Nitratangebot. Tyrosin reagierte bei Nitrat + Gln wie Tryptophan nicht auf zunehmende Nitratkonzentrationen (Abb. 3/34b). Die Konzentrationen bei Mangelernährung lagen nur gering unter denen der anderen Bedingungen. Bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln ergab sich kein Einfluß durch den Wegfall von Gln. Insgesamt reagierte Tyrosin weder auf das externe Nitratangebot noch auf die An- bzw Abwesenheit von Gln.

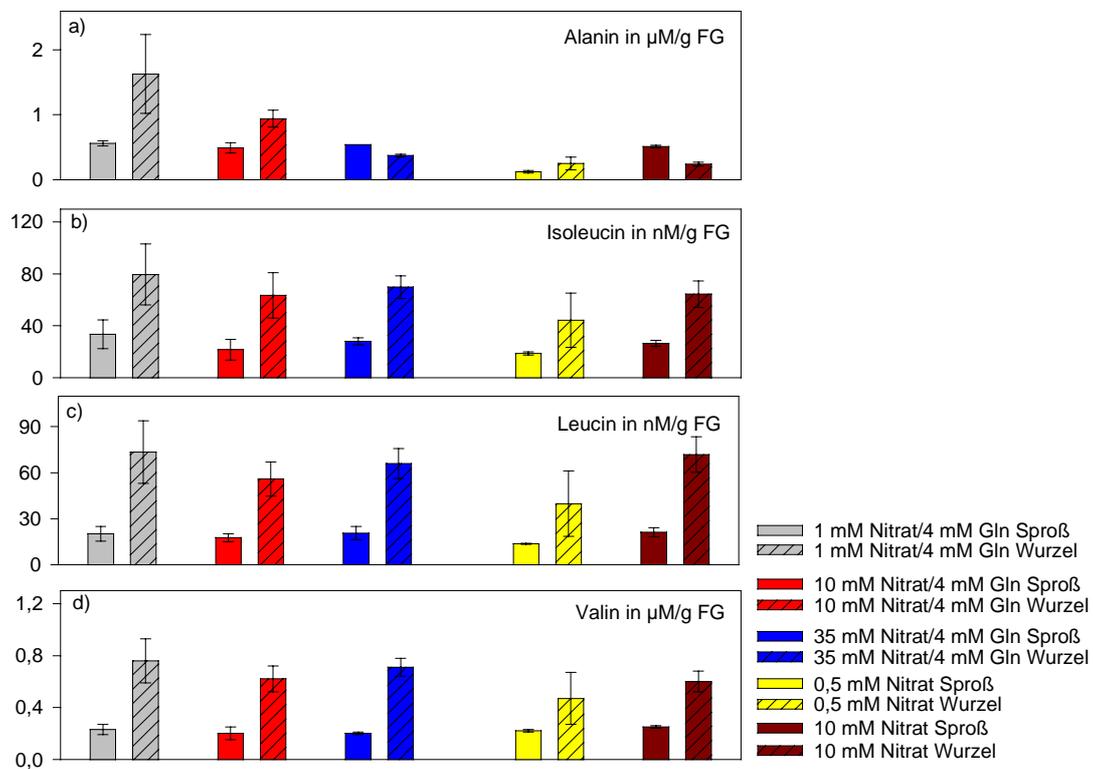


**Abbildung 3/34:** der Graph zeigt die Konzentration der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4 - 5$ ).

Phenylalanin zeigte keine Steuerung durch das externe Nitratangebot, auch die Gewebeverteilung wurde nicht beeinflusst. Bei Mangelernährung sanken die Konzentrationen nur leicht ab im Vergleich zu den anderen Bedingungen, die geernteten Pflanzen waren bei dieser Bedingung am ältesten. Auch die An- oder Abwesenheit von Gln wirkte sich nicht auf die Phenylalaninspiegel aus (Abb. 3/34c).

### 3.3.1.7 Alanin und aliphatische Aminosäuren

Alanin zeigte tendenziell eine Konzentrationsabnahme mit steigender Nitratzufuhr in Gegenwart von Glutamin im Wurzelgewebe, der Sproß reagierte nicht (Abb. 3/35a). Bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte das Sproßgewebe eine stärkere Abnahme an Alanin als die Wurzel, die Werte lagen niedriger als bei allen anderen Bedingungen. Die Werte der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen unter der der Vergleichsbedingung mit Gln, zudem war das Verhältnis in Bezug auf die Gewebe vertauscht. Mit Gln wies die Wurzel die höheren Alaninkonzentrationen auf, ohne Gln ergab sich beim Sproß die höhere Alaninkonzentration. Die aliphatischen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin zeigten in Anwesenheit von Gln keine Abhängigkeit vom externen zunehmenden Nitratangebot (Abb. 3/35 b-d).



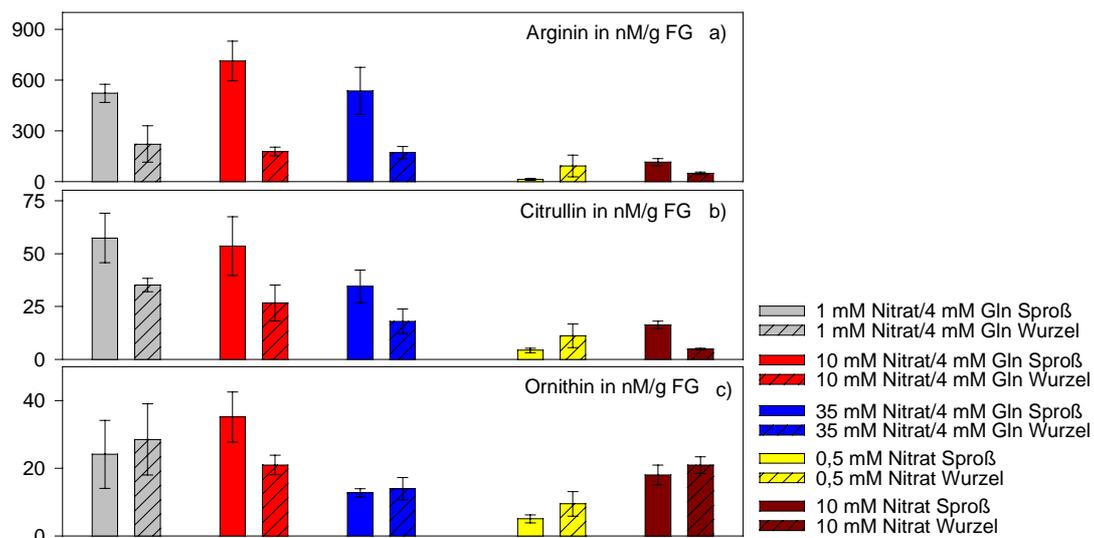
**Abbildung 3/35:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Alanin, Isoleucin, Leucin und Valin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4 - 5$ ).

Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) führte bei den Aliphaten zu einer etwas geringeren Wurzelkonzentration im Vergleich zu den anderen Nitratangeboten, der Sproß zeigte keine Beeinflussung. Die Synthese der Aliphaten wurde nicht durch Gln beeinflusst, die 10 mM-

Bedingung ohne Gln wies die gleichen Spiegel wie die entsprechende Bedingung mit Gln aus der Hauptversuchsreihe auf. Bei Isoleucin und Leucin zeigte sich bei den Bedingungen ohne Gln mit steigender Nitratversorgung eine tendenzielle Zunahme der Wurzelkonzentration. Für alle Bedingungen galt, daß die Gewebeverteilung mit der höheren Wurzelkonzentration nicht beeinflußt wurde.

### 3.3.1.8 Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus

Arginin zeigte in seinen Konzentrationen keine Abhängigkeit vom steigenden Nitratangebot, sofern das Medium Gln enthielt (Abb. 3/36a). Die Sproßkonzentration war bis zu 2mal so hoch wie die Wurzelkonzentration, unabhängig vom Alter der Pflanzen. Bei 0,5 mM Nitrat als Mangelernährung sanken die Konzentrationen beider Gewebe sehr stark ab, die Wurzel wies hier tendenziell etwas mehr Arginin als der Sproß auf.



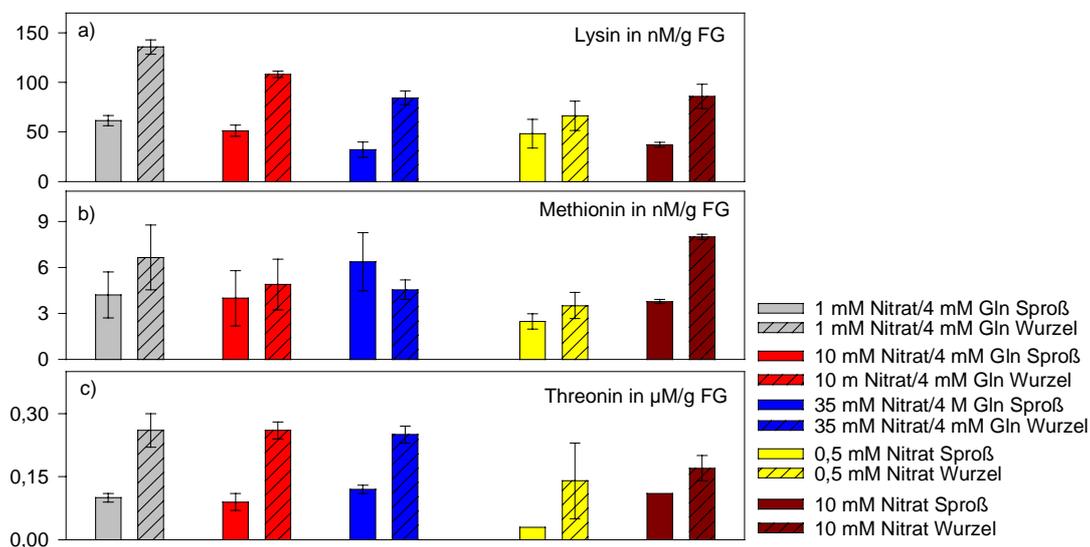
**Abbildung 3/36:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Arginin, Citrullin und Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4 - 5$ ).

Auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigte deutlich verringerte Konzentrationen im Vergleich zur 10 mM-Nitrat-Bedingung mit Gln. Die Verteilung auf Sproß und Wurzel war durch die Abwesenheit von Gln nicht beeinflußt. Daraus kann abgeleitet werden, daß nicht der Mangel an Nitrat, sondern der Mangel an Gln zu einem Absinken der Spiegel führte. Diese Bild ergab sich auch für Citrullin, wobei die Konzentrationen grundsätzlich ca. ein

Zehntel derer von Arginin betrogen (Abb. 3/36b). Ornithin reagierte uneinheitlich auf das externe Nitratangebot in Gegenwart von Gln (Abb. 3/36c). Im Gegensatz zu den beiden anderen Aminosäuren wiesen Sproß und Wurzel vergleichbare Konzentrationen auf. Bei Mangelernährung sanken die Spiegel in Sproß und Wurzel sehr stark ab, die Ornithinkonzentrationen nahmen jedoch im Vergleich zu den anderen Bedingungen nicht so dramatisch ab wie bei Arginin und Citrullin. Auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigte keinen starken Abfall im Vergleich zur Gln-haltigen Bedingung mit 10 mM Nitrat. Die Synthese von Ornithin wurde durch die Abwesenheit von Gln nicht so stark beeinflusst wie die Synthese von Arginin und Citrullin. Bei den beiden Bedingungen ohne Gln ergab sich ein leichtes Ansteigen der Ornithinkonzentration mit zunehmender Nitratversorgung in beiden Geweben.

### 3.3.1.9 Aminosäuren, die sich von Aspartat ableiten

Lysin zeigte mit ansteigender Nitratversorgung und Gln im Medium einen Gehaltsabfall in beiden Geweben (Abb. 3/37a). Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) lag in ihren Konzentrationen nur minimal unter denen der anderen Nitratangebote.

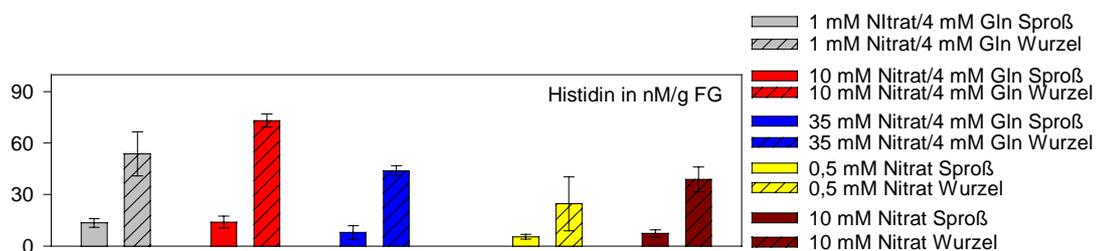


**Abbildung 3/37:** der Graph zeigt die Konzentration von Lysin, Methionin und Threonin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C., die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4 -5).

Wie an der 10 mM-Bedingung ohne Gln zu erkennen ist, hatte die Ab- oder Anwesenheit von Gln keinen Einfluß auf den Lysinspiegel. Die Wurzel wies unter allen Bedingungen die höhere Lysinkonzentration auf. Methionin zeigte keine spezifische Abhängigkeit von der externen Nitratversorgung, sofern Gln zusätzlich vorhanden war (Abb. 3/37b). Auch die Gewebeverteilung war uneinheitlich. Bei 0,5 mM Nitrat sanken die Konzentrationen in Sproß und Wurzel etwas ab im Vergleich zu den anderen Bedingungen. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln kam es in der Wurzel zu einem Anstieg der Methioninkonzentration gegenüber der 10 mM-Nitrat-Bedingung mit Gln, der Sproß verhielt sich indifferent. Bei Abwesenheit von Gln stieg die Methioninkonzentration mit steigender externer Nitratkonzentration an, dies trat besonders deutlich in der Wurzel auf. Threonin zeigte in der Hauptversuchsreihe keine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot (Abb. 3/37c). Die Wurzel wies ungefähr doppelt so hohe Konzentrationen an Threonin wie der Sproß auf, unabhängig vom Nitratangebot und vom Alter der Pflanzen. Bei Mangelernährung sanken die Spiegel beider Gewebe deutlich ab. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wies im Vergleich zur 10 mM Nitrat-Bedingung mit Gln eine Abnahme an Threonin nur in der Wurzel auf. Wie bei Methionin zeigte sich bei reiner Nitratversorgung ein Ansteigen des Threoninspiegels in beiden Geweben mit zunehmender Nitratversorgung.

### 3.3.1.10 Histidin

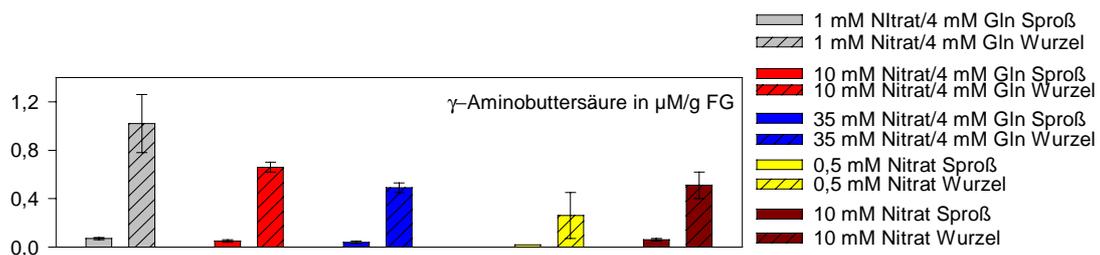
Histidin reagierte bei der Kombination Nitrat und Gln kaum auf die steigenden Nitratkonzentrationen (Abb. 3/38). Bei Mangelernährung sank der Wurzelspiegel im Vergleich zu den anderen Bedingungen ab, der Sproß reagierte nicht. Auch bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln nahm die Wurzelkonzentration ab im Vergleich zur Gln-haltigen Bedingung. Bei allen Bedingungen lag der Hauptanteil an Histidin in der Wurzel.



**Abbildung 3/38:** der Graph zeigt die Konzentration von Histidin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4 - 5).

### 3.3.1.11 $\gamma$ -Aminobuttersäure

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) reagierte mit steigender externer Nitratversorgung in Gegenwart von Gln mit einem Konzentrationsabfall in der Wurzel, der Sproß reagiert kaum (Abb. 3/39). Unter Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nahm die Konzentration in beiden Geweben ab im Vergleich zu den anderen Bedingungen. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wies die gleichen GABA-Konzentrationen wie mit Gln auf, die Synthese wird also nicht durch die An- oder Abwesenheit von Gln beeinflusst.



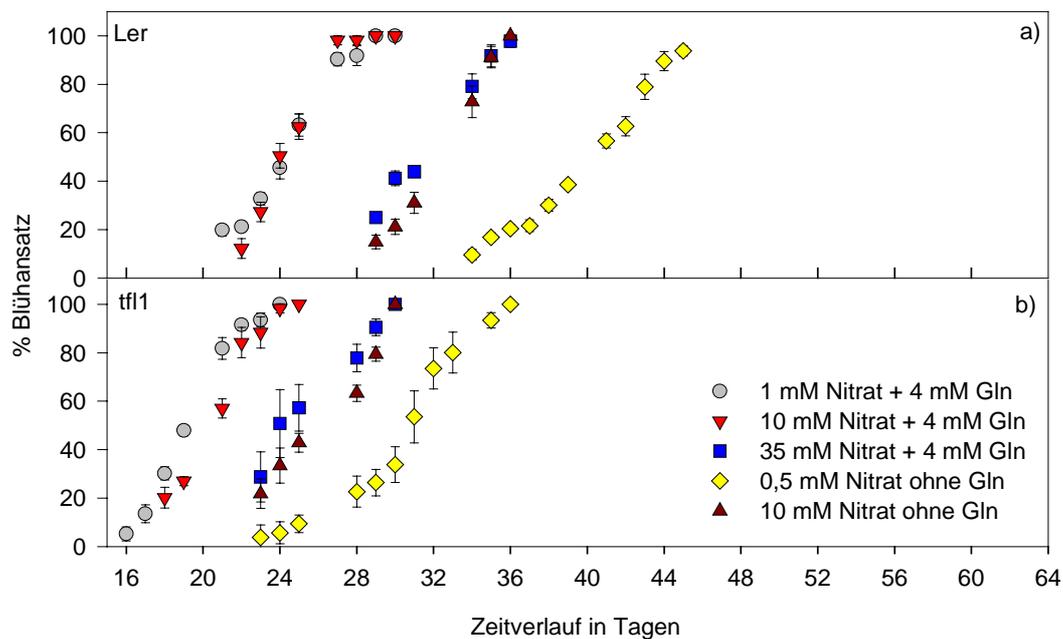
**Abbildung 3/39:** der Graph zeigt die Konzentration von  $\gamma$ -Aminobuttersäure der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E/m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4 - 5$ ).

Ohne Gln ergab sich eine leichte Zunahme an GABA in beiden Geweben, wenn die externen Nitratkonzentrationen anstiegen. In der Wurzel war die Konzentration immer höher als im Sproß.

### 3.2.2 *tfl1= terminal flower 1*

Bei den nachfolgenden Graphen – dies gilt für alle Mutanten – werden die Daten vom Wildtyp *Landsberg erecta* den Daten der jeweiligen Mutante gegenübergestellt. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Datensätze.

Bei *tfl* handelt es sich um ein Genprodukt, das indirekt die Aktivität eines Inhibitors der Blühprimordia-Induktion beeinflusst, indem es ihn stabilisiert. (Alvarez et al.1992). Fehlt TFL, so wird der Repressor schneller abgebaut, die reproduktive Phase beginnt vorzeitig. Das Genprodukt zeigt Ähnlichkeit zu einem tierischem Phosphatidylethanolamin-bindenden Protein. bzw. andere Proteine, die wahrscheinlich mit Lipiden und GTP-bindenden Proteinen assoziieren (Ohshima et al. (1997)). Die mutante wird im nachfolgenden Text nur als *tfl* bezeichnet.



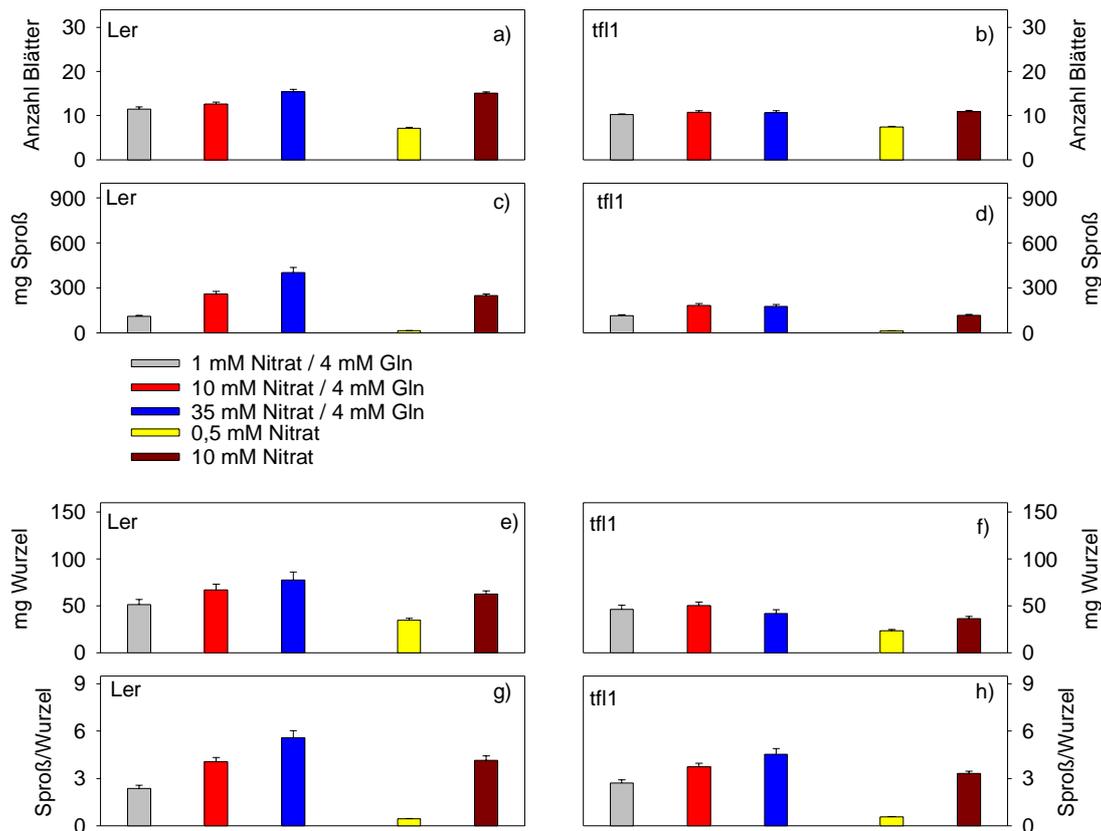
**Abbildung 3/40:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* und der Blühmutante *tfl-2* unter verschiedenen Nitratangeboten Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ). Die Anzuchttemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h.

Beim Vergleich von Mutante und Wildtyp ergab sich, daß die Blühverlaufskurven bei *tfl* (Abb. 3/40b) in allen Bedingungen etwas früher starteten als bei *Ler* (Abb. 3/40a), die Anordnung war aber dieselbe. Die vegetative Phase war verkürzt, sodaß auch die Werte für Blattzahl (Abb. 3/41b), die Biomassen für Sproß und Wurzel (Abb. 3/41d+f) sowie das

Sproß/Wurzel-Verhältnis (Abb. 3/41h) niedriger ausfielen als bei Ler (Abb. 3741a/c/e/g). Vor allem zeigten sich bei *tfl* in der Hauptversuchsreihe nicht die deutlichen Zunahmen in Blattzahl, Sproß- und Wurzelbiomasse bis zur Blühinduktion, die sich bei Ler mit ansteigender Nitratversorgung (in der Gegenwart von Gln) ergaben. Vielmehr zeigten sich für die jeweiligen Parameter in der Hauptversuchsreihe sehr ähnliche Werte, obwohl die Blühverlaufskurven deutlich voneinander abgesetzt waren.

Tabelle 3/2 zeigt die Zahlenwerte zur Abbildung 3/41 für Ler und *tfl* für Blattzahl, Sproß- und Wurzelbiomasse und Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl*-2 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bedingung	Ler			
	Blatt	Sproß	Wurzel	Sp/Wu
1 mM Nitrat/ 4 mM Gln	11,47 ± 0,51	110,13 ± 7,48	51,33 ± 5,54	2,36 ± 0,21
10 mM Nitrat/ 4 mM Gln	12,67 ± 0,37	259,13 ± 17,5	66,93 ± 5,97	4,07 ± 0,26
35 mM Nitrat/ 4 mM In	15,36 ± 0,6	402,43 ± 35,28	77,64 ± 8,3	5,58 ± 0,45
0,5 mM Nitrat	7,1 ± 0,23	14,4 ± 0,63	34,55 ± 2,11	0,44 ± 0,02
10 mM Nitrat	15,07 ± 0,29	248,67 ± 10,72	62,33 ± 3,78	4,16 ± 0,28
Bedingung	<i>tfl</i>			
	Blatt	Sproß	Wurzel	Sp/Wu
1 mM Nitrat/ 4 mM Gln	10,2 ± 0,21	115,67 ± 4,94	46,33 ± 4,26	2,71 ± 0,2
10 mM Nitrat/ 4 mM Gln	10,73 ± 0,34	182,93 ± 12,87	50,13 ± 3,79	3,74 ± 0,23
35 mM Nitrat/ 4 mM Gln	10,67 ± 0,46	176,47 ± 11,99	41,73 ± 4,2	4,52 ± 0,37
0,5 mM Nitrat	7,4 ± 0,19	13,1 ± 0,6	23,55 ± 1,06	0,56 ± 0,02
10 mM Nitrat	10,87 ± 0,33	117,33 ± 6,22	36,13 ± 2,52	3,32 ± 0,14



**Abbildung 3/41:** der Graph zeigt die Blattanzahl, Biomassen und Sproß/Wurzel-Verhältnisse der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl-2* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

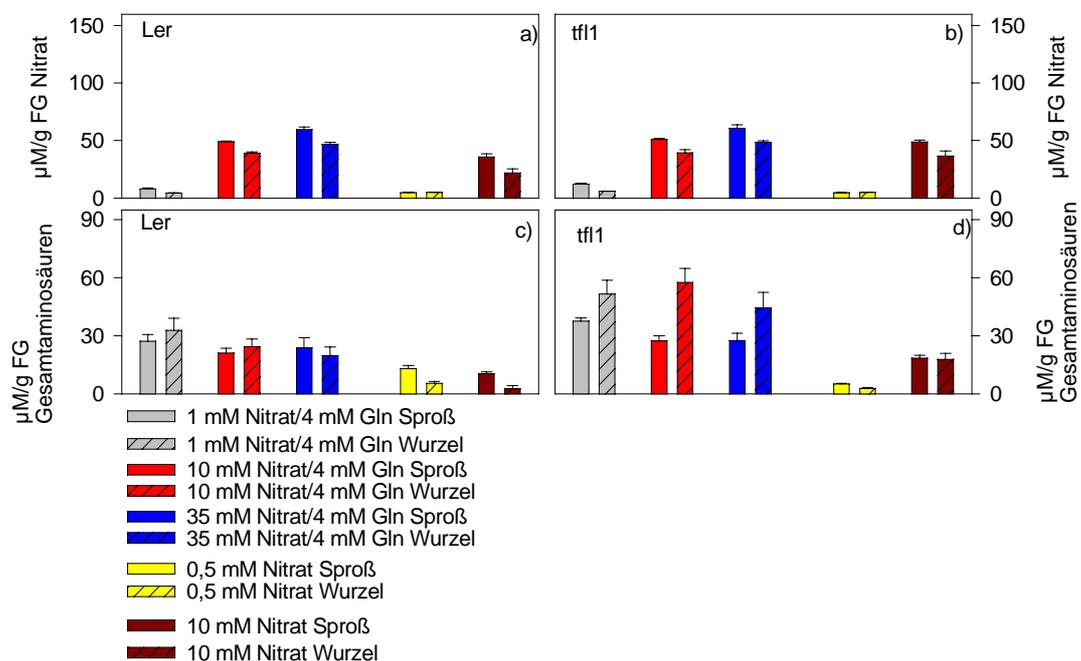
Das Sproß/Wurzel-Verhältnis nahm bei der Mutante hingegen in der Hauptversuchsreihe mit ansteigender Nitratkonzentration noch deutlich zu (Abb. 3/41h). In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigten sich kaum Unterschiede in Bezug auf Blattzahl, Biomassen und Sproß/Wurzel-Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutante, bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln hingegen wies *tfl* niedrigere Werte als Ler auf, wobei zu beachten ist, daß die Pflanzen auch zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt geerntet worden sind (siehe Legende). Wie der Wildtyp reagierte *tfl* mit einer Verzögerung der Blühinduktion bei ansteigender Nitratversorgung in Gegenwart von Gln, die Verzögerung war jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt, vor allem, wenn die Blühinduktion in Relation zu Blattzahl oder Sproßgewicht gesetzt wird. Auf der anderen Seite blieb der Anstieg des Sproß/Wurzel-Verhältnisses mit zunehmender externer Nitratversorgung erhalten. Auch in den Bedingungen, die nur Nitrat

enthalten, trat bei der Mutante ein schwächerer Effekt als bei Ler ein, dies traf besonders bei der Blattanzahl zu.

### Fazit:

*tfl* führt, wie bereits bekannt, zu verfrühtem Blühen und überwindet damit teilweise die hemmende Wirkung von Nitrat auf die Blühinduktion.

Beim internen Nitrat Spiegel traten keine Unterschiede zwischen der Mutante (Abb. 3/42b) und Ler (Abb. 3/42a) auf. Bei den Gesamtaminosäuren hingegen wies *tfl* (Abb. 3/42d) bei den Nitratmedien, die zusätzlich Gln enthielten, höhere Werte auf als der Wildtyp (Abb. 3/42c).



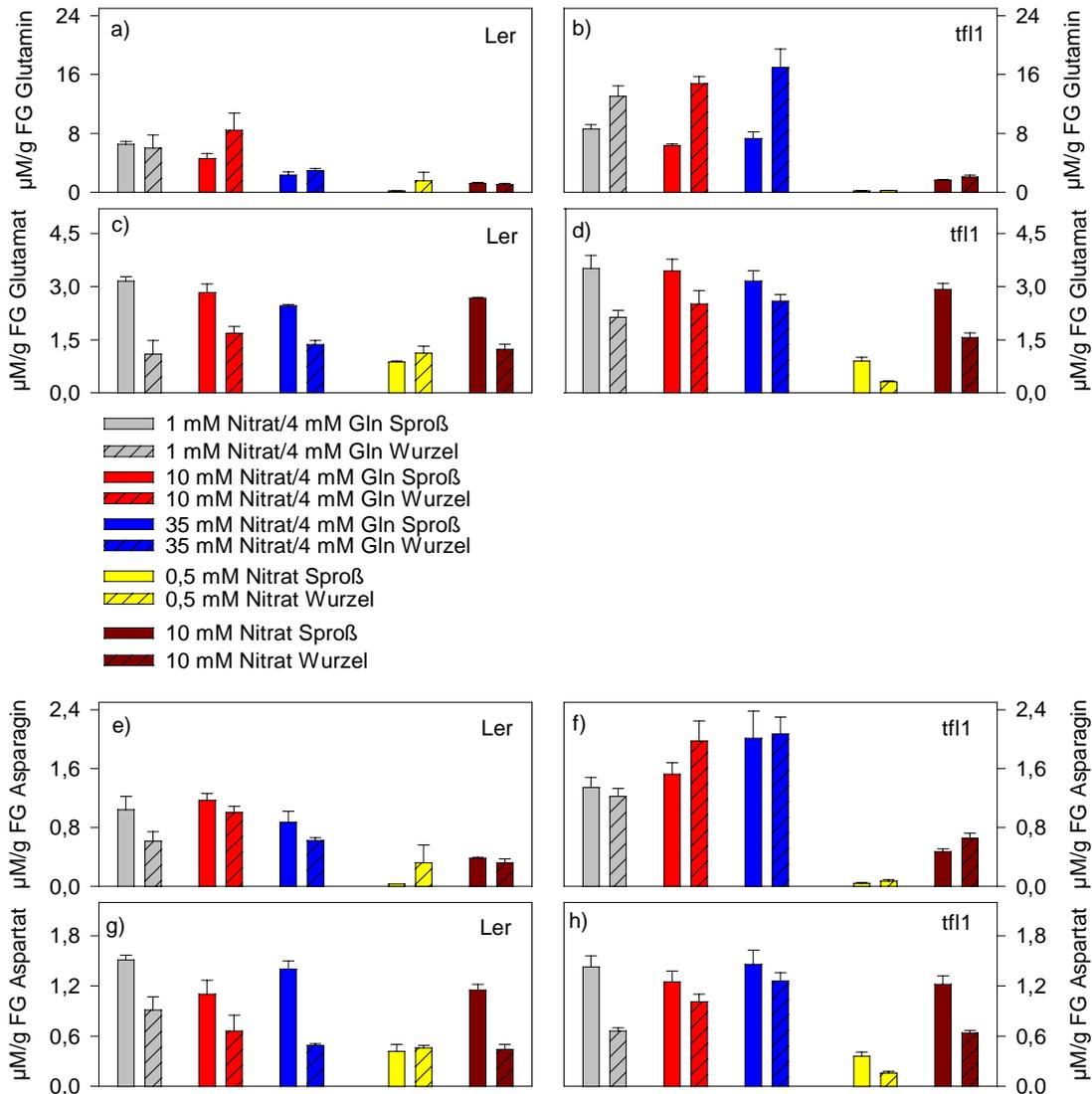
**Abbildung 3/42:** der Graph zeigt die Konzentrationen an Nitrat und Gesamtaminosäuren der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei tfl-2 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Allerdings waren die Pflanzen auch jünger, als sie geerntet wurden, sodaß dieser Effekt auch auf einen geringeren Verbrauch der Gesamtaminosäuren zum Zeitpunkt der Ernte zurückzuführen ist. Dies traf für beide Gewebe zu, war im Wurzelgewebe aber besonders deutlich ausgeprägt. Bei Mangelernährung sanken die Konzentrationen in der Mutante im Vergleich zu Ler leicht ab, wobei die Verteilung auf die Gewebe davon unberührt blieb. Auch in der 10 mM-Bedingung ohne Gln nahmen die Konzentrationen der Mutante gegenüber den Werten in der 10 mM-Bedingung ohne Gln beim Wildtyp zu, Sproß und Wurzel wiesen bei der Mutante gleich hohe Spiegel auf.

Beim Malatspiegel zeigte sich kein Einfluß der Mutation auf das Verhalten gegenüber den externen Nitratkonzentrationen, lediglich bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln zeigte die Mutante in beiden Geweben ca. 70 % der Wildtypkonzentrationen (Daten nicht gezeigt).

Die löslichen Zucker und Stärke reagierten bei der Mutante nicht anders als der dazugehörige Wildtyp, eine Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch die Mutation trat nicht ein (Daten nicht gezeigt).

Der Anstieg der Gesamtaminosäuren beruhte hauptsächlich auf einen Anstieg der Aminosäuren wie Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat in der Mutante. Bei Glutamat und Glutamin lagen in der Mutante (Abb. 3/43d,b) in Gegenwart von Glutamin im Nährmedium sowohl Sproß als auch Wurzelkonzentration der jeweiligen Aminosäure höher im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3/43a,c). Vor allem Glutamin zeigte bei hoher Nitratkonzentration (35 mM Nitrat), zusammen mit Gln angeboten, keine Abnahme wie im Wildtyp, sondern stieg im Gegenteil im Vergleich zu den anderen beiden Bedingungen, die Glutamin enthielten, noch an. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigten keine veränderten Aminosäurekonzentrationen als Folge einer Einwirkung der Mutation auf die Aminosäuresynthese. Die Mutante reagierte also bei Anwesenheit von Gln als zusätzliche N-Quelle mit erhöhten Aminosäurespiegeln. Glutamin wies in beiden Geweben erhöhte Spiegel auf, Glutamat, Asparagin und Aspartat zeigten vor allem erhöhte Wurzelkonzentrationen.

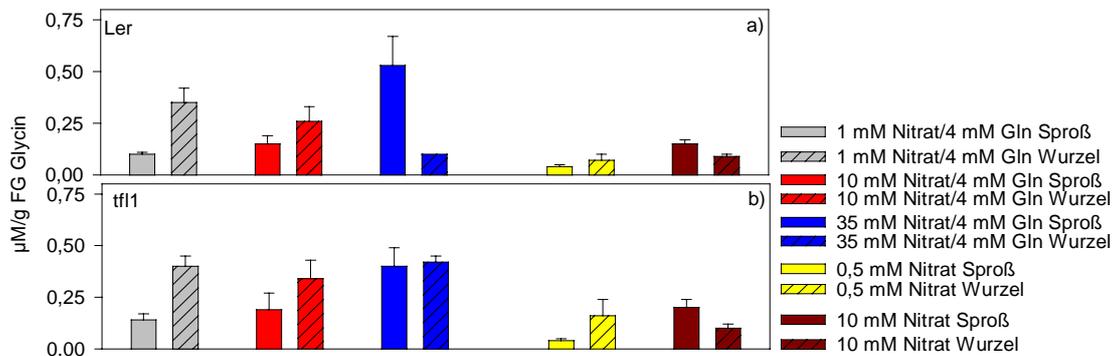


**Abbildung 3/43:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei tfl-2 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4 - 5).

Dies war ein Effekt der Glutaminbeigabe, da sich bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln keine Veränderung im Vergleich zur entsprechenden Bedingung mit Gln ergaben. Bei Glutamin war der Konzentrationsanstieg in der Wurzel wohl auch auf die Glutaminfütterung selbst zurückzuführen. Bei Asparagin stiegen sowohl die Sproß- als auch die Wurzelkonzentrationen der Mutante in den Medien mit einer Kombination aus Nitrat und Gln an (Abb. 3/43f). Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierten in der Mutante kaum anders als im Wildtyp (Abb. 3/43e). Bei Aspartat kam es hauptsächlich zu einem Konzentrationsanstieg in der Wurzel, wenn die Medien zusätzlich

noch Gln enthielten (Abb. 3/43h), die Bedingungen ohne Gln reagierten bei *tfl* nicht anders als beim Wildtyp (Abb. 3/43g).

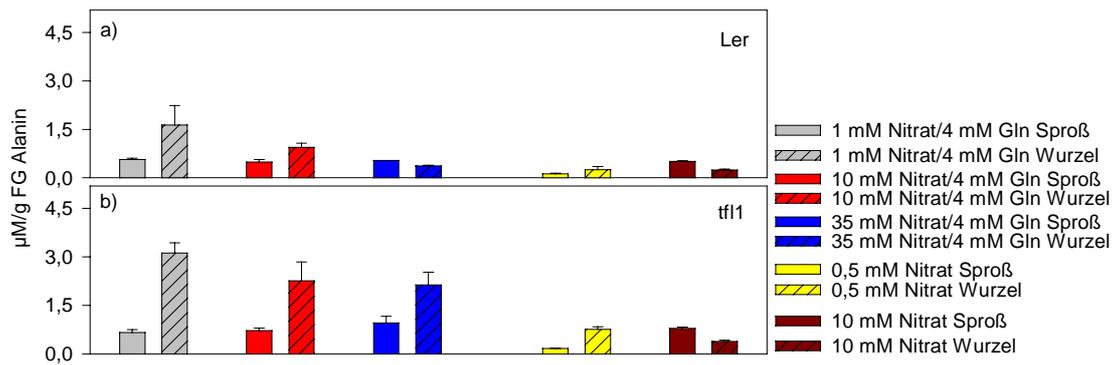
Bei den Aminosäuren aus der Photorespiration trat keine Veränderung der Nitratantwort durch die Mutation ein, die Spiegel entsprachen denen des Wildtyp. Lediglich Glycin nahm im Vergleich zum Wildtyp bei überoptimaler Nitratversorgung in Gegenwart von Gln im Sproß zu und in der Wurzel von *tfl* ab, die Konzentrationen von Sproß und Wurzel waren ansonsten gleich (Abb. 3/44b). Dies betraf sowohl die Bedingungen aus der Hauptversuchsreihe – aufsteigende Nitratkonzentrationen + Gln – sowie Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) als auch 10 mM-Bedingung ohne Gln. Serin zeigte in der Mutante keine Veränderung im Vergleich zu Ler (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3/44:** der Graph zeigt die Konzentration von Glycin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl-2* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4 - 5).

Bei den aromatischen Aminosäuren trat ebenfalls keine Beeinflussung der Nitratantwort durch die Mutation ein, lediglich Phenylalanin zeigte eine Erhöhung des Aminosäurespiegels um ca. 30 % bei allen fünf Bedingungen im Sproß (Daten nicht gezeigt).

Alanin nahm gerade in der Wurzel bei externer Nitratversorgung zusammen mit Glutamin sehr deutlich bei *tfl* (Abb. 3/45b) im Vergleich zu Ler (Abb. 3/45a) zu, wie bei den anderen N-haltigen Aminosäuren war dies auch auf die Glutaminfütterung selbst zurückzuführen. Auch bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) reagierte die Mutante kaum anders als der Wildtyp. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wies keine erhöhten Spiegel auf.



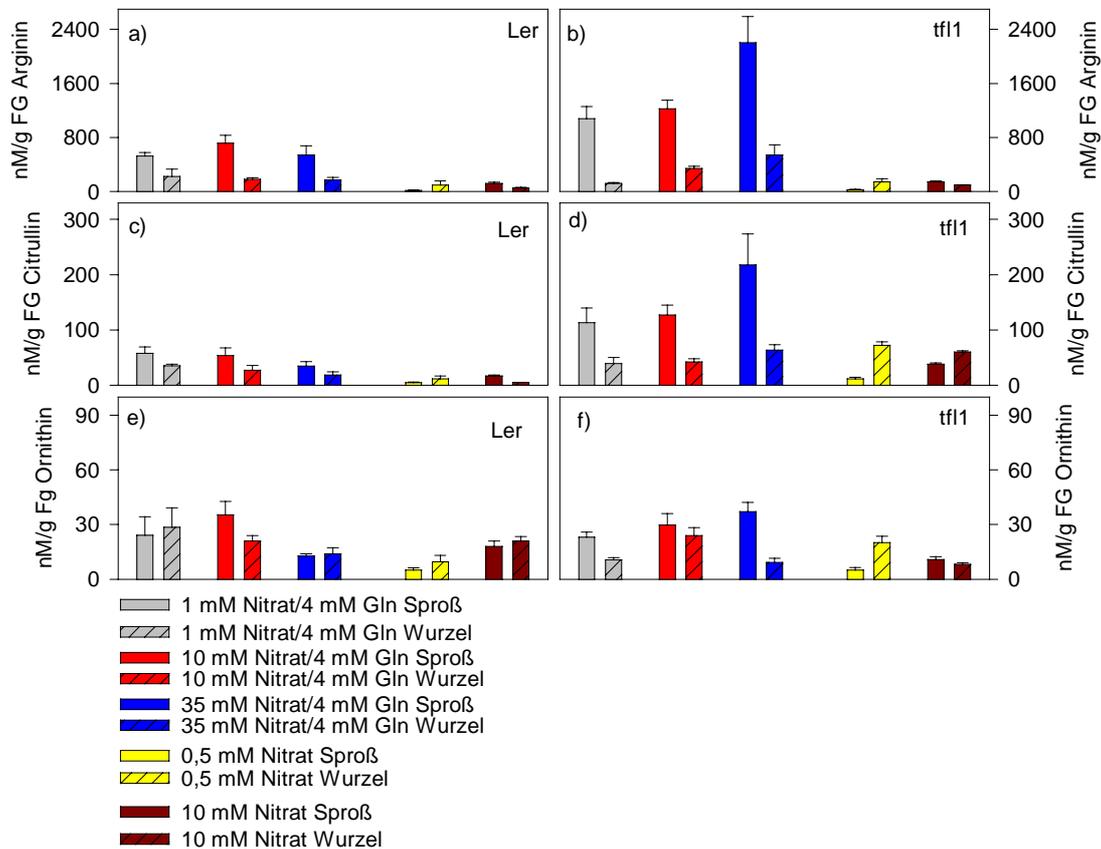
**Abbildung 3/45:** der Graph zeigt die Konzentration von Alanin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl-2* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4 - 5).

Die aliphatischen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin reagierten nur mit einem leichten Konzentrationsanstieg von ca. 30 % in den Wurzeln und zwar bei allen angebotenen Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

Bei den Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus zeigte sich kein einheitliches Bild. Arginin und Citrullin nahmen, wenn das Medium Glutamin enthielt, in der Mutante stark zu (Abb. 3/46b,d) und zeigten dabei auch eine leichte Korrelation zum extern ansteigenden Nitratangebot. Bei Arginin zeigte sich dies hauptsächlich im Sproß und gering ausgeprägt auch in der Wurzel, bei Citrullin nur im Sproß. Ornithin reagierte bei *tfl* in der Hauptversuchreihe, die neben Nitrat auch Gln enthielt (Abb. 3/46f), nur bei überoptimaler Konzentration mit einer Verschiebung der Gewebeanteile im Vergleich zu Ler. Bei Ler waren die Konzentrationen beide im gleichen niedrigen Bereich (Abb. 3/46e), bei der Mutante wies der Sproß höhere und die Wurzel niedrigere Konzentrationen als Ler auf.

Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) reagierten Citrullin und Ornithin mit einer leichten Konzentrationszunahme in der Wurzel bei *tfl* (Abb. 3/46d,f) gegenüber Ler (Abb. 3/46c,e). Trotz Nitratmangel war die Synthese dieser Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp in *tfl* gesteigert. Citrullin reagierte auch in der 10 mM-Bedingung ohne Gln mit einem leichten Konzentrationsanstieg in beiden Geweben im Vergleich zum Wildtyp, die anderen beiden Aminosäuren zeigten keine Veränderung im Vergleich zu Ler in der 10 mM-Bedingung ohne Gln. Im Vergleich zwischen 10 mM-Bedingung ohne Gln und entsprechender Bedingung mit Gln lagen alle drei Aminosäuren jedoch in der 10 mM-Bedingung ohne Gln niedriger, dies bedeutet, daß Gln verstoffwechselt wurde und unter anderem auch die Aminosäuresynthese

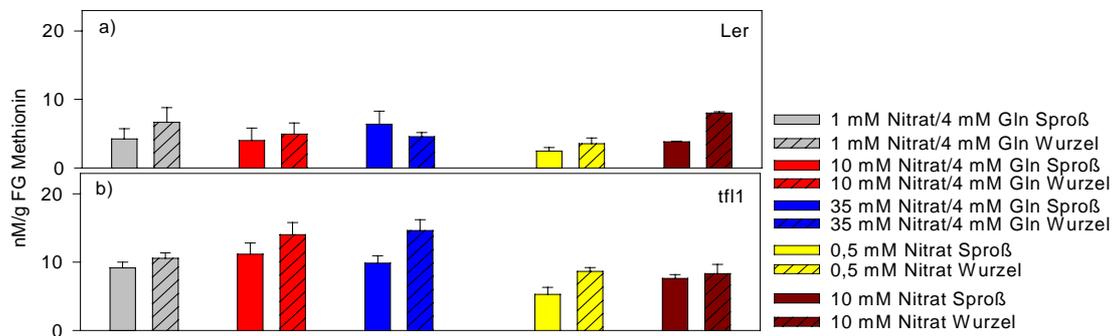
gefördert hat. Für Ornithin ergab sich in den beiden Bedingungen ohne Gln eine Konzentrationssteigerung im Vergleich zum Wildtyp, aber wie bei Ler trat keine Korrelation der Ornithinspiegel zur externen Nitratversorgung auf.



**Abbildung 3/46:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Arginin, Citrullin und Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tf1-2* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4 - 5$ ).

Die von Aspartat abstammenden Aminosäuren Lysin, Methionin und Threonin nahmen wie auch Aspartat leicht zu. (Daten zu Lysin und Threonin nicht gezeigt) Alle drei Aminosäuren reagierten in der Hauptversuchsreihe mit der Kombination Nitrat und Gln bei der Mutante mit einem leichten Anstieg der Konzentrationen in der Wurzel, Methionin zudem auch im Sproß (Abb. 3/47b) im Vergleich zu Ler. Lysin nahm um um ca 30 % in der Mutantenwurzel zu, Threonin um ca. 20 % gegenüber dem Wildtyp. Wie der Wildtyp ergab sich bei der Mutante aber auch kein Zusammenhang zwischen externem Nitratangebot und Aminosäurekonzentration, sofern Gln ebenfalls im Medium vorlag. Lysin und Threonin

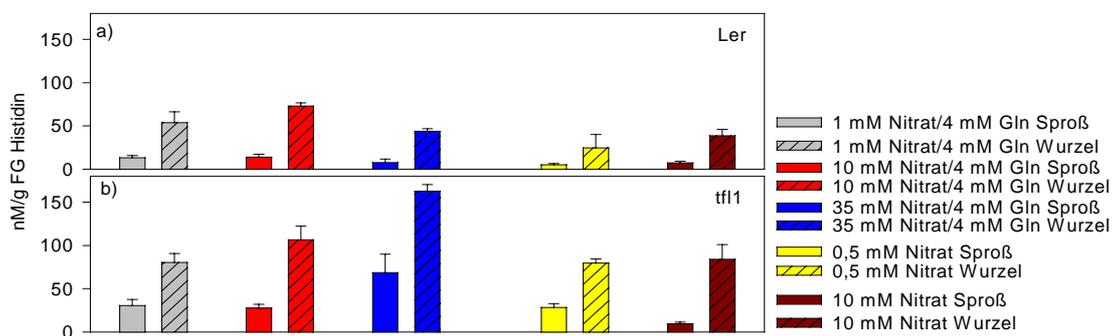
reagierten bei *tfl* unter Mangelernährung nicht anders als beim Wildtyp, während Methionin im Vergleich zu Ler (Abb. 3/47a) in der Mutante in beiden Geweben leicht zunahm.



**Abbildung 3/47:** der Graph zeigt die Konzentration von Methionin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl-2* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierte *tfl* bei Lysin und Threonin nicht anders als der Wildtyp, bei Methionin kam es im Spröß bei der Mutante zu einer leichten Erhöhung des Spiegels gegenüber Ler. Insgesamt stiegen die Methioninkonzentrationen bei *tfl* in den Gln-freien Bedingungen gegenüber Ler leicht an.

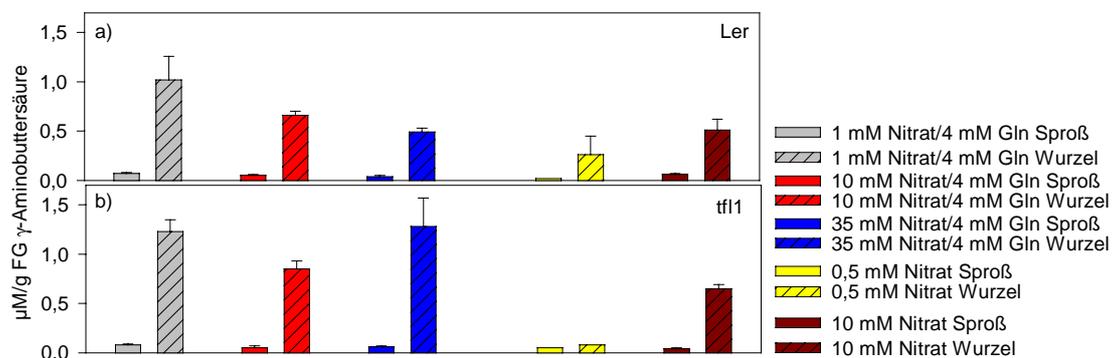
Histidin nahm bei *tfl* (Abb. 3/48b) in den Bedingungen mit Nitrat und Gln in beiden Geweben gegenüber Ler zu (Abb. 3/48a), in der Wurzel trat dabei sogar eine Korrelation zwischen ansteigenden Histidinkonzentrationen und extern angebotenen Nitratkonzentrationen auf.



**Abbildung 3/48:** der Graph zeigt die Histidinkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl-2* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nahm die Mutante in beiden Geweben im Vergleich zu Ler zu, d.h. trotz mangelnder externer N-Versorgung war die Synthese entweder verstärkt oder es kam zu einem Anstau von Hsitidin, da nachfolgende Reaktionen gestoppt waren. Auch bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigte die Mutante erhöhte Werte im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch lagen die Werte für beide Gewebe bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln unter den Werten der Bedingung 10 mM Nitrat + 4 mM Gln, dies entsprach der Wildtyp-Verteilung. Bei allen Bedingungen wurde die grundsätzliche Verteilung zwischen den Geweben nicht verändert, *tfl* und Ler wiesen in der Wurzel die höhere Konzentration auf.

GABA =  $\gamma$ -Aminobuttersäure reagierte bei *tfl* (Abb. 3/49b) nur im Wurzelgewebe anders als der Wildtyp (Abb. 3/49a). In der Hauptversuchsreihe zeigte sich nicht wie bei Ler eine Abhängigkeit vom Nitratangebot. Bei Mangelernährung ergab sich kein Unterschied im Vergleich Wildtyp – Mutante, auch die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln ergab keine Unterschiede. Sowohl für Wildtyp als auch für Mutante ergab sich bei Gln-Abwesenheit ein Anstieg der  $\gamma$ -Aminobuttersäurekonzentration mit zunehmender Nitratversorgung.



**Abbildung 3/49:** der Graph zeigt die Konzentration von  $\gamma$ -Aminobuttersäure der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *tfl*-2 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 22 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 23 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 24 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 32 Tage und bei 10 mM Nitrat 25 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

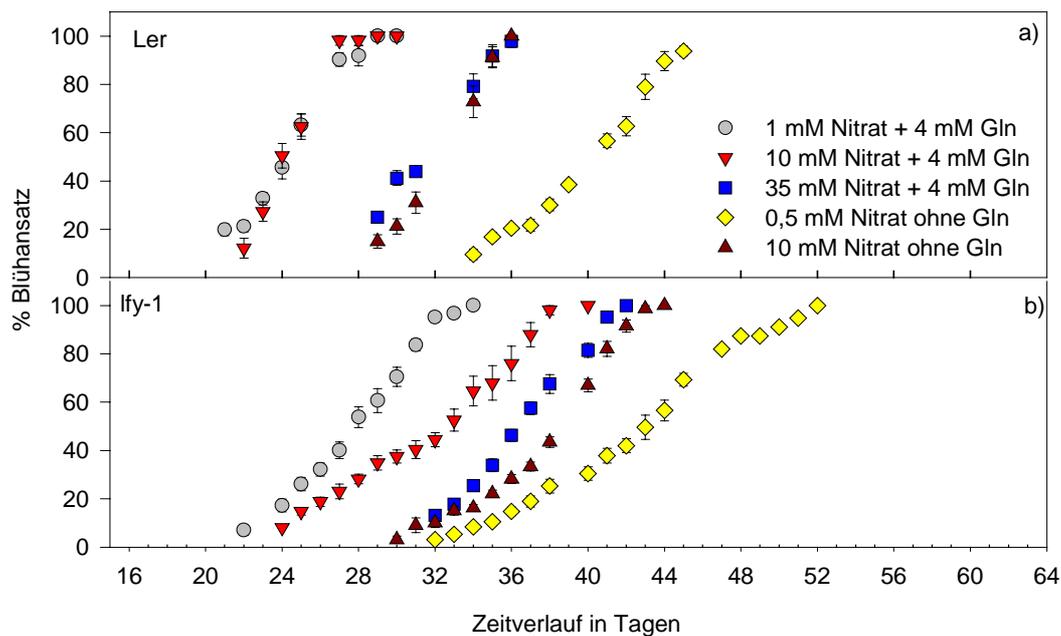
**Fazit zu *tfl1*:**

- (i) Tfl1 reagiert im Gegensatz zu Ler schwächer auf die Hemmung der Blühinduktion durch ansteigende Nitratkonzentrationen. Die Hemmung ist jedoch vorhanden und zeigt sich vor allem in den Behandlungen, die nur Nitrat als N-Quelle beinhalten
- (ii) Die Abschwächung der Hemmung der Blühinduktion durch ansteigende externe Nitratversorgung beruht nicht auf veränderte Reaktion des internen Nitratgehalts
- (iii) Die Kohlenhydrate zeigen in der Mutante keinen veränderten Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp
- (iv) Einige Aminosäuren (jedoch nicht alle) zeigen erhöhte Spiegel in der Mutante gegenüber dem Wildtyp

Insgesamt zeigen die Metabolitenmessungen, das die Abschwächung des Nitrateffektes auf die Blühinduktion nicht auf Veränderungen des internen Nitratgehaltes oder der Aminosäuren beruht. Sie weisen jedoch darauf hin, daß das TFL1-Produkt erforderlich, aber wahrscheinlich nicht essentiell für die Nitratantwort ist.

### 3.2.4. *leafy-1*

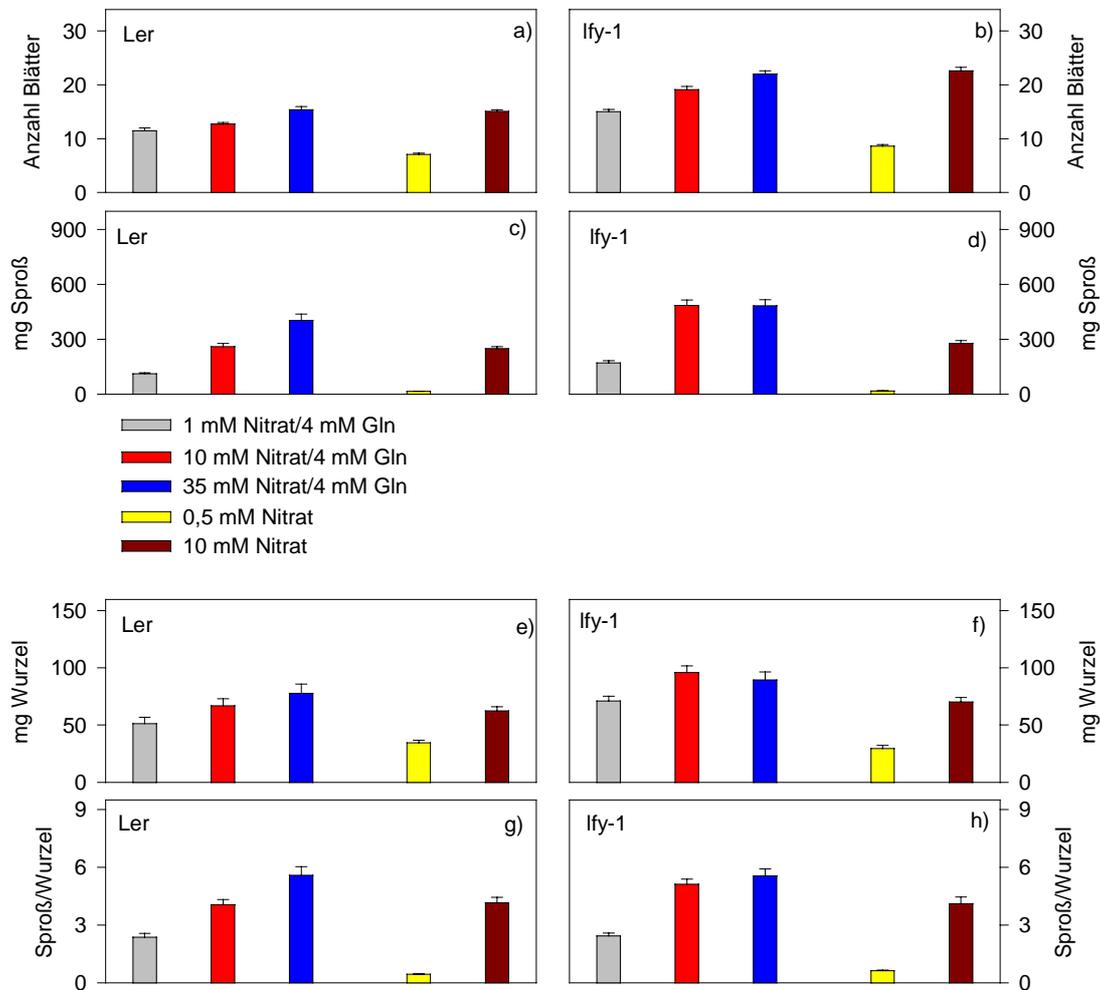
Bei *LEAFY* handelt es sich um ein „Floral meristem identity“-Gen (Gómez-Mena et al. 2001). Dieser Transkriptionsfaktor ist im sich entwickelnden Primordium notwendig bei der Promotion eines weiteren „Floral meristem identity gen“ *APETATA1* (Reeves et al. 2000). Als Resultat daraus ist die Mutante *leafy-1* eine spätblühende Mutante.



**Abbildung 3/50:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* und der Blühmutante *lfy-1* unter verschiedenen Nitratangeboten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ). Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h.

Die Blühinduktion war bei *lfy* (Abb. 3/50b) erwartungsgemäß verzögert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3/50a). Bei Ler liefen in der Hauptversuchsreihe die Kurven für 1 mM Nitrat/4 mM Gln und 10 mM Nitrat/ 4 mM Gln parallel zueinander, die Kurve für die überoptimale Nitratversorgung war zeitlich etwas versetzt. Bei *lfy* liefen alle drei Kurven separat abgesetzt voneinander, zudem begannen sie zeitlich etwas später als die Kurven zum Wildtyp. Die Kurven für die Mangelernährung starteten bei Ler und *lfy* zur gleichen Zeit, bei der Mutante zeigte sich jedoch ein zeitlich verlängerter Ablauf der Blühinduktion. Auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln blühte bei der Mutante wie beim Wildtyp etwas später als die entsprechende Kurve mit Gln, diese zusätzliche N-Quelle hatte auch bei der Mutante eine blühfördernde Wirkung.

Der verzögerte Blühverlauf zeigte sich auch in einer höheren Blattzahl und Biomasse, was auf eine etwas verlängerte vegetative Phase hindeutet. Die Mutante wies bei der aufsteigenden Nitratreihe mit Gln bei Blattzahl und den beiden Biomassen etwas erhöhte Werte (Abb. 3/51 b,d,f) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3/51a,c,e) auf, das Sproß/Wurzel-Verhältnis änderte sich kaum.



**Abbildung 3/51:** der Graph zeigt die Anzahl der Blätter, die beiden Biomassen für Sproß und Wurzel sowie das Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei lfy-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Sowohl Wildtyp als auch Mutante wiesen ähnliche Werte auch bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) auf, in beiden Fällen kam es also zu einer verfrühten Blüte der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat). Obwohl die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln bei der Mutante später blühte als bei Ler, zeigte *lfy* nur bei der Blattzahl einen höheren Wert in dieser Bedingung als Ler auf, die Biomassen und das Sproß/Wurzel-Verhältnis zeigten bei der Mutante keine

Veränderung. Damit war bei dieser Bedingung nicht unbedingt die vegetative Phase in *lfy* im Vergleich zu Ler verlängert, sondern die Entwicklung verlangsamt.

### **Fazit:**

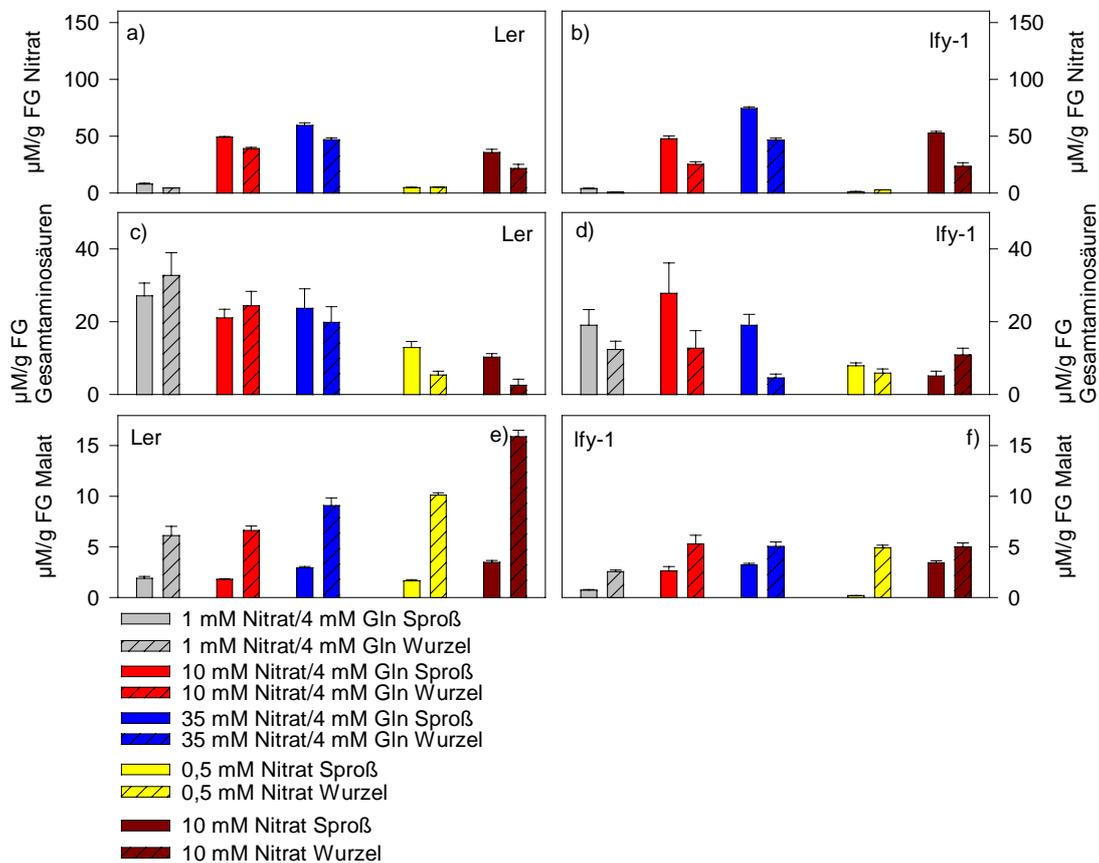
Die Blühverzögerung durch Nitrat ist bei *leafy-1* vollständig ausgeprägt, es zeigt sich, daß dies sogar stärker ausgeprägt ist als beim Wildtyp. Es sind jedoch weitere Experimente notwendig, um dies zu bestätigen.

Der interne Nitratspiegel zeigte bei der Mutante (Abb. 3/52b) bei aufsteigender Nitratreihe + Gln eine Verlagerung aus der Wurzel in den Sproß hinein, beim Wildtyp wiesen die beiden Gewebe fast gleiche Spiegel auf (Abb. 3/52a). Zudem zeigte sich bei der Mutante eine deutlichere Abhängigkeit des internen Nitratspiegels vom externen Nitratangebot als beim Wildtyp. Bei Mangelernährung waren die Mutantennitratspiegel in beiden Geweben etwas niedriger als die Wildtyp-Werte, obwohl die Pflanzen fast zum selben Zeitpunkt geerntet wurden. Die niedrigeren Nitratspiegel ergaben sich also nicht durch zeitliche Versetzung, die Mutante scheint hingegen weniger aufgenommen zu haben. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln hingegen lagen bei *lfy* die Werte im gleichen Bereich wie bei der Bedingung mit Gln (Abb. 3/52b), bei Ler lagen sie in der 10 mM-Bedingung ohne Gln etwas niedriger als in der Bedingung plus Gln (Abb. 3/52a).

Bei den Gesamtaminosäuren kam es bei den Bedingungen, die zusätzlich noch Glutamin enthielten, in der Mutante (Abb. 3/52d) vor allem im Wurzelgewebe zu einem Absinken der Konzentrationen im Vergleich zu Ler (Abb. 3/52c). Das Absinken der Gesamtaminosäuren mit zunehmender externer Nitratversorgung war bei der Mutante nicht so klar ausgeprägt wie bei Ler. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies bei *lfy* eine etwas niedrigere Sproßkonzentration auf als bei Ler, bei der Wurzel ergab sich keine Veränderung. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln drehte sich bei der Mutante die Verteilung zwischen Sproß und Wurzel zugunsten der Wurzel um, Ler wies die höhere Sproßkonzentration auf. Insgesamt ergab sich, daß sowohl bei Wildtyp als auch bei Mutante die 10 mM-Bedingung ohne Gln niedrigere Konzentrationen an Gesamtaminosäuren aufwies als die Vergleichsbedingung mit Gln.

Malat nahm sowohl bei Hauptversuchsreihe – Nitrat + Gln - als auch bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln in der Wurzel der Mutante (Abb. 3/52f)

gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3/52e) stark ab. Bei Ler ergab sich sowohl in der Hauptversuchsreihe als auch bei den beiden Bedingungen ohne Gln ein zunehmender Malatspiegel in der Wurzel mit ansteigender Nitratkonzentration, bei der Mutante hingegen zeigte sich diese Korrelation nicht.

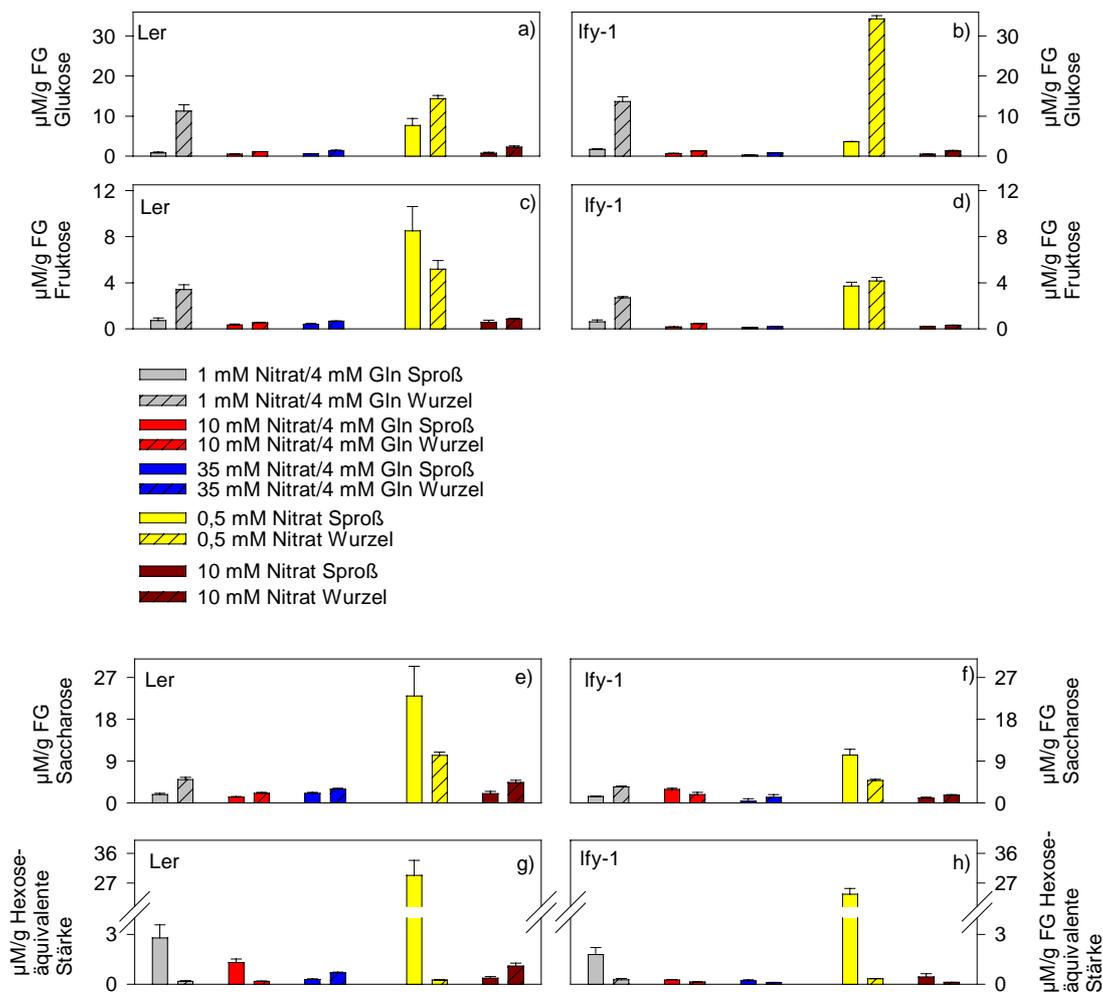


**Abbildung 3/52:** der Graph zeigt die Konzentration von Nitrat, Gesamtamino säuren und Malat der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei lfy-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Da sonst kaum Veränderungen im Malatspiegel auftraten, scheint dies ein Hinweis darauf, daß die Malatsynthese in der Mutante im Wurzelbereich verändert ist. Da aber nur die Malatspiegel und nicht entsprechende Enzymmessungen vorliegen, kann hier nicht bestimmt werden, an welchem Punkt eine Beeinflussung des Malatmetabolismus stattgefunden hat.

Bei den löslichen Zuckern und Stärke kam es der Mutante (Abb. 3/53 b,d,f,h) beim Hauptversuch zu erniedrigten Kohlenhydratkonzentrationen gegenüber Ler (Abb. 3/53a,c,e,g). Die Spiegel sanken mit ansteigender Nitratversorgung ab, bei überoptimaler Nitratversorgung

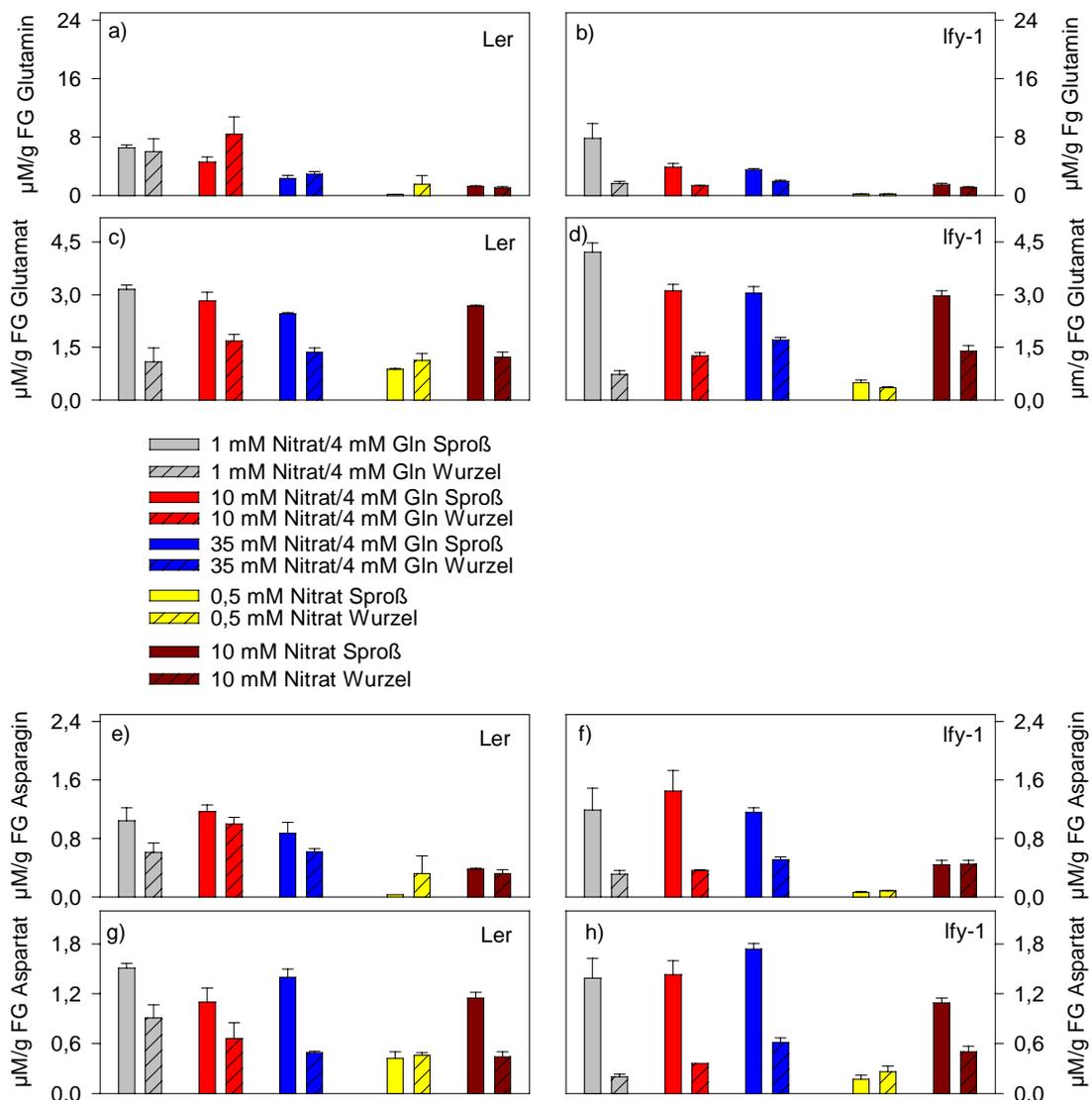
mit 35 mM Nitrat bis zu 50 %. In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies *lfy* bei Glukose eine wesentlich höhere Wurzelkonzentration als Ler auf, während Fruktose in beiden Geweben im Vergleich zum Wildtyp abnahm. Die Hexosen stiegen insgesamt damit in der Mutante an im Vergleich zu Ler. Auch Saccharose und Stärke nahmen in der Mutante in der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) etwas ab, die Verteilung auf die Gewebe blieb aber erhalten.



**Abbildung 3/53:** der Graph zeigt die Konzentration von Glukose, Fruktose, Saccharose und Stärkeder geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *lfy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln hingegen nahmen alle Zuckerspiegel bei *lfy* im Vergleich zu Ler etwas ab, lagen aber ähnlich hoch wie die entsprechende Bedingung mit Gln.

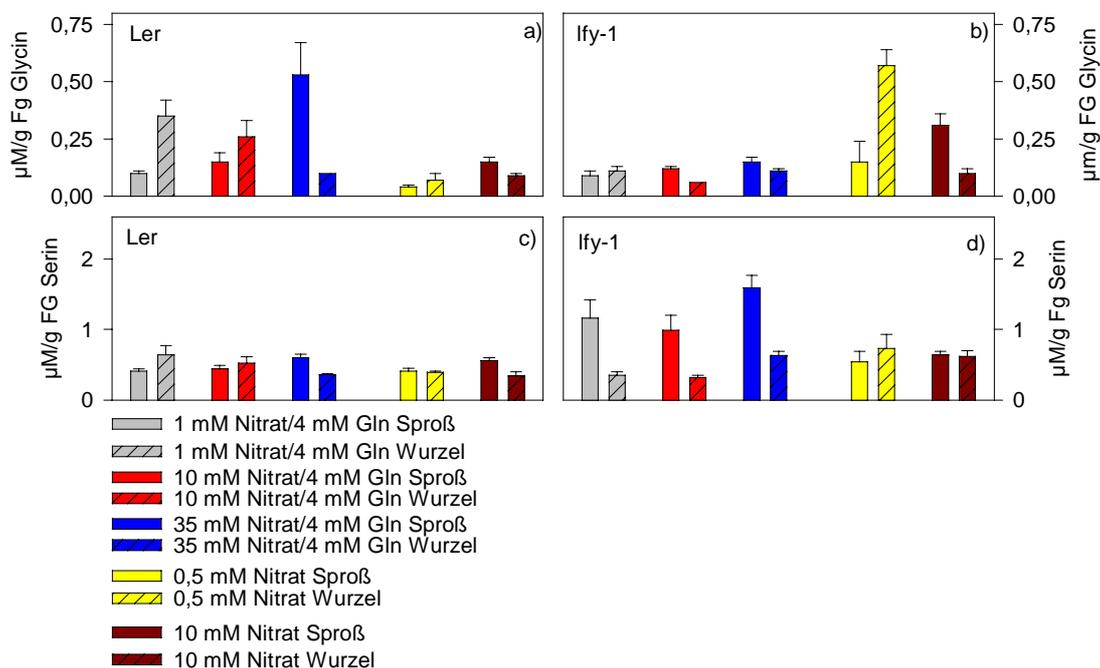
Die geringen Veränderungen der Gesamtaminosäuren bei *lfy* im Vergleich zum Wildtyp in den Bedingungen, die zusätzlich noch Gln enthielt, beruhte vor allem auf einer Abnahme der N-haltigen Aminosäuren (Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat) bei *lfy*. Glutamin sank in *lfy* bei allen drei Bedingungen unabhängig vom externen Nitratangebot auf die gleichen Konzentrationen ab (Abb. 3/54b), Glutamat nahm in der Wurzel ab, im Sproß jedoch etwas zu (Abb. 3/54d). Auch bei Asparagin und Aspartat (Abb. 3/54f,h) kam es in *lfy* zu niedrigeren Wurzelspiegeln im Vergleich zu Ler, Aspartat nahm dann in der Mutante wie Glutamat im Sproß leicht zu gegenüber Ler (Abb. 3/54g,h).



**Abbildung 3/54:** der Graph zeigt die Konzentration von Asparat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *lfy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) reagierten alle vier Aminosäuren mit einem Abfall im Wurzelgewebe der Mutante, bei Glutamat und Aspartat nahmen auch die Sproßwerte in *lfy* ab im Vergleich zum Wildtyp. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante in Bezug auf die Aminosäuren. Enthielt das Medium also Gln oder lag ein sehr niedriger Nitratspiegel vor, so reagierte die Mutante mit einer Konzentrationsabnahme der besprochenen Aminosäuren in der Wurzel, lag genügend Nitrat vor, so zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

Neben den bisher besprochenen Aminosäuren waren auch die Aminosäuren der Photorespiration beeinflusst. Glycin nahm in *lfy* (Abb. 3/55b) in den Bedingungen, die neben Nitrat auch Gln enthielten, in beiden Geweben gegenüber Ler ab (Abb. 3/55a). In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nahm bei der Mutante vor allem die Wurzelkonzentration deutlich zu im Vergleich zu Ler, aber auch die Sproßkonzentration stieg bei *lfy* etwas an. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln hingegen nahm Glycin bei der Mutante im Sproß zu im Vergleich zu Ler.

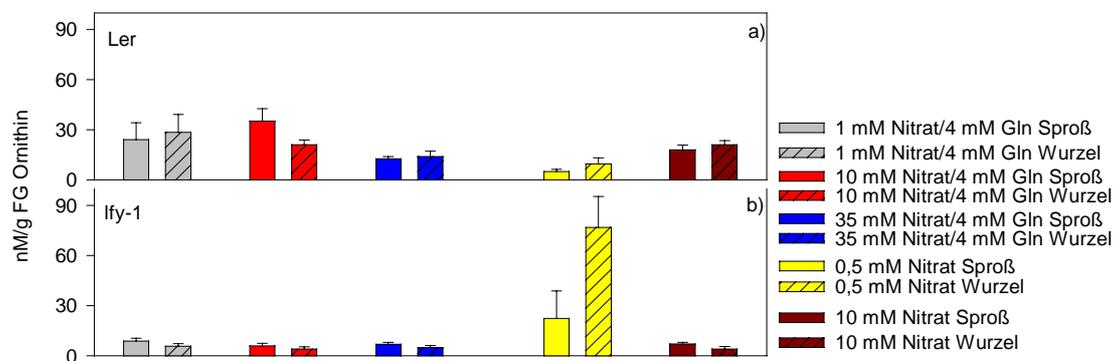


**Abbildung 3/55:** der Graph zeigt die Konzentration von Glycin und Serin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *lfy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei Serin hingegen kam es in der Mutante (Abb. 3/55d) gegenüber Ler zu einem Anstieg der Sproßkonzentrationen in den Gln-haltigen Medien, die Konzentration stieg dabei mit zunehmenden Nitratgehalt an. Im Wurzelgewebe der jeweiligen Bedingungen trat keine Veränderung bei *lfy* gegenüber Ler (Abb. 3/55c) ein. In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) lagen in der Mutante im Vergleich zu Ler die Konzentrationen zu beiden Geweben etwas höher. Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigte bei der Mutante etwas höhere Konzentrationen im Vergleich zu Ler, damit ergab sich für die beiden Bedingungen ohne Gln in der Mutante ein Konzentrationsanstieg im Vergleich zum Wildtyp. Es ergab sich jedoch wie bei Ler keine Korrelation zum extern ansteigenden Nitratspiegel.

Die aromatischen Aminosäuren, Alanin und die Aliphaten zeigten sich bei *lfy* im Vergleich zu Ler unbeeinflusst in ihrer Antwort auf die verschiedenen Nitratbedingungen (Daten nicht gezeigt).

Bei der Mutante reagierte bei den Aminosäuren des Harnstoffzyklus nur Ornithin unterschiedlich zum Wildtyp, es kam in der Mutante (Abb. 3/56b) zu einem Absinken der Konzentrationen in den Bedingungen aus der Hauptversuchsreihe, dies betraf beide Gewebe.

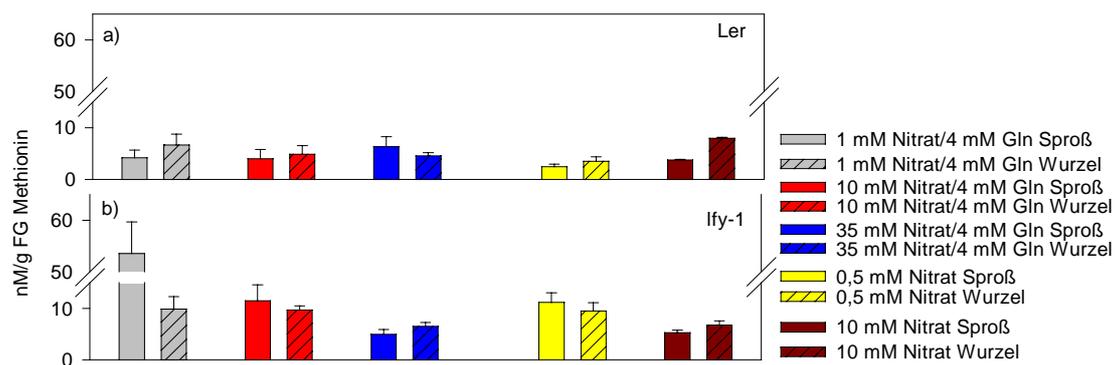


**Abbildung 3/56:** der Graph zeigt die Konzentration von Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *lfy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Jedoch ergab sich wie beim Wildtyp (Abb. 3/56a) kein Zusammenhang zwischen ansteigender Nitratkonzentration und internem Ornithinspiegel. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) hingegen bewirkte bei der Mutante eine deutliche Zunahme an Ornithin in beiden Geweben, vor allem in der Wurzel. Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln wies bei der Mutante niedrigere Spiegel als beim Wildtyp auf, lag aber vergleichbar dem Wildtyp im gleichen Bereich wie die 10 mM Nitrat Bedingung mit Gln. Ergab sich beim Wildtyp ein

Ansteigen der Ornithinkonzentration mit zunehmender Nitratkonzentration, wenn kein Gln vorlag, so zeigte sich hingegen bei der Mutante eine deutliche Abnahme an Ornithin mit höherer Nitratversorgung, wenn das Medium kein zusätzliches Gln enthielt.

Bei den Aminosäuren, die sich von Aspartat ableiten, trat bei Lysin (Daten nicht gezeigt) keine Veränderung aufgrund der Mutation ein. Methionin reagierte in der Mutante mit einem Anstieg der Konzentrationen in den Gln-haltigen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp. Auffällig ist der hohe Sproßwert in der Mutante bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln (Abb. 3/57b) im Vergleich zu Ler (Abb. 3/57a). Da sonst kein anderer Wert sich so stark verändert wie dieser, kann ein Artefakt nicht ausgeschlossen werden. Auch bei der Mangelernährung reagierte die Mutante mit einem leichten Anstieg der Methioninspiegel im Vergleich zum Wildtyp. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln führte zu keiner Veränderung, die Mutante wies hier niedrigere Spiegel als in der Vergleichsbedingung mit Gln auf.

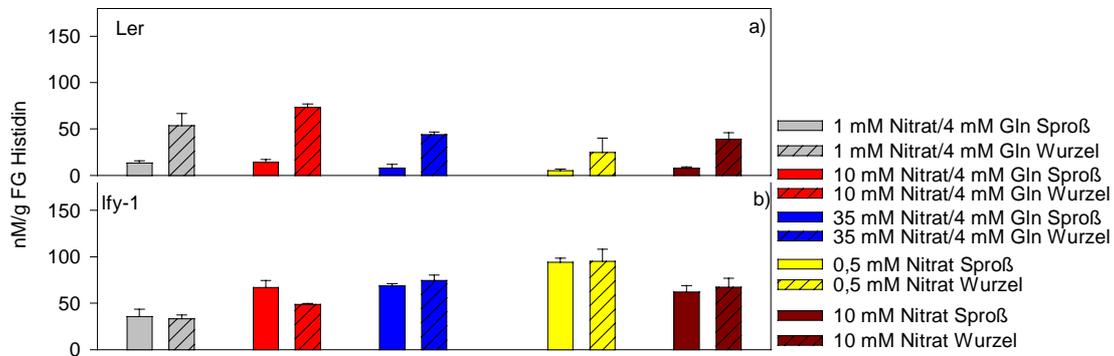


**Abbildung 3/57:** der Graph zeigt die Konzentration von Methionin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei lfy-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Threonin zeigte wie Lysin keinen Unterschied zwischen Ler und Mutante (Daten nicht gezeigt).

Histidin zeigte bei lfy eine Konzentrationszunahme im Sproß unter allen Bedingungen in der Hauptversuchsreihe (Nitrat + Gln) (Abb. 3/58b) gegenüber Ler. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) bewirkte in der Mutante eine deutliche Konzentrationssteigerung in beiden Geweben. Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln wies bei lfy höhere Spiegel als bei Ler auf. Im Gegensatz zu Ler wies die Mutante kaum einen Unterschied zwischen 10 mM Nitrat + Gln

und 10 mM Nitrat ohne Gln auf. Beim Vergleich der beiden Bedingungen ohne Gln ergab sich bei der Mutante eine leichte Abnahme der Histidinkonzentration mit steigender Nitratversorgung im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 3/58a).



**Abbildung 3/58:** der Graph zeigt die Konzentration von Histidin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei lfy-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 38 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 42 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

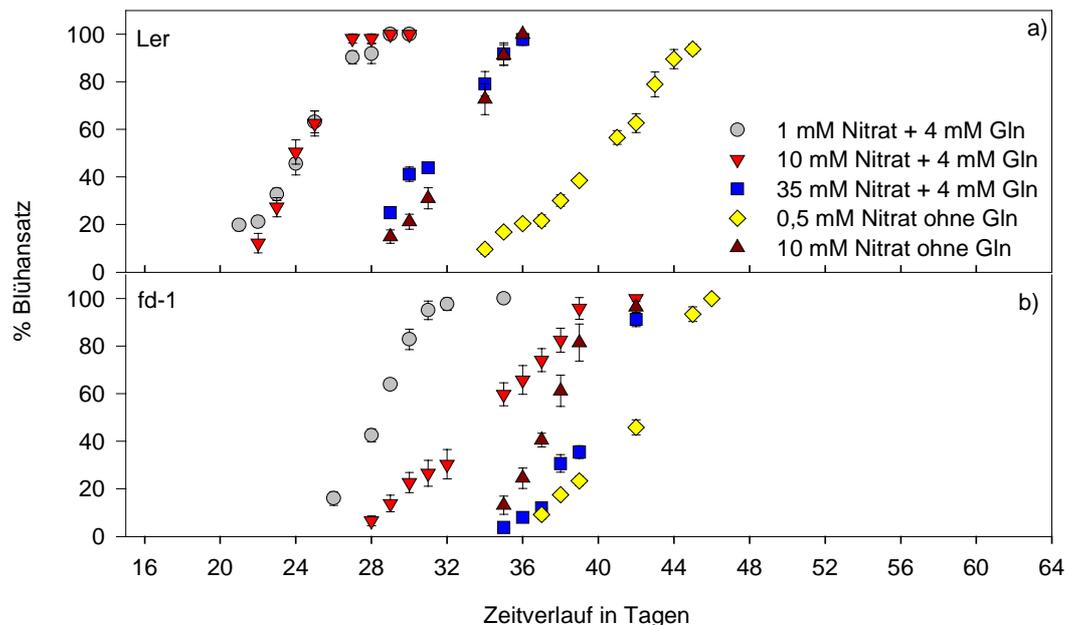
### Fazit zu leafy-1:

- (i) Nitrat bewirkt eine Hemmung der Blühinduktion bei der Mutante, die mindestens genauso stark ausgeprägt wie beim Wildtyp ist.
- (ii) Die Veränderungen im internen Nitratgehalt verlaufen bei der Mutante wie im Wildtypen Ler. Es gibt konkrete Veränderungen bei den Kohlenhydraten und Aminosäuren im Vergleich zu Ler, diese sind aber nicht sehr groß. Aus den Resultaten ergibt sich kein Hinweis darauf, daß die Schlußfolgerung beeinflusst, wonach bei dieser Mutante ansteigende Nitratkonzentrationen zu einer Hemmung der Blühinduktion führen.

### 3.2.5 *fd-1*

Das Genprodukt gehört zu den Genen, die im photoperiodisch gesteuerten Signalweg agieren (Burn et al. 1993).

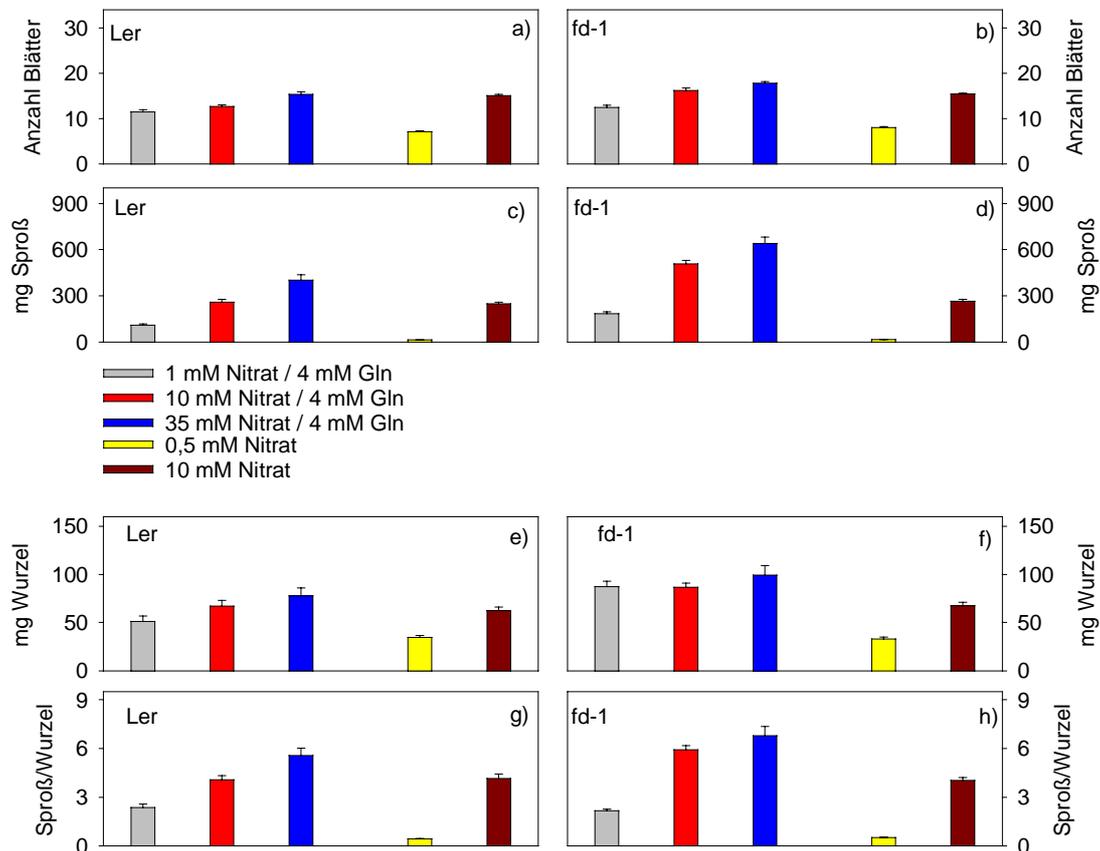
*fd* wurde als spätblühende Mutante charakterisiert. Tatsächlich startete der Blühverlauf auch um einige Tage versetzt gegenüber dem Wildtyp. Die Blühinduktionskurven zu den Hauptbedingungen verliefen bei *fd* alle getrennt (Abb. 3/59b), im Gegensatz zu Ler (Abb. 3/59a), da verliefen die Kurven für die beiden niederen Nitratkurven direkt parallel nebeneinander. Die Blühverlaufskurve zur höchsten Nitratkonzentration aus der Hauptversuchsreihe startete wie bei Ler später als die anderen beiden Bedingungen.



**Abbildung 3/59:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* und der Blühmutante *fd-1* unter verschiedenen Nitratangeboten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ). Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h.

Die Kurve der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war bei der Mutante (Abb. 3/59b) nur wenige Tage gegenüber Ler (Abb. 3/59a) nach hinten verschoben, die Mutante reagierte also bei Nitratmangel nicht anders als der Wildtyp. Der Einfluß der Mutation auf das Blühverhalten greift bei mangelnder N-Versorgung kaum. Die Blühverlaufskurve zur 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln begann bei *fd* wie bei Ler später als die entsprechende Kurve mit Gln. Gegen Ende überlappten beide Kurven mit 10 mM Nitrat aber einander. Der blühfördernde Einfluß von Gln, der bei Ler sichtbar wird, greift bei der Mutante weniger

ausgeprägt. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, daß Gln oder seine Derivate in der Mutante anders registriert werden als im Wildtyp oder daß die Verschiebungen der Blühverlaufskurven weinger mit der An- bzw. Abwesenheit von Gln als mit Veränderungen bei den Wachstumsraten zu tun haben.

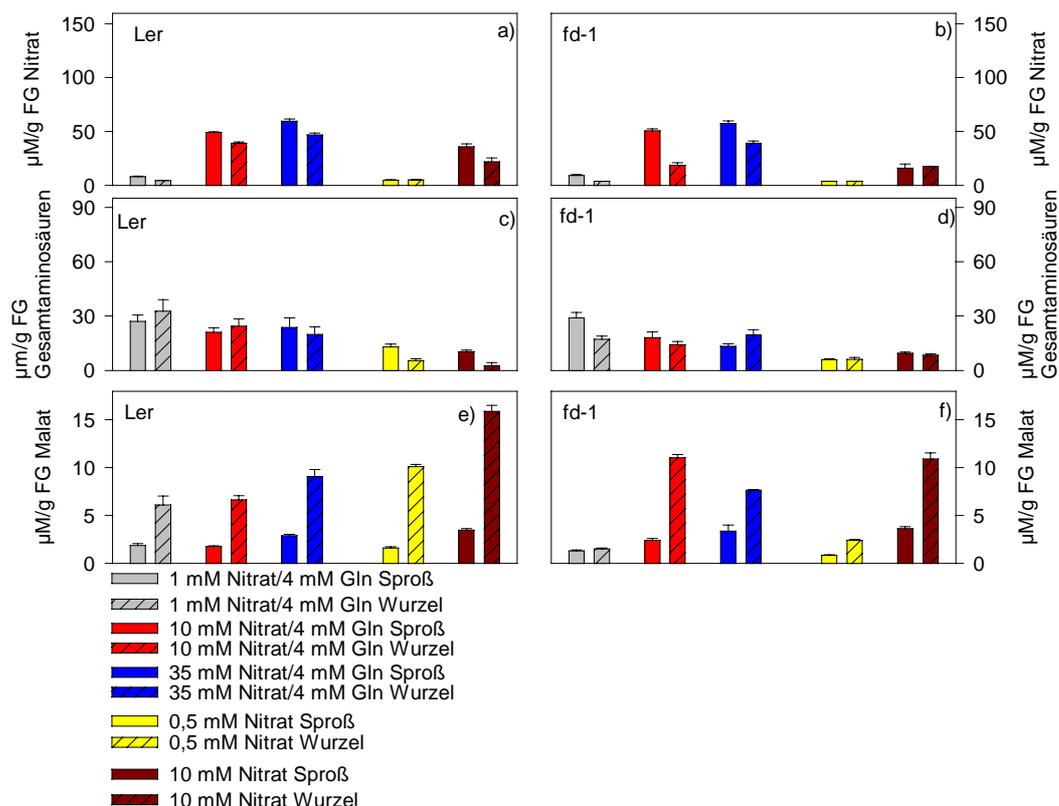


**Abbildung 3/60:** der Graph zeigt die Blattanzahl, Biomassen und Sproß/Wurzel-Verhältnisse der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei fd-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Steigende Nitratkonzentrationen führten bei *fd* im Vergleich zu Ler zu einer Verzögerung der Blühinduktion aufgrund einer Verlängerung der vegetativen Phase, die Pflanzen waren bei Blühbeginn größer und hatten mehr Blätter (Abb 3/60b). Die Anordnung der Kurven war bei der Mutante etwas verändert im Vergleich zum Wildtyp, aber insgesamt zeigte sich bei *fd-1* eine ähnlich starke Hemmung wie bei Ler.

Bei der aufsteigenden Nitratkonzentration + Gln lagen die Werte zu Blattzahl und Biomasse bei *fd* (Abb. 3/60b+d+f) etwas höher als bei Ler (Abb. 3/60a+c+e), ein Hinweis auf eine verlängerte vegetative Phase. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies bei *fd* die gleichen Werte auf wie Ler, auch hier kam es zu einem verfrühtem Blühen der Pflanzen unter Berücksichtigung von Blattzahl und Biomasse. Die 10 mM-Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigte bei Mutante und Wildtyp die gleiche Reaktion im Vergleich zur entsprechenden Bedingung mit Gln, das Blühen trat in der Gln-haltigen Bedingung aufgrund rascheren Wachstums ein. Die Sproß/Wurzel-Verhältnisse wurden bei *fd* (Abb. 3/60h) und Wildtyp (Abb. 3/60g) in der gleichen Weise durch Nitrat beeinflusst.

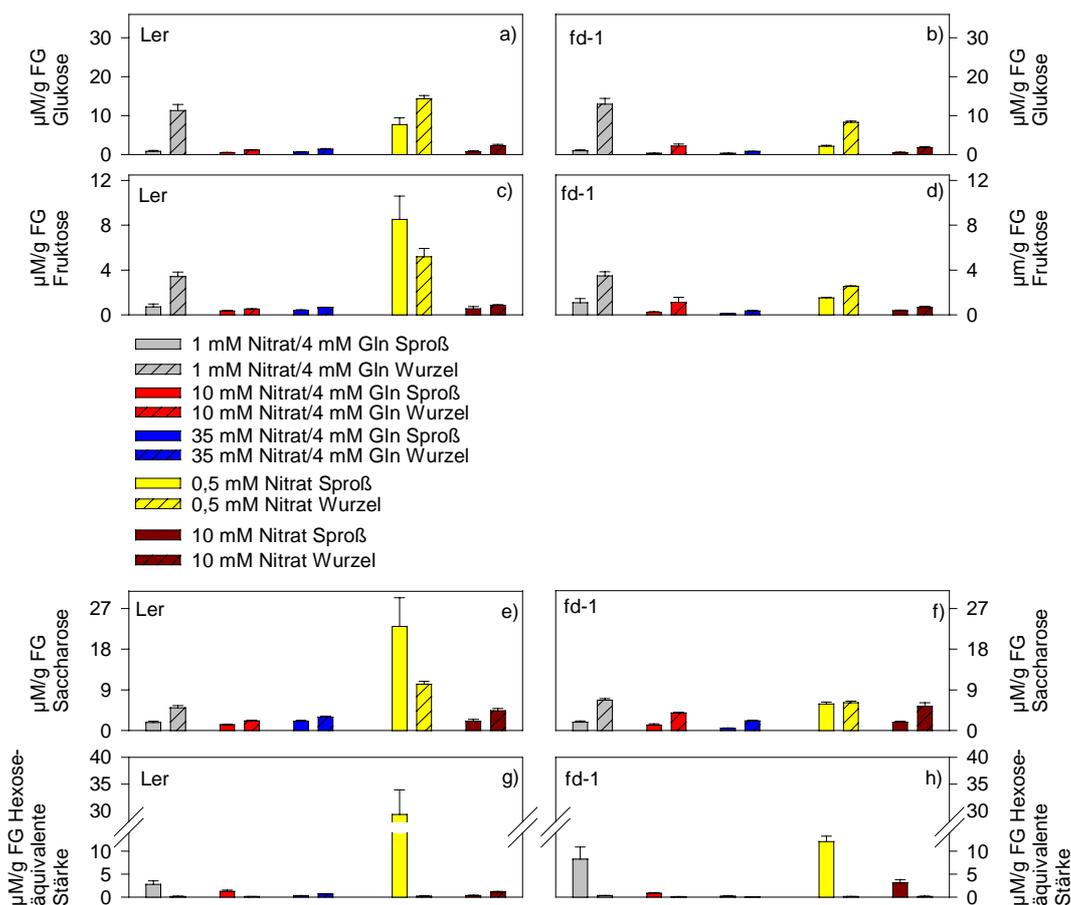
Wie beim Wildtypen (Abb. 3/61a) stiegen die internen Nitratspiegel bei der Mutante mit zunehmender externer Nitratversorgung an (Abb. 3/61b). Ausnahme ist die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln, diese wies etwas geringere Werte in der Mutante gegenüber dem Wildtyp auf. Auch die Gesamtaminosäuren nahmen insgesamt etwas ab bei *fd*, wobei dies bei der Mutante (Abb. 3/61d) stärker ausgeprägt war als bei Ler (Abb. 3/61c).



**Abbildung 3/61:** der Graph zeigt die Konzentration von Nitrat, Gesamtaminosäuren und Malat der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fd-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Malat zeigte bei Wildtyp und Mutante ein ähnliches Verhalten. Bei Malat zeigte die Mutante im Wurzelgewebe geringe, aber nicht signifikante Veränderungen (Abb. 3/61f) im Vergleich zum Wildtypen. Die Wurzelkonzentration in der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) lag deutlich niedriger bei der Mutante als bei Ler. In der 10 mM-Bedingung ohne Gln ergab sich bei *fd* in der Wurzel ein niedrigerer Spiegel als bei Ler (Abb. 3/61e), und außerdem war die Malatkonzentration genauso hoch als in der vergleichenden Bedingung mit Gln, was bei Ler nicht zutrif. In den beiden Bedingungen ohne Gln ergab sich für Malat wieder eine positive Korrelation mit der zunehmenden Nitratkonzentration in der Mutante, die Hauptversuchsreihe mit Gln als zusätzlicher N-Quelle zeigte dies im Gegensatz zu Ler nicht.

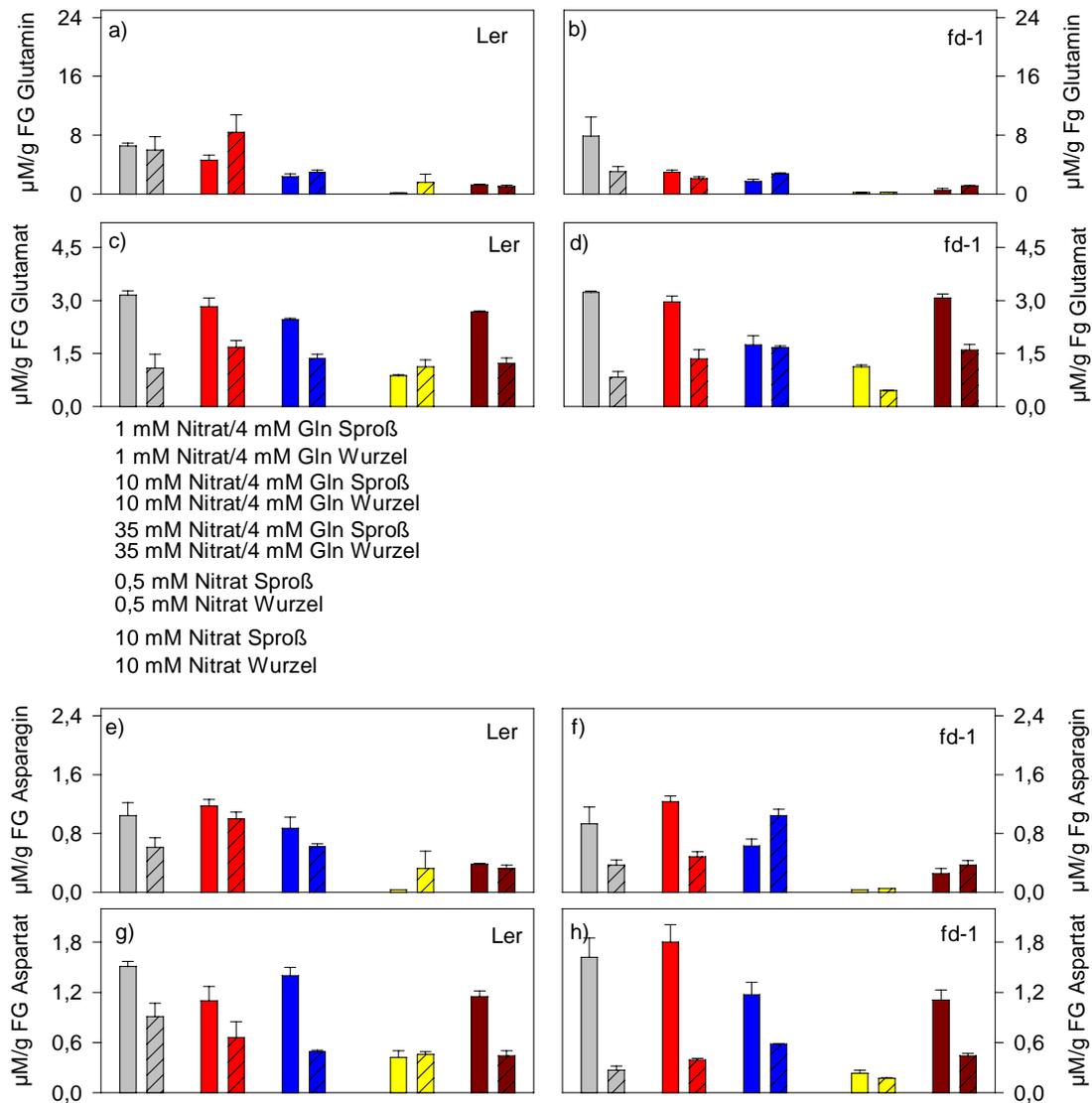
Bei den Kohlenhydraten reagierte *fd* (Abb. 3/62b,d,f,h) in der Hauptversuchsreihe nicht anders als Ler (Abb. 3/62a,c,e,g).



**Abbildung 3/62:** der Graph zeigt die Konzentration von Glukose, Fruktose, Saccharose und Stärke der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fd-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

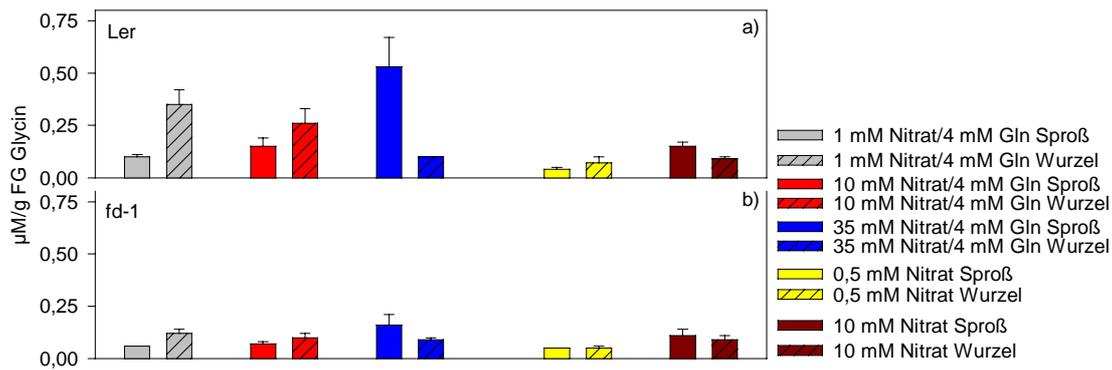
Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) sah dies anders aus, hier reagierten vor allem die reduzierenden Zucker und Saccharose mit veränderten Spiegeln in der Mutante. Zum einen sanken die Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp deutlich ab, bei Fruktose und Saccharose veränderte sich bei *fd* auch die Verteilung auf die beiden Gewebe. Auch Stärke nahm in der Mutante unter Mangelernährung im Sproß ab. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wiederum zeigte kaum Unterschiede zwischen Ler und *fd*. Lediglich Stärke nahm bei der Mutante in der 10 mM-Bedingung ohne Gln in der Wurzel ab und im Sproß zu gegenüber dem Wildtyp.

Bei den N-speichernden Aminosäuren (Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat) nahm Glutamin in den Bedingungen, die neben zunehmender Nitratkonzentration auch Gln enthielten, bei *fd* (Abb. 3/63b) in beiden Geweben ab. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies kaum einen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante auf, auch die Glutaminspiegel bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln wichen kaum voneinander ab. Bei Glutamat (Abb. 3/63d) wies die Mutante lediglich bei überoptimaler N-Versorgung (35 mM Nitrat + 4 mM Gln) einen niedrigeren Sproßwert als der Wildtyp auf, ansonsten reagierte *fd* kaum anders als Ler (Abb. 3/63c). Asparagin wies bei *fd* (Abb. 3/63f) in den Gln-haltigen Bedingungen im Sproß kaum Veränderungen gegenüber Ler auf (Abb. 3/63e). In der Wurzel sanken die Konzentrationen teilweise ab, Ausnahme war die überoptimale Nitratversorgung mit 35 mM Nitrat, hier drehte sich in der Mutante das Verhältnis zwischen Sproß und Wurzel im Vergleich zum Wildtyp um. Bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln ergaben sich keine gravierenden Veränderungen zwischen Mutante und Wildtyp. Auch bei Aspartat waren die Bedingungen mit der Kombination aus Nitrat und Gln bei *fd* betroffen (Abb. 3/63h), die Sproßwerte stiegen leicht an, während die Wurzelkonzentrationen im Vergleich zu Ler absanken. Auch die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) führte bei der Mutante in beiden Geweben zu einer Absenkung der Spiegel im Vergleich zu den Ler-Werten, bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln hingegen reagierte die Mutante nicht anders als der Wildtyp (Abb. 3/63g).



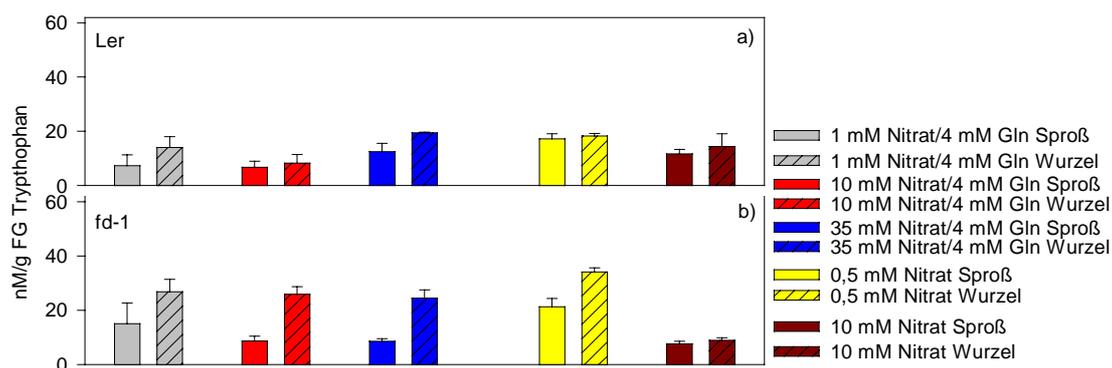
**Abbildung 3/63:** der Graph zeigt die Konzentration von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fd-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei den Aminosäuren aus der Photorespiration nahm Glycin bei *fd* in den Bedingungen mit Gln-Zusatz in beiden Geweben deutlich ab gegenüber Ler (Abb. 3/64b), die Verteilung auf die beiden Gewebe wurde nicht beeinflusst. Die anderen Bedingungen reagierten bei *fd* nicht auf einen Mutationseinfluß, hier beeinflusste hingegen die An- bzw. Abwesenheit von Gln die Glycinkonzentration, nicht die Veränderung der externen Nitratkonzentration. Serin zeigte keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4/64:** der Graph zeigt die Glycinkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei fd-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Auch die aromatischen Aminosäuren waren nur schwach beeinflusst, lediglich bei Tryptophan (Abb. 3/65b) kam es in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3/65a) zu einer verstärkten Synthese in der Wurzel, wenn die Medien Nitrat und Gln enthielten. In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) stiegen die internen Spiegel in beiden Geweben der Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht an. Trotz mangelnder N-Versorgung stieg hier die Aminosäuresynthese an, allerdings nur bei Tryptophan, nicht bei den anderen aromatischen Aminosäuren. Vergleicht man die 10 mM-Bedingung ohne Gln mit der entsprechenden Bedingung mit Gln, so lagen in der Mutante beide Gewebe in ihren Konzentrationen bei 10 mM Nitrat alleine unter denen bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln.

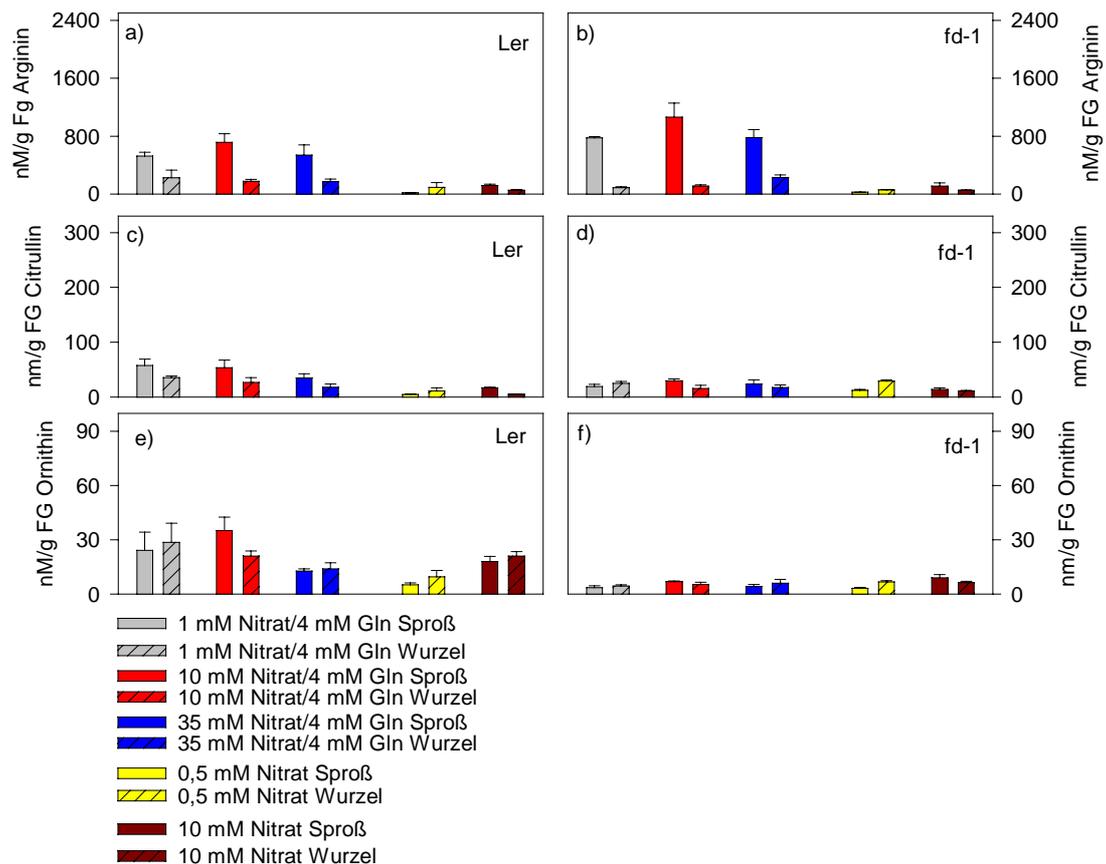


**Abbildung 3/65:** der Graph zeigt die Tryptophankonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei fd-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Zudem lagen die Werte bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln in der Mutante niedriger als im Wildtyp. Bei Betrachtung der beiden Bedingungen ohne Gln ergab sich für die Mutante eine deutliche negative Korrelation zwischen Tryptophanspiegel und externer Nitratversorgung, dies zeigte sich beim Wildtyp in viel geringerem Ausmaß.

Alanin und die aliphatischen Aminosäuren reagierten nicht anders als im Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Die Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus hingegen reagierten alle drei mit Veränderungen. Bei Arginin (Abb. 3/66b) und Citrullin (Abb. 3/66d) zeigten sich bei *fd* Veränderungen in den Bedingungen, die beide N-Quellen enthielten im Vergleich zu Ler. Die Mutante wies im Sproß in den genannten Bedingungen höhere Argininspiegel auf als Ler (Abb. 3/66a,c), die Wurzel reagierte mit leichter Abnahme oder garnicht. Bei Citrullin nahmen Sproß- und Wurzelkonzentrationen bei *fd* leicht ab, bei Ornithin kam es in beiden Geweben zu deutlich niedrigeren Spiegeln in der Mutante (Abb. 3/66f) als im Wildtyp (Abb. 3/66e). Sowohl bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) als auch bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln reagierten Ler und Mutante gleich bei Arginin und Citrullin, Ornithin hingegen sank in der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln bei *fd* im Vergleich zu Ler in beiden Geweben ab. Die Mutation hatte in diesem Fall eine Auswirkung vor allem auf die Allokation der Aminosäure auf die Gewebe.



**Abbildung 3/66:** der Graph zeigt die Konzentration von Arginin, Citrullin und Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei fd-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 31 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 36 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 43 Tage und bei 10 mM Nitrat 39 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

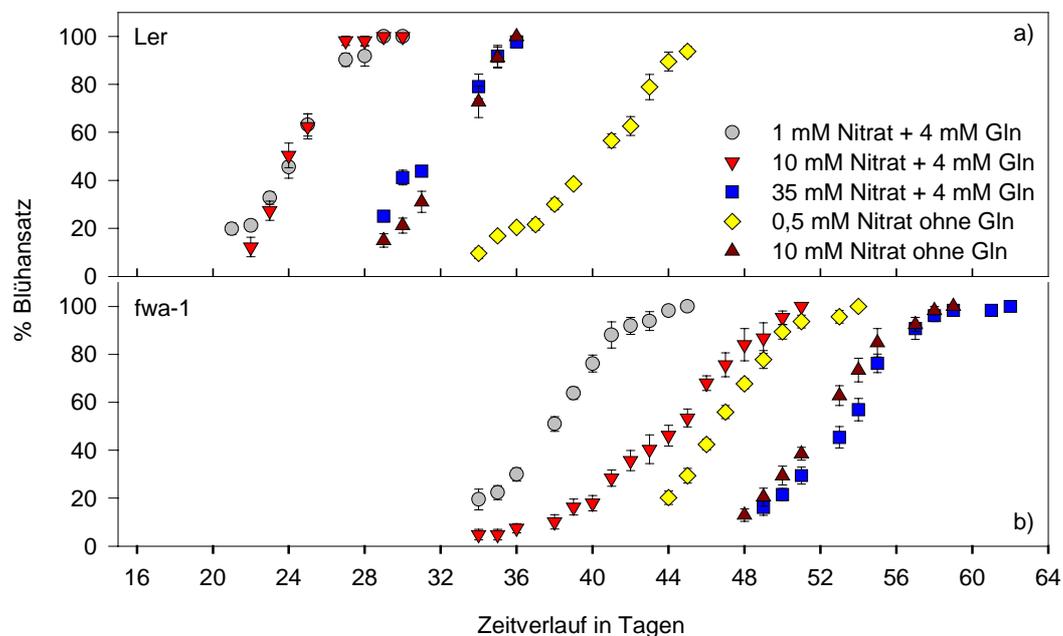
### Fazit zu *fd-1*:

- (i) Nitrat führt zu einer Hemmung der Blühinduktion bei *fd*.
- (ii) Es gibt keine Veränderungen bei den gemessenen Metaboliten, die darauf hinweisen, daß dies nicht auf Nitrat beruht.
- (iii) Auf der anderen Seite gibt es jedoch interessante kleinere Verschiebungen wie niedrigere Kohlenhydratspiegel und niedrigere Gesamtaminosäuren, zum letzteren gehört ein Absinken von xxx und ein Anstieg bei xxx, außerdem verändert sich die Gewebeverteilung bei xxx

### 3.2.6 *fwa-1*

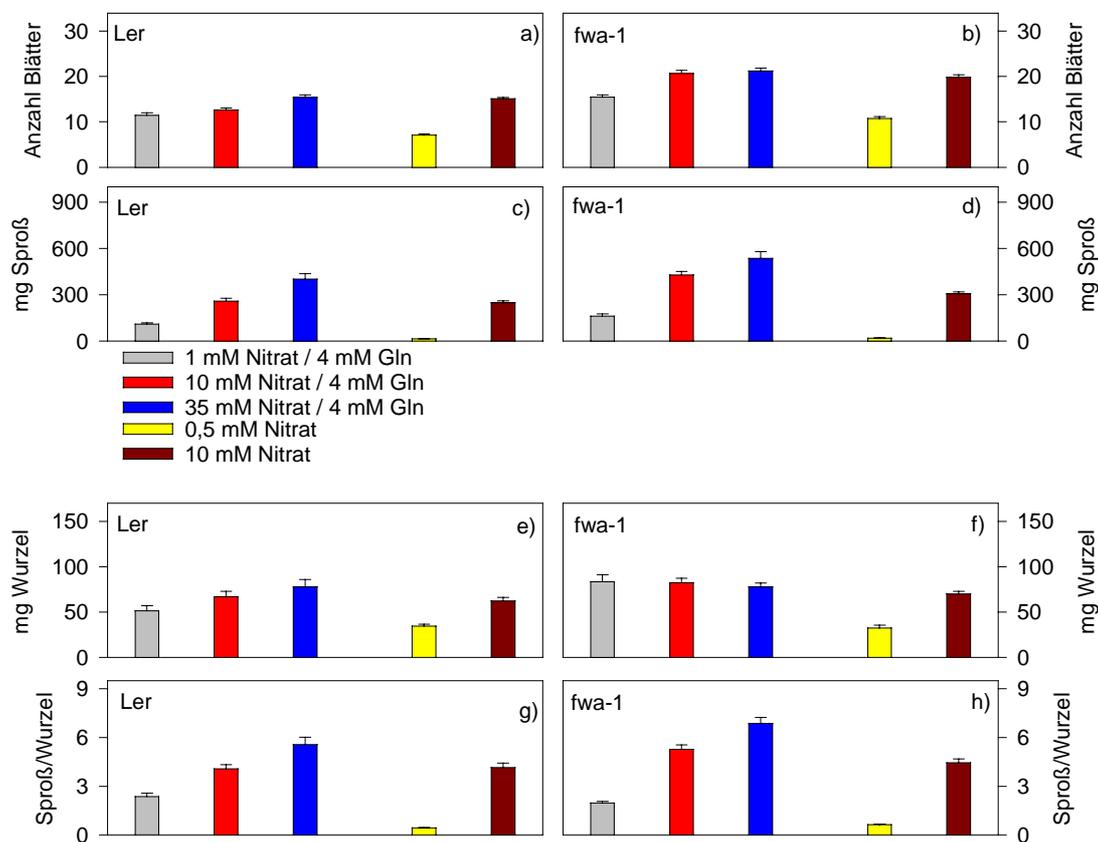
Das Genprodukt FWA agiert im photoperiodisch gesteuerten Signalweg (Burn et al. 1993). Es unterdrückt bzw. wirkt entgegengesetzt zur Aktivität fördernder Signalwege bzw. downstream-Komponenten während der frühen Entwicklung oder juveniler vegetativer Phase (Araki et al. 1998). Diese Mutante ist als spätblühend charakterisiert worden.

Die Blühverlaufskurven für alle Nitratbedingungen waren in der Mutante (Abb. 3/67b) stark verzögert gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3/67a). Die Kurven für 1 mM und 10 mM Nitrat, jeweils mit Gln, sind auch getrennt im Vergleich zu Ler. Die Kurve für 35 mM Nitrat + 4 mM Gln startete von allen Kurven als letzte. Hier trat also bei *fwa* in der Hauptversuchsreihe eine sehr deutliche Hemmung der Blühinduktion mit steigender externer Nitratversorgung auf im Vergleich zum Wildtyp. Die Kurve für die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) startete bei *fwa* im Vergleich zu den anderen Kurven nicht sehr stark verzögert, während die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln auch bei dieser Mutante später als die Vergleichsbedingung mit Gln blühte. Dabei fiel auch auf, daß die Blühverlaufskurve zur Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) bei *fwa* schneller startete als die Kurve zur 10 mM-Nitrat-Bedingung ohne Gln.



**Abbildung 3/67:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* und der Blühmutante *fwa-1* unter verschiedenen Nitratangeboten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ). Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h..

Es zeichnete sich sowohl bei Blattzahl (Abb. 3/68b) als auch bei Biomasse (Abb. 3/68d,f) eine deutliche Zunahme bei *fwa* gegenüber Ler ab. Bei der Wurzelbiomasse zeigte die Mutante in der Hauptversuchsreihe fast gar keine Veränderung (Abb. 3/67f), während bei Ler mit ansteigender externer Nitratversorgung auch eine Zunahme des Wurzelgewichtes eintrat (Abb. 3/67e). Interessanterweise zeigten die beiden Bedingungen ohne Gln – Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM Nitrat-Bedingung – bei *fwa* kaum ein Veränderung in Blattzahl, Biomassen und Sproß/Wurzel-Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp, obwohl beide Kurven bei der Mutante im Vergleich zu Ler nach hinten verschoben waren. Eine Verzögerung der Blühinduktion durch Verlängerung der vegetativen Phase => dies würde sich in höherer Blattzahl bzw. Biomasse niederschlagen – kann so nicht alleine gegeben werden, hier kam es wohl auch zu einer verzögerten Entwicklung.

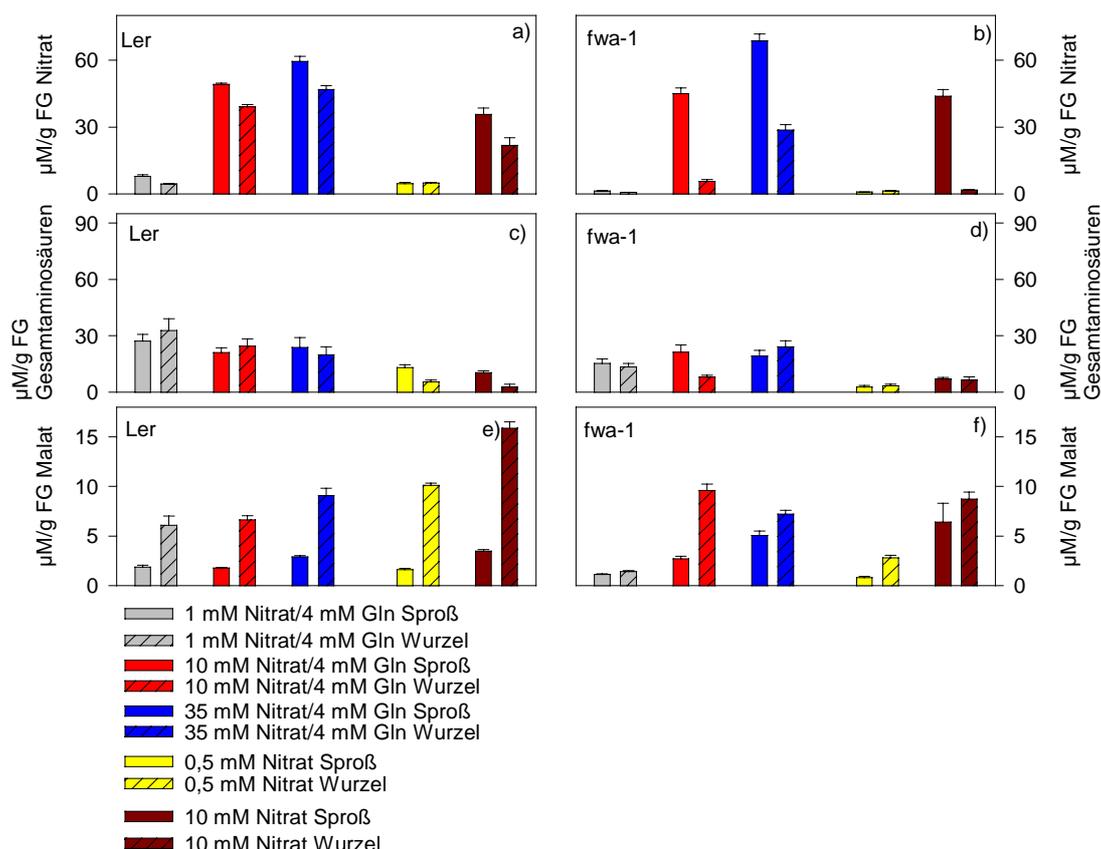


**Abbildung 3/68:** der Graph zeigt die Anzahl der Blätter, die beiden Biomassen für Sproß und Wurzel sowie das Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fwa-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 41 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 55 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 54 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Der interne Nitratspiegel stieg bei der Hauptversuchsreihe in der Mutante (Abb. 3/69b) im Sproß parallel zum externen Nitratangebot an, somit ergab sich für den Sproß ein deutlicher

Zusammenhang zwischen externem und internem Nitratgehalt, der sogar wesentlich stärker als beim Wildtyp (Abb. 3/69a) ausgeprägt war. Dieser Zusammenhang ergab sich auch für die Wurzelwerte von *fwa*, hier sanken die Konzentrationen gegenüber Ler jedoch ab. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) führte bei Wildtyp und Mutante zu den gleichen Resultaten. Dies bestätigt den Eindruck, der sich aus den Daten zu Blattzahl und Biomasse ergibt, die Blühkurve zur Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat), das verfrühte Blüten dieser Bedingung bei Ler ist in der Mutante etwas abgeschwächt. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln wies der Sproß in der Mutante im Vergleich zu Ler einen deutlich erhöhten Spiegel auf, der bei Ler nicht niedriger lag als die entsprechende Bedingung mit Gln.

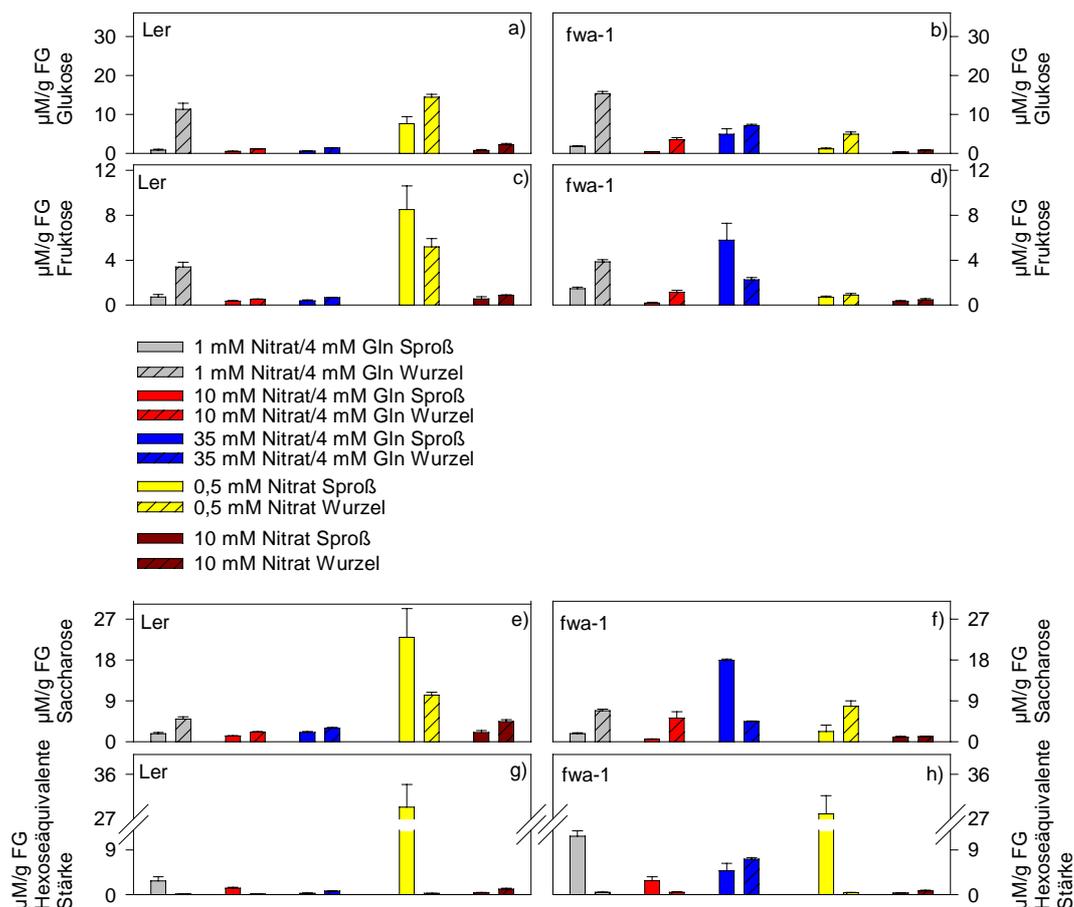
Die Gesamtaminosäuren nahmen bei *fwa* (Abb. 3/69d) insgesamt etwas ab gegenüber Ler, dies betraf alle Bedingungen. Bei den beiden Bedingungen ohne Gln zeigte sich bei *fwa* nicht dieselbe Gewebeverteilung wie beim Wildtyp, bei der Mutante wiesen beide Gewebe die gleiche Konzentration auf.



**Abbildung 3/69:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Nitrat, Gesamtaminosäuren und Malat der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fwa-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 41 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 55 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 54 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

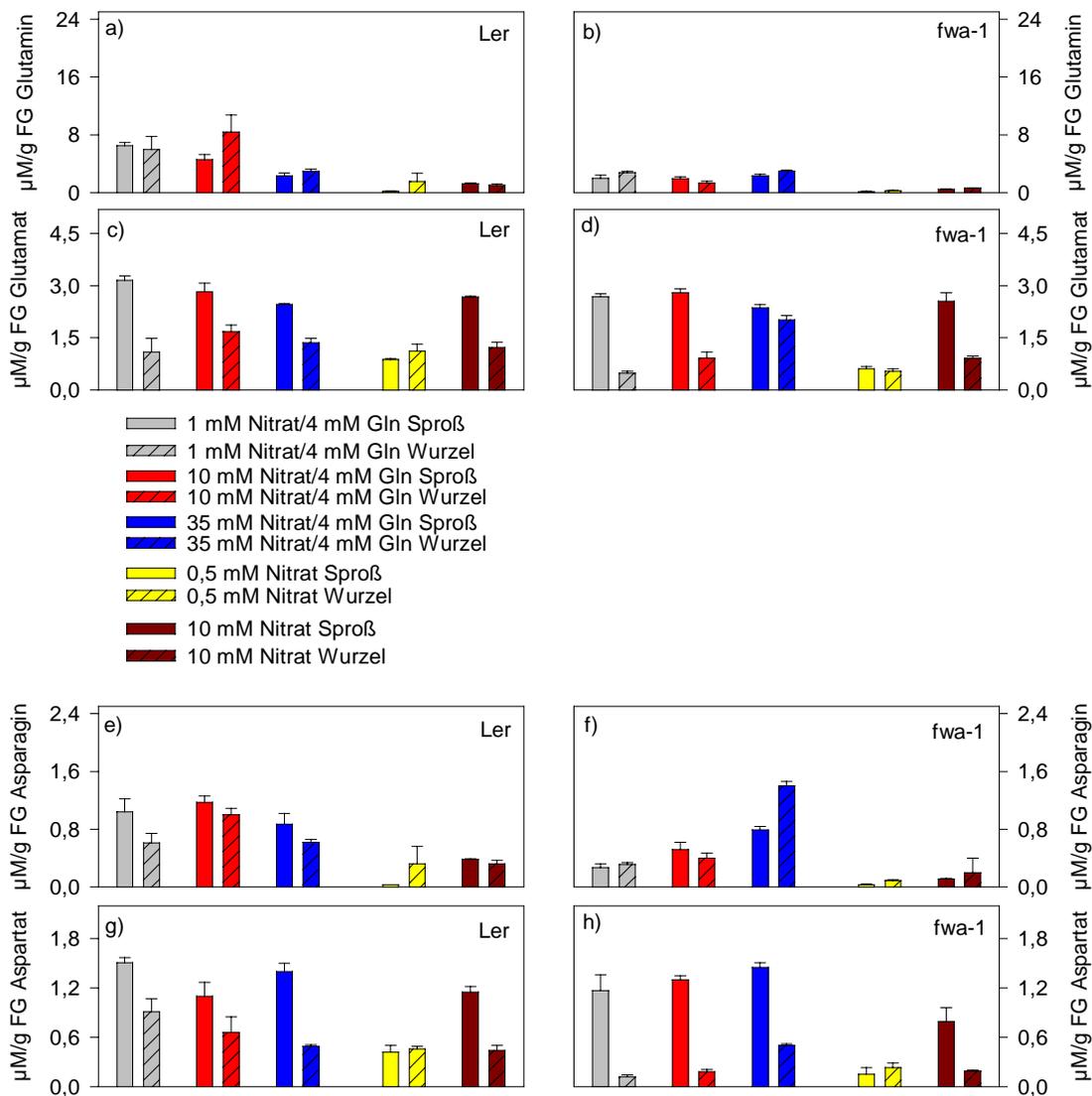
Der Malatspiegel reagierte uneinheitlich. Bei überoptimaler N-Versorgung nahm er bei *fwa* (Abb. 3/69f) in der Hauptversuchsreihe im Vergleich zu Ler (Abb. 3/69e) etwas ab. Auch bei Mangelernährung sanken die Konzentrationen in den Geweben der Mutante ab, vor allem die Wurzel wies weniger als 1/3 des Wildtyp-Wertes auf. Dies ist teilweise mit den niedrigeren Nitratwerten der Mutante in dieser Bedingung erklärbar. Im Gegensatz zu Ler wies die Mutante in der 10 mM-Bedingung ohne Gln in der Wurzel einen deutlich niedrigeren Malatspiegel auf.

Bei den Kohlenhydraten führten sowohl bei den löslichen Zuckern als auch bei Stärke die Bedingungen mit einer Kombination aus Nitrat und Gln bei *fwa* zu einem Anstieg der Konzentrationen (Abb. 3/70 b,d,f,h) gegenüber den Wildtypkonzentrationen. Besonders deutlich war dies bei der überoptimalen Versorgung mit 35 mM Nitrat + 4 mM Gln ausgeprägt



**Abbildung 3/70:** der Graph zeigt die Kohlenhydratkonzentrationen der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fwa-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 41 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 55 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 54 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E/m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Auch die Verteilung auf Sproß und Wurzel wich in der Mutante vom dem Wildtyp-Bild bei externer Nitratversorgung mit 35 mM Nitrat (Abb. 3/70a,c,e,g) ab. Dafür sanken die Kohlenhydratkonzentrationen in der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) drastisch ab, lediglich Stärke wies einen ähnlich hohen Spiegel wie Ler auf. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln hingegen traten kaum Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp auf. Enthielt das Medium also kein Gln, so zeigte sich bei der Mutante eine viel geringere Kohlenhydratabnahme mit ansteigendem Nitratangebot als bei Ler, Ausnahme war Stärke.



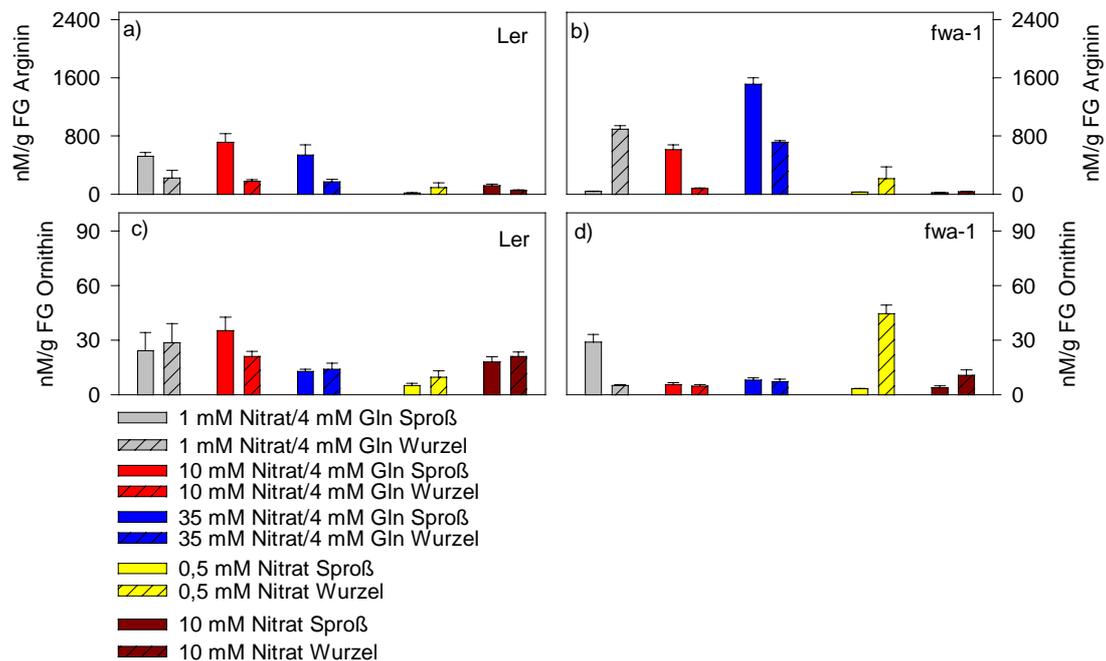
**Abbildung 3/71:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei fwa-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 41 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 55 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 54 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei den N-haltigen Aminosäuren (Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat) reagierte Glutamin in der Mutante (Abb. 3/71b) nur mit einer allgemeinen Absenkung der Spiegel bei allen Bedingungen. Wie beim Wildtyp (Abb. 3/71a) ergab sich jedoch bei der Mutante kaum ein Zusammenhang zwischen externem Nitratangebot und interner Aminosäurekonzentration, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Gln. Glutamat nahm bei der Mutante im Wurzelbereich ab (Abb. 3/71d), sofern das Medium neben Nitrat noch Gln enthielt, die höchste Nitratkonzentration war davon nicht betroffen. Bei Mangelernährung sanken die Spiegel beider Gewebe von *fwa* etwas ab, die 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierte nicht anders als der Wildtyp (Abb. 3/71c). Asparagin wies zunächst bei aufsteigender Nitratreihe mit Gln niedrigere Spiegel in der Mutante auf (Abb. 3/71f), bei überoptimaler Nitratversorgung nahm der Wurzelwert bei *fwa* aber deutlich im Vergleich zu Ler zu, der Sproß reagierte nicht. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte bei der Mutante keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp, die 10 mM-Bedingung ohne Gln nahm bei der Mutante in beiden Geweben etwas ab. Aspartat reagiert bei *fwa* nur in der Wurzel (Abb. 3/71f), dort wies es geringere Spiegel als im Wildtyp auf. Zudem zeigte die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) in beiden Geweben etwas geringere Spiegel als beim Wildtyp auf (Abb. 3/71g), dies traf auch auf die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zu.

Die Aminosäuren aus der Photorespiration sowie die aromatischen Aminosäuren reagierten in der Mutante nicht anders als wie beim Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Bei den Aliphaten und Alanin zeigte sich ebenfalls keine veränderte Nitratantwort, die Konzentrationen stiegen bei der Mutante um 20 – 30 % in beiden Geweben im Vergleich zum Wildtyp an (Daten nicht gezeigt).

Im Harnstoffzyklus stieg Arginin im Hauptversuch bei *fwa* vor allem bei überoptimaler N-Versorgung mit 35 mM Nitrat + 4 mM Gln im Vergleich zu Ler stark an (Abb. 3/72b), dabei war dies jedoch ungleichmäßig auf die Gewebe verteilt, Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierten jedoch nicht. Die Anwesenheit von Gln hatte damit in der Mutante einen Einfluß auf den Argininspiegel. Ornithin sank bei *fwa* in den Gln-haltigen Bedingungen wiederum ab (Abb. 3/72d). Auf der anderen Seite stieg die Wurzelkonzentration von *fwa* der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) sehr stark an gegenüber Ler. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierte mit einer leichten Abnahme in beiden Geweben der Mutante. Bei *fwa* ergab sich damit eine negative Korrelation der

Ornithinkonzentration zum externen Nitratangebot in der Wurzel, wenn kein zusätzliches Gln im Medium vorlag, dies trat beim Wildtyp nicht ein.



**Abbildung 3/72:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Arginin und Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei fwa-1 sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 41 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 55 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 54 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Citrullin zeigte bei *fwa* keine auffälligen Veränderungen im Vergleich zu Ler (Daten nicht gezeigt).

Bei den von Aspartat abstammenden Aminosäuren reagierte nur Lysin in der Mutante verändert gegenüber dem Wildtyp, es kam zu einer allgemeinen Konzentrationszunahme bei allen Bedingungen in beiden Geweben um 40 – 50 % (Daten nicht gezeigt), unabhängig von der Nitratbedingung.

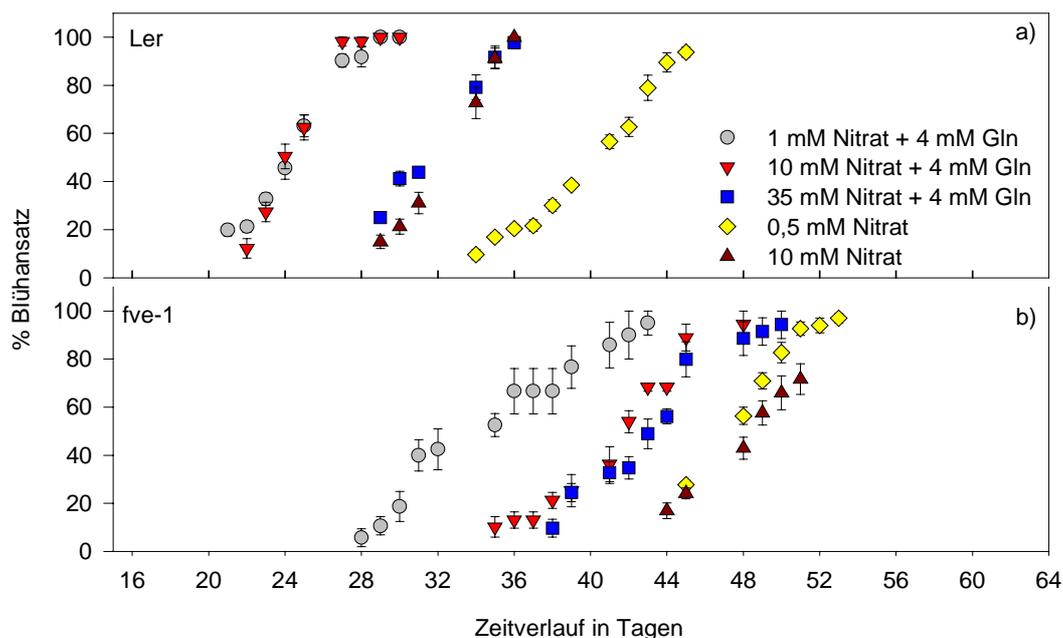
**Fazit zu *fwa-1*:**

- (i) Auch bei dieser Mutante führt Nitrat zu einer Verzögerung der Blühinduktion. Dies ist stärker ausgeprägt bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp Ler bei Vergleich der Blühverlaufskurven, Mutante und Wildtyp zeigen ähnliche Ergebnisse bei Blattzahl und Sproßbiomasse. Die quantitativen Unterschiede sollten nicht überbewertet werden, da die Verzögerung der Blühinduktion in dieser sehr spätblühenden Mutante sehr stark ist, was unzweifelhaft auch zu anderen Verschiebungen führen wird. Dies beeinflusst nicht die Hauptaussage, daß Nitrat immer noch effektiv zu einer Hemmung der Blühinduktion in *fwa* führt.
- (ii) Die Veränderungen in den Metaboliten sind ähnlich denen beim Wildtyp, zunehmende externe Nitratzufuhr führt steigenden internen Nitratspiegeln, während die Aminosäuren kaum reagieren bzw. bei hohen Nitratkonzentrationen leicht absinken und eine leichte Abnahme der Kohlenhydrate eintritt.

### 3.2.7 *fve-1*

Das Genprodukt FVE-1 agiert im konstitutiven Signalweg (Burn et al. 1993) und die Mutante zeigt einen spätblühenden Phänotyp.

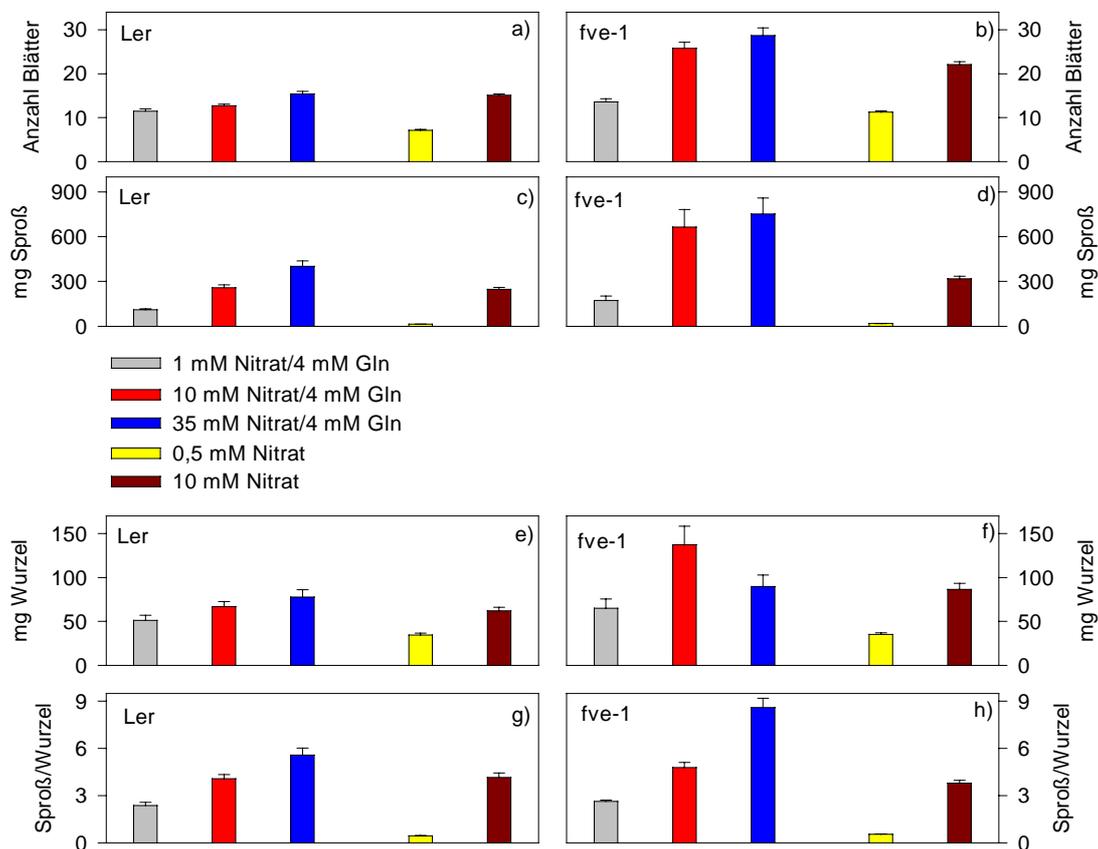
Bei *fve* (Abb. 3/73b) sah der Verlauf der Blühkurven ähnlich aus wie bei den bisherigen Mutanten. Die ersten beiden Bedingungen, die Glutamin enthielten, waren deutlich voneinander getrennt, bei überoptimaler Nitratkonzentration wurde die Blühinduktion verzögert. Verließen beim Wildtyp (Abb. 3/73a) die Kurven für 1 mM und 10 mM Nitrat (beide mit Gln) direkt parallel nebeneinander und 35 mM Nitrat + Gln etwas abgesetzt davon, so verliefen bei *fve* die Kurven für 10 mM und 35 mM Nitrat ( beide mit Gln) sehr eng beieinander.



**Abbildung 3/73:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* und der Blühmutante *fve-1* unter verschiedenen Nitratangeboten. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ).

Im Hauptversuch spiegelte sich die Verschiebung der Blühverlaufskurven auch in Blattzahl und Biomasse wieder. Stiegen bei Ler diese Daten für die aufsteigende Nitratreihe + Gln gleichmäßig an (Abb. 3/74a,c,e), so zeigten sie bei der Mutante (Abb. 3/74 b,d,f) einen Sprung von 1 mM Nitrat nach 10 mM Nitrat und danach nur einen sehr leichten Anstieg nach 35 mM Nitrat (jeweils mit Gln). Dies galt sowohl für Blattzahl als auch für die Biomasse des Sproßes. Insgesamt ergaben die Daten aus Blühverlaufskurven auf der einen Seite und

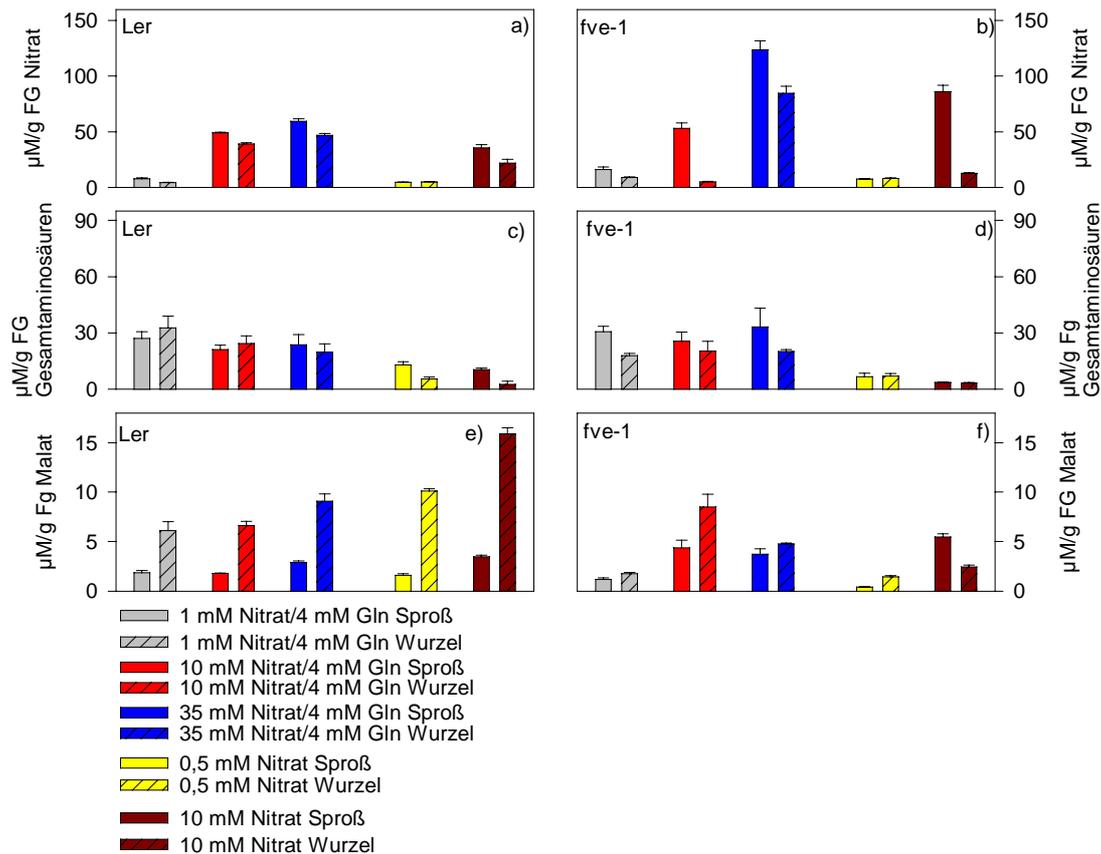
Blattzahl und Biomasse auf der anderen Seite, daß *fve* eine deutliche Hemmung der Blühinduktion durch Nitrat aufwies. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) startete bei der Mutante deutlich verspätet im Vergleich zum Wildtyp, wenn man die Blühverlaufskurven betrachtet. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte die Mutante nur in der Blattzahl eine leichte Erhöhung im Vergleich zu Ler, die Biomassen veränderten sich nicht. Unter diesen Umständen war also die Entwicklung in der Mutante beeinflusst. Auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln startete bei *fve* im Vergleich zu Ler verspätet, zeigte aber denselben parallelen Verlauf zur entsprechenden Bedingung mit Gln, der blühfördernde Effekt von Gln wurde hier bei der Mutante bestätigt. Die beiden Bedingungen ohne Gln liefen bei der Mutante fast parallel, obwohl sich bei Blattzahl und Biomasse (Abb. 3/74b+d+f) deutliche Unterschiede ergaben.



**Abbildung 3/74:** der Graph zeigt die Anzahl der Blätter, die beiden Biomassen für Sproß und Wurzel sowie das Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fve-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 44 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 50 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Bei Ler begann die Blühverlaufskurve für die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln im Vergleich zu der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) früher, aber die Biomassedaten zeigten, daß die Blühinduktion in dieser Bedingung bei der Mutante tatsächlich verzögert bzw. bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) verfrüht war (Abb. 3/74b+d). Bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln ergaben sich bei *fve* bei Blattzahl und Wurzelbiomasse leicht erhöhte Werte im Vergleich zu Ler, die Sproßbiomasse reagierte kaum, damit war die Bedingung vergleichbar mit der 10 mM Nitrat-Bedingung mit Gln. Das Sproß/Wurzel-Verhältnis stieg bei *fve* (Abb. 3/74h) mit zunehmender Nitratversorgung auf ähnliche Weise oder noch stärker als beim Wildtyp (Abb. 3/74g) an.

Der interne Nitratspiegel zeigte für Wildtyp und Mutante generell dasselbe Bild, es traten aber einige qualitative Unterschiede auf. Im Hauptversuch sank die Wurzelkonzentration bei mittlerem Nitratangebot mit 10 mM Nitrat + Gln in *fve* (Abb. 3/75b) gegenüber Ler (Abb. 3/75a) ab, bei überoptimaler Nitratversorgung (35 mM Nitrat) hingegen stiegen die Nitratspiegel beider Gewebe in der Mutante deutlich an. Dabei ist zu beachten, daß die Pflanzen bei Wildtyp und Mutante große Unterschiede im Alter aufwiesen (siehe Legende). Insgesamt ergab sich bei *fve* nur im Sproß eine Korrelation zwischen externem Nitratangebot und internem Nitratspiegel, diese war jedoch wesentlich stärker ausgeprägt als beim Wildtyp. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) trat keine Veränderung im Vergleich zu Ler auf. Bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln stieg die Nitratkonzentration im Sproß der Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich an und lag etwas höher als die Konzentration in der vergleichbaren Bedingung mit Gln. Die Mutante zeigte leicht erhöhte Nitratspiegel im Vergleich zum Wildtyp im Sproß, während die Wurzelkonzentration leicht absank, dies war auch bei der vergleichbaren Bedingung mit Gln zu sehen.



**Abb.ildung 3/75:** der Graph zeigt die Konzentration von Nitrat, Gesamtaminosäuren und Malat der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *ve-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 44 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 50 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

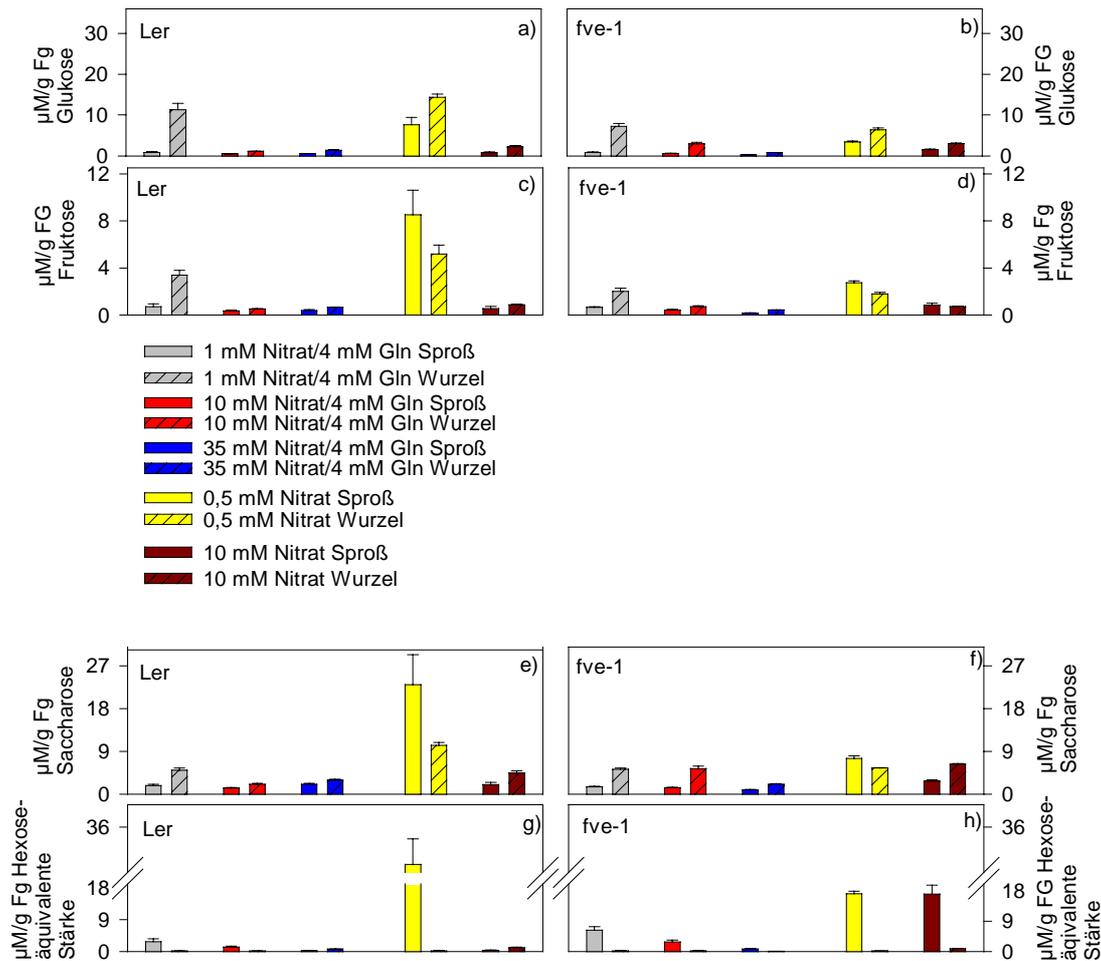
Insgesamt zeigte sich auch bei den beiden Bedingungen ohne Gln bei *fve* eine viel stärker ausgeprägte Korrelation zwischen internem Nitratgehalt und externer Nitratversorgung als bei Ler.

Die Gesamtaminosäuren reagierten nur sehr schwach auf eine veränderte Nitratantwort infolge der Mutation bei *fve* (Abb. 3/75d), dies galt für alle angewandten Bedingungen. Die An- bzw. Abwesenheit von Gln modifizierte die Reaktion auf das externe Nitratangebot kaum. Es ergab sich damit für Mutante und Wildtyp ein ähnliches Bild.

Beim Malatspiegel kam es in *fve* (Abb. 3/75f) zu einem ähnlichen Bild im Vergleich zu Ler (Abb. 3/75e) mit einigen Unterschieden. Zeigte sich beim Wildtyp ein Zusammenhang zwischen ansteigender Nitratkonzentration bei den Kombinationen von Nitrat und Gln und internem Malatspiegel, so ergab sich bei der Mutante keine Korrelation mehr. Bei der

Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) sanken bei *fve* die Malatspiegel stark ab, vor allem in der Wurzel, obwohl Wildtyp und Mutante ähnliche Nitratspiegel aufwiesen. Auch die 10 mM-Nitrat-Bedingung ohne Gln wies in der Mutante niedrigere Malatspiegel auf als Ler, zudem wechselte die Verteilung in Bezug auf die Gewebe. Anhand der beiden Bedingungen ohne Gln zeigte sich, daß die Abwesenheit von Gln auf jeden Fall im Wurzelbereich einen hemmenden Effekt auf die Malatsynthese bei *fve* hatte.

Bei den reduzierenden Zuckern wies die Mutante (Abb. 3/76b,d) niedrigere Spiegel als Ler (Abb. 3/76a,c) auf. Dies galt für beide Gewebe sowohl für die Hauptversuchsreihe als auch für die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat). Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigte keinen Unterschied zwischen Ler und Mutante. Bei Saccharose kam es bei *fve* (Abb. 3/76f) zu einer leichten Konzentrationszunahme in der Wurzel gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3/76e) in der Hauptversuchsreihe, die Gewebeverteilung änderte sich nicht. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) hingegen reagierte Saccharose bei der Mutante wie die reduzierenden Zucker in beiden Geweben mit abnehmenden Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp, bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln traten wiederum keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *fve* auf. Bei der Stärke zeigten sich kaum Unterschiede zwischen Ler (Abb. 3/76g) und *fve* (Abb. 3/76h) für die Hauptversuchsreihe, bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nahm die Sproßkonzentration der Mutante deutlich ab im Vergleich zu Ler. Dafür trat in der zweiten Bedingung ohne Gln eine deutliche Konzentrationssteigerung im Sproß der Mutante auf. Damit wiesen beide Bedingungen ohne Gln unabhängig vom externen Nitratangebot die gleichen Stärkespiegel im Sproß auf, dies ergab sich nicht beim Wildtyp.

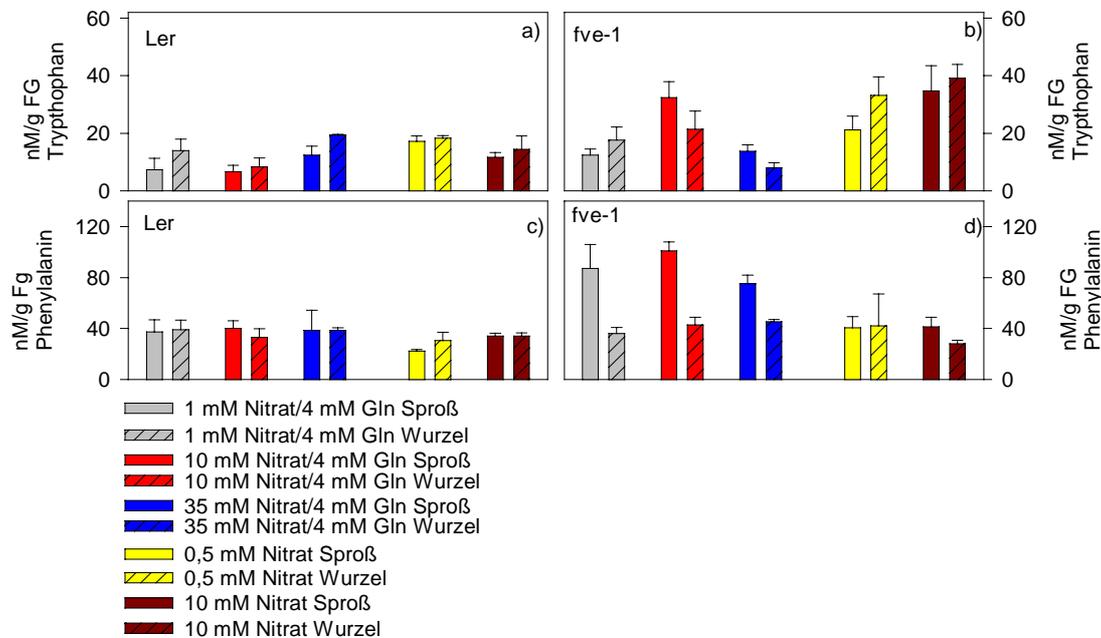


**Abbildung 3/76:** der Graph zeigt die Kohlenhydratkonzentrationen der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *ve-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 44 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 50 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Die Einzelaminosäuren spiegeln die Nichtveränderung im Gesamtaminosäurenspiegel wieder. Veränderten sich sonst bei den anderen besprochenen Mutanten vor allem die N-speichernden Aminosäuren, so zeigten sie bei dieser Mutante das gleiche Verhalten wie Ler (Daten nicht gezeigt).

Veränderungen traten bei den aromatischen Aminosäuren auf, da diese aber im nM-Bereich lagen, hatten sie keinen nennenswerten Einfluß auf den Gesamtaminosäurenspiegel. Tryptophan und Phenylalanin zeigten bei *fve* einige, wenn auch uneinheitliche, Veränderungen gegenüber Ler mit einer leicht steigenden Tendenz. Tryptophan nahm in der Bedingung, die 10 mM Nitrat und Gln enthielt, in beiden Mutanten-Geweben zu (Abb. 3/77b), Bei den anderen beiden Bedingungen, die eine Kombination aus Nitrat und Gln

enthielten, reagierte der Tryptophanspiegel in der Mutante kaum. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte die Mutante deutlich erhöhte Werte gegenüber Ler (Abb. 3/77a). Auch bei der 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln stiegen bei *fve* die Konzentrationen im Sproß und Wurzel stark an. Die Abwesenheit von Gln führte zu wesentlich höheren Tryptophanspiegeln bei *fve* als bei Ler.



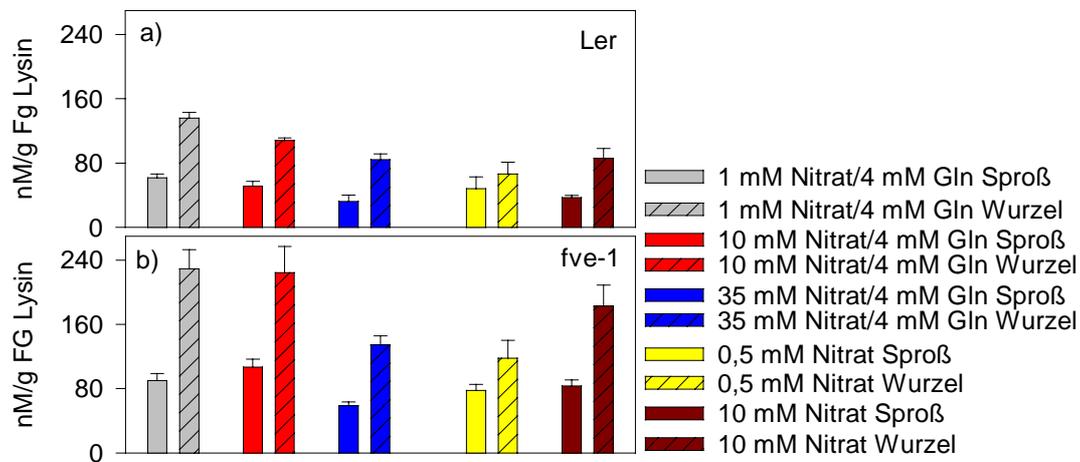
**Abbildung 3/77:** der Graph zeigt die Konzentration von Tryptophan und Phenylalanin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *ve-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 44 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 50 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Phenylalanin stieg bei der Mutante nur im Sproßgewebe der Bedingungen an (Abb. 3/77d), die zusätzlich zu Nitrat noch Gln enthielten. Bei den Gln-freien Bedingungen trat kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante auf. Tyrosin zeigte keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

Bei den Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus reagierte Ornithin mit Konzentrationsabnahmen (20 – 30 %) in beiden Geweben unter allen Bedingungen, Arginin und Citrullin zeigten keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

Bei den von Aspartat abstammenden Aminosäuren zeigte lediglich Lysin bei der Mutante (Abb. 3/78b) ein Anstieg der Konzentrationen in beiden Geweben gegenüber Ler, der Wurzelgehalt war davon besonders deutlich getroffen. Dies betraf sowohl die

Hauptversuchsreihe wie auch Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln, die Verteilung auf die Gewebe wurde nicht verändert bei *fve* im Vergleich zu Ler.



**Abbildung 3/78:** der Graph zeigt die Lysinkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *ve-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 43 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 44 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 50 Tage und bei 10 mM Nitrat 50 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Methionin und Threonin zeigten bei der Mutante keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zu Ler (Daten nicht gezeigt).

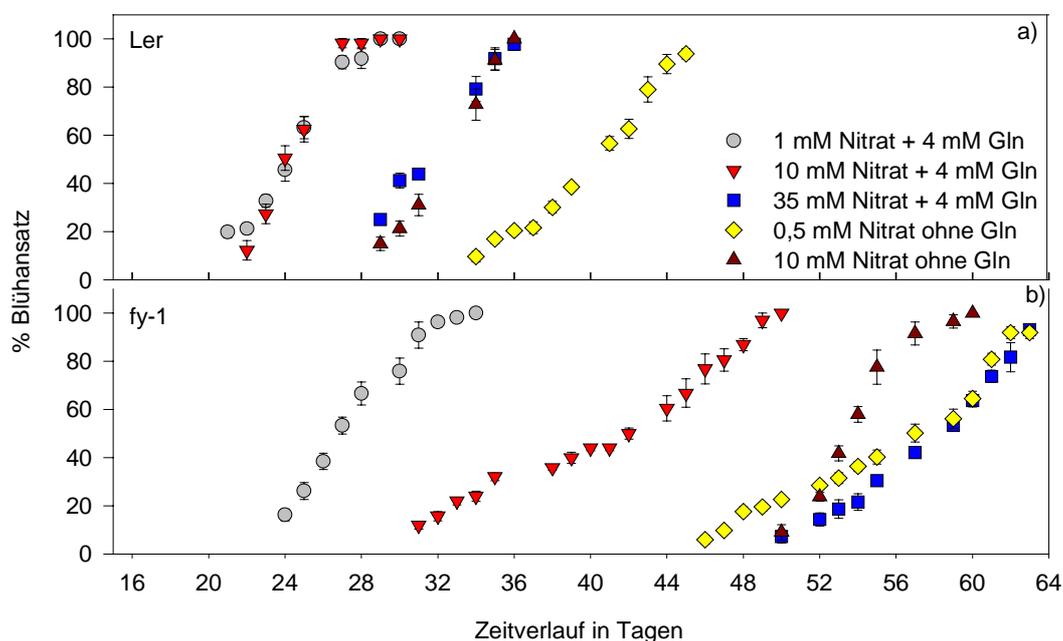
#### Fazit zu *fve*:

- (i) Nitrat bewirkt eine deutliche Hemmung des Blühens bei *fve*. Diese Verzögerung mag stärker als beim Wildtyp Ler sein. Wie bereits erwähnt, sollten die quantitativen Unterschiede jedoch nicht überbewertet werden, die insgesamt die Blühzeiten so stark verschoben sind.
- (ii) Auch hier zeigt sich bei der Mutante ein ähnliches Metabolitenbild wie beim Wildtypen, wobei einige Unterschiede wie bei Nitrat, Malat, den Kohlenhydraten, den aromatischen Aminosäuren sowie Lysin auftreten.

### 3.2.8 *fy-1*

Das Genprodukt FY agiert im konstitutiven Signalweg (Burn et al. 1993) und auch diese Mutante ist spätblühend.

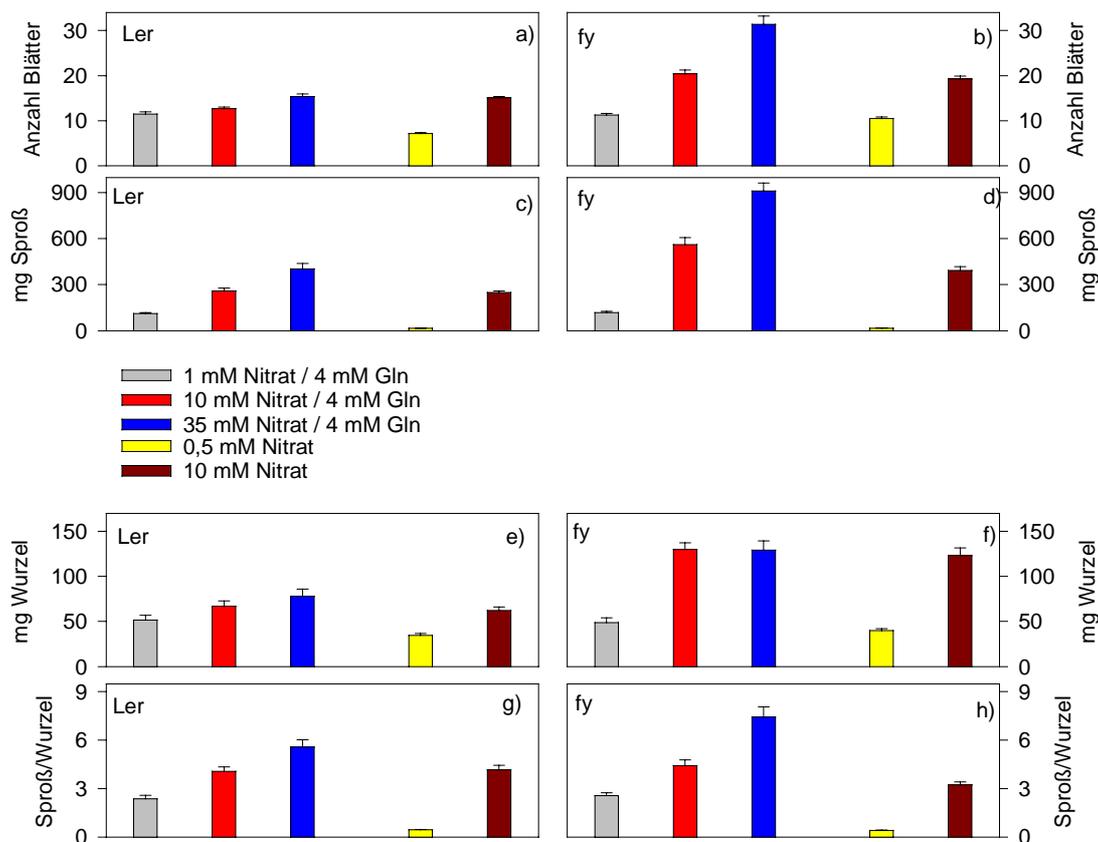
Bei *fy* (Abb. 3/79b) kam der hemmende Einfluß von Nitrat auf die Blühinduktion deutlich zum tragen, solange das Medium als zusätzliche N-Quelle noch Gln enthielt. Bei dieser Mutante liefen die Kurven für die drei Nitratbedingungen sehr weit auseinandergezogen, dies ging einher mit erhöhten Werten zu Blattzahl und Biomasse zur Blütezeit (Abb. 3/80b+d+f). Bei der Mutante zeigten Blattzahl, Biomassen und Sproß/Wurzel-Verhältnis (Abb. 3/80b+d+f) in der Hauptversuchsreihe eine viel deutlicher ausgeprägte positive Korrelation zwischen den jeweiligen Parametern und dem externen Nitratangebot als der Wildtyp (Abb. 3/80a+c+e). Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) lief parallel zur Kurve für 35 mM Nitrat + 4 mM Gln, war also bei der Mutante sehr stark verzögert gegenüber Ler (Abb. 3/79a). Hier stiegen die Biomassedeaten jedoch nicht an, die Verzögerung der Blühinduktion beruht also nicht auf eine verlängerte vegetative Phase, sondern auf eine verzögerte Entwicklung.



**Abbildung 3/79:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg erecta* und der Blühmutante *fy-1* unter verschiedenen Nitratangeboten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ). Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h.

Auch die Kurve zur 10 mM-Bedingung ohne Gln war in der Mutante verzögert, zum einen im Vergleich zur Gln-haltigen Bedingung der Mutante selbst, zum andern gegenüber der

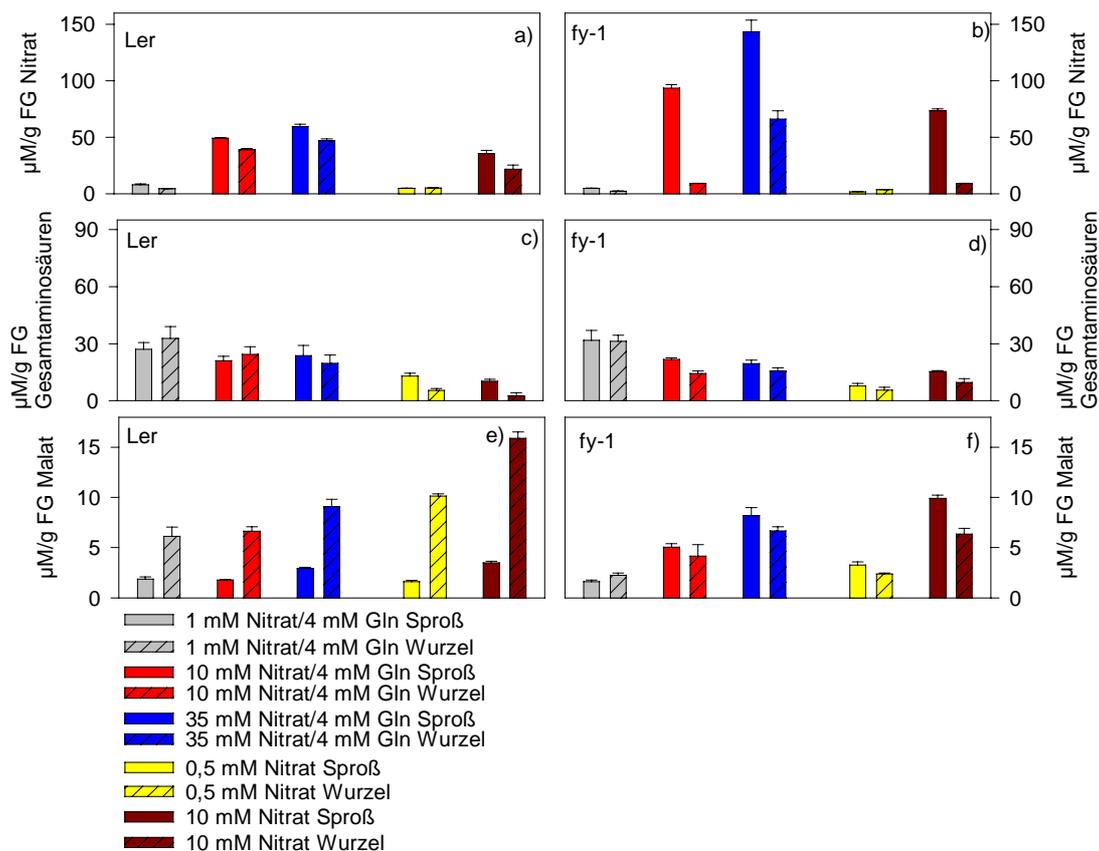
Wildtyp-Kurve. Bei *fy* zeigte sich jedoch ein sehr steiler Kurvenverlauf bei der Bedingung ohne Gln, während die Kurve mit Gln langsam anstieg. Wie bei *fyve* liefen die beiden Bedingungen ohne Gln in dieser Mutante sehr eng beieinander, während Blattzahl und Biomasse deutliche Unterschiede im Gegensatz zu Ler aufwiesen. Unter Berücksichtigung von Blattzahl und Sproßbiomasse zeigte sich, daß bei *fy* wie bei Ler eine Verzögerung der Blühinduktion mit steigender Nitratversorgung auftrat. Beide Mutanten – *fy* und *fyve* – entstammen dem gleichen Signalweg (Empfindlichkeit gegenüber Vernalisation) und reagieren auf einen fehlenden Gln-Einfluß ähnlich.



**Abbildung 3/80:** der Graph zeigt die Blattanzahl, Biomassen und Sproß/Wurzel-Verhältnisse der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Aber auch bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln wiesen die Parameter bei *fy* höhere Werte als bei Ler auf. Diese Mutante reagierte in Gegenwart von Gln sehr stark auf die hemmende Wirkung von Nitrat auf die Blühinduktion und damit auf eine Verlängerung der vegetativen Phase, bei Abwesenheit von Gln trat zumindest in der Blühinduktion kein Einfluß durch Nitrat auf.

Beim internen Nitratspiegel kam es bei der Hauptversuchsreihe in der Mutante zu erhöhten Konzentrationen im Sproß (Abb. 3/81b), somit ergab sich für den Sproß ein deutlicher Zusammenhang zwischen externem und internem Nitratgehalt, der wesentlich stärker als beim Wildtyp (Abb. 3/81a) ausgeprägt war. Diese Korrelation ergab sich jedoch nicht für die Wurzelwerte von *fy*. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) führte bei Wildtyp und Mutante zu den gleichen Resultaten. Dies bestätigte den Eindruck, der sich aus den Daten zu Blattzahl und Biomasse ergab, die Blühkurve zur Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war aufgrund verzögerter Entwicklung nach hinten verschoben. Bei der 10 mM-Nitrat-Bedingung ohne Gln wies der Sproß in der Mutante im Vergleich zu Ler einen deutlich erhöhten Spiegel auf, der aber wie bei Ler niedriger lag als der der entsprechenden Bedingung mit Gln. Obwohl der Unterschied im Nitratgehalt bei den beiden Bedingungen ohne Gln bei der Mutante viel größer war als beim Wildtyp, so trat jedoch bei der Blühinduktion kaum ein Unterschied in der Mutante auf.

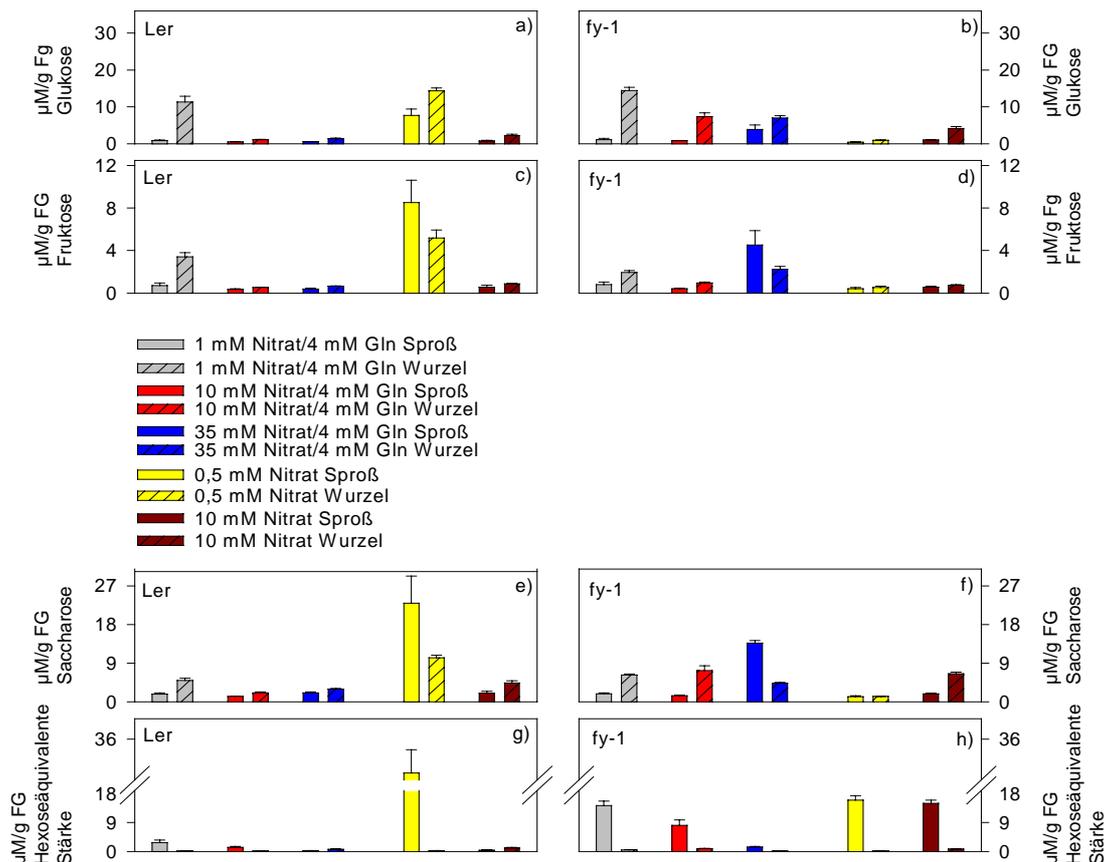


**Abbildung 3/81:** der Graph zeigt die Konzentration von Nitrat, Gesamtaminosäuren und Malat der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Die Gesamtaminosäuren reagierten in der Mutante (Abb. 3/81d) nicht anders als beim Wildtyp (Abb. 3/81c), unabhängig vom Nitratangebot oder einem Gln-Zusatz.

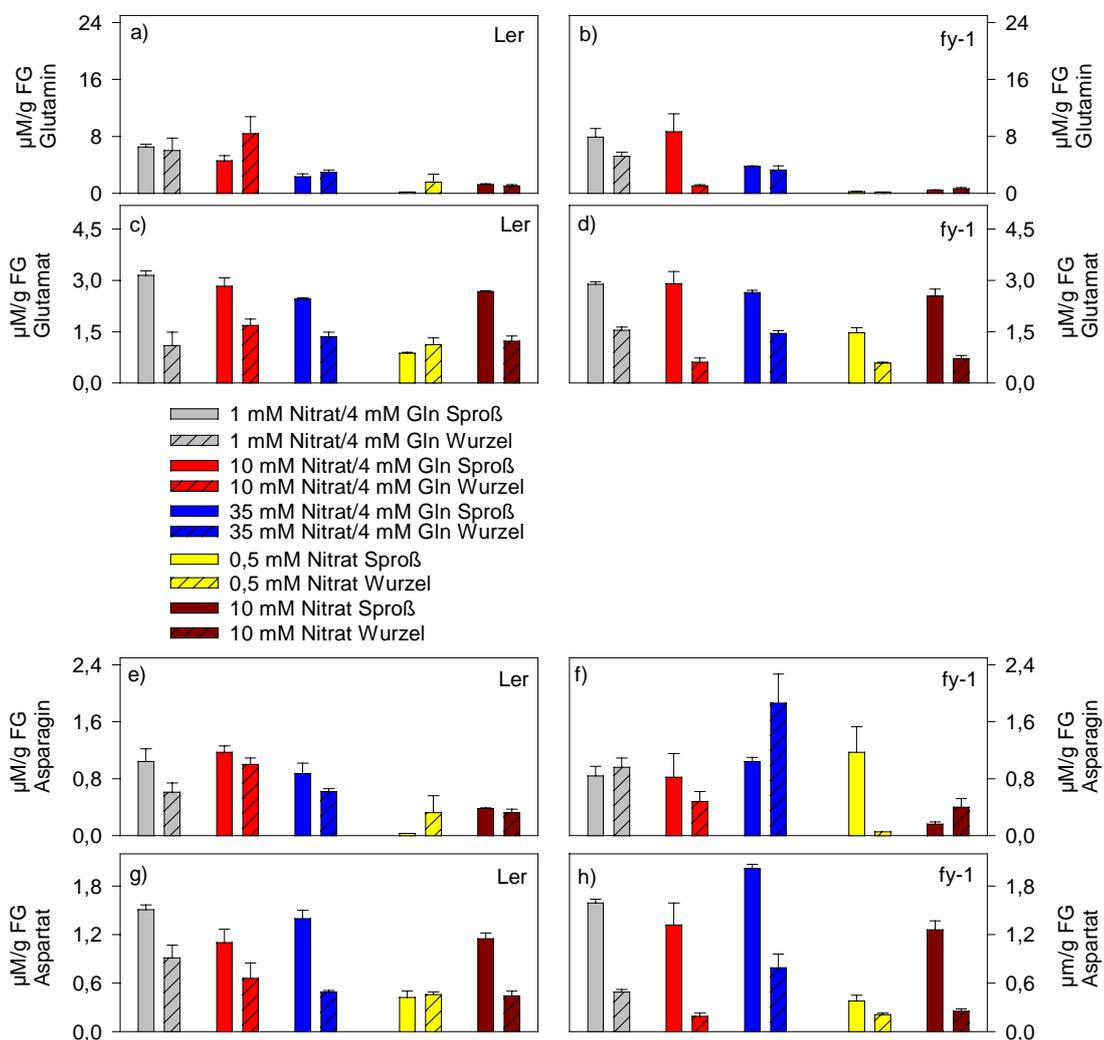
Beim Malatspiegel kam es jedoch zu Verschiebungen im internen Spiegel. War beim Wildtyp (Abb. 3/81e) ein Großteil des Malats unabhängig von der angewandten Bedingung in der Wurzel zu finden, so fand in der Mutante (Abb. 3/81f) eine Umschichtung in Richtung Sproß statt, sodaß sich die beiden Gewebe bei *fy* mehr oder weniger ähnliche Konzentrationen ergaben. Bei der Hauptversuchsreihe stieg der Malatspiegel in beiden Geweben mit zunehmender externer Nitratversorgung bei *fy* an. Auch bei den beiden Gln-freien Bedingungen trat eine Zunahme des Malatspiegels in der Mutante mit höherer Nitratversorgung ein im Vergleich zu Ler.

Bei den Kohlenhydratenspiegeln der Mutante fiel auf, daß in Gegenwart von ansteigenden Nitratangebot und Gln die Konzentrationen der reduzierenden Zucker (Abb. 3/82b,d) und Saccharose (Abb. 3/82f) selbst bei höheren Nitratkonzentrationen gegenüber Ler anstiegen.



**Abbildung 3/82:** der Graph zeigt die Kohlenhydratkonzentrationen der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

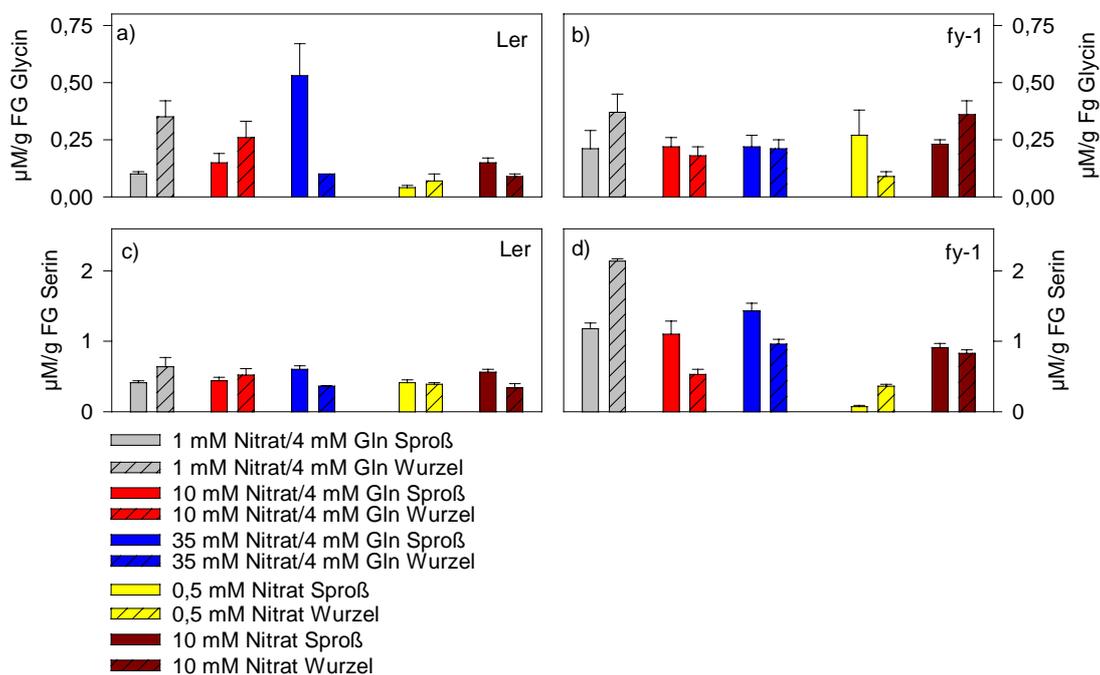
Stärke (Abb. 3/82h) nahm hingegen wie im Wildtyp (Abb. 3/82g) ab, lag in den Konzentrationen bei *fy* aber immer noch höher als die Ler-Werte. Bei 0,5 mM Nitrat im Medium fielen auf der anderen Seite die Kohlenhydratkonzentrationen in der Mutante drastisch ab, Ausnahme war dabei die Stärke. Dies ging nicht einher mit den niedrigen Nitratkonzentrationen bei 0,5 mM Nitrat externem Nitratangebot. Entweder speichert eine Pflanze Nitrat oder Stärke (Scheible et al. 1997), dies traf hier bei dieser Mutante aber nicht zu. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierten die Zuckerspiegel bei der Mutante ähnlich wie bei Wildtyp, die Stärke stieg in der Mutante jedoch an.



**Abbildung 3/83:** der Graph zeigt die Konzentration von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Reagierten die Gesamtaminosäuren bei der Mutante kaum anders als im Wildtyp, so kam es jedoch zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung. Glutamin (Abb. 3/83b) und Glutamat (Abb. 3/83d) zeigten bei der Mutante kaum Unterschiede gegenüber dem Wildtyp, unabhängig von den angewandten Bedingungen. Bei Asparagin (Abb. 3/83f) nahm die Aminosäurekonzentration mit steigendem Nitratangebot zu, sofern zusätzlich Gln im Medium vorlag, die Gewebeverteilung war dabei in der Mutante unregelmäßig. Auch in der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) kam es bei *fy* zu einer Erhöhung des internen Spiegels gegenüber Ler, allerdings auf den Sproß beschränkt. Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln reagierte kaum anders in der Mutante, verglichen mit Ler. Bei Aspartat (Abb. 3/83h) verschob sich das Gleichgewicht sehr stark in Richtung Sproß, wenn die Mutante Nitrat und Gln zusammen angeboten bekam. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM Nitrat-Bedingung reagierten bei *fy* ähnlich wie bei Ler.

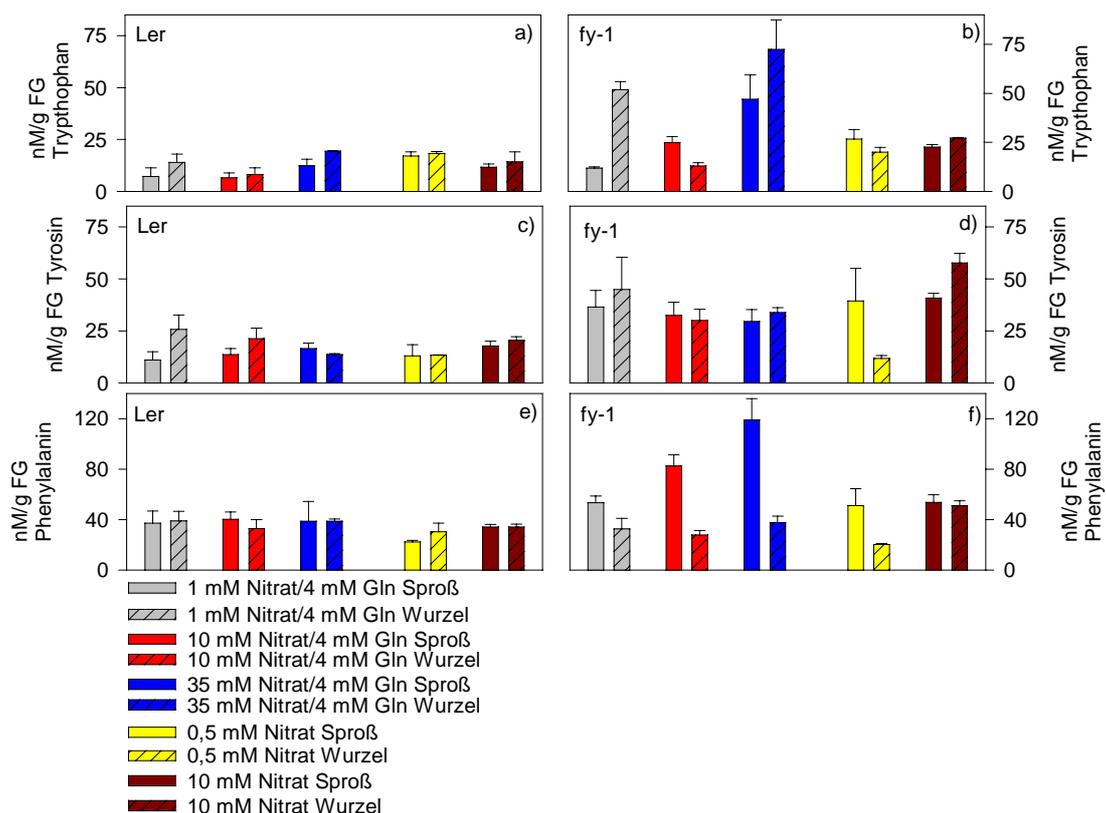
Die Aminosäuren der Photorespiration zeigten ein uneinheitliches Verhalten. Glycin reagierte in Gegenwart von Gln im Gegensatz zu Ler bei ansteigendem Nitratangebot in der Mutante (Abb. 3/84b) eher mit einer Abnahme der Konzentration im Sproß.



**Abbildung 3/84:** der Graph zeigt die Konzentration von Glycin und Serin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

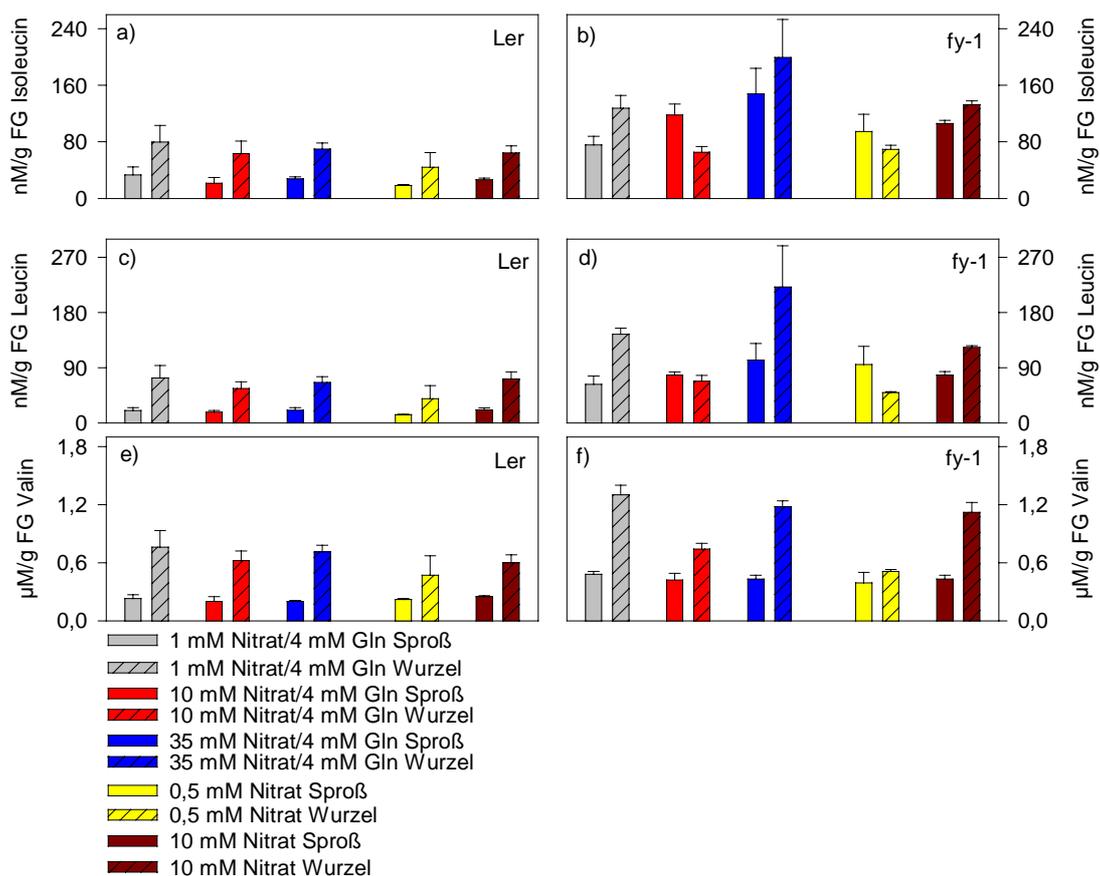
Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte bei *fy* im Vergleich zu Ler (Abb. 3/84a) hingegen höhere Glycinkonzentrationen, dies betraf vor allem den Sproß. Auch die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigte bei *fy* höhere Konzentrationen, nicht nur im Vergleich zu Ler, sondern auch im Vergleich zur Gln-haltigen Bedingung. In Abwesenheit von Gln kam es damit zu einem leichten Glycinkonzentrationsanstieg in der Mutante im Vergleich zu Ler.

Serin hingegen zeigte in *fy* in Gegenwart von Nitrat und Gln insgesamt eine Zunahme der Konzentration (Abb. 3/84f), die sich jedoch nicht auf beide Gewebe gleich stark auswirkte, Ler wies in allen drei Bedingungen ähnlich niedrige Werte auf. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) bewirkte dafür bei der Mutante einen leichten Konzentrationsabnahme von Serin im Sproß, die 10 mM-Bedingung ohne Gln wiederum zeigte in beiden Geweben im Vergleich zu Ler einen leichten Anstieg des Serinspiegels. Hier zeigte sich bei der Mutante eine Konzentrationssteigerung abhängig vom externen Nitratangebot, sofern kein Gln angeboten wurde.



**Abbildung 3/85:** der Graph zeigt die Konzentration der Aromaten der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. (0,5 mM Nitrat). Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Eine Veränderung in der externen Nitratversorgung beeinflusste die aromatischen Aminosäuren bei Mutante und Ler in ähnlicher Weise, es kam grundsätzlich aber zu einer Erhöhung der internen Spiegel bei der Mutante im Vergleich zu Ler. In der Hauptversuchsreihe reagierte Tryptophan bei *fy* in beiden Geweben ungleichmäßig mit Konzentrationssteigerung, es ergab sich kein Zusammenhang mit dem externen Nitratangebot (Abb. 3/85b). Tyrosin nahm bei allen drei externen Nitratkonzentrationen in beiden Geweben der Mutante gleichmäßig zu, auch hier ergab sich jedoch keine Korrelation (Abb.3/85d). Bei Phenylalanin reagierte nur der Sproß von *fy* mit erhöhten Aminosäurespiegeln, der Phenylalanin Gehalt nahm mit steigender externer Nitratkonzentration zu (Abb. 3/85f). Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) reagierte die Mutante nur schwach mit erhöhten Spiegeln im Vergleich zum Wildtyp. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln nahmen alle aromatischen Aminosäuren zu bei *fy* gegenüber Ler, Tyrosin und Phenylalanin am stärksten.

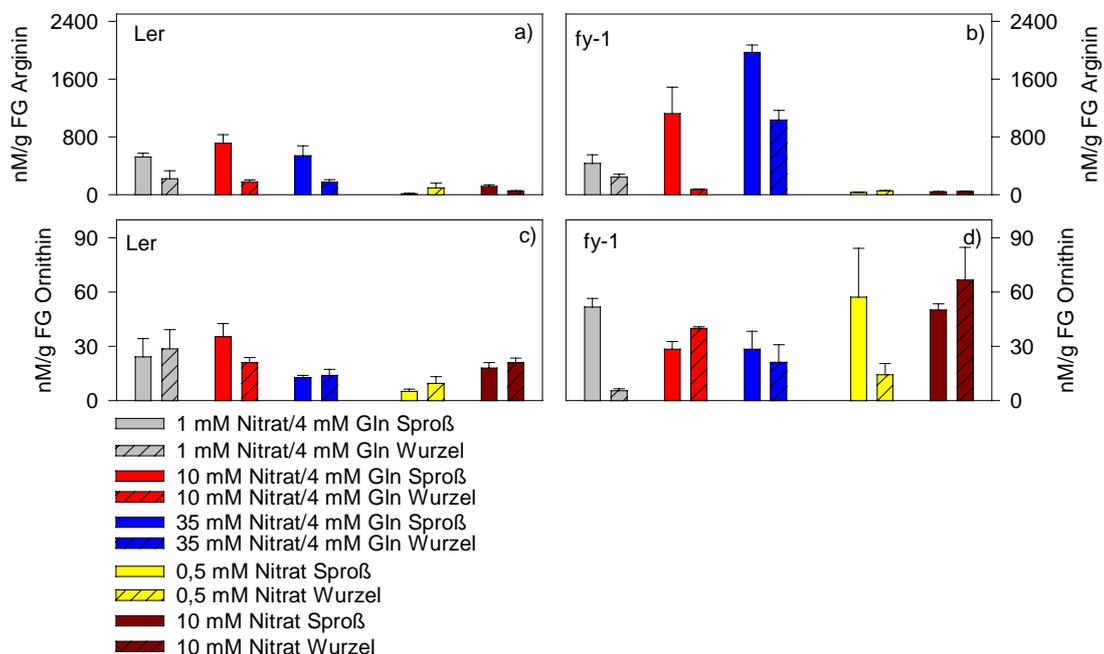


**Abbildung 3/86:** der Graph zeigt die Konzentration von Alanin und den aliphatischen Aminosäuren der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100 µE/m<sup>2</sup> und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei den aliphatischen Aminosäuren nahmen alle drei Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin in ihren Konzentrationen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu. Dabei ergab sich für *fy* keine Korrelation zwischen Aminosäuregehalt und externem Nitratangebot, sofern das Medium zusätzlich Gln enthielt (Abb. 3/86 b,d,f). Auch bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nahmen die Aliphaten leicht zu in der Mutante, dabei stiegen vor allem die Sproßwerte an. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln nahmen die Konzentrationen beider Gewebe in der Mutante zu, die Verteilung blieb erhalten.

Alanin, das sich mit den aliphatischen Aminosäuren denselben Ursprung teilt, reagierte in der Mutante nicht anders als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

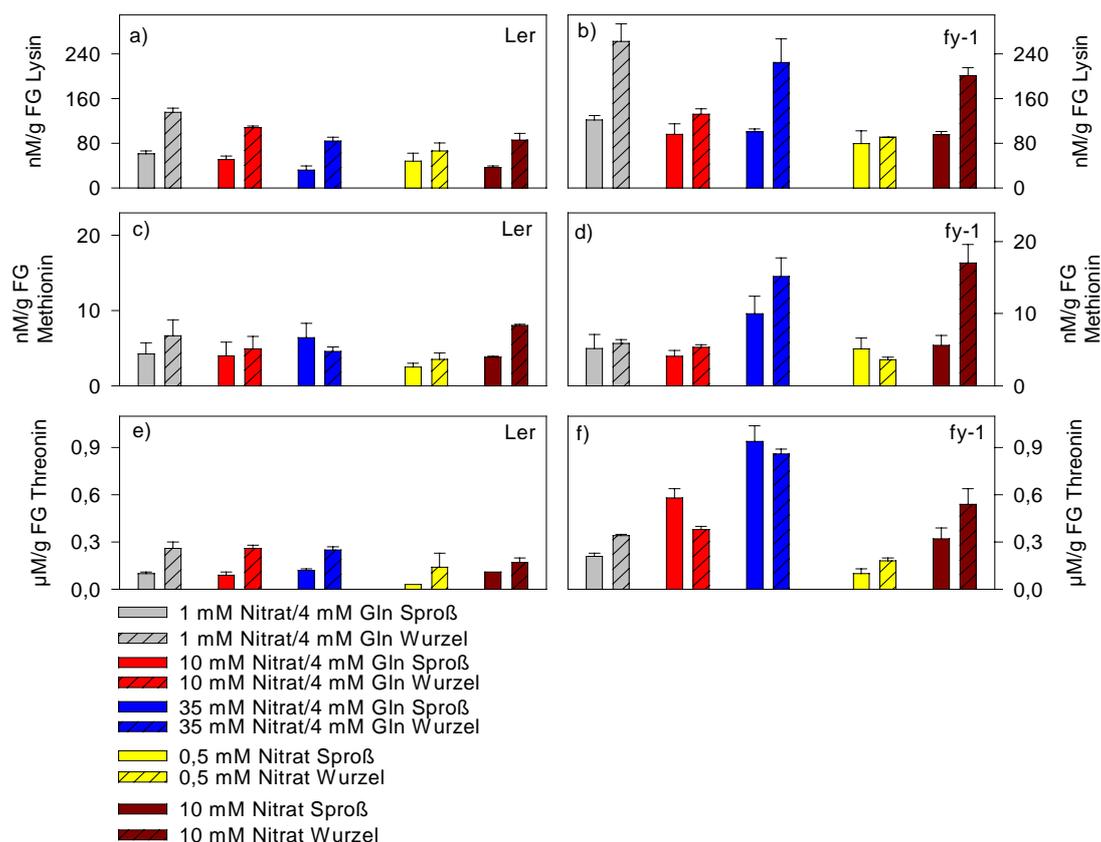
Auch die Aminosäuren aus dem Harnstoffwechsel nahmen teilweise zu. Bei Arginin ergab sich in der Mutante dabei im Gegensatz zu *Ler* ein Zusammenhang zwischen Aminosäurekonzentration und externem Nitratangebot im Sproß, sofern das Medium noch Gln enthielt (Abb. 3/87b). Die Wurzel reagierte nur bei der höchsten Nitratkonzentration mit einer Anhebung des Argininspiegels.



**Abbildung 3/87:** der Graph zeigt die Konzentration von Arginin und Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die *Landsberg erecta* - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Sowohl die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) als auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierten kaum unterschiedlich beim Vergleich von Mutante und Wildtyp. Citrullin zeigte in der Mutante dasselbe Bild wie im Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Ornithin nahm in bei *fy* hauptsächlich in Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln zu, also in Abwesenheit von Gln (Abb. 3/87d).

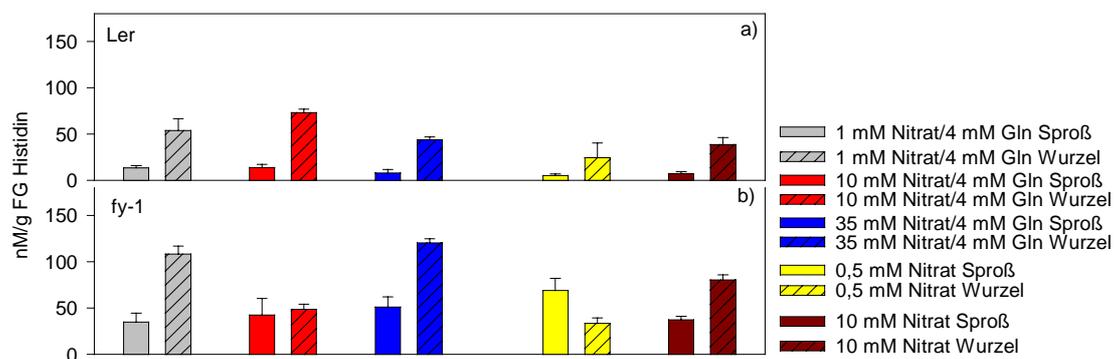
Die von Aspartat abstammenden Aminosäuren stiegen in der Mutante in ihren Konzentrationen teilweise deutlich an, dies betraf meist beide Gewebe. Lysin reagierte in der Hauptversuchsreihe – aufsteigende Nitratkonzentration + Gln – in den beiden extremen Bedingungen (1mM und 35 mM Nitrat) vor allem in der Wurzel mit Anhebung des Aminosäurespiegels, dabei ergab sich keine Korrelation zwischen Lysinspiegel und externem Nitratangebot (Abb. 3/88b). Methionin reagierte in der Hauptversuchsreihe mit einer Konzentrationszunahme in beiden Geweben bei überoptimaler Nitratversorgung (Abb. 3/88d).



**Abbildung 3/88:** der Graph zeigt die Konzentration von Lysin, Methionin und Threonin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Threonin stieg mit zunehmenden Nitratangebot in beiden Geweben der Mutante gegenüber Ler an (Abb. 3/88f) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3/88e). Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) reagierte *fy* im Vergleich zu Ler kaum. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln kam es vor allem in der Wurzel der Mutante zu deutlich erhöhten Aminosäurekonzentrationen. In der Abwesenheit von Gln führte zunehmende externe Nitratversorgung zu ansteigenden Spiegeln der besprochenen Aminosäuren.

Histidin zeigte in der Mutante bei aufsteigender Nitratreihe mit Gln teilweise erhöhte Konzentrationen in beiden Geweben (Abb. 3/89b). Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) stieg Histidin bei *fy* im Vergleich zu Ler (Abb. 3/89a) in beiden Geweben an, dabei wies der Sproß die höhere Konzentration auf. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigten beide Mutantengewebe höhere Konzentrationen, die Verteilung blieb unberührt.



**Abbildung 3/89:** der Graph zeigt die Histidinkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die Landsberg erecta - Pflanzen 28 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 29 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 35 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 44 Tage und bei 10 mM Nitrat 35 Tage. Bei *fy-1* sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 28 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 47 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 62 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 60 Tage und bei 10 mM Nitrat 55 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

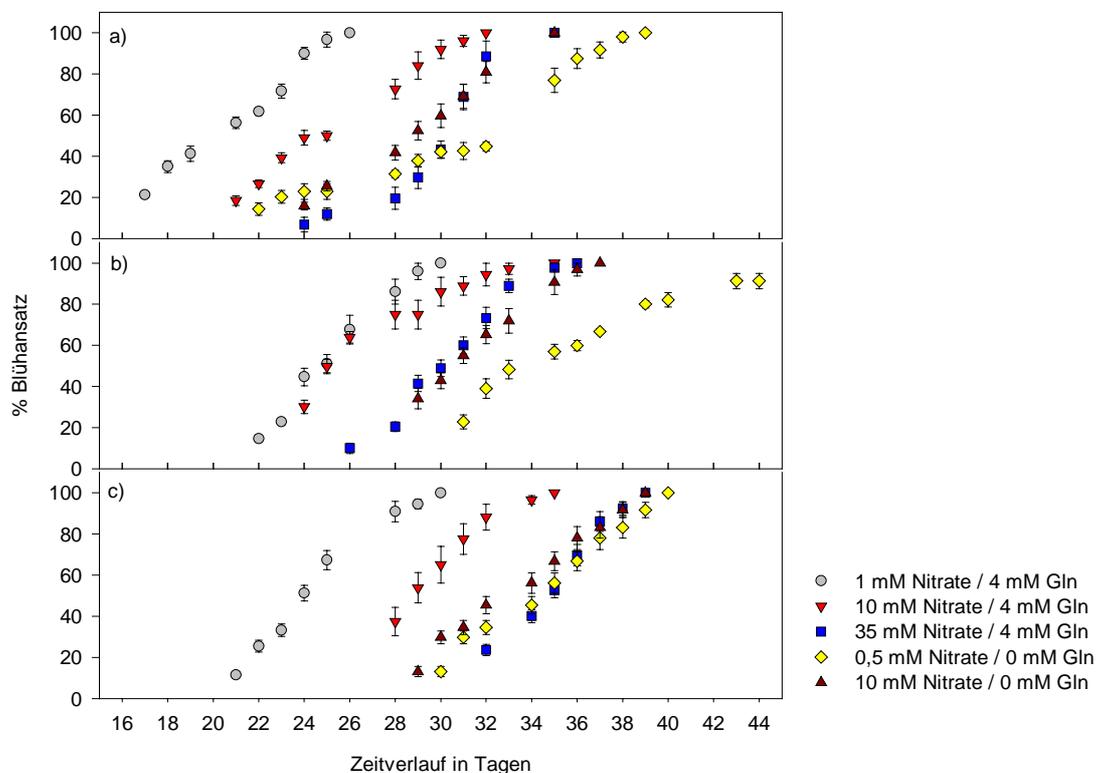
### Fazit zu *fy*:

- (i) Nitrat bewirkt auch bei *fy* eine deutliche Hemmung des Blühens. Diese Verzögerung mag stärker als beim Wildtyp Ler sein. Wie auch bei *fve* gilt hier, das die quantitativen Unterschiede jedoch nicht überbewertet werden sollten, die insgesamt die Blühzeiten so stark verschoben sind.

### 3.3. C24 und ANR1

ANR1 kodiert einen nitratinduzierten MADS-Box-Transkriptionsfaktor. Studien in der Gruppe von Forde haben gezeigt, daß es nach Nitratapplikation an lokalen Bereichen der Wurzeln induziert wird und die Entwicklung der Lateralwurzeln beeinflusst (Zhang et al. 1998). Der Nachweis seiner Funktion bei der Nitratinduktion von Lateralwurzeln wurde erbracht, indem Antisense- und Cosuppressionslinien von *Arabidopsis thaliana* mit verminderter Expression von ANR1 erzeugt wurden, bei denen die Induktion der Lateralwurzeln durch Nitrat abgeschwächt war im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyppflanzen.

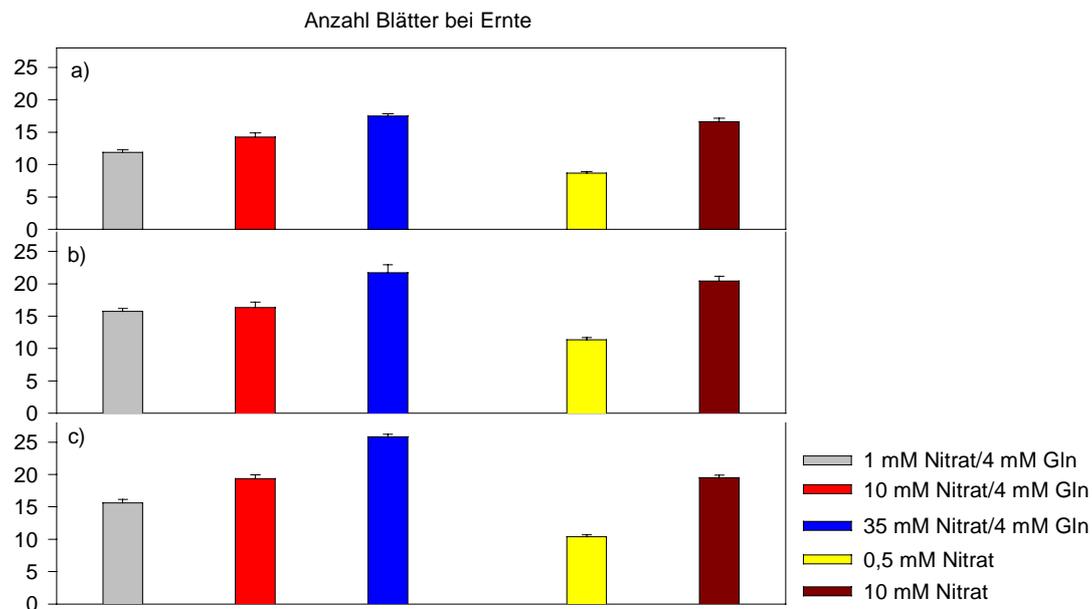
Wir wollten testen, ob die nitratinduzierte Hemmung der Blühinduktion in diesen Pflanzen ebenfalls beeinflusst ist. Außerdem ging es darum, erste Informationen über mögliche Veränderungen im Metabolismus dieser Pflanzen zu erhalten. Bei den beiden getesteten Genotypen handelt es sich um die beiden am stärksten durch Antisense (A1) oder Sense-RNA (S10) herunterregulierten Linien.



**Abbildung 3/90:** Die Graphik zeigt den Blühverlauf von *Arabidopsis thaliana* cv C 24 (a) und der ANR-Mutantengenotypen A1 (b) und S10 (c) unter verschiedenen Nitratangeboten Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 6-8$ ). Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $120 \mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Belichtungsdauer 12 h.

Bei den bisher besprochenen Wildtyp Col und Ler lagen die Kurven für 1 mM und 10 mM Nitrat, jeweils + 4 mM Gln, immer dicht beieinander, bei Ler liefen dann auch die Kurven für 35 mM Nitrat + 4 mM Nitrat und für die 10 mM-Bedingung ohne Gln direkt parallel zueinander, die Kurve für 0,5 mM Nitrat lief dann als letztes. Beim vorliegenden Ökotyp C24, der unter 120  $\mu$ E angezogen wurde, hingegen separierten sich die Kurven für 1 mM Nitrat + 4 mM Gln und 10 mM Nitrat + 4 mM Nitrat voneinander. Damit waren alle drei Kurven aus der Haupttestreihe getrennt voneinander. Wie bei den beiden anderen Wildtypen (Col: Abb. 3/7a, Ler Abb. 3/28) stieg die Blattzahl und die Sproßbiomasse bei C24 bei zunehmender externer Nitratversorgung in Gegenwart von Gln stetig an. Wie aus den Blühverlaufskurven ersichtlich, waren beide Genotypen der Mutante etwas verzögert (Abb. 3/90b,c) in ihrer Blühinduktion im Vergleich zum Wildtyp C24 (Abb. 3/90a). Beide Mutantengenotypen starteten mit der 1 mM Nitrat / 4 mM-Bedingung ungefähr zum gleichen Zeitpunkt, 4 – 5 Tage versetzt gegenüber dem Wildtyp. Bei A1 liefen dann aber die Kurven für 1 und 10 mM Nitrat + 4 mM Gln fast parallel, die Kurve für 35 mM Nitrat + 4 mM Gln war dann wieder leicht abgesetzt wie beim Wildtyp. Die beim Wildtyp vorliegende Trennung war hier also aufgehoben, der hemmende Einfluß von steigenden Nitratkonzentrationen auf die Blühinduktion wirkt im Vergleich zum Wildtyp bei der Mutante stufenweise zwischen 1 mM Nitrat und 10 mM Nitrat (jeweils + Gln) auf der einen Seite und 35 mM Nitrat/4 mM Gln auf der anderen Seite. Bei S10 liefen die drei Kurven mit ansteigender Nitratkonzentration in Gegenwart von Gln wiederum getrennt voneinander. Beim Vergleich der Blattzahl von C24 (Abb. 3/91a) und den beiden Mutanten-Genotypen (Abb. 3/91b,c) bei Einsetzen der Blühinduktion zeigte sich, daß beide Transformanten in Gegenwart von Gln höhere Blattzahlen entwickelten als der Wildtyp, dies war besonders deutlich bei S10 (Abb. 3/91c). Für alle drei Testreihen – C24 + A1 + S10 - gilt, daß die Blattzahl mit zunehmender Nitratkonzentration anstieg. Bei der Biomasse des Wildtyps (Abb. 3/92a) ergab sich eine deutliche Korrelation zwischen externem Nitratangebot und Biomasse, wenn Nitrat in Gegenwart von Gln angeboten wurde. Obwohl beide Genotypen später mit der Blüte begannen als der dazugehörige Wildtyp, zeigte sich bei der Biomasse von A1 (Abb. 3/92b) nicht unbedingt ein Hinweis darauf, daß dies auf eine starke Verlängerung der vegetativen Phase beruhte. Die Biomasse von A1 in Gegenwart von 1 mM Nitrat/4 mM Gln war zwar leicht erhöht, danach aber lagen beide weiteren Nitratkonzentrationen, die noch zusätzlich Gln enthielten, niedriger als die entsprechenden Wildtyp-Werte, obwohl die Pflanzen von C24 und A1 für jede Nitratbedingung zum gleichen Zeitpunkt geerntet worden sind. Dies

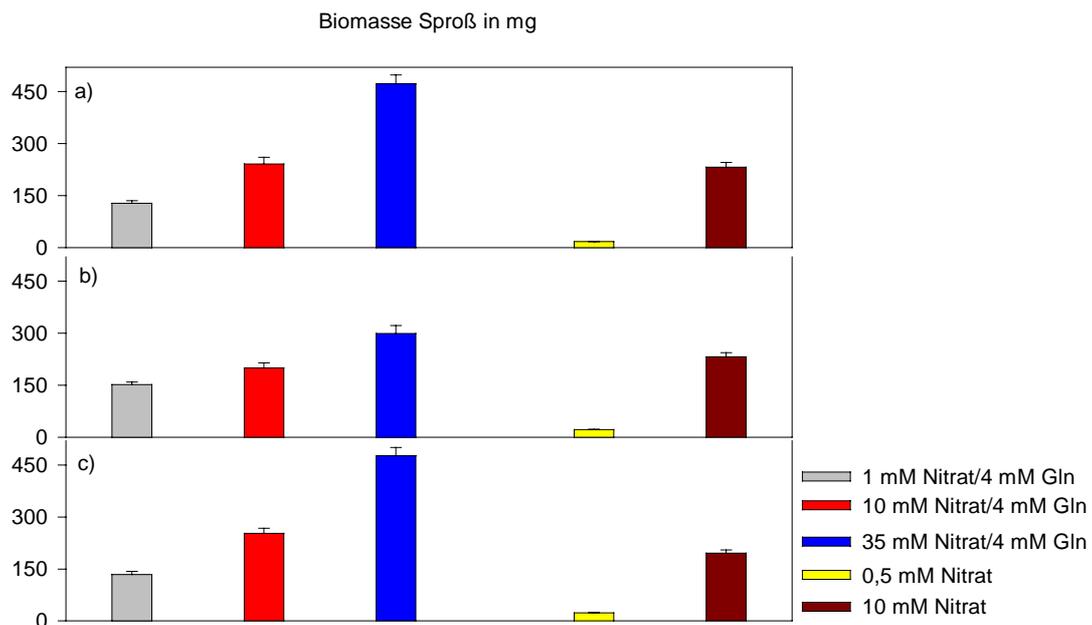
bedeutete, daß die Korrelation zwischen Sproßbiomasse und extern ansteigendem Nitrat bei A1 weniger stark ausgeprägt war als beim Wildtypen. Die S10-Pflanzen sind einen Tag zuvor oder danach geerntet worden (siehe Legende zu den Graphen). Bei dieser Transformante ergab sich eine ähnliche Steuerung der Biomasse durch extern angebotenes Nitrat in Gegenwart von Gln wie beim Wildtyp, steigendes Nitrat führt zur Zunahme der Biomasse.



**Abbildung 3/91:** der Graph zeigt die Anzahl der Blätter der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 10 - 15$ ).

Die Kurve für die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) startete bei C24 im Verhältnis zu den anderen Wildtyp früher und nicht als letzte Kurve, zog sich aber über einen längeren Zeitraum hinweg. Wie bei den beiden anderen Wildtyp auch führte die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) bei C24 zu einer sehr geringen Blattzahl und Sproßbiomasse. Die Kurve für die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war bei A1 nur leicht verzögert gegenüber dem Wildtyp. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war bei S10 zwar etwas verzögert gegenüber dem Wildtyp, zeigte aber einen steileren Kurvenverlauf. Auch hier galt wie bei den anderen Wildtypen und anderen Mutanten, daß die Pflanzen bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) in Bezug auf Blattzahl und auch Biomasse eigentlich verfrüht blühten, auch wenn sie zeitlich gesehen als letztes mit der Blüte begannen.

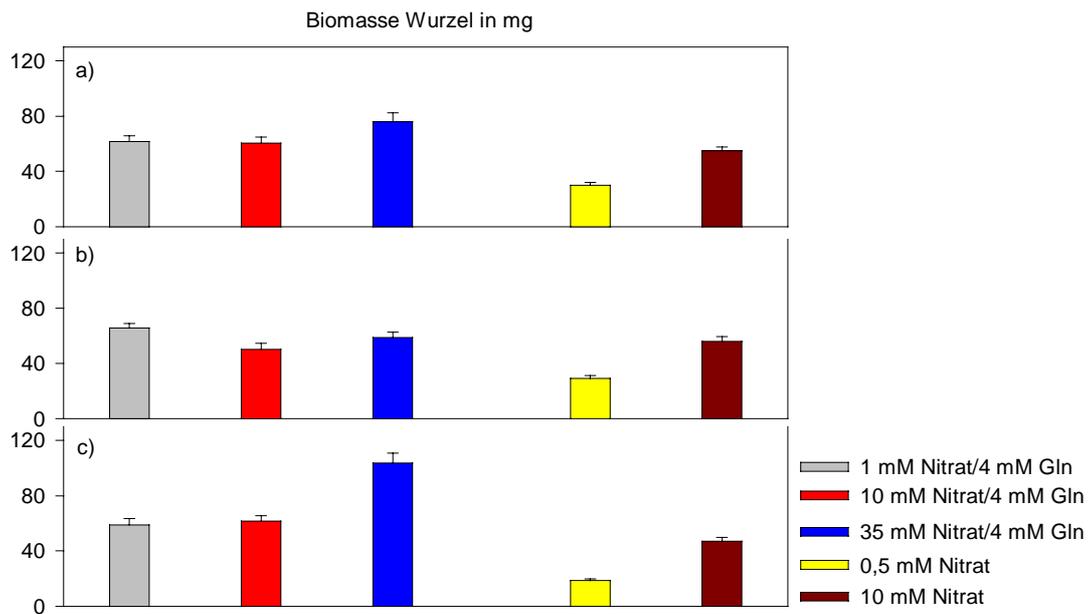
Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln begann bei C24 wie bei den anderen Wildtypen später als die entsprechenden Bedingung mit Gln, war allerdings nicht so stark zeitlich von dieser abgesetzt. Die höhere Lichtintensität hatte vermutlich eine raschere Blühinduktion zur Folge. Die 10 mM-Nitrat-Bedingung ohne Gln wies bei diesem Wildtypen eine ähnliche Sproßbiomasse wie die vergleichbare Bedingung mit Gln auf. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln blühte ebenfalls entsprechend später bei A1, endete aber fast zum selben Zeitpunkt wie die Bedingung mit Gln, die blühfördernde Wirkung von Gln verliert sich bei A1 etwas im Vergleich zum Wildtyp. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln fing bei S10 später an als die Gln-haltige Bedingung und lief bis zum Ende getrennt durch. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen die Werte für die Blattzahl vom Wildtyp und von den beiden Genotypen ebenso hoch wie die jeweilige vergleichbare Bedingung mit 10 mM Nitrat, Gln beeinflusste in diesen Transformanten damit nicht die Entwicklung der Pflanzen.



**Abbildung 3/92:** der Graph zeigt die, die Biomassen für Sproß der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage , bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage .Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage30, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 10 – 15).

Insgesamt spiegelten die Daten zu Blattzahl und Biomasse zum Zeitpunkt der Ernte bei den Gln-freien Bedingungen sowohl beim Wildtyp C24 als auch bei beiden Transformanten dasselbe Bild wieder, das sich aus der Hauptreihe ergab, steigende Nitratkonzentrationen führten zu erhöhten Blattzahlen und Sproßbiomassen.

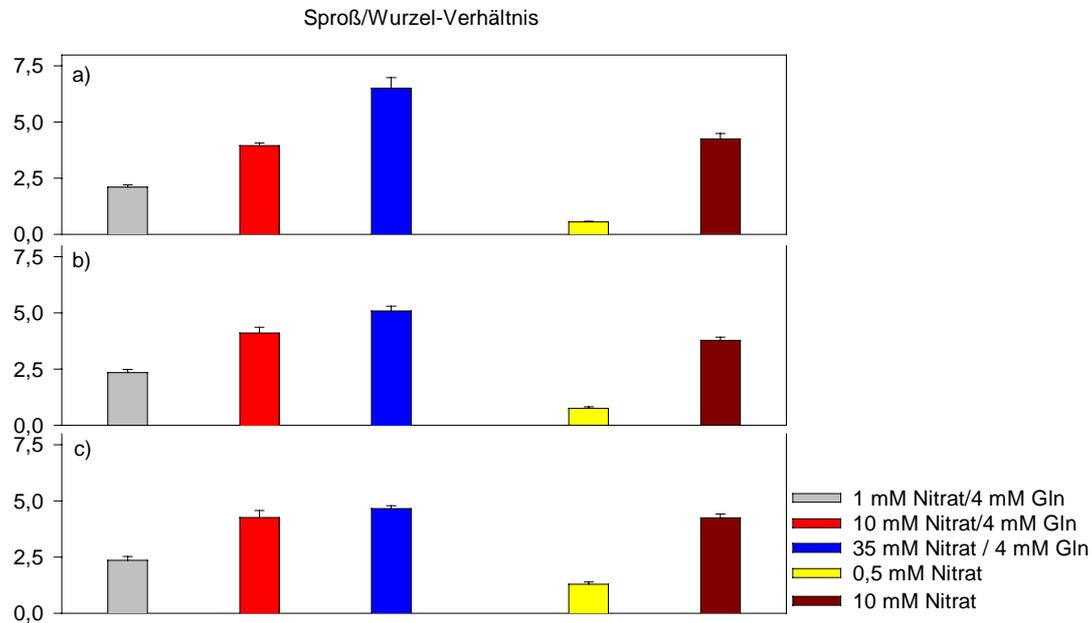
Die Wurzelbiomassen, die in der nachfolgenden Abbildung 3/93 dargestellt sind, dienen auch hier nur zur Ermittlung des Sproß/Wurzel-Verhältnisses.



**Abbildung 3/93:** der Graph zeigt die, die Biomasse für Wurzel der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 10 - 15$ ).

C24 (Abb. 3/94a) zeigte beim Sproß/Wurzel-Verhältnis erwartungsgemäß eine Zunahme bei ansteigender Nitratkonzentration, sowohl in der Hauptreihe in Gegenwart von Gln, als auch in den beiden Gln-freien Bedingungen. Der Vergleich der Gln-haltigen 10 mM-Nitrat-Bedingung und der Gln-freien 10 mM-Nitrat-Bedingung zeigte, daß Gln keinen nennenswerten Effekt auf das Sproß/Wurzel-Verhältnis hatte. Bei beiden Transformanten (Abb. 3/94b+c) zeigte sich, daß das Sproß/Wurzel-Verhältnis in der Hauptversuchsreihe mit Gln-Zusatz von 10 mM Nitrat nach 35 mM Nitrat nicht so stark anstieg wie beim Wildtyp. Auch bei Vergleich der beiden Gln-freien Bedingungen zeigte sich bei A1 und S10 ein geringerer Anstieg des Sproß/Wurzel-Verhältnisses von 0,2 mM Nitrat nach 10 mM Nitrat im

Vergleich zu C24, allerdings lag in den Transformanten das Verhältnis bei 0,2 mM Nitrat von vorneherein höher als bei C24. die An- oder Abwesenheit von Gln zeigte keinen Effekt auf das Sproß/Wurzel-Verhältnis sowohl im Wildtyp als auch in den beiden Transformanten.

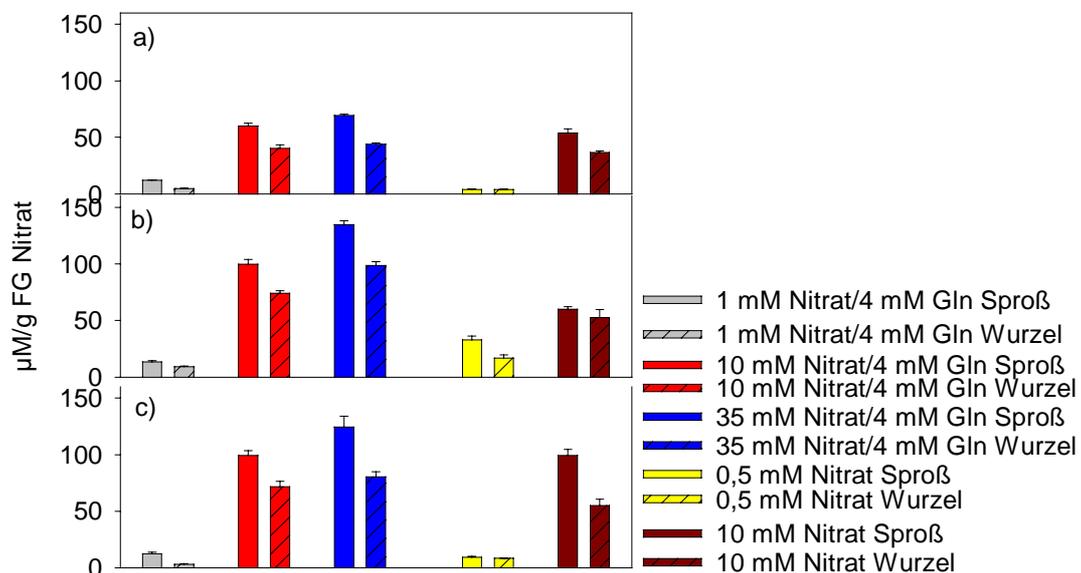


**Abbildung 3/94:** der Graph zeigt das Sproß/Wurzel-Verhältnis der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage , bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage .Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 10 - 15$ ).

ANR1 ist als Gen identifiziert worden, daß bei der Induktion von Lateralwurzeln bei Applikation von Nitrat an die Wurzeln einer Nitratdefizienten Pflanze beteiligt ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es ebenso bei der Regulation des Sproß/Wurzel-Verhältnisses als Antwort auf die Nitratzufuhr beteiligt ist.

Der interne Nitrat Spiegel spiegelte die externe Nitratversorgung wieder. Die beiden Transformanten zeigten dabei im Hauptversuch deutlich höhere interne Nitratkonzentrationen als der Wildtyp (Abb. 3/95a), wenn 10 mM und 35 mM Nitrat (jeweils mit Gln) angeboten wurden. Da die Biomassen von A1 und S10 niedriger bzw. gleich groß waren wie bei C24, beruhte dies nicht auf einer Anhäufung infolge langsameren Wachstums, zumindest bei S10. Auch die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und die 10mM Nitrat-Bedingung ohne Gln wies

bei den Genotypen etwas erhöhte Werte gegenüber C24 auf, vor allem A1 (Abb. 3/95b) wies dabei sogar höhere Spiegel als die andere Bedingung mit niedriger Nitratversorgung auf. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen die Konzentrationen bei C24 ebenso hoch wie die Spiegel der entsprechenden Bedingung mit Gln. Bei A1 zeigte sich ein Unterschied im internen Nitratgehalt zwischen An- und Abwesenheit von Gln, die Bedingung ohne Gln wies geringere Konzentrationen als ihre Vergleichsbedingung auf. Bei S10 ergab sich das gleiche Bild wie bei C24, nur dass die Konzentrationen höher lagen (Abb. 3/95c). Der erhöhte Nitratgehalt in den Transformanten zeigt, daß die geringere Empfindlichkeit des Sproß/Wurzel-Verhältnisses auf das Nitratangebot nicht auf eine verringerte Nitratakkumulation in den Transformanten beruhte.

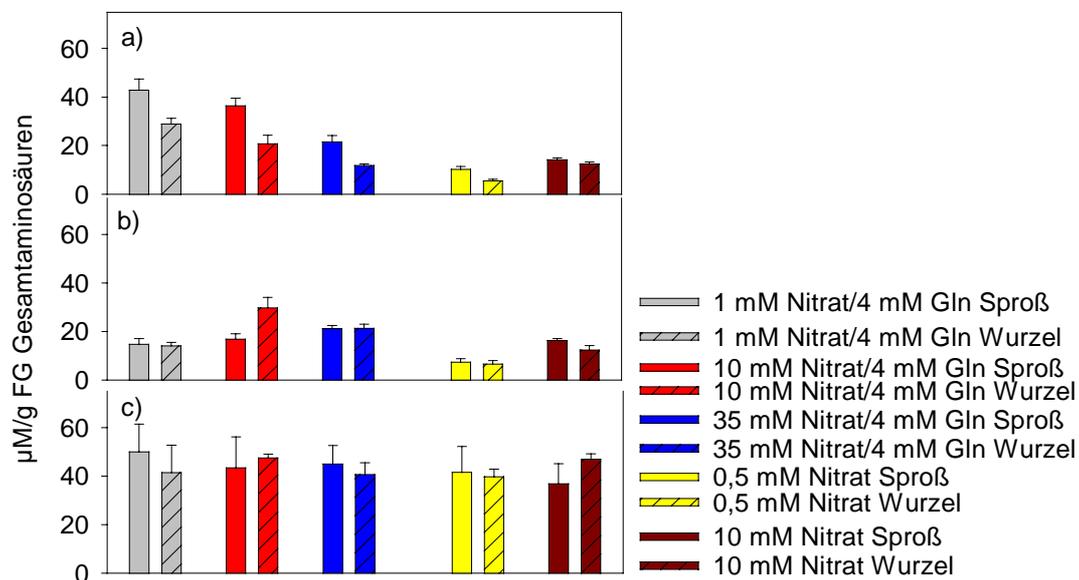


**Abbildung 3/95:** der Graph zeigt die Konzentration von Nitrat der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n =4-5).

Bei Betrachtung der beiden Bedingungen ohne Gln ergab sich bei A1 ein geringerer Anstieg des internen Nitratgehaltes mit ansteigender Nitratversorgung im Vergleich zum Wildtypen, bei S10 hingegen ein stärkerer Abhängigkeit vom externen Nitratpool.

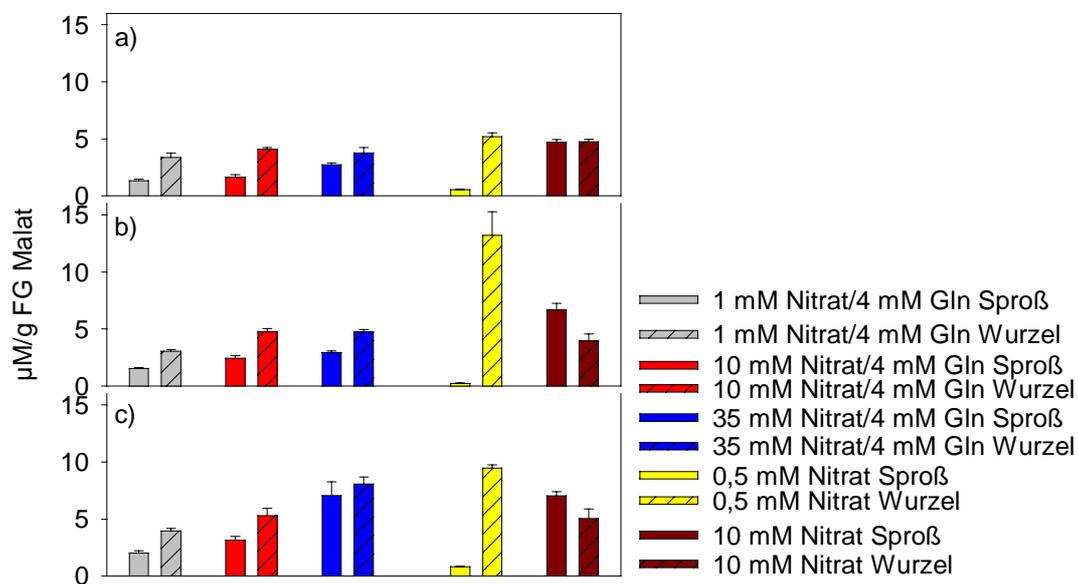
Bei den Gesamtamino Säuren zeigte sich, daß mit zunehmender externer Nitratversorgung in Gegenwart von Gln bei C24 ein Abnehmen der Gesamtamino Säuren in beiden Geweben ergab

(Abb. 3/96a). Auch in den beiden Bedingungen ohne Gln zeigten sich im Wildtyp niedrige Konzentrationen, wobei die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nur geringfügig unter der 10 mM-Bedingung ohne Gln lag. Dies spiegelt die Ergebnisse wieder, die sich bereits für Col und Ler ergaben. In allen Bedingungen wies der Sproß eine höhere Konzentration als die Wurzel auf. Bei A1 (Abb. 3/96b) sanken alle Werte im Vergleich zu C24 ab, zudem zeigte sich keine umgekehrte Abhängigkeit mehr vom externen Nitratspiegel, wenn die Medien zusätzlich Gln enthielten. Vielmehr zeigte sich tendenziell eine ganz leichte Zunahme der Gesamtaminosäuren bei zunehmender Nitratversorgung. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln reagieren ähnlich wie im Wildtyp. Insgesamt zeigte sich keine eindeutige Verteilung auf die beiden Gewebe mehr. Bei S10 (Abb. 3/96c) hingegen kam es bei allen Bedingungen zu einer deutlichen Erhöhung der internen Spiegel, beide Gewebe glichen sich dabei sehr aneinander an, dies trat nicht beim Wildtyp auf. Zudem trat keine sichtbare Beeinflussung durch die angebotenen Nitratkonzentrationen mehr auf, alle Bedingungen zeigten sehr ähnliche Konzentrationen. Auch Gln zeigte keinen Einfluß auf den Gesamtaminosäurenspiegel. Bei A1 zeigte sich bei den Gln-freien Bedingungen ein niedrigerer Spiegel an Gesamtaminosäuren gegenüber den entsprechenden Gln-haltigen Bedingungen, S10 hingegen zeigte keine Abhängigkeit von der externen N-Versorgung.



**Abbildung 3/96:** der Graph zeigt die Konzentration der Gesamtaminosäuren der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n =4– 5).

Bei Malat zeigte sich im Wildtyp (Abb. 3/97a) keine Abhängigkeit des Malatspiegels vom externen Nitratangebot, sofern Gln als zusätzliche N-Quelle vorhanden war. Die Hauptkonzentration lag dabei in der Wurzel. Nur bei überoptimaler N-Versorgung war Malat ungefähr gleich auf beide Gewebe verteilt. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) verschob sich das Gleichgewicht deutlich zur Wurzel hin, hier war die Konzentration von allen Bedingungen am höchsten. In der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen die Konzentrationen höher als in der vergleichbaren Bedingung mit Gln, zudem wiesen Sproß und Wurzel gleiche Konzentrationen auf. Damit ergab sich bei den Gln-freien Bedingungen im Sproß ein Anstieg des Malatspiegels in Abhängigkeit vom externen Nitratangebot. Bei beiden Genotypen zeigte sich im Gegensatz zu C24 eine leichte Tendenz eines Anstiegs der Malatkonzentration mit zunehmender Nitratkonzentration in Anwesenheit von Gln (Abb. 3/97b,c), wobei die Verteilung auf Sproß und Wurzel beibehalten wurde. Diese Tendenz war bei S10 stärker ausgeprägt als bei A1. In beiden Transformantengenotypen zeigte die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) erhöhte Wurzelwerte als der Wildtyp, A1 fast dreimal so hohe Werte, S10 einen fast doppelt so hohen Wert.

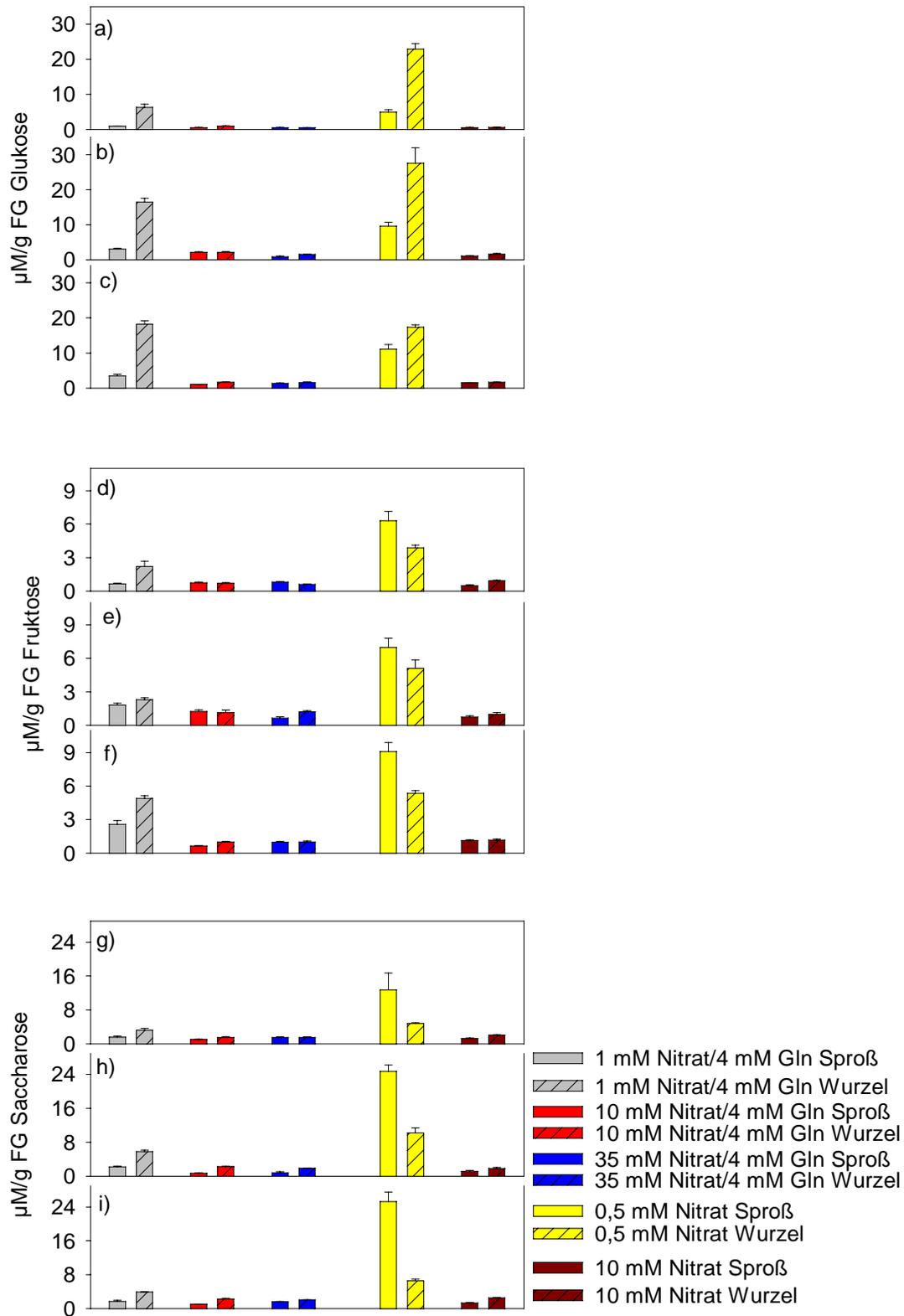


**Abbildung 3/97:** der Graph zeigt die Malatkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C24 - Pflanzen 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Die 10 mM-Nitrat-Bedingung ohne Gln führte jeweils bei A1 und S10 einen erhöhten Sproßwert gegenüber dem Wurzelgewebe des jeweiligen Transformanten, dessen Gehalt lag im Bereich des Wildtyp. Bei den beiden Genotypen zeigte sich damit bei Abwesenheit von Gln eine negative Korrelation für die Malatkonzentration bei ansteigendem Nitratspiegel für das Wurzelgewebe, dies trat bei C24 nicht auf.

Bei ansteigender Nitratversorgung in Gegenwart von Gln nahmen die reduzierenden Zucker, Saccharose und Stärke im C24-Wildtyp ab (Abb. 3/98a+d+g,99a). Dies zeigte sich vor allem beim Vergleich von 1 mM Nitrat/4 mM Gln zu 10 mM Nitrat/4 mM Gln, die Abnahme von 10 mM Nitrat/4 mM Gln nach 35 mM Nitrat/4 mM Gln war sehr gering bzw. nicht vorhanden. Saccharose reagierte insgesamt schwächer auf eine Veränderung im externen Nitratangebot (Abb. 3/98g) als die reduzierenden Zucker und Stärke. Auch dies ergab sich bereits bei den beiden anderen getesteten Wildtypen Col und Ler.

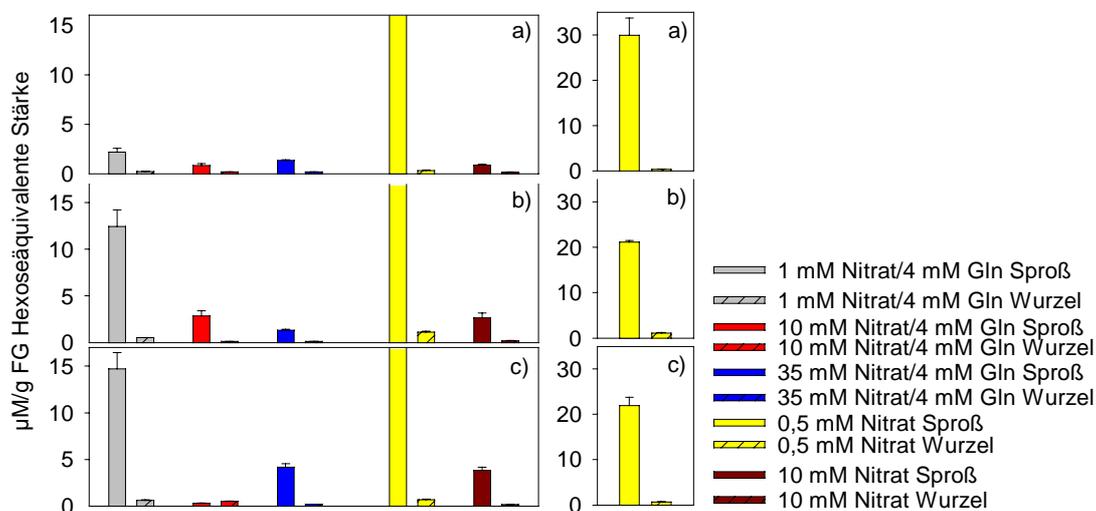
Im Vergleich zu den anderen Ökotypen Col (Abb. 3/14 b + 3/15b) und Ler (Abb. 3/31) zeigte C24 die gleiche Verteilung der Zucker auf die beiden Gewebe, unterschied sich aber in den Konzentrationen von den beiden anderen Wildtypen. Vor allem zwischen Col und C24 traten Unterschiede im Stärkegehalt bei aufsteigender Nitratreihe + Gln auf, die wohl auf die unterschiedlichen Lichtintensitäten bei der Anzucht zurückgingen. Unterschiede zwischen Ler und C24 traten vor allem in der Mangelbedingung auf, die höhere Lichtintensität führte bei C24 zu niedrigeren Glukosekonzentrationen im Vergleich zu Ler in der Mangelbedingung, Saccharose stieg hingegen tendenziell an. Fruktose und Stärke zeigten bei C24 hingegen kaum veränderte Konzentrationen bei Anzucht auf einem 0,5 mM Nitratmedium.



**Abbildung 3/98:** der Graph zeigt die Kohlenhydratkonzentrationen der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug  $20^{\circ}\text{C}$ , die Lichtintensität  $120 \mu\text{E/m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

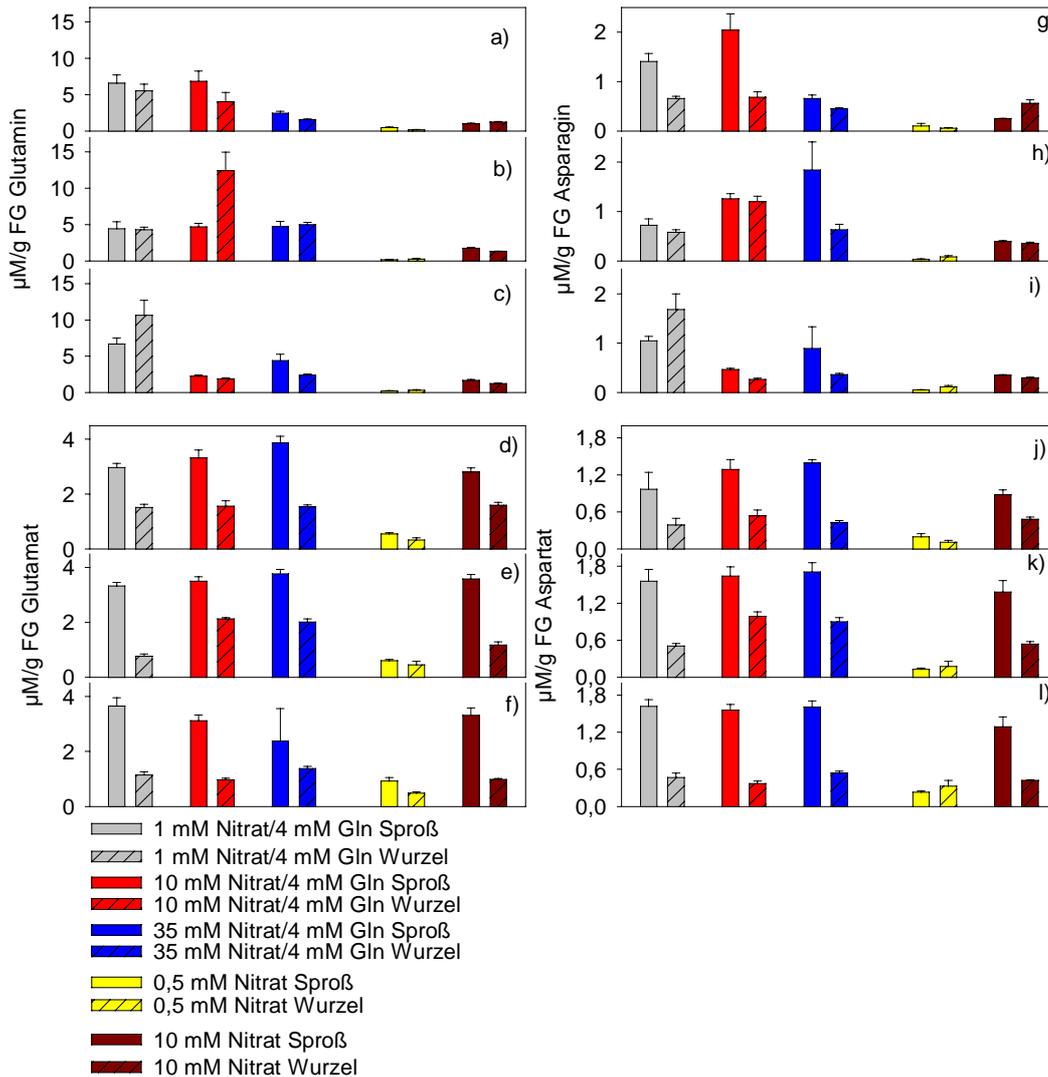
Der Hauptanteil lag bei den reduzierenden Zuckern und Saccharose bei C24 bei 1 mM Nitrat / 4 mM Gln in der Wurzel, bei Stärke im Sproß. Ansonsten zeigten Sproß und Wurzel ähnliche Kohlenhydratspiegel. Bei Mangelernährung (0,5 mM Nitrat) stiegen alle Kohlenhydratspiegel des Wildtyps deutlich an und lagen sogar höher als die Werte der niedrigen Nitraternährung mit 1 mM Nitrat/4 mM Gln. Bei Glukose blieb die Gewebverteilung gleich (Abb. 3/98a), bei Fruktose (abb 3/98d) und Saccharose (Abb. 3/98g) war der Hauptanteil im Sproß zu finden. Bei Stärke wiederum war die Verteilung gleich der in den anderen Bedingungen (Abb. 3/99a). Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen die Konzentrationen bei C24 für die Kohlenhydrate im gleichen Bereich oder etwas höher als die Spiegel der vergleichbaren Bedingung mit Gln.

Bei den Transformanten ergab sich das gleiche Bild, was die Reaktion auf das externe Nitratangebot anging, nur die Konzentrationen der Kohlenhydrate lagen bei beiden Genotypen höher als beim Wildtyp. Grundsätzliche Ausnahme war die Stärkekonzentration bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat), diese lagen bei A1 und S10 niedriger als beim Wildtypen. Jedoch wiesen beide Transformanten einen 4mal so hohen Stärkegehalt im Sproß wie C24 bei einer Anzucht auf 1 mM Nitrat/4 mM Gln auf.



**Abbildung 3/99:** der Graph zeigt die Stärkekonzentrationen der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4 – 5).

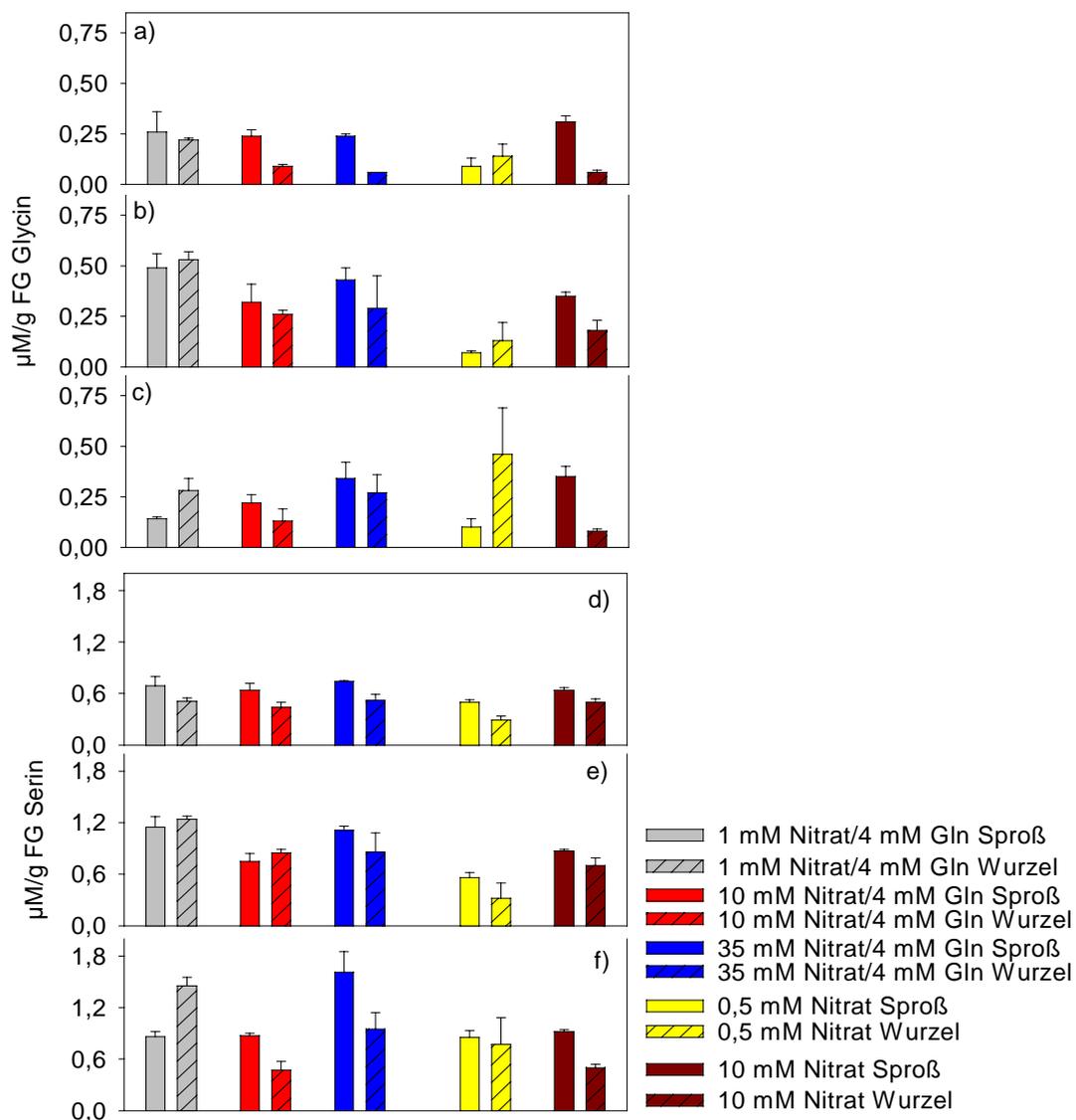
Bei den N-haltigen Aminosäuren (Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat) reagierte Glutamin im Gegensatz zu den anderen Wildtyp bei C24 (Abb. 3/100a) mit einer deutlicher sichtbaren Konzentrationsabnahme bei ansteigender Nitratreihe + Gln. Der Sproß wies dabei etwas höhere Spiegel auf als das Wurzelgewebe. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierten wie bei den anderen Wildtypen, beide Bedingungen wiesen sehr niedrige Konzentrationen auf. A1 (Abb. 3/100b) zeigte bei Glutamin keine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot, sofern Gln zusätzlich angeboten wurde. Ausnahme war die Wurzel bei 10 mM Nitrat / 4 mM Gln, hier lag allerdings auch ein großer Standardfehler vor. Bei S10 (Abb. 3/100c) stieg die Konzentration beider Gewebe bei 1 mM Nitrat / 4 mM Gln im Vergleich zu C24 deutlich an, bei den anderen beiden Gln-haltigen Bedingungen hingegen lagen die Spiegel beider Gewebe sehr niedrig. Bei Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln reagierten die Transformantengenotypen nicht anders als der Wildtyp. Glutamat zeigte bei C24 (Abb. 3/100d) im Sproß eine tendenzielle Zunahme mit ansteigendem Nitratangebot in der Gegenwart von Gln, die Wurzel wies immer die gleichen Konzentrationen auf. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies wie bei den anderen Wildtyp die niedrigsten Konzentrationen auf, die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln wies ähnliche Spiegel auf wie die entsprechende Bedingung mit Gln. A1 (Abb. 3/100e) und S10 (Abb. 3/100f) zeigten kaum Veränderungen in den Glutamatkonzentrationen im Vergleich zu C24, lediglich S10 zeigte bei der Hauptversuchsreihe mit der Kombination aus Nitrat und Gln im Sproß eine tendenzielle Abnahme. Asparagin zeigte bei C24 (Abb. 3/100g) keine Beeinflussung durch das externe Nitratangebot, wenn gleichzeitig Gln angeboten wurde. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln reagierten bei C24 wie bei Ler, sie nahmen gegenüber den Gln-haltigen Bedingungen deutlich ab. A1 (Abb. 3/100h) zeigte hingegen im Vergleich zu C24 im Sproß eine Konzentrationszunahme mit ansteigendem Nitratangebot, sofern auch Gln im Medium enthalten war. S10 (Abb. 3/100i) zeigte bei Asparagin im Hauptversuch die gleiche Verteilung wie Glutamin. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln wichen bei A1 und S10 in ihrer Verteilung nicht vom Wildtyp-Bild ab. Aspartat hingegen spiegelte sowohl bei C24 (Abb. 3/100j) als auch bei den beiden getesteten Genotypen (Abb. 3/100k,l) die Anordnung von Glutamat wieder. Alle vier Aminosäuren zeigten in den Bedingungen, die kein Gln enthielten, eine zunehmende Konzentration bei ansteigendem externen Nitratangebot, das mehr oder weniger stark ausgeprägt war.



**Abbildung 3/100:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei den Aminosäuren aus der Photorespiration zeigte sich im Wildtyp (Abb. 3/101a,d) bei den drei Gln-haltigen Nitratangeboten im Spröß kein Unterschied zwischen den internen Konzentrationen. Bei den Wurzeln ergab sich in C24 bei Glycin eine Abnahme mit ansteigenden Nitratkonzentrationen, zudem lagen die Wurzelwerte unter den Sprößwerten. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) lag mit ihren Werten etwa zwischen Spröß- und Wurzelwerten der anderen Bedingungen. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln lag mit ihrer Sprößkonzentration höher als die Vergleichsbedingung mit Gln, die Wurzel dagegen niedriger. Bei A1 (Abb. 37101b) waren die Glycinkonzentrationen meist erhöht gegenüber

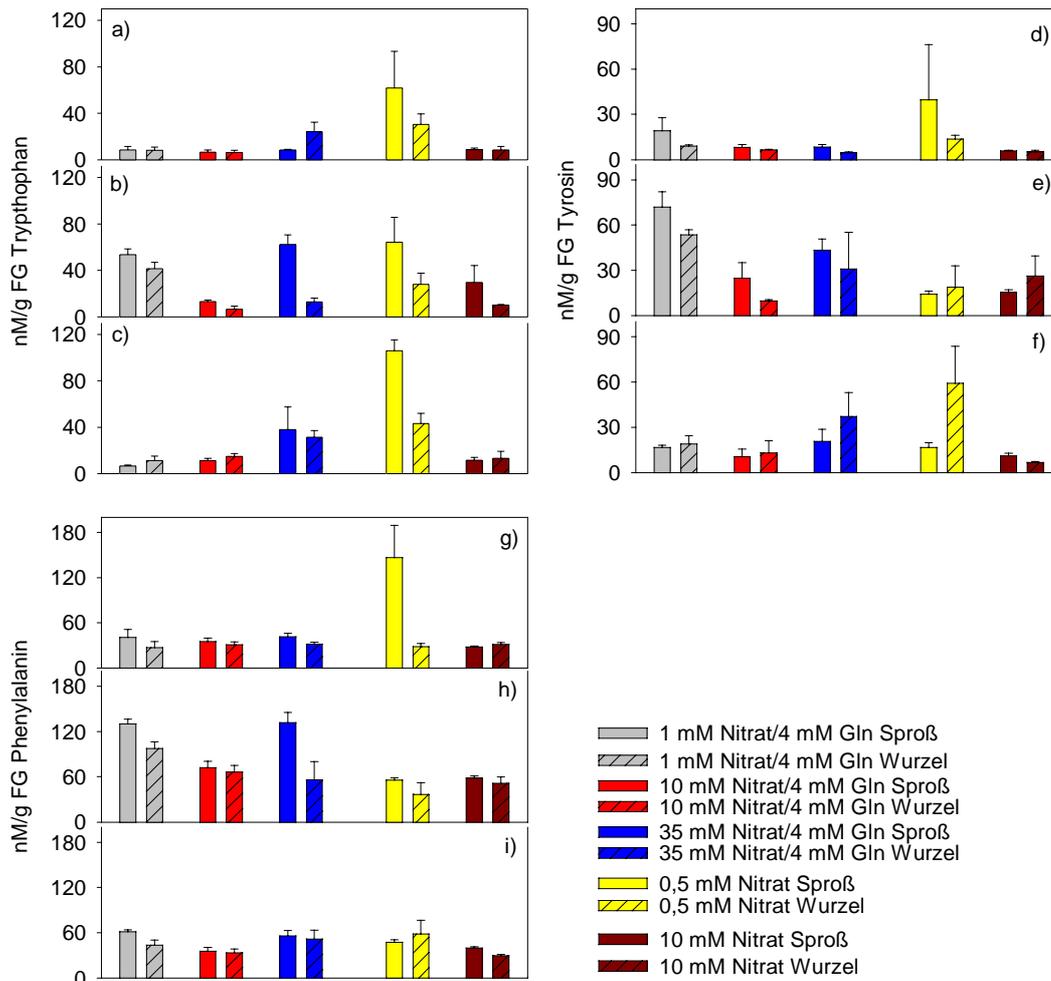
C24, vor allem in den Gln-haltigen Bedingungen. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) reagierte nicht anders als im Wildtyp, bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln stieg in der Transformantengenotype nur der Wurzelwert etwas an. Bei S10 lagen die Werte ähnlich wie beim Wildtyp, Sproß- und Wurzelwerte glichen sich jedoch mehr an (Abb. 3/101c). Der Wurzelwert der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) war deutlich erhöht im Vergleich zu Wildtyp und zu A1, die 10 mM-Bedingung ohne Gln hingegen blieb unverändert. Bei den Gln-freien Bedingungen ergab sich mit ansteigendem Nitratangebot ein Zunehmen der Sproßkonzentrationen für beide Aminosäuren in S10 im Vergleich zum Wildtyp.



**Abbildung 3/101:** der Graph zeigt die Konzentrationen von Glycin und Serin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n 4-5).

Auch bei Serin zeigte sich keine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot im Wildtyp (Abb. 3/101d), wenn gleichzeitig Gln angeboten wurde. Lediglich die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies etwas niedrigere Werte als die anderen Bedingungen auf. Der Sproßanteil war höher als der Wurzelanteil. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln war vergleichbar mit der entsprechenden Bedingung, die zusätzlich Gln enthielt. A1 (Abb. 3/101e) zeigte gegenüber C24 etwas erhöhte Werte bis auf die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat), dies betraf die Reihe mit Nitrat und Gln und die 10 mM-Bedingung ohne Gln. S10 (Abb. 3/101f) hingegen zeigte ein sehr uneinheitliches Verhalten, die Konzentrationen nahmen teilweise im Vergleich zu Wildtyp zu, während bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln kaum eine Veränderung eintrat. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierten mit einer leichten Konzentrationszunahme bei S10 gegenüber C24. Insgesamt ergab sich keine Steuerung der Aminosäuren aus der Photorespiration durch das externe Nitratangebot.

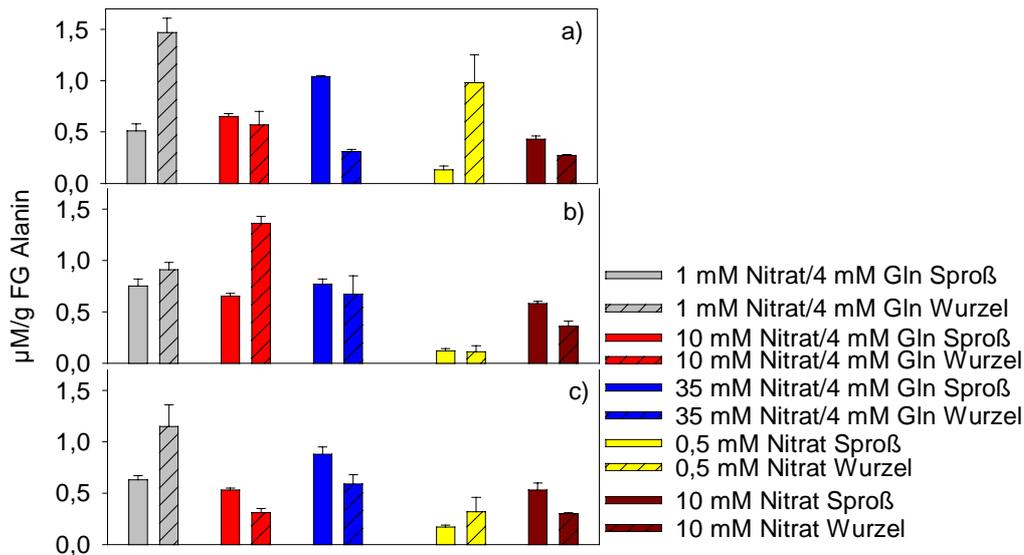
Bei den aromatischen Aminosäuren zeigte sich bei allen drei Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin beim Wildtyp (Abb. 3/102a,d,g) immer sehr niedrige Spiegel, die unabhängig vom externen Nitratangebot waren und kaum zwischen Sproß und Wurzel differierten. Ausnahme war die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat), hier war zudem der Sproßanteil höher als der Wurzelanteil. Bei A1 (Abb. 3/102b,e,h) kam es zu einer teilweisen Konzentrationssteigerung im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Verhalten trat bei allen drei aromatischen Aminosäuren auf. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) hingegen zeigte bei A1 für Tyrosin und Phenylalanin niedrigere Werte als bei C24. Dafür stiegen die Konzentrationen der 10 mM-Bedingung ohne Gln bei A1 im Vergleich zum Wildtyp an. Bei S10 zeigten sich ähnlich niedrige Werte wie bei C24, aber auch die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) nahm bei Phenylalanin (Abb. 3/102i) ab, bei Tryptophan (Abb. 3/102c) und Tyrosin (Abb. 3/102f) erhöhten sich die Spiegel. Hierbei wurde aber die Verteilung auf Sproß und Wurzel vertauscht. In der 10 mM-Bedingung ohne Gln ergab sich kein Unterschied zwischen C24 und S10.



**Abbildung 3/102:** der Graph zeigt die Konzentration von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, 30, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n=4-5$ ).

Bei Alanin zeigte bei C24 (Abb. 3/103a) sich bei ansteigender Nitratreihe mit 4 mM Gln, eine Umkehr der Alaninverteilung auf die Gewebe. Bei niedriger Nitratversorgung lag der Hauptanteil an Alanin in der Wurzel, bei 10 mM Nitrat waren Sproß- und Wurzelkonzentration gleich und bei 35 mM Nitrat lag die Sproßkonzentration höher als die der Wurzel. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte ähnliche Werte wie 1 mM Nitrat + 4 mM Gln, nur etwas niedriger. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln spiegelte die Verhältnisse bei 10 mM Nitrat + 4 mM Gln wieder, aber auch waren die Konzentrationen niedriger. Beim Wildtypen ergab sich eine negative Korrelation für die Wurzelkonzentration an Alanin mit ansteigender externer Nitratversorgung in Abwesenheit von Gln, für den Sproß eine geringe

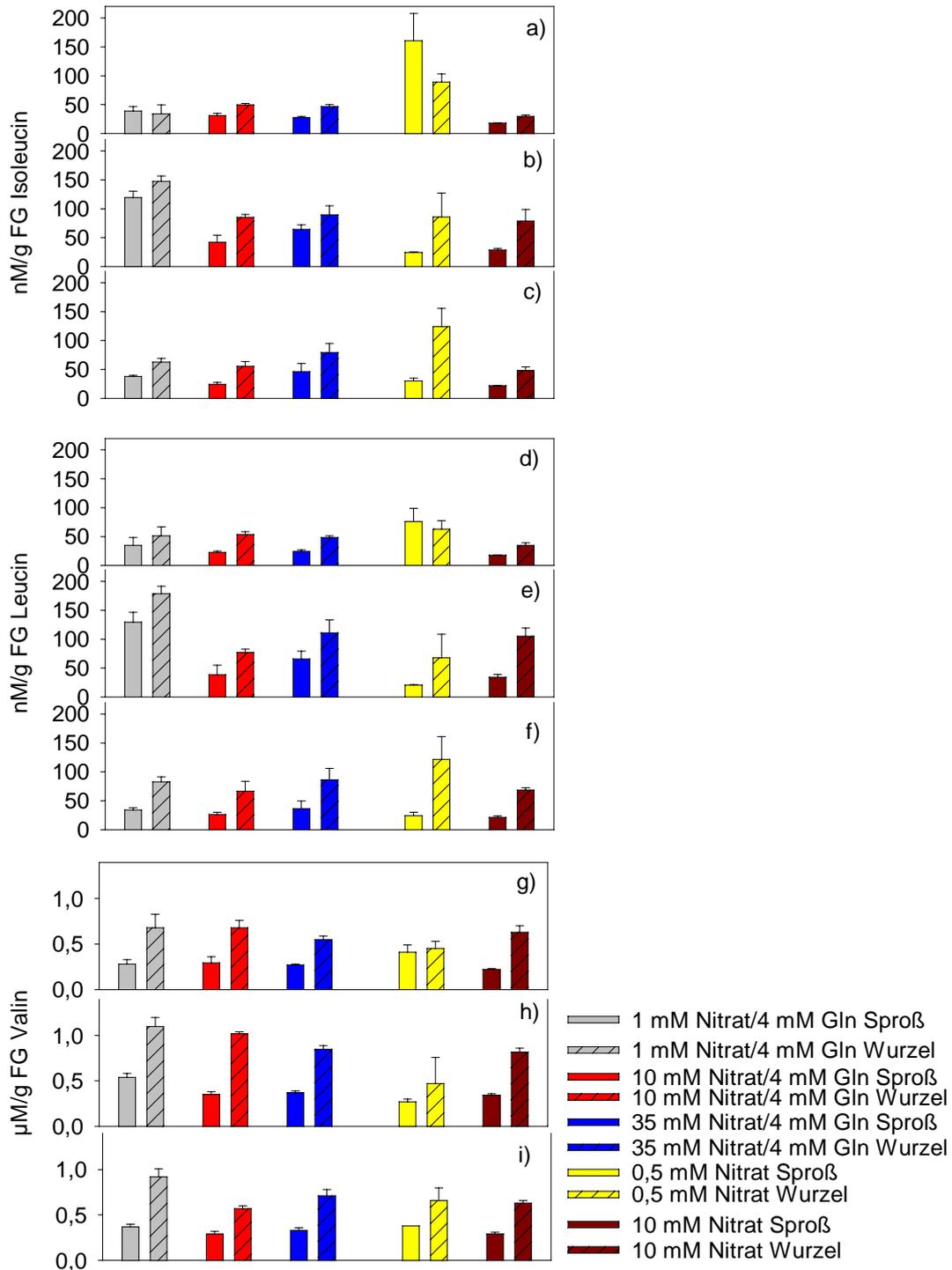
positive Korrelation. Bei A1 (Abb. 3/103b) und S10 (Abb. 3/103c) kam es zu sehr uneinheitlichen Verschiebungen im Vergleich zum Wildtyp, sofern das Medium neben Nitrat auch noch Gln enthielt, es ergab sich keine Korrelation zum externen Nitratangebot. Bei beiden Transformantengeotypen sank der Gehalt in der Wurzel der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) sehr stark ab, die 10 mM-Bedingung ohne Gln blieb unbeeinflusst. Das Abnehmen der Wurzelkonzentration für Alanin mit zunehmender Nitratkonzentration in C24 ohne zusätzliches Gln trat bei beiden Genotypen nicht auf.



**Abbildung 3/103:** der Graph zeigt die Alaninkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Bei den aliphatischen Aminosäuren gab es nur wenige Änderungen. Bei C24 wiesen Isoleucin (Abb. 3/104a) und Leucin (Abb. 3/104d) in etwa die gleichen Konzentrationen auf, sofern Nitrat zusammen mit Gln angeboten wurde, Valin lag wesentlich höher (Abb. 3/104g). Für alle drei Aminosäuren ergab sich keine Abhängigkeit vom externen Nitratspiegel. Der Hauptanteil der Aminosäure lag dabei jeweils in der Wurzel. Ausnahme war die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat), Diese zeigte bei Isoleucin noch einen höheren Sproßwert, bei Leucin und Valin war die Verteilung auf die Gewebe jedoch gleich. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigte kaum veränderte Konzentrationen als die Bedingung mit Gln im

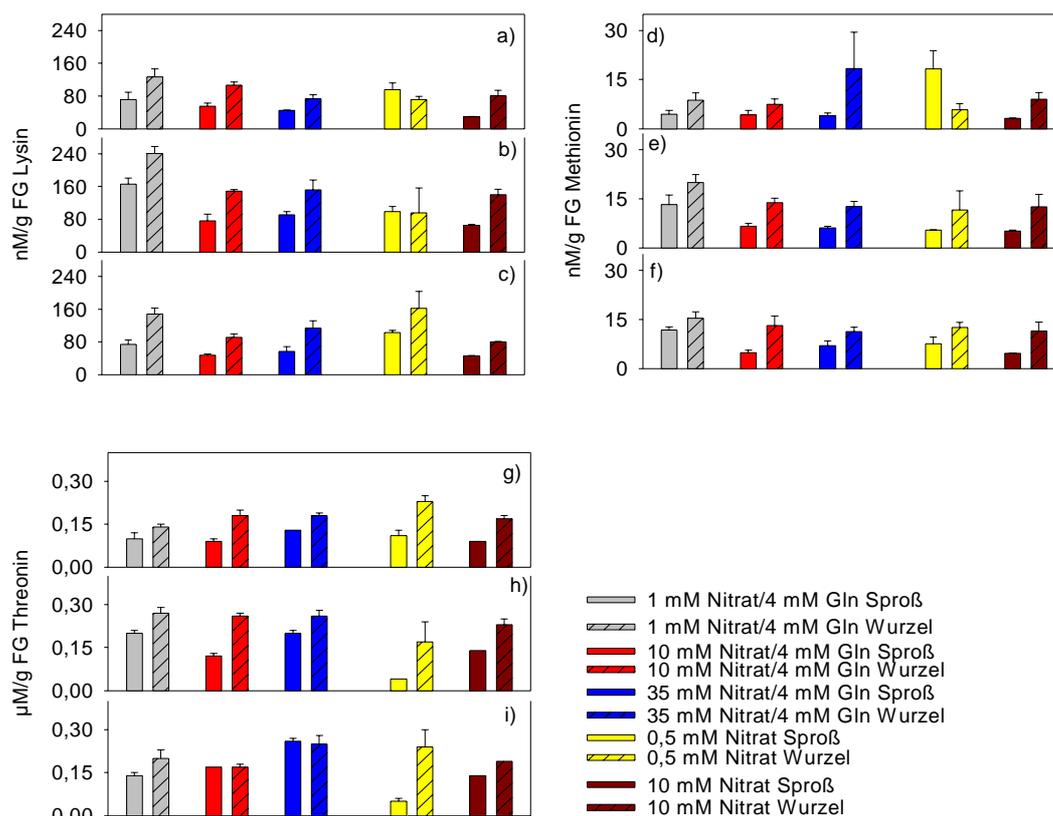
Wildtypen auf. Beide Genotypen zeigten gegenüber dem Wildtyp erhöhte Aminosäurespiegel.



**Abbildung 3/104:** der Graph zeigt die Konzentration der Aliphaten der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 μE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Vor allem A1 (Abb. 3/104b,e,h) wies in dieser Gln-freien Bedingung mehr als doppelt so hohe Konzentrationen zumindest in der Wurzel auf bei aufsteigender Nitratreihe mit Gln. Beim Sproß waren diese Zunahmen etwas schwächer. In der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) sanken bei A1 die Werte aller drei Aminosäuren zumindest im Sproß teilweise deutlich ab im Vergleich zu C24. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln wiederum lag bei A1 im Bereich der Vergleichsbedingung mit Gln. Auch S10 wies im Sproß der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) niedrigere Konzentrationen als der Wildtyp auf, dafür stieg der Wurzelanteil an. Bei der 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigten sich bei S10 die gleichen Konzentrationen wie bei der vergleichbaren Bedingung mit Gln.

Bei den Aminosäuren, die sich von Aspartat ableiten, zeigte sich kein ausgeprägter Einfluß durch Nitrat. C24 (Abb. 3/105a,d,g) zeigte bei den ansteigenden Nitratkonzentrationen, die in Gegenwart von Gln angeboten wurden, sowohl in Sproß als auch in der Wurzel tendenziell eine leichte Abnahme.

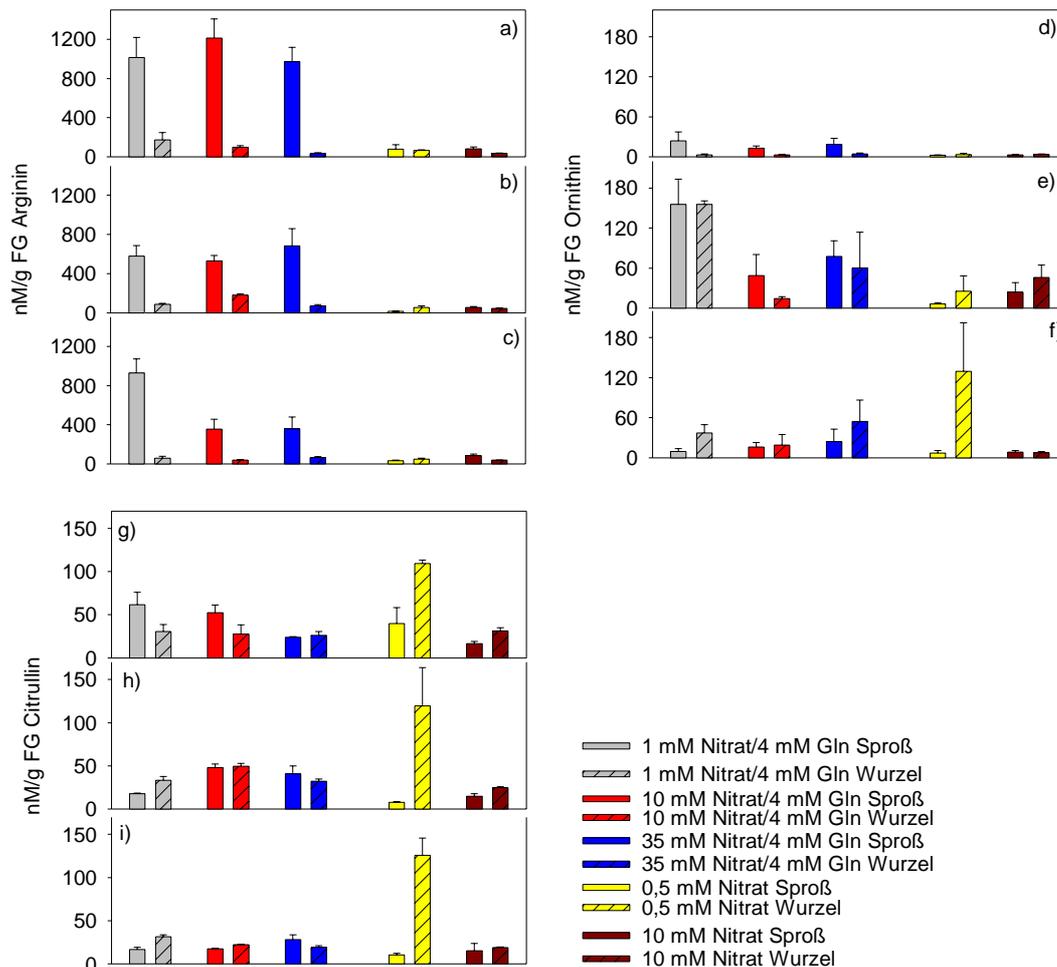


**Abbildung 3/105:** der Graph zeigt die Konzentration von Lysin, Methionin und Threonin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120 µE/m<sup>2</sup> und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n = 4-5).

Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies trotz geringer Nitratversorgung ebenso vergleichbare Konzentrationen wie die anderen Bedingungen auf. Hier war der Hauptanteil jedoch zum Sproß hin verlagert, bei den anderen Bedingungen war es jeweils die Wurzel. Die Konzentrationen in der 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen nur geringfügig unter denen der vergleichbaren Bedingung mit Gln. Die beiden Transformantengenotypen zeigten etwas erhöhte Lysinspiegel (Abb. 3/105b,c), aber die tendenzielle Abnahme im Wildtyp bei aufsteigender Nitratreihe trat hier nicht auf. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte in Bezug auf die Gewebe dieselbe Verteilung bei den Transformanten wie alle anderen Bedingungen. Auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln reagierte in Wildtyp und Genotypen gleich. Bei Methionin (Abb. 3/105d+e+f) ergab sich ein ähnliches Bild wie bei Lysin, nur waren die Spiegel etwas ein Zehntel so hoch. Threonin (Abb. 3/105h,i) zeigte dasselbe Bild wie Lysin, nur wiesen Wildtyp und Genotypen in der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) immer die gleiche Verteilung auf. Insgesamt wies A1 dabei immer etwas höhere Aminosäurespiegel auf als S10.

Bei den Aminosäuren aus dem Harnstoffwechsel zeigte sich bei Arginin zwischen C24 (Abb. 3/106a) und den beiden Transformanten (Abb. 3/106b,c) nur in Bezug auf die Konzentrationen ein Unterschied, nicht in Bezug auf die Verteilung. Beinhaltete das Medium neben Nitrat auch noch Glutamin, so stiegen die Sproßkonzentrationen bei C24 sprunghaft an, ohne Gln war der Unterschied zwischen Sproß und Wurzel kaum vorhanden. Bei A1 und S10 sanken dann diese hohen Sproßwerte deutlich ab im Vergleich zum Wildtyp in der Hauptversuchsreihe, die Konzentrationen der Bedingungen, die kein zusätzliches Gln beinhalteten, waren gleich bei Wildtyp und Transformanten. Bei Citrullin (Abb. 3/106d) ergab sich für den Wildtyp mit steigender Nitratkonzentration + Gln eine leichte Abnahme des Spiegels, der Sproß lag meist etwas über der Wurzel. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) wies die Wurzel einen mehr als doppelt so hohen Wert wie der Sproß auf. Auch in der 10 mM-Bedingung ohne Gln wies die Wurzel bei C24 die höhere Konzentration auf, insgesamt lagen die Spiegel aber niedriger als bei der Bedingung mit Gln. Sowohl A1 (Abb. 3/106e) als auch S10 (Abb. 3/106f) wichen leicht von dieser Verteilung ab, vor allem S10 wies niedrigere Spiegel auf. In beiden Fällen glichen sich die beiden Gewebe bei S10 meist aneinander an. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) hingegen zeigte sich in diesem Genotyp ein größerer Unterschied zwischen Sproß und Wurzel im Vergleich zum Wildtyp. Bei Citrullin ergab sich in den beiden Gln-freien Bedingungen für Wildtyp und für die beiden

Transformantengentypen eine abnehmende Wurzelkonzentration mit zunehmender Nitratkonzentration.

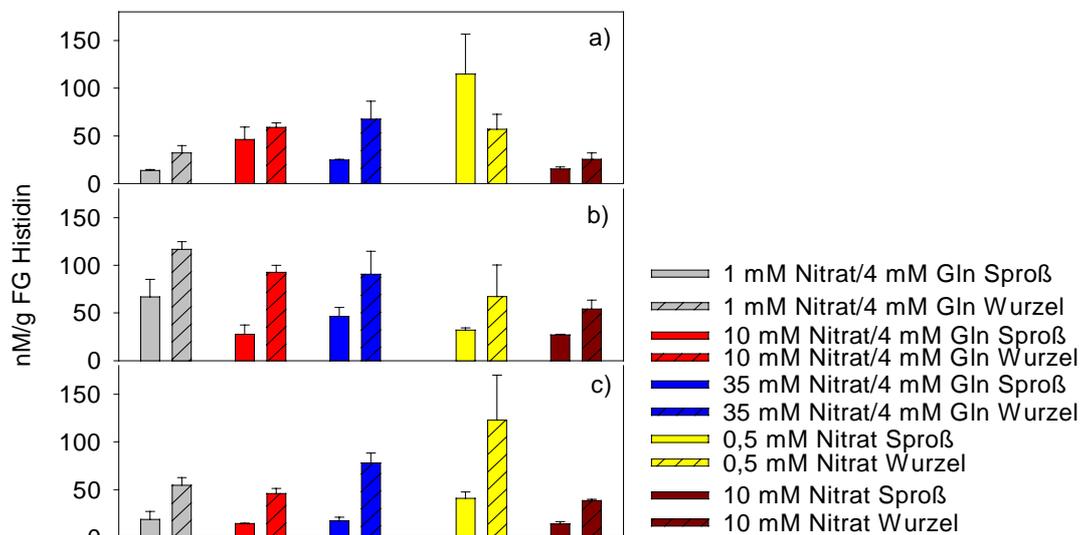


**Abbildung 3/106:** der Graph zeigt die Konzentration von Arginin, Citrullin und Ornithin der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Bei Ornithin hingegen reagierten beide Transformantengentypen deutlich anders als der Wildtyp. Bei C24 (Abb. 3/106g) zeigten die Sprosse eine höhere Konzentration als die Wurzeln, sofern das Medium Nitrat und Gln enthielt. Eine Abhängigkeit von der angebotenen Nitratkonzentration trat dabei aber nicht auf. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigten ähnliche Werte wie die Wurzeln der anderen drei Bedingungen, also sehr niedrig. Bei A1 (Abb. 3/106h) stieg die Konzentration in Sproß und Wurzel bei 1 mM Nitrat / 4 mM Gln um das vielfache gegenüber dem Wildtyp an, in den beiden anderen Bedingungen mit Nitrat und Gln sanken die Spiegel dann wieder ab, lagen aber immer noch

über denen des Wildtyp. Auch die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und die 10 mM-Bedingung ohne Gln lagen über den vergleichbaren Werten des Wildtyp, zeigten dabei aber höhere Wurzel als Sproßwerte. Bei S10 (Abb. 3/106i) hingegen zeigten die drei Bedingungen mit Gln nur leicht erhöhte Spiegel gegenüber dem Wildtyp, dabei war die Verteilung zwischen Sproß und Wurzel zugunsten der Wurzel vertauscht. Hier zeigte die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) die höchste Wurzelkonzentration, während die 10 mM-Bedingung ohne Gln nur leicht über den C24-Werten lag.

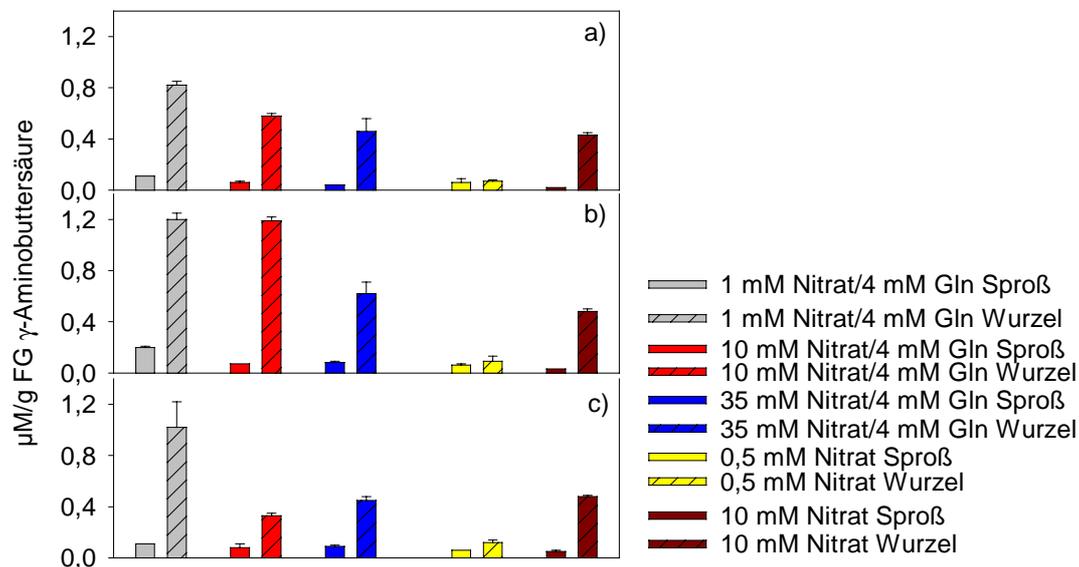
Bei Histidin zeigte sich mit steigender Nitratversorgung und Gln eine tendenzielle Zunahme beim Wildtyp (Abb. 3/107a), der Hauptanteil lag dabei jeweils in der Wurzel. Bei der Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat), die die höchsten Spiegel zeigte, war das Verhältnis zwischen Sproß und Wurzel umgedreht gegenüber den anderen Bedingungen. Die 10 mM-Bedingung ohne Gln spiegelte die Bedingung mit Gln wieder, die Konzentrationen waren jedoch niedriger. Bei A1 (Abb. 3/107b) zeigte sich eher eine abnehmende Konzentration mit steigender Nitratkonzentration, jeweils mit Gln, im Vergleich zu C24. Dies galt allerdings nur für den Sproß, bei der Wurzel ergab sich keine klare Linien. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte ähnlich hohe Werte wie die anderen Bedingungen und auch die 10 mM-Bedingung ohne Gln war gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht, bei den Gln-freien Bedingungen trat also kaum eine Beeinflussung durch das externe Nitratangebot auf.



**Abbildung 3/107:** der Graph zeigt die Histidinkonzentration der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Bei S10 (Abb. 3/107c) hingegen kam es zu vergleichbaren Werten wie bei C24, die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte jedoch wie A1 eine höhere Wurzelkonzentration als im Sproß.

Bei  $\gamma$ -Aminobuttersäure kam es im Wildtyp (Abb. 3/108a) sowohl im Sproß als auch in der Wurzel zu einer Abnahme der internen Konzentration mit zunehmenden Nitratkonzentrationen, sofern noch Gln anwesend war. Die Wurzel wies dabei die höheren Konzentrationen als der Sproß auf. Die Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) zeigte in beiden Geweben gleich niedrige Werte, die 10 mM-Bedingung ohne Gln lag geringfügig unter den Werten der 10 mM Nitrat + 4 mM Gln-Bedingung.



**Abbildung 3/108:** der Graph zeigt die Konzentration von  $\gamma$ -Aminobuttersäure der geernteten Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte. Bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln sind die C 24 - Pflanzen 26 Tage alt, Bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage. Bei A1 (b) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 30 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 36 Tage und bei 10 mM Nitrat 33 Tage, bei S10 (c) sind die Pflanzen bei 1 mM Nitrat/4 mM Gln 25 Tage alt, bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln 26 Tage, bei 35 mM Nitrat/4 mM Gln 37 Tage, bei 0,5 mM Nitrat 37 Tage und bei 10 mM Nitrat 32 Tage. Die Wachstumstemperatur betrug 20°C, die Lichtintensität 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  und die Lichtdauer 12 h. Geerntet wurde 30 – 90 min nach Lichtbeginn. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ( $n = 4-5$ ).

Beide Transformantengenotypen (Abb. 3/108b,c) zeigten ein ähnliches Bild wie C24, dabei schwankten die Konzentration in den Wurzeln der Nitrat + Gln-Bedingungen, sodaß sich keine deutlichen Abhängigkeiten von den externen Nitratkonzentrationen ergaben. Mangelbedingung (0,5 mM Nitrat) und 10 mM-Bedingung ohne Gln zeigten keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp.

**Fazit zu ANR1:**

- (i) Die Hemmung der Blühinduktion durch hohe Nitratkonzentrationen ist in Transformanten mit verringerter ANR1-Expression nicht aufgehoben.
- (ii) Der verspätete Beginn der Blühinduktion bei beiden Transformanten beruht wahrscheinlich eher auf ein verlangsamtes Wachstum als auf eine direkte Beeinflussung der ANR1-Mutation auf die Nitratwahrnehmung.
- (iii) Beide Transformanten zeigen interresanterweise einen geringeren Einfluß der Nitratkonzentration auf das Sproß/Wurzel-Verhältnis als der Wildtyp C24. Dies trat vor allem beim Übergang von 10 mM Nitrat nach 35 mM Nitrat hin auf, wobei es nicht zu einer erniedrigten Nitratakkumulation in den Transformanten kam. Brian Forde hat die Aufgabe von ANR1 dahingehend charakterisiert, daß es notwendig ist, eine lokale Stimulation des Wachstums von Lateralwurzeln zu ermöglichen, wenn Nitrat lokal an einer Stelle des Wurzelsystems einer nitratdefizienten Pflanze angeboten wird. es es gibt sich kein direkter Zusammenhang, was dies mit der Inhibierung des Wurzelwachstums bei Nitratakkumulation in einer Pflanze zu tun hat, außer das beide Phänomene auf Nitrat beruhen.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, den Einfluß von Nitrat auf das Blühverhalten von *Arabidopsis thaliana* zu ermitteln. Es ist bekannt, daß hohe Nitratkonzentrationen die Blühinduktion verzögern (Trewaras 1983, Bernier 1993), während es bei niedrigen Nitratkonzentrationen zu einer raschen Blüte kommt. Die externen Nitratkonzentrationen beeinflussen auch die Biomasseallokation (Scheible et al.. 1997), steuern das Sproß/Wurzel-Verhältnis und beeinflussen viele Enzymaktivitäten aus dem Primärstoffwechsel vom Nitratangebot. Bisher ist keine konkrete Forschung darüber bekannt, wie genau das Nitratangebot bzw. Nitrat das Umschalten von der vegetativen zur reproduktiven Phase bei *Arabidopsis thaliana*, einer fakultativen Langtagpflanze beeinflusst.

Die vorliegende Arbeit konnte bestätigen, daß ein limitierendes Stickstoff-Angebot zu einer verfrühten Blühinduktion führt, und zeigte zum ersten Mal, daß die Hemmung der Blühregulation auf einer Regulation beruht, die durch Nitrat selbst angeregt wird und nicht auf eine Regulation durch Metabolite aus der Nitratassimilation wie z.B. durch Aminosäuren.

Blühen ist ein sogenannter „default“-Vorgang, der zunächst unterbunden werden muß, um der Pflanze den Durchlauf einer vegetativen Phase zu ermöglichen. Durch Signale (auch Florigene genannt), die sowohl im Blatt produziert werden (chemische Stoffe, deren Natur noch nicht aufgeklärt ist) als auch am Sproßapex registriert werden (Vernalisation), tritt dann der Eintritt in die reproduktive Phase ein. Es ist bereits vieles darüber bekannt, in welchem Maße die Photoperiode, Temperatur, Vernalisation oder auch Wellenlänge des Lichtes zum Beispiel bei verschiedenen Ökotypen sowohl vegetative Phase als auch die Umschaltung in die reproduktive Phase beeinflusst. Die unterschiedlichen Signale werden dabei an verschiedenen Organen der Pflanze registriert. Tageslänge oder auch die Lichtqualität wird von den Blättern wahrgenommen, die dann ein bisher noch nicht näher charakterisiertes Signal über das Phloem zum Sproßapex hin abgeben. Vernalisation hingegen wird direkt am Sproßapikalmeristem wahrgenommen. Auf der anderen Seite zeigt Nitrat hingegen sehr starke Auswirkungen gerade an der Wurzel, was sich aus der Rolle als wichtiges Nährmineral ergibt. Es ist bekannt, daß die Signale aus dem Blatt über das Phloem auch in die Wurzeln transportiert wird, es könnte hier also eine Beeinflussung der Blühsignale durch Nitrat stattfinden. Dies gilt jedoch auch für den Sproß, da der Nitratmetabolismus nicht nur auf die Wurzel beschränkt ist.

Um die Signalwirkung von Nitrat testen zu können, ohne auf Nitrat als N-Quelle angewiesen zu sein, wurden zunächst mehrere Aminosäuren auf ihre Qualitäten als Ersatz-N-Quelle ausgetestet. Dabei wurden grundsätzliche Parameter wie Biomasse, Blattanzahl, Nitrat, Gesamtaminosäuren und Kohlenhydrate bei Nitratanzucht und Anzucht in Gegenwart von verschiedenen Aminosäuren gegenübergestellt, um die beste Ersatz-N-Quelle für Nitrat zu finden. Unter Berücksichtigung aller Faktoren hat sich dabei Glutamin als guter Ersatz-N-Lieferant erwiesen. Das Pflanzenwachstum auf 4 mM Gln führt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Wachstumsraten auf hohen Nitratkonzentrationen. Des Weiteren wurde die Signalwirkung von Nitrat nicht beeinträchtigt, Nitrat führt in Anwesenheit von Gln immer noch zu einer Inhibierung der Bildung von Lateralwurzeln (Gabi Meyer zu Hörste, eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Es hat sich gezeigt, daß dieses schnellere Wachstum und die damit verbundene raschere Blühinduktion nicht auf einen pH-Effekt von Glutamin beruht. Nachdem Gln als Ersatz-N-Quelle festgelegt war, wurden die Nitratkonzentrationen verändert, um die Signalwirkung auf die Blühinduktion beobachten zu können.

Die Arbeit enthält vier verschiedene Ansätze, um einen möglichen Einfluß von Nitrat auf die Blühinduktion zu ermitteln:

- 1.) Nitrat wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in Gegenwart von Glutamin als Ersatz N-Quelle angeboten, um die grundsätzliche Frage zu klären, ob Nitrat verzögernd auf der Blühinduktion wirkt.
- 2.) Nitrate wurde in unterschiedlichen Konzentration unter verschiedenen Photoperioden angeboten. Es ist bekannt, daß *Arabidopsis thaliana* eine fakultative Langtagpflanze ist, die unter Kurztagbedingungen eine deutliche Verzögerung der Blühinduktion zeigt. Dies stellte eine Möglichkeit dar, das Zusammenspiel zwischen Nitrat als Nährstoff und Licht zu ermitteln und zugleich festzustellen, wie stark die jeweilige Gewichtung ist.
- 3.) Es wurden verschiedene bekannte Blühmutanten mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen angezogen, um festzustellen, in welchem Maße Nitrat als einer der wichtigsten Nährstoffe das Blühverhalten steuert, wenn Gene aus den

verschiedenen Signalwegen der Blühinduktion mutiert sind, bzw. ob eine Mutation unabhängig von der externen Nitratversorgung greift.

- 4.) In einem weiteren Testansatz wurde eine definierte Mutante, welche eine Mutation in einem MADS-Bos Gen aufweist, ebenfalls unter verschiedenen Nitratkonzentrationen angezogen, um zu sehen, in welchem Ausmaß die Mutation in dem sogenannten ANR-Gen, daß die Wurzelarchitektur unter verschiedene Nährstoffangeboten bei Arabidopsis steuert (Zhang & Forde, 1998) die Blühinduktion beeinflusst. Dieses Gen bewirkt eine Wurzelverlängerung bei lokal begrenzten Nitratangeboten. Die Blühinduktion unterliegt jedoch hauptsächlich Signalen aus der Sproßregion (Araki et al 1998). Wie in diesem Fall der Zusammenhang zwischen Sproß und Wurzelverhältnissen gegeben ist, sollte in dieser Testreihe ermittelt werden.

Alle Versuchsreihen wurden als sterile Anzuchten auf Agarplatten durchgeführt, da dies die Anwendung von Glutamin ermöglichte und auch eine definierte Nährstoffkonzentration vorgegeben werden konnte, zum anderen aber auch die Anzucht unter definierten Licht- und Temperaturverhältnissen erfolgen konnte. Solche Bedingungen hätte man auch mit einer Sandanzucht in Klimakammern erzielen können, dies ermöglicht aber nicht die Verwendung von Glutamin als Ersatz-N-Quelle. Außerdem dauern solche Versuchsreihen wesentlich länger und sind auch anfälliger gegenüber Schädlingen. Auf der anderen Seite hat man dann jedoch die Möglichkeit, die gewählte Nährstoffkonzentration jeden Tag zuzuführen, während es bei den Agarplatten zu einem graduellen Verbrauch an Nährstoffen kommt, der nicht ausgeglichen werden kann. Durch die Zugabe von Glutamin als Ersatz-N-Quelle und dem damit verbundenen rascheren Wachstum wurde das Problem umgangen, daß die Platten austrockneten und damit ein weiterer, jedoch unerwünschter Effekt die Blühinduktion beeinflusst.

#### **4.1 Wirkung von Nitrat auf der Blühinduktion**

Als grundsätzliche Aussage aus der Doktorarbeit ist abzuleiten, daß mit zunehmender externer Nitratversorgung eine Verzögerung der Blühinduktion eintrat. Da Biomasse und der Blattzahl zum Zeitpunkt der Blühinduktion mit externer Nitratzufuhr anstiegen, beruhte die Verzögerung der Blühinduktion auf einer Verlängerung der vegetativen Phase. Die Änderungen im externen Nitratgehalt führten zu einer entsprechenden Änderung des internen

Nitratgehaltes, während die Gesamtaminosäuren mit den N-speichernden Aminosäuren kaum auf die externe Nitratversorgung reagierten, jedoch mit abnehmender Tageslänge absanken. Malat, daß als Gegenion zu Nitrat synthetisiert wird, um eine Alkalisierung bei der Nitratassimilation zu verhindern, mag ebenfalls von der externen Nitratkonzentration beeinflußt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur zwei Gewebetypen, nämlich Sproß und Wurzel geerntet. Diese wurden nicht weiter aufgetrennt, sodaß zum einen der gesamte Malatgehalt der Zellen und des weiteren der Malatgehalt verschiedener Pflanzenbereiche zusammen gemessen wurden. Somit konnte im vorliegenden Testsystem kein direkter Zusammenhang ermittelt werden. Die Kohlenhydrate nahmen mit ansteigender Nitratversorgung ab. Scheible et al. haben 1997(a) nachgewiesen, daß eine Pflanze entweder Stärke oder Nitrat anhäuft, bei *Arabidopsis thaliana* kann dies – zumindest beim vorliegenden Erntezeitpunkt – auf alle Kohlenhydrate ausgedehnt werden.

#### **4.2 Einfluß von Nitrat auf die Blühinduktion unter verschiedenen Photoperioden**

Im vorliegenden Ansatz ging es um den Einfluß von Nitrat auf die Blühinduktion und in welchem Maß die Tageslänge dies beeinflußt. Dabei ergaben sich mehrere Fragen:

##### ***Hat Nitrat einen hemmenden Einfluß auf die Blühinduktion ?***

Nitrat hat einen hemmenden Einfluß auf die Blühinduktion in der Col-Varietät. Untersuchte man dies unter dem Einfluß verschiedener Photoperioden – 8 h, 12 h und 16 h Licht, so zeigte sich die Hemmung besonders deutlich bei der kurzen Photoperiode und ist auch noch beim 12 h / 12 h-Lichtregime sichtbar. Interessanterweise ging dieser Effekt bei Langtagbedingungen sehr stark verloren.

Der Zeitpunkt des Blühens kann zu falschen Schlußfolgerungen führen, wenn Änderungen in der Wachstumsrate auftreten. Deswegen wird bei Beobachtungen des Blühverhaltens die Blühzeit auch immer in Relation gesetzt zu Parameter, die Auskunft über das physiologische Alter einer Pflanze geben, dies wären Daten zur Blattzahl oder auch Biomasse. Es hat sich gezeigt, bei kurzer Photoperiode deutliche Unterschiede bei Blattzahl und Biomasse zwischen den einzelnen Nitratangeboten auftraten, mit zunehmender Nitratkonzentration kam es zu

einer verlängerten vegetativen Phase. Dies ergab sich ebenfalls bei der intermediären Tageslänge mit 12 h Licht, bei langer Photoperiode ergaben sich dagegen kaum Unterschiede bei Blattzahl und Biomasse in Bezug auf die verschiedenen Nitratkonzentrationen. Grundsätzlich zeigte sich, daß Blühen durch Nitrat verzögert wird, auch wenn man es in Bezug zu Blattzahl oder Biomasse setzt, die bei einer Blütrate von ca. 80 % erreicht sind.

Die Konzentrationen an externem Nitrat, die die Blühinduktion beeinflussen, sind ähnlich denen, welche das Sproß/Wurzel-Verhältnis beeinflussen. Das Sproß/Wurzel-Verhältnis ist ein weiterer Parameter, bei dem bekannt ist, daß es durch Stickstoffversorgung und speziell durch Nitrat beeinflusst wird. Daß das Sproß/Wurzel-Verhältnis von der N-Versorgung abhängig ist, haben Scheible et al. 1997(b) bei *Nicotiana plumbaginifolia* gezeigt.

Um zu überprüfen, ob das externe Nitratangebot den internen Nitratspiegel beeinflusste, wurde auch Nitrat gemessen. Dabei zeigte sich unabhängig von der Photoperiode, daß der interne Nitratgehalt im angewandten Testsystem fast ausschließlich von der externen Nitratversorgung abhängig war. Auch unter Langtagbedingungen kam es dabei zu einem Anstieg des internen Nitratspiegels, wenn die externe Nitratversorgung zunahm. Die Abwesenheit der nitratabhängigen Hemmung der Blühinduktion beruhte damit nicht auf einen fehlenden Anstieg des internen Nitratspiegels, vielmehr wurde die Nitratinduzierte Inhibierung durch das Photoperioden-Signal überwunden.

Die Spiegel der Aminosäuren blieben im allgemeinen konstant bzw. fielen bei ansteigenden Nitratkonzentrationen leicht ab, die allgemeine Strategie wurde in ihrer Funktionalität bestätigt. Die Beeinflussung des internen Nitratgehaltes durch das externe Nitratangebot spiegelte sich nicht bei den Aminosäuren – weder bei den Gesamtaminosäuren noch bei den einzelnen Aminosäuren – wieder. Die wichtigen N-speichernden Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat und Alanin stellen den höchsten Anteil an den Gesamtaminosäuren und sind teilweise direkte Derivate der Nitratassimilation. Die Aminosäuren reagierten lediglich bei der höchsten Nitratkonzentration mit einer leichten Abnahme der Konzentrationen. Auf der anderen Seite reagierten die Aminosäuren sehr stark auf die Photoperiode; je kürzer die Tageslänge und damit desto länger die vegetative Phase, desto mehr sanken die Aminosäurekonzentrationen ab, dies galt sowohl für die Gesamtaminosäuren als auch für die einzelnen Aminosäuren. Ausnahme war Arginin, dieses nahm mit abnehmender Tageslänge zu. Arginin ist Vorläufer für Putrescin, einem Polyamid,

dem Signalwirkung bei der Blühinduktion nachgesagt wird (Caffaro & Vincente 1995). Leider war es technisch nicht möglich, die Polyamide zu messen, aber bei weiteren Untersuchungen zu diesem Thema sollten sie berücksichtigt werden. Wenn sich Korrelationen zwischen dem externen Nitratangebot und der Aminosäurekonzentration ergaben – dies traf für Glycin und Serin aus der Photorespiration sowie Tyrosin und die aliphatischen Aminosäuren zu – dann nur unter Langtagbedingungen. Da die aufgeführten Aminosäuren aber keine direkten Derivate von Nitrat sind wie z.B. Glutamin und Glutamat und zudem die Blühinduktionskurven gezeigt haben, daß bei 16 h Tageslänge das Nitratsignal nicht zum Tragen kommt, kann eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäuren am Nitratsignal ausgeschlossen werden.

Ebenso kam es bei ansteigenden Nitratangebot zu einer allgemeinen Abnahme der Kohlenhydrate. Bei den Kohlehydraten hingegen ergaben sich deutliche Korrelationen zwischen ansteigenden Nitratspiegeln und abnehmenden Zucker- und Stärkekonzentrationen. Am geringsten betroffen hat sich dabei der Saccharosespiegel gezeigt. Saccharose steht als Drehpunkt zwischen den reduzierenden Zuckern und Stärke, der Umbau des einen in den anderen läuft immer über Saccharose ab, wahrscheinlich zeigt dieser Zucker daher weniger starke Reaktionen auf Nitratveränderungen als die reduzierenden Zucker und Stärke.

Malat zeigte weder in Bezug auf die Nitratkonzentrationen noch auf die Photoperiode eine Korrelation. Malat wird als Gegenion zu Nitrat bei dessen Assimilation produziert, um eine Alkalisierung in der Zelle zu vermeiden. Dabei wird die Synthese von Malat und weiteren organischen Säuren durch Nitrat stimuliert (Scheible et al. 1997). Wäre Nitrat allein für den Spiegel der organischen Säuren verantwortlich, so sollte sich eine Korrelation zwischen externer Nitratversorgung und Gehalt an organischer Säure – hier eingeschränkt auf Malat, andere organische Säuren sind nicht bestimmt worden – ergeben, der jedoch nicht eintrat. Zum einen wurden nur zwei Gewebetypen geerntet, sodaß sich gewebespezifische Unterschiede nicht ausprägen konnten, zum anderen gab es nur einen Erntezeitpunkt. Die organischen Säuren werden außerdem nicht nur als Antwort auf Nitratassimilation synthetisiert, sondern entstehen auch in verschiedenen Bereichen des Primärstoffwechsels (Beispiel Zitratzyklus) als normale Zwischenprodukte. Um einen genaueren Zusammenhang zwischen Malat und Nitrat ermitteln zu können müßte man eine feinere Gewebeeinteilung – sink-Blatt, source-Blatt und Wurzel – durchführen, zum anderen aber auch mehrere Ernten über den Tag hinweg durchführen. W.-R. Scheible hat in seiner Dissertation 1996 für

*Nicotiana plumbaginifolia* gezeigt, daß die Malatsynthese durch Nitratassimilation stimuliert wird, dies konnte aufgrund des Versuchablaufs in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

### ***Wie agiert Nitrat als Signalstoff?***

Aus den Ergebnissen, die in dieser Doktorarbeit erarbeitet worden sind, ergibt sich, daß der interne Nitratgehalt parallel zum ansteigenden externen Nitratgehalt zunimmt und das mit zunehmender externer Nitratkonzentration zu einer Verzögerung der Blühinduktion eintritt. Die Verzögerung der Blühinduktion bei ansteigenden Nitratkonzentrationen und parallel zunehmenden internen Nitratkonzentrationen wird von der Tageslänge moduliert, bei 16 h Photoperiode zeigt sich nur ein sehr schwacher, kaum signifikanter Unterschied zwischen den Blühverlaufskurven zu den verschiedenen Nitratangeboten, obwohl die internen Nitratspiegel dem externen Nitratangebot folgten. Bei 12 h Tageslänge zeigte sich ebenfalls eine Parallele zwischen externem Nitratangebot und internem Nitratspiegel und es ergab sich eine Auftrennung zwischen den verschiedenen Blühverlaufskurven, da das Photoperiodensignal hier schwächer war als bei der langen Photoperiode. Dieser Effekt der Auftrennung des Blühverlaufs zwischen den unterschiedlichen Nitratkonzentrationen war am deutlichsten bei der kurzen Photoperiode mit 8 h Licht ausgeprägt. Ebenso wie bei den beiden anderen Photoperioden zeigte sich, daß mit zunehmenden externem Nitratangebot die internen Nitratkonzentrationen anstiegen. Dabei zog sich der Beobachtungszeitraum bei 8 h Tageslänge so sehr in die Länge, daß die Beobachtung der Pflanzen auf 35 mM Nitrat / 4 mM Gln nicht bis zum Ende der Blühverlaufskurve durchgeführt werden konnte, da die Platten auszutrocknen begannen. Die Pflanzen, die von dieser Bedingung geerntet wurden, zeigten jedoch zum Zeitpunkt der Ernte einen makroskopisch sichtbaren Blühansatz und waren daher im physiologisch gleichen Zustand wie die bereits zuvor geernteten Pflanzen.

Glass und Siddiqi haben 1995 bei Gerste gezeigt, daß die Netto-N-Aufnahme mit der Photosynthese und der Wachstumsrate der Pflanze korreliert und zwar unabhängig vom externen Nitratgehalt. Dies trifft bei der vorliegenden Arbeit nur bedingt zu, der externe Nitratgehalt steuert zumindest bei den beiden niedrigen Nitratgehalt den internen Nitratgehalt und damit die Netto-N-Aufnahme. Bei der höchsten angebotenen Nitratkonzentration spiegelt der interne Nitratgehalt jedoch nicht die externe Nitratkonzentration wieder, der Unterschied im internen Nitratspiegel entspricht nicht einem Verhältnis von 10 zu 35 bzw. 1 : 3,5. Diese

hohe Nitratkonzentration wird vermutlich von der Pflanze wahrgenommen, aber nicht aufgenommen. Auf der anderen Seite ist die Blühinduktionskurve bei der kurzen Photoperiode zur höchsten angebotenen Nitratkonzentration am stärksten abgesetzt gegenüber den beiden anderen Nitratkonzentrationen. Diese Aufspaltung trat bereits bei 12 h Licht auf und ist besonders stark ausgeprägt bei der Kurztagbedingung. Dies hat sich nicht nur bei Col gezeigt, sondern auch bei den beiden anderen verwendeten Wildtypen = Ökotypen Landsberg erecta und C24. Diese werden später genauer miteinander verglichen. Da die auftretende Hemmung der Blühinduktion nicht vollständig parallel mit der internen Nitratkonzentration einherging, stellt sich die Frage, ob das Nitratsignal nicht bereits vor der Aufnahme in die Wurzel wirkt oder wie es in der Wurzel moduliert wird. Die Pflanzen auf der hohen Nitratkonzentration mit 35 mM Nitrat hatten gerade bei 12 h Tageslänge keine höheren Biomassedaten als die Pflanzen bei 10 mM Nitrat in der gleichen Photoperiode, die Blühinduktionskurve zu 35 mM Nitrat waren bei dieser Photoperiode jedoch bereits deutlich abgesetzt. Es ist also nicht mehr Biomasse aufgebaut und damit Nitrat verbraucht worden. Um festzustellen, ob die Signalwirkung bereits von außen wirkt, wäre es z. B. notwendig, die Genexpression der verschiedenen Nitrattransporter zu beobachten. Es ist bekannt, daß die Nitrattransporter durch externes Nitrat in ihrer Synthese induziert werden (Meraviglia et al. 1996, Filleur et al. 1999). Des weiteren geht man davon aus, daß das Blühinduktionssignal aus den Blättern nicht nur zum Sproßapex, sondern auch in die Wurzel transportiert wird. Dort wird es auf bisher unbekannte Art und Weise modifiziert und beeinflusst dann via Phloemtransport den Sproßapex. Insgesamt ergibt sich die Frage, ob Nitrat grundsätzlich nur in bestimmten geringen Konzentrationen zu einer Stimulation der Blühinduktion führt oder ob das Abnehmen des Nitratgehaltes im Laufe der vegetativen Phase an sich – unabhängig von den tatsächlichen Konzentrationen – als Signal wahrgenommen wird. Dazu wäre es jedoch notwendig, während der Testreihe immer wieder – entweder alle zwei Tage oder jeden Tag – Probeernten durchzuführen, um zu ermitteln, wie sich der Nitratspiegel sich im Laufe des Pflanzenwachstums intern verändert.

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, handelt es sich beim Blühen um einen sogenannten „default“-Vorgang, dieser wird durch verschiedene Signalwege verzögert, die die Umschaltung von der vegetativen zur reproduktiven Phase unterbinden. Die Essenz der vorliegenden Ergebnisse zur Interaktion zwischen Nitrat und Photoperiode ist, daß der inhibitorische Effekt von Nitrat nur sehr schwach oder gar nicht wirkt, wenn ein anderes förderndes Signal aufgrund langer Photoperiode angeschaltet wird. Eine andere mögliche

Erklärung ist, daß Nitrat über einen vollständig selbstständigen Signalweg wirkt ; und daß metabolische Veränderungen, die unter Langtagbedingungen auftreten ( z.B. höhere Aminosäurekonzentrationen, höhere Kohlenhydrate und weitere Veränderungen) dem hemmenden Effekt hoher Nitratkonzentrationen entgegenwirken. Eine weitere Möglichkeit ist, daß diese veränderten Metabolitenspiegel selbst ein förderndes Signal für die Blühinduktion darstellen und den hemmenden Effekt hoher Nitratkonzentrationen somit überwinden.

### **4.3 Die Beeinflussung der Blühinduktion durch Nitrat läuft bei verschiedenen frühblühenden Wildtypen ähnlich ab**

Neben Columbia als frühblühender Ecotyp wurden auch Landsberg erecta und C24 in der vorliegenden Arbeit verwendet. Landsberg erecta ist dabei der Wildtyp zu verschiedenen getesteten Blühmutanten, während C24 Wildtyp zu den beiden *ANRI*-Genotypen ist, die näher untersucht wurden. Beim Vergleich zeigte sich, daß für alle drei frühblühenden Wildtypen die Reaktion der Blühinduktion auf ansteigende Nitratkonzentrationen ähnlich war, sofern Gln als zusätzliche N-Quelle vorhanden war. Col und Ler zeigten fast die gleiche Anordnung der Blühinduktionskurven bei den drei Nitratkonzentrationen aus der Hauptversuchsreihe. Bei C24 kam es hingegen zu einer deutlichen Auftrennung zwischen allen drei Blühinduktionskurven, die grundsätzliche Antwort auf steigende Nitratkonzentrationen ist hingegen die gleiche. Dabei ist zu beachten, daß bei C24 eine um 20 % höhere Lichtintensität im Vergleich zu den beiden anderen Ökotypen angewandt wurde. Es ist daher nur eingeschränkt möglich, diese Auftrennung der Blühinduktionskurven als Charakteristikum von C24 festzulegen, da die Lichtintensität sehr wohl einen Einfluß auf das Wachstum der Pflanze hat. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit aber nicht weiter ausgetestet.

Alle drei Ökotypen zeigten in Bezug auf Biomasse und Blattzahl ein ähnliches Verhalten. Bei einer Photoperiode von 12 h Tageslänge kam es mit ansteigenden Nitratkonzentrationen zu einer Zunahme von Blattzahl und Biomasse zum Zeitpunkt der Blühinduktion und damit zu einer Verlängerung der vegetativen Phase. Dies zeigte sich vordergründig am deutlichsten bei C24, jedoch ist zu beachten, daß hier eine höhere Lichtintensität herrschte als bei den beiden anderen Ökotypen. Ob es sich bei dieser Ausprägung also um ein C24-spezifisches Phänomen

handelt oder ob dies durch die höhere Lichtintensität bedingt ist, kann durch eine Vergleichsanzucht der beiden anderen Ökotypen bei dieser höheren Lichtintensität von  $120 \mu\text{E}/\text{m}^2$  ermittelt werden. Bei den internen Nitratspiegeln lagen die Col-Werte höher als die von Landsberg erecta und C24, das grundsätzliche Bild blieb jedoch erhalten. Auch die anderen gemessenen Inhaltsstoffe wichen in ihrer Verteilung nicht sehr stark voneinander ab beim Vergleich der drei Wildtypen, lediglich die Konzentrationen waren unterschiedlich. Dies zeigt, daß bei gegebener Photoperiode von 12 h Tageslänge bei frühblühenden Ökotypen die Hemmung der Blühinduktion durch zunehmende Nitratkonzentration sichtbar wird. Es wäre interessant, dies mit weiteren Ökotypen, vor allem mit spätblühenden Varianten zu vergleichen. Je nach natürlichem Standort sind Ökotypen früh- oder spätblühend und werden teilweise durch Vernalisation in ihrer Blühinduktion gefördert. In dieser Arbeit wurde bisher der Zusammenhang zwischen Photoperiode und Nitratkonzentration in Bezug auf Blühinduktion ermittelt, ein anderer Aspekt wäre der Zusammenhang zwischen Vernalisation und Nitratkonzentration.

Beim Vergleich der drei Wildtypen wurden nur die Auswirkungen der drei Nitratkonzentrationen aus der Hauptversuchsreihe – 1, 10 und 35 mM Nitrat + je 4 mM Gln – berücksichtigt, da diese immer angewendet wurden. Bei Ler und C24 wurden jedoch noch zwei weitere Bedingungen getestet. Bei der einen handelte es sich um eine Mangelbedingung mit 0,5 mM Nitrat, um zu ermitteln, in welchem Maße nicht nur Nitratmangel, sondern eine allgemeine Nitratdefizienz die Blühinduktion beeinflusst, die zweite Bedingung enthielt nur 10 mM Nitrat ohne Gln-Zusatz, um zu ermitteln, wie Glutamin die Blühinduktion beeinflusst durch Vergleich mit der entsprechenden 10 mM Nitrat-Bedingung + 4 mM Gln. Beim Vergleich von Ler und C24 war zu beachten, daß beide Wildtypen unter verschiedenen Lichtintensitäten angezogen wurden

### ***Nitratdefizienz führt zu verfrühtem Blühen***

Beiden Wildtypen war aber gemeinsam, daß die Mangelbedingung zeitlich gesehen sehr spät blühte. Betrachtet man aber die Daten zu Biomasse und Blattanzahl, so zeigen die sehr niedrigen Werte für beide Wildtypen an, daß die Blüte in Bezug auf die Biomasse in beiden Fällen verfrüht eingetreten ist.

Es ist bekannt, daß niedrige externe Nitratkonzentrationen zu einer Verschiebung des Sproß/Wurzel-Verhältnisses in Richtung Wurzel führt. Dies haben Rufty et al. 1990 für

*Nicotiana tabacum* und Peuke et al. 1994 für *Ricinus communis* gezeigt, die vorliegende Arbeit bestätigt dies für *Arabidopsis thaliana*. Die Veränderungen im Sproß/wurzel-Verhältnis treten in gleichen Nitratkonzentrationen auf, die die Blühinduktion beeinflussen.

#### ***Blühinduktion in Gegenwart und Abwesenheit von Glutamin***

Die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln begann später mit der Blüte als die entsprechende Bedingung aus der Hauptversuchsreihe mit Gln, die Daten zu Biomassen, Blattzahl, Sproß/Wurzel-Verhältnis und auch Nitrat zeigten jedoch sehr ähnliche Werte. Dies bedeutet, daß Gln die Blühinduktion nur indirekt durch Verkürzung der vegetativen Phase bei Anzucht der Pflanzen unter einem 12 h/12 h-Lichtregime fördert, wenn die Blühzeit in Relation zu Biomasse und Blattzahl gesetzt wird. Die Glutaminfütterung führte zu einem Anstieg von Glutamin und anderen Aminosäuren, sodaß ein nicht vorhandener Effekt auf die Blühinduktion nicht auf einer fehlenden Aufnahme von Glutamin beruhte (auch wenn das Wachstum beschleunigt wurde).

Die Ergebnisse der diskutierten Experimente schließen allerdings nicht aus, daß die Veränderung der Aminosäurespiegel möglicherweise unter anderen Bedingungen die Blühinduktion fördern können, z.B. in Langtagbedingungen.

#### **4.4 Verschiedene Blühmutanten zeigen keine Beeinflussung durch Nitrat**

Bei der Diskussion der Frage, wie Nitrat die Blühinduktion beeinflusst, hat sich bei Betrachtung der Ergebnisse aus den Photoperioden-Versuchen kein klares Bild ergeben, ob Nitrat auf den bereits bekannten Signalweg der Tageslänge wirkt oder ob es über einen unabhängigen Signalweg die Induktion der Blüte bewirkt. Ob weitere Erkenntnisse zu dieser Problematik zu erlangen, wurden verschiedene, bereits teilcharakterisierte Blühmutanten unter verschiedenen Nitratkonzentrationen angezogen. Ziel war es, neue Kenntnisse über das Zusammenspiel von Nitrat und anderen bekannten Signalwegen zu erlangen. Dabei wurden zum einen die drei Nitratkonzentrationen aus der Hauptversuchsreihe und die beiden Zusatzbedingungen verwendet. Die verwendeten Mutanten wurden ursprünglich in zwei Klassen eingeteilt, frühblühende und spätblühende Mutanten. Letztere sind mittlerweile weiter aufgespalten worden je nach Verhalten gegenüber Photoperiode, Vernalisation,

Interaktion mit Gibberellinen oder Zugehörigkeit zum autonomen Signalweg. Bei *Arabidopsis thaliana* führt der autonome Signalweg z.B. dann zum Blühen, wenn keine Stimuli vorliegen und die anderen Signalwege damit ausfallen. Es gibt damit keine Mutante, die nicht zum Blühen kommt, auch wenn dies zeitlich sehr verschoben geschieht oder die Anatomie der Blüte stark verändert ist. Mittlerweile ist bei vielen Mutanten bereits die genauere Wirkungsweise und die ungefähre Position im Ablauf der Blühinduktion bekannt.

Es wurden sechs verschiedene Mutanten ausgetestet. Dabei handelt es sich zum einen um ein inhibitorisch wirkendes Protein = *tfl*, zum anderen um ein „floral meristem identity“-Gen = *lfy*. Außerdem wurden zwei Mutanten aus dem Vernalisationssignalweg, *fve* und *fy*, und zwei aus dem autonomen Signalweg, *fd* und *fwa*, getestet. Allen Mutanten ist gemeinsam, daß die Auswirkung ihrer Mutation durch Nitrat nicht aufgehoben wurde.

Im nachfolgenden werden die Mutanten einzeln nach folgendem Muster besprochen:

- zunächst werden allgemeine, bereits bekannte Informationen zu den einzelnen Mutanten gegeben.
- Hat Nitrat eine hemmende Wirkung auf die Blühinduktion in Bezug auf Zeit zum einen und in Bezug zu Blattzahl und Biomasse zum anderen?
- Veränderungen im Sproß/Wurzel-Verhältnis
- Veränderungen in weiteren Metaboliten, um zu sehen, ob die Mutation bisher unbekannte Effekte auf Verteilung und Metabolismus hat, um die Möglichkeit auszuschließen, daß Veränderungen bei den Metaboliten nicht die Interpretation des Nitrategieffekts auf die Blühinduktion beeinflussen

#### 4.3.1. *tfl1-2*

Bei der vorliegenden Mutante ist bisher bekannt, daß das betroffene Protein Ähnlichkeit mit tierischen Phosphatidylethanolamin-bindenden Proteinen oder anderen Proteinen aufweist, die mit Lipiden oder GTP-bindenden Proteinen assoziieren. Die Funktion von TFL ist es, die reproduktive Entwicklung der Pflanze zu unterbinden, um der Pflanze zu ermöglichen, verschiedene vegetative Stadien zu durchlaufen, bevor sie in die Blüte eintritt (Ratcliffe et al. 1998). In der Blühinduktion beeinflußt es wahrscheinlich die Aktivität eines Inhibitors, der die Induktion von Blühprimordia inhibiert, indem es stabilisierend wirkt. Vermutlich nimmt

die Aktivität des Inhibitors infolge TFL1-Beeinflussung während der Entwicklung langsam ab und fällt unter einen bestimmten Schwellenwert, sodaß sich ein Blütenprimordium ausbilden kann. Liegt eine Mutation bei TFL vor, so nimmt die Aktivität des Inhibitors schneller ab als im Wildtyp, das Blühprimordium bildet sich schneller aus, zudem verändert sich auch die Morphologie der entstehenden Blüte. Das die Inhibierung der Entwicklung des Blühprimordiums schneller beendet ist als im Wildtyp, kommt es zu einer verfrühten und abnormen Blüte im Vergleich zum Wildtyp. Bei Blühinduktion kommt es zur Ausbildung von Blühprimordien am Sproßapex. Die Muster, in denen diese Blühprimordia auftreten, ist durch die Aktion sogenannter inhibitorischer Felder festgelegt. Fällt die Konzentration des Inhibitors unter einen Schwellenwert, so können neue Primordia entstehen. Dieser Inhibitor wird jedesmal neu in den frisch entstandenen Primordienfeldern gebildet. Das TFL-Genprodukt hat vermutlich einen quantitativen Effekt auf diesen Inhibitor (Alvarez et al. 1992). TFL1 interagiert mit LFY und reprimiert dessen Expression im Sproß, während umgekehrt LFY die TFL1-Expression in der Blüte unterbindet (Alvarez et al. 1992, Bradley et al. 1997). TFL1 wird sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Phase expremiert (Bradley et al. 1997).

Der fehlende Einfluß des mutierten *tfl*-Genproduktes auf einen Inhibitor der Blühinduktion zeigt sich auch bei den verschiedenen angewandten Nitratkonzentrationen. Alle Kurven waren im Vergleich zu Ler nach vorne geschoben, die Anordnung war jedoch nicht verändert. Dabei zeigte die Hauptversuchsreihe mit ansteigender Nitratkonzentration in Gegenwart von Gln in der Mutante eine ähnliche Hemmung der Blühinduktion wie der Wildtyp Ler. Im Gegensatz zu Ler ergab sich bei *tfl1* keine offensichtliche Zunahme bei Blattzahl und Biomasse in Bezug auf steigende Nitratkonzentrationen. Dies lag jedoch daran, daß die Mutante sehr schnell wuchs und damit die verschiedenen Bedingungen nicht immer zum gleichen Zeitpunkt – 50 – 60 % Blühansatz – geerntet werden konnten. Somit sind die Blattzahl und die Biomasse für 1 mM und 10 mM Nitrat aus der Hauptreihe überschätzt, da diese Bedingungen geerntet wurden, als bereits 90 bzw. 85 % der Pflanzen blühten. Auch zeigte die Mangelbedingung mit niedriger Blattzahl und Biomasse bei *tfl1* ebenfalls verfrühtes Blühen, wie es bereits der Wildtyp gezeigt hat. Das die Mangelbedingung verfrüht geblüht hat, zeigte sich auch bei Vergleich der beiden Nitratbedingungen ohne Glutamin – 0,5 mM und 10 mM Nitrat. Zeitlich gesehen begann die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln früher zu blühen als die Mangelbedingung, aber in Bezug auf Blattzahl und Sproßgewicht zeigte die 10 mM Nitrat-

Bedingung bei der Mutante deutlich höhere Werte als die Mangelbedingung, dies ergab sich auch im Wildtyp.

Beim Sproß/Wurzel-Verhältnis zeigten Mutante und Wildtyp ein ähnliches Bild, bei der Hauptversuchsreihe ergab sich bei steigender Nitratkonzentration und damit verlängerter vegetativer Phase eine Zunahme des Verhältnisses. Auch bei Mangelbedingung und der Glutaminfreien 10 mM Nitrat-Bedingung zeigten Wildtyp und Mutante keine Unterschiede. Dabei ist zu beachten, daß die Pflanzen zu den ersten beiden Bedingungen zu spät im Verhältnis zu den anderen Bedingungen geerntet wurden (siehe oben), sodaß das Bild zum Sproß/Wurzel-Verhältnis etwas verfälscht ist.

Um zu sehen, ob die Mutante anders als der Wildtyp auf die externe Nitratversorgung reagierte, wurden Metaboliten wie Nitrat, Aminosäuren, Malat und Kohlenhydrate gemessen. Der N-Status der Hauptversuchsreihe war in Bezug auf Nitrat bei *tfl1* nicht verändert, steigende externe Nitratversorgung führte zu erhöhten internen Nitratspiegeln. Jedoch stiegen die N-speichernden Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat im Vergleich zum Wildtyp in der Wurzel stark an. Aus den bisherigen Versuchen mit Col und auch mit Ler hat sich ergeben, daß der Nitratstatus und nicht der Anteil der Aminosäuren am Gesamt-N-Status die Blühinduktion beeinflusst. Da diese Aminosäuren unabhängig von einer externen Gln-Zugabe erhöht sind, wie die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln zeigt, kann bei dieser Mutante ein Einfluß der Aminosäuren auf die Blühinduktion nicht ausgeschlossen werden. Neben den bisher besprochenen Aminosäuren stieg auch Alanin, das sich zusammen mit den verzweigten Aminosäuren von Pyruvat ableitet, ist in seiner Konzentration an, sobald das Medium Gln enthielt. Alanin stellt ebenfalls einen wichtigen Speicherstoff für N in der Pflanze dar. Gerade bei der Kombination von Nitrat und Gln stieg der Gesamt-N-Status der *tfl*-Mutanten deutlich an, der interne Nitratspiegel war dabei nicht verändert.

Außerdem waren die Aminosäuren aus dem Harnstoffwechsel in der Mutante verändert. Hier führte die Gln-Fütterung vor allem bei Arginin und Citrullin zu deutlichen Konzentrationsanstiegen, diesmal aber im Sproß. Es ist bekannt, daß aus den Aminosäuren des Harnstoffzyklus Polyamine wie z.B. Putrescin synthetisiert werden, das eine induktive Rolle in der Blühinduktion spielen soll und auch Spermin bzw. Spermidin, die als Wachstumsfaktoren fungieren. Da diese Aminosäuren hauptsächlich im Sproß erhöht sind, können auch die nachfolgenden Produkte vor allem im Sproß in ihren Konzentrationen erhöht

sein. Das Blühinduktionssignal, das bisher noch nicht näher charakterisiert worden ist, wird aus dem Blatt heraus zum Sproßapex transportiert. Noch nicht geklärt ist, inwieweit und wie es mit anderen Signalen interagiert, aber die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, daß eine mögliche Beschleunigung der Blühinduktion durch die besprochenen Stoffe nicht ausgeschlossen ist. Dazu wäre es notwendig, Putrescin, Spermin und Spermidin zum einen in ihrer Konzentration zu messen, zum anderen müßten aber auch Enzymaktivitäten bestimmt werden, um festzulegen, ob tatsächlich ein erhöhtes Wachstum eingetreten ist.

#### 4.3.2 *lfy-1*

Bei Leafy handelt es sich um ein sogenanntes „Floral meristem identity“-Gen, das zusammen mit anderen Genen den Aufbau einer Blüte bzw. die Ausrichtung eines Blühprimordiums in bezug auf die spätere Anordnung der einzelnen Blütenorgane steuert. Dabei hat sich gezeigt, daß die an dieser Determination beteiligten Gene redundant arbeiten, es also auch bei Ausfall einzelner Gene zu einer Blütenbildung kommt, die dann jedoch sich morphologisch vom Wildtyp unterscheidet. Sowohl der autonome als auch der photoperiodengesteuerte Signalweg sind an der Regulierung von LEAFY beteiligt (Aukerman et al. 1999, Simpson et al. 1999). Das Genprodukt ist im Kern lokalisiert und bindet DNA auf sequenzspezifische Weise, wobei bisher keine transkriptionelle Regulatorfunktion nachgewiesen wurde (Parcy et al. 1998). Während der vegetativen Phase wird LEAFY in Blattprimordien expremiert und durch die Photoperiode reguliert (Blazquez et al. 1997). Seine Expression wird durch Gibberelline gefördert (Blazquez et al. 1998). Es verstärkt die Expression von APETALA1 und CAULIFLOWER, zwei weitere „Floral-Meristem-identity“-Gene.

Bei dieser Mutante trat wie erwartet eine leichte Verzögerung der Blühinduktion ein, dies betraf alle Bedingungen. Bei der Hauptversuchsreihe – aufsteigende Nitratkonzentrationen + Gln-Zusatz - liefen die drei Kurven bei der Mutante im Gegensatz zu Ler alle separiert voneinander, hier trat also eine deutliche Abhängigkeit der Blühinduktion von der externen Nitratversorgung auf. Auch die beiden Glutaminfreien Bedingungen zeigten bei der Mutante ein vergleichbares Verhalten wie beim Wildtyp.

Die Blattanzahl war stark erhöht in bei *lfy* im Vergleich zu Ler, dies galt für die Bedingungen der Hauptreihe und der Gln-freien 10 mM Nitrat-Bedingung. Wildtyp und Mutante zeigten

jedoch weniger Übereinstimmung bei der Sproßbiomasse bei ansteigenden Nitratkonzentrationen in Gegenwart von Gln, die Mutante zeigte bei ansteigender Nitratkonzentrationen keine durchgehend zunehmende Biomasse, wie Ler dies tat. Die Mangelbedingung zeigte bei der Mutante kaum einen Unterschied gegenüber dem Wildtyp, dies gilt für Blattzahl und Sproßbiomasse. Die Kurve zur Gln-freien 10 mM-Bedingung begann bei *lfy* zwar später als beim Wildtyp, dies spiegelte sich aber nicht in den Sproßbiomassedaten wieder. Hier handelte es sich also nicht unbedingt um eine Verlängerung der vegetativen Phase, vielmehr trat eine verzögerte Entwicklung ein. Das Fehlen von Glutamin als Zusatz-N-Quelle führte bei dieser Mutante also zu einer Verzögerung der Entwicklung, auch der langsamere Ablauf der Blühinduktionskurve der Mangelbedingung deutet darauf hin. Insgesamt ist die leichte Verzögerung der Blühinduktion also auf eine geringfügig verlängerte vegetative Phase zurückzuführen. Die Mangelbedingung zeigte keine Verzögerung der Blühinduktion, was durch Biomassedaten bestätigt wurde, die Kurve zog sich jedoch bei der Mutante über einen längeren Zeitraum hinweg.

**Fazit:** Die Blühinduktion bei *lfy* wird durch Nitrat verzögert.

Für das Sproß/Wurzel-Verhältnis bei der Mutante gilt bei aufsteigender Nitratreihe + Gln dasselbe wie beim Sproßgewicht der Mutante unter den selben Bedingungen, es ergab sich kein durchgehender Anstieg wie beim Wildtyp. Bei den Gln-freien Bedingungen ergab sich kein Unterschied zwischen Ler und Mutante.

Auch bei *lfy* wurden die Metaboliten gemessen, um festzustellen, wie ansteigende externe Nitratversorgung diese beeinflusst. Dabei ergab sich für die Mutante, daß Metaboliten wie Nitrat und Aminosäuren und auch Malat, so fielen bei der Hauptversuchsreihe die Wurzelkonzentrationen dieser Metaboliten in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich ab, während die Kohlenhydrate kaum reagierten, dies gilt für beide Gewebe. Der Gesamt-N-Status der Mutante stieg also im Sproßbereich im Vergleich zur Wurzel stark an. Es kam also bei dieser Mutante zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses gerade im Wurzelbereich. Bei der Mangelbedingung traten die Hauptveränderungen nicht bei den N-haltigen Metaboliten auf, sondern bei den Kohlenhydraten. Das C/N-Verhältnis verschob sich damit in die entgegengesetzte Richtung im Vergleich zu den Gln-haltigen Bedingungen. Jedoch zeigte die Mutante wie Ler eine Zunahme an Nitrat bei ansteigender externer

Nitratversorgung, während die Aminosäuren bei kaum reagierten bzw. bei hohen Nitratkonzentrationen abnahmen.

Ebenfalls ungewöhnlich ist der hohe Methioninspiegel in der Niedrignitraternährung mit 1 mM Nitrat/4 mM Gln in der Mutante. Da sonst keine weiteren Veränderungen bei dieser Bedingung auftraten und auch das Blühverhalten nach hinten verschoben war, sonst aber keine weiteren Ungewöhnlichkeiten aufwies, muß dieser Wert als Artefakt betrachtet werden. Dies wäre anders, wenn bei allen Blühverlaufskurven, die nach hinten verschoben waren, ein deutlicher Anstieg des Methioninspiegels zu beobachten wäre, dies ließe einen Rückschluß auf eine mögliche Signalwirkung zu.

#### 4.3.3 *fd* – 1

*fwa* und *fd* auf Photoperioden. Diese Mutanten reagieren mit verzögerter Blühinduktion unter Langtagbedingungen und etwas verzögert unter Kurztagbedingungen. Sie werden deswegen nach Simpson et al. (1999) in eine Subgruppe zum photoperiodisch gesteuerten Signalweg gestellt, da die anderen Mutanten aus diesem Signalweg nur bei Langtagbedingungen mit verzögerter Blühinduktion reagieren.

Die Mutante zeigte bei ansteigender Nitratkonzentration in Gegenwart von Gln eine zunehmende Hemmung der Blühinduktion. Alle Kurven begannen bei der Mutante deutlich verzögert im Vergleich zum Wildtyp, es ergab sich somit für *fd* eine größere Nitratsensibilität für die Blühinduktion, wenn Glutamin anwesend war. Die Verzögerung der Blühverlaufskurven bei Nitrat + Gln ging einher mit einer Zunahme an Blattzahl und Biomasse, die vegetative Phase war in der Mutante deutlich verlängert im Vergleich zum Wildtyp. Die verstärkte hemmende Wirkung von Nitrat trat in der Mutante hauptsächlich in en Gln-haltigen Bedingungen auf. Die Kontrollbedingung mit 10 mM Nitrat ohne Gln fing zwar um einige Tage versetzt an, endet aber fast zum gleichen Zeitpunkt wie die entsprechende Bedingung mit Gln im Medium. Die Blühverlaufskurve für die Mangelbedingung war bei der Mutante nur geringfügig nach hinten verschoben und endet zum selben Zeitpunkt wie bei *Landsberg erecta*. Während beim Wildtyp Glutaminbeigabe zu einem rascheren Wachstum führte, zeichnete sich bei der Mutante ein geringerer Effekt der Glutaminbeigabe ab.

Die verstärkte Hemmung der Blühinduktion führte in dieser Mutante bei ansteigender Nitratzufuhr in Gegenwart von Gln wie bei Blattzahl und Biomasse zu erhöhten Sproß/Wurzel-Verhältnissen, dabei ergab sich wie im Wildtyp ein Anstieg mit steigender Nitratversorgung.

Der Nitratspiegel reagierte in der Mutante nicht anders als beim Wildtyp, ansteigende Nitratkonzentrationen im Medium führen zu zunehmenden internen Nitratkonzentrationen. Die Aminosäuren zeigten keine Veränderungen bei zunehmender externer Nitratversorgung bzw. sanken bei hohen Nitratkonzentrationen leicht ab, dies gilt für Mutante und Wildtyp gleichermaßen.

Der Malatspiegel sank hingegen in der Mutante in den beiden Bedingungen, die niedrige Nitratkonzentrationen beinhalten, jeweils in der Wurzel ab, der Wildtyp wies dagegen ähnliche Malatkonzentrationen in diesen Bedingungen wie in den anderen drei Ansätzen auf. Die Abnahme der Gesamtaminosäuren beruhte nicht nur auf einer Veränderung der Konzentrationen der N-speichernden Aminosäuren. Aspartat stieg sogar leicht an, während es bei Asparagin zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von der Wurzel in Richtung Sproß kommt. Glutamat reagierte nicht anders als bei *Landsberg erecta*, während Glutamin leicht abnahm.

Auffällig ist, daß sich bei den Kohlenhydraten vor allem bei der Mangelernährung die Konzentrationen verringerten, obwohl diese Bedingung sich in Blühverlauf und in den Biomassedaten am wenigsten vom Wildtyp unterschied. Da aber alle vier Kohlenhydrate in ihrer Konzentration abnahmen, ist bei dieser Bedingung das C/N-Verhältnis am stärksten beeinflußt. Nichtsdestotrotz kommt es aber nicht zu einer Beeinflussung des Blühverhaltens.

#### 4.3.4 *fwa-1*

*fwa* und *fd* reagieren beide auf Photoperioden. Diese Mutanten reagieren mit verzögerter Blühinduktion unter Langtagbedingungen und etwas verzögert unter Kurztagbedingungen. Sie werden deswegen nach Simpson et al. (1999) in eine Subgruppe zum photoperiodisch gesteuerten Signalweg gestellt, da die anderen Mutanten aus diesem Signalweg nur bei Langtagbedingungen mit verzögerter Blühinduktion reagieren. Araki et al. (1998) erklären, daß FWA wahrscheinlich keine positive oder fördernde Rolle bei der Regulation der

Blühinduktion hat. Eine Beteiligung von FWA könnte so aussehen, daß es die Aktivität von blühfördernden Signalwegen oder downstream-Komponenten während der frühen Entwicklung oder der frühen vegetativen Phase unterdrückt oder dagegen arbeitet. Zusammen mit FD steht es in einer eigenen Subgruppe. Es agiert zusammen mit anderen Genen bei der Regulation von Genen wie APETALA1. Es handelt sich um ein Protein, daß zu einer Subfamilie von HD-ZIP-Homeodomänen-Proteinen gehört. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, denen eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Zellspezifizierung nachgesagt wird (Soppe et al. 2000).

Diese Mutante zeigte in der Hauptversuchsreihe eine Abhängigkeit der Blühinduktion von der externen Nitratkonzentration, wenn die Blühinduktion in Relation zur Zeit, zur Sproßgewicht oder zur Blattzahl gesetzt wurde. Diese Abhängigkeit der Blühinduktion vom externen Nitratangebot war in Mutante und Ler damit ähnlich. Die Kurven begannen teilweise 2 Wochen später als die vergleichbaren Kurven des Wildtyp und sie waren stärker auseinandergezogen. Dasselbe Bild ergab sich, wenn man die beiden glutaminfreien Bedingungen mit 0,5 mM und 10 mM Nitrat verglich. Dabei stieg die Blattzahl bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht an und die Biomassen reagierten bei *fwa* nur mit einer geringen Zunahme, wenn das externe Nitratangebot anstieg. Daraus ergibt sich, daß die verzögerte Blühinduktion bei den Bedingungen der Hauptversuchsreihe wahrscheinlich auf einem leicht verzögertem Wachstum beruhen.

Der interne Nitratgehalt zeigte bei dieser Mutante sehr niedrige Spiegel in der Wurzel, der Sproß reagierte hingegen kaum anders als bei Ler. Damit kam es zu einem Anstieg des internen Nitratspiegel parallel zum externen Nitratangebot.

Dafür stiegen die Kohlenhydrate bei *fwa* gerade in den Gln-haltigen Bedingungen stark an in ihren Konzentrationen. Damit kam es zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses in Richtung des Kohlenstoffes. Die beiden Gln-freien Bedingungen zeigten in der Mutante keine Veränderung in Bezug auf Nitrat, hier nahmen die Kohlenhydrate im Vergleich zu Ler ab, sodaß sich das C/N-Verhältnis in Richtung von Stickstoff verschob. Gln hatte damit eine starke Auswirkung auf den Kohlenhydratmetabolismus der Mutante.

Die Aminosäuren zeigten sich bei *fwa* kaum beeinflusst durch die Mutation im Vergleich zu Ler. Bei Wildtyp und Mutante reagierten die Aminosäuren kaum auf das externe

Nitratangebot, insgesamt wies *fwa* aber in allen Bedingungen niedrigere Konzentrationen an Aminosäuren auf, da die Mutantpflanzen zum Erntezeitpunkt wesentlich älter waren als die Ler-Pflanzen und damit mehr Aminosäuren verbraucht hatten. Arginin reagierte aber bei den Gln-haltigen Bedingungen mit einem leichten Konzentrationsanstieg, während Ornithin hingegen abnahm. Der Harnstoffzyklus zeigte sich bei der Mutante also verändert.

Bei den anderen Aminosäuren reagierte Tryptophan mit einer Erhöhung der Wurzelkonzentrationen bei allen Bedingungen, die Sproßwerte veränderten sich nur geringfügig. Die Tryptophandegradation führt in Richtung Auxinsynthese. Leider ergibt sich aus den Daten nicht, ob hier ein Anstau stattfindet, dann würde die Auxinproduktion letztendlich herabgesetzt sein, oder ob der gesamte Shikimiweg verstärkt abläuft, was zu einer höheren Auxinkonzentration führen würde. In diesem Fall würde das Signal aber aus dem Wurzelbereich heraus wirken. Für das letztere spricht, daß auch die Konzentrationen der anderen beiden Aminosäuren leicht ansteigen, wobei Tyrosin nur geringe Veränderungen zeigt, bei Phenylalanin sind diese deutlicher.

#### 4.3.5 *fve-1*

*fve-1* ist als spätblühende Mutante beschrieben worden (Koornneef et al. 1991), dieser Phänotyp kann durch Vernalisation, also durch längere Kälteeinwirkung, wobei die Samen sich in einem feuchten Milieu befinden müssen, aufgehoben werden. Da die Platten im vorliegenden System nur 5 Tage bei 4°C gelagert wurden, findet dadurch zwar eine Synchronisation der Keimung statt, aber aufgrund der zu kurzen Kältebehandlung keine Kältebeeinflussung der Entwicklung. Es ist wahrscheinlich nicht an der Phasenverschiebung von vegetativ nach reproduktiv beteiligt (Martinez-Zapater et al. 1995). FVE könnte an der Festlegung des Blühentwicklungsprogramms in den Lateralmeristemsystemen beteiligt sein (Martinez-Zapater et al. 1995).

Alle Blühverlaufskurven waren wie bei den beiden zuvor besprochenen Mutanten im Vergleich zu Ler verzögert. Dabei verliefen im Gegensatz zum Wildtyp alle drei Kurven mit einer Kombination von Nitrat und Gln getrennt voneinander. Der Verzögerung der Blühinduktion ging einher mit erhöhter Biomasse und Sproß/Wurzel-Verhältnis zum Zeitpunkt der Blühinduktion. Auch die beiden Bedingungen ohne Gln waren nach hinten

verschoben in der Mutante, dabei änderten sich gerade für die 10 mM Nitrat-Bedingung ohne Gln die Biomassedaten kaum.

Die Veränderungen im externen Nitratgehalt wurden in den internen Nitratkonzentrationen reflektiert. Die Mangelbedingung reagierte bei Mutante und Wildtyp ähnlich in Bezug auf Nitrat, bei *five* sanken jedoch die Kohlenhydratspiegel deutlich ab. Scheible et al. haben 1997 gezeigt, daß *Nicotiana plumbaginifolia* bei Mangelerährung entweder Stärke oder Nitrat anhäuft. Die vorliegende Arbeit zeigt soweit, daß dies für *Arabidopsis thaliana* ebenfalls gilt und grundsätzlich auf die Kohlenhydrate ausdehnen kann, zumindest für den gewählten Erntezeitpunkt. Bei der hier besprochenen Mutante trat aber eine Ausnahmesituation ein, bei einer Nitratzufuhr von 0,5 mM Nitrat sanken sowohl Nitrat als auch die Kohlenhydrate im Vergleich zum Wildtyp deutlich ab. Es scheint so, daß bei der Mutante die Koordinierung der verschiedenen Synthesewege blockiert ist. Um dies näher untersuchen zu können, wäre es zum einen notwendig, Enzymaktivitäten der Enzyme aus Nitrat- und Kohlenhydratstoffwechsel nachzuweisen, aber auch die Genexpression dieser Enzyme sollte nachgewiesen werden.

Die Gesamtaminosäuren reagierten in der Mutante nicht anders als beim Wildtyp auf die verschiedenen Nitratangebote. Dies spiegelt sich auch bei den einzelnen Aminosäuren bzw. Aminosäuregruppen wieder. Bei den N-speichernden Aminosäuren stieg lediglich Aspartat etwas in der Sproßkonzentration an und damit auch Lysin, welches sich von Aspartat ableitet. Die anderen N-speichernden Aminosäuren reagierten nicht unterschiedlich als bei *Landsberg erecta*, sie nahmen aber auch trotz einer verlängerten vegetativen Phase nicht ab, obwohl die Biomasse anstieg.

Bei den anderen Aminosäuren kam es lediglich bei den aromatischen Aminosäuren zu leichten Veränderungen. Tryptophan stieg dabei in den Bedingungen an, die nur Nitrat als N-Quelle enthielten, während Phenylalanin in der Sproßkonzentration anstieg, sobald das Medium beide N-Quellen, also Nitrat und Gln enthält. Wie bereits besprochen, führt der Abbau von Tryptophan zu Auxin, das bekanntermaßen eine Signalwirkung bei der Blühinduktion hat, während Phenylalanin-Degradation zu Zimtsäure und Vorstufen von Lignin. Außerdem entstehen bei diesem Abbau Anthocyane, dabei handelt es sich um die blauen Blattfarbstoffe, und Tannine, das sind Stoffe mit Schutzfunktion.

#### 4.3.6 *fy-1*

Auch *fy-1* ist als spätblühende Mutante beschrieben worden, deren Phänotyp durch Vernalisation aufgehoben werden kann. Diese Mutante wird dem konstitutiven Signalweg zugeordnet. Zu dieser Mutante ist bisher nur bekannt, in welchen Signalweg der Blühinduktion sie einzuordnen ist, eine weitere Charakterisierung hat bisher noch nicht stattgefunden. Auch hier gilt dieselbe Einschränkung wie bei *fve-1*, die angewandte Kältebehandlung dient nur der Synchronisation der Keimung, sie kann nicht als Vernalisation betrachtet werden.

Die Mutante *fy-1* reagierte im Gegensatz zu *fve-1* viel stärker auf eine nitratgebundene Kontrolle der Blühinduktion. Die drei Bedingungen, die Nitrat und Gln als N-Quellen enthalten, zeigten eine sehr starke Abhängigkeit vom externen N-Spiegel. Hier kam es zu einer sehr deutlichen Verzögerung der Blühinduktionskurven, wobei bereits die erste Kurve mit nur 1 mM Nitrat/4 mM Gln schon leicht verzögert im Vergleich zum Wildtyp begann.

Aufgrund der starken Verzögerung der Blühinduktion mit ansteigender Nitratkonzentration, sofern Gln zusätzlich im Medium vorliegt, waren die beiden Kurven, die kein Gln enthalten, im Vergleich zu Wildtyp in der Anordnung nach vorne verschoben, wobei auch sie zeitlich nach hinten gelegt waren. Die Kurve der Mangelbedingung lief hier noch vor der Kurve mit überoptimalem Nitratangebot, und Blühen trat bei 0,5 mM Nitrat bei wesentlich niedrigerer Blattzahl und Sproßbiomasse als bei 10 mM Nitrat auf.

Die Blattzahl und die Biomassen stiegen stark an, *fy-1* ist auch bereits von Koornneef et al. 1997 als spätblühende Mutante charakterisiert worden. Die Verzögerung der Blühinduktion ist noch auffallender, wenn die Blühzeiten für Ler und *fy-1* auf der Basis von Sproßgewicht oder Blattzahl miteinander verglichen werden.

**Fazit:** *fy-1* zeigt Nitratsensitivität bei der Blühinduktion. Die Daten deuten sogar an, daß die Blühinduktion bei *fy-1* sogar stärker durch Nitrat beeinflusst wird als bei Ler.

*fy-1* zeigt ebenfalls stärkere Veränderungen im Sproß/Wurzel-Verhältnis bei ansteigenden Nitratkonzentrationen.

Auffallend war der erhöhte Nitratspiegel in den Bedingungen, die ausreichende bzw. überoptimale Nitratversorgung beinhalten, dabei zeigte die Gegenwart oder Abwesenheit von Gln keinen Einfluß. Dabei zeigte vor allem der Sproß jeweils eine Erhöhung des internen Nitratspiegels, während der Anteil in der Wurzel absank. In den beiden Bedingungen mit geringen externen Nitratkonzentrationen trat eher ein Absinken der Konzentration ein, hier wurde der vorhandene N-Pool zu Aufbau von Biomasse und teilweise als Signalstoff genutzt. Dies bedeutet, daß es unklar ist, ob die erhöhte Nitrathemmung des Blühens darauf beruht, daß FY-1 antagonistisch zum Nitratsignal arbeitet, oder ob es sich um einen weniger direkten Effekt handelt, daß *fy-1* mehr Nitrat akkumuliert und sich damit ein stärkeres Signal von Nitrat auf einem vorgegebenen externen Nitratgehalt ergibt. Da keine weiteren Daten zur Verfügung stehen, ist das letztere die wohl beste Erklärung.

Bei dieser Mutante kam es beim Malatspiegel zu einer Umkehrung der Verteilung auf die beiden Gewebe. Zeigte der Wildtyp in der Wurzel eine höhere Malatkonzentration als im Sproß, zeigte sich bei dieser Mutante ein Verschieben der Malatkonzentration zum Sproß hin, wobei die Unterschiede zwischen den beiden Geweben nicht sehr groß waren, Ob dies mit einer veränderten Verteilung der Nitratassimilation oder anderen Vorgängen, die zur Malatanhäufung führen könnten, zu tun hat, kann aus den vorhandenen Daten leider nicht hergeleitet werden. Bei den Gesamtaminosäuren zeigte sich zunächst keine Beeinflussung, jedoch kam es bei den einzelnen Aminosäuren teilweise zu erheblichen Verschiebungen.

Auch bei den Kohlenhydraten traten Veränderungen zwischen Wildtyp und Mutante bei den einzelnen Bedingungen auf. Hatta sonst immer die Mangelbedingung die höchsten Konzentrationen, so lagen sie bei dieser Mutante sehr niedrig bis auf Stärke, und das, obwohl auch der Nitratspiegel sehr niedrig war. Grundsätzlich gilt, daß eine Pflanze entweder Nitrat oder Stärke anhäuft, aber nicht beides (Scheible et al.. 1997a). Dies trifft jedoch nur für das Sproßgewebe zu, die Wurzel wies kaum Stärke auf. Eine mögliche Erklärung für die anderen niedrigen Kohlenhydratspiegel unter Mangelernährung mit 0,5 mM Nitrat könnte höchstens sein, daß aufgrund des zeitlichen Alters die Pflanzen die Kohlenhydrate verbraucht hätten. Betrachtet man jedoch die anderen Bedingungen, so ergibt sich hier überraschenderweise eher eine Zunahme der Zuckerkonzentrationen, sogar Stärke stieg bei niedriger und optimaler Nitratversorgung an. Waren bei *Landsberg erecta* die Zucker zum Zeitpunkt der Ernte sehr niedrig bis auf die Bedingungen, die geringe Nitratkonzentrationen enthalten, so wies die Mutante noch recht hohe Konzentrationen auf. Dies läßt den Schluß zu, das die Pflanze, was

ihren C-Status betrifft, zu früh die Blühinduktion eingetreten ist, auch wenn es sich zeitlich gesehen um eine spätblühende Mutante handelt oder die Mutante verbraucht ihre Kohlenhydrate nicht so rasch wie der Wildtyp.

Bei den N-speichernden Aminosäuren gab es einige Veränderungen, die jedoch kein Muster erkennen lassen. Aspartat reagierte mit einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten des Sproßes, die Anstiege bei Asparagin verliefen jedoch ungeordnet. Glutamat zeigte dasselbe Verhalten wie Aspartat, währendhingegen Glutamin fast kaum reagierte. Der Gesamt-N-Status, der sich daraus ergibt, korreliert kaum mit dem Blühverhalten.

Auch bei den Aminosäuren der Photorespiration ergibt sich kein klares Bild. Glycin zeigte in der Mutante keine Abhängigkeit von der externen Nitratkonzentration im Gegensatz zum Wildtyp, währendhingegen Serin sowohl bei niedriger als auch bei überoptimaler Nitratversorgung mit erhöhten Konzentrationen reagierte, Ler zeigt hingegen keine Abhängigkeit vom externen Nitratangebot bei Serin. Da Serin die Vorstufe zu Cystein ist, diese Aminosäure entsteht durch Acetylierung von Serin, ist davon auszugehen, daß auch dieser Syntheseweg beeinflusst ist. Cystein war mit den gegebenen Meßmethoden jedoch nicht zu erfassen, sodaß hier nur vermutet werden kann. Die Veränderungen sind bei Glycin wesentlich niedriger als bei Serin. Glycin zeigt in der Mutante in allen Bedingungen sehr ähnliche Konzentrationen im Gegensatz zu Ler, Serin hingegen zeigt in der Mutante eine ungleichmäßige Verteilung in den verschiedenen Nitratbedingungen zeigt, beim Wildtyp wiesen alle Bedingungen nahezu gleiche Konzentrationen auf.

Auch die aromatischen Aminosäuren reagierten bei der Mutante anders als im Wildtyp. Tryptophan reagierte bei niedriger und hoher Nitratversorgung mit erhöhten Konzentrationen vor allem in der Wurzel, aber die Mangelbedingung ist nicht verändert gegenüber dem Wildtyp. Tyrosin stieg in allen Bedingungen an, während Phenylalanin im Sproß mit steigender Nitratkonzentration zunahm, sofern das Medium noch zusätzlich Gln enthielt. Tryptophan ist bekanntlich Vorläufer zu Auxin, während Tyrosin zu Plastochinon und Tocopherol degradiert wird. Plastochinon ist an der Atmungskette beteiligt, während Tocopherol zum Schutz von Membranlipiden, besonders ungesättigter Fettsäuren dient. Phenylalanin ist Vorstufe von Lignin (Festigung der Zellwände), Anthocyane (blaurote Farbstoffe, dienen zum Schutz vor UVB-Strahlung) und Tanninen (Fraßschutz).

Auch der Harnstoffcyclus ist verändert gegenüber dem Wildtyp. Die Argininkonzentrationen stiegen in den Bedingungen an, die Nitrat und Gln zusammen enthielten. Arginin ist Vorstufe zur Synthese von Ornithin, das wiederum zu Polyaminen metabolisiert wird.

#### 4.4 *ANRI*

*ANRI* wurde 1998 von Zhang & Forde näher charakterisiert als ein MADS-Box-Gen, daß durch Nitrat induziert wird. *ANRI* wird dabei hauptsächlich oder ausschließlich in den Wurzeln expremiert. *ANRI* ist involviert im lokalen Stimulationseffekt von Nitrat auf die Induktion von Lateralwurzeln und Transformanten mit einer verringerten Expression von *ANRI* zeigen eine geringerer Induktion von Lateralwurzeln als Antwort auf lokale Nitratzufuhr.

Die Daten zeigen, dass die Blühinduktion in den Transformanten ebenfalls durch Nitrat gehemmt ist und es gibt deutliche Hinweise, dass die Transformanten weniger empfindlich auf Nitrat reagierten als C24. Die Blühverlaufskurven für A1 und S10 waren im Vergleich zum Wildtyp nach hinten verschoben auf der Zeitskala und das Verhältnis von Blühverlauf in Relation zu Sproßbiomasse oder Blattzahl war bei Transformanten und Wildtyp gleich ausgeprägt. Obwohl es einen Trend zu leicht verzögerter Blühinduktion bei den Transformanten mit verringerter *ANRI*-Expression gab, war dies nicht einheitlich. Es zeigt sich am stärksten in den Plots, die den Blühverlauf gegen die Zeit aufgetragen enthalten (das unzuverlässigste Parameter) und ebenso bei den Plots zur Blattzahl, sofern die Bedingungen Glutamin enthalten, die Graphen zum Sproßgewicht geben keinen Hinweis auf eine Verzögerung.

#### **Fazit:**

Die Daten geben keinen Hinweis, dass *ANRI* an der Regulation der Blühinduktion durch Nitrat beteiligt ist.

Die Mutation hatte jedoch eine Auswirkung auf das Sproß/Wurzel-Verhältnis (Abb. 4/1). Um die Werte besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte jeweils auf die 10 mM Nitrat-Bedingungen des Wildtyps normiert.

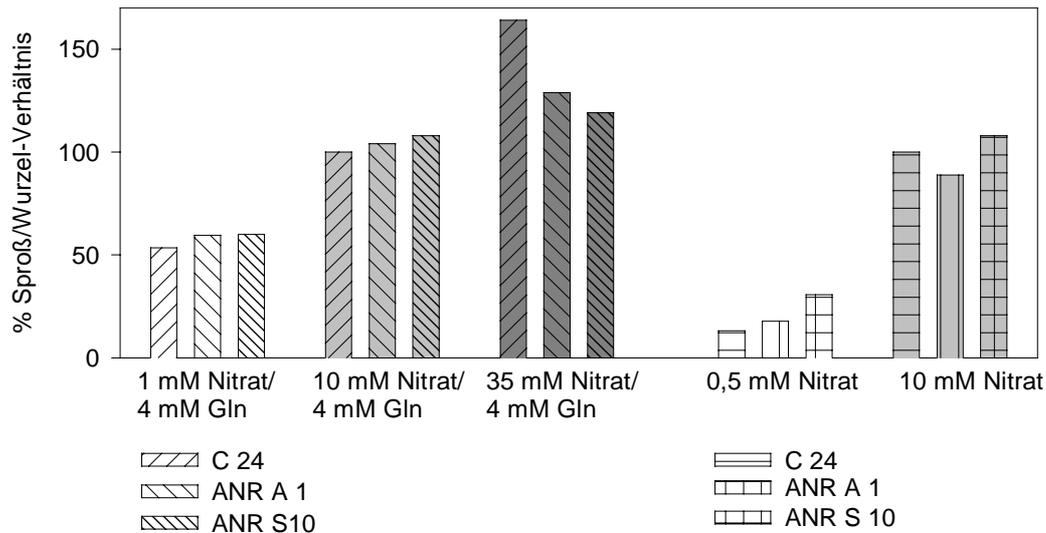


Abbildung 4/1: Dargestellt sind die Sproß/Wurzel-Verhältnisse von C24 und den beiden ANR-Genotypen A1 und S10 in %. Für die Gln-haltigen Bedingungen wurde das Sproß/Wurzel-Verhältnis von C24 bei 10 mM Nitrat/4 mM Gln als Normierungsgrundlage gewählt, für die beiden Gln-freien Bedingungen das Sproß/Wurzel-Verhältnis von C24 bei 10 mM Nitrat.

Dabei zeigt sich, daß die beiden Genotypen ein verändertes Sproß/Wurzel-Verhältnis im Vergleich zu ihrem Eltern-Wildtyp hatten. Bei niedriger bis ausreichender Nitratversorgung stiegen die Sproß/Wurzel-Verhältnisse von A1 und S10 gegenüber C24 leicht an, solange Glutamin als zusätzliche N-Quelle im Medium vorlag. Bei überoptimaler Nitratversorgung mit 35 mM Nitrat hingegen sanken die Verhältnisse aber stark ab im Vergleich zu C24. Bei A1 war dies vor allem auf eine geringere Sproßbiomasse im Vergleich zu C24 zurückzuführen, während die Wurzelbiomasse bei A1 und C24 vergleichbar war, bei S10 stiegen sowohl Sproß- als auch Wurzelbiomasse gegenüber dem Wildtyp stark an. Beiden Genotypen ist gemeinsam, daß sie in der Gln-freien Mangelbedingung ein höheres Sproß/Wurzel-Verhältnis entwickelten als der Wildtyp, was auf eine geringere Wurzelmasse zurückzuführen ist.

Beide Genotypen zeigten bei ausreichender bzw. überoptimaler Nitratversorgung erhöhte Nitratwerte in beiden Geweben, selbst bei der Mangelbedingung kam es zu einem geringen Anstieg. Da die Bedingung mit 1 mM Nitrat/4 mM Gln kaum reagierte, hängt vielleicht mit der reprimierenden Wirkung von Gln auf die Nitratreduktase zusammen. Dabei zeigte sich, daß die veränderte Antwort des Sproß/Wurzel-Verhältnisses offensichtlich nicht durch die Nitrataufnahme beeinträchtigt wurde. Tatsächlich zeigten die Transformanten bei hoher externer Nitratversorgung ein niedrigeres Sproß/Wurzel-Verhältnis und niedrigere interne Nitratspiegel als der Wildtyp. Dies geht einher mit der Tatsache, daß ANR1 an der Feedback-Inhibition des Wurzelwachstums bei Nitratakkumulation in der Pflanze beteiligt ist.

Betrachtet man die Gesamtaminosäuren, so zeigten sich bei den beiden Transformanten keine übereinstimmende Unterschiede zu C24.

Auch in den Malatspiegeln ergibt sich diese Unterschiedlichkeit, bei A1 lagen die Werte im Bereich der Wildtyp-Werte, während bei S10 die Konzentrationen etwas anstiegen. Beiden Genotypen ist jedoch gleich, daß vor allem in der Mangelbedingung die Wurzelwert weit über den Wildtyp-Werten lagen, obwohl die Nitratwerte nur gering angestiegen sind.

Betrachtet man die Konzentrationen der einzelnen Kohlenhydrate, so zeigen sich bei den reduzierenden Zuckern und bei Saccharose keine allzugroßen Unterschiede, während die Stärkekonzentration im Sproß bei beiden Genotypen deutlich unter dem Vergleichswert lag, während die Sproßwerte zur Bedingung mit 1 mM Nitrat/4 mM Gln gegenüber dem C24-Wert ansteigen. Dies geht einher mit dem geringeren Nitratwert bei A1 und S10, Pflanzen speichern entweder Nitrat oder Stärke, aber nicht beides (Scheible et al. 1997).

Bei den N-speichernden Aminosäuren reagierte Aspartat in beiden Genotypen mit einer Konzentrationszunahme im Sproß, Ausnahme ist hierbei die Mangelbedingung, Asparagin zeigte hingegen keine einheitliche Veränderung in der Verteilung. War beim Wildtyp eine leichte Tendenz zur Gehaltsabnahme im Sproßgewebe zu sehen, sofern das Medium Nitrat und Gln enthielt, so zeigte sich bei A1 im selben Gewebe unter diesen Bedingungen sogar eine leichte Zunahme. Da Aspartat und Glutamin zu Asparagin und Glutamat reagieren, spiegelt Aspartat die Glutamat und Glutamin die Asparaginverteilung wieder, Insgesamt stiegen diese N-speichernden Aminosäuren in ihren Konzentrationen leicht an, da auch Nitrat als Ausgangsmaterial leicht angestiegen ist.

Beide Genotypen zeigten leichte Erhöhungen bei den Aminosäuren der Photorespiration. Dies wäre damit erklärbar, das hier infolge eine etwas höheren Lichtintensität im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen (120  $\mu$ E gegenüber 100  $\mu$ E) es zusammen mit den Einwirkungen der Mutation zu einer anderen Streßsituation kommt als bei der niedrigeren Lichtintensität. Hier zeigt der Genotyp S10 sogar bei der Mangelbedingung erhöhte Konzentrationen, A1 reagierte hier kaum.

Bei den aromatischen Aminosäuren kam es in Gegenwart von Gln zu veränderten Anteilen im Vergleich zu Wildtyp. Tryptophan reagierte dabei in den beiden extremen Bedingungen mit

einem Anstieg der Konzentrationen. Die Rolle der aromatischen Aminosäuren ist bereits zuvor mehrfach besprochen worden. Interessant ist dabei, daß A1 bei allen drei Aminosäuren mit diesem Anstieg reagierte, was vielleicht als Streßsituation zu werten ist. S10 hingegen reagierte nur schwach, obwohl es wie A1 in Bezug auf ANR-Expression am stärksten reprimiert ist. Bei A1 wird diese Mutation wohl anders perceived als bei S10.

Auch bei den aliphatischen Aminosäuren reagierte A1 bei den Nitrat und Gln enthaltenen Bedingungen mit einer Konzentrationszunahme, S10 hingegen zeigte kaum andere Werte als der Wildtyp.

Auch bei Lysin kam es bei A1 zu einer leichten Konzentrationssteigerung, bei Methionin und Threonin hingegen stiegen die Werte in beiden Genotypen etwas an im Vergleich zu C24.

Arginin und Citrullin als Vertreter des Harnstoffcyclus sanken dagegen leicht ab, während Ornithin Konzentrationszunahmen zeigte, die sich jedoch bei beiden Genotypen vollkommen unterschieden. Beide zeigten ansteigende Spiegel der Aminosäure, die Verteilung ist aber nicht equivalent zueinander. A1 reagierte mit einer Konzentrationsabnahme mit zunehmender Nitratversorgung, wobei Gln keine Wirkung zeigt. Bei S10 kam es dagegen, sofern das Medium Gln enthielt, eher zu einem leichtem Anstieg.

Beide Genotypen zeigen zwar einen ähnlich stark herunterregulierten ANR-RNA-Spiegel, sind aber aus verschiedenen Ansätzen hervorgegangen, A1 aus einem antisense-Ansatz, während S10 durch ein sense-Produkt herunterreguliert wurde. Sie zeigen zwar in Bezug auf Nitrat eine ähnliche Antwort, unterscheiden sich aber in einigen Inhaltsstoffen deutlich voneinander. Sie weisen sehr unterschiedliche Malatspiegel auf, die aromatischen Aminosäuren sind nicht miteinander vergleichbar und auch der Harnstoffzyklus weist unterschiedliche Aminosäurespiegel bei beiden Genotypen auf. Diese Unterschiede könnten zurückzuführen sein auf die unterschiedlichen methodischen Ansätze, mit denen die ANR-Expression reprimiert wurde und könnten zu einer Modulation der Blühinduktion als Antwort auf die verschiedenen Nitratbedingungen beitragen. Um dies genauer belegen zu können, müßte jedoch zunächst bekannt sein, wie stark die Expression in den beiden Transformantenlinien herunterreguliert ist. Diese Angaben ergaben sich nicht aus der Veröffentlichung von Zhang und Forde (1998).

## 4.5 Abschließende Diskussion

Nitrat ist zusammen mit Licht und Wasser einer der wichtigsten Bestandteile für das Wachstum der Pflanze und kann dieses nachhaltig beeinflussen. Es ist nachgewiesen, daß die Expression von Gegen des Nitrat- und Kohlenhydratstoffwechsels durch externes Nitrat beeinflusst wird, die Synthese organischer Säuren, die als Gegenion bei der Assimilation von Nitrat fungieren, wird induziert und auch das Sproß/Wurzel-Verhältnis wird durch die Verfügbarkeit von Nitrat in der Umgebung der Pflanzenwurzel gesteuert (Scheible et al. 1997a,b).

Bisher ist jedoch noch nicht näher untersucht worden, in welchem Maße es die Blühinduktion von Pflanzen beeinflusst. Die Einwirkung von Tageslänge, Lichtqualität, Vernalisation und Verfügbarkeit von Nährstoffen in Form von Kohlenhydraten ist bereits hinlänglich untersucht worden, nicht jedoch von Nitrat als einem essentiellen Nährstoff, den die Pflanze aus dem Boden beziehen muß.

Aus den Ergebnissen, die in dieser Doktorarbeit präsentiert werden, kann man den Schluß ziehen, daß Nitrat mit ansteigenden Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Blühinduktion hat, wobei der hemmende Effekt von Nitrat auf die Blühinduktion bei Kurztagbedingungen deutlich sichtbar wird, während er mit zunehmender Tageslänge überwunden wird. Interessanterweise wird der interne Nitratspiegel sehr stark vom externen Nitratspiegel gesteuert, die Photoperiode hat nur eine untergeordnete Auswirkung auf den Nitratgehalt.

Die Aminosäuren reagieren hingegen viel stärker auf die Photoperiode, auch diejenigen wie Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat, die direkte Derivate des Nitratmetabolismus sind.

Auf der anderen Seite werden die Konzentrationen der Kohlenhydrate sehr wohl durch das externe Nitratangebot beeinflusst. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Notwendigkeit von C-Skeletten für die Metabolisierung des assimilierten Nitrates, das in Abwesenheit von verfügbaren Kohlenhydraten auch in der pflanzlichen Vakuole gespeichert werden kann, wenn z.B. Nitratassimilation oder Remobilisierung während der Dunkelphase auftritt. Diese

Verzögerung der Blühinduktion durch ansteigende Nitratkonzentrationen geht einher mit zunehmenden Biomassen, damit handelt es sich um eine Verlängerung der vegetativen Phase.

Diese Verlängerung der vegetativen Phase kann auf einer Modulierung des Blühstimulus oder der Aktivität verschiedenster Gene beruhen, die an der Blühinduktion beteiligt sind. Die chemische Natur des Blühstimulus ist bisher nicht bekannt, aber es wird davon ausgegangen, daß er mehrere Komponenten umfaßt und das Kohlenhydrate daran beteiligt sind. Bei der genetischen Steuerung der Blühinduktion in *Arabidopsis thaliana* hingegen ergibt sich mittlerweile ein sehr komplexes Bild, daß im nachfolgenden Modell versucht wurde darzustellen:

Grundsätzlich hat sich herausgestellt, daß Blühen ein „default“-Vorgang ist, der ohne weitere Beeinflussung sofort nach dem Keimen eintreten würde. Damit ist zunächst die Aktivität eines oder mehrerer Repressoren der Blühinduktion bzw. eines Promotors der vegetativen Phase notwendig, damit die *Arabidopsis*-Pflanze zunächst wachsen und damit Biomasse aufbauen kann, um danach in die reproduktive Phase überzugehen. Für die Hemmung der Blühinduktion sind bei *Arabidopsis thaliana* Genprodukte der Gene wie Embryonic Flower (EMF) oder Terminal Flower (TFL) zuständig. Bei *emf*-Mutanten tritt dabei die Blühinduktion tatsächlich direkt nach der Keimung ein, nach Ausbildung zweier Kotyledonen werden sofort Blütenstrukturen ausgebildet, bei *tfl*-Mutanten kommt es im Vergleich zum Wildtyp zu einer verfrühten Blüte mit einer abnorm geformten Blüte. Die Blühinduktion selbst beinhaltet mehrere Signalwege, den konstitutiven Signalweg, der unter allen Umständen zur Blüte führt (man hat bisher keine *Arabidopsis*-Mutante gefunden, die nicht irgendwann blüht), den Photoperiodengesteuerten Signalweg, der sowohl Tageslänge als auch die Lichtqualität registriert und den Gibberellin-gesteuerten Signalweg. Konstitutiver und Gibberellin-gesteuerter Signalweg zeigen zudem nach einer Beeinflussung durch Vernalisation, wobei die genaue Einordnung dieses Mechanismus in das Modell noch streitig ist. In der vorliegenden Arbeit wurden aus dem konstitutiven Signalweg die *fve*- und *fy*-Mutanten getestet, aus dem Photoperiodengesteuerten Signalweg die *fd*-Mutante und die *fwa*-Mutante, wobei diese beiden Mutanten in eine Subgruppe gestellt werden. Alle Signalwege führen zu einer Aktivierung von Floral Meristem identity Genen wie LFY und auch AG1, diese wiederum aktivieren dann die Gene, welche den Blütenaufbau kontrollieren.

Bei der Untersuchung der verschiedenen Mutanten hat sich gezeigt, daß keine Mutante unter Nitratinfluß anders reagiert als der Eltern-Wildtyp. Dies gilt sowohl für *tfl*, daß an der Reprimierung der Blühinduktion beteiligt ist, wie auch für die getesteten Mutanten aus dem konstitutiven und aus dem photoperiodengesteuerten Signalweg. Auch das „floral meristem identity“-Gen *lfy* reagiert nicht anders als der dazugehörige Wildtyp Ler. Die beiden Mutanten *fve* und *fy* aus dem konstitutiven Signalweg zeigen unter steigenden Nitratkonzentrationen eine besonders starke Verzögerung der Blühinduktion, d. h., die Nitratantwort wird durch die Mutation verstärkt. Auch *fwa* zeigt eine deutliche Verzögerung der Blühinduktion mit zunehmender externer Nitratversorgung, während *fd*, das zusammen mit *fwa* in einer Untergruppe des photoperiodisch gesteuerten Signalweges steht, schwächer reagiert. Dem FWA-Genprodukt wird eine eher hemmende Beteiligung an der Blühinduktion zugewiesen, dies wird durch den Einfluß von Nitrat noch verstärkt. *LFY* als floral meristem identity-Gen reagiert kaum anders als der Wildtyp, Nitrat hat keinen Einfluß auf die Funktion des Genproduktes. Blühen wird durch Stoffe, die von den Blättern abgegeben werden, induziert. Diese Blühstimuli werden über das Phloem transportiert und gelangen damit auch in die Wurzeln, wo sie modifiziert werden. Bei der Modifikation in der Wurzel könnte Nitrat eine Rolle spielen, in diesem Pflanzenorgan findet die Assimilation statt. Dazu wurden Pflanzen, die im ANR1-Gen mutiert sind, ebenfalls auf ihre Blühinduktion in Abhängigkeit von der externen Nitratkonzentration untersucht. Bei dem ANR1-Gen handelt es sich um einen MADS-Box-Transkriptionsfaktor, der durch lokale Nitratgabe in seiner Expression induziert wird und an der Entwicklung von Lateralwurzeln in Abhängigkeit von der externen Nitratverfügbarkeit beteiligt ist. Fällt dieser Transkriptionsfaktor aus, so hat die Pflanze keine Möglichkeit, bei niedriger Nitratversorgung Lateralwurzeln auszubilden, um über eine vergrößerte aufnahmefähige Oberfläche mehr Nitrat zu erschließen. Die Mutantengenotypen zeigten jedoch nur eine geringe Verzögerung der Blühantwort und auch die Abhängigkeit des internen Nitratspiegels war nicht verändert gegenüber dem Eltern-Wildtyp. Die internen Nitratspiegel stiegen bei geringen externen Nitratspiegeln sogar leicht an, obwohl die Mutanten erwartungsgemäß niedrigere Biomassen als der Wildtyp zeigten, da sie aufgrund der Mutation weniger Lateralwurzeln ausbilden konnten.

Betrachtet man die weiteren Ergebnisse der verschiedenen Blühmutanten, so zeigen einige von ihnen Veränderungen in den Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren, die im Shikimisäureweg entstehen. Dieser Syntheseweg kommt bei Pflanzen, Bakterien und Pilzen vor, nicht aber bei Tieren. Für diese sind damit die Aromaten essentiell, sie müssen sie mit der

Nahrung aufnehmen. Die aromatischen Aminosäuren sind Ausgangsstoff für viele Metaboliten vor allem aus dem Sekundärmetabolismus, die wichtige Funktionen wie Schutz vor Tierfraß haben. Von Phenylalanin leiten sich zum Beispiel die Phenylpropanoide ab, wichtige Vertreter des Sekundärmetabolismus. Einer der wichtigsten Metabolite, der sich von Phenylpropanoid-Alkoholen ableitet, ist Lignin. Lignin ist wichtigster Bestandteil von pflanzlichen Zellwänden, das sowohl mechanische Stützfunktion als auch Schutz vor Tierfraß bietet. Phenylalanin ist aber auch Vorstufe für die Flavonoide. Zu diesen gehören auch die Anthocyane, die blauen Farbstoffe der Pflanze. Die Flavone bzw. Flavonole dienen dem Schutz vor UVB-Strahlung, während die Isoflavonoide als Phytoalexine agieren, die bei bakteriellem oder Pilzbefall synthetisiert werden. Tyrosin und Tryptophan bilden die Vorstufe zu verschiedenen Alkaloiden wie Auxin, Codein, Morphin oder auch Strychnin. Andere Aminosäuren, die in die Alkaloidsynthese eingehen sind Ornithin als Vorstufe für Nicotin oder auch Lysin. Ornithin stammt dabei aus dem Harnstoffzyklus, während Lysin sich von Aspartat ableitet.

Die Aminosäuren aus dem Harnstoffzyklus sind auch Vorstufen für Putrescin, das eine blühfördernde Wirkung hat und Spermin bzw. Spermidin, die wachstumsfördernd wirken. Zu den möglichen Auswirkungen ist bei den einzelnen Mutanten bereits eine Deutung gegeben worden.

Vor allem fällt auf, dass die Mangelbedingung zumindest in Bezug auf Blattzahl und Biomasse, aber auch bei den Metaboliten, meist am geringsten auf Mutationen reagiert. Auch die Blühverlaufskurve wird teilweise weniger stark verschoben als die anderen Bedingungen. Bei diesen Streßbedingungen kann Nitrat wahrscheinlich nicht mehr als Signalstoff agieren, sondern wird nur als N-Quelle genutzt. Vermutlich gibt es einen Art Schwellenwert für Nitrat als Signalstoff, der überschritten werden muß, damit eine nitratgesteuerte Antwort in der Pflanze ablaufen kann.

Bei allen Mutanten führte Glutamin in Bezug auf die Zeitskala zu einer rascheren Blühinduktion, dies beruhte jedoch nur auf einem etwas schnellerem Wachstum, und Blattzahl und Sprossbiomasse zum Zeitpunkt der Blüte waren ähnlich zu denen von Pflanzen, die auf dem gleichen Nitratgehalt in der Abwesenheit von Glutamin angezogen wurden. Dies bedeutet, daß keine der Mutanten eine veränderte Reaktion auf N-haltige Derivate im Vergleich zum Wildtyp zeigte.

Bei den untersuchten Mutanten kam es in Abhängigkeit von der externen Nitratversorgung nicht zu einer veränderten Blühinduktion im Vergleich zum jeweiligen Eltern-Wildtyp. Jedoch sind nicht alle Signalwege, die an der Blühinduktion beteiligt sind, über verschiedene Mutanten untersucht worden. Sowohl der Gibberrellingesteuerte (obwohl dieser indirekt durch Gene wie FVE und FCA beeinflusst wird) als auch der Photoperiodengesteuerte Signalweg könnten eine Beeinflussung durch Nitrat zeigen. Der Photoperiodengesteuerte Signalweg enthält verschiedene Untergruppen, in einer Untergruppe reagieren die Mutanten nur unter Langtagbedingungen mit verzögertem Blühen. Die gestesteten Mutanten *fwa* und *fd* werden in eine eigene Untergruppe gestellt, da sie bei Langtagbedingungen mit verzögerter Blühinduktion und bei Kurztagbedingung mit leicht verzögerter Blühinduktion reagieren.

Insgesamt ist es aber auch notwendig, neben der Metaboliten Genexpression oder auch Enzymaktivitäten verschiedenster Proteine nachzuweisen, dazu gehören die Gene und Enzyme aus der Nitratassimilation, aber auch aus dem Kohlenstoffmetabolismus. Es ist gezeigt worden, dass Stärkemutanten eine verzögerte Blühinduktion aufweisen (siehe Einleitung). Weitere Kandidaten wären die Gene und Enzyme aus der Putrescin-Synthese. Putrescin hat laut Caffao & Vincente (1995) einen fördernden Effekt auf die Blühinduktion. Die meisten Gene, die der Blühinduktion zugerechnet werden, sind regulative Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression anderer Gene beeinflussen bzw. Signale übermitteln.

Interessanter Kandidat für eine mögliche Steuerung der Blühinduktion durch Nitrat wäre z.B. *elf3*, das als Zeitgeber für circadiane Rhythmik fungiert (Covington et al. 2001). Das NR einem diurnalen Rhythmus unterliegt, ist von W.-R. Scheible erfolgreich in seiner Dissertation untersucht worden. Um die Rolle von *elf3* unter Nitrateinfluß zu ermitteln, wäre eine Doppelmutante, die sowohl in NR als auch in *elf3* mutiert ist, nützlich. Zur NR ist bekannt, daß die NR ihren circadianen Rhythmus auch unter Dauerlichtbedingungen beibehält (Deng et al. 1990), von *elf3*-Mutanten weiß man, daß Blattbewegungen und „circadian clock regulated“ Genexpression unter Dauerlicht arrhythmisch sind. Aufgrund des Vergleichs von Sequenzmustern kann davon ausgegangen werden, daß ELF3 wahrscheinlich als Transkriptionsfaktor dient (Hicks et al. 2001). ELF3 agiert zusammen mit PHYB als Blührepressor.

Ein weiterer Kandidat für eine mögliche Nitratsteuerung wäre aber auch *emf1/2*. Beide Mutanten zeigen fast keine vegetative Phase, sondern beginnen nahezu sofort nach der Keimung mit der Ausbildung einer Blüte. Würde Nitrat diesen Mutantenphänotyp aufheben, so müßte es an der Regulation des sogenannten „Floral Repressors“ beteiligt sein, der vielleicht von den *EMF*-Genen kodiert wird (Haughn et al. 1995, Martinez-Zapater et al. 1994, Sung et al. 1992). Dieser Repressor nimmt im Laufe der vegetativen Phase ab und Nitrat könnte diese Degradation beeinflussen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß sich keine Nitratabhängigkeit für diese Mutante ergibt, da im allgemeinen die Mutantenscreens auf Medien durchgeführt werden, die Nitrat enthalten.

Es hat sich gezeigt, daß der hemmende Effekt von Nitrat auf die Blühinduktion durch Langtagbedingungen überwunden wird. Mutanten aus diesem Signalweg wie *fwa* und *fd* zeigten jedoch keinen Verlust der Nitratsensitivität. Dies bedeutet, daß die Interaktion zwischen Photoperioden-Wahrnehmung und Nitrat nicht darauf beruht, daß beide Faktoren in einem Signalweg agieren. Vielmehr ist davon auszugehen, daß Nitrat über einen eigenen Signalweg agiert, der von Signalen aus dem Photoperioden-Signalweg unter Langtagbedingungen überwunden wird. Dabei ist zu beachten, daß die beiden Mutanten *fwa* und *fd* zu einer Untergruppe gestellt werden. Es ist daher notwendig, weitere Mutanten aus diesem Signalweg wie *co* oder *gi* zu testen, um festzustellen, ob die bisherigen Aussagen grundsätzlich für diesen Signalweg gelten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben keine Anhaltspunkte darüber, ob hohe Nitratkonzentrationen die Blühinduktion hemmen oder niedrige Nitratkonzentrationen diese fördern. Beides wäre möglich. Um dies wirklich festlegen zu können, müssten Mutanten mit veränderter Nitratwahrnehmung auf Blühinduktion hin getestet werden. Tabak-Mutanten mit verringerter NR-Aktivität (50% der Wildtyp-Aktivität) zeigen keine Veränderung im Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und wiesen ähnliche Aminosäurekonzentrationen wie der Wildtyp auf (?)

Die Möglichkeit, das hohe oder niedrige Nitrat ein hemmendes bzw. förderndes Signal für die Blühinduktion darstellt, beeinflusst die Planung und Interpretation der weiteren Experimente. W.-R. Scheible hat in seiner Dissertation 1996 gezeigt, dass in Wildtyp-Pflanzen der Nitratgehalt gegen Ende der Nacht hoch ist und im Verlauf des Tages abfällt. Daher sollten weitere Experimente mehrere Erntezeitpunkte über den Tag hinweg beinhalten, um circadiane Rhythmen bestimmen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Nitrat spielt eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Entwicklung und beeinflusst maßgeblich die Biomasseallokation, das Sproß/Wurzel-Verhältnis und Enzymaktivitäten aus dem Kohlenstoff- und Nitratassimilationsmetabolismus. Aufgrund dieser Faktoren ist auch eine maßgebliche Rolle bei der Blühinduktion von *Arabidopsis thaliana* zu vermuten. Bei der Blühinduktion spielen mehrere Signalwege zusammen, die zum einen verschiedene Faktoren aus der Umgebung wie Tageslänge oder Temperatur registrieren. Aber auch interne Stoffe wie Gibberelline oder auch Kohlenhydrate haben durch ihre Verfügbarkeit einen Einfluß auf die Blühinduktion. In der vorliegenden Arbeit hat sich gezeigt, daß es mit zunehmender externer Nitratversorgung zu einer Verzögerung der Blühinduktion kommt, dies hat sich bei verschiedenen frühblühenden Wildtypen gezeigt. Diese Reaktion wird durch die Länge der Photoperiode moduliert, je kürzer die Photoperiode, desto stärker zeigt sich der Nitrateinfluß auf die Blühinduktion. Der interne Nitratgehalt wird dabei fast ausschließlich vom externen Nitratangebot gesteuert, nur sehr kurze Photoperioden von 8 h Licht führen zu einer allgemeinen Absenkung der internen Nitratspiegel. Die Aminosäuren hingegen reagieren hauptsächlich auf die Tageslänge und nicht kaum auf das externe Nitratangebot, die Kohlenhydrate werden von beiden Faktoren beeinflusst. Es hat sich erwiesen, daß die getesteten Mutanten, *tfl1* als Blührepressor, , *fwa* und *fd* als Mutanten aus dem Photoperiodengesteuerten Signalweg, *fve* und *fy* aus dem autonomen Signalweg und *lfy* als Vertreter der „floral meristem identity“-Gene. keine veränderte Blühinduktion infolge ansteigender Nitratkonzentrationen zeigten, sie reagieren wie der Wildtyp mit verzögerter Blühinduktion bei ansteigenden Nitratkonzentrationen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben auch gezeigt, dass *ANRI*, ein MADS-Box-Transkriptionsfaktor, der an der Kontrolle der Wurzelarchitektur durch Nitrat beteiligt ist nicht beteiligt ist an der Regulation der Blühinduktion durch Nitrat.

Aus versuchstechnischer Hinsicht hat sich Glutamin als gute Ersatz-N-Quelle erwiesen, die kaum einen Einfluß auf Biomasse oder wichtige Inhaltsstoffe wie Nitratspiegel oder Kohlenhydrate zeigt. Damit ist möglich, auch bei niedrigen Nitratkonzentrationen die Signalwirkung von Nitrat zu beobachten, ohne das dieses als N-Quelle verbraucht wird. Glutamin und die sich daraus ergebenden Veränderungen in den nachfolgenden Aminosäuren hatten keinen sichtbaren Effekt auf den zeitlichen Verlauf der Blühinduktion.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>adp1</i>	<i>ADP glucose pyrophosphorylase 1</i> (Arabidopsis-Gen)
Ala	Alanin
<i>API</i>	<i>APETALA1</i> (Arabidopsis-Gen)
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
<i>cam 1</i>	<i>carbohydrate accumulation mutant 1</i> (Arabidopsis-Gen)
Col	Columbia
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i> (Arabidopsis-Gen)
<i>CRY1 /2</i>	<i>CRYPTOCHROME 1/2</i> (Arabidopsis-Gen)
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch)
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>EMF</i>	<i>EMBRYONIC FLOWER</i> (Arabidopsis-Gen)
Fd	Ferredoxin
FG	Frischgewicht
Fru	Fruktose
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAI	GIBBERRELLIN INSENSITIVE (Arabidopsis-Gen)
<i>GI</i>	<i>GIGANTEA</i> (Arabidopsis-Gen)
g	Gramm
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GOGAT	Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
h	Stunde (englisch: hour)

Hepes	N-(-2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure)
HPLC	High-Performance liquid chromatography (Hoch auflösende Flüssigkeitschromatographie)
<i>LD</i>	<i>LUMINIDEPENDENS</i> (Arabidopsis-Gen)
<i>LHY</i>	<i>LONG HYPOCOTYL</i> (Arabidopsis-Gen)
LFY	LEAFY (Arabidopsis thaliana-Mutante)
Ler	Landsberg erecta
M	Molar
MADS	zusammengesetzt aus: <i>MCM1</i> / <i>Agamous</i> / <i>Deficiens</i> / <i>fos</i> , diese zuerst identifizierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den homeotischen Genen und gaben dieser Gruppe von Genen ihren Namen
Mes	2-(N-Morpholino)ethanolsulfonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Minimolar
mRNA	messenger- Ribonukleinsäure (englisch)
N	Stickstoff
n	Anzahl der Replikate pro Meßpunkt
NAD(P)(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)(reduziert)
NR	Nitratreduktase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>pgm</i>	<i>phosphoglucomutase</i> (Arabidopsis-Gen)
<i>PHYA / PHYA</i>	<i>PHYTOCHROM A / B</i> (Arabidopsis-Gen)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: rounds per minute)
<i>sex1</i>	<i>starch excess 1</i> (Arabidopsis-Gen)
TFL1	TERMINAL FLOWER1 (Arabidopsis thaliana-Mutante)
U	Unit ( Einheit der Enzymaktivität, 1 U = 1 µmol umgesetztes Substrat*min <sup>-1</sup> = 1,67 * 10 <sup>-8</sup> katal)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-Glc	Uridin-5'-diphosphoglukose
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
w/v	Gewicht je Volumen

z.B.                      zum Beispiel

Zu allen anderen Mutanten wurde nur die Abkürzung gefunden, sodaß der volle Name nicht angegeben werden kann.

Dies betrifft folgende Mutanten: *FCA, FVE, FT, FWA, FD, FY, FLD, VRN*

Glutamin wird im Text als Gln abgekürzt.

- Agbaria, H., Heuer, B. & N. Zieslin (1996) Shoot-Root interaction effects on nitrate reductase and glutamine synthetase activities in rose (*Rosa x hybrida* cvs. Ilseta and Mercedes) Graftings. *Plant Physiol* **149**, 559 - 563
- C. Alonso-Blanco & M. Koorneef (2000) Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science* **5** (1), 22 - 29
- Alvarez, J., Guli, C.L., Yu, X.H., Smyth, D.R. (1992) *terminal flower*: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *fi* **2**, 103 - 116
- Ameziane, R., Limami, M.A., Noctor, G. & J.-F. Morot-Gaudry (1995) Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strength in chicory. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1423 - 1428
- Araki, T., Kobayashi, Y., Kaya, H. & M. Iwabuchi (1998) The flowering-time gene FT and regulation of flowering in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.* **111**, 277 - 281
- Araki, T. (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 63 - 68
- Aslam, M. & R.C. Huffacker (1984) Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of Barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.* **75**, 623 - 628
- B. Atilio J. & H.F. Causin (1996) The central role of amino acids on nitrogen utilisation and plant growth, *J. Plant Physiol* **149**, 358 - 362
- Aubert, D., Chen, L., Moon, Y.-H., Martin, D., Castle, L.A., Yang, C.H., Sung, Z.R. (2001) EMF1, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 1865 - 1875
- Aukerman, M.J. & Amasino, R.M. (1998) Floral induction and florigen. *Cell* **93**, 491 - 494
- Aukerman, M.J., Lee, I., Weigel, D., Amasino, R.M. (1999) The *Arabidopsis* flowering-time gene LUMINIDEPENDENS is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates LEAFY expression. *The Plant Journal* **18**(2), 195 - 203
- Ågren, G.I., Ingestad, T. (1987) Root:shoot-ratio is a balance between nitrogen productivity and photosynthesis. *Plant Cell and Environment* **10**, 579 - 586
- D.J. Bagnall (1992) the control of flowering of *Arabidopsis thaliana* by light, vernalisations and Gibberellins. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 401- 409
- D.J. Bagnall (1993) Light quality and vernalisation interaction in controlling late flowering in *Arabidopsis* ecotypes and mutants. *Annals of Botany* **71**, 75 - 83
- Barneix, A. J. & H.F. Causin (1996) The central role of amino acids on nitrogen utilisation and plant growth. *J. Plant Physiol* **149**, 358 - 362
- Barneix, A.J., James, D.M., Watson, E.F. Hewitt, E.J. (1984) Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Sonja. *Planta* **162**, 465 - 476

- Beevers, L., Hagemann, R.H. (1969) Nitrate reduction in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **20**, 495 - 522
- Ben-Zioni, A., Vaadia, Y. & S.H. Lips (1970) Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. *Physiologia Plantarum* **23**, 1039 - 1047
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. & P. Lejeune (1993) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* **5**, 1147 - 1155
- Blázquez, M., Soowai, L., Lee, I., Weigel, D. (1997) LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 3835 - 3844
- Blázquez, M., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., Weigel, D. (1998) Gibberelins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY Promotor. *The Plant Cell* **10**, 791 - 800
- Blázquez, M. & Weigel, D. (1999) Independent regulation of flowering by phytochrome B and Gibberelins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **120**, 1025 - 1032
- Borochoy, A., Spiegelstein, H. & A. H. Halevy (1995) Involvement of signal transduction pathway components in photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiologia Plantarum* **95**, 393 - 398
- Bowman, J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M. (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37 - 52
- Bowsher, C.G., Long, D.M., Oaks, A. & S.J. Rothstein (1991) Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. *Plant Physiol* **95**, 281 - 285
- Bradley, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Rothstein, S., Coen, E. (1996) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* **379**, 791 - 797
- Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S. & W.J. Peacock (1993) DNA methylation, vernalisation and the initiation of flowering. *Proc. Nat. Acad. Sci* **90**, 287 - 291
- Burn, J.E., Smyth, D.R. Peacock, W.J. & E.S. Dennis (1993) Genes conferring late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* **90**, 147 - 155
- Caspar, T., Lin, T.-P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., Somerville, C.R. (1991) Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol.* **95** (1), 181 - 188
- Causin, H.F., Barnaix, A.J. (1994) The effect of glutamine and asparagine on net  $\text{NH}_4^+$  uptake in young wheat plants. *Plant and Soil* **161**, 257 - 266
- Cheng, C.L., Acedo, G.N., Christinsin, M., Conkling, M.A. (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1861 - 1864
- Chou, M.-L. & Yang, C.-H. (1999) Late-flowering genes interact with early-flowering genes to regulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **40**(7), 702 - 708

- Chu, C.C., Coleman, J.S., Mooney, H.A. (1992) Control of biomass partitioning between roots and shoot: atmospheric carbon dioxide enrichment and the acquisition and allocation of carbon and rice in wild radish. *Oecologia* **89**, 580 - 587
- Clarkson, D.T., Tourraine, B. (1994) Morphological response of plants to nitrate-deprivation: a role for abscisic acid? In: *A whole Plant Perspective of Carbon-Nitrogen Interactions* (Roy J., Garnier E., eds) The Hague, Academic Publishing, The Netherlands 131 - 148
- Coen, W.S. (1991) The role of homeotic genes in flower development and evolution. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 211 - 279
- Corbesier, L., Lejeune, P. & G. Bernier (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild-type and a starchless mutant. *Planta* **206**, 131 - 137
- Coupland G. (1995) Genetic and environmental control of flowering time in Arabidopsis. *Trends in Genetics* **11** (10), 393 - 397
- Coupland G. (1997) Regulation of flowering by photoperiod in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* **20**, 785 - 789,
- Covington, M.F., Panda, S., Liu, X.L., Strayer, C.A., Wagner, D.R., Kay, S.A. (2001) ELF3 modulates resetting of the circadian clock in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 1305 - 1315
- Crawford, N.M., Arst, H.N. Jr. (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 115 - 146
- Crawford, N.M. (1995) Nitrate : Nutrient and Signal for Plant growth. *The Plant Cell* **7**, 859 - 868
- Davies, D.D. (1986) The fine control of cytosolic pH. *Physiol. Plant.* **67**, 702 - 706
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. & H. Sommer (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *The EMBO Journal* **15**(16), 4330 - 4343
- Deng, M.-D., Moureaux, T., Cherel, I., Leydecker, M.-T. & M. Caboche (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, M.-D., Moureaux, T., Cherel, I., Boutin, J.-P. & M. Caboche (1991) Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol Biochem* **27**(3), 239 - 247
- Dijkwel, P.P., Huijser, C., Weisbeek, P.J., Chua, N.H., Smeeckens, S.C.M. (1997) Sucrose control of phytochrome signalling in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**, 583- 595
- Eimert, K., Wang, M., Lue, W.-L., Chen, J.C. (1995) Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**, 1703 - 1712
- Faure, J.D., Vincentz, M., Kronenberger, J., Caboche, M. (1991) Coregulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant J.* **1**, 107 - 113

- Ferrario, S., Valadher, M.-H., Moron-Gaudry, J.-F., Foyer, C.H. (1995) Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. *Planta* **196**, 288 - 294
- Ferrario-Méry, S., Masclaux, C., Suzuki, A., Valadier, M.-H., Hirel, B., Foyer, C.H. (2001) Glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine- $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase. *Planta* **213**, 265 - 271
- Fichtner, K. & E.-D. Schulze (1992) The effect of nitrogen nutrition on growth and biomass partitioning of annual plants originating from habitats of different nitrogen availability. *Oecologia* **92**, 236 - 241
- Fichtner, K., Quick, W.-P., Schulze, E.-D., Mooney, H.A., Rodermel, S.R., Bogorad, L., Stitt, M. (1993) Decreased ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with antisense *rbcS*. Relationship between photosynthetic rate, storage strategy, biomass allocation and vegetative plant growth at three different nitrogen supplies. *Planta* **190**, 1 - 9
- Garnier, E. & Vancaeyzeele, S. (1994) Carbon and nitrogen content of congeneric annual and perennial grass species. relationships with growth. *Plant, Cell and Environment* **17**, 399 - 407
- Gómez-Mena, C., Piñeiro, M., Franco-Zorrilla, J.M., Salinas, J., Coupland, G., Martínez-Zapater, J.M. (2001) early bolting in short days: an Arabidopsis mutation that causes early flowering and partially suppresses the floral phenotype of leafy. *The Plant Cell* **13**, 1011 - 1024
- Gowri, G., Kenis, J.D., Ingemarsson, B., Redinbaugh, M.G. & W.H. Campbell (1992) Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Molecular Biology* **18**, 55 - 64,
- Haughn, G.W., Schultz, E.A., Martínez-Zapater, J.M. (1995) The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristems, morphogenesis and mutants. *Can. J. Bot.* **73**, 959 - 981
- Havelange, A., Lejeune, P., Bernier, G., Kaur-Sawhney, R., Galston, A.W. (1996) Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* **96**, 59 - 6
- Hayakawa, T., Yamaya, T., Kamachi, K., Ojima, K. (1992) Purification, characterisation and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthetase from rice cell cultures. *Plant Physiol.* **98**, 1317 - 1322
- Hempel, F.D., Welch, D. R. & L.J. Feldman (2000) Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends in Plant Science* **5(1)**, 17 - 21
- Hicks, K.A., Albertson, T.M., Wagner, D.R. (2001) EARLY FLOWERING 3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 281 - 1292
- Hoff, T., Truong, H.-N., Caboche, M. (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ* **17**, 489 - 506

- Huber, S.C. (1983) Relation between photosynthetic starch formation and dry-weight partitioning between the shoot and root. *Can. J. Bot.* **61**, 2709 - 2716
- Huppe, H.C., Turpin, D.H. (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 577 - 607
- Jackson, W.A., Flesher, D., Hageman, R.H. (1973) Nitrate-uptake by dark-grown corn seedlings. *Plant Physiol.* **51**, 120 - 127
- Kaiser, W.M., Förster, J. (1989) Low CO<sub>2</sub> prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* **91**, 970 - 974
- Kania, T., Russenberger, D., Peng, S., Apel, K. & S. Melzer (1997) FPF1 promotes flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* **9**, 1327 - 1338
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., Weigel, D. (1999) Activation Tagging of the floral inducer FT. *Science* **386**, 1962 - 1965
- King, R.W., Bagnall, D.J. (1996) Photoreceptors and the photoperiodic response controlling flowering time in Arabidopsis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **7**, 449 - 454
- Karlsson, B.H., Sills, G.R. & J. Nienhuis (1993) Effect of photoperiod and vernalisation on the number of leaves at flowering in 32 Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) ecotypes. *American Journal of Botany* **80(6)**, 646 - 648
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. & J.H. van der Veen (1991) A genetical and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* **229**, 57 - 66
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., Soppe, W. (1998) Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **14**, 373 - 398
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, H., Blankestijn-de-Vries, C., Hanhart, J., Peeters, A.J.M. (1998) Genetic interactions among late-flowering mutants of Arabidopsis. *Genetics* **148**, 885 - 892
- Kreps, J.A. & S.A. Kay (1997) Coordination of plant metabolism and development by the circadian clock. *The Plant Cell* **9**, 1235 - 1244
- Krizek, B.A. & E.M. Meyerowitz (1996) The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**, 11 - 22
- Lainé, P., Ourry, A., Boucaud, J. (1995) Shoot control of nitrate uptake rates by roots of Brassica apus L.: effects of localised nitrate supply. *Planta* **196**, 77 - 83
- Lam, H.-M., Coschinnago, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M.-H. & G. Coruzzi (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 887 - 898

- Layzell, D.B. (1990) N<sub>2</sub> fixation, nitrate reduction and ammonium assimilation. In *Plant Physiology, biochemistry and molecular biology* (Dennis D.T. and Turpin D.H., eds.) Longman Scientific and technical, New York, S. 389 - 406
- Lee, R.B.V., Purves, R.G., Ratcliff, G., Saker, L.R. (1992) Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize. *J. Experimental Botany* **43**, 1385 - 1396
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F. D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F. & A. Gojon (1999) Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub>-uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *The Plant Journal* **18(5)**, 509 - 519
- D.A.Laurie (1997) Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* **35**, 167 - 177
- Lea, P.J. & B.G. Forde (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant, Cell and Environment* **17**, 541 - 556
- Li, X.-Z., Larson, D.E., Glibetic, M. & A. Oaks (1995) Effect of glutamine on the induction of nitrate reductase. *Physiologia Plantarum* **93**, 740 - 744
- Lin, T.-P., Caspar, T., Somerville, C., Preiss, J. (1988) Isolation and characterisation of a starchless mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Heyn, lacking ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **86**, 1131 - 1135
- Liu, X.L., Covington, M.F., Frankhauser, C., Chory, J., Wagner, D.R. (2001) ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis PHYB signal transduction pathway. *The Plant Cell* **13**, 1293 - 1304
- Lowry, O.H., Passoneau, J.V. (1972) A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press Inc., New York
- McDaniel, C.N. (1996) Developmental physiology of floral initiation in Nicotiana tabacum L. *J. Exp. Bot.* **47**, 465 - 475
- G. I. McIntyre (1997) The Role of Nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. *Aust.J. Plant Physiol* **24**, 103 - 118
- Mandel, M. A. & Yanofsky, M.F. (1995) A gene triggering flower formation in Arabidopsis. *Nature* **377**, 522 - 524
- Marschner, E. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, Zweite Auflage. Academic Press Ltd., London UK
- Martínez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C., Koornneef, M. (1994) The transition to flowering in Arabidopsis. In: *Arabidopsis* (eds. Somerville C.R. & Meyerowitz E.M.) pp. 403 - 433 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Martínez-Zapater, J.M., Jarillo, J.A., Cruz-Alvarez, M., Roldán, M. & J. Salinas (1995) Arabidopsis late-flowering five mutants are affected in both vegetative and reproductive development. *The Plant Journal* **7(4)**, 543 - 551
- Martinoia, E., Rentsch, D. (1994) Malate compartmentation - responses to a complex metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 447 - 467

- Marzluf, G.A. (1993) Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 31 – 55
- Matt, P., Schurr, U., Klein, D., Krapp, A., Stitt, M. (1998) Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugar, altered diurnal changes in the *Nia* transkript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. *Planta* **207**, 27 - 41
- Menzel, G., Apel, K., & S. Melzer (1996) Identification of two MADS box genes that are expressed in the apikal meristem of the long-day plant *Sinapsis alba* in transition to flowering. *The Plant Journal* **9(3)**, 399 - 408
- Merlo, L., Ferretti, M., Passera, C. & R. Ghisi (1994) Effect of decreased irradiance on N and C metabolism in leaves and roots of maize. *Physiologia Plantarum* **91**, 72 - 80
- E.M.Meyerowitz (1998) Genetic and molecular mechanisms of pattern function in Arabidopsis flower development. *J. Plant Res* **111**, 233 – 242
- Meyer zu Hörste, Gabrielle (1998) Der Einfluß von Aminosäuren auf das Wachstum und die Physiologie von Arabidopsis thaliana (L.) Heyn., Diplomarbeit, Universität Heidelberg
- Michaels, S.D. & Amasino, R.M. (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalisation. *The Plant Cell* **13**, 935 - 941
- Michal, G. (Hrsg) (1999) Biochemical Pathways, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Migge, A., Meya, G., Carryol, E., Hirel, B., Becker, T.W. (1997) Coaction of light and the nitrogen substrate in controlling the expression of the tomato genes encoding nitrite reductase and nitrate reductase. *J. Plant Physiol.* **151**, 151 - 158
- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H., Lin, C. (1999) Antagonistic actions of ARABIDOPSIS cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* **126**, 2073 – 2082
- Mulligan, R.M., Chory, J. & J.R.Ecker (1997) Signaling in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **94**, 2793 - 2795
- Näsholm, T. & A.J.S.McDonald (1990) Dependence of amino acid composition upon nitrogen availability in birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum* **80**, 507 - 514
- Neininger, A., Kronenberger, J., Mohr, H. (1992) Coaction of light, nitrate and a plastidic factor in controlling nitrite reductase gene expression in tobacco. *Planta* **187**, 381 - 387
- Nemhauser, J.L., Zambryski, P.C. & J.L.Roe (1998) Auxin signalling in Arabidopsis flower development? *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 531 - 535
- Ng, M. & Yanowsky, M.F. (2001) Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *The Plant Cell* **13**, 739 - 753
- Oaks, A. (1994) Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* **72**, 739 - 750

- Ogawa, K., Shiraishi, N., Ida, S., Nakawaga, H. & A. Komamine (1999) Effects of glutamine on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells. *J. Plant Physiol* **154**, 46 - 50
- Ohshima, S., Murata, M., Sakamoto, W., Ogura, Y., Motoyoshi, F. (1997) Cloning and molecular analysis of the Arabidopsis Terminla Flower1. *Mol Gen. Genet.* **254**, 186 - 194
- Oka, M., Ueda, J., Miyamoto, K., Okada, K. (1998) Activities of Auxin polar transport in inflorescence axes of flower mutants of Arabidopsis thaliana: relevance to flower formation and growth. *J. Plant Res.***111**, 407 - 410
- Onouchi, H. & G. Coupland (1998) The regulation of flowering time of Arabidopsis in response to daylength. *J. Plant Res* **111**, 271 - 275
- Onouchi, H. Igeno, M.I., Perilleux, C., Graves, K., Coupland, G. (2000) Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *The Plant Cell* **12**, 885 - 900
- Page, T., Macknight, R., Yang, C.-H. & C. Dean (1999) Genetic interactions of the Arabidopsis flowering time gene FCA with genes regulating floral initiation. *The Plant Journal* **17(3)**, 231 - 239
- Parcy F., Nilsson O., Busch M.A., Lee I., Weigel D. (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561 - 566
- Pelaz, S., Gustafson-Brown, C., Kohalmi, S.E., Crosby, W.L., Yanowski, M.F. (2001) APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *The Plant Journal* **26(4)**, 385 - 394
- Peuke, A.D., Hartung, W. & W.D. Jeschke (1994) The uptake and flow of C,N and ions between roots and shoots in Rcinus communis L. II: Grown with low or high nitrate supply. *Journal of Experimental Botany* **45 (275)**, 733 - 740
- Pidkowich, M.S, Klenz, J.E. & G.W. Haughn(1999) The making of a flower: control of floral meristem identy in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **4(2)**, 64 - 70
- Pilgrim, M.L., Caspar, T., Qhah, P.H., Robertson McClung, C. (1993) Circadian and light regulated expression of nitrate reductase in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **23**, 349 - 394
- Piñeiro, M. & Coupland, G. (1998) The control of flowering time and floral identity in Arabidopsis *Plant Physiol* **117**, 1 - 8
- Ratcliffe, O.J., Nadzan, G.C., Reuber, T.L., Riechmann, J.L. (2001) Regulation of flowering in Arabidopsis by an FLC homologue. *Plant Physiology* **126**, 122 - 132
- P.H. Reeves & G. Coupland (2000) Response of plant development to enviroment: control of flowering by daylength and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 37 - 42
- Roldan, M., Gomez-Mena, C., Ruiz-Garcia, L., Salinas, J. & J.M. Martínez-Zapater (1999) Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of Arabidopsis in the dark. *The Plant Journal* **20 (5)**, 581 - 590

- Ruiz-Garcia, L., Madueno, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J., Martínez-Zapater J.M. (1997) Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **9**, 1921 - 1934
- Runkle, E.S., Heins, R.D., Cameron, A.C., Carlsson, W.H. (2001) Photocontrol of flowering and stem extension of the intermediate-day plant *Echinacea purpurea*. *Physiologia Plantarum* **112**, 433 - 441
- Running, M.P. & Hake, S. (2001) The role of floral meristems in patterning. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 69 - 74
- Sakakibara, H., Watanabe, M., Hase, T., Sugiyama, T. (1991) Molecular cloning and characterisation of complementary DNA encoding ferredoxin-dependent glutamate synthetase in maize leaf. *J. Biol. Chem.* **266**, 2028 - 2035
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.-F., Lesaint, C. & E. Jolivet (1987) Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol Biochem* **25**, 805 - 812
- Sanda, S., John, M. & R. Amasino (1997) Analysis of flowering time in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Heredity* **88(1)**, 69 - 72
- Scheible, W.-R. (1996) Zur Bedeutung der Nitritreduktase per se für das Wachstum, den Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus von Tabak. Dissertation, Universität Heidelberg
- Scheible, W.-R., Gonzáles-Fontes, A., Lauerer, M., Müller-Röber, B., Caboche, M. & M. Stitt (1997a) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell* **9**, 783 - 897
- Scheible, W.-R., Lauerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M. & M. Stitt (1997b) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal* **11(4)**, 671 - 691
- Sheen, J., Zhou, L. & J.-C. Jang (1999) Sugars as signalling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 410 - 418
- Sheldon, C.C., Burn, J.E., Perez, P.P., Metzger, J., Edwards, J.A., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1999) The FLM MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalisation and methylation. *The Plant Cell* **11**, 445 - 458
- Schulze, W., Schulze, E.-D., Stadler, J., Heilmeyer, H., Stitt, M. & H.A. Mooney (1994) Growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate-uptake-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment* **17**, 795 - 809
- Schultz, E.A. & Haughn, G.W. (1993) Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 745 - 765
- Schuster, C., Mohr, H. (1990) Appearance of nitrite reductase mRNA in mustard cotyledons is regulated by phytochrome. *Planta* **181**, 327 - 334

- Shiraishi, N., Sato, T., Ogura, N. & H. Nakawaga (1992) Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultured spinach cells. *Plant Cell Physiol* **33**(6), 727 - 731
- Siddiqui, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J., Rufty, T.W. (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley. *Plant Physiol.* **93**, 1426 - 1432
- Simon, R., Igeño, M.I., Coupland, G. (1996) Activation of floral meristem identity genes in Arabidopsis. *Nature* **382**, 59 - 62
- Simpson, G.G., Gendall, A.R., Dean, C. (1999) When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 519 - 550
- Singer, Z.R. & McDaniel, C.N. (1986) Floral determination in the terminal and axillary buds of *Nicotiana tabacum* L. *Dev. Biol.* **118**, 587 - 592
- S. Smeeckens & F. Rook (1997) Sugar Sensing and Sugar-Mediated Signal Transduction in Plants. *Plant Physiol.* **115**, 7 - 13
- Solomonson, L.P., Barber, M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase : functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 225 - 253
- Soppe, W.J.J., Bentsink, L., Koornneef, M. (1999) The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **126**, 4763 - 4770
- Soppe, W.J.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M., Peeters, A.J.M. (2000) The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Molecular Cell* **6**, 791 - 802
- Stitt, M., Wirtz, W., Heldt, H.W., (1980) Metabolite levels during induction in the chloroplast and extrachloroplast compartment of spinach protoplast. *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 188 - 204
- Stitt, M., Cseke, C., Buchana, B. (1984) Regulation of fructose-2,6-biphosphate concentration in spinach leaves. *Eur. J. Biochem.* **143**, 89 - 93
- Stitt, M., Schulze, E.-D. (1994) Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth ? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant Cell and Environment* **17**, 465 - 487
- Stitt, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 178 - 186
- Sung, Z.R., Belachew, A., Shunong, B., Bertrand-Garcia, R. (1992) EMF, an Arabidopsis gene required for vegetative shoot development. *Science* **258**, 1645 - 1647
- Tacchini, P., Fink, A., Thiellement, H. & H. Greppin (1995) Analysis of leaf proteins in late flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **93**, 312 - 316
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*, second Edition, Sinauer Associates Inc., Publishers, Massachusetts
- Theißen, G. (2001) development of floral organ identity : stories from the MADS house. *Current Opinion on Plant Biology* **4**, 75 - 85

- Trewavas, A.J. (1983) Nitrate as a plant hormone In: Interaction between nitrogen and growth regulators in the control of plant development (Jackson M.B. eds.) British Plant Growth Regulator Group Monograph **9**, 97 - 110
- Trewavas, A.J. (1985) A pivotal role for nitrate and leaf growth in plant development In: Control of Leave Growth (Baker N.R. & Ons, C.K., eds.) *Society of Experimental Botany* . Seminar Series **27**, 77 - 91
- Vincentz, M. & M. Caboche (1991) Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *The EMBO Journal* **10** (5), 1027 - 1035
- Vincentz, M., Moureaux, T., Leydecker, M.-T., Vaucheret, H., Caboche, M. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* **3**, 315 - 324
- Vaucheret, H., Kronenberger, J., Lepingle, A., Vilaine, F., Boutin, J.P., Caboche, M. (1992) Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J.* **2**, 559 - 569
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., Meyerowitz, E.M. (1992) Leafy controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843 - 859
- Weigel, D. & Meyerowitz, E.M. (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**, 203 - 209
- Weigel, D. & Nilsson, O. (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**, 495 - 500
- Wirtz, W., Stitt, M., Heldt, H.W. (1980) Encymatic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts. *Plant Physiol.* **66**, 187 - 193
- Wray, J.L. (1993) Molecular biology, genetics and regulation of nitrite reduction in higher plants. *Physiologia Plantarum* **89**, 607 - 612
- Zhang, H. & B.F.Forde (1998) An *Arabidopsis* ;ADS Box Gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407 - 409
- Zhang, H. & B.F.Forde (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* **51** (349), 51 - 59

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, daß ich nicht versucht habe, weder An der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg noch an einer anderen Universität eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Heidelberg, Februar 2002

### **Mein besonderer Dank gilt:**

Herrn Professor Dr. Mark Stitt für die Überlassung des Themas, seine große Diskussionsbereitschaft und seine motivierende Betreuung beim Fortgang der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Thomas Rausch für die Übernahme des Korreferats.

Frau. Dr. A. Krapp für die erfolgte Betreuung.

Heike Weiner für Rat und Tat bei vielen technischen und auch persönlichen Fragen.

Regina Feil für die Unterstützung und vielen Tips bei den HPLC-Messungen.

Emilia Sancho-Vargas und Norbert Giermann für die netten Gespräche beim Mittagessen und die gegenseitige Unterstützung.

Manuela und Inge für die Versorgung mit Kaffee.

Norbert, Tanja und Jolanta für die gute Stimmung im kleinen Labor.

Den Ökofuzzis für Hilfe in letzter Minute.

Den Mitgliedern der AG Stitt für die Atmosphäre im Labor.

Dem Thermalbad Heidelberg für die Möglichkeit, was gutes für meinen Rücken zu tun.

Meiner Mutter und dem Rest der Familie für die Unterstützung und den Rückhalt, den ich manchmal sehr nötig hatte.

Und zum Schluß und ausnahmsweise mir selbst, daß ich diese Doktorarbeit tatsächlich zu einem Ende gebracht habe.