

Schlussbericht zum Vorhaben

Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese

Zuwendungsempfänger: Universität Rostock
Professur für Agrobiotechnologie und Begleitforschung
zur Bio- und Gentechnologie
Justus-von-Liebig-Weg 8
18059 Rostock

Universität Rostock
Lehrstuhl für Ökologie
Albert-Einstein-Straße 3
18051 Rostock

Förderkennzeichen: 22020208

Laufzeit: 01.05.2011 bis 30.04.2014

Nachbearbeitungszeit: 01.05.2014 bis 28.02.2015

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Datum der Veröffentlichung: 16.11.2015

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhalt

I.	Kurze Darstellung	4
I.1	Aufgabenstellung:	4
I.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:	4
I.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
I.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an denen das Vorhaben angeknüpft wurde	7
I.5	Literatur	9
I.6	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.	10
II.	Eingehende Darstellung	11
II.1	WP I: Optimierung der Photosynthese durch Verbesserung der Stresstoleranz	11
II.1.1	Bereitstellung von transgenen Pflanzen	11
II.1.2	Messung der Stresstoleranz und PsbO Menge unter Lichtstress	15
II.1.3	Ansätze zur Reduktion der Variabilität und Standardisierung des Versuchsansatzes zur Analyse weiterer Stressfaktoren	19
II.1.4	Abweichungen zum Projektantrag	30
II.2	WP II: Optimierung der C-Fixierung in Tabakpflanzen.....	32
II.3	WP III: Steigerung der Photosynthese und Kohlenstofffixierung in Pflanzen.....	38
II.4	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:	38
II.5	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit:	38
II.6	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:	38
II.7	Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:	39
II.8	Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen.....	39
II.9	Arbeiten nach Abschluss des Projektes	41
III.	Erfolgskontrollbericht	42
III.1	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen	42
III.2	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens	42
III.3	Fortschreibung des Verwertungsplans.....	43

III.3.1	Ansätze zum Nachweis der Expression von rekombinantem PsbO in Pflanzen	44
III.3.2	Neue Ansätze zur Untersuchung der Stresstoleranz	45
III.3.3	Abschlussarbeiten:	45
III.3.4	Tagungsbeiträge:.....	45
III.3.5	Geplante Publikationen:	46
III.4	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.....	46
III.5	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	46
III.6	Die Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.....	46
IV.	Kurzfassung	47
IV.	Berichtsblatt	51

I. Kurze Darstellung

I.1 Aufgabenstellung:

Ziel des Projektes war es, in Pflanzen eine unter Stressbedingungen erhöhte Biomasseproduktion zu erreichen indem:

1. die Stresstoleranz der Photosynthese gesteigert wird, um eine gleichmäßige und von abiotischen Stressfaktoren unabhängige Energieversorgung der Pflanze zu gewährleisten,
2. die Effektivität des Calvinzyklus verbessert wird, um auf Basis der stabilen Energieerzeugung eine verstärkte Kohlenhydratproduktion zu erreichen.

Es wurde erwartet, dass die resultierenden Pflanzen auch unter erhöhten Temperaturen und verringertem Wasserangebot gleichbleibende oder höhere energetisch verwertbare Biomasseerträge liefern.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Im Hinblick auf den möglichen Einfluss von Klimaänderungen (steigende Temperaturen, Trockenheit) und die damit möglichen synergistischen Verstärkungen von Wirkungen anderer abiotischer Stressfaktoren ist eine Erhöhung der Stresstoleranz von Kulturpflanzen eine wesentliche Strategie zur Reduktion stressbedingter Ertragsverluste.

Die Photosynthese ist einer der primären Vorgänge in der Pflanze, die durch abiotischen Stress negativ beeinflusst wird. Gleichzeitig ist sie der in Pflanzen entscheidende Prozess der Energiebereitstellung für allgemeine und spezifische Mechanismen der Stressakklimatisation. Das extrinsische Protein PsbO stabilisiert den sauerstoffentwickelnden Komplex (Mangancluster, OEC - oxygen evolving complex), des Photosystems II (PSII) unter anderem unter Starklichtbedingungen und dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies [1- 4].

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Mutanten von *Synechococcus sp.* PCC 7942, die eine erhöhte Expression von PsbO hatten und eine deutlich höhere Fitness sowie höhere Biomasseproduktion aufwiesen [5]. Die positive Korrelation zwischen PsbO-Expression und Anzahl aktiver PSII in *Arabidopsis*-Mutanten [2] unterstützte die Arbeitshypothese, dass eine erhöhte Bereitstellung von PsbO, nicht zuletzt in Phasen pessimaler Bedingungsgefüge zu einer im Vergleich optimierten bzw. stabilisierten PSII-Effizienz führen kann. Die erhöhte Expression von PsbO erschien somit geeignet, Fitness im Kontext der vergleichsweise stressempfindlichen Funktionen am PSII (Schutz vor Photoinhibition) und letztendlich die Biomasseproduktion speziell unter Stress zu steigern.

Neben der Stabilisierung der Biomasseproduktion unter abiotischem Stress ist es in Anbetracht des steigenden Bedarfs an nachwachsenden Rohstoffen sowie der begrenzten Verfügbarkeit von Nahrungsmitteln von Bedeutung, die Erträge im Vergleich zum heutigen Niveau deutlich zu steigern. Dies kann über eine Erhöhung der Kohlenhydratproduktion (Steigerung der Effektivität des Calvin-Zyklus) in der Pflanze geschehen, welche zu einer verstärkten Biomasseproduktion führen sollte.

Als limitierender Schritt des Calvin-Zyklus wird die Reaktion angenommen, welche von den Enzymen Fructose-1,6 (FBPase) und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) katalysiert wird [6-8]. Durch Überexpression sowohl von FBPase als auch SBPase konnte in Tabak eine effizientere Kohlenstofffixierung erreicht werden. Insbesondere wurden Photosyntheseleistung und Wachstumsraten gesteigert [6-8]. In unserem Ansatz wurde ein cyanobakterielles Gen eingesetzt, das beide Funktionen erfüllt (FBP/SBPase). Möglicherweise könnte dieses

Enzym die Vorteile der beiden einzelnen Enzyme kombinieren und so zu noch stärkeren Effekten führen.

In der Kombination der Stabilisierung der Photosynthese unter Stress und der erhöhten Fixierung der hier produzierten Energie im Calvinzyklus sahen wir einen innovativen Ansatz um - mittels grüner Gentechnik - den Herausforderungen des Klimawandels und der Flächenkonkurrenz nachhaltig zu begegnen.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Umsetzung des Ziels einer gesteigerten Phytobiomasse waren Modifikationen in ausgewählten Stoffwechselwegen vorgesehen.

WP I: Optimierung der Photosynthese durch Verbesserung der Stresstoleranz

Es wurden aus drei verschiedenen Organismen (*Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* PCC 6303 und *Thermosynechococcus elongatus* BP-1) *psbO* kodierende Gene in geeignete Pflanzentransformationsvektoren kloniert und anschließend in Tabakpflanzen eingebracht. Tabak wurde wegen seiner vergleichsweise leichten und schnellen Transformierbarkeit und Eignung für ein „proof of concept“ ausgewählt. Die Fertigstellung der Konstrukte, die Transformation der Pflanzen, sowie der sich anschließende molekulare Nachweis der DNA, RNA und des *PsbO*-Proteins wurden von der Arbeitsgruppe Broer (AGB) vorgenommen. Es konnten Transformationsereignisse aller drei *psbO*-Gene per PCR identifiziert und deren Transkript nachgewiesen werden. Der eindeutige Nachweis des rekombinanten *PsbO*-Proteins im Vergleich zum endogenen *PsbO*-Protein war in diesen stabilen Transformanten jedoch nicht möglich, da nur die Gesamt-*PsbO*-Menge gemessen werden konnte. Alle vorhandenen Antikörper erkannten sowohl das pflanzeigene als auch das transgenkodierte *PsbO*. Auch in nicht photosynthetisch aktiven Geweben wie Wurzeln oder etiolierten Keimlingen, in denen das endogene *PsbO*-Protein nicht vorkommt, konnte kein transgenkodiertes *PsbO* nachgewiesen werden. Dies ließe sich durch den bei [9, 10] beschriebenen Effekt erklären, dass der Transport des Vorläuferproteins von *PsbO* nur in Chloroplasten, nicht aber in andere Plastiden möglich ist. Zusätzlich könnte vermutet werden, dass *PsbO* nur im Komplex mit den Proteinen des Photosystems II stabil ist, mit denen es im System assoziiert ist. Dann könnte immer nur so viel *PsbO*-Protein detektiert werden wie Komplexpartner zur Verfügung stehen. Für den hier verfolgten Ansatz würde keine der beiden Erklärungen störend sein, da wir davon ausgehen das *PsbO* unter Stress limitierend wirkt, eine förderliche Wirkung der Überexpression wäre also unter Stress durchaus zu erwarten.

Unter der Annahme, dass eine Detektion des instabilen Proteins dann möglich ist, wenn es in sehr hohen Mengen hergestellt wird, weil der Abbau langsamer erfolgt als die Produktion, wurde versucht, das *PsbO*-Protein durch transiente Überexpression im Vergleich zur Leervektor-kontrolle zu akkumulieren. Es konnte jedoch keine Akkumulation nachgewiesen werden.

Um die Expression von *PsbO* in den transgenen Pflanzen zu erhöhen wurde zusätzlich zum geplanten Vorhaben durch die AGB ein an die Codon-Nutzung der Pflanzen angepasstes *psbO*-Gen aus *T. elongatus* BP-1 kloniert und erfolgreich in Tabakpflanzen eingebracht. Die Kodierregion dieses Gens enthält am N-terminalen Ende ein 6xHis tag, der eine eindeutige Unterscheidung zum endogenen *psbO*-Gen des Tabaks ermöglicht. Eine erste transiente Expression in Tabakpflanzen war erfolgreich. Zudem wird überprüft, ob das zusätzliche *PsbO*-Protein möglicherweise unter Stress zu einem Elektronenstau führt, der zu einer höheren ROS (reactive oxygen species) Menge in der Pflanze führt. Da angenommen wurde, dass das endogene *PsbO*-Protein auf Grund seiner Regulation in der Pflanze unter Stress den limitierenden

Faktor darstellt, wurde durch die Arbeitsgruppe Schubert (AGS) *in vivo* Lichtstress induziert und durch die AGB die entsprechende PsbO Menge gemessen. Die transgenen Pflanzen sollten unter Stress höhere PsbO Mengen aufweisen als die konventionellen Kontrollen. Da hierbei starke Schwankungen in der PsbO-Expression zwischen den Events auftraten, wurde nachfolgend ein Versuchsdesign erstellt, welches den Vergleich der PsbO-Proteinwerte in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus des beprobten Blattes sowie des Stressstatus erlaubte.

Neben Lichtstress wurden die abiotischen Stressfaktoren Trockenheit, Hitze und chemischer Stress, wie Schwermetalle, untersucht, um festzustellen, ob im Vergleich zu nicht gestressten Pflanzen erhöhte PsbO-Mengen messbar sind und diese eine mögliche Fitnesssteigerung herbeiführen. Zu diesen Stressfaktoren wurden baseline Daten im Gewächshaus aufgenommen (s. Bericht biovativ GmbH).

Der Einfluss der heterologen PsbO-Expression auf die Photosyntheseleistung wurde mit Hilfe von PAM-Chlorophyllfluorometrischen Analysen des PSII und P700 – Differenzabsorptionsmessungen, zur Charakterisierung des PSI untersucht. Mit der im Verlauf des Vorhabens entstandenen Verfügbarkeit neuester Analysetechnik (DUAL-PAM) wurden komplexe simultane Analysen der Leistungsparameter von PSII und PSI am identischen Messort den mit Fortschritt des Vorhabens geplanten integrierenden Erfassungen der CO₂-Fixierung durch IR-Absorptionsmessungen vorgezogen. Die Charakterisierung der Photosynthese (Arbeitsgruppe Schubert; AGS) konnte auf diese Weise weit differenzierter als geplant, u.a. mit Erfassungen der Elektronenpoolgröße zwischen den Photosystemen, in aufwändigen Vergleichs- Untersuchungen von Gewächshauskulturen durchgeführt werden. Neben der Erfassung von Standardparametern zur Leistungsbeschreibung wurden Lichtstressinduktion durch Starklichtexposition und Recovery des PSII obligatorischer Bestandteil nahezu aller vergleichenden Untersuchungen transgener Linien und Kontrollpflanzen gemessen. Mit Fortschreiten des Vorhabens offensichtliche, relativ hohe Varianz der Photosynthesecharakteristik bzw. außergewöhnliche Eigenschaften von Einzelpflanzen auch innerhalb genetisch identischer transgener Linien konnte durch methodische Anpassungen begegnet, jedoch nach Stand üblicher Methodik bei Arbeiten mit Gewächshauskulturen nicht maßgeblich unterbunden werden, (biovativ, AGS). Die vergleichende Analyse aller 3 transgenen Linien sowie der Pflanzen mit eingebrachtem Leervektor und der nah-isogenen Kontrollpflanzen wurde so durch eine sequenzielle Reihe gleicher Experimente mit akzeptierter Varianz aller Anzucht- und Akklimatisierungsschritte vor dem Hintergrund saisonaler Dynamik bei Gewächshauskultivierungen abgeschlossen. Dies diente der Erfassung von möglichen Effekten der PsbO-Expression auf die Pflanzen, welche der Verallgemeinerung im Rahmen parallel erfasster Variabilität von Temperatur, Strahlung und Bodenfeuchte standzuhalten vermögen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im zweiten Teil dieses Berichtes dargestellt.

Daten ausgewählter Photosyntheseparameter, Biomasse und Proteinmengen und PsbO-proteinmengen der beprobten Pflanzen wurden durch die BioMath GmbH in einer Datenbank gespeichert und ausgewertet, siehe Anhang Abschlussbericht BioMath GmbH.

Da sich im Laufe des Vorhabens neue Erkenntnisse von externer Seite ergeben haben, die darauf hinweisen, dass Kartoffelpflanzen mit reduzierter PsbO-Menge eine höhere Stresstoleranz haben sollen, wird zur Zeit ein *antisense-psbO*-Gen aus Tabak kloniert, um diese These zu überprüfen. Des Weiteren werden zurzeit PsbO-Mangelmutanten von *thaliana* angezogen, deren PsbO-Defizit durch die Expression des angepassten *psbO*-Gens aus *T. elongatus* BP-1 in komplementiert werden kann. Erste Pflanzen wurden bereits transformiert. Weitere Ergebnisse dazu sind im Anhang unter "Arbeiten nach Abschluss des Projektes" dargestellt.

WP II: Optimierung der C-Fixierung in Tabakpflanzen

Um den Einfluss einer verstärkten Kohlenstofffixierung zu analysieren, wurde das cyanobakterielle *fbp1*-Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, dessen Genprodukt sowohl Fructose-1,6-bisphosphatase als auch Sedoheptulose-1,6-bisphosphatase-Aktivität hat, in Tabakpflanzen kloniert und dort exprimiert. Die Bisphosphatase sollte vor allem die Kapazität des Calvin-Zyklus erhöhen.

Die Klonierung des *fbp1* in geeignete Pflanzentransformationsvektoren, sowie die Transformation in Tabakpflanzen erfolgte in der AG Broer. Nach Identifikation von Transformations-events per PCR und dem Nachweis des Transkriptes konnte durch die AG Broer ein Test zur Messung der FBPase-Aktivität des Enzyms etabliert und Events identifiziert werden, die eine signifikant höhere Aktivität aufwiesen als die nah-isogenen Kontrollpflanzen. Die Nachkommen dieser Events wurden in Bezug auf ihre Biomassebildung untersucht. Die transgenen Events wiesen eine erhöhte Biomasse auf, es zeigte sich jedoch keine eindeutige Korrelation der Biomasse zu den Aktivitätswerten. Daten zur FBPase-Aktivität und Biomasseparameter wurden durch die BioMath in einer Datenbank gespeichert und ausgewertet, siehe Anhang Abschlussbericht BioMath GmbH.

WP III: Steigerung der Photosynthese und Kohlenstofffixierung in Pflanzen

Im Fall einer erhöhten Stresstoleranz der PSII-Aktivität durch die Überexpression von PsbO war eine Kombination mit den transgenen Pflanzen aus dem WP II vorgesehen. Damit sollte ein effektiver zielgerichteter Stofffluss von der Photosynthese über die C-Fixierung in der Pflanze gewährleistet werden.

Dafür sollten ausgewählte Linien mit FBP/SBPase und PsbO gekreuzt werden. Es sollte untersucht werden, ob die Kombination der beiden Transgene den angestrebten synergistischen Effekt (gesteigerte Biomasseproduktion) erzeugen kann bzw. wie sich deren Interaktion allgemein auf den Organismus auswirkt. Da sich aus WPI keine geeigneten eindeutig stress-resistenten, das PsbO-Protein überexprimierenden Pflanzen ergeben haben, machte die Kreuzung der Pflanzen sowie deren molekularbiologische Untersuchungen bisher keinen Sinn. Die Erfassung der Auswirkungen von Stressfaktoren und der allgemeinen Photosyntheseleistung, wie in WP I beschrieben, die durch die AG Schubert hätten erfolgen sollen, konnten aus dem gleichen Grund nicht durchgeführt werden.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an denen das Vorhaben angeknüpft wurde

Im Hinblick auf den möglichen Einfluss von Klimaänderungen (Trockenheit, steigende Temperaturen) und die damit einhergehenden wachsenden abiotischen Stressfaktoren, ist eine Erhöhung der Stresstoleranz von Kulturpflanzen ein wesentlicher Faktor zur Reduktion stressbedingter Ertragsverluste. In den USA haben Untersuchungen ergeben, dass Trockenheit und Hitzestress im langjährigen Mittel circa zwei Drittel der Ertragsreduktion von insgesamt durchschnittlich 50% verursachen [16].

Einen Hauptteil der Biomassesteigerung hängt vom Vorhandensein der Energieträger ATP und NADPH in den Zellen ab. Diese sind notwendige Co-Substrate für die Fixierung von CO₂ im Calvin Zyklus und werden im Verlauf der Lichtreaktionen der Photosynthese gebildet. Die Produktion dieser beiden Stoffe wird maßgeblich durch die Funktionstüchtigkeit des Photosyntheseapparates gewährleistet. Hierzu zählen die beiden Photosysteme, der Cytochrom b₆f Kom-

plex, das Ferredoxin, die NADP-Reduktase und die ATP-Synthase.

Die Photosynthese ist eine der ersten Vorgänge in der Pflanze, die durch abiotischen Stress negativ beeinflusst wird. Besonders bei Kombination von Stressfaktoren wie Hitze und Trockenheit reagiert der Photosyntheseapparat schon bei geringen Lichtintensitäten mit Photoinhibition [1], welche wesentlich zu den Ertragsverlusten beiträgt.

Das extrinsische Protein PsbO ist als ubiquitärer Bestandteil des Photosystems II (PSII) aller Organismen mit oxygener Photosynthese wesentlich an der Stresstoleranz der Photosynthese beteiligt. Das Protein stabilisiert besonders den sauerstoffentwickelnden Komplex (Mangancluster, OEC - oxygen evolving complex), aber auch den gesamten PSII-Komplex, unter anderem unter Starklichtbedingungen und dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies [1, 2, 3, 4].

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Mutanten von *Synechococcus* sp. PCC 7942, die eine erhöhte Expression von PsbO aufwiesen, eine deutlich höhere Fitness und höhere Biomasseproduktion zeigten [6]. Die positive Korrelation zwischen PsbO-Expression und Anzahl aktiver PSII in *Arabidopsis*-Mutanten [2] unterstützt die Arbeitshypothese, dass eine Erhöhung von PsbO zu einer optimierten PSII Effizienz/ Arbeitsleistung/ Performanz führen kann. Die erhöhte Expression von PsbO scheint somit geeignet, um Fitness (Schutz vor Photoinhibition) und Biomasseproduktion speziell unter Stress zu steigern.

Neben der Stabilisierung der Biomasseproduktion unter abiotischem Stress ist es in Anbetracht des steigenden Bedarfs an nachwachsenden Rohstoffen und der daraus resultierenden Verteuerung und teilweise sogar Verknappung von Lebensmitteln von Bedeutung, die Erträge im Vergleich zum heutigen Niveau deutlich zu steigern. Dies kann über eine Erhöhung der Kohlenhydratproduktion (Steigerung der Effektivität des Calvin-Zyklus) in der Pflanze geschehen, was zu einer verstärkten Biomasseproduktion führen sollte.

Die in den Lichtreaktionen der Photosynthese produzierten Energieträger werden zur Fixierung von Kohlenstoff (C) im Calvinzyklus benötigt. Als limitierender Schritt wird hier die Reaktion angenommen, welche von den Enzymen Fructose-1,6/ und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBPase) katalysiert wird [6, 7, 8]. Sowohl die Fructose-1,6-bisphosphatase als auch die Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase sind Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus. Sie sind zum einen für die Regeneration des Substrats Ribulose-1,5-bisphosphat verantwortlich, zum anderen stellt vor allem das Produkt der Reaktion der FBPase, Fructose-6-Phosphat, einen wichtigen Verzweigungspunkt zwischen Calvin-Zyklus und Stärkesynthese dar.

Durch Überexpression von FBP- und SBPase in Tabak konnte eine effizientere Kohlenstofffixierung erreicht werden. Insbesondere wurden Photosyntheseleistung und Wachstumsraten gesteigert [6, 7, 8].

Im Kontext der Vorhabensspezifik relevante Konstrukte, Verfahren oder geschützte Ideen Dritter wurden nicht genutzt bzw. nicht in Anspruch genommen.

I.5 Literatur

Verwendete Literatur für die Erstellung des Berichtes:

- 1 Aro E.-M., Virgin I., Andersson B. (1993) Photoinhibition of PSII. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134
- 2 Yi X., McChargue M., Laborde S., Frankel L. K., Bricker T. M. (2005) The Manganese-stabilizing Protein Is Required for Photosystem II Assembly/Stability and Photoautotrophy in Higher Plants. *Journal of Biological Chemistry* 280: 16170-16174
- 3 Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. & Murata, N. (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1757, 742-749
- 4 Henmi T., Yamasaki H., Sakuma S., Tomokawa Y., Tamura N., Shen J.-R. & Yamamoto Y. (2003) Dynamic interaction between the D1 Protein, CP43 and OEC33 at the Lumenal Side of Photosystem II in Spinach Chloroplasts: Evidence from Light-Induced Cross-Linking of the Proteins in the Donor-Side Photoinhibition. *Plant Cell Physiol.* 44: 451-456
- 5 Bagchi, S. N., Pistorius, E. K. & Michel, K. P. (2003) A *Synechococcus* sp. PCC 7942 mutant with a higher tolerance towards bentazone. *Photosynth. Res.* 75: 171-182
- 6 Miyagawa, Y., Tamoi, M. & Shigeoka, S. (2001) Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6- /sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nature Biotechnology* 19, 965-969
- 7 Lefebvre, S., Lawson, T., Zakhleniuk, O. V., Lloyd, J. C. & Raines, C. A. (2005) Increased sedoheptulose-1,7- bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiology* 138: 451-460
- 8 Tamoi, M., Nagaoka, M., Miyagawa, Y. & Shigeoka, S. (2006) Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants. *Plant and Cell Physiology* 47: 380-390
- 9 Wan, J. X., Blakeley, S. D., Dennis, D. T., Ko, K. (1996) Transit peptides play a major role in the preferential import of proteins into leucoplasts and chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* Vol 271, Iss. 49: 31227- 31233
- 10 Mould, R. M., Robinson, C. (1991) A Proton Gradient Is Required for the Transport of 2 Lumenal Oxygen- Evolving Proteins across the Thylakoid Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 266: 12189-12193
- 11 Lundin, B., Hansson, M., Schoefs, B., Vener, A. V., Spetea, C (2007) The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *Plant Journal* 49: 528-539
- 12 Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Strasser, R. J., Woong, Y. J., Park, S. W. (2012) Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein, *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 182-194
- 13 Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Strasser, R. J., Yu, J. W., Park, S. W. (2013) Evaluation of abiotic stress tolerance in transgenic potato plants with reduced expression of PSII manganese stabilizing protein, *Plant Science* 198: 7-16
- 14 Pueyo, J. J., Alfonso, M., Andres, C., Picorel, R. (2002) Increased tolerance to thermal inactivation of oxygen evolution in spinach Photosystem II membranes by substitution of the extrinsic 33-kDa protein by its homologue from a thermophilic cyanobacterium, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1554: 29-35
- 15 Klughammer, C. und Schreiber, U. (2008), „Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method“, *PAM Application Notes* 1: 27–35.
- 16 Serr, A., Pühler, A., Broer, I. unter Mitarbeit von Menrad, K., Schiemann, J., Schubert, H., Spelsberg, G., Sukopp, H., Wenzel, G. und Zwerger, P. (2007) Der Beitrag von Pflanzen mit neuartigen Eigenschaften zur Inwertsetzung ländlicher Räume. Materialien Nr. 19. Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften (Hrsg.), Interdisziplinäre Arbeitsgruppe *Zukunftsorientierte Nutzung ländlicher Räume*.

Im Rahmen des Vorhabens vorrangig genutzte bibliografische und sonstige Informationsdienste: Scopus (Elsevier), Web of Knowledge (Thomson Reuters)

I.6 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Im Zusammenhang des Projektes wurden zwei Unteraufträge erteilt:

BioMath GmbH
Schnickmannstraße 4
18055 Rostock

biovativ GmbH
Thünenplatz 1
18190 Groß Lüsewitz

II. Eingehende Darstellung

II.1 WP I: Optimierung der Photosynthese durch Verbesserung der Stress-toleranz

Ziel des Projektes war die Analyse des Einflusses einer Überexpression von PsbO auf die Stresstoleranz transgener Tabakpflanzen. PsbO wurde stabil und transient in Tabak exprimiert. Generell zeigte die Überexpression von PsbO keinen Effekt der sich signifikant von den Nahisogenen Kontrollen (NIK) unterschied. Geringere Effekte konnten wegen der starken Schwankungen der Umwelt und der Reaktion der individuellen Pflanzen nicht festgestellt werden. Dies ließ sich auch nicht durch die Optimierung der internen (Pflanze) und externen (Umwelt) Faktoren verbessern.

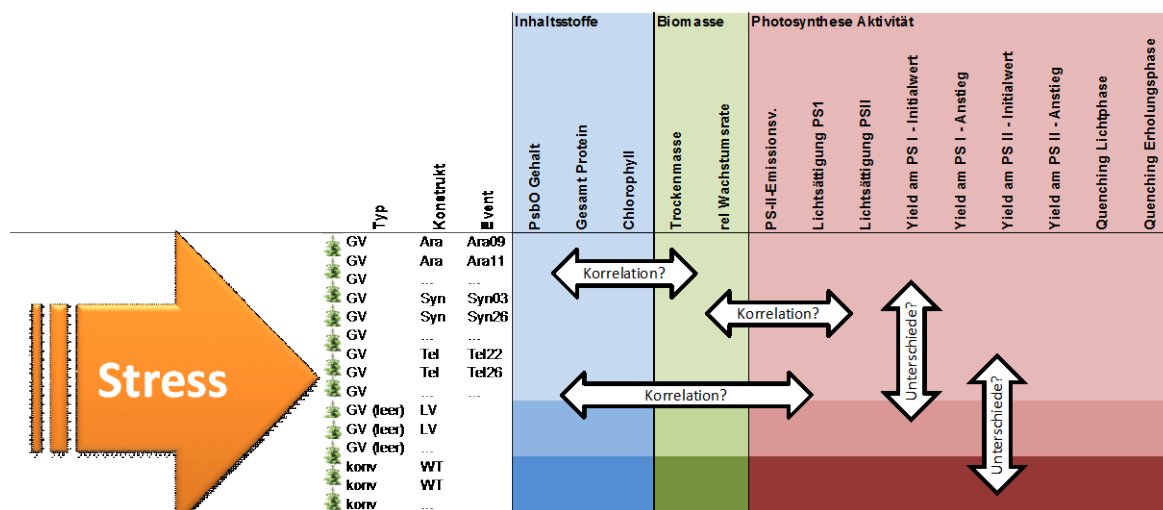


Abbildung 1 Darstellung der Stressoren, Events und Messparameter in WP 1 (GV: gentechnisch verändert, LV: Leervektor, WT: Wildtyp = NIK)

II.1.1 Bereitstellung von transgenen Pflanzen

Nach Transformation von *N. tabacum* Petit Havana SRI mit drei Konstrukten Ara-PsbO (*A.thaliana*), Syn-PsbO (*Synechocystis* PCC 6803) und Tel-PsbO (*T. elongatus*) konnten zahlreiche Pflanzen identifiziert werden, die eines der drei chimären Gene trugen. Ein Transkriptnachweis gelang für alle drei Gene. Ein spezifischer Nachweis des transgen-kodierten PsbO war aber nicht möglich, weil es nicht von dem pflanzeigenen Protein unterschieden werden kann. Daher wurde immer die Gesamt PsbO-Menge bestimmt. In den transgenen Pflanzen ließ sich nicht mehr PsbO nachweisen als in den NIK. Dies könnte dadurch verursacht sein, dass PsbO nur im Komplex mit anderen Proteinen des PSII stabil ist und der Abbau schneller oder gleich schnell erfolgt wie die Translation. Mit Hilfe der transienten Transformation können in kurzer Zeit so hohe Mengen des transgen-kodierten Proteins erzeugt werden, dass der Abbau nicht schnell genug erfolgt, was zu einer Akkumulation führen sollte. Aber auch hier konnte keine signifikante Steigerung der PsbO Menge erzielt werden. Durch die Anpassung der bakteriellen Sequenz an den pflanzlichen Kodongebrauch könnte die Expression des Transgens verbessert und durch das Anhängen von sechs Histidinen am N-Terminus (His-TAG) könnte dieses vom endogenen PsbO unterscheidbar gemacht werden. Daher wurde ein synthetisches Gen konstruiert und in Tabak eingebracht. Die Untersuchungen zu diesen Pflanzen erfolgten aus Zeitgründen nach Projektende (siehe II.1.5)

Die Leistung des Photosystems II wird hauptsächlich durch den wasserspaltenden Komplex (OEC) und dessen Sensitivität in Reparatur und Turnover des D1-Proteins limitiert [1]. Die Stabilität dieses Komplexes wird in erster Linie der extrinsischen Untereinheit PsbO zugesprochen [2]. In Cyanobakterien konnte eine Stabilisierung des Komplexes mit Zunahme der Untereinheit PsbO beobachtet werden [5]. Es wurde angenommen, dass dies auch bei Pflanzen erfolgt. Um diese These zu überprüfen sollte in diesem Projekt PsbO konstitutiv in Tabakpflanzen überexprimiert werden.

Dazu wurden drei verschiedene Kodierbereiche für das extrinsische Protein PsbO aus den Organismen *Arabidopsis thaliana* (Ara), *Synechocystis* PCC 6803 (Syn) und *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Tel), jeweils mit dem Transitpeptid des PsbO-Gens aus *Arabidopsis thaliana* fusioniert und unter die Kontrolle des konstitutiven 35S Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus gebracht. Die resultierenden drei Pflanzentransformationsvektoren wurden in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 überführt.

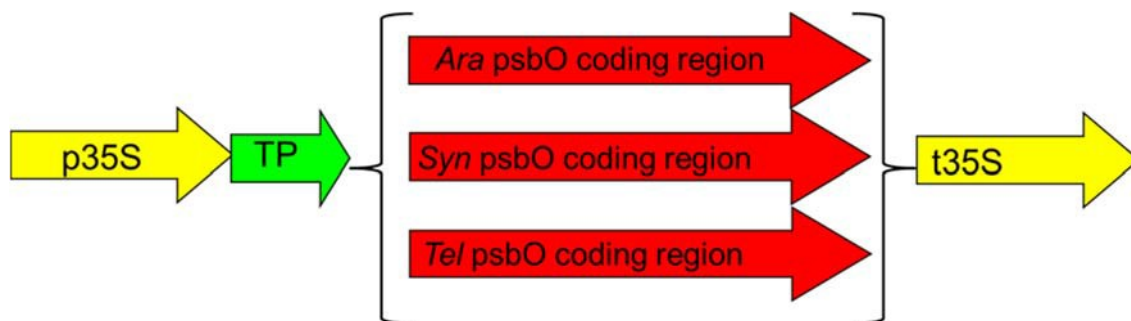


Abbildung 2 In *Nicotiana tabacum* Petit Havanna SRI eingebrachte chimäre *psbO*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* (Ara), *Synechocystis* PCC6803 (Syn), und *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Tel), p35S: konstitutiver p35S Promotor aus dem *Cauliflower mosaic virus*, t35S: konstitutiver t35S Terminator aus dem *Cauliflower mosaic virus*, TP: Transitpeptidsequenz aus dem *psbO*- Gen aus *Arabidopsis thaliana*

Nach Transformation von *Nicotiana tabacum* Petit Havanna SRI mit den drei Konstrukten konnten Pflanzen über PCR identifiziert werden, die eines der drei chimären Gene trugen.

18 von 25 der getesteten Pflanzen enthielten den *PsbO*-Kodierbereich aus *Arabidopsis thaliana*. 23 von 29 getesteten Pflanzen enthielten den *PsbO*-Kodierbereich aus *Synechocystis* PCC 6803 und 28 von 33 getesteten Pflanzen enthielten den *PsbO*-Kodierbereich aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

Das Transkript der transgenen Tabakpflanzen konnte über RT-PCR nachgewiesen werden.

Hierbei enthielten 7 von 8 getesteten Pflanzen mit dem *PsbO*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* das Transkript. Bei den transgenen Pflanzen, die das *PsbO*-Gen aus *Synechocystis* PCC 6803 enthielten, konnten 14 von 17 Pflanzen positiv getestet werden und bei den Pflanzen mit dem *PsbO*-Kodierbereich aus *Thermosynechococcus elongatus* waren 11 von 17 Pflanzen positiv für die spezifische RNA. Hiervon wurden einige Pflanzen für die weiteren Experimente ausgewählt (siehe Tabelle 1).

Der Nachweis des rekombinanten PsbO-Proteins gestaltete sich schwierig, da das transgenkodierte PsbO-Protein nicht vom endogenen PsbO-Protein unterschieden werden kann. Für den immunologischen Nachweis steht ein polyklonaler Antikörper zur Verfügung, der sowohl am endogenen, in Tabak vorhandenen PsbO-Protein als auch an den rekombinanten PsbO-Prote-

inen bindet. Daher ist mit diesem Antikörper eine Unterscheidung dieser beiden Proteine in photosynthetisch aktiven Geweben der Pflanze nicht möglich. In photosynthetisch nicht aktiven Geweben, wie etiolierten Keimlingen oder Wurzeln, in denen das endogene PsbO nicht gebildet wird, das transgenkodierte aber vorhanden sein sollte, konnte kein PsbO-Protein nachgewiesen werden.

Tabelle 1 Übersicht über die Transformationsevents und die damit durchgeführten Experimente. Ara-PsbO: Pflanze enthält chimäres psbO-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Syn-PsbO: Pflanze enthält chimäres psbO-Gen aus *Synechocystis* PCC 6803, Tel-PsbO: Pflanze enthält chimäres psbO-Gen aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, LV: Leervektor

	Event	DNA Nachweis	RNA Nachweis	Chemischer Stress in vitro	Hitzeschock in vitro	Lichtstress
Ara-PsbO	23	+	+	-	-	+
Ara-PsbO	11	+	+	-	-	+
Ara-PsbO	28	+	+	-	-	+
Ara-PsbO	38	+	+	-	-	+
Ara PsbO	9	+	+	-	-	+
Ara PsbO	46	+	+	+	-	-
Ara-PsbO	57	+	+	+	-	-
Syn PsbO	50	+	+	+	-	-
Syn PsbO	60	+	+	+	-	-
Syn PsbO	46	+	+	-	-	+
Syn PsbO	49	+	+	-	-	+
Syn PsbO	26	+	+	-	-	+
Syn PsbO	3	+	+	-	-	+
Syn PsbO	47	+	+	-	-	+
Tel PsbO	58	+	+	-	-	+
Tel PsbO	44	+	+	-	+	+
Tel PsbO	57	+	+	-	-	+
Tel PsbO	60	+	+	-	+	+
Tel PsbO	61	+	+	-	-	+
Tel PsbO	65	+	+	+	+	-
Tel PsbO	82	+	+	+	+	-
Tel PsbO	74	+	+	-	+	-
Tel PsbO	68	+	+	-	+	-
Tel PsbO	26	+	+	-	-	+
NIK		-	-	+	+	+
LV	AK-3	+	-	-	-	+

Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das PsbO Vorläuferprotein nur von Chloroplasten, die ja in etiolierten Geweben nicht vorhanden sind, aufgenommen werden kann [9, 10]. Wir vermuten in Kombination mit den anderen Experimenten, dass im grünen Gewebe PsbO nur im Komplex mit den anderen Proteinen des Photosystems II stabil ist. Wenn der fehlende Nachweis des Proteins durch seine Instabilität bedingt ist, sollte eine sehr hohe Expression auch bei hohen Abbauraten wenigstens kleine Proteinmengen nachweisbar machen können. Mit Hilfe der transienten Expression kann man in kurzer Zeit sehr hohe Mengen des transgen kodierten Proteins erzeugen und ggf. eine Akkumulation einige Tage nach der Transformation beobachten. Deshalb wurden die drei binären Pflanzentransformationsvektoren sowie der Leervektor in den Agrobakterienstamm *A. tumefaciens* C58C1 eingebracht, der außerdem den Vektor pCB-P1HcPro enthält. Mit den resultierenden drei Agrobakterienstämmen wurden dann vollständige Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* infiltriert. Im Vergleich zu den Pflanzen, die nur den Leervektor pLH9000 enthielten, konnte mit Hilfe des Western Blots bei den Pflanzen, die das psbO-Gen enthielten eine tendenzielle aber keine signifikante Steigerung der Expression erzielt werden. Die niedrigsten Mittelwerte wurden bei den Pflanzen detektiert, die das psbO-Gen aus *T. elongatus* BP-1 exprimieren sollten. Möglicherweise ist auch bei hoher Überexpression des PsbO-Proteins, dieses ohne Assembling mit dem Photosystem II so instabil, dass es nicht akkumuliert, sondern sehr schnell wieder abgebaut wird und daher nicht

nachweisbar ist.

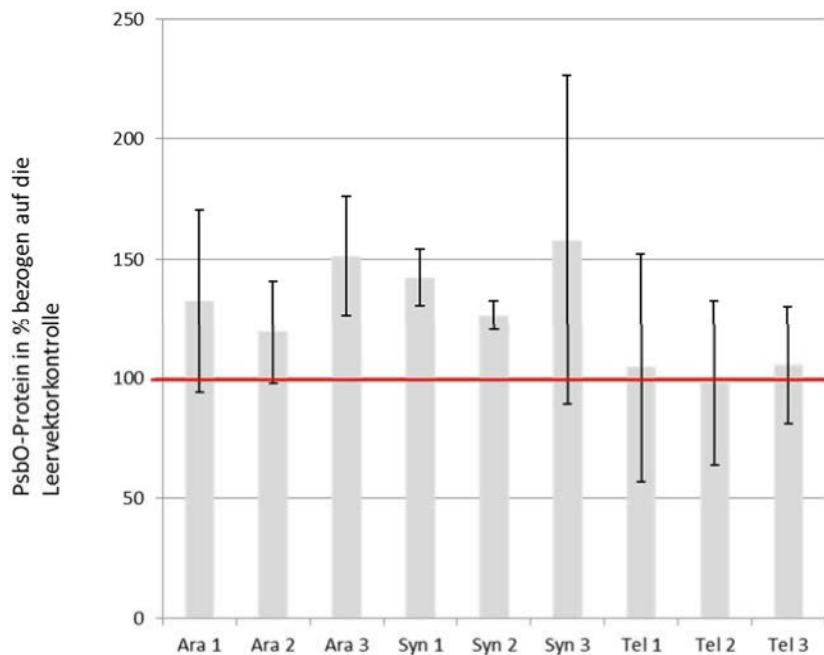


Abbildung 3 PsbO Mengen nach transienter Transformation in *Nicotiana benthamiana*. Je 1./2./ und 3. Blattprobe je 3, 4 und 5 Tage nach transienter Transformation von *Nicotiana benthamiana*, Proteinmengen in Prozent bezogen auf die Leervektorkontrolle, n=2, Ara: Pflanze enthält chimäres aus *Arabidopsis thaliana*, Syn: Pflanze enthält chimäres psbO-Gen aus *Synechocystis* PCC 6803, Tel: Pflanze enthält chimäres psbO-Gen aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Die rote Linie zeigt den Mittelwert der Kontrollen.

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die *psbO*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* und den beiden Cyanobakterien trotz positivem Transkriptonachweis - wenn überhaupt - nur zu sehr geringen PsbO-Protein-Anreicherungen in den Pflanzen führen. Die laut Antrag nicht geplante Strategie, ein synthetisches Gen auf Basis der Sequenz von *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 herzustellen, schien aus folgenden Gründen erfolgversprechend:

1. Sie erlaubt eine Fusion mit einem His-Tag, der über einen His-Tag-Antikörper die selektive Isolation von transgen kodiertem PsbO-Protein ermöglicht.
2. Proteine aus thermophilen Bakterien haben sich bisher als wesentlich stresstoleranter als pflanzliche Homologe erwiesen. Die DNA-Sequenz weicht aber so stark von der pflanzlichen Sequenz ab, dass dies der Grund dafür sein könnte, dass nur sehr wenig Protein translatiert werden kann und daher kein Protein detektiert werden konnte.
3. Die Anpassung des Codongebrauchs und des GC-Gehalts des Kodierbereichs in dem synthetischen Gen sollte sowohl die Translation als auch die Stabilität des Transkripts in der Pflanzenzelle erhöhen.

Ein binärer Pflanzentransformationsvektor, der einen an den Kodongebrauch von Pflanzen angepassten Kodierbereich für das PsbO-Protein aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 unter der Kontrolle des konstitutiven p35S-Promotors enthält, konnte erfolgreich hergestellt werden. Beim Entwurf des Genes wurde der Kodierbereich an den GC-Gehalt und an den Kodongebrauch von Pflanzen angepasst und der 6xHis tag an das N-terminale Ende des Kodierbereiches zwischen die Transitpeptidsequenz und den Kodierbereich angehängt, da sich das C-terminale Ende im Inneren des PsbO-Proteins befindet.

Die Analyse der Transgen Pflanzen musste nach Projektende erfolgen da es etwa 1 Jahr dauert transgene Tabakpflanzen zu erzeugen (siehe II.1.5).

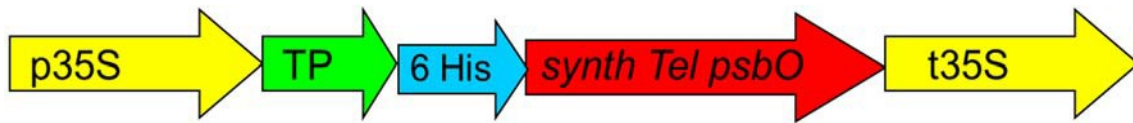


Abbildung 4 An die Codon-Usage von Tabakpflanzen angepasstes synthetisches *psbO*-Gen aus *T. elongatus* BP-1, p35S: konstitutiver p35S Promotor aus dem *Cauliflower mosaic virus*, t35S: konstitutiver t35S Terminator aus dem *Cauliflower mosaic virus*, TP: Transitpeptidsequenz aus dem *psbO*-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, 6xHis: 6x Histidin tag

II.1.2 Messung der Stresstoleranz und PsbO Menge unter Lichtstress

Auch wenn sich unter Standardbedingungen keine Erhöhung von PsbO-Mengen zeigen ließ, könnte sich das unter Stressbedingungen ändern, da das transgenkodierte Gen nicht Stress-reguliert ist und im Gegensatz zum endogenen Gen auch unter diesen Bedingungen weiter PsbO produzieren sollte. Wenn PsbO der limitierende Faktor ist, müsste dies zu einer erhöhten Stresstoleranz führen. Daher wurden ausgewählte transgene Pflanzen (Tab. 1) zuerst einem Lichtstress ausgesetzt. Ihre Photosyntheseaktivität wurde mit Hilfe eines neu entwickelten Screeningprotokolls bestimmt. Leitparameter waren die minimalen effektiven Quantenausbeuten des PSII in der Stressinduktionsphase, effektive Quantenausbeuten in der Erholungsphase sowie Parameter des nicht photochemischen Quenchings (NPQ). Es gab, bis auf wenige Ausnahmen, keinen signifikanten Unterschied in der Reaktion der transgenen Pflanzen zu NIK. Auch der PsbO-Gehalt in Blattproben unterschied sich weder nach Stressinduktion noch nach der Erholungsphase signifikant von der NIK (Abb. 3).

Bis auf Event ARA9 zeigten aber alle transgenen Events deutlich höhere Schwankungen in den gemessenen Parametern. Die Ursachen hierfür sind noch unklar, die generell starken Schwankungen sind aber auf die natürlicherweise schwankenden Umweltbedingungen und individuellen Unterschiede der einzelnen Pflanze zurückzuführen.

Um einen vergleichenden Stress-Screening von Kontrollpflanzen und Pflanzen transgener Linien zu ermöglichen, wurde mit typisch vorkultivierten Kontrollpflanzen vorerst ein Photosystem II-basiertes Schema zur Charakterisierung der Lichtstressinduktion entwickelt. Dieses enthielt auch die Charakterisierung nach der Stressphase, ermöglichte mit einem moderaten Zeitbedarf von ca. 1 Stunde aber noch zeitlich akzeptable Durchsatzraten von Einzelpflanzen pro Tag im Labor, ohne auf dynamische Informationen über die Reaktion der Einzelpflanze verzichten zu müssen.

Dafür wurden im Vergleich zur natürlichen Maxima leicht überhöhte Photonenflussdichten von ca. 3000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) aus Kaltlichtquellen bis zu einer Dosis appliziert, die bei Kontrollpflanzen den Anteil schneller Erholung (Recovery der PSII-Quantenausbeute bzw. Relaxation des high energy quenching, qE, nicht-photochemischer Anteile der Chlorophyllfluoreszenzlöschung) nach der Stressinduktion auf <100% der maximalen Quantenausbeute des PSII dunkel akklimatisierter Kontrollpflanzen beschränkte, eine irreversible, mittelfristig erkennbare Zerstörung (Bleaching der Expositionsflächen am - der Inkubation folgenden - Tag) jedoch ausschloss.

Minimale effektive Quantenausbeuten des PSII ($\Delta F/F_m'$) in der Stressinduktionsphase, effektive Quantenausbeuten nach der Recovery-Phase sowie Parameter des nicht photochemischen Chlorophyllfluoreszenz-Quenching (NPQ) dienen u.a. als vorläufige Leitparameter zur Erfassung des physiologischen Zustandes der untersuchten Pflanzen. Beim Vergleich von Einzelpflanzen und kleineren Gruppen von Kontrollpflanzen, mit denen der transgenen Pflanzenlinien (Syn, Tel, Ara) konnten keine markanten Unterschiede indiziert werden. Eine überraschende Ausnahme bildete eine einzelne transgene Pflanze (Ara 9) mit sehr deutlich, ca. 53 bzw. 60% reduzierter NPQ-Induktion am Beginn bzw. vor Abschluss der Stressinduktionsphase (bei ansonsten im Vergleich zu Kontrollpflanzen unauffälligen Niveaus der PSII-Quantenausbeuten, sowie von Ausmaß und Dynamik ihrer Recovery in der Relaxationsphase nach der Stressinduktion). Das im Vergleich relativ geringe Niveau maximaler Quantenausbeute des PSII (0,77) wurde jedoch nur für einzelne Pflanzen der nah-isogenen Kontrolle ermittelt, der relative Gewinn effektiver Quantenausbeute am Ende der Stressinkubationsphase (3%) fiel im Vergleich zur Varianz in der Gruppe von Kontrollpflanzen unbedeutend aus. Das Screening der identischen Pflanzen nach 14 Tagen verlängerter Gewächshauskultur nivellierte die Auffälligkeit der Einzelpflanze (Ara 9) hinsichtlich der Deskriptoren für das nicht-photochemische Quenching deutlich, dokumentierte jedoch für diese Pflanze die höchste maximale Quantenausbeute des PSII (0,83) und durchweg eine relativ erhöhte effektive Quantenausbeute des PSII am Ende der Stressinkubationsphase im Vergleich zu allen Kontrollpflanzen ($150 \pm 33 \%$, $n=5$). Allgemein führte die weitere Kultivierung der identischen Pflanzen nur für transgene Linien (Ara, Syn) zu relativ klaren positiven Korrelationen photosynthetischer Parameter beider Messzeitpunkte. Da weder auffällige phänotypische Besonderheiten noch messtechnische Artefakte der sehr robusten Screening-Methodik eine Erklärung für das sehr stark reduzierte Niveau von NPQ_{max} in der Stressinduktionsphase liefern konnten, mussten unbekannte bzw. schwer kontrollierbare Einflussfaktoren angenommen werden, welche zumindest innerhalb transgener Linien photosynthetische Basisgrößen des PSII in Einzelpflanzen ggf. gravierend zu modifizieren vermögen. Der relative Entwicklungsstand von Einzelpflanzen bei moderaten Unterschieden der Entwicklungszeit im Gewächshaus musste, auch ohne Anzeichen von Seneszenz bzw. von deutlichen Unterschieden bei der Entwicklung des Blütenansatzes, als potenziell relevante Varianzquelle für vergleichende Screenings angesehen werden.

Der Vergleich von jeweils 4 Klonen der primären Transformante des Events Ara 9 zeigte, dass die interklonale Variabilität der PsbO-Mengen wesentlich kleiner ist als die der Nachkommen der Ara 9. Dies ist nicht verwunderlich, da die Klone im Gegensatz zu den Geschwisterpflanzen genetisch identisch sind. Auffällig war jedoch auch, dass die Ara 9 Klone signifikant weniger PsbO-Protein aufwiesen, als die nah-isogene Kontrolle und dies bei den Geschwisternachkommen in unabhängigen Gewächshauskultivierungen nicht mehr zutrifft. Die reduzierte PsbO Menge ist damit nicht genetisch fixiert. Die Reduktion in den Klonen der Primärtransformante könnte durch Transformationsstress oder andere individuelle Besonderheiten bedingt sein. Sollte der Transformationsstress die Ursache sein, hätte er einen stärkeren Einfluss auf die Photosynthese als der induzierte Lichtstress beim standardisierten Screening.

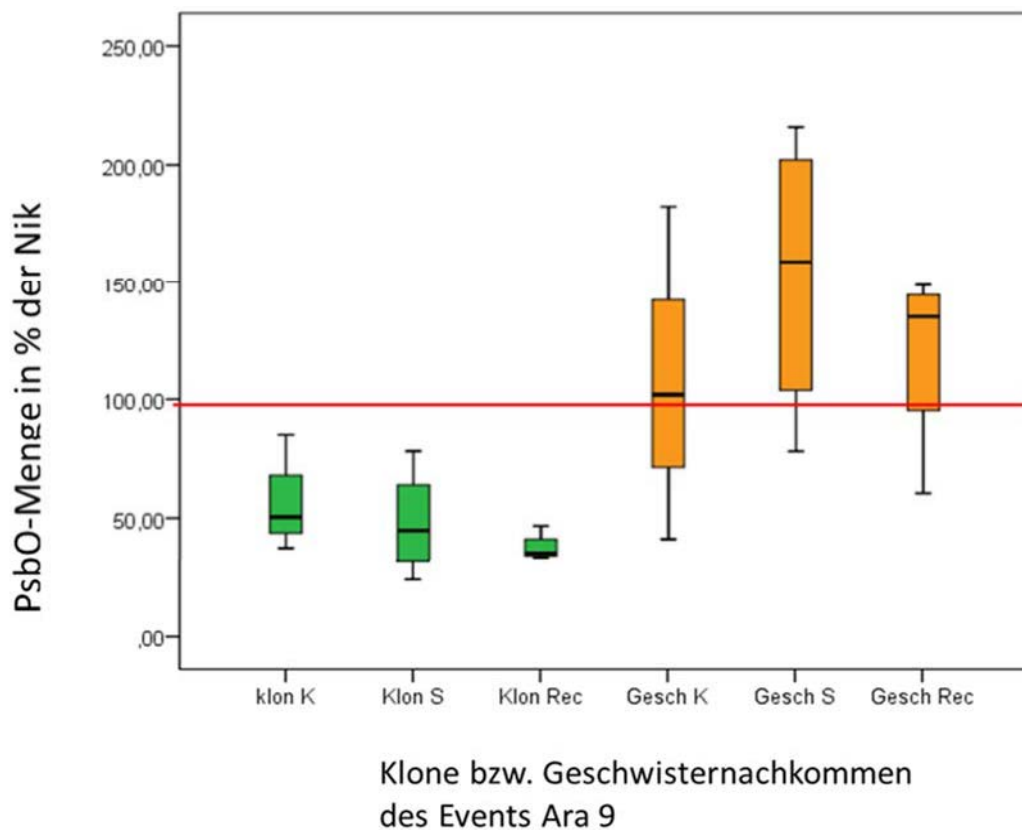


Abbildung 5 PsbO-Mengen in Prozent der nah-isogenen Kontrolle (NiK) von Klonen der primären Transformante Ara 9 (T0) und Geschwistern (Gesch) der Nachkommen (T1) dieses Events , (n=4), K= Kontrolle, S= Lichtstress, Rec=Recovery

Das vergleichende photosynthetische Screening der transgenen Linien (vergl. PsbO-Mengen Abb. 2 und 3) anhand unterschiedlicher Transformationsevents lieferte ein entsprechendes Bild relativ inhomogener Verteilungen bedeutender Effekte im Vergleich zur NiK. Tabelle 2 belegt allerdings, dass solche Effekte durchaus auftreten. Vor allem in der ARA-Linie tritt wiederholt ein Unterschied zur Kontrolle bezüglich der maximalen Quantenausbeute des PSII auf. Dieser Unterschied bleibt in Fällen, wo er beobachtet wurde, auch in der Stress- und der Erholungsphase bestehen. Da er vor allem auf eine Verringerung des NPQ zurückzuführen ist, kann hier von einer potentiell höheren Leistung ausgegangen werden. NPQ beschreibt die nicht-photochemische Energiedissipation - stark vereinfacht - einen Verlustprozess, der dazu führt, dass das einfallende Licht nicht für die Photosynthese genutzt wird, sondern z.B. als Wärmestrahlung abgegeben wird.

Die zwei Ara-Events (Ara 23, Ara 38) zeigten eine schnellere Recovery der Quantenausbeute des PSII in der Dunkelphase nach der Lichtstressinduktion. Das Event Ara 23 zeigte zudem ein erhöhtes NPQ während der Lichtstressphase, wohingegen die Pflanzen des Events Ara 38 hier eine erhöhte, aber bei absoluter Betrachtung geringe Quantenausbeute aufwiesen. Die anderen Events, vor allem der Linien Syn und Tel, verhielten sich im Vergleich zu den NiK unauffällig. Zwei Ausnahmen gab es dabei. Pflanzen des Events Syn 46 zeigten eine verlangsamte Erholung der Quantenausbeute nach der Lichtstressinduktion, während Pflanzen des Events Tel 57 während dieser Induktion erhöhte NPQ-Werte aufwiesen. Mit der verwendeten, relativ breit angelegten Versuchsmatrix waren für die Events Ara 11 und Tel 61 die Ergebnisse aufgrund geringer Individuenzahlen (n=2) nicht statistisch sicherbar.

Tabelle 2 Tabelle 2 Auswirkungen verschiedener psbO-kodierender Events auf absolute und für die individuelle Pflanze normierte Deskriptoren photosynthetischer Leistung und Anpassung von Gewächshauskulturen vor, während und nach der Lichtstressinduktion im Verhältnis zur nah-isogenen Kontrolle. q , Differenzenquotient; q , relativer Steigungskoeffizient; s , Dynamik der schnellen Anpassung; l , Dynamik der langfristigen Anpassung; $t_{0.5}$, Halbwertszeit der schnellen Kinetik; YII_0 : F_v/F_m , YII : $\Delta F/F_m'$. () fehlende Verifizierung von Unterschieden nicht normal verteilter Daten im nicht-parametrischen Testverfahren

Event	Potenzielle Leistung	Stressempfindlichkeit	Erholung
ARA09	YII_0 : 101%	NPQ_s : 70-80%, NPQ_L : 77-82% ρNPQ_s : 70-80%, ρNPQ_s : 80%, $qYII_s$: 144%	NPQ_s : 79%, ρNPQ : 54%
ARA11	YII_0 : 103%		
ARA23		NPQ : 126%	ρYII : 201% ρNPQ : 212%
ARA28		($qYII_s$: 166%)	
ARA38	YII_0 : 101%	YII : 195-229%, ρYII : 6225%	NPQ : 71%, (ρNPQ : 226%) (YII : 167%), (ρYII : 211%)
SYN03			
SYN26		$qYII_s$: 186%	
SYN46		$qYII_s$: 6%	($YII_{t_{0.5}}$: 158%), (ρYII : 53%)
SYN49			
TEL44			
TEL57		NPQ_s : 117%	
TEL58			
TEL60			

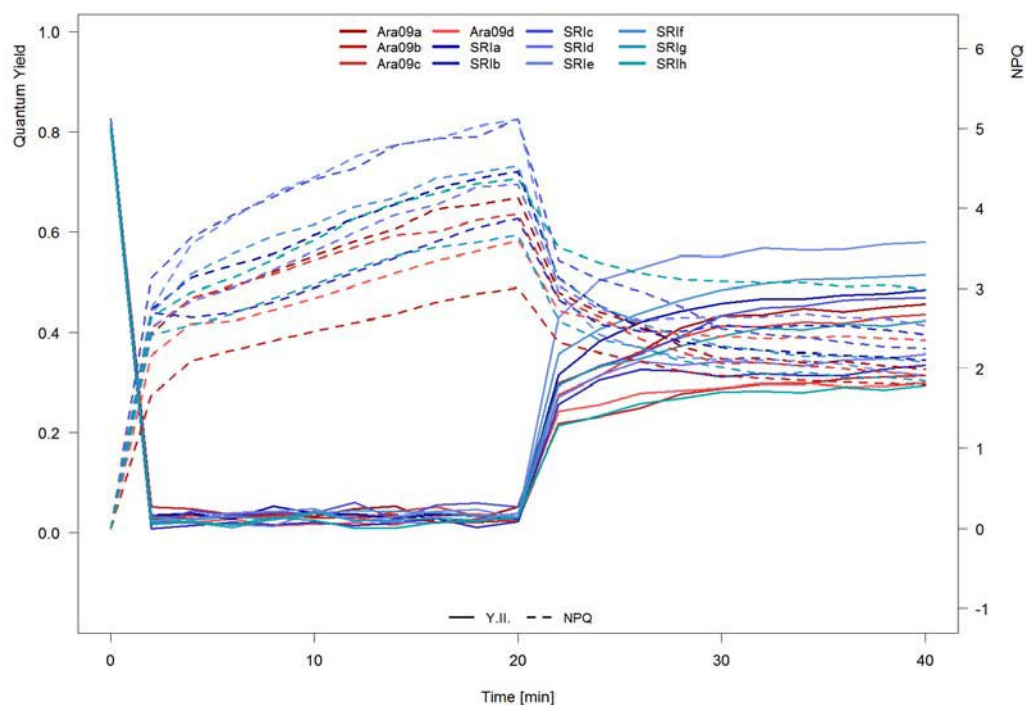


Abb. 5: Variabilität der Dynamiken von Quantenausbeute und NPQ am PSII im zeitlichen Verlauf einer Lichtstressinduktion (2-20 min) mit anschließender Dunkelperiode (22-40 min) am Beispiel von Gewächshauskulturen für Pflanzen des Events Ara 9 und nah-isogenen Kontrollpflanzen (SRI)..

Bedeutende Variabilitätsunterschiede in transgenen Linien für die Deskriptoren relativ zur nah-isogenen Kontrolle sind jedoch nicht durchweg verallgemeinerbar erhöht, sondern v.a. bei Events der transgenen Linien Syn und Tel zum Teil auch deutlich reduziert (Tab. 3).

Bei der unabhängigen Versuchsmatrix mit transgenen Pflanzen für die Klonen des Events Ara 9

(n=4) und Nik (n=9) zeigten sich wie für die o.g. zwei Events (Ara 23, Ara 38) signifikante ($\alpha=0,05$) Effekte auf photosynthetische Parameter während sowie nach der Lichtstress-induktion. Die Pflanzen wiesen - trotz allgemein hoher Varianz für Messungen an Pflanzen aus Gewächshauskulturen (Abb.5) - bei vergleichbarer Quantenausbeute des PSII ein signifikant verringertes NPQ auf, was auf eine Effektivierung der Lichtstressakklimatisation hindeutete und die entsprechende Auffälligkeit von Einzelpflanzen des Events Ara 9 in sehr frühen Screenings von Events doch untermauerte.

Tabelle 3 Tabelle 3: Auswirkungen verschiedener *psbO*-kodierender Events auf die Variabilität absoluter und für die individuelle Pflanze normierter Deskriptoren photosynthetischer Leistung und Anpassung von Gewächshauskulturen vor, während und nach der Lichtstressinduktion im Verhältnis zur nah-isogenen Kontrolle. Symbole und Abkürzungen (vgl. Tab. 2).

Event	Potenzielle Leistung	Stressempfindlichkeit	Erholung
ARA09		pNPQ _s : 1233%, pYII: 98066%	NPQ _s : 622%
ARA11			
ARA23			
ARA28			
ARA38		NPQ _s : 5%	pNPQ: 5%, YII.t _{0,5} : 1047%
SYN03	YII ₀ : 4%	YII _s : 247%, ^Q YII _s : 1290%	
SYN26		^Q YII _s : 186%	
SYN46		YII _s : 2%, pNPQ _s : 692%	
SYN49		NPQ _s : 30%, pNPQ _s : 30%	
		^Q YII _s : 754%	
TEL44		NPQ _s : 3%, pNPQ _s : 3%	
TEL57		^Q YII _s : 864%	
TEL58			
TEL60		NPQ _s : 24%, NPQ _L : 329%	
		pNPQ _s : 24%, pNPQ: 464%	
TEL61			

II.1.3 Ansätze zur Reduktion der Variabilität und Standardisierung des Versuchs-ansatzes zur Analyse weiterer Stressfaktoren

In den vorherigen Versuchen wurden nur Primärtransformanten (Event) eingesetzt. Diese unterscheiden sich voneinander nicht nur durch die Position des Transgens. Es können bei der Transformation und Gewebekultur auch weitere Mutationen auftreten. Nachkommen eines Events (T1) unterscheiden sich genetisch wesentlich weniger voneinander als Events, daher wurden, in der Erwartung, dass die pflanzenbedingte Variabilität der Stressreaktion sinkt, in den weiteren Versuchen nur T1 Pflanzen eingesetzt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die PsbO Expression innerhalb einer Pflanze in Abhängigkeit von der Blattposition und dem Blattalter stark schwankt (Abb.7). Auch auf Parameter wie die maximale Elektronentransportrate, den Lichtsättigungspunkt und den Anstieg der PI-Kurve hatte die Blattposition einen Einfluss. Daher wurden die Blattpositionen für die Messung von Ruhezustand, Stress und Erholungsphase (recovery) so variiert, dass der Faktor Blattposition sich gleichmäßig auswirken sollte. Gleichzeitig wurde in Groß Lüsewitz versucht die Umweltbedingungen weitestgehend zu standardisieren. Die neuen Versuchsbedingungen wurden zuerst erneut mit Lichtstress erprobt. Es konnten auch hier keine eindeutigen Unterschiede der PsbO-Mengen nach Stress und Erholung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen

werden (Abb. 8).

Als weitere Stressoren wurden Verwundungsstress, tageszeitlich bedingte Lichtwechsel, Bewässerung, Hitze und chemischer Stress analysiert. Keiner von ihnen zeigte einen signifikanten Effekt von PsbO. Auch mit einem über Wochen hinweg wiederholten Versuchsaufbau mit T1 Pflanzen der Linien (Ara-PsbO, Syn-PsbO, Tel-PsbO) und Kontrollpflanzen mit je derselben Anzuchtdauer, Akklimatisierungsphase im Gewächshaus, Stressinduktionsanalyse und Biomasseernte konnten mit wenigen Ausnahmen keine statistisch signifikanten Änderungen sichtbar gemacht werden.

Ausnahmen: 1. Die Pflanzen mit dem Ara-PsbO unterschieden sich durch das Verhältnis der Länge zur Breite der Blätter, die maximale Quantenausbeute des PSI und den Lichtsättigungspunkt des Elektronentransports am PSI von den NiK. 2. Für Pflanzen mit dem Tel-PsbO-Gen wurden eine um 22% geringere Trockenmasse je Blattfläche und ein um 33% vermindertes Wurzelvolumen im Vergleich zur NiK gefunden.

Alle Daten wurden in einer Datenbank gespeichert und ausgewertet.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde zur Einschränkung der Variabilität daher mit Nachkommen der T1 der Transformationsevents gearbeitet. Um außerdem zu vermeiden, dass unterschiedliche Entwicklungsstadien der Transformanten zu einer starken Variabilität der Daten führen, wurden Samen der Transformanten Ara 9, Ara 28 und Tel 26 sowie nah-isogene Kontrollpflanzen zeitversetzt ausgesät und je 7 Nachkommen zeitversetzt im photosynthetischen Screening unter Lichtstressinduktion als auch in Bezug auf den PsbO-Gehalt vermessen. Hierbei wurde vergleichend untersucht, ob die Blattposition an der Pflanze oder der induzierte Lichtstress eine höhere Wirkung auf die PsbO-Expression hat. Abb. 7 zeigt den PsbO Gehalt der Nachkommen der Events Ara 9, Ara 28 und Tel 26 in Prozent des PsbO Gehalts der gleichen Gewebe unter gleichen Bedingungen und mit den gleichen Wiederholungen der nah-isogenen Kontrolle des 1. (oberen), 2. (mittleren) und 3. (unteren) Blattes.

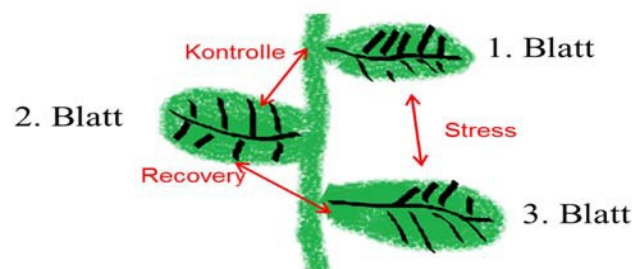


Abbildung 6

Probenschema

Es konnte die Tendenz festgestellt werden, dass das jeweils oberste Blatt im Vergleich zum mittleren Blatt leicht erhöhte PsbO-Mengen aufwies, wobei die starken Schwankungen zu beachten sind. Der Median für Werte des obersten Blattes ist jedoch immer höher als der Median für Werte des mittleren Blattes. Interessant ist, dass der Medianwert des obersten Blattes immer über 100% der NiK liegt, dies aber im mittleren und unteren Blatt nicht mehr eindeutig zutrifft. Die Wahl des Blattes an der Pflanze hat also einen Einfluss auf die PsbO-Menge unabhängig von den gewählten Bedingungen.

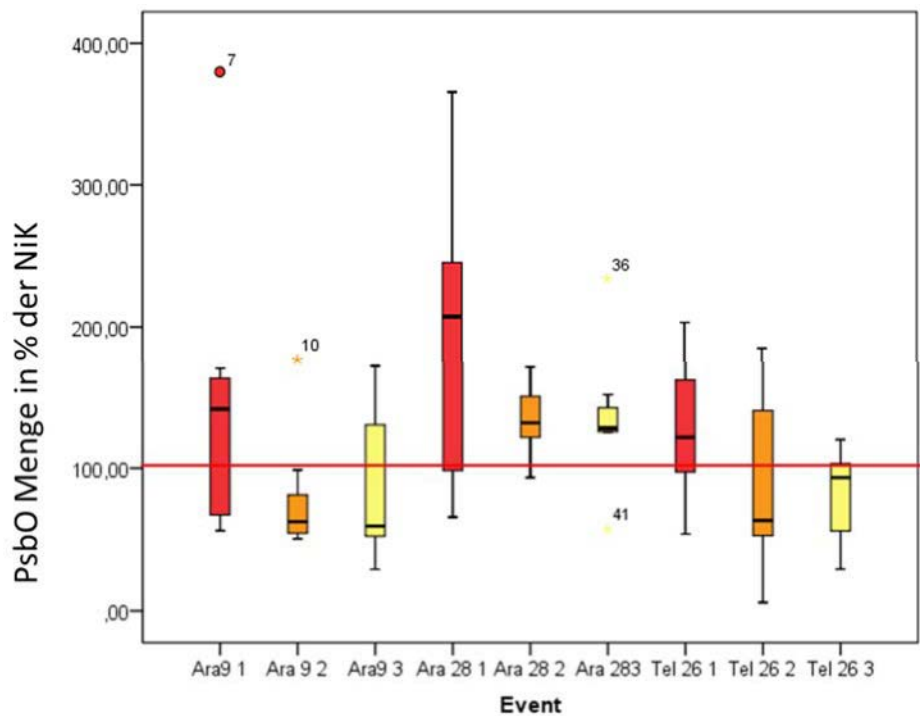


Abbildung 7 PsbO-Mengen von Nachkommen (T1) der Transformationsevents Ara 28 und 9 und Tel 26, (je n=7) bezogen auf die jeweils unter den gleichen Bedingungen gemessene nah-isogene Kontrolle (NiK n=7) in Prozent, 1 (rot)= oberstes Blatt, 2 (orange) mittleres Blatt, 3 (gelb)= unteres Blatt einer Pflanze

Wegen der deutlichen Hinweise auf eine hohe Varianz der nachweisbaren PsbO-Menge in Blattscheiben der untersuchten, genetisch vergleichbaren Pflanzen wurde die Entscheidung getroffen, die unumgänglichen Varianzquellen bei der Handhabung von Pflanzen vor bzw. bis zu der Analyse photosynthetischer Leistungsparameter und die übliche Standardisierung von Untersuchungen am 3. bzw. 2. vollständig entwickelten Blatt der Einzelpflanze auch beim photosynthetischen Screening experimentell genauer zu hinterfragen. Da die Gewinnung von Blattscheibenmaterial für Expressionsvergleiche in Stress- und Recovery-Phase ggf. unter Einschluss einer für die individuelle Pflanze spezifischen Kontrolle am identischen Blatt und/oder mit Zugriff auf Alternativen (z. B. das 2. vollständig entwickelte Blatt der Individualpflanze) grundsätzlich mit zeitlichem Versatz erfolgen mussten, standen zudem das Ausmaß von Einflüssen durch Verwundungsstress auf die analytischen Parameter und den Vertrauensbereich von Messwertunterschieden in den photosynthetischen Leistungs- und Akklimatisationsparameter infrage. Versuche zur Effektabschätzung erfolgten u.a. mit Pflanzen der nah-isogenen Kontrolle im 3-dimensionalen Variationsschema (Verletzung-Kontrolle, Blattposition 1 bzw. 3, Tagesabschnitt – Vormittag, Nachmittag - der Analyse nach standardisierter Entfernung aller zu analysierenden Pflanzen aus dem diurnalen Licht-Rhythmus am Morgen des Analysetages) mit Starklichtexposition bzw. moderater Lichtstressinduktion (PFD ca. 2000 $\mu\text{mol Photonen PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10 min) und zusätzlich schnellen Erfassungen von P-I-Kurven vor und nach der Stressinduktionsphase. Es konnte eine signifikante Einflussnahme der Blattposition als auch des Tagesabschnittes der Messung auf verschiedene Parameter der Photosynthese (maximale Elektronentransportrate, Lichtsättigungspunkt, Anstieg der P-I-Kurve im licht-limitierten Bereich) festgestellt werden. Der Tagesabschnitt der Messung nach Entnahme der zu vermessenden Pflanzen aus der diurnalen Lichtrhythmik am Morgen des Messtages wirkte sich nur auf die Elektronentransportrate (ETR) und den Lichtsättigungspunkt (Ik) dunkeladaptierter Pflanzen signifikant aus. Eine Verletzung beeinflusste diese Leistungsparameter der Photosynthese mit dem gewählten Messschema nicht. Durch die Starklichtinkubation herbeigeführte Reaktionen an den Photosystemen (ETR, Anteil der Limitation der

Quantenausbeute durch den Elektronenakzeptor am PSI (YNA), Anteil der Limitation der Quantenausbeute durch den Elektronendonator am PSI (YND), Yield des nichtregulierten nicht-photochemischen Energieverlustes am PSII (YNO), Yield des regulierten nichtphotochemischen Energieverlustes am PSII (YNPQ), nicht-photochemisches quenching (NPQ) – vgl. [15]) werden von den Faktoren Blattposition, Tagesabschnitt der Messung und, speziell während der Lichtstressakklimatisation, auch Verletzung signifikant beeinflusst. Durch die Lichtstress-induktion ausgelöste Effekte am PSI werden in der Gruppe o.g. Faktoren nur durch die Blatt-position beeinflusst. Hier kommt es zu Unterschieden bei den donor- und akzeptorlimitierten Anteilen des PSI. Im Gegensatz dazu wirkten sich, wie schon auf die Parameter der Photosyntheseleistung der dunkeladaptierten Pflanzen, die Faktoren Blattposition und Tagesabschnitt der Messung auf Deskriptoren beider Photosysteme während der Erholungsphase signifikant aus. Die Verletzung spielt als Einflussfaktor während der Erholungsphase keine bedeutende Rolle.

Zur Klärung des Ausmaßes der methodisch unumgänglichen, durch Verwundungsstress bei der Blattscheibengewinnung induzierten Interferenzen wurden in einer komplexeren Versuchsmatrix mit nah-isogenen Kontrollpflanzen die Lage von Analysenort und Blattscheibengewinnung (1.-3. Blatt, Seitenlage relativ zur Mittelrippe am identisches Blatt) und der relative Zeitpunkt der photosynthetischen Analyse zur Verletzung durch eine Blattscheibengewinnung an Tabakpflanzen untersucht.

Interessanterweise konnte zwischen den Messungen mit einem zeitlichen Versatz von vier Stunden (vormittags und nachmittags) der unverletzten Kontrollpflanzen kein signifikanter Unterschied in den Leistungsparametern festgestellt werden, obwohl dies aufgrund der vorausgegangenen Untersuchungen zu erwarten gewesen wäre. Der Verletzungsstress durch die Entnahme einer Blattscheibe 30 min vor der zweiten Messung an einem der oberen drei vollständig ausgebildeten Blätter stellte nach eingehender Untersuchung der gewonnenen Daten keine signifikante Varianzquelle für photosynthetische Leistungsparameter dar. Selbst ein Vergleich der Blattregionen direkt neben den verletzten Regionen brachte keine statistisch bedeutsamen Unterschiede hervor. Auch die Ergebnisse der Untersuchung zur verletzungsbedingten Signalübertragung in andere unverletzte Blätter der Pflanze sowie über die Blattmittelrippe hinweg waren mit dieser Aussage übereinstimmend. Auch hier konnten keinerlei Auswirkungen festgestellt werden, so dass Effekte einer Verletzung auf photosynthetischen Leistungsparameter im Rahmen der Entnahme von Blattscheiben für molekularbiologische Analysen als weithin unbedeutend eingestuft wurden, soweit nicht, wie in den vorausgegangenen Untersuchungen, Akklimatisationsprozesse der Photosysteme während einer Lichtstressinduktion untersucht wurden.

Sowohl die Verwundung der Blätter bei der Entnahme der Blattscheiben als auch das Alter der Blätter beeinflussten die gemessenen Leistungsparameter. Damit waren für das Versuchsdesign enge Grenzen gesetzt, die Altersabhängigkeit bedeutete zum Beispiel, dass stets mehrere Blätter je Pflanze gemessen werden mussten, da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die Altersabhängigkeit für alle Events in gleicher Weise wirksam ist. Die Verwundungseffekte beschränkten die Möglichkeiten zur Entnahme von Blattscheiben; ein Bezug zu PsbO am jeweils gemessenen Blatt war erst nach Versuchsende möglich.

Auf eine für die Einzelpflanze spezifische Kontrolle zur vergleichenden Blattscheibengewinnung in Blattarealen ohne Stressinduktion bzw. ohne Ablauf einer Recovery-Phase nach der Stressinduktion konnte nach allgemeiner Bewertung der trans-individuellen Varianz nicht verzichtet werden. Die Vorinkubation der Pflanzen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen. Trotzdem mussten individuelle Unterschiede berücksichtigt werden: Die Leistungsmessungen benötigten Zeit, so dass die Individuen einer Versuchsgruppe zu unterschiedlichen Tageszeiten (nacheinander) in die Messung kamen. Da höhere Pflanzen über biologische

Uhren verfügen, kann ein Einfluss des Tagesrhythmus auf die Messung nicht ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für den Jahresrhythmus und Unterschiede im Strahlungsregime während der Vorinkubationsphase zwischen den Versuchsgruppen. Um Effekte, die sich aus diesen Unterschieden der Vorinkubationsphase ergeben von Effekten der Manipulation unterscheiden zu können, erfolgte eine detaillierte Erfassung sämtlicher Einflussfaktoren während der Vorinkubations- (Temperatur, Licht) und Messphase (Tageszeit der Messung). Vergleichsmessungen, bei denen Einzelindividuen an verschiedenen Tageszeiten vermessen wurden, sowie die Wiederholung von Messungen an Nachkommen bereits vermessener Events in nachfolgenden Versuchsreihen sollten hier helfen, sowohl die Amplitude derartiger Effekte abzuschätzen als auch Hinweise auf Normierungsmöglichkeiten liefern. Über derartige Normierungen, d.h. Bezug der Messwerte auf einen Basisfaktor, der in gleicher Weise von den Vorinkubationsbedingungen abhängig ist wie der Messwert, konnte die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen verbessert werden.

Abgesehen von der Variabilität bis zum Übergang der Jungpflanze in das Gewächshaus, bieten auch moderne Forschungsgewächshäuser mit zusätzlichen Kunstlichtquellen keine idealen Bedingungen. Bereits das Problem der Individuengröße ist überall eher ungelöst. Licht nimmt im Quadrat mit der Entfernung zur Lichtquelle ab. Im Prinzip müsste in Versuchsgruppen eine fast tägliche Justage erfolgen, sonst werden die Versuchsgruppen so groß, dass komplexe Analysen unter Berücksichtigung von Individualentwicklung und Zeit praktisch gar nicht mit überschaubarem Aufwand möglich sind. Hinzu kommen langfristige Überlagerungen (Jahreszeit, konstruktionsbedingte Schatteneffekte, Individualschatten, ggf. chemische Interaktion bei unvermeidlichen Verletzungen u.ä.). Klimakammern mit standardisiertem Licht ohne Schatteneffekte hätten Vorteile gehabt, jedoch gelangt man hier oft (zu lange) auf Wege, die grundlagenwissenschaftlich interessant, aber für anwendungsorientierte Forschung oft eher wenig aussagefähig bis abwegig sind. Zudem ist die Problematik „natürlichen“ Lichts in Klimakammern bis heute eher ungelöst. Die Strategie war komplexe Analysen mit individuellen Pflanzen genau im Übergangsbereich von künstlicher Kultivierung (Klimakammer, breite analytische Möglichkeiten) und Gewächshausversuch (hohe Anzahl von Individuen, aber schon durch Individualentwicklung gleichzeitig nicht mit komplexen Analysen zu behandeln) durchzuführen. Es gibt also leider einen regelrechten Zwang, die Jahreszeiten zu akzeptieren oder unproportional hohe Kosten oder lange Untersuchungszeiträume für ähnliche Untersuchungen zu akzeptieren bzw. aufwenden zu müssen.

Um nachzuweisen, dass eine Stressreaktion auch detektierbar ist, erfolgten Messungen an Nachkommen der transgenen Events Ara 9 Ara 28 und Tel 26. Entsprechend der Zielsetzung des Projektes standen die Auswirkungen von Stress auf den Photosyntheseapparat im Mittelpunkt dieser Untersuchungen; konkret wurden Leistungs- und Akklimationsparameter beider Photosysteme erfasst. Die Messungen erfolgten am jeweils ersten, zweiten und dritten vollständig ausgebildeten Blatt der Pflanzen, um Unterschiede, die nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung wirksam sind, ggf. ebenfalls zu erfassen. Der PsbO-gehalt wurde dabei vor Stresseinwirkung, nach Induktion des Stresses sowie nach Abschluss der Erholungsphase bestimmt. Mit diesem Vorgehen wurde sichergestellt, dass Stress-induzierte Veränderungen in der Syntheserate des Proteins detektiert werden. Eine verallgemeinerbare Charakterisierung von Pflanzen der transgenen Ara-Linien durch unterdurchschnittliche Niveaus nicht-photochemischer Löschprozesse in der Lichtstressphase gelang hier nicht. Jedoch konnten signifikante Varianzunterschiede bei den donor- sowie akzeptorlimitierten Anteilen des PSI im Vergleich von NiK-Pflanzen zu den transgenen Events Ara 9 und Tel 26 festgestellt werden. Weiterhin konnte in diesem Versuch die aus den anfänglichen Screening-Experimenten bekannt gewordenen Unterschiede zwischen den Blattpositionen verifiziert werden. So waren die Unterschiede zwischen dem jüngsten ausgewachsenen Blatt und den beiden älte-

ren nachfolgenden Blättern (2 und 3) größer als zwischen den zwei älteren Blättern. Die photosynthetischen Leistungs- und Akklimationsparameter (ETRI, ETRII, YNA, YND, YNO, YNPQ, NPQ) unterschieden sich dabei insbesondere während der Lichtstressphase, aber auch nach der Erholungsphase, zum Teil erheblich in der Lage als auch in der Varianz der Daten. Ausgehend von diesen Erkenntnissen lieferte die vergleichende Untersuchung der transgenen Pflanzenlinien mit den NiK-Pflanzen jeweils unter der Bedingung der gleichen Blattposition bzw. des gleichen Blattalters zusätzliche Unterschiede photosynthetischer Parameter. So konnten selektiv für das jüngste ausgewachsene Blatt geringfügig erhöhte Werte für den Koeffizienten des nicht-photochemisches quenchings (Energilöschung, -ableitung: qN) sowie YNO während der Lichtstressinduktion bei Ara 28 ermittelt werden. Des Weiteren nahm die Anzahl signifikant unterschiedlicher Photosyntheseparameter zwischen transgenen Pflanzenlinien und den NiK-Pflanzen mit zunehmendem Blattalter ab. Die deutliche Differenzierung zwischen 1. und folgenden Blättern anhand der PsbO-Mengen (Abb. 7) wurde so anhand der Parameter im photosynthetischen Screening hier auch nachvollzogen.

Bezüglich ihrer PsbO-Proteinexpression konnten jedoch keine eindeutigen Unterschiede nach der Stressinduktion im Vergleich zu den nah-isogenen Kontrollpflanzen gefunden werden. Auffällig war aber, dass die Kontrollproben derselben untersuchten Pflanzen vor der Stressinduktion geringere Variabilität zeigten als Proben nach der Stressinduktion bzw. der nachfolgenden Erholung (Abb. 8).

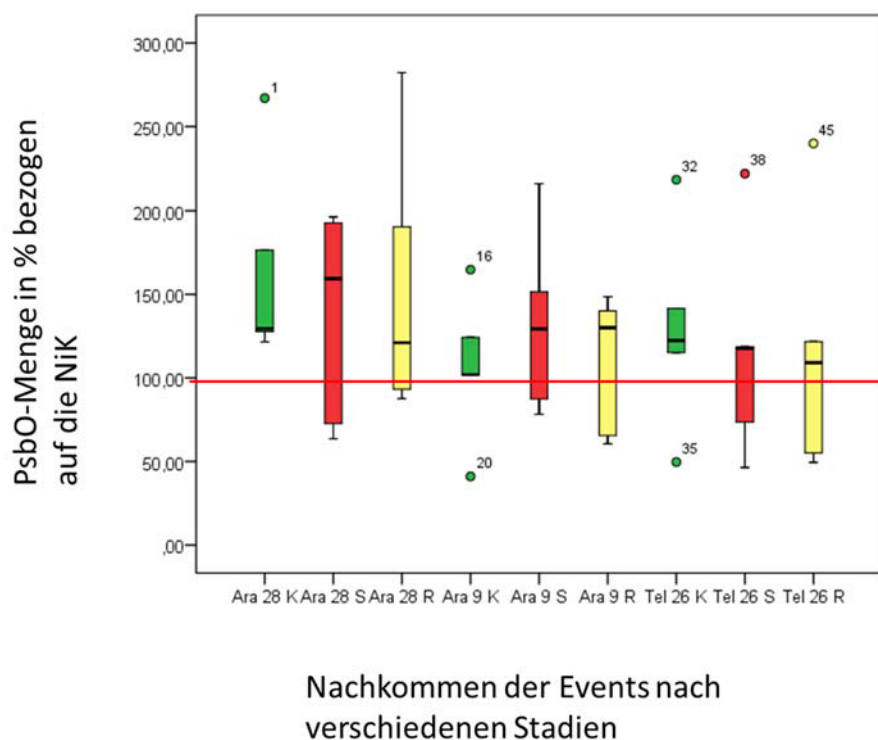


Abbildung 8 PsbO-Mengen von je 5 Nachkommen (n=5) der Transformationsevents Ara 28 und 9 (Ara: Pflanze enthält chimäres *psbO*- Gen aus *Arabidopsis thaliana*) und Tel 26 (Tel: Pflanze enthält chimäres *psbO*-Gen aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1) bezogen auf die nah-isogene Kontrolle (NiK) in Prozent, K (grün) = Kontrollprobe vor Stress, S (rot) = Probe nach Lichtstress, R (gelb) = Probe nach Recovery (Erholung)

Die allgemein beobachtete Variabilität von Analyseergebnissen auch innerhalb genetisch identischer Gruppen von Pflanzen führte zur Hypothese, dass unberücksichtigte bzw. nach üblichem Stand der Methodik in der Anzucht- und Akklimationsphase unvermeidliche

Einflussfaktoren ursächlich sind. Zwei grundsätzliche Aspekte wurden dabei als von wahrscheinlicher Bedeutung isoliert und experimentell überprüft. Dies betraf die Rolle des physiologischen Alters der Linie, welche anhand von NiK-Pflanzen als unbedeutend eingestuft werden konnte, sowie die methodisch-technisch schwer eliminierbare Variabilität der relativen Bodenfeuchte in Abhängigkeit von der absoluten Transpirationswassermenge unterschiedlich entwickelter Einzelpflanzen im Gewächshaus mit typisch standardisierten Bewässerungszyklen.

Können Lichtfeldeffekte für unterschiedliche entwickelte Pflanzen im Gewächshaus durch ihre Stelldichte gut ausgeglichen werden, ist dies für die Amplitude der Änderungen der Bodenfeuchte zwischen den täglichen Bewässerungszyklen und bei variierendem Einfluss des natürlichen Strahlungstagesganges sowie begrenzter Temperaturregulation größerer Forschungsgewächshäuser schwer möglich. Der Einfluss der Bewässerung auf das Photosyntheseverhalten bei Lichtstressinduktion in Abhängigkeit von Photonenflussdichte und applizierter Photonendosis wurde deshalb in komplexer Form mit Pflanzenkohorten von *Nicotiana tabacum* var. Petit Havanna SRI bei ansonsten Beibehaltung der standardisierten Anzucht- und Akklimatisationsbedingungen untersucht, um für diese Bedingungen typische und bei ergänzend relativ erhöhtem Wassermangel grundsätzlich zu erwartende Reaktionsbreiten der Photosyntheseleistung und -akklimatisation unter Einschluss der Lichtstressinduktion für die gesamte Lichtreaktion (PSII, PSI) zu charakterisieren.

Dazu wurde eine sog. vollfaktorielle Versuchsplanung mit den Stressoren Wasserversorgung sowie Photonenflussdichte und Dauer der Bestrahlung während der Lichtstressinduktion entwickelt, welcher durch zusätzliche Faktorstufen auf ein „*central composite design*“ (ccd) erweitert wurde. Die erwartungsgemäß signifikanten Einflüsse der Faktoren Photonenflussdichte und Bestrahlungsdauer auf die Leistungsparameter waren in der gewählten Variationsbreite weithin durch die Photonenflussdichte dominiert. Der Einfluss der zugegebenen Wassermenge kann nach diesem Experiment als signifikant für die Elektronentransportrate als auch für die Lage des Lichtsättigungspunktes erachtet werden. Aber auch die Quantenausbeuten am PSI und am PSII während der photosynthetischen Bestrahlung unterschieden sich zwischen den einzelnen Faktorstufen der Wasserzugabe. Dies konnte für die Pflanzen mit geringerer Wasserzugabe im Vergleich zu denen mit einer täglich zugeführten Referenzwassermenge von 20 ml statistisch gesichert werden. Die Lichtsättigungspunkte beider Photosysteme sind bei den Pflanzen mit geringerer Wasserzufuhr (8 ml/d) um 17% erhöht und für die Pflanzen mit stark reduzierter Wasserversorgung (3,5 ml/d) sogar um 50%. Für diese Pflanzen (3,5 ml/d) konnte auch eine um 35% erhöhte Elektronentransportrate der dunkeladaptierten Pflanzen im Bezug zu denen der Referenzpflanzen nachgewiesen werden. Des Weiteren sind die Unterschiede zwischen dunkeladaptierten und lichtstressinduzierten Photosystemen, insbesondere der Elektronentransportraten sowie der Lage der Lichtsättigungspunkte beim Vergleich der Pflanzen mit verringerter Wasserzufuhr von 8 ml/d mit den Referenzpflanzen (20 ml/d) signifikant geringer. Für die Pflanzen mit verringerter Wasserzufuhr (3,5 und 8 ml/d) konnte ebenfalls ein um ca. 10% verringerter Anstieg der Elektronentransportrate beider Photosysteme im lichtlimitierten Bereich als signifikant erkannt werden. Ein Vergleich mit den Pflanzen, welche erhöhte Wassermengen (36 sowie 50 ml/d) erhielten, lieferte keine nennenswerten Unterschiede in den photosynthetischen Parametern. Für die genutzte NiK wurde so die Reaktionsbreite genutzter photosynthetische Deskriptoren unter typischen Gewächshausbedingungen ermittelt, welche als Referenz für irreguläre Variationen der Wasserversorgung in komplexeren Experimenten diene.

Die im fortgeschrittenen Zeitraum der Förderperiode im Rahmen der Arbeitsgruppen vorgenommene Gesamtschau grundlegender Ergebnisse der vergleichenden Analysen von Photosyntheseleistung und -akklimatisationsvermögen unter Lichtstressinduktion transgener Pflan-

zenlinien in Topfkulturen führte zur Hypothese, dass die bis dahin zum Teil deutliche Indikation stressmodulierender Einflüsse bei Events in transgenen Linien, wie z. B. Ara, ihre jedoch relativ inkonsistente bzw. sporadische Ausprägung in unterschiedlichen, zeitlich unabhängigen Versuchen mit unter den gegebenen Bedingungen zwischen Einzelversuchen weithin unkontrollierbaren Varianzquellen verbunden sind. Dies betraf potenziell u.a. die Strahlungsbedingungen während der Anzuchtphase sowie während der im Minimum einwöchigen Akklimatisationsphase nach Überführung der Pflanzen in das Forschungsgewächshaus (mittelfristige/saisonale Trends; Positionseffekte für die Einzelpflanze) als auch temporäre bzw. singuläre Ereignisse (technischer Ausfall eines Bewässerungszyklus bzw. einer Strahlungsquelle, Abweichung der räumlichen Orientierung zu analysierender Einzelblättern zur Hauptstrahlungsquelle). Diesem Umstand mit einer Reduktion zu vergleichender Pflanzengruppen und Erhöhungen der Gruppengrößen abzuweichen, wurde in der gegebenen Situation des Erkenntnisfortschritts und mit dem Ziel, am Ende des Vorhabens für übliche Variationen des Faktorengefüges zumindest im Ansatz verallgemeinerbare Aussagen treffen zu können, als nicht zielführend angesehen. Abgesehen von der zwangsläufigen Eliminierung transgener Events im direkten bzw. simultanen Vergleich bliebe die langfristige Variabilität (saisonale Langzeitdynamik natürlicher Solarstrahlungsanteile im Gewächshaus) bei im Aufwand beherrschbaren, jedoch sukzessiven Vergleichsexperimenten mit unterschiedlichen transgenen Events bzw. Linien letztendlich nicht bzw. nur in halbjährlichen Zeitfenstern weitgehend eliminierbar. Dies führte zur Entscheidung, einen eher ungewöhnlichen experimentellen Weg zu gehen, indem quasi-kontinuierlich über Monate hinweg eine Versuchsmatrix mit transgenen Events der Linien (Ara, Syn, Tel) und Kontrollpflanzen mit gleitenden Wiederholungen von der primären Anzucht bis hin zur finalen Stressinduktionsanalyse und Biomasseernte bearbeitet wurden, also die von Experiment zu Experiment bestehende Varianz durch eine geringere Variabilität der Kombination im Umfang geringer bemessener Versuchsgruppen abzubilden und die Güte der Aussagen durch unabhängige Wiederholungen zu erhöhen. Einer einwöchigen Akklimatisationsphase folgte dabei jeweils eine einwöchige Versuchsphase (Analyse photosynthetischer Leistungsparameter einschließlich Stressinduktion von $n=2$ Individuen pro Tag nach Isolation aus der diurnalen Lichtphase im ca. 5stündigen Messschema und Re-integration der Pflanzen nach Ende der Tageslichtphase in das Gewächshaus bis zur abschließenden Biomasseernte). Gleichzeitig erfolgte über die jeweils 2 Wochen eines Versuchsblockes hinweg ein intensives, quasi-simultanes Monitoring (3malig, verteilt über den Licht-Tag) der effektiven Quantenausbeute des PSII an einem erzwungen horizontal exponierten Blatt jeder Einzelpflanze bei kontinuierlicher Erfassung der Bestrahlungsstärke sowie auch der Bodenluftfeuchte in der einwöchigen Versuchsphase mittels autonomer Messlogger am analysierten Blatt bzw. im Kultursubstrat der jeweiligen Einzelpflanze. Die hoch komplexe Datenmatrix enthielt so neben den physiologischen und morphologischen Parametern statistisch deskriptive Parameter, welche die Variabilität der Schlüsselfaktoren Strahlung und Bewässerung zumindest grob für die individuelle Pflanze mit dem Hintergrund der saisonalen Dynamik im sukzessiven Verlauf der Einzelversuche abzubilden vermochten. Der sehr hohe, auch technische Aufwand der quasi-kontinuierlichen Versuchsdurchführung über Wochen hinweg sowie der nachfolgenden Rohdatenbearbeitung wurde mit einer Datenmatrix gerechtfertigt, welche die typische Lücke zwischen experimenteller Kultivierung (Erfassung hoch komplexer Leistungsdaten mit fortgeschrittener Analysentechnik an wenigen Pflanzen) und längerfristiger Massenkultivierung (Erfassung einfacher, leicht messbarer Deskriptoren) bei Abbildung von verlängerten Ausschnitten saisonaler Faktorenvariabilität überspannt. Die zur Berichtslegung vollständige, für höchste Qualitätsansprüche nachträglich nur noch in Teilen zur Sicherheit wiederholt zu evaluierende Datenmatrix, wurde bisher mit ersten multivariaten und v.a. univariaten Verfahren analysiert.

Durch univariante statistische Analysen (Cramer von Mises Test, Fligner-Killeen-Test, Anova

und in Einzelfällen Mann Whitney U-Test sowie Mood's two sample Test) konnten Deskriptoren ermittelt werden, welche sich zwischen den Pflanzengruppen signifikant unterschieden. Dabei fielen insbesondere die beiden transgenen Linien Ara und Tel im Vergleich mit den NiK auf. Die Pflanzenlinien mit eingebautem Leervektor sowie die Pflanzen der transgenen Linie Syn wiesen hingegen keine signifikanten Unterschiede zu denen der NiK auf. Die transgene Linie Ara konnte sogar morphologisch durch das Verhältnis der Länge zur Breite der Blätter von der NiK unterschieden werden. Pflanzen dieser Linie besaßen im Mittel gestauchtere bzw. weniger lanzettliche Blätter als die der NiK (ca. 14% reduziertes Längen-Breiten-Verhältnis). Auch physiologische Unterschiede waren signifikant. U.a. die maximale Quantenausbeute des PSII und der Lichtsättigungspunkt des Elektronentransports am PSI waren um ca. 16 und 19% im Vergleich zur NiK reduziert. Für Pflanzen der für die transgenen Linie Tel untersuchten Events zeichnete sich ein deutlicheres Bild. Die Pflanzen hatten eine 22% geringere Trockenmasse je Blattfläche und ein um 33% vermindertes Wurzelvolumen im Vergleich zur NiK. Unterschiede der Leistungsparameter der Photosynthese sind sowohl für das PSII als auch des PSI statistisch signifikant. Maximale Elektronentransportraten erreichen im Mittel nur etwa 80% und die Lichtsättigungspunkte nur um die 70% derer von den NiK.

Tabelle 4 Tabelle 4: Bedeutende Auswirkungen verschiedener *psbO* kodierender Events auf allgemeine und photosynthetische Parameter für transgene Pflanzen im Verhältnis zur nah-isogenen Kontrolle. Schnittpunkt der Dynamiken schneller und langsamer Anpassung: α_{ab} , der zugehörige Zeitpunkt: t_{ab} , rel. Frischmasse je Blattfläche: rFMA.BL, Längen-Breite-Verhältnis der Blätter: LB.BL, Carotinoidgehalt je Blattfläche: P.A.Car, rel. Wachstumsrate der Triebe: rWr.TL, rel. Trockenmasse der Sprosse: rTM.S, abs. Wachstumsrate der Triebe: aWr.TL, abs. Wachstumsrate der Frischmasse: aWr.FM, rel. Trockenmasse: rTM, rel. Trockenmasse der Blätter: rTM.BL, rel. Trockenmasse der Sprosse: rTM.S, Wurzelvolumen: V_w , Blattfläche: A_{BL} .

Event	Morphologie Biomasse	& Leistung	Stressempfindlichkeit	Erholung
ARA09	rFMA.BL: 115%		NPQ $_{ab}$: 86%	
ARA11	LB.BL: 90%	PSI.alpha: 120%		
	rFMA.BL: 130%	PSI.w: 294%		
ARA23	LB.BL: 74%	YI $_0$: 104%	qN: 108%	NPQ $_L$: 121%
			NPQ $_{tab}$: 62%	qN: 110%
ARA38	LB.BL: 83%			
	P.A.Car: 109%			
SYN03	LB.BL: 86%		PSI.alpha: 109%	Q NPQ $_L$: 157%
	rWr.TL: 143%		PSI.w: 163%	
SYN26	rTM.S: 114%			
TEL26		YII $_0$: 94%	NPQ $_{t0.5}$: 116%	Y.NA: 118%
TEL42	aWr.TL: 67%	PSII.ETR: 81%	qLs: 80%	
	aWr.FM: 42%	PSI.alpha: 109-113%		
	rTM: 78%	PSI.IK: 77%		
	rTM.BL: 75%	PSII.IK: 75%		
	rTM.S: 79%			
	rTMA.BL: 75%			
	V_w : 55-62%			

Der Vergleich der einzelnen Events mit den NiK unterstützt die Ergebnisse aus dem Vergleich der transgenen Linien mit den NiK. So konnten für fast alle Events der Ara Linie ein geringeres Längen-Breiten-Verhältnis der Blätter nachgewiesen werden. Zusätzliche photosynthetische Parameter unterschieden sich hingegen nur bei einzelnen Events im Vergleich zu denen der NiK. Des Weiteren konnte bei der Betrachtung der einzelnen Events (Tab. 4) auch die Linie Syn 3 erstmals von den NiK in Bezug auf einige morphologische und physiologische Merkmale getrennt werden. Dieses Event wies ähnlich wie bei den Ara Events auch ein um 17% geringeres Länge-Breiten-Verhältnis der Blätter auf. Weiterhin wurden eine erhöhte relative

Wachstumsrate, eine schnellere Relaxation des NPQ in der dem Lichtstress folgenden Dunkelphase, sowie eine nach dieser Lichtstressinduktion schnelleren Änderung der Elektronentransportrate sowohl im lichtlimitierten als auch im lichtgesättigten Bereich nachgewiesen. In der transgenen Linie Tel fiel das Event Tel 42 besonders auf. Dieses Event zeichnete sich durch stark verringerte Wachstumsraten und Biomasseausbeuten aus. Bereits das Wurzelvolumen betrug nur 55-62% im Vergleich zur NiK. Auch die Gesamtblattfläche erreichte nur 84% der Fläche der NiK. Maximale ETR sowie Lichtsättigungspunkte der Photosysteme betrugen für dieses Event nur 81 bzw. 75% unter Bezug auf die NiK.

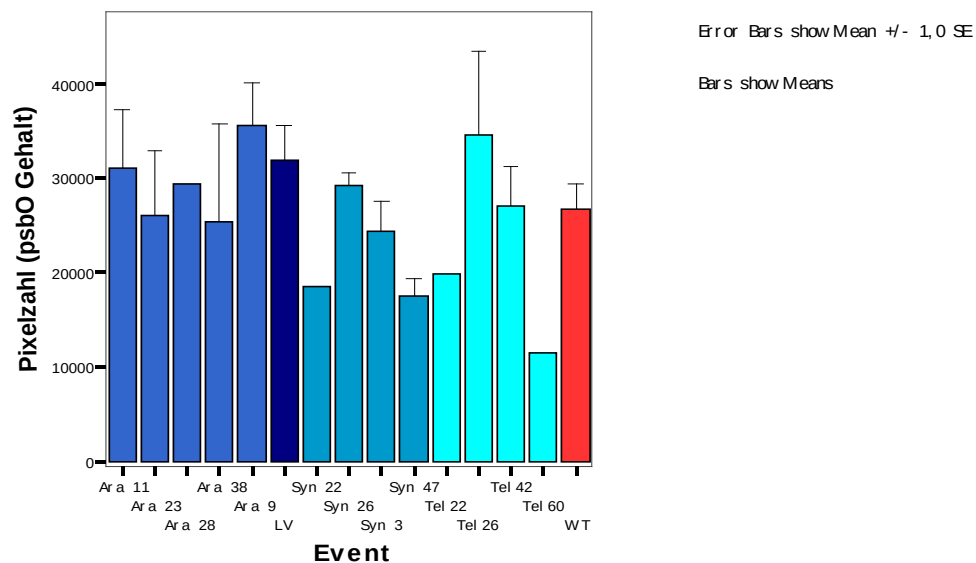


Abbildung 9 PsbO Menge nach Lichtstress der untersuchten Events der drei chimären Gene (psbO aus *A. thaliana* (Ara), *Synechocystis* (Syn), und *T. elongatus* (Tel) im Vergleich zu den nah-isogenen Kontrollen (NiK) und den Leervektorpflanzen (LV)

Bei den in unabhängigen Blockversuchen im Gewächshaus anhand unterschiedlicher Events vorgenommenen Untersuchungen der eines von den drei chimären *psbO*-Genen tragenden Pflanzenlinien wurden anhand der Lage des 1. und 3. Quartils die im Vergleich höchsten relativen Schwankungsbreiten der PsbO-Menge bei der Pflanzenlinie ermittelt, die das *psbO*-Gen aus *T. elongatus* BP-1 trägt. Überraschenderweise werden die geringsten relativen Schwankungen bei Pflanzen, die das *psbO*-Gen aus *Synechocystis* tragen, in einer Größenordnung (3. Quartil im Bereich von ca. 150% des 1. Quartils) ermittelt, welche für Pflanzen in einem einzelnen Versuch sonst typisch sind. Die Variabilität der PsbO-Mengen in den verschiedenen Pflanzenlinien bei unabhängigen Wiederholungen aller Verfahrensschritte und der Gewächshauskultivierung ist jedoch so hoch, dass keine eindeutigen Unterschiede der transgenen Pflanzen im Vergleich zu den NiK bzw. Leervektorpflanzen nachweisbar sind. Pflanzen der Events Tel 26, Ara 9 und Syn 3 enthielten die höchsten PsbO-Mengen, solche der Events Tel 42, Syn 22 und Ara 38 die geringsten.

Die statistische Auswertung, sowie die Speicherung der Daten dieses Versuches wurden durch die BioMath GmbH durchgeführt, (siehe Bericht BioMath GmbH im Anhang)

Ein Teil der Auswertungen und Generierung der Daten wurden nach Projektende durchgeführt,

(siehe Arbeiten nach Projektende im Anhang)

Weitere untersuchte Stressoren sind Salzstress, osmotischer Stress, Schwermetallstress und Hitzeschock. Da die Versuche mit Lichtstress in den Western Blots keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurden mit je zwei Events der Gruppen Ara (Ara 46 und 57), Syn (Syn 50 und 60) und Tel (Tel 65 und 82) weitere Stressversuche *in vitro* durchgeführt. Dabei wurden 1 cm² große Blattscheiben über 9 Tage in jeweils 200 mM NaCl-Lösung, 20 mM ZnCl₂-Lösung, 200 mM Mannitol-Lösung oder Wasser inkubiert. Eine Veränderung der Chlorophyllmengen war für alle drei Stressoren, anders als bei [13] für diese Versuche beschrieben, im Vergleich zur nah-isogenen Kontrolle nicht zu beobachten.

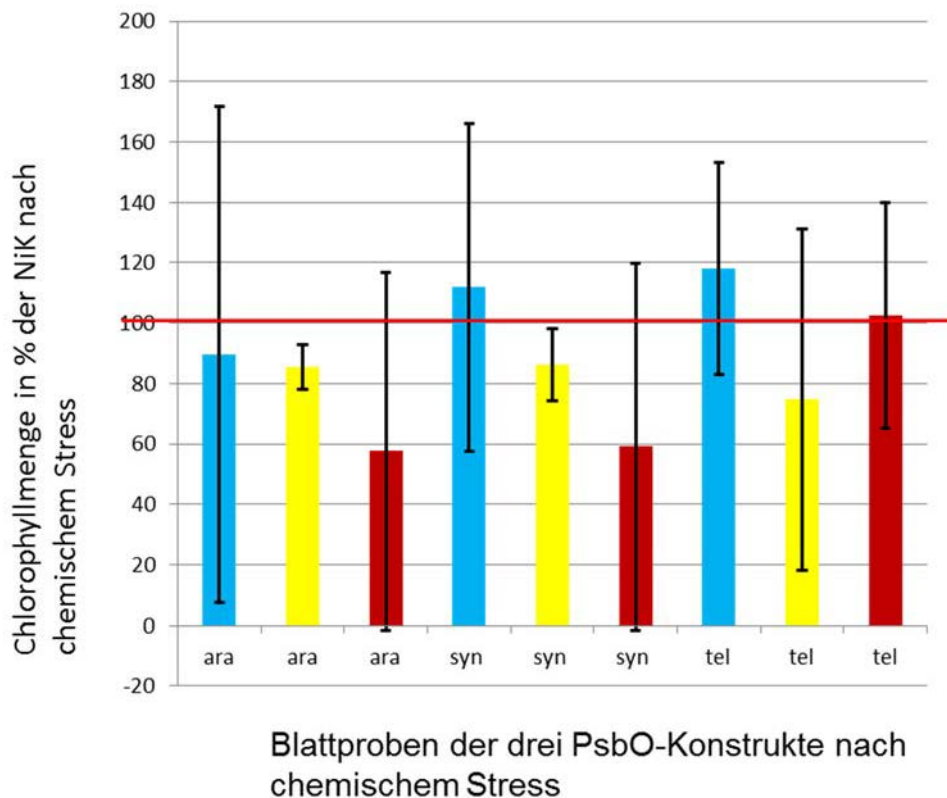


Abbildung 10 Darstellung der Chlorophyllmengen in Prozent der Kontrolle, die mit Wasser behandelt wurde bei je 2 Transformaten der Tabakpflanzen, die eines der drei chimären psbO-Gene trugen (*A. thaliana* (Ara), *Synechocystis* (Syn) und *T. elongatus* (Tel), nach 9 Tagen Inkubation, blau = 200 mM NaCl, gelb = 200 mM Mannitol, braun = 20 mM ZnCl₂

Ein Hitzeschockexperiment *in vitro* lieferte keine Ergebnisse, welche einen Unterschied untersuchter transgener Individuen im Vergleich zur nah-isogenen Kontrolle belegen konnte.

Da *in vitro*-Experimente mit Thylakoidmembranen und substituiertem PsbO-Protein aus dem thermophilen Bakterium *Phormidium laminosum* zeigten, dass die Photosyntheseapparate Hitze resistenter sind als nach Substitution mit einem PsbO-Protein aus einem mesophilen Bakterium, [14], wurde ein Hitzeschockexperiment *in vitro* mit je 5 Blättern einiger Transformationsevents der Pflanzen durchgeführt, die das *psbO*-Gen aus *T. elongatus* (Tel), tragen. Hierbei wurden aus den verwendeten Blättern nach 4 h Hitzeschock bei 40°C Blattextrakte hergestellt und über Western Blot analysiert. Auch hier ist kein eindeutiger Unterschied zu Blättern der NiK erkennbar. Die untersuchten 4 Events erwiesen sich jedoch als deutlich inhomogener als die NiK.

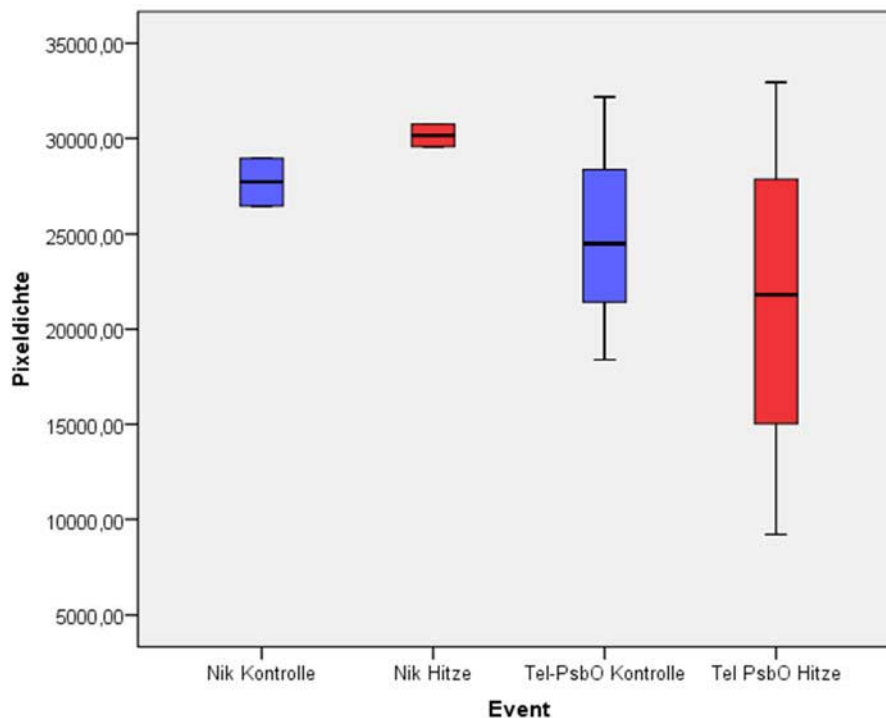


Abbildung 11 Darstellung der PsbO-Menge in Form der Pixeldichte der detektierten Banden im Western Blot nach 4 h Inkubation bei RT (blau) bzw Hitze (40°C) (rot), n=4, Tel: Pflanze enthält chimäres psbO-Gen aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, NiK: nah-isogene Kontrolle

Im Antrag war geplant, die transgenen Linien, die sich in den kleinräumigen Vorversuchen als besonders effektiv erwiesen hatten, im großen Maßstab im Gewächshaus in Groß Lüsewitz zu testen. Dazu mussten die Kultivierungsbedingungen mit Hilfen von konventionellen Tabakpflanzen standardisiert werden. Daher wurden Tabakpflanzen mit und ohne Lichtstress sowie mit und ohne Wasserstress angezogen und die Auswirkungen auf phänotypische Merkmale erfasst. Mit den simulierten Stressbedingungen konnten zwar Unterschiede in den Merkmalen zur Biomassebestimmung (Pflanzenhöhe, Frischmasse, Trockenmasse, Frisch- und Trockenmasse der Blätter, mittlere Blattfläche) festgestellt werden, diese waren aber nicht signifikant.

II.1.4 Abweichungen zum Projektantrag

II 1.4.1. Ansätze zum Nachweis der Expression von rekombinantem PsbO in Pflanzen

In der Schlussphase des Projektzeitraums wurde ein synthetisches Gen hergestellt und in Tabak eingebracht, das zum einen die Produktion steigern und zum andern die Detektion des transgen-kodierten PsbO ermöglichen sollte.

Nach Transformation von Tabakpflanzen, konnten 7 von 23 getesteten Pflanzen auf DNA-Ebene als Träger des Transgens identifiziert werden. Der Nachweis des Transkriptes und der Nachweis des PsbO-Proteins per Western Blot mit einem 6xHis tag spezifischen Antikörper wird zurzeit durchgeführt. Ergebnisse hierzu wurden unter „Arbeiten nach Projektende“ im Anhang dargelegt.

Um die Protein-Expression des angepassten *psbO*-Gens aus *T. elongatus* BP-1 nachweisen zu können, wurde das Gen in einen viralen Vektor eingebracht, der eine transiente Expression in Tabakpflanzen in hoher Menge ermöglicht. Hiermit soll untersucht werden, ob

1. eine Translation des angepassten *psbO*-Gens aus *T. elongatus* BP-1 in Tabakpflanzen möglich ist,

2. die transiente Expression des angepassten PsbO-Proteins zu einer Veränderung der Gesamtmenge des in der Pflanze gebildeten PsbO-Proteins führt. Eine Expression des angepassten *psbO*-Gens aus *T. elongatus* mit Hilfe eines Anti-6x-His Tag-Antikörper nachgewiesen werden. Ob es dadurch zu einer Veränderung der Gesamtmenge des PsbO-Proteins kommt, wird zurzeit noch untersucht.

II 1.4.2 Neue Ansätze zur Untersuchung der Stresstoleranz

In den oben beschriebenen Stressversuchen konnte keine Überlegenheit der modifizierten Tabakpflanzen im Vergleich zu den nah-isogenen Kontrollpflanzen nachgewiesen werden. Ein Erklärungsansatz könnte ein durch das zusätzlich exprimierte PsbO-Protein induzierter Elektronenstau zwischen den Photosystemen I und II sein, der dann zu höherem oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) führt.

Hierzu wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit Blattscheiben von transient exprimierenden Tabakpflanzen bezüglich der Entstehung von ROS untersucht. Dazu sollte ein *in vitro*-Testverfahren entwickelt werden, mit dem die ROS-Entwicklung quantifiziert werden kann. Angaben dazu finden sich im Anhang im Teil „Arbeiten nach Projektende“

Ein weiterer Ansatz, der zurzeit untersucht wird, ist die Frage, ob das angepasste PsbO-Protein aus *T. elongatus* BP-1 die Funktion des endogenen *psbO*-Gens von Mangelmutanten der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ersetzen kann, so dass deren Phänotyp aufgrund des fehlenden PsbO-Proteins komplementiert wird.

Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*, die entweder das *psbO1*-Gen oder die unvollständige Kopie *psbO2* nicht exprimieren können [11], wurden dazu bereits transformiert. Das Experiment befindet sich noch in Arbeit, vgl. Teil Arbeiten nach Projektende.

Zwei neu erschienene Publikationen [12,13], weisen darauf hin, dass eine Reduktion des PsbO-Proteins in *Solanum tuberosum* cv. Taedong valley zu einer höheren Knollenmenge und zu einer höheren Zuckerkonzentration in den Blättern führten. Die Pflanzen hatten nach Stressinduktion mit NaCl, ZnCl₂ und Mannitol einen höheren Chlorophyllgehalt in den Blättern, eine höhere Menge an Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inaktivieren und waren photosynthetisch aktiver. Zudem zeigten die Pflanzen unter den genannten Stresskonditionen ein besseres Wachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die eine normale Menge an PsbO-Protein bildeten [12,13]. Der Autor konnte jedoch nicht den genauen Zusammenhang zwischen geringerer PsbO-Menge und besserer Stresstoleranz erklären. Diese Daten widersprechen der bisher angenommenen Hypothese, dass eine höhere Menge an PsbO-Protein zu einer höheren Stresstoleranz führt. Ein *antisense-psbO*-Gen, welches in Tabakpflanzen zu einem Silencingeffekt des endogenen *psbO*-Gens führen soll, wird zurzeit kloniert. Die resultierenden Pflanzen sollen im Hinblick auf deren Stresstoleranz im Vergleich zu Gururani *et al.* [12,13] charakterisiert werden.

II.2 WP II: Optimierung der C-Fixierung in Tabakpflanzen

Die stabile Bereitstellung von mehr Energie unter Stressbedingungen durch die Photosynthese, die durch die Expression von PsbO erreicht werden sollte, führt allein nicht zu einer Steigerung der Biomasse, die Energie muss im Calvinzyklus genutzt werden um Glukose zu produzieren. [7] konnten zeigen, dass die Expression einer FBPase hier unterstützend wirken kann. Ähnliches zeigten [8] für eine SBPase. Cyanobakterien bilden ein Protein das eine Fusion aus beiden Enzymen darstellt, die FBP/SBPase. Dies könnte möglicherweise eine noch stärkere Steigerung der Biomasse bewirken. Daher haben wir das cyanobakterielle Gen erfolgreich in Tabakpflanzen eingebracht. Das Gen bildete in den Pflanzen ein Transkript. Nach der erfolgreichen Etablierung eines Aktivitätstests für die FBPase-Funktion, konnten Events identifiziert werden, die im Vergleich zur NiK eine höhere bzw. eine niedrigere FBPase-Aktivität aufwiesen. Die transgenen Linien zeigten durchgehend eine erhöhte Biomasse, dies korrelierte aber nicht immer mit der nur zu einem Zeitpunkt gemessenen FBPase-Aktivität.

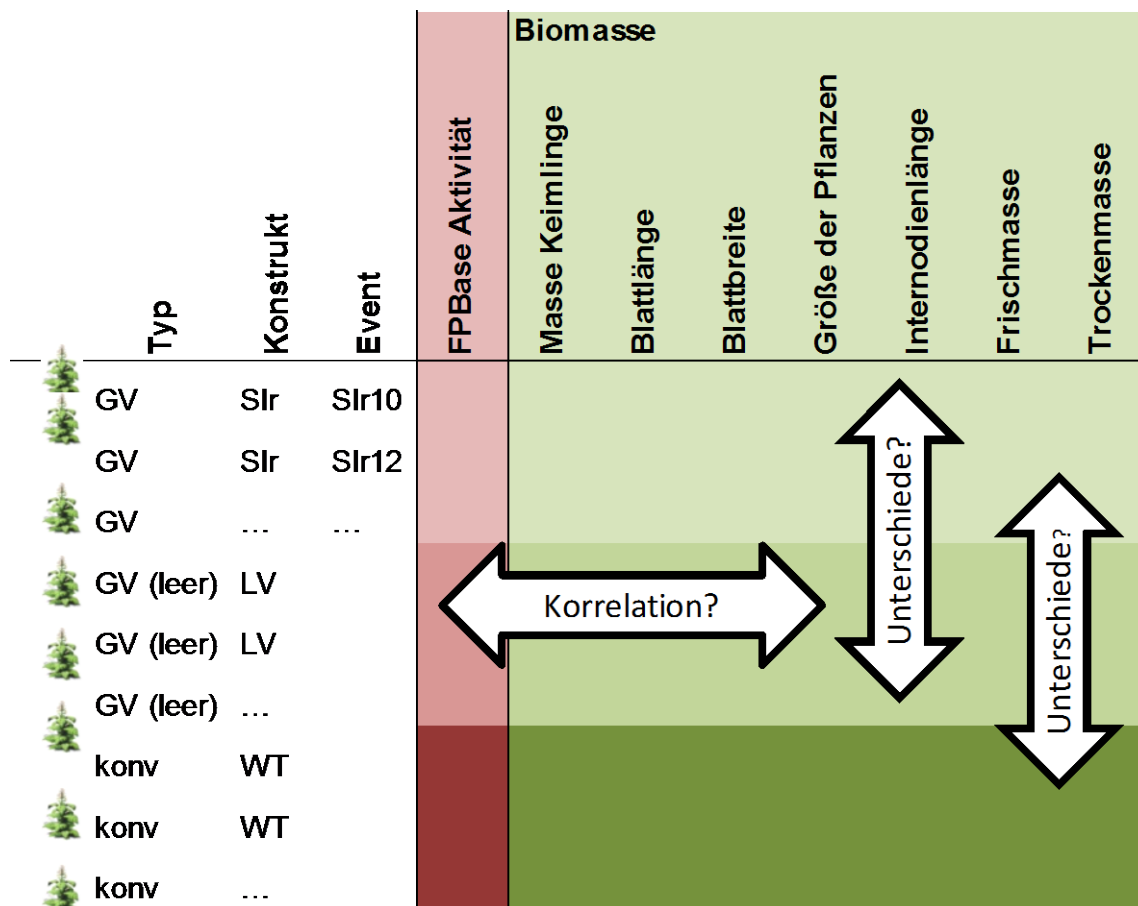


Abbildung 12

Schematische Darstellung der Versuchsansatzes WP 2

Um den Einfluss einer verstärkten Kohlenstofffixierung zu analysieren, sollte das cyanobakterielle *fbp1*-Gen aus *Synechocystis* in Tabakpflanzen kloniert und dort exprimiert werden. Der Kodierbereich des *fbp1*-Gens aus *Synechocystis* PCC6803, dessen Genprodukt sowohl FBPase als auch SBPase-Aktivität hat, wurde erfolgreich mit dem Transitpeptid rbcS der kleinen Untereinheit der RubisCo fusioniert und unter die Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus gebracht.



Abbildung 13 Chimäres FBP/SBPase kodierendes Gen, p35S: konstitutiver p35S Promotor aus dem *Cauliflower mosaic virus*, t35S: konstitutiver t35S Terminator aus dem *Cauliflower mosaic virus*, TP: Transitpeptidsequenz aus der kleinen Untereinheit der RubisCo, *fbp/sbpase*: Originalkodierregion für die FBP/SBPase aus *Synechocystis* PCC6803

Der Pflanzentransformationsvektor wurde in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 überführt. Nach Transformation von *Nicotiana tabacum* SRI konnten 18 Pflanzen über PCR identifiziert werden, die eine oder mehrere Kopien des chimären Gens tragen. Das Transkript konnte bei 7 von 13 untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden. Es wurde erfolgreich ein Assay zum Aktivitätsnachweis der FBPase-Funktion (Fructose-1,6-bisphosphatase) der FBP/SBPase etabliert. Hierbei wurde die FBPase-Funktion gewählt, weil diese Enzymfunktion die Schnittstelle zwischen Calvinzyklus und Stärkesynthese darstellt. Das Produkt der FBPase, das Fructose-6-phosphat wird dann mit Glucose zu Saccharose umgebaut, welche in die Speicherorgane transportiert und dort zu Speicherstoffen, wie Stärke oder Cellulose, umgebaut wird. Die SBPase-Funktion (Sedoheptulose-1,6-bisphosphatase) dient der Regeneration des Ausgangssubstrates für die CO₂-Fixierung und soll einen Ausgleich schaffen.

Neun nah-isogene Kontrollpflanzen und neun Events wurden diesem Test unterzogen. Drei Events erwiesen sich in diesem Test als vielversprechend, da sie eine signifikant höhere FBPase-Aktivität als die nah-isogenen Kontrollen aufwiesen. Weitere vier Events lagen bezüglich der FBPase-Aktivität unter dem Aktivitätsbereich der nah-isogenen Kontrollen. Dabei fiel auf, dass die Aktivitäten der nah-isogenen Kontrollen weitaus homogener waren, als die der Events. Zwei weitere Events konnten nicht ausgewertet werden, da keine Linearität im Laufe der Reaktion nachweisbar war, (vergl. Abb. 15).

Tabelle 5 Transgene Events mit nachgewiesener FBPase/SBPase Expression

			Aktivität im Vergleich zur NiK	Biomasse der Keimlinge im Vergleich	T1 im Vergleich
Slr 8	+	+	-	+	
Slr 9	+	+	-	+	
Slr 10	+	+	+	-	
Slr 12	+	+	+	+	
Slr 15	+	+	+	+	
Slr 20	+	+	-	-	
Slr 24	+	+	-	nicht getestet	

Die Rohdaten des FBPase Test wurden von der BioMath verarbeitet, um die realen Messwerte der FBPase Aktivität zu erlangen und die Endpunkte vergleichen zu können.

(Dazu siehe auch den Auswertungsbericht der BioMath vom 11.12.2012.)

Um die Biomasse der im Enzymtest erfolgversprechenden Events zu bestimmen, wurden von diesen *in vitro* Nachkommen erzeugt und je 5 mal 10 Keimlinge 17 Tage nach der Aussaat

gewogen, (vergl. Abb 16)

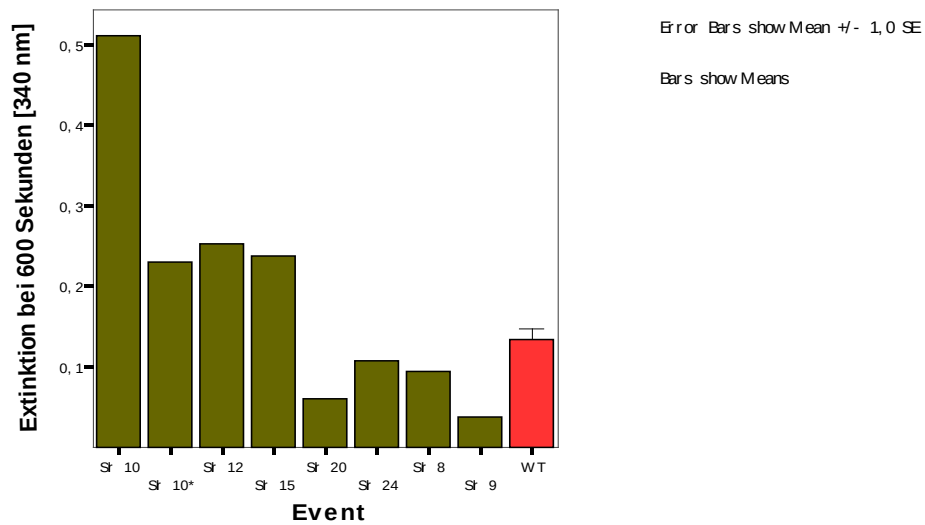


Abbildung 14 Aktivitätstest der FBPase-Funktion der untersuchten Events (grün) im Vergleich zur nahisogenen Kontrolle (NiK, rot)

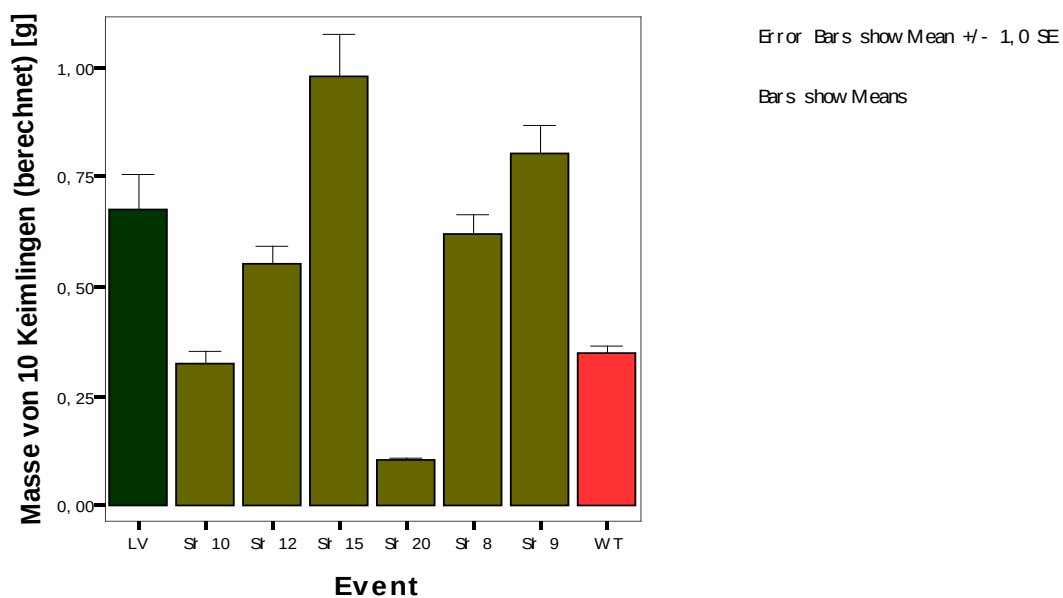


Abbildung 15 Masse von 10 Keimlingen in g der untersuchten Events (grün) sowie der NiK (rot)

Es wurde erwartet, dass Transformationsevents mit einer höheren FBPase-Aktivität als die NiK bei den Nachkommen auch eine Biomassesteigerung im Vergleich zur NiK zeigen, da es zu

einer höheren Kohlenstofffixierung kommt. Die Biomassen der untersuchten Events lagen deutlich über der Biomasse der nah-isogenen Kontrolle (NiK) mit Ausnahme des Events 20. Das Event Slr 10 hat zwar eine wesentlich höhere FBP-Aktivität als die untersuchten NiK, liegt aber in der Biomasse unter den NiK. Bei den Events Slr 9 und Slr 8 hingegen konnte eine deutlich niedrigere FBP/SBPase Aktivität als die der NiK nachgewiesen werden, aber wesentlich mehr Biomasse der T1 Nachkommen als die NiK. Dies könnte daran liegen, dass sich die Biomasse der Pflanzen über einen längeren Zeitabschnitt bildet, während die Bestimmung der FBPase-Aktivität nur zu einem Zeitpunkt bestimmt wurde. Das Event Slr 15 zeigt eine sehr starke Schwankung sowohl in der FBPaktivität als auch in der Biomasse der Nachkommen. Dies könnte wieder daran liegen, dass die Nachkommen genetisch unterschiedlich sind und die Integrationsorte der T-DNA, sowie die Anzahl der Kopien einen Einfluss auf die Expressionshöhe und damit auch auf die Biomassebildung haben.

Weiterhin müsste im Rahmen einer Zeitreihe zu verschiedenen Zeitpunkten die FBPase-Aktivität der Pflanzen bestimmt werden, um einen genaueren Zusammenhang zwischen der Biomassebildung und der Aktivität des Enzyms herstellen zu können.

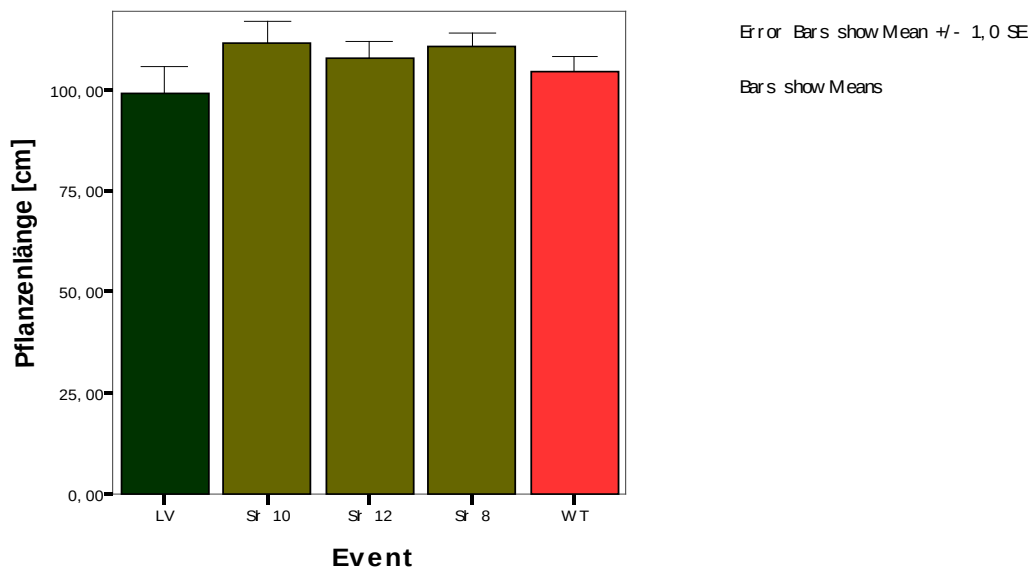


Abbildung 16 Vergleich der Pflanzenlängen nach 8-wöchiger Gewächshauskultivierung von Leervektorpflanzen (LV), nah-isogener Kontrolle (WT, rot) und einiger Events.

Ein weiterer Biomasseversuch wurde im Gewächshaus unternommen, allerdings nicht in der Klimakammer, so dass die Kulturbedingungen nicht so standardisiert waren, wie bei dem *in vitro*-Versuch mit den Keimlingen oder bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten. Das Event 15 wurde wegen der starken Schwankungen in der FBPase-Aktivität nicht ausgewählt. Zur Bestimmung der Biomasse wurden die Blattspreiten, Pflanzenlängen, Internodienlängen, sowie Frisch- und Trockenmassen der Pflanzen gemessen. Auf die im Antrag geplante Saccharosemessung wurde verzichtet, da Saccharose nur das Transportsubstrat in der Pflanze darstellt, hier aber der Zusammenhang zwischen der FBPase-Aktivität und dem endgültigen Biomasseertrag ermittelt werden sollte.

Im Biomasseversuch zeigten sich bei allen untersuchten Events leicht erhöhte Pflanzenlängen

im Vergleich zur Leervektorkontrolle und zur NiK, (vergl. Abb. 17), sowie erhöhte Trockenmassen (vergl. Abb. 18).

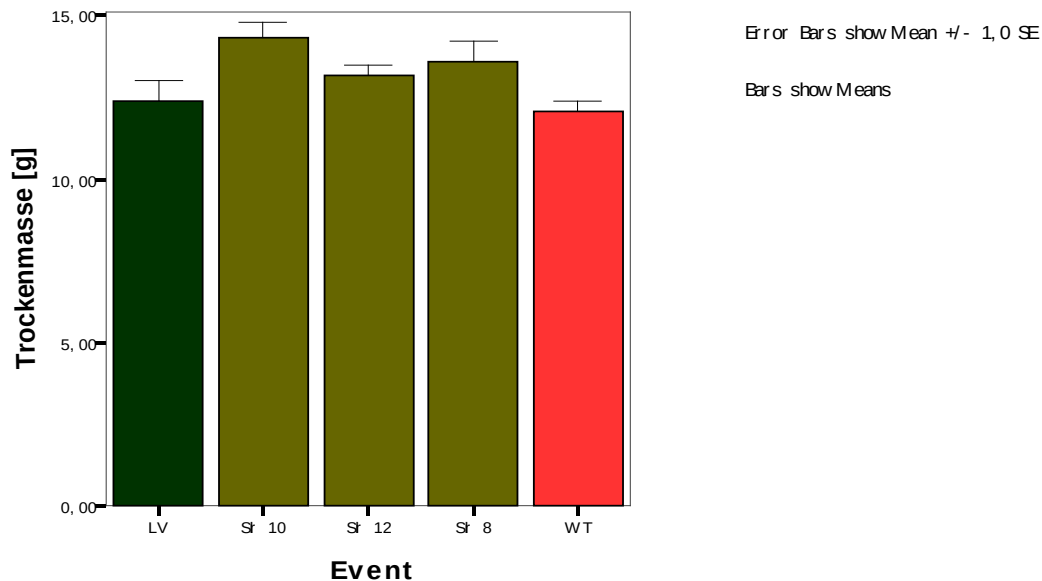


Abbildung 17 Vergleich der Trockenmassen nach 8-wöchiger Gewächshauskultivierung von Leervektorpflanzen (LV), nah-isogener Kontrolle (WT, rot) und einiger Events.

Hier ist auffällig, dass das Event 8 höhere Erträge als die Kontrollen liefert, obwohl die FBPase-Aktivität dieses Events geringer als die der Kontrollen ausfällt. Dieses Ergebnis untermauert die Notwendigkeit die FBPase-Funktion im Zeitverlauf zu messen, um mögliche Schwankungen zu ermitteln und einen klaren Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Biomasseertrag herzustellen.

Des Weiteren fällt auf, dass die Internodienlänge des Events 8 deutlich kürzer ist als die der restlichen Events und die der Kontrollen (vergl. Abb. 19).

Die Blattlängen des Events 8 fallen jedoch nicht größer aus, sondern sind bei allen Events etwas geringer als die Blattlängen der Kontrollen (vergl. Abb. 20)

Der Biomasseversuch muss in einer Klimakammer unter strikteren Bedingungen wiederholt werden. Um eine genauere Korrelation zwischen FBPase-Aktivität und Biomassebildung zu erhalten, muss die FBPase-Funktion über einen längeren Zeitraum wiederholt bestimmt werden.

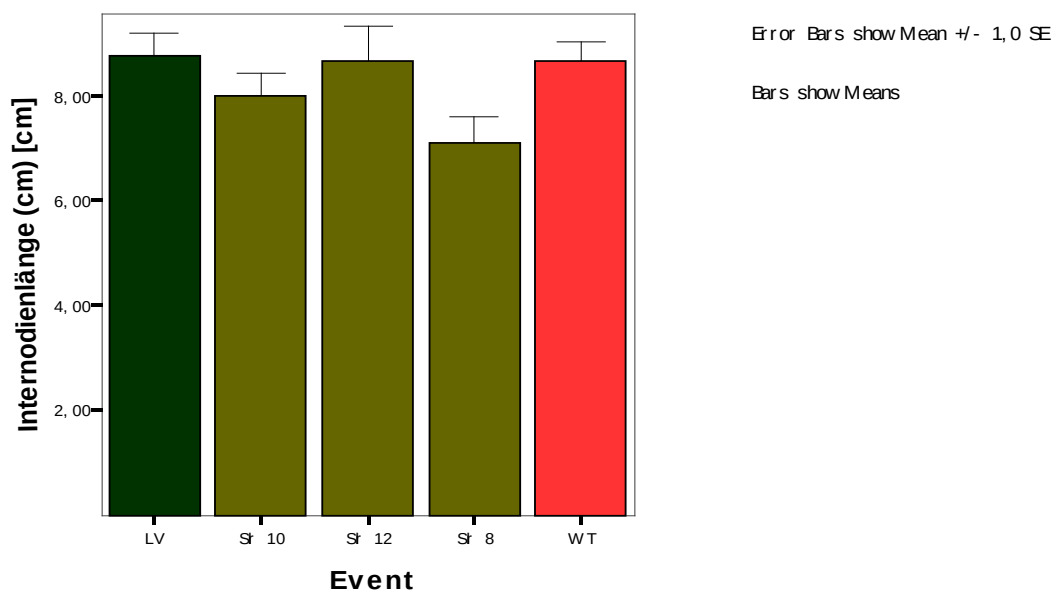


Abbildung 18 Vergleich der Internodienlängen zwischen dem 4. und 5. voll entfaltenen Blatt nach 8-wöchiger Gewächshauskultivierung von Leervektorpflanzen (LV), nah-isogener Kontrolle (WT, rot) und einiger Events.

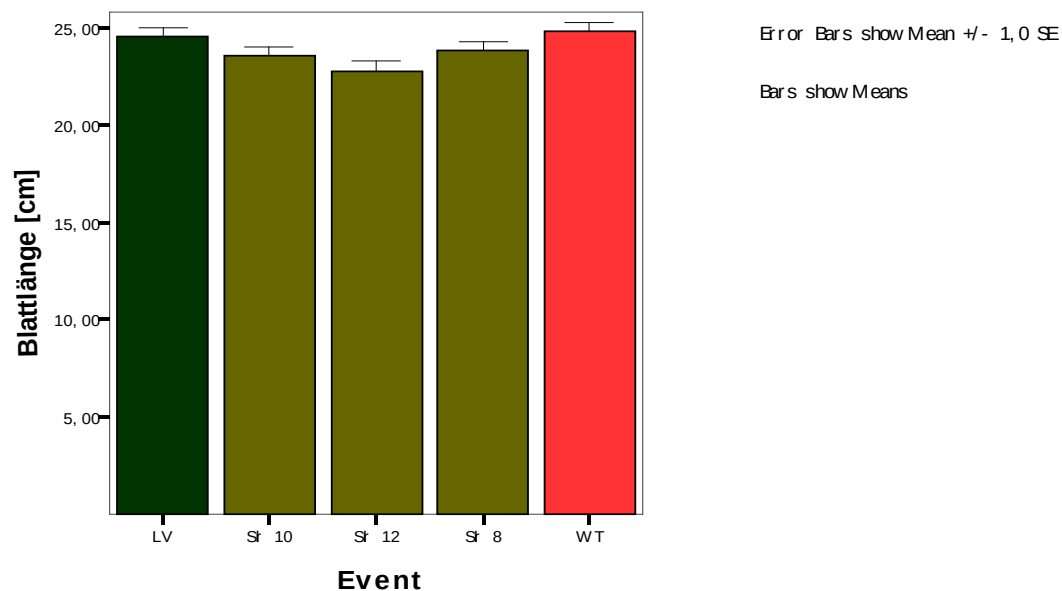


Abbildung 19 Vergleich der Blattlängen des 1. Voll entwickelten Blattes nach 8-wöchiger Gewächshauskultivierung von Leervektorpflanzen (LV), nah-isogener Kontrolle (WT, rot) und einiger Events.

II.3 WP III: Steigerung der Photosynthese und Kohlenstofffixierung in Pflanzen

Wenn durch die Überexpression von PsbO die Stresstoleranz der Photosynthese und somit eine Optimierung dieses Prozesses erreicht werden kann, war eine Kombination mit den transgenen Pflanzen aus dem WP II vorgesehen. Damit sollte ein effektiver, zielgerichteter Stofffluss von der Photosynthese über die C-Fixierung in der Pflanze gewährleistet werden. Bisher war es nicht möglich, den geeigneten Elter eindeutig zu identifizieren.

Die Ergebnisse aus WPI weisen darauf hin, dass die Pflanzen eine komplexe Regulation ihrer Anpassung an abiotische Stressoren zeigt. Wenn jedoch Pflanzen mit einem starken Sink genutzt werden, könnte es sein, dass dies ein Stressor und damit eine Notwendigkeit für die transgene Pflanze darstellt, ihr zusätzliches Potenzial zu nutzen, so dass erst eine Kombination aus einer PsbO überexprimierenden Pflanze mit einer Pflanze mit einem starken Sink zum gewünschten Nutzen führt. Eine Kombination der PsbO Pflanzen und der FBP/SBPase Pflanzen macht also nur in Verbindung mit einem starken Sink (wie z.B. der Cyanophycinproduktion) und Identifikation der geeigneten Eltern Sinn.

II.4 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

☐ Unteraufträge	89.719,00€
☐ Personalkosten, gesamt	285.450,96€
☐ Sachmittelausgaben	72.059,25€
☐ Gegenstände über 410 €	21.833,77€

II.5 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit:

Die durchgeführten Arbeiten haben sich nach dem aktuellen Stand des Wissens ergeben. Die zusätzlichen nicht im Antrag aufgeführten Arbeiten haben sich aus dem Zugewinn des Wissens ergeben.

II.6 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:

Während des Förderzeitraumes ist eine Bachelorarbeit angefertigt worden und eine weitere befindet sich noch in Arbeit. Die gewonnenen Daten aus den WPI und II sollen im Rahmen von Publikationen veröffentlicht werden und auch Teil einer Promotion sein.

Es ist durch den steigenden Bedarf an nachwachsenden Rohstoffen und der daraus resultierenden Verteuerung und teilweise sogar Verknappung von Lebensmitteln von Bedeutung, die Erträge im Vergleich zum heutigen Niveau deutlich zu steigern. Gleichzeitig zeigen sich die Folgen des Klimawandels in Form von Extrembedingungen immer deutlicher.

Die Notwendigkeit, die Biomasseproduktion unter abiotischem Stress zu stabilisieren, hat sich also eher noch verstärkt. Ein praktischer Nutzen der erlangten Daten, sofern sie denn zu einer erhöhten Stresstoleranz der Biomasseproduktion führen, wäre also weiterhin gegeben.

II.7 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

In diesem Projekt sollte die Überexpression des PsbO-Proteins zu einer besseren Stresstoleranz gegenüber abiotischem Stress führen.

Zwei neu erschienene Publikationen [12,13] weisen jedoch darauf hin, dass eine Reduktion des PsbO-Proteins in *Solanum tuberosum* cv. Taedong valley zu einer höheren Knollenmenge und zu einer höheren Zuckerkonzentration in den Blättern führten. Die Pflanzen hatten nach Stressinduktion mit NaCl, ZnCl₂ und Mannitol einen höheren Chlorophyllgehalt in den Blättern, eine höhere Menge an Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inaktivieren und waren photosynthetisch aktiver. Zudem zeigten die Pflanzen unter den genannten Stresskonditionen ein besseres Wachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die eine normale Menge an PsbO-Protein bildeten. Der Autor konnte jedoch nicht den genauen Zusammenhang zwischen geringerer PsbO-Menge und besserer Stresstoleranz erklären. Diese Daten widersprechen der bisher angenommenen Hypothese, dass eine höhere Menge an PsbO-Protein zu einer höheren Stresstoleranz führt.

Diese Publikationen ergaben neue Impulse für dieses Projekt, die zurzeit umgesetzt werden. (siehe Punkt II 1.)

II.8 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Die in WPI und II erreichten Ergebnisse sind zur Publikation vorgesehen und dürfen daher durch den Projektträger nicht veröffentlicht werden.

Veröffentlichte Poster:

Approaches to increase plant biomass through optimization of net photosynthesis

Anja Katzel, Nanette Sievers, Christian Porsche, Nan Qu, Christoph Unger, Arne Schoor, Hendrik Schubert, Inge Broer

veröffentlicht auf folgenden Tagungen:

Botanikertagung in Tübingen, 30.9.-4.10.2013

Workshop "Molekulare Präzisionszüchtung" –Neue Horizonte und Anwendungen- 12.-13.09.2013, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben

Geplante Publikationen:

Es sind folgende Publikationen geplant:

Heterologous expression of PsbO in *Nicotiana tabacum*: Influence of the coding region, the transformation process and the environment on the stabilization of photosynthesis

Autoren: A. Katzel, H.-A. Thrun, A. Spitschak, J. Huckauf, C. Unger, K. Schmidt, C. Porsche, A. Schoor, H. Schubert, I. Broer

PSII/PSI activity, PsbO content and phenotype of transgenic tobacco over-expressing *psbO* - Environmental and methodical variance of repeated greenhouse cultivation.

Autoren: C. Porsche, A. Katzel, A. Schoor, K. Schmidt I. Broer, H. Schubert

Impact of a water deficiency gradient on PSII/PSI activity under varying conditions of photon flux density and photon dose for light treatments of tobacco leaves.

Autoren: S. Basler, C. Porsche, A. Katzel, A. Schoor, I. Broer, H. Schubert

Expression of the cyanobacterial FBP/SBPase leads to increase biomass in transgenic tobacco

Autoren: C.Unger, A. Katzel, K.Schmidt, I.Broer, J.Huckauf

II.9 Arbeiten nach Abschluss des Projektes

- 1 Vervollständigung der Daten, die in die Datenbank eingeflossen sind, also Bestimmung der PsbO-Mengen der gewonnenen Blattstanzen nach Lichtstress., sowie Speicherung und Auswertung der Daten des WP II (Biomassedaten und Enzymtest),(vergl. Bericht BioMath GmbH)
- 2 Durch die transiente Überexpression des an den Kodongebrauch von Pflanzen angepassten PsbO-Gens (Tel-PsbOopt) in *N. benthamiana* konnte zum ersten Mal die Translation des Proteins in Pflanzen gezeigt werden (vergl. II1.5.1).
- 3 In einer Bachelorarbeit (praktische Bearbeitungszeit ca. 1,5 Monate) wurden diese Tabakpflanzen (2), bezüglich ihrer ROS-Entstehung untersucht. Dazu wurde ein vorläufiges *in vitro*-Testverfahren entwickelt, mit welchem man ROS-Entstehung messen kann. Das Testsystem muss in weiteren Experimenten etwas verfeinert und sensitiver werden. (vergl. II 1.5.2).
- 4 Charakterisierung der stabil transformierten Tabakpflanzen, die mit dem an den Kodongebrauch von Pflanzen angepassten His markiertem PsbOopt-Gen transformiert wurden. Hierbei waren 16 der 27 getesteten auf DNA-Ebene positiv, der Transkriptnachweis war bisher bei 7 von 9 getesteten Pflanzen positiv. Bei den auf Transkriptebene positiv getesteten Pflanzen steht noch ein Nachweis der Translation aus. vergl II1.5.1
- 5 Ein PsbO-Gen aus *N. tabacum* konnte in *antisense*-Richtung amplifiziert werden, die Klonierung wurde bisher aber noch nicht abgeschlossen (vergl. II1.5.1).
- 6 In allen bisherigen Untersuchungen konnte kein Funktionsnachweis des optimierten psbO-Gens gezeigt werden. Das kann zum einen daran liegen, dass das transgenkodierte Protein nicht funktioniert, PsbO nicht der limitierende Faktor ist oder PsbO nur im Komplex mit anderen Proteinen stabil ist. Die Funktionalität des transgekodierten PsbO-Protein sollte sich aber in PsbO Mangelmutanten zeigen lassen. In einer *Arabidopsis* Mutantenbank wurden zwei Mutanten identifiziert, die durch die Integration einer T-DNA entweder im endogenen PsbO1-Gen oder PsbO2-Gen mutiert sind. Diese Mutationen führen zu PsbO Mangel und einem erkennbaren Phänotyp, der sich im Wesentlichen in einem reduzierten Wuchs äußert. Um den Mutanten-Phänotyp durch das Transgenkodierte PsbO zu komplementieren, wurden die zwei *Arabidopsis*-Mutanten mit einem PsbOopt-Konstrukt transformiert. Die Transformationsexperimente sind bereits abgeschlossen und einige Pflanzen konnten auf DNA Ebene für das *TelpsbOopt*-Gen positiv getestet werden. Derzeit befinden sich die Transformanten in der Samenproduktion. Gegen Ende März erfolgt eine Aussaat dieser Samen. Anschließend werden psbOopt-Gehalt, Phänotyp und die Biomasse der Nachkommen bestimmt. Wenn Kapazitäten zur Verfügung stehen, sollen auch ausgewählte Photosyntheseparameter bestimmt werden. So soll festgestellt werden, ob der stark reduzierte Wuchs der beiden Mutanten durch die Transformation aufgehoben werden kann (vergl. II1.5.2).
- 7 Durchführung eines Biomasseversuches im GWH mit Nachkommen der Events, die eine auffällige FBPase-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen zeigten (vergl. WPII).
- 8 Übergreifende statistische Auswertung der Daten aus beiden Arbeitspaketen: statistische Bewertung von Differenzen und Äquivalenzen sowie deren biologischer Relevanz mit dem Ziel der Publikation.

III. Erfolgskontrollbericht

III.1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Das Projekt „Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese“ ist Teil des Förderschwerpunkts „Züchtung zur Anpassung von Energiepflanzen an den Klimawandel“. Nach allen bisherigen Prognosen verursacht der Klimawandel vor allem Wetterextreme. Diese führen in der Landwirtschaft zu starken Ertragsverlusten die durch züchterische Verbesserung z.B. der Trockentoleranz oder der Wassertoleranz nur schwer auszugleichen sind da alle Extreme auftauchen und regional unterschiedlich sein können. Eine mögliche Strategie ist aber die generelle Verbesserung der Umweltstresstoleranz. Da sich alle Formen von Umweltstress primär auf die Photosynthese auswirken, war es Ziel des Projektes der umweltstress-bedingten Reduktion von Biomasse dadurch zu begegnen, dass 1. die Stresstoleranz der Photosynthese gesteigert wird, um eine gleichmäßige und von abiotischen Stressfaktoren unabhängige Energieversorgung der Pflanze zu gewährleisten und 2. die Effektivität des Calvinzyklus verbessert wird, um auf Basis der stabilen Energieerzeugung eine verstärkte Kohlenhydratproduktion zu erreichen. Die resultierenden Pflanzen sollten auch unter erhöhten Temperaturen und verringertem Wasserangebot gleichbleibende oder höhere energetisch verwertbare Biomasseerträge liefern.

III.2 Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens

1. Kodierbereiche aus Cyanobakterien (Tel und Syn) und Pflanzen (ARA) die für das Enzym PsbO aus dem Photosystem II kodieren, konnten erfolgreich in Tabak exprimiert werden. Das transgenkodierte Protein ließ sich aber nicht vom endogenen unterscheiden.
2. Der Gesamt-PsbO Gehalt der stabilen Transformanten war teilweise niedriger, teilweise höher als der der nah-isogenen Kontrolle (NIK). Die Behandlung mit unterschiedlichen abiotischen Stressoren wie Licht, Hitze, Schwermetallen oder Salz führte in den transgenen Pflanzen zu vergleichbaren Reaktionen wie in den NIK. In den obersten voll entfalten Blättern (Blatt 1) ließ sich aber im Median eine Erhöhung der PsbO-Mengen in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu den NIK nachweisen. Dies traf für das jeweils mittlere und untere untersuchte Blatt nicht mehr zu. Die PsbO-Menge unterschied sich jedoch im gestressten Blatt vom erholtten Blatt. Transient konnte das PsbO-Protein im Vergleich zur Leervektorkontrolle nicht eindeutig akkumuliert werden. Auf Grund der hohen Varianz zwischen den Individuen, Geweben und einzelnen Messungen ließ sich eine eindeutige Korrelation des PsbO-Gehalts mit der Reaktion auf die unterschiedlichen Stressoren über alle transgenen Events nicht nachweisen. Die Events Ara 9 und Ara 23 erwiesen sich jedoch photosynthetisch als auffällig.
3. Unterschiede in der Eignung der drei Transgene waren bisher nicht nachweisbar. Sequenz bedingte Silencingeffekte, die nur bei dem pflanzlichen Gen Ara auftauchen sollten, können daher ausgeschlossen werden. Die notwendige Fokussierung zur Untermauerung der Daten kann daher auf die Events Ara 9 und Ara 23 erfolgen.
4. Es konnte ein cyanobakterieller Kodierbereich, der für die FBP/SBPase-Funktion kodiert, erfolgreich in Pflanzen eingebracht werden. Es wurden Pflanzen mit erhöhter FBP/SBPase-Aktivität gefunden. Die transgenen Pflanzen wiesen eine erhöhte Biomasse auf, dies korrelierte aber nicht immer mit der Höhe der gemessenen FBPase-Aktivität.
5. Nach den bisherigen Ergebnissen kann die Expression der Transgene eher dann einen

Beitrag zur Erhöhung der Biomasse unter Stress leisten, wenn alternative Kompensationsprozesse zu Lasten der Biomasseproduktion begrenzt werden. Zum Nachweis der Aktivität ist dann die Einführung eines maßgeblichen Sinks in der Pflanze naheliegend. Diese könnten z.B. stabile Biopolymere sein.

Details siehe Abschlussbericht II.2

Die erreichten Nebenergebnisse

Zur Sicherung vergleichbarer Bedingungen für das photosynthetische Screening von Pflanzen unter Einschluss einer Lichtstressinduktion in unabhängigen Gewächshausversuchen wurden begleitend für nah-isogene Kontrollpflanzen 3 dimensionale Faktorenvariationen unter Einschluss der Wasserversorgung untersucht, so dass unerwünschte Effekte moderater bzw. irregulärer Varianz der Wasserversorgung von Einzelpflanzen im Gewächshaus durch Anpassung der Faktorenkombination Photonenflussdichte und Photonendosis im vergleichenden Screening minimiert werden können. Die Möglichkeiten der komplexen Analysen des Photosyntheseapparates mit Hilfe der simultanen Charakterisierung von PSII und PSI (DUAL-PAM, Walz) wurden mit Hilfe schrittweiser Optimierungen und komplexen Programmierungen soweit ausgeschöpft, dass dynamische Standardanalysen, Lichtstress-Screening und fortgeschrittene Parameter (Intersystem-Elektronenpool) standardisiert erfasst werden können, ohne Einzelpflanzen an wiederholten Tagen aus der diurnalen Rhythmik im Gewächshaus entfernen zu müssen. Die Screeningmethodik ist so als Alternative zum rein PSII-basierten Screening in Gewächshausversuchen mit moderatem Tagesdurchsatz von Pflanzen künftig in der Routine einsetzbar.

Die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Die PsbO-Mengen variierten in unterschiedlich alten Blättern, individuellen Pflanzen und auch in Abhängigkeit von den Anzuchsbedingungen. Dieser Variation muss bei den weiteren Versuchen Rechnung getragen werden. Der dadurch bedingte Probenumfang erzwingt eine Fokussierung auf wenige Events. Dies ist deshalb möglich, weil ein signifikanter Einfluss des verwendeten Transgens nicht erkennbar war. Auch die Ergebnisse der durchgeführten Western Blots zur Bestimmung der PsbO-Proteinmenge schwankten sehr stark, so dass es hilfreich erscheint, einen zusätzlichen Proteinstandard auf alle Proteingele aufzutragen, damit eine Bezugsgröße für die Werte vorhanden ist, ohne dass jedesmal Kontrollisolate mitgeführt werden müssen. Einige Pflanzen (Ara 9 und 23) erwiesen sich als photosynthetisch auffällig, so dass diese mit Hilfe von Langzeitlichtstress von mehreren Wochen untersucht werden könnten.

III.3 Fortschreibung des Verwertungsplans

Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten

Keine

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - z.B. auch funktionale/

wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)

Die bisher erreichten Erkenntnisse konnten noch keine eindeutige Korrelation zwischen abiotischem Stress und einer Modifikation der Photosyntheseproteine speziell PsbO aufzeigen. Von einer möglichen Anwendung sind die Resultate noch weit entfernt. Es müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um eine Anwendung ggf. möglich zu machen.

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z.B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u.a. einzubeziehen.

Das Projekt hat zu vielen neuen Erkenntnissen über die Variabilität der Photosynthese und ihrer Reaktion auf Umweltveränderungen geführt, die auch abseits der transgenen Pflanzen wissenschaftlich genutzt werden können, um Stressreaktionen besser analysieren zu können. Die extreme Instabilität von freiem PsbO, die eine wirkliche Stabilisierung der Photosynthese nur in Gegenwart der anderen PSII Proteine erlaubt, führte zu der Erkenntnis, dass ein starker Sink oder aber ein dauerhafter Stress notwendig sind, um Effekte der Expression der Transgenen in der Biomasseproduktion zu sehen. Dies wird zu einer weiteren Zusammenarbeit der Projektpartner führen. Andere Einrichtungen werden aber dafür vorerst nicht benötigt. Für die Einbeziehung von Firmen ist es ebenfalls zu früh.

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse

Es wurden bisher zwei photosynthetisch auffällige Events gefunden, die genauer untersucht werden sollen. Möglicherweise ist eine Überexpression eines der drei *psbO*-Gene aber nur dann sinnvoll, wenn in der Pflanze ein sehr starker Sink (z.B. die Produktion eines energieaufwändigen Speicherstoffs wie Stärke oder Cyanophycin) vorliegt. Es erscheint daher sinnvoll, die photosynthetisch auffälligen Events mit solch einer Pflanze zu kombinieren. Hierfür ist ein neuer Projektantrag geplant.

III.3.1 Ansätze zum Nachweis der Expression von rekombinantem PsbO in Pflanzen

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die *psbO*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* und den beiden Cyanobakterien trotz positivem Transkriptonachweis, wenn überhaupt nur zu sehr geringen PsbO-Protein-Anreicherungen in den Pflanzen führen. Die laut Antrag nicht geplante Strategie, ein synthetisches Gen auf Basis der Sequenz von *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 herzustellen, schien aus folgenden Gründen erfolgversprechend:

1. Sie erlaubt eine Fusion mit einem His-Tag, der über einen His-Tag-Antikörper die selektive Isolation von transgen kodiertem PsbO-Protein ermöglicht.
2. Proteine aus thermophilen Bakterien haben sich bisher als wesentlich stresstoleranter als pflanzliche Homologe erwiesen. Die DNA-Sequenz weicht aber so stark von der pflanzlichen Sequenz ab, dass dies der Grund dafür sein könnte, dass nur sehr wenig Protein translatiert werden kann und daher kein Protein detektiert werden konnte.
3. Die Anpassung des Codongebrauchs und des GC-Gehalts des Kodierbereichs in dem synthetischen Gen sollte sowohl die Translation als auch die Stabilität des Transkriptes in

der Pflanzenzelle erhöhen.

III.3.2 Neue Ansätze zur Untersuchung der Stresstoleranz

In den durchgeführten Stressversuchen konnte keine eindeutige Überlegenheit der modifizierten Tabakpflanzen im Vergleich zu den nah-isogenen Kontrollpflanzen nachgewiesen werden. Ein Erklärungsansatz könnte ein durch das zusätzlich exprimierte PsbO-Protein induzierter Elektronenstau zwischen den Photosystemen I und II sein, der dann zu höherem oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) führt. Hierzu werden zurzeit im Rahmen einer Bachelorarbeit Blattscheiben von transient exprimierenden Tabakpflanzen bezüglich der Entstehung von ROS untersucht.

Ein weiterer Ansatz, der zurzeit untersucht wird, ist die Frage, ob ein an den Kodongebrauch der Pflanzen angepasstes PsbO-Protein aus *T. elongatus* BP-1 die Translation dieses Proteins in Pflanzen erhöht und ob dieses die Funktion des endogenen *psbO*-Gens von Mangelmutanten der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ersetzen kann, so dass deren Phänotyp aufgrund des fehlenden PsbO-Proteins komplementiert wird.

III.3.3 Abschlussarbeiten:

Aus dem Projekt ging eine Staatsexamensarbeit mit dem Titel „Detektion von Umwelteinflüssen mittels Photosystem I/Photosystem II-PAM-Fluorometrie“ (S. Basler) der AGS hervor und zurzeit wird noch eine Bachelorarbeit mit dem Titel „Entwicklung neuer Detektionsparameter zur Analyse der Steigerung der Photosyntheseaktivität.“ (J-H Kröger) in der AGB angefertigt. Zudem sollen die Ergebnisse dieses Projektes Bestandteil einer Promotion der AGB sein.

III.3.4 Tagungsbeiträge:

Das Poster mit dem Titel “Approaches to increase plant biomass through optimization of net photosynthesis“

Anja Katzel, Nanette Sievers, Christian Porsche, Nan Qu, Christoph Unger, Arne Schoor, Hendrik Schubert, Inge Broer

Wurde auf folgenden Tagungen/Workshops vorgestellt:

Botanikertagung in Tübingen, 30.9.-4.10.2013

Workshop “Molekulare Präzisionszüchtung“ – Neue Horizonte und Anwendungen – 12.-13.09.2013, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben

III.3.5 Geplante Publikationen:

Es sind folgende Publikationen geplant:

Heterologous expression of PsbO in *Nicotiana tabacum*: Influence of the coding region, the transformation process and the environment on the stabilization of photosynthesis

Autoren: A. Katzel, H.-A. Thrun, A. Spitschak, J. Huckauf, C. Unger, C. Porsche, A. Schoor, Schubert, I. Broer

PSII/PSI activity, PsbO content and phenotype of transgenic tobacco over-expressing *psbO* - Environmental and methodical variance of repeated greenhouse cultivation.

Autoren: C. Porsche, A. Katzel, A. Schoor, I. Broer, H. Schubert

Impact of a water deficiency gradient on PSII/PSI activity under varying conditions of photon flux density and photon dose for light treatments of tobacco leaves.

Autoren: S. Basler, C. Porsche, A. Katzel, A. Schoor, I. Broer, H. Schubert

Expression of the cyanobacterial FBP/SBPase leads to increase biomass in transgenic tobacco

Autoren: C.Unger, A. Katzel, K.Schmidt, I.Broer, J.Huckauf

III.4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Es konnte keine signifikante Erhöhung des PsbO Gehalts und der Stresstoleranz erreicht werden.

III.5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die bisher erreichten Erkenntnisse sind noch weit von einer möglichen Anwendung entfernt.

III.6 Die Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Ausgabenplanung:

Der Kostenplan wurde eingehalten.

Zeitplanung: Zur Einhaltung der Zeitplanung siehe Schlussbericht Punkt I.3

IV. Kurzfassung

Projekttitle:

Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese

FKZ: 22020208

Projektbeschreibung: max. 2000 Zeichen

Thema des Projektes:

Nach allen bisherigen Prognosen verursacht der Klimawandel vor allem Wetterextreme. Diese führen in der Landwirtschaft zu starken Ertragsverlusten die durch züchterische Verbesserung z.B. der Trockentoleranz oder der Wassertoleranz nur schwer abzufangen sind, da alle Extreme auftauchen können. Eine mögliche Strategie ist aber die generelle Verbesserung der Umweltstresstoleranz. Da sich alle Formen von Umweltstress primär auf die Photosynthese auswirken, war es Ziel des Projektes, der umweltstress-bedingten Reduktion von Biomasse dadurch zu begegnen, dass 1. die Stresstoleranz der Photosynthese gesteigert wird, um eine gleichmäßige und von abiotischen Stressfaktoren unabhängige Energieversorgung der Pflanze zu gewährleisten und 2. die Effektivität des Calvinzyklus verbessert wird, um auf Basis der stabilen Energieerzeugung eine verstärkte Kohlenhydratproduktion zu erreichen. Die resultierenden Pflanzen sollten auch unter extremen Temperaturen oder Wasserangebot gleichbleibende oder höhere energetisch verwertbare Biomasseerträge liefern.

Arbeitsplan:

Die Stresstoleranz sollte durch die konstitutive Expression von Enzymen der Photosynthese und Kohlenhydratproduktion erreicht werden. Daher wurden Kodierbereiche aus Bakterien und Pflanzen mit pflanzenspezifischen Expressionssignalen fusioniert und in *Nicotiana tabacum* transient und konstitutiv exprimiert. Zur Verbesserung der Expression wurde der Kodierbereich eines bakteriellen Gens an den Kodongebrauch der Pflanze angepasst. Die Anwesenheit des jeweiligen Gens, seine Transkription und Translation wurde molekularbiologisch unter Normal- und unter Stressbedingungen gemessen. Die Analyse der abiotischen Stressfaktoren erfolgte mit Hilfe der Pulsamplitudenmodulationstechnik (PAM) und Chlorophyllmessungen.

Projektergebnisse:

1. Kodierbereiche aus Cyanobakterien (Tel und Syn) und Pflanzen (ARA) die für das Enzym PsbO aus dem Photosystem II kodieren, konnten erfolgreich in Tabak exprimiert werden. Das transgenkodierte Protein ließ sich aber nicht vom endogenen unterscheiden.
2. Der Gesamt-PsbO-Gehalt der stabilen Transformanten war teilweise niedriger, teilweise höher als der der nah-isogenen Kontrolle (NIC). Die Behandlung mit unterschiedlichen abiotischen Stressoren wie Licht, Hitze, Schwermetallen oder Salz führte in den transgenen Pflanzen zu vergleichbaren Reaktionen, wie in den NIC. Nur in den obersten voll entfalteten Blättern (Blatt 1) ließ sich im Median eine Erhöhung der PsbO-Mengen in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu den NIC nachweisen, nicht aber in den jeweils mittleren und unteren Blättern. Auch transient konnte das PsbO-Protein im Vergleich zur Leervektorkontrolle nicht eindeutig akkumuliert werden. Die PsbO-Menge unterschied sich jedoch im gestressten Blatt vom erhaltenen Blatt. Dennoch ließ sich auf Grund der hohen Varianz zwischen den Individuen, Geweben und einzelnen Messungen eine eindeutige Korrelation des PsbO Gehalts mit der Reaktion auf die unterschiedlichen Stressoren über alle transgenen Events nicht nachweisen. Die Events Ara 9 und Ara 23 erwiesen sich jedoch photosynthetisch als auffällig.
3. Unterschiede in der Eignung der drei Transgene waren bisher nicht nachweisbar.
4. Sequenz-bedingte Silencingeffekte, die nur bei dem pflanzlichen Gen Ara auftauchen sollten, können daher ausgeschlossen werden. Die notwendige Fokussierung zur Untermauerung der Daten kann daher auf die Events Ara 9 und Ara 23 erfolgen.
5. Es konnte ein cyanobakterieller Kodierbereich, der für die FBP/SBPase Funktion kodiert, erfolgreich in Pflanzen eingebracht werden. Es wurden Pflanzen mit erhöhter FBP/SBPase-Aktivität gefunden. Alle untersuchten transgenen Linien wiesen eine gegenüber der NIK erhöhte Biomasse auf. Eine eindeutige Korrelation zur Biomassebildung konnte aber bisher nicht festgestellt werden.
6. Nach den bisherigen Ergebnissen kann die Expression der Transgene eher dann einen Beitrag zur Erhöhung der Biomasse unter Stress leisten, wenn alternative Kompensationsprozesse zu Lasten der Biomasseproduktion begrenzt werden. Zum Nachweis der Aktivität ist dann die Einführung von Sinks in der Pflanze naheliegend. Diese könnten z.B. stabile Biopolymere sein.

Project title:

Biomass Augmentation Approaches through Optimization of Net Photosynthesis

Project number: 22020208

Project description:

Objectives of the project:

Climate change is supposed to cause weather extremes that lead to severe yield reductions in agriculture. One important mean to cope with this situation is the increase of stress tolerance in plants to insure sufficient production under extremely changing conditions. The first reaction of plants to environmental stress is the reduction of photosynthesis. Hence, it is the goal of this project to increase the stress tolerance and thereby biomass production in plants by the following means: 1) increasing the stress tolerance of the photosynthetic cycle in order to guarantee a consistent supply of energy, which is independent of abiotic stress factors, and 2) increasing the effectiveness of the Calvin Cycle in order to achieve stable energy production and, as a result, increased carbohydrate production under stress conditions. It is expected that the resulting plants will be able to deliver similar or higher yields of energetically useful biomass under extreme stress conditions compared to conventional varieties of the same crop.

Work plan:

In order to realize the increase in biomass, the photosynthetic performance and carbohydrate production will be thusly increased by the over expression of chimaric genes derived from plants or photosynthetic bacteria. The molecular characterization of the transgenic plants will done using biomolecular methods, and the subsequent abiotic stress factor analysis of the plants will be carried out with the help of PAM fluorometry and absorption measurements.

Project results: max. 2000 Zeichen

1. The coding regions isolated from Cyanobacteria (Tel and Syn) and plants (Ara) coding for the enzyme PsbO active in photosystem II could be expressed successfully in *Nicotiana tabacum*. The transgene encoded protein was undistinguishable from the endogenous PsbO.
2. In stable transformands, the total PsbO was sometimes lower sometimes higher than in the near isogenic control (NIC). Treatment with different abiotic stress factors like light, heat, heavy metal or salt led to similar reactions compared to the NIC. In the first fully expanded leaf (leaf 1), an increase in the median of PsbO content in transgenic plants compared to the NIC was detectable. This was not the case for leaves 2 and 3. But total amount of PsbO differed for leaves after light stress and recovery. In transient expression, no significant increase in PsbO content was detectable. The photosynthetic activity differed significantly in leaf one compared to leaves 2 and 3. Due to the high variance between individuals, tissues and single measurements a direct correlation between PsbO content and the reaction to different stressors was not detectable. Nevertheless, the events Ara 9 and Ara 23 differed in their reaction from the NIC.
3. No difference in the effectiveness of the different transgenes could be observed.
4. Hence sequence dependent silencing effects, that should only occur to the plant gene, can be excluded. Therefore, the focussing on the events Ara 9 and Ara 23 in order to substantiate the present data is feasible.
5. A cyanobacterial coding region, coding for a FBP/SBPase, was successfully expressed in *Nicotiana tabacum*. Plants with an increased FBP/SBPase activity were selected. All transgenic events showed increase biomass compared to the near isogenic control. Nevertheless, up to now no significant correlation between FBP/SBPase activity and biomass production was obvious.
6. According to the present data, the expression of the transgenes can only contribute to the increase in biomass under stress conditions when other compensation processes at the expense of biomass will be limited. In order to prove the activity it is therefore necessary to introduce a new sink into the plant. This might e.g. be a stable biopolymer.

IV.Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Schlussbericht Berichtsart
3a. Titel des Berichts Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese	
3b. Titel der Publikation	

4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Inge Broer, Hendrik Schubert, Arne Schoor, Christian Porsche, Anja Katzel	5. Abschlußdatum des Vorhabens 30.04.2014
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Abschlussbericht

8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Rostock Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät Prof. Broer (Agrobiotechnologie) Justus-von-Liebig-Weg 8 18059 Rostock	9. Ber.Nr. Durchführende Institution
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium Ernährung und Landwirtschaft (BMEL)	10. Förderkennzeichen *) 22020208
	11a. Seitenzahl Bericht 35
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben 15
	14. Tabellen 5
	15. Abbildungen 16

*) Auf das Förderkennzeichen des BMEL soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung: max. 2000 Zeichen Nach allen bisherigen Prognosen verursacht der Klimawandel vor allem Wetterextreme. Diese führen in der Landwirtschaft zu starken Ertragsverlusten die durch züchterische Verbesserung z.B. der Trockentoleranz oder der Wassertoleranz nur schwer abzufangen sind, da alle Extreme auftauchen können. Eine mögliche Strategie ist aber die generelle Verbesserung der Umweltstresstoleranz. Da sich alle Formen von Umweltstress primär auf die Photosynthese auswirken, war es Ziel des Projektes der umweltstress-bedingten Reduktion von Biomasse dadurch zu begegnen, dass 1. die Stresstoleranz der Photosynthese gesteigert wird, um eine gleichmäßige und von abiotischen Stressfaktoren unabhängige Energieversorgung der Pflanze zu gewährleisten und 2. die Effektivität des Calvinzyklus verbessert wird, um auf Basis der stabilen Energieerzeugung eine verstärkte Kohlenhydratproduktion zu erreichen. Die resultierenden Pflanzen sollten auch unter extremen Temperaturen oder Wasserangebot gleich bleibende oder höhere energetisch verwertbare Biomasserträge liefern. Kodierbereiche aus Cyanobakterien (Tel und Syn) und Pflanzen (ARA) die für das Enzym PsbO aus dem Photosystem II kodieren, konnten erfolgreich in Tabak exprimiert werden. Der Gesamt-PsbO-Gehalt der stabilen Transformanten war teilweise niedriger, teilweise höher als der der nah-isogenen Kontrolle (NIC). Die Behandlung mit unterschiedlichen abiotischen Stressoren wie Licht, Hitze, Schwermetallen oder Salz führte in den transgenen Pflanzen zu vergleichbaren Reaktion wie in den NIC. In den obersten voll entfalteten Blättern (Blatt 1) ließ sich im Median eine Erhöhung der PsbO-Mengen in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu der NIC nachweisen. Die PsbO-Menge unterschied sich zudem im gestressten Blatt von der im erholtten Blatt. Unterschiede in der Eignung der drei Transgene waren bisher nicht nachweisbar.	
19. Schlagwörter	
PsbO, Photosynthese, Biomasse, FBP/SBPase, abiotischer Stress, Photosystem II	
20. Verlag	21. Preis



Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese

Förderkennzeichen: 22020208

des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft

Abschlussbericht

BioMath GmbH

Schnickmannstraße 4

18055 Rostock

Germany

Telefon: +49 381 375661-10

Fax: +49 381 375661-18

Inhalt:

1	Aufgabenstellung	3
	Arbeitspaket 1:	3
	Arbeitspaket 2:	3
2	Datenmanagement	4
3	Mathematische Modellierung, Versuchsplanung und statistische Auswertung	6
	Mathematische Modellierung	6
	Allgemeines	6
	Arbeitspaket 1:	7
	Arbeitspaket 2:	9
	Versuchsplanung	10
	Statistische Auswertung	10
	Arbeitspaket 1:	10
	Arbeitspaket 2:	14
4	Arbeiten nach Projektende	16
5	Literaturverzeichnis	16

1 Aufgabenstellung

Das Hauptziel des Projektes war die Erhöhung der Biomasseproduktion in Pflanzen durch

1. die Steigerung der Stresstoleranz der Photosynthese und durch
2. die Verbesserung der Effektivität des Calvinzyklus.

Dazu wurden in den Versuchen die folgenden Tabakpflanzentypen verwendet:

Arbeitspaket 1:

- Wildtyp (WT)
- Leervektor (LV)
- gentechnisch veränderter (GV) Tabak mit PsbO kodierendem Gen aus *Arabidopsis thaliana* (Ara)
- gentechnisch veränderter (GV) Tabak mit PsbO kodierendem Gen aus *Synechocystis* PCC 6803 (Syn)
- gentechnisch veränderter (GV) Tabak mit PsbO kodierendem Gen aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Tel)

Arbeitspaket 2:

- Wildtyp (WT)
- Leervektor (LV)
- gentechnisch veränderter Tabak mit cyanobakteriellem *fbp1*-Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Slr)

Die Aufgabe der BioMath GmbH bestand darin

- eine Datenbank zu entwickeln in der die relevanten Versuchsergebnisse gespeichert werden
- die Verwaltung dieser Datenbank einschließlich der Datenaufbereitung und Qualitätskontrolle durchzuführen und
- für das Hauptziel die mathematische Modellierung, Versuchsplanung und statistische Auswertung durchzuführen

2 Datenmanagement

Für das Datenbankdesign wurde zunächst eine Anforderungsanalyse durchgeführt. Mit dieser Analyse wurden die folgenden essentiellen Sachverhalte konkretisiert:

- Was ist die Versuchseinheit?
- Welche Messgrößen charakterisieren die Biomasseproduktion?
- Welche Messgrößen stellen ein Maß für die Aktivität der Photosynthese/Calvinzyklus dar?
- Welche technische Realisierung ist geeignet?

Daraus abgeleitet wurden alle Datenbankvariablen (s.a. Modellierung) einschließlich des Variablentyps und weiterer Attributen wie Label und Indizes für Referenzen. Die eindeutige Identifikation der Versuchseinheit *Pflanze* erfolgte über den Pflanzencode (Variable PflCode).

Die Variablen für das Maß der Aktivität der Photosynthese/Calvinzyklus beruhen auf zeitliche Verlaufskurven. Aus den Parametern dieser Verlaufskurven wurde ein Set von Schlüsselvariablen definiert.

Das Datenbankdesign wurde in erste Normalform gebracht und physisch als MS-Access Datenbank implementiert. Das Frontend der Datenbank wurde als Windowsprogramm, dass mit Hilfe der Jet-Engine¹ auf die Access-Datenbank zugreift, entwickelt. Sowohl der Import von Messdaten als auch der Export von Daten in das Statistikprogramm SPSS erfolgt über eine ASCII-Schnittstelle.

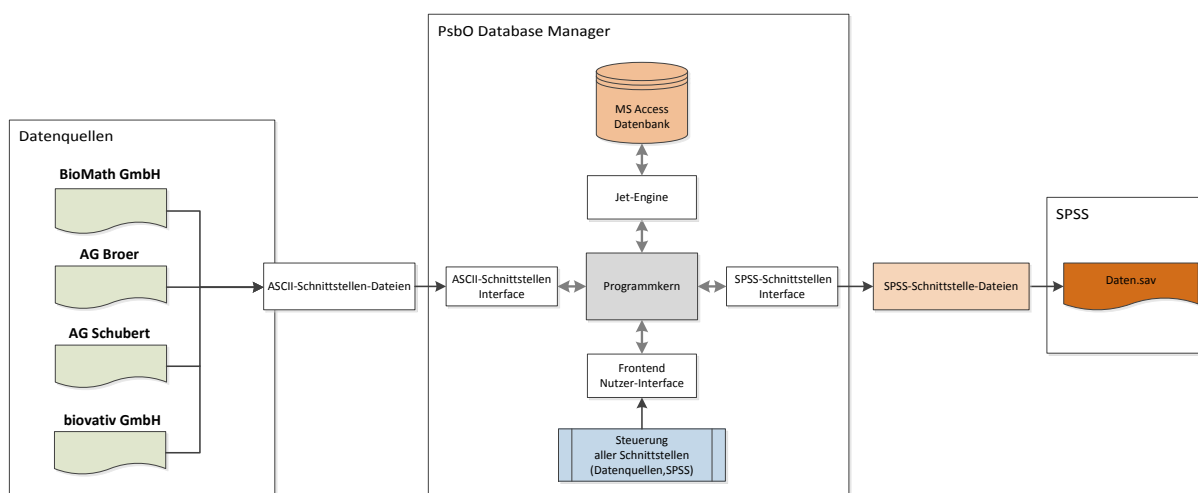
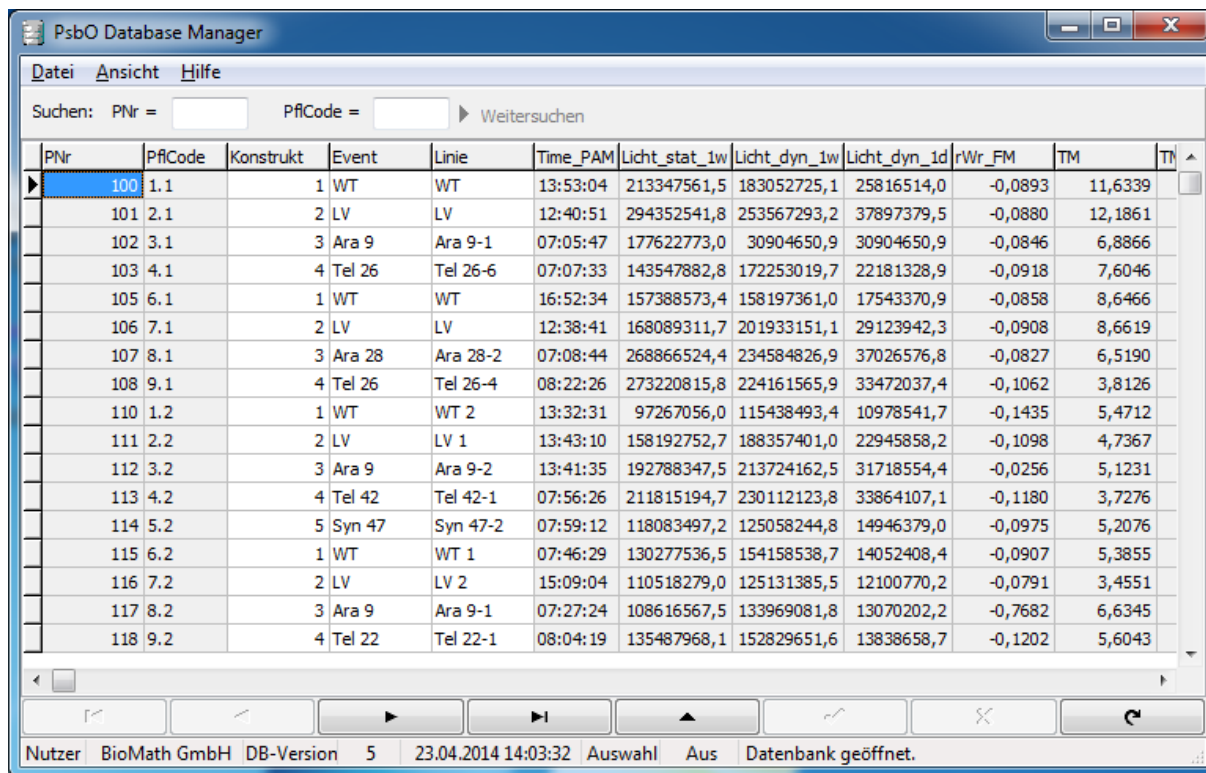


Abb 1 Technische Realisierung der PsbO-Datenbank

¹ Die Jet Engine ist im Betriebssystem Windows standardmäßig integriert und kann Access-Datenbanken, ohne explizite Lizenzierung von Microsoft Access, handeln.

Jede Arbeitsgruppe (Datenquelle) kann sich mit einem Identifier an das PsbO-Datenbank-System anmelden und seine spezifischen Daten pflegen. Weiterhin hat jeder Arbeitsgruppe lesenden Zugriff auf die Daten anderer Arbeitsgruppen.

Die PsbO-Datenbank wurde zentral bei der BioMath GmbH gehalten und über eine Web-Synchronisation mit den anderen Projektpartnern abgeglichen.



PNr	PfiCode	Konstrukt	Event	Linie	Time_PAM	Licht_stat_1w	Licht_dyn_1w	Licht_dyn_1d	rWr_FM	TM	TN
100	1.1	1	WT	WT	13:53:04	213347561,5	183052725,1	25816514,0	-0,0893	11,6339	
101	2.1	2	LV	LV	12:40:51	294352541,8	253567293,2	37897379,5	-0,0880	12,1861	
102	3.1	3	Ara 9	Ara 9-1	07:05:47	177622773,0	30904650,9	30904650,9	-0,0846	6,8866	
103	4.1	4	Tel 26	Tel 26-6	07:07:33	143547882,8	172253019,7	22181328,9	-0,0918	7,6046	
105	6.1	1	WT	WT	16:52:34	157388573,4	158197361,0	17543370,9	-0,0858	8,6466	
106	7.1	2	LV	LV	12:38:41	168089311,7	201933151,1	29123942,3	-0,0908	8,6619	
107	8.1	3	Ara 28	Ara 28-2	07:08:44	268866524,4	234584826,9	37026576,8	-0,0827	6,5190	
108	9.1	4	Tel 26	Tel 26-4	08:22:26	273220815,8	224161565,9	33472037,4	-0,1062	3,8126	
110	1.2	1	WT	WT 2	13:32:31	97267056,0	115438493,4	10978541,7	-0,1435	5,4712	
111	2.2	2	LV	LV 1	13:43:10	158192752,7	188357401,0	22945858,2	-0,1098	4,7367	
112	3.2	3	Ara 9	Ara 9-2	13:41:35	192788347,5	213724162,5	31718554,4	-0,0256	5,1231	
113	4.2	4	Tel 42	Tel 42-1	07:56:26	211815194,7	230112123,8	33864107,1	-0,1180	3,7276	
114	5.2	5	Syn 47	Syn 47-2	07:59:12	118083497,2	125058244,8	14946379,0	-0,0975	5,2076	
115	6.2	1	WT	WT 1	07:46:29	130277536,5	154158538,7	14052408,4	-0,0907	5,3855	
116	7.2	2	LV	LV 2	15:09:04	110518279,0	125131385,5	12100770,2	-0,0791	3,4551	
117	8.2	3	Ara 9	Ara 9-1	07:27:24	108616567,5	133969081,8	13070202,2	-0,7682	6,6345	
118	9.2	4	Tel 22	Tel 22-1	08:04:19	135487968,1	152829651,6	13838658,7	-0,1202	5,6043	

Nutzer BioMath GmbH DB-Version 5 23.04.2014 14:03:32 Auswahl Aus Datenbank geöffnet.

Abb 2 Frontend der PsbO-Datenbank

3 Mathematische Modellierung, Versuchsplanung und statistische Auswertung

Mathematische Modellierung

Allgemeines

Die Daten aus der Datenbank wurden zunächst deskriptiv beschrieben (Mittelwerte und Variabilität je Konstrukt) sowie grafisch dargestellt.

Aktuelle wissenschaftliche und regulatorische Entwicklungen zielen auf eine statistische Bewertung sowohl der Unterschiede als auch der Äquivalenz zwischen gentechnisch veränderten und konventionellen Referenzlinien hin (Kang und Vahl 2014; van der Voet, Hilko et al. 2011; Ward et al. 2012; Schmidt et al. 2015; European Food Safety Authority 2010). Wir folgen diesen Ansätzen, um die Über- oder Unterlegenheit (oder Gleichheit) der gentechnisch veränderten Pflanzen für alle gemessenen Merkmale mit ihrer biologischen Relevanz zusammen darzustellen:

Für die Modellierung wird ein lineares Modell verwendet (General Linear Model). Mit dem Modell werden Randmittelwerte (Estimated Marginal Means) für alle Stufen der Einflussfaktoren geschätzt. Mittelwertdifferenzen (= Stärken des Effekts der gentechnischen Veränderung) von Interesse sind:

Unterschiede zwischen gentechnisch veränderten und konventioneller Pflanze (also: WT - Ara, WT - Syn, WT - Tel und auch WT - LV bzw. WT - Slr) - s.u. Arbeitspaket 1 und 2

Diese Mittelwertdifferenzen werden auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

Außerdem werden die 95% Konfidenzintervalle für die Mittelwerte geschätzt.

Zur Beurteilung der biologischen Relevanz der Unterschiede zwischen Mittelwerten der Stufen eines Faktors wird geprüft, ob die Mittelwertdifferenzen (und ihre Konfidenzintervalle) sich innerhalb von Äquivalenzgrenzen bewegen. Äquivalenzgrenzen stellen die aus fachlicher Sicht festgelegten Schwellenwerte für biologisch relevante Unterschiede dar. Das Überschreiten von Äquivalenzgrenzen bedeutet also in diesem Projekt eine Bestätigung des Einflusses der gentechnischen Veränderung auf die Leistung der Pflanze (gemessen an Biomasse und Photosynthese Aktivität). Die Äquivalenzgrenzen können in positive (Leistungsverbesserung) oder negative (Leistungsverschlechterung) Richtung überschritten werden

Statistische Signifikanz und biologische Relevanz von Mittelwertunterschieden zwischen gentechnisch veränderten und konventionellen Pflanzen werden für alle Endpunkte eines jeden der vier Vergleiche von Interesse (s.o.) in einem Graphen dargestellt (Abb 3). Diese Darstellung erlaubt die visuelle Einschätzung der Leistungsänderung sowohl in Biomasse- als auch in Parametern der Photosyntheseleistung auf einen Blick.

Im einzelnen wird jeder Parameter mit seiner statistischen Signifikanz und biologischen Relevanz dargestellt). Die Punktschätzungen (Kreise) und die 95% Konfidenzintervalle (Balken) illustrieren die Effektstärke zwischen zwei Gruppen. Die vertikale schwarze Linie indiziert keinen Effekt (Verhältnis der Mittelwerte = 1), die vertikalen grauen Linien indizieren die Äquivalenzgrenzen (biologische Relevanz, hier $\pm 20\%$). Wenn die Konfidenzintervall-Balken die schwarze Linie kreuzen und innerhalb der grauen Linie liegen, bedeutet das: keine statistische Signifikanz und keine biologische Relevanz (Fall a). Zwei Gruppen sind unterscheiden sich statistisch signifikant, wenn die Konfidenzintervall-Balken die schwarze Linie nicht kreuzen (Fälle b, c). Der Unterschied zwischen zwei Mittelwerten wird als biologisch relevant angesehen, wenn die Konfidenzintervall-Balken außerhalb der Äquivalenzgrenzen liegen (Fall c). Fall b deutet auf statistische Signifikanz, aber keine klare biologische Relevanz hin. Fall d zeigt keine statistische Signifikanz, aber keine klare Negierung der biologischen Relevanz.

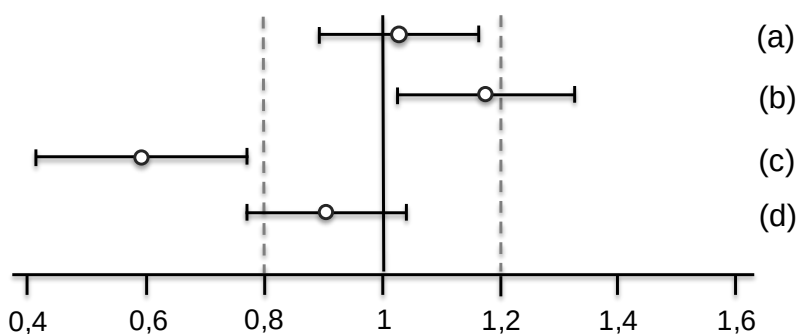


Abb 3 Vereinfachte Version einer Grafik zur visuellen Beurteilung von statistischer Signifikanz und biologischer Relevanz von Mittelwertvergleichen

Arbeitspaket 1:

Studienfaktoren:

Diese Faktoren stellen die Größen dar, deren Einfluss auf die Zielgrößen (in den Versuchen gemessene Endpunkte) modelliert werden soll. Anhand des Modelles wird dann ermittelt, wie groß der Einfluss ist und ob es zwischen den Stufen der Faktoren signifikante Unterschiede gibt.

Es war zum einen der Einfluss von PsbO (Faktor Konstrukt) und zum anderen der Einfluss von Stress (Stressfaktoren) auf die Biomasseproduktion und die Photosyntheseaktivität zu untersuchen.

Der Faktor Konstrukt ist ein qualitativer Faktor. Der Stressfaktor ist ein quantitativer Faktor, dessen Verlauf über den gesamten Messzeitraum (Lichtstressinduktion und Erholung) und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen natürlichen Bedingungen im Gewächshaus die Licht-, Induktionskurven ergibt, die dann wiederum auf akkumulierte Daten reduziert werden.

Faktor Konstrukt (fünf Stufen):

- Wildtyp (WT)
- Leervektor (LV)
- GV Tabak mit PsbO kodierendem Gen aus *Arabidopsis thaliana* (Ara)
- GV Tabak mit PsbO kodierendem Gen aus *Synechocystis* PCC 6803 (Syn)
- GV Tabak mit PsbO kodierendem Gen aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Tel)

Stressfaktor (drei Modelle):

- Licht.stat.1w - akkumulierte LUX Daten über 7 Tage vor der jeweiligen Ernte
- Licht.dyn.1w - akkumulierte LUX Daten über 7 Tage vor der jeweiligen Dual-PAM Messung
- Licht.dyn.1d - akkumulierte LUX Daten über 1 Tag vor der jeweiligen Dual-PAM Messung

Messgrößen (Endpunkte):

Inhaltsstoffe

- Gehalt an PsbO über Pixelmessungen (Pixelzahl als Maß der Bandenfläche und damit des PsbO Gehaltes)
- Gesamtproteingehalt in der Probe [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
- Chlorophyll A Gehalt je cm^2 Blattfläche [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

An phänotypische Variablen (zur Bewertung der **Biomasse**) wurden weiterhin gemessen:

- Trockenmasse [g]
- relative Wachstumsrate der Pflanzen in Bezug zur Frischmasse [d^{-1}]
- Verhältnis der Trockenmasse Sprosse zu Wurzel []

Photosynthese Aktivität: Die Schlüsselvariablen der Photosynthese Aktivität waren:

- PSI-II Emissionsverhältnis bei 77K (734nm/688nm) und 440nm Anregung
- Lichtsättigungspunkt in Bezug zum PS I nach Dunkeladaption
- Lichtsättigungspunkt in Bezug zum PS II nach Dunkeladaption
- Yield am PS I - Initialwert (dunkel) = 0
- Yield am PS I - Anstieg zu Beginn der Lichtstressphase
- Yield am PS II - Initialwert (dunkel) = 0
- Yield am PS II - Anstieg zu Beginn der Lichtstressphase
- nicht-photochemisches quenching Lichtphase - Anstieg in der Initialphase zu Beginn der Bestrahlung

- nicht-photochemisches quenching Erholungsphase - Anstieg in der Initialphase zu Beginn der Erholung

Die statistischen Fragestellungen zum Hauptziel des Projektes waren also (Abb 4):

- Haben die GV Tabakpflanzen einen erhöhten PsbO Gehalt? Wie ist die Variabilität zwischen den Konstrukten und den Events?
- Korreliert der PsbO Gehalt mit einer erhöhten Photosynthese Aktivität und Biomasse Produktion unter Stress?

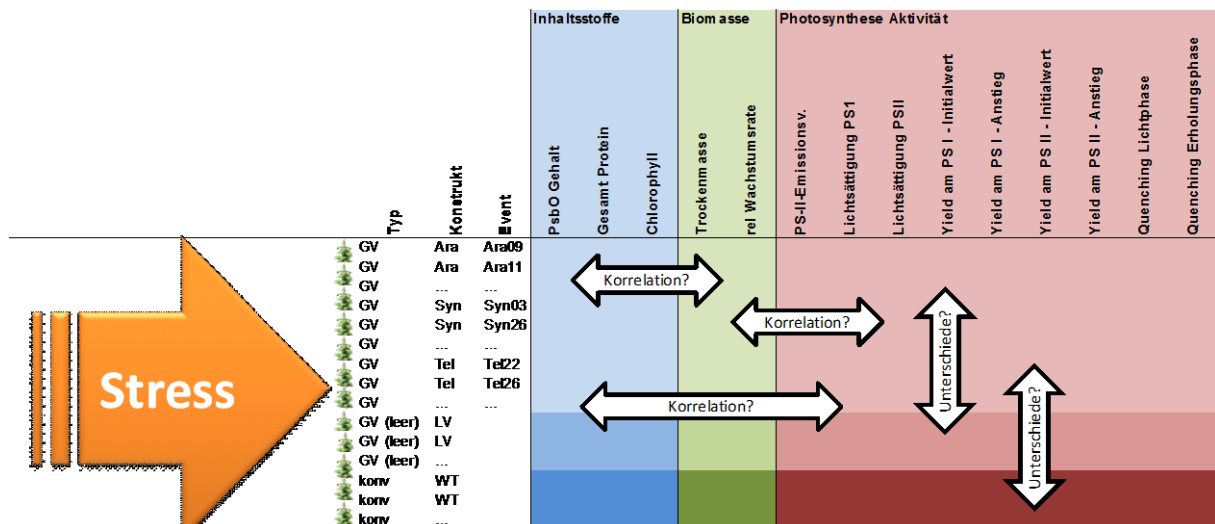


Abb 4 Schema der statistischen Fragestellungen im Arbeitspaket 1

Modell:

Die Versuchsfrage: hat die gentechnische Veränderung (also die zusätzliche Produktion von PsbO) einen positiven Einfluss auf die Leistung der Pflanzen? wird für die einzelnen Endpunkte also wie folgt modelliert: Endpunkt = Funktion(Konstrukt, Stressfaktor)

Arbeitspaket 2:

Studienfaktoren:

Faktor Konstrukt (fünf Stufen):

- Wildtyp (WT)
- Leervektor (LV)
- GV Tabak mit cyanobakteriellem *fbp1*-Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Slr)

Messgrößen (Endpunkte):

Phänotypische Variablen (zur Bewertung der **Biomasse**)

- Blattlänge [cm]

- Blattbreite [cm]
- Größe der Pflanzen [cm]
- Internodienlänge [cm]
- Frischmasse [g]
- Trockenmasse [g]

Die statistischen Fragestellungen zum Hauptziel des Projektes waren also (Abb 5):

- Haben die GV Tabakpflanzen einen erhöhten FPBase Aktivität? Wie ist die Variabilität zwischen den Events?
- Korreliert die FPBase Aktivität einer erhöhten Biomasse Produktion?

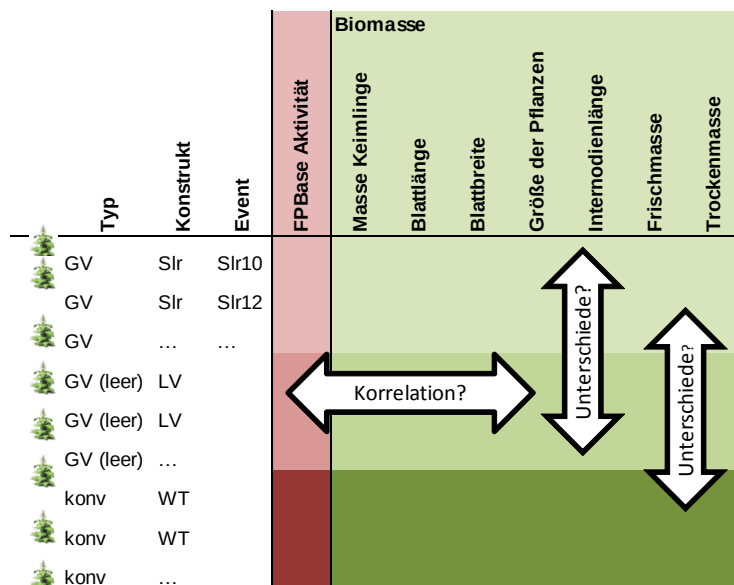


Abb 5 Schema der statistischen Fragestellungen im Arbeitspaket 2

Versuchsplanung

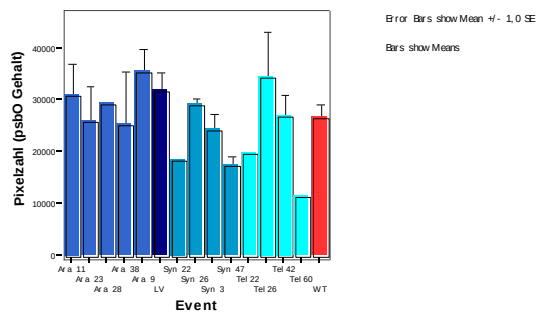
Für den Nachweis, dass die Stresstoleranz wenigstens eines Events größer ist als bei der nah isogenen Kontrolle wurde die Versuchsplanung durchgeführt. Das Ergebnis war ein vollständig randomisiertes Blockdesign mit 16 Wiederholungen je Event und 16 Wiederholungen der nah isogenen Kontrolle (Anhang 1).

Statistische Auswertung

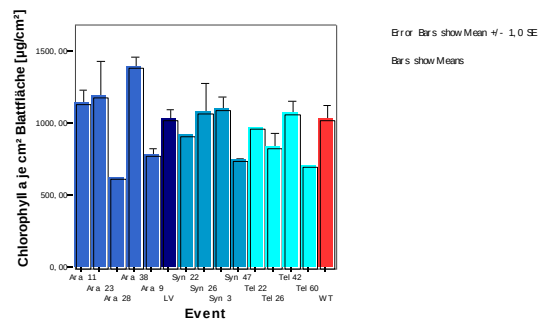
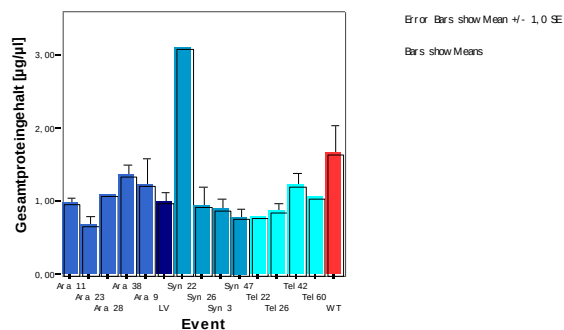
Arbeitspaket 1:

Inhaltsstoffe

Die deskriptive Auswertung der Daten zeigte keine Steigerung des PsbO Gehaltes in den GV Tabakpflanzen und starke Schwankungen zwischen den Konstrukten und Events:

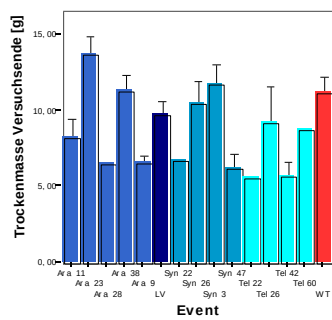


Der Gesamtproteingehalt zeigt sich relativ gleich über alle Konstrukte und geringer als im konventionellen Tabak (mit einer Ausnahme)

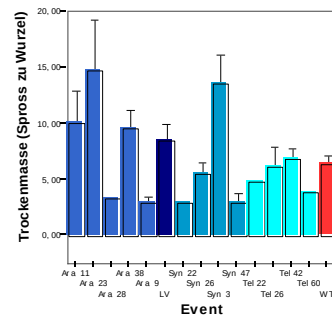


Biomasse

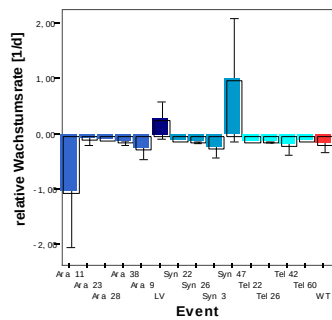
Auch in den Biomasse-Merkmalen zeigen sich starke Variabilitäten. Ein Unterschied zwischen GV und konventionelle Pflanzen ist nicht erkennbar. Die negativen Wachstumsraten ergeben sich aus der Verwendung der Frischmasse als Bezugsparameter. Während der Photosynthesemessung tritt starker Feuchtigkeitsverlust auf, der zum Zeitpunkt der Frischmassebestimmung noch nicht durch Rehydrierung ausgeglichen ist; eine Verwendung von Trockenmasse als Bezugsparameter ist nicht möglich, da es eine destruktive Methode darstellt.



Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



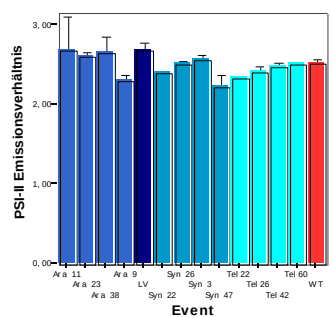
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



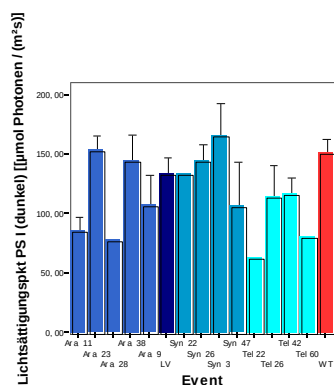
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means

Photosynthese Aktivität

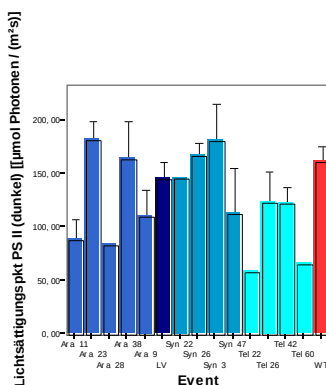
Ebenso in den Photosynthese-Merkmalen zeigen sich starke Variabilitäten. Ein Unterschied zwischen GV und konventionelle Pflanzen ist nicht erkennbar.



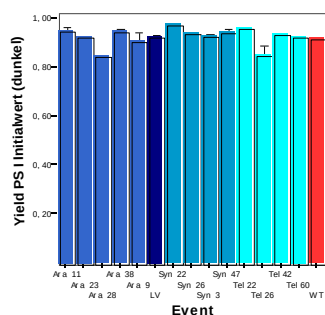
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



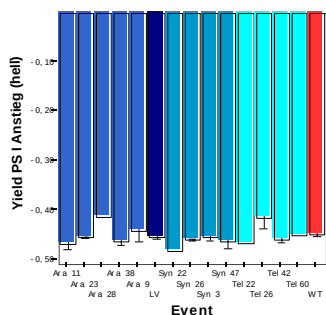
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



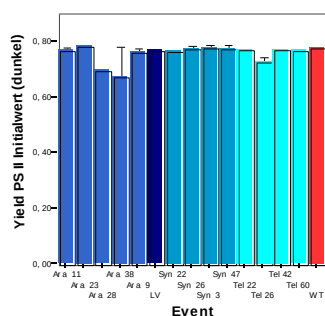
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



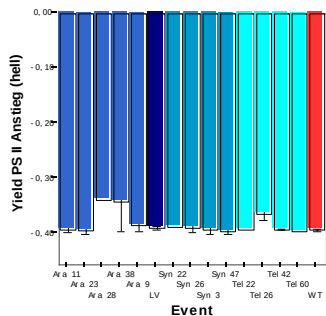
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



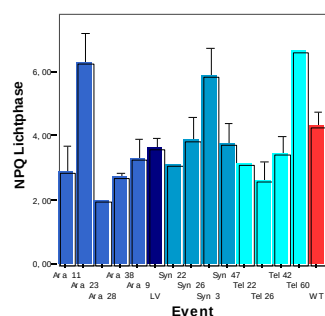
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



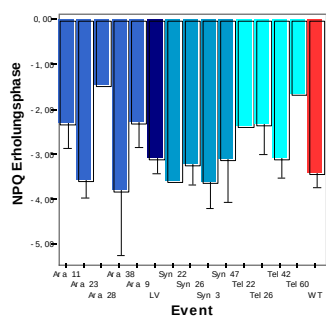
Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means



Error Bars show Mean $\pm$ 1.0 SE
Bars show Means

Arbeitspaket 2:

Die Rohdaten des FPBasetest mussten zunächst verarbeitet werden, um die realen Messwerte der FPBase Aktivität zu erlangen und die Endpunkte vergleichen zu können.

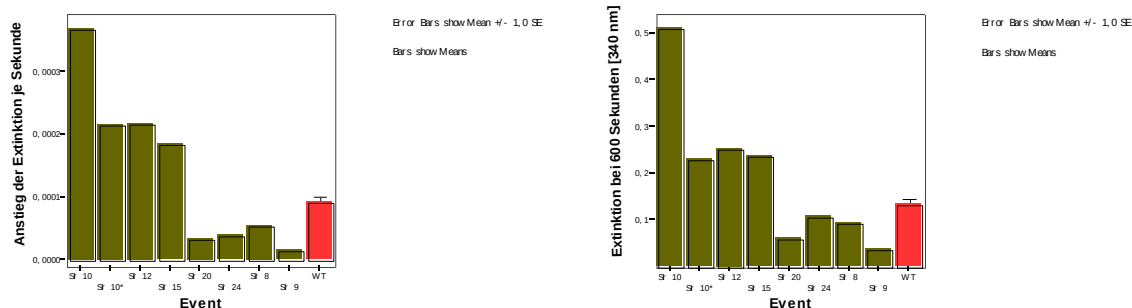
(Dazu siehe auch den Auswertungsbericht vom 11.12.2012, Anhang 2.)

Mit dem FPBasetest sollte festgestellt werden, welche transgene Tabaklinie eine höhere Enzymaktivität als die nah isogene Kontrolle hat. Dazu wurde die Enzymaktivität von Blattproben gemessen. Die Messungen erfolgten auf einer Wellplatte durch die Bestimmung der Extinktionen an drei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten. Bei den Messungen mussten die Zeitpunkte des Pipettierens mit berücksichtigt werden.

Der zeitliche Verlauf der Extinktionen je Kavität der Wellplatte wurde durch einen Regressionsfunktion modelliert. Der Anstieg dieser Regressionsfunktion charakterisiert die normierte Geschwindigkeit mit der die Enzymreaktion innerhalb von 15 Minuten fortschreitet.

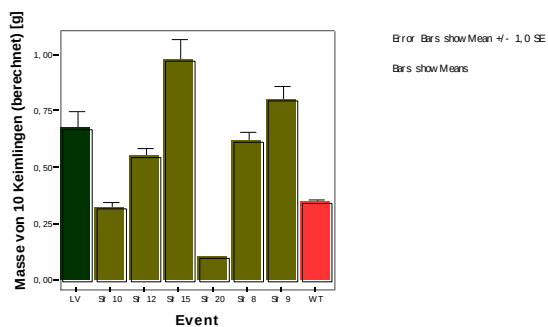
FPBase Aktivität

Die PSBase Aktivität war gegenüber der konventionellen Sorte bei den Events 10, 10*, 12 und 15 deutlich gesteigert, bei den Events 20, 24, 8 und 9 erniedrigt. In den Grafiken dargestellt sind Anstieg und Endwert (nach 15 Minuten) der linearen Regression der Extinktionswerte (s.o).

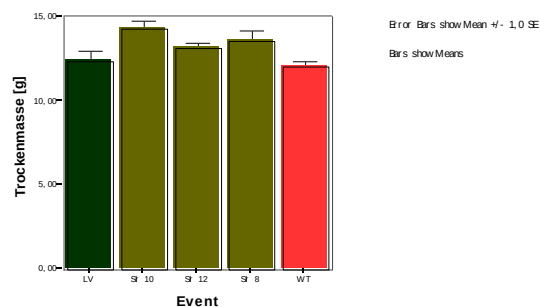
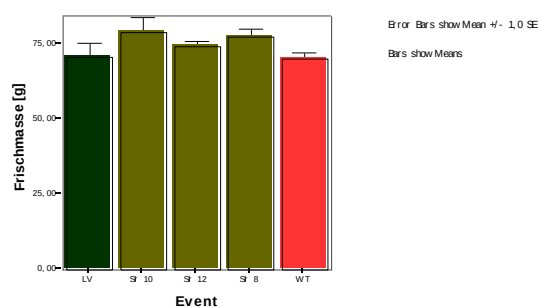
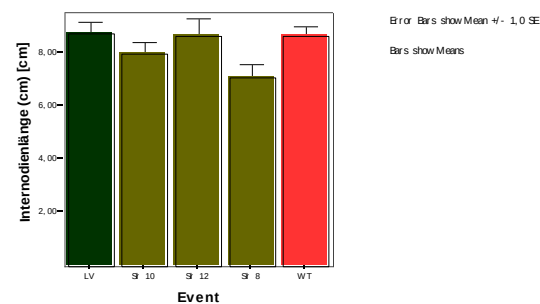
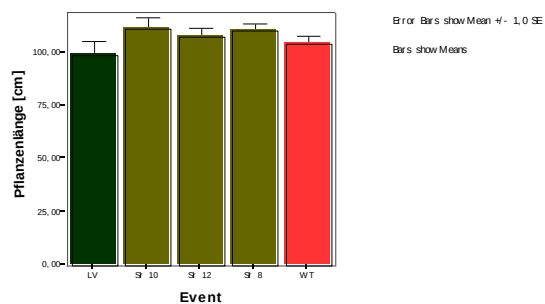
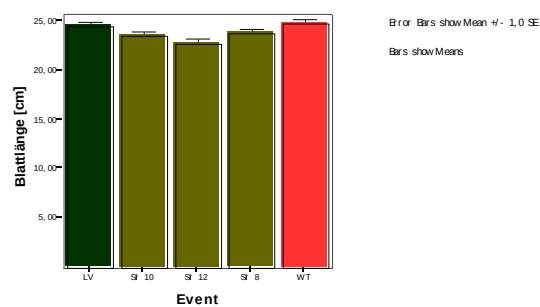
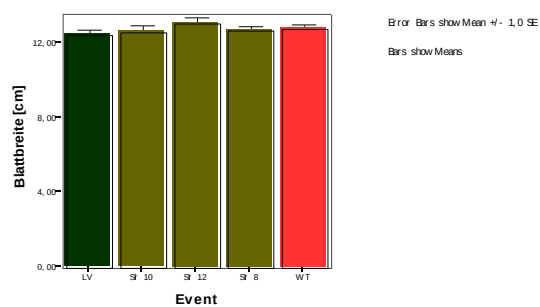


Biomasse

Zur Biomasse Bestimmung wurde die Masse von Keimlingen bestimmt. Die durchschnittliche Masse von 10 Keimlingen war Events 8, 9, 12 und 15, aber auch bei der LV Linie gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht.



Weiterhin wurden die Merkmale Blattlänge, Blattbreite, Pflanzenhöhe, Internodienlänge, Frisch- und Trockenmasse von Gewächshauspflanzen bestimmt. Bei Pflanzen mit Event S'r 8, 10 und 12 waren Größe und Masse gegenüber Wildtyp und Leervektor leicht erhöht.



4 Arbeiten nach Projektende

Mit allen in der Datenbank enthaltenen Messergebnissen wertet die BioMath GmbH die Daten für die geplanten Veröffentlichungen zusammenfassend über die oben beschriebene Modellierung für eine Publikation auch nach Projektende statistisch aus.

5 Literaturverzeichnis

European Food Safety Authority (2010): Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. In: *EFSA Journal* 8 (1), S. 1250. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1250.

Kang, Qing; Vahl, Christopher I. (2014): Statistical Analysis in the Safety Evaluation of Genetically-Modified Crops: Equivalence Tests. In: *Crop Science* 54 (5), S. 2183. DOI: 10.2135/cropsci2014.01.0011.

Schmidt, Kerstin; Schmidtke, Jörg; Kohl, Christian; Wilhelm, Ralf; Schiemann, Joachim; van der Voet, Hilko; Steinberg, Pablo (2015): Enhancing the interpretation of statistical P values in toxicology studies: implementation of linear mixed models (LMMs) and standardized effect sizes (SESS). In: *Archives of toxicology*. DOI: 10.1007/s00204-015-1487-8.

van der Voet, Hilko; Perry, Joe N.; Amzal, Billy; Paoletti, Claudia (2011): A statistical assessment of differences and equivalences between genetically modified and reference plant varieties. In: *BMC biotechnology* 11, S. 15. DOI: 10.1186/1472-6750-11-15.

Ward, Keith J.; Nemeth, Margaret A.; Brownie, Cavell; Hong, Bonnie; Herman, Rod A.; Oberdoerfer, Regina (2012): Comments on the paper "A statistical assessment of differences and equivalences between genetically modified and reference plant varieties" by van der Voet et al. 2011. In: *BMC biotechnology* 12, S. 13. DOI: 10.1186/1472-6750-12-13.

Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese

Ein Ziel zur Erhöhung der Biomasseproduktion von Tabak ist die Steigerung der Stresstoleranz der Photosynthese. Dazu wurden Tabakpflanzen gentechnisch verändert.

In den Versuchen werden an Einzelpflanzen Parameter der Biomasse und der Photosynthese gemessen. Aus den Parametern der Photosynthese wird dann die Stresstoleranz berechnet.

Versuchsplanung GWH

Im GWH-Versuch ist geplant Pflanzen der Events Ara, Syn, Tel und Lh9000 sowie der nah isogenen Kontrolle SR1 einzubeziehen. Es soll nachgewiesen werden, dass die Stresstoleranz wenigstens eines Events größer ist als bei der nah isogenen Kontrolle.

Somit ist die folgende Hypothese zu testen:

$$H_o : \Theta_{transgen} = \Theta_{niv} \quad \text{gegen} \quad H_A : \Theta_{transgen} > \Theta_{niv} \quad \text{mit}$$

$\Theta_{transgen}$ Parameter der Stresstoleranz eines Events und

Θ_{niv} Parameter der Stresstoleranz der nah isogenen Kontrolle

Für die Bestimmung eines optimalen Stichprobenumfanges sind für den Parameter Stresstoleranz keine Vorinformationen bekannt. Es wird vorausgesetzt, dass

1. alle bekannten Einflussfaktoren konstant sind
2. der Parameter der Stresstoleranz normalverteilt ist und
3. mindestens eine Differenz von 90% der biologischen Variabilität des Parameters Stresstoleranz nachgewiesen werden soll.

Damit ergibt sich bei einem Risiko ersten Art von 0.05^1 , einem Risiko zweiter Art von 0.2^2 und einer nachweisbaren Mindestdifferenz von 0.9 ein Stichprobenumfang von $N=16^3$.

Es sind je Event und Kontrolle 16 Pflanzen zu untersuchen.

Als Versuchsanlage ist eine vollständig randomisierte Anlage zu wählen. Sind Störfaktoren z.B. unterschiedliche Tische oder Kabinen auszuschalten ist eine Blockanlage zu verwenden.

¹ Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese fälschlich abzulehnen

² Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese fälschlich anzunehmen

³ CADEMO, Modul Mittelwerte, Version 3.20

Auswahl: zwei Mittelwerte einer Normalverteilung testen, unabhängige Stichproben, gleiche Varianzen, einseitiger Test

Anhang A

Optimaler Stichprobenumfang für den einseitigen Test zweier Mittelwerte bei unabhängigen, normalverteilten Stichproben mit gleichen Varianzen und den Parametern:

$\alpha = 0.05$	Risiko erster Art
$\beta = 0.2$	Risiko zweiter Art
$\sigma^2 = 1$	Varianz

Mindestdifferenz d	Stichprobenumfang N
1.3147	8
1.2306	9
1.1610	10
1.1021	11
1.0514	12
1.0071	13
0.9681	14
0.9332	15
0.9019	16
0.8736	17
0.8477	18
0.8241	19
0.8023	20



Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese

**Statistische Auswertung
FBPasetest - 2012**

**Version 1.1
11. Dezember 2012**

BioMath GmbH
Thünenplatz 1
18190 Groß Lüsewitz
Germany

Büro:
Schnickmannstraße 4
18055 Rostock

Telefon: +49 381 375661-10
Fax: +49 381 375661-18

Inhalt:

1	Daten.....	3
2	Ziel des Versuches	3
3	Versuchsdesign	3
4	Mathematisches Modell	4
5	Auswertung.....	5
	Berechnung der Zielgrößen	5
	Vergleich der Zielgrößen bezüglich des Normalbereiches.....	10
6	Rohdatenlisting	11

1 Daten

Daten: 1.12.2012 FBPasetest + Bradford.xls (E-Mail vom 7.12.2012)

Pflanzenart: Tabak

Linien: NiK 1 - 10, Slr 1, Slr 7, Slr 8, Slr 9, Slr 10*, Slr 10, Slr 12, Slr 15, Slr 20, Slr 24

Messwerte: Extinktionen bei 340 nm

2 Ziel des Versuches

Es soll mit dem FBPasetest festgestellt werden welche transgenen Tabaklinien (Slr) eine höhere Enzymaktivität als die nah isogone Kontrolle (NiK) zeigen.

3 Versuchsdesign

Die Versuchseinheit ist die Tabakpflanze. Die zu analysierenden Proben werden aus dem Blatt der Pflanze gewonnen. Für den FBPasetest wurden 10 verschiedene NiK-Pflanzen und je transgene Tabaklinie eine Pflanze beprobt.

Für den FBPasetest wurden auf einer Wellplatte je 3 Wiederholungen des Puffers, jeder nah isogenen Kontrolle und jeder transgene Linie aufgebracht (Tab 1).

Tab 1: Belegung der Wellplatte (Linie, Wiederholung)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	NiK 8 1	NiK 8 2	NiK 8 3	Slr10 1	Slr10 2	Slr10 3
B	NiK 1 1	NiK 1 2	NiK 1 3	NiK 9 1	NiK 8 2	NiK 8 3	Slr 12 1	Slr 12 2	Slr 12 3
C	NiK 2 1	NiK 2 2	NiK 2 3	NiK 10 1	NiK 8 2	NiK 8 3	Slr 15 1	Slr 15 2	Slr 15 3
D	NiK 3 1	NiK 3 2	NiK 3 3	Slr 1 1	Slr 1 2	Slr 1 3	Slr 20 1	Slr 20 2	Slr 20 3
E	NiK 4 1	NiK 4 2	NiK 4 3	Slr 7 1	Slr 7 2	Slr 7 3	Slr 24 1	Slr 24 2	Slr 24 3
F	NiK 5 1	NiK 5 2	NiK 5 3	Slr8 1	Slr8 2	Slr8 3			
G	NiK 6 1	NiK 6 2	NiK 6 3	Slr9 1	Slr9 2	Slr9 3			
H	NiK 7 1	NiK 7 2	NiK 7 3	Slr10* 1	Slr10* 2	Slr10* 3			

Das Pipetieren erfolgte in der Reihenfolge A1, A2, A3, B1, B2, B3,..., A4, A5, A6, B4,B5, B6,..., E7, E8, E9.

Danach wurden die Extinktionen bei 340 nm zu den Zeitpunkten 0, 300, 600 und 900 Sekunden gemessen.

Die nachzuweisende Enzymreaktion begann in einer Kavität sofort nach dem Pipetieren. Für den gesamten Pipetiervorgang wurden 243 Sekunden benötigt.

4 Mathematisches Modell

Die zeitliche Entwicklung der Extinktion in jeder Kavität wird als linear angenommen und durch die folgende Regressionsfunktion beschrieben:

$$Extinktion_{340nm}(t) = b_0 \cdot t + b_1 + \varepsilon$$

Der Parameter b_0 ist der Anstieg der Regressionsfunktion und charakterisiert die normierte Geschwindigkeit mit der die Enzymreaktion fortschreitet. Der Parameter b_1 ist der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse und beschreibt die Extinktion zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Variable ε stellt die Zufallsabweichung dar.

Der Vergleich der Enzymaktivität erfolgt einerseits mit dem normierten Parameter b_0 und andererseits mit der berechneten Extinktion zum Zeitpunkt $t = 900$.

Dazu wird aus den Proben der nah isogenen Kontrolle das 95%-Konfidenzintervall der jeweiligen Zielgröße berechnet und als "Normalbereich" betrachtet. D.h. dieses Intervall repräsentiert sowohl die biologische als auch die messtechnische Variabilität. Vergleichend bezüglich dieses Normalbereiches werden die 95%-Konfidenzintervalle der Messwiederholungen jeder transgenen Linie dagegengestellt.

5 Auswertung

Berechnung der Zielgrößen

Im ersten Schritt wurden die Messzeitpunkte t_i in Bezug zur Dauer des Pipiertivorganges adjustiert.

$$t_i = t_i + 243 \left((i-1) \frac{243}{69} \right) \text{ mit } i = 1, \dots, 69$$

Im zweiten Schritt wurden von den gemessenen Extinktionswerten der Mittelwert der Extinktionen des Puffers (=0.1341) abgezogen.

Im dritten Schritt wurden für jede Kavität die Regressionsparameter und das Bestimmtheitsmaß R^2 für die adjustierten Messzeitpunkte und Extinktionswerten berechnet.

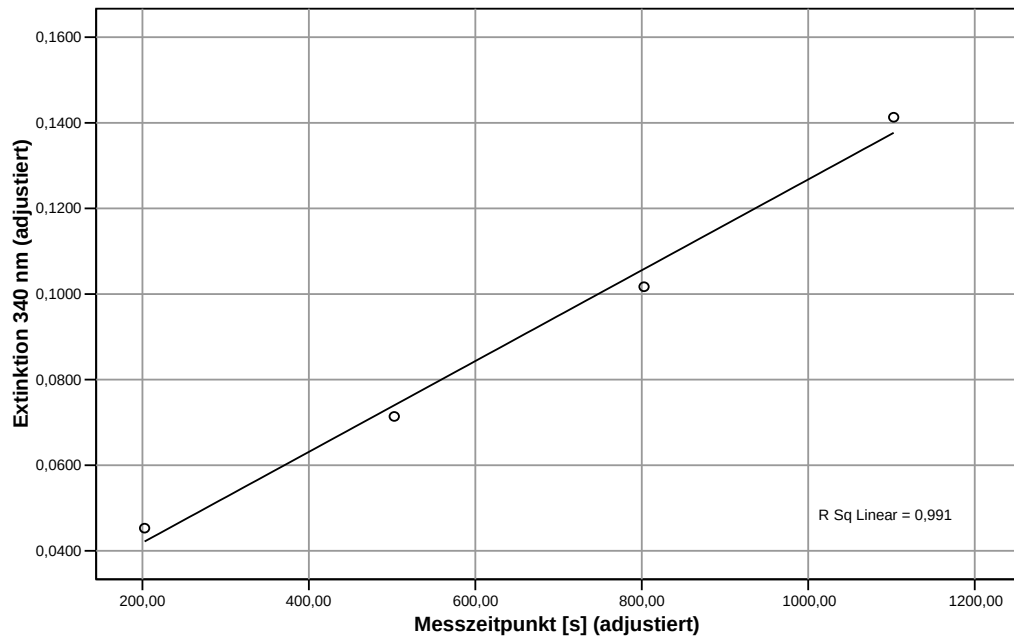


Abb 1: Beispiel der Regression für die Probe NiK 4 Wiederholung 1

Im letzten Schritt wurden mit Hilfe der Regressionsparameter die Extinktionswerte zum Zeitpunkt $t = 900$ berechnet.

Die Bestimmtheitsmaße sind für die Proben 12 (Slr 1) und 13 (Slr 7) deutlich kleiner als 0.6, d.h. ein linearer Zusammenhang ist hier nicht gegeben. Von der weiteren Auswertung wurden diese Proben ausgeschlossen.

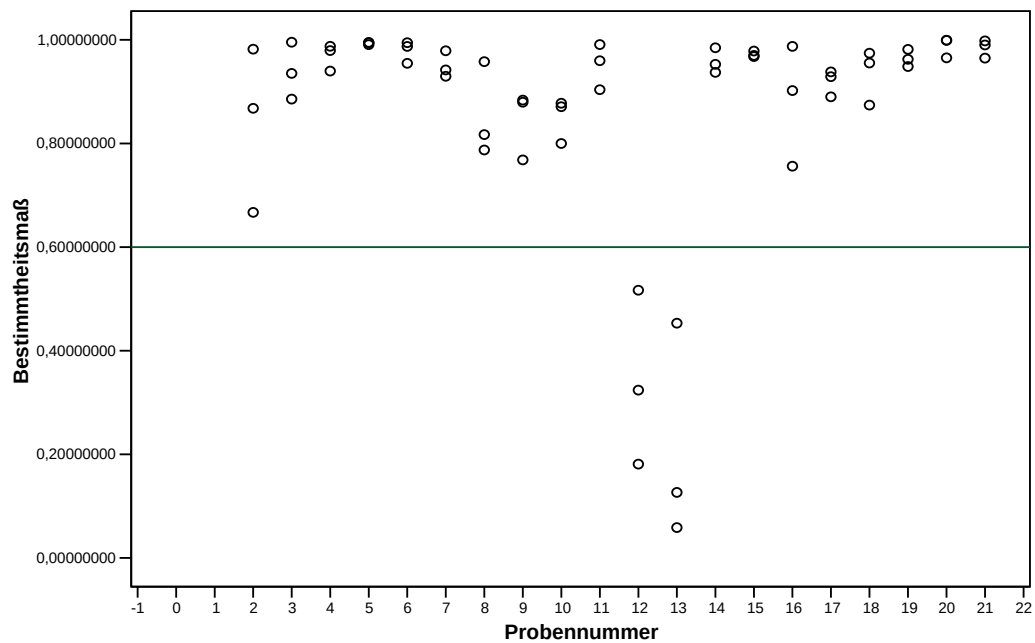


Abb 2: Anpassungsgüte der Regression

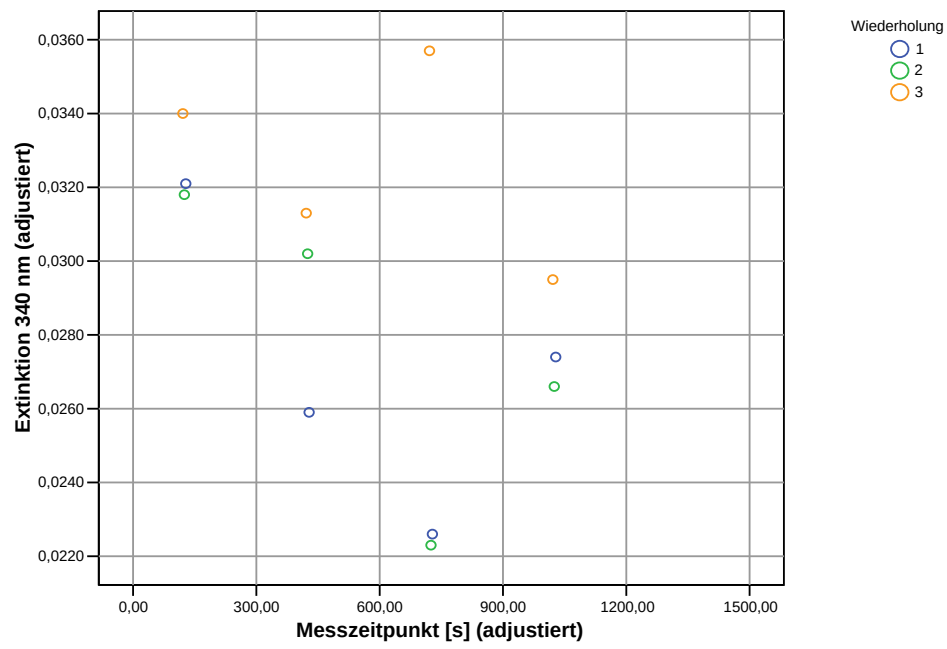


Abb 3: Probe 12 / Slr 1

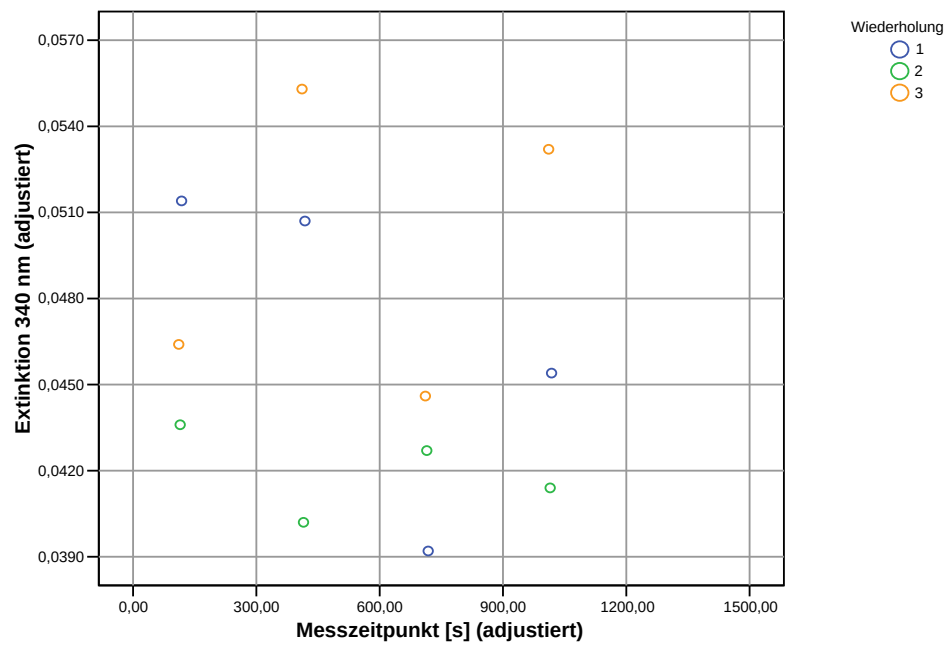


Abb 4: Probe 13 / Slr 7

Tab 1: Zielgrößen der nah isogenen Kontrolle

		N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Anstieg	NiK 1	3	,0001512200	,00002501776	,0000890724	,0002133676
	NiK 2	3	,0001084900	,00005969572	-,0000398024	,0002567824
	NiK 3	3	,0001004467	,00007796257	-,0000932231	,0002941164
	NiK 4	3	,0000872000	,00001729289	,0000442421	,0001301579
	NiK 5	3	,0000759767	,00000864410	,0000545035	,0000974498
	NiK 6	3	,0000704667	,00002922328	-,0000021280	,0001430613
	NiK 7	3	,0000632200	,00000378937	,0000538067	,0000726333
	NiK 8	3	,0001319100	,00000346039	,0001233139	,0001405061
	NiK 9	3	,0000900333	,00000148500	,0000863444	,0000937223
	NiK 10	3	,0000436000	,00001572723	,0000045314	,0000826686
	Total	30	,0000922563	,00004219184	,0000765016	,0001080110
Extinktion bei 900 Sek (Modell)	NiK 1	3	,1678328637	,00421239906	,1573686843	,1782970430
	NiK 2	3	,1188947487	,03916481630	,0216039515	,2161855458
	NiK 3	3	,1435989943	,03831019167	,0484312025	,2387667862
	NiK 4	3	,1107189440	,01225732910	,0802700505	,1411678375
	NiK 5	3	,1178821257	,02047155309	,0670279686	,1687362827
	NiK 6	3	,1238867800	,00651063354	,1077134697	,1400600903
	NiK 7	3	,0922409990	,01694690421	,0501425552	,1343394428
	NiK 8	3	,2045927510	,01430696482	,1690522802	,2401332218
	NiK 9	3	,1876205180	,01027261183	,1621019356	,2131391004
	NiK 10	3	,0612483710	,00618703045	,0458789353	,0766178067
	Total	30	,1328517095	,04559427986	,1158265256	,1498768934

Tab 2: Zielgrößen der trangen Linien

		N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Anstieg	Slr 8	3	,0000543900	,00001368405	,0000203969	,0000883831
	Slr 9	3	,0000158867	,00000533194	,0000026414	,0000291320
	Slr 10*	3	,0002161433	,00001275506	,0001844580	,0002478287
	Slr 10	3	,0003684200	,00004292480	,0002617889	,0004750511
	Slr 12	3	,0002169900	,00006815592	,0000476813	,0003862987
	Slr 15	3	,0001841767	,00003034539	,0001087945	,0002595588
	Slr 20	3	,0000337667	,00000234845	,0000279328	,0000396005
	Slr 24	3	,0000396567	,00000460919	,0000282068	,0000511065
Extinktion bei 900 Sek (Modell)	Slr 8	3	,0940869373	,01804720896	,0492551850	,1389186897
	Slr 9	3	,0376544263	,00171214701	,0334012174	,0419076353
	Slr 10*	3	,2293093140	,01228219602	,1987986477	,2598199803
	Slr 10	3	,5095595853	,05134687417	,3820068788	,6371122919
	Slr 12	3	,2529080410	,05772181032	,1095191152	,3962969668
	Slr 15	3	,2376124873	,02724829232	,1699239768	,3053009979
	Slr 20	3	,0596468207	,00747302415	,0410827996	,0782108418
	Slr 24	3	,1074965400	,00945336686	,0840130749	,1309800051

Vergleich der Zielgrößen bezüglich des Normalbereiches

Die Grenzen des Normalbereiches wurden aus den Proben der nah isogenen Kontrolle ermittelt (Tab 1, Zeile Total) und sind in Abb 5 und 6 dargestellt.

Die Einzelpflanzen der Linien Slr10*, Slr10 und Slr15 haben eine erhöhte Enzymaktivität. Bei der Linie Slr12 ist es sehr Wahrscheinlich, dass die Enzymaktivität erhöht ist. Die Einzelpflanzen der Linien Slr9, Slr20 und Slr24 zeigen eine geringere Enzymaktivität. Bei der Linie Slr8 ist es sehr Wahrscheinlich, dass die Enzymaktivität geringer ist.

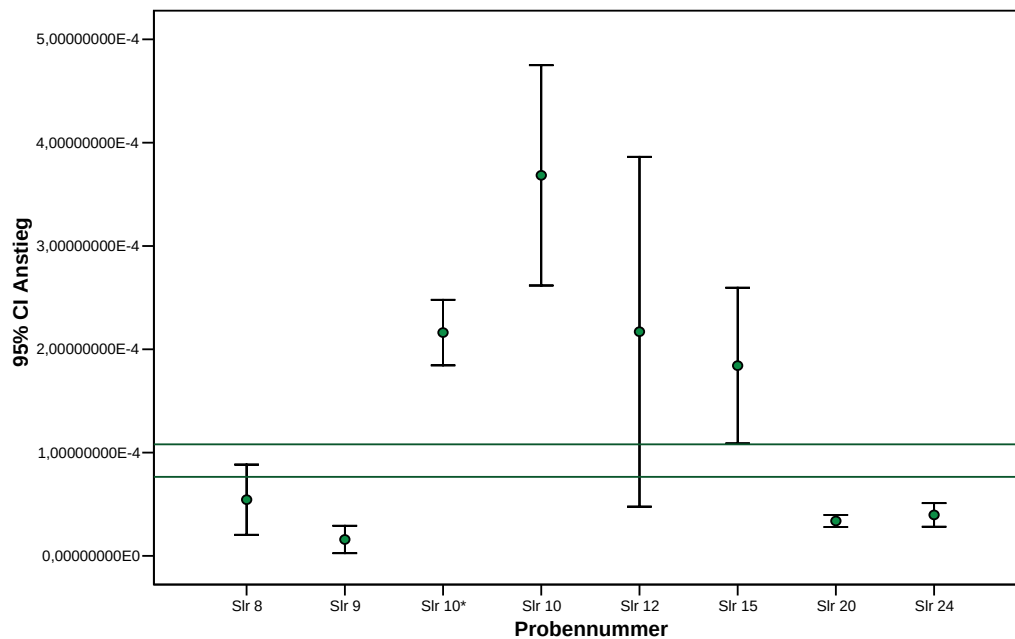


Abb 5: Zielgröße Anstieg in Bezug zum Normalbereich

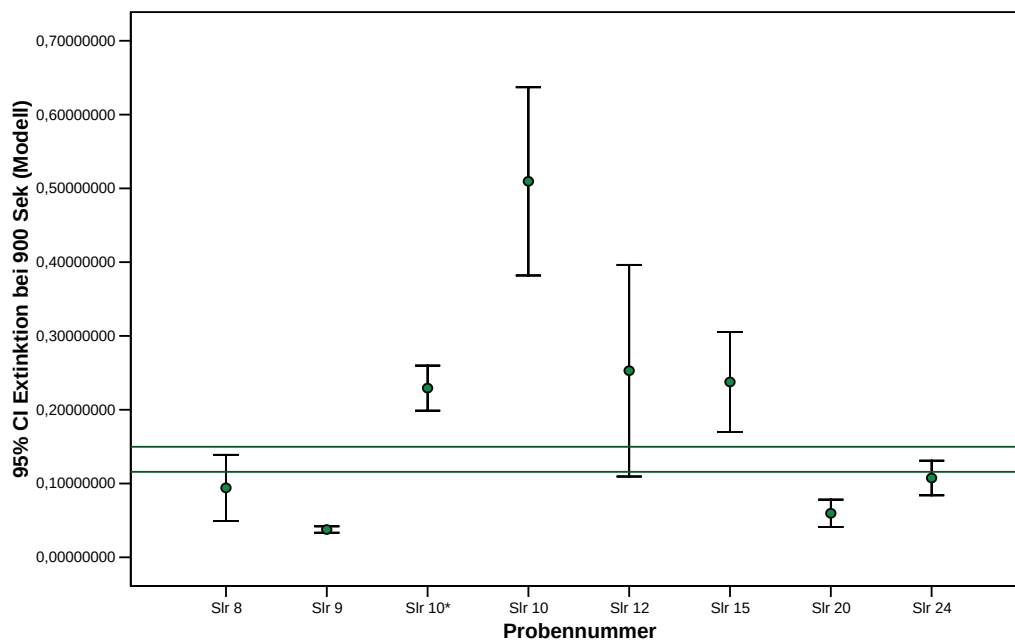


Abb 6: Zielgröße Extinktion bei 900 Sek in Bezug zum Normalbereich

6 Rohdatenlisting

	Kavität	Proben nummer	Wiederholung	Pipertier nummer	Messzeitpunkt [s] (original)	Extinktion 340 nm
1	A01	Extra Puffer	1	1	,0000	,1332
2	A01	Extra Puffer	1	1	300,0000	,1340
3	A01	Extra Puffer	1	1	600,0000	,1332
4	A01	Extra Puffer	1	1	900,0000	,1333
5	A02	Extra Puffer	2	2	,0200	,1345
6	A02	Extra Puffer	2	2	300,0200	,1349
7	A02	Extra Puffer	2	2	600,0200	,1342
8	A02	Extra Puffer	2	2	900,0200	,1345
9	A03	Extra Puffer	3	3	,0400	,1340
10	A03	Extra Puffer	3	3	300,0400	,1349
11	A03	Extra Puffer	3	3	600,0400	,1344
12	A03	Extra Puffer	3	3	900,0400	,1343
13	A04	NiK 8	1	25	,0600	,2195
14	A04	NiK 8	1	25	300,0600	,3012
15	A04	NiK 8	1	25	600,0600	,3174
16	A04	NiK 8	1	25	900,0600	,3442
17	A05	NiK 8	2	26	,0700	,2109
18	A05	NiK 8	2	26	300,0700	,2949
19	A05	NiK 8	2	26	600,0700	,2994
20	A05	NiK 8	2	26	900,0700	,3453
21	A06	NiK 8	3	27	,0900	,2317
22	A06	NiK 8	3	27	300,0900	,3332
23	A06	NiK 8	3	27	600,0900	,3408
24	A06	NiK 8	3	27	900,0900	,3589
25	A07	Slr 10	1	49	,1100	,2916
26	A07	Slr 10	1	49	300,1100	,4504
27	A07	Slr 10	1	49	600,1100	,5399
28	A07	Slr 10	1	49	900,1100	,5807
29	A08	Slr 10	2	50	,1300	,3071
30	A08	Slr 10	2	50	300,1300	,4707
31	A08	Slr 10	2	50	600,1300	,6187
32	A08	Slr 10	2	50	900,1300	,6533
33	A09	Slr 10	3	51	,1500	,3203
34	A09	Slr 10	3	51	300,1500	,4986
35	A09	Slr 10	3	51	600,1500	,6552
36	A09	Slr 10	3	51	900,1500	,6589
37	B01	NiK 1	1	4	,6200	,1893
38	B01	NiK 1	1	4	300,6200	,2872
39	B01	NiK 1	1	4	600,6200	,3209
40	B01	NiK 1	1	4	900,6200	,3017
41	B02	NiK 1	2	5	,6100	,1807
42	B02	NiK 1	2	5	300,6000	,2404
43	B02	NiK 1	2	5	600,6000	,3196
44	B02	NiK 1	2	5	900,6000	,3119
45	B03	NiK 1	3	6	,5900	,1895
46	B03	NiK 1	3	6	300,5900	,2362
47	B03	NiK 1	3	6	600,5900	,3065
48	B03	NiK 1	3	6	900,5900	,3385
49	B04	NiK 9	1	28	,5700	,2296
50	B04	NiK 9	1	28	300,5700	,2879
51	B04	NiK 9	1	28	600,5700	,2937
52	B04	NiK 9	1	28	900,5700	,3194
53	B05	NiK 9	2	29	,5500	,2432
54	B05	NiK 9	2	29	300,5500	,2960
55	B05	NiK 9	2	29	600,5500	,3284
56	B05	NiK 9	2	29	900,5500	,3218
57	B06	NiK 9	3	30	,5300	,2554
58	B06	NiK 9	3	30	300,5300	,2916
59	B06	NiK 9	3	30	600,5300	,3338
60	B06	NiK 9	3	30	900,5300	,3303
61	B07	Slr 12	1	52	,5100	,1970
62	B07	Slr 12	1	52	300,5100	,2566

63	B07	Slr 12	1	52	600,5100	,2765
64	B07	Slr 12	1	52	900,5100	,3547
65	B08	Slr 12	2	53	,4900	,1929
66	B08	Slr 12	2	53	300,4900	,3145
67	B08	Slr 12	2	53	600,4900	,3177
68	B08	Slr 12	2	53	900,4900	,3845
69	B09	Slr 12	3	54	,4800	,1888
70	B09	Slr 12	3	54	300,4800	,3149
71	B09	Slr 12	3	54	600,4800	,3628
72	B09	Slr 12	3	54	900,4800	,4668
73	C01	NiK 2	1	7	,9500	,1909
74	C01	NiK 2	1	7	300,9500	,2299
75	C01	NiK 2	1	7	600,9500	,2508
76	C01	NiK 2	1	7	900,9500	,3601
77	C02	NiK 2	2	8	,9700	,1695
78	C02	NiK 2	2	8	300,9700	,2147
79	C02	NiK 2	2	8	600,9700	,2230
80	C02	NiK 2	2	8	900,9700	,2527
81	C03	NiK 2	3	9	,9900	,1818
82	C03	NiK 2	3	9	300,9900	,2042
83	C03	NiK 2	3	9	600,9900	,2196
84	C03	NiK 2	3	9	900,9900	,2400
85	C04	NiK 10	1	31	1,0100	,1518
86	C04	NiK 10	1	31	301,0100	,1652
87	C04	NiK 10	1	31	601,0100	,1854
88	C04	NiK 10	1	31	901,0100	,2061
89	C05	NiK 10	2	32	1,0300	,1624
90	C05	NiK 10	2	32	301,0300	,1802
91	C05	NiK 10	2	32	601,0300	,1819
92	C05	NiK 10	2	32	901,0300	,1923
93	C06	NiK 10	3	33	1,0400	,1680
94	C06	NiK 10	3	33	301,0400	,1870
95	C06	NiK 10	3	33	601,0400	,1945
96	C06	NiK 10	3	33	901,0400	,2048
97	C07	Slr 15	1	55	1,0600	,2058
98	C07	Slr 15	1	55	301,0600	,2439
99	C07	Slr 15	1	55	601,0600	,3019
100	C07	Slr 15	1	55	901,0600	,3743
101	C08	Slr 15	2	56	1,0800	,2193
102	C08	Slr 15	2	56	301,0800	,2885
103	C08	Slr 15	2	56	601,0800	,3085
104	C08	Slr 15	2	56	901,0800	,3648
105	C09	Slr 15	3	57	1,1000	,2037
106	C09	Slr 15	3	57	301,1000	,3090
107	C09	Slr 15	3	57	601,1000	,3571
108	C09	Slr 15	3	57	901,1000	,4002
109	D01	NiK 3	1	10	1,5700	,2031
110	D01	NiK 3	1	10	301,5700	,2430
111	D01	NiK 3	1	10	601,5700	,2814
112	D01	NiK 3	1	10	901,5700	,3794
113	D02	NiK 3	2	11	1,5600	,2192
114	D02	NiK 3	2	11	301,5600	,2368
115	D02	NiK 3	2	11	601,5600	,2484
116	D02	NiK 3	2	11	901,5600	,2579
117	D03	NiK 3	3	12	1,5400	,2095
118	D03	NiK 3	3	12	301,5400	,2373
119	D03	NiK 3	3	12	601,5400	,2546
120	D03	NiK 3	3	12	901,5400	,2734
121	D04	Slr 1	1	34	1,5200	,1662
122	D04	Slr 1	1	34	301,5200	,1600
123	D04	Slr 1	1	34	601,5200	,1567
124	D04	Slr 1	1	34	901,5200	,1615
125	D05	Slr 1	2	35	1,5000	,1659
126	D05	Slr 1	2	35	301,5000	,1643
127	D05	Slr 1	2	35	601,5000	,1564
128	D05	Slr 1	2	35	901,5000	,1607
129	D06	Slr 1	3	36	1,4800	,1681
130	D06	Slr 1	3	36	301,4800	,1654

131	D06	Slr 1	3	36	601,4800	,1698
132	D06	Slr 1	3	36	901,4800	,1636
133	D07	Slr 20	1	58	1,4600	,1709
134	D07	Slr 20	1	58	301,4600	,1800
135	D07	Slr 20	1	58	601,4600	,1906
136	D07	Slr 20	1	58	901,4600	,1996
137	D08	Slr 20	2	59	1,4500	,1650
138	D08	Slr 20	2	59	301,4500	,1776
139	D08	Slr 20	2	59	601,4500	,1919
140	D08	Slr 20	2	59	901,4500	,1967
141	D09	Slr 20	3	60	1,4300	,1572
142	D09	Slr 20	3	60	301,4300	,1663
143	D09	Slr 20	3	60	601,4300	,1768
144	D09	Slr 20	3	60	901,4300	,1863
145	E01	NiK 4	1	13	1,9000	,1794
146	E01	NiK 4	1	13	301,9000	,2055
147	E01	NiK 4	1	13	601,9000	,2358
148	E01	NiK 4	1	13	901,9000	,2754
149	E02	NiK 4	2	14	1,9200	,1967
150	E02	NiK 4	2	14	301,9200	,2189
151	E02	NiK 4	2	14	601,9200	,2421
152	E02	NiK 4	2	14	901,9200	,2723
153	E03	NiK 4	3	15	1,9400	,1818
154	E03	NiK 4	3	15	301,9400	,1992
155	E03	NiK 4	3	15	601,9400	,2225
156	E03	NiK 4	3	15	901,9400	,2462
157	E04	Slr 7	1	37	1,9600	,1855
158	E04	Slr 7	1	37	301,9600	,1848
159	E04	Slr 7	1	37	601,9600	,1733
160	E04	Slr 7	1	37	901,9600	,1795
161	E05	Slr 7	2	38	1,9800	,1777
162	E05	Slr 7	2	38	301,9800	,1743
163	E05	Slr 7	2	38	601,9800	,1768
164	E05	Slr 7	2	38	901,9800	,1755
165	E06	Slr 7	3	39	1,9900	,1805
166	E06	Slr 7	3	39	301,9900	,1894
167	E06	Slr 7	3	39	601,9900	,1787
168	E06	Slr 7	3	39	901,9900	,1873
169	E07	Slr 24	1	61	2,0100	,2095
170	E07	Slr 24	1	61	302,0100	,2275
171	E07	Slr 24	1	61	602,0100	,2340
172	E07	Slr 24	1	61	902,0100	,2456
173	E08	Slr 24	2	62	2,0300	,1987
174	E08	Slr 24	2	62	302,0300	,2124
175	E08	Slr 24	2	62	602,0300	,2202
176	E08	Slr 24	2	62	902,0300	,2320
177	E09	Slr 24	3	63	2,0500	,2096
178	E09	Slr 24	3	63	302,0500	,2238
179	E09	Slr 24	3	63	602,0500	,2355
180	E09	Slr 24	3	63	902,0500	,2505
181	F01	NiK 5	1	16	2,5300	,2155
182	F01	NiK 5	1	16	302,5300	,2403
183	F01	NiK 5	1	16	602,5300	,2602
184	F01	NiK 5	1	16	902,5300	,2947
185	F02	NiK 5	2	17	2,5100	,1895
186	F02	NiK 5	2	17	302,5100	,2210
187	F02	NiK 5	2	17	602,5100	,2439
188	F02	NiK 5	2	17	902,5100	,2543
189	F03	NiK 5	3	18	2,4900	,1854
190	F03	NiK 5	3	18	302,4900	,2076
191	F03	NiK 5	3	18	602,4900	,2243
192	F03	NiK 5	3	18	902,4900	,2495
193	F04	Slr 8	1	40	2,4700	,1936
194	F04	Slr 8	1	40	302,4700	,2233
195	F04	Slr 8	1	40	602,4700	,2277
196	F04	Slr 8	1	40	902,4700	,2577
197	F05	Slr 8	2	41	2,4500	,1846
198	F05	Slr 8	2	41	302,4500	,1899

199	F05	Slr 8	2	41	602,4500	,2026
200	F05	Slr 8	2	41	902,4500	,2195
201	F06	Slr 8	3	42	2,4300	,1750
202	F06	Slr 8	3	42	302,4300	,1988
203	F06	Slr 8	3	42	602,4300	,2107
204	F06	Slr 8	3	42	902,4300	,2295
205	G01	NiK 6	1	19	2,8500	,1983
206	G01	NiK 6	1	19	302,8500	,2165
207	G01	NiK 6	1	19	602,8500	,2398
208	G01	NiK 6	1	19	902,8500	,2945
209	G02	NiK 6	2	20	2,8700	,2067
210	G02	NiK 6	2	20	302,8700	,2319
211	G02	NiK 6	2	20	602,8700	,2511
212	G02	NiK 6	2	20	902,8700	,2575
213	G03	NiK 6	3	21	2,8900	,2177
214	G03	NiK 6	3	21	302,8900	,2377
215	G03	NiK 6	3	21	602,8900	,2528
216	G03	NiK 6	3	21	902,8900	,2629
217	G04	Slr 9	1	43	2,9100	,1589
218	G04	Slr 9	1	43	302,9100	,1644
219	G04	Slr 9	1	43	602,9100	,1680
220	G04	Slr 9	1	43	902,9100	,1767
221	G05	Slr 9	2	44	2,9300	,1541
222	G05	Slr 9	2	44	302,9300	,1628
223	G05	Slr 9	2	44	602,9300	,1659
224	G05	Slr 9	2	44	902,9300	,1720
225	G06	Slr 9	3	45	2,9500	,1634
226	G06	Slr 9	3	45	302,9500	,1664
227	G06	Slr 9	3	45	602,9500	,1683
228	G06	Slr 9	3	45	902,9500	,1725
229	H01	NiK 7	1	22	3,4800	,1959
230	H01	NiK 7	1	22	303,4800	,2037
231	H01	NiK 7	1	22	603,4800	,2298
232	H01	NiK 7	1	22	903,4800	,2541
233	H02	NiK 7	2	23	3,4600	,1689
234	H02	NiK 7	2	23	303,4600	,1747
235	H02	NiK 7	2	23	603,4600	,1850
236	H02	NiK 7	2	23	903,4600	,2289
237	H03	NiK 7	3	24	3,4400	,1969
238	H03	NiK 7	3	24	303,4400	,2017
239	H03	NiK 7	3	24	603,4400	,2099
240	H03	NiK 7	3	24	903,4400	,2535
241	H04	Slr 10*	1	46	3,4200	,2053
242	H04	Slr 10*	1	46	303,4200	,2622
243	H04	Slr 10*	1	46	603,4200	,2878
244	H04	Slr 10*	1	46	903,4200	,4222
245	H05	Slr 10*	2	47	3,4000	,1953
246	H05	Slr 10*	2	47	303,4000	,2372
247	H05	Slr 10*	2	47	603,4000	,3038
248	H05	Slr 10*	2	47	903,4000	,3747
249	H06	Slr 10*	3	48	3,3800	,2041
250	H06	Slr 10*	3	48	303,3800	,2476
251	H06	Slr 10*	3	48	603,3800	,2467
252	H06	Slr 10*	3	48	903,3800	,4258
Total	N	252	252	252	252	252

biovativ GmbH, Thünenplatz 1, 18190 Groß Lüsewitz

Universität Rostock
Agrar- und Umweltfakultät
Agrobiotechnologie und Begleitforschung
Prof. Dr. Inge Broer
18051 Rostock

Kontakt: Kerstin Schmidt
Datum: 2015-02-27
Tel.: +49 381 375661 20
Fax: +49 381 375661 18
E-Mail: kerstin.schmidt@biovativ.de
Thünenplatz 1
18190 Groß Lüsewitz

Bericht zum Unterauftrag im Projekt Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese

Im o.a. Projekt hatte die biovativ GmbH eine Unterauftrag zur Anzucht von gv Tabak im Gewächshaus und Bonitur von phänotypischen Merkmalen.

Für den Unterauftrag wurde gemäß Angebot eine kleine Gewächshauskabine im AgroBioTechnikum Groß Lüsewitz für den Zeitraum von 20 Monaten von der Betreibergesellschaft gemietet.

Unmittelbar nach Projektstart im Mai 2011 wurden Vorversuche durchgeführt, um die Anbaubedingungen für PsbO Tabak speziell im Groß Lüsewitzer Gewächshaus zu testen und festzulegen (eine Kabine für 5 Monate)
s. Protokoll Anhang 1

Resultierend wurde eine Standardarbeitsanweisung für die Anzucht von PsbO Tabak im Gewächshaus entwickelt.
s. SOP Anhang 2

Auf der Projektberatung am 28.10.2011 wurde entsprechend des aktuellen Projektstandes bestätigt, Gewächshausversuche zur Simulation der Stressfaktoren Licht und Wasser vorzubereiten und Basisdaten zur Entwicklung des Tabak unter Stress zu gewinnen. Das war zum einen darin begründet, dass zu diesem Zeitraum noch keine gentechnisch veränderten Pflanzen wie geplant zur Verfügung gestellt werden konnten. Zum anderen war es darin begründet, dass die beobachteten Schwankungen viel größer waren als vorher anzunehmen und befürchtet wurde, die erwarteten, durch PsbO begründeten Leistungsverbesserungen bei der Varianz der Anzuchtbedingungen im Gewächshaus nicht identifizieren zu können. Die AG Schubert berichtete weiterhin über außergewöhnliche Schwankungen bei Einzelpflanzen in den Vorversuchen. Entsprechend wurden im Winter 2011/12 konventionelle Tabakpflanzen mit und ohne Lichtstress sowie im Sommer 2012 konventionelle Tabakpflanzen mit und ohne Wasserstress gehalten und die Auswirkungen auf phänotypische Merkmale erfasst (Zweimal zwei Kabinen für jeweils 5 Monate). Mit den simulierten Stressbedingungen konnten zwar Unterschiede in den Merkmalen zur Biomassebestimmung (Pflanzenhöhe, Frischmasse, Trockenmasse, Frisch- und Trockenmasse der Blätter, mittlere Blattfläche) festgestellt werden, diese waren aber nicht signifikant.
s. Protokoll Anzucht für Simulationsversuche Anhang 3

Eine Anzucht von gv Tabak fand nicht mehr statt, da mit diesen Baseline Versuchen die geplanten Kapazitäten erschöpft waren und außerdem in den Versuchen an der Universität Rostock festgestellt wurde, dass die Variabilität in den PsbO Pflanzen unter Gewächshausbedingungen zu hoch war, und für die entsprechende Auswirkung auf die Photosyntheseaktivität und die Biomasseproduktion mindestens Anzuchtkammern zu nutzen wären, um die Umweltbedingungen zu kontrollieren.

Die Kalkulation der Gewächshauskosten war auf der Basis von einer Grundmiete von 7 €/ m² und NK Vorauszahlung von 15,50 €/m² erfolgt. Die NK Abrechnung für 2011 ergab einen m²-Preis von 16,18 € und in 2012 von 22,98 € (extreme Kälte von bis zu -20°C im Winter, dadurch hohe Heizkosten; hoher Leerstand). Damit erhöhten sich die Gewächshauskosten für das Projekt im Vergleich zum Angebot um 3.215,90 Euro.

biovativ GmbH
Thünenplatz 1
18190 Groß Lüsewitz
Germany

Geschäftsführer
Kerstin Schmidt
Reg. Gericht.
Rostock, HRB9774

Tel.: +49 381 375661 20
Fax: +49 381 375661 18
E-Mail: central@biovativ.de
I.net: www.biovativ.de

UstID DE 8141145 98
Finanzamt
Ribnitz-Damgarten
StNr. 081/106/01345

Bank
UniCredit Bank AG
BIC: HYVEDEMM300
IBAN: DE33 2003 0000 0638643163

Die biovativ GmbH hat an den Projektbesprechungen am 28.10.2011 und am 3.12.2012 teilgenommen.

Kerstin Schmidt

Protokoll durchgeführte Arbeiten (Vorversuche)

- 10.05.11 Tabaksamen *N. tabacum* cv. Petit Havana erhalten.
Es handelt sich um Samen des Wildtyps und kann für Vorversuche verwendet werden. Das Saatgut stammt aus 2007.
- 25.05.11 Einen Teil des Wildtyp-Saatgutes im Gewächshaus ausgesät: grüne Aussaatschale mit Pikiererde + Ton (mit etwas Sand vermischt) gefüllt und Oberfläche geglättet. Saatgut mit ein wenig feinem Vogelsand vermischt und Mischung auf der Erde verteilt. Erde mit Sprühflasche gut angefeuchtet. Mit Abdeckhaube abgedeckt. Temperatur tagsüber 18 bis 20 °C, Tageslänge 14 h.
- 07.07.11 Tabaksamen extrem schlecht gekeimt (nur 4 Pflanzen erhalten), die inzwischen in 6er-Töpfe umgetopft wurden.
Am 30.11.2010 neueres Saatgut erhalten , Aussaat der Charge N. t. PH Nr. 5 in verschiedene Substrate (P+Ton, ED 73, Stender-Petunien-Erde), Kultur in Pflanzenschrank bei 25 °C
- 13.07.11 erste Keimlinge der 2. Charge „Petit Havana“ (PH) sind erkennbar, Keimrate ist wiederum gering, aber etwas besser als bei der ersten Charge
- 18.07.11 Beste Keimung in P+Ton-Erde, ED 73 geht auch, Stender: keine Pflanzen sichtbar
Aussaat von eigenen Tabaksamen (Ernte 2009, Sorte unbekannt) in P+Ton
- 28.07.11 Eigene Tabaksamen sind fast 100%ig aufgelaufen, wesentlich gleichmäßiger als PH
PH-Keimlinge in P+Ton und ED 73 in 6er-Töpfe umgetopft
- 17.08.11 12 Pflanzen vom 07.01.10 in 5 l-Töpfe umgetopft und ins Gewächshaus überführt.
Als Substrate wurden P + T (5 Töpfe) sowie ED 73 (7 Töpfe) verwendet.
- 01.09.11 Keimversuch angesetzt :
N. t. PH Nr. 5
N. t. PH Nr. 6

Saatgut in Töpfe in P + Ton-Erde ausgesät:
1 Topf N. t. PH Nr. 5
1 Topf N. t. PH Nr. 6

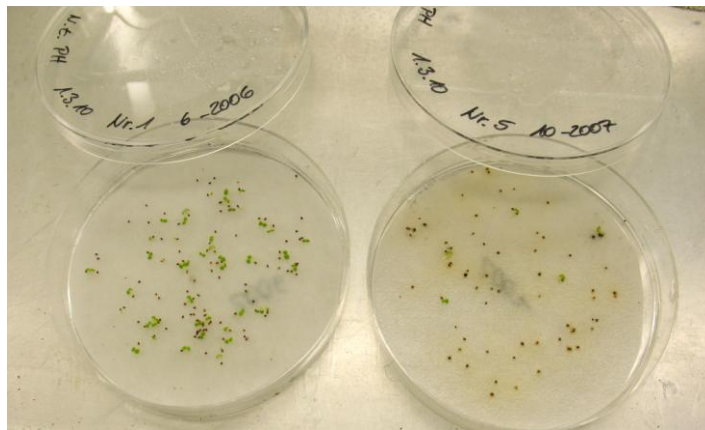
Die Erde wurde zur Reduzierung von Infektionen durch Pilze anstatt mit reinem Gießwasser mit Gießwasser + Previcur N durchfeuchtet. Kultur bei 16 h Licht und konstant 25°C im Pflanzenanzuchtschrank.

08.09.11

Die beiden Chargen sind unterschiedlich gut aufgelaufen:



Das Ergebnis spiegelt sich auch beim Keimtest wieder, die Charge N. t. PH Nr. 5 keimt - obwohl jünger - schlechter:



15.09.11

Pflanzen vom 01.09.11 sind soweit aufgelaufen, dass sie pikiert werden könnten.

25.09.11

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Größe der Pflanzen in 5 l-Töpfen. Am besten sind die Pflanzen gewachsen, die nach dem Pikieren in ED 73 gepflanzt wurden und auch beim zweiten Umtopfen in 5 l-Töpfe in ED 73 gesetzt wurden



Auswertung:

Die zuerst erhaltene Charge Petit Havana von 2007 war extrem schlecht keimfähig. Dies wurde auch von anderen Versuchsanstellern bestätigt.

Unterschiede zeigten sich auch nach Aussaat von zwei weiteren Chargen vom 2008 und 2009. Die Charge von 2009 hatte eine schlechtere Qualität als die von 2008. Letztere keimte gut. Pflanzen aus beiden Chargen konnte nach etwa 14 bis 19 Tagen pikiert werden.

Die Pflanzen wurden zunächst in 6er-Töpfe pikiert. Nach weiteren 20 Tagen konnten die Jungpflanzen in 5 l- Töpfe umgepflanzt werden, in denen sie bis zur Samenernte verbleiben können. Als Anzuchtmedium hat sich P + Ton als am besten erwiesen. Das Pikieren und Umtopfen in größere Töpfe sollte in ED 73 erfolgen. Pflanzen die auf diese Weise angezogen und kultiviert wurden, kamen im Gewächshaus nach 11 Wochen zur Blüte.

Die WT-Pflanzen dürften somit frühestens nach 5 bis 6 Wochen so groß sein, dass sie ausgepflanzt werden können. Dies deckt sich auch mit den Angaben anderer Publikationen.

	Bioaktiv GmbH	Standardarbeitsanweisung SOP 02 – 012 - 01
Seite: 1 von 4 Gültig ab: Version: Erstellt von: <u>Rüster</u> <u>18.02.2012</u>		Anzucht von PsbO Tabakpflanzen für das Projekt "Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese", Unterauftrag von der Universität Rostock

1. Zweck und/oder Anwendungsbereich

Die SOP beschreibt die Vorgehensweise zur Anzucht von Tabakpflanzen im Gewächshaus. Die Tabakpflanzen können je nach Aufgabenstellung für verschiedene Zwecke genutzt werden, z. B. zur Gewinnung von Blattmaterial oder zur Gewinnung von Saatgut.

2. Prinzip

Tabaksamen werden im Gewächshaus ausgesät, die Keimlinge pikiert und die Jungpflanzen weiterkultiviert. Diese werden umgetopft und bis zu Abreife der Samenstände weiter kultiviert. Die Samen werden geerntet und aufbereitet.

3. Material/ Reagenzien

3.1 Arbeitsmaterialien

- Pikierschalen mit Löchern oder 10 cm-Töpfe
- Durchsichtige Abdeckhauben
- Drucksprüngerät
- evtl. feiner Sand
- Stecketiketten aus Plastik (orange: GVO, weiß: konventionell)
- 6 cm-Töpfe oder entsprechende Multitopfplatten
- 20 l-Töpfe
- Papiertüten 23 x 30 cm
- Papiertüten 9 x 14 cm
- Verschlüsse für Gefrierbeutel (ca. 9 cm)
- Becherglas (250 ml)
- wasserfester und uv-beständiger Stift
- Tesafilm

3.2 Substrate

- P + Ton (Pikiererde + 50 % Ton, Einheitserde Fa. Einheitserdewerk Uetersen)
- Gemüseerde Fa. Stender
 Zusammensetzung: 95 % Weißtorf/Feuchttorf 0 – 8 mm
 4 % Sand
 1,2 kg/m³ Hakaphos rot
 125 g/m³ Spurenelemente
 pH-Wert: 5,5 bis 6,0

3.4 Dünger

 Biovativ GmbH	Standardarbeitsanweisung SOP 02 – 012 - 01
Seite: 2 von 4 Gültig ab: Version: Erstellt von: <u>Rüster</u> <u>18.02.2012</u>	Anzucht von PsbO Tabakpflanzen für das Projekt "Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese", Unterauftrag von der Universität Rostock

- Wuxal super

3.5 Pflanzenschutzmittel

- Confidor WG 70 (Blattläuse, Weiße Fliege)
- Conserve (Thripse)
- Vertimec (Spinnmilben)
- Plenum 50 WG (Blattläuse, Weiße Fliege)

4. Durchführung

4.1 Einstellung der Gewächshauskabine

Tageslänge: 18 h (4 – 22 Uhr)
 Temperatur: zum Keimen: Tag und Nacht 25 °C; später Tag 23 - 25 °C, Nacht 16 - 18 °C
 Zusatzbeleuchtung: tagsüber bei < 20 kLx Außenhelligkeit
 Luftfeuchte: aus
 Bewässerung: Tropfbewässerung (kleine Töpfe), Fließrinnen (gr. Töpfe) oder per Hand

4.2 Aussaat

Pikierschalen oder 10 cm-Töpfe mit Pikiererde füllen und diese leicht andrücken. Oberfläche mit Drucksprühgerät reichlich anfeuchten. Saatgut mit etwas feinem Sand vermischen und die Mischung gleichmäßig dünn auf der Oberfläche verteilen. Samen nicht abdecken (Lichtkeimer!). Nochmal vorsichtig mit Drucksprühgerät anfeuchten, Etikett mit Variante und Datum versehen und dazustecken. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit Haube von innen mit Wasser einsprühen und Töpfe oder Schale damit abdecken. Schalen/Töpfe gleichmäßig feucht halten.

Wenn (je nach Sorte nach ein bis drei Wochen) zwei Laubblätter vorhanden sind in kleine Töpfe mit P + Ton-Erde pikieren und mit entsprechenden Etiketten versehen. In den ersten Tagen zu Erhöhung der Luftfeuchtigkeit weiterhin mit Abdeckhauben abdecken.

4.3 Weiterkultur im Gewächshaus

Wenn der Boden gut durchwurzelt ist, werden die Pflanzen in 20 l-Töpfe in Stender-Erde umgetopft. Ab jetzt zweimal pro Woche mit 0.3 %-iger Wuxal super Lösung düngen. Die Töpfe müssen wegen des Gewichtes auf dem Boden stehen und können entweder über Fließrinnen oder per Hand bewässert werden (Abb. 1).

Seite: 3 von 4

Gültig ab:

Version:

Erstellt von: Rüster 18.02.2012**Anzucht von PsbO Tabakpflanzen für
das Projekt "Ansätze zur Steigerung
der Biomasse durch Optimierung der
Nettophotosynthese", Unterauftrag von
der Universität Rostock**

Abb. 1: Tabakpflanzen in Gewächshaus

4.3 Ernte der Samen

Verfärben sich außer der Apikalkapsel weitere Samenkapseln braun, wird eine Papiertüte (23 x 30 cm) über den Samenstand gestülpt. Diese wird unterhalb des Samenstandes mit einem Gefrierbeutelverschluss um den Pflanzenstängel herum verschlossen, damit evtl. bereits reife, herausfallende Samen nicht verloren gehen können.

Es wird weiterhin gegossen, bis sich der gesamte Samenstand braun verfärbt hat. Dann wird die Bewässerung eingestellt und der Samenstand mitsamt Tüte abgeschnitten. Tüte umdrehen, sodass die Öffnung nach oben zeigt, mit Bezeichnung und Datum beschriften und vor der weiteren Aufarbeitung noch mindestens zwei Wochen trocken und mit Öffnung nach oben lagern.

4.4 Aufbereitung der Samen

Eine Papiertüte (9 x 13 cm) beschriften und geöffnet in ein Becherglas stellen. Die Samenkapseln werden einzeln von Hand vom Samenstand gelöst und vorsichtig über der Tüte aufgebrochen, sodass die Samen in die Tüte fallen. Samen, die schon in der großen Tüte herausgefallen sind, werden in die kleine Tüte umgeschüttet und diese mit Tesafilm verschlossen. Saatgut im Kühlschrank aufbewahren.

	Bioaktiv GmbH	Standardarbeitsanweisung SOP 02 – 012 - 01
Seite: 4 von 4 Gültig ab: Version: Erstellt von: <u>Rüster</u> <u>18.02.2012</u>		Anzucht von PsbO Tabakpflanzen für das Projekt "Ansätze zur Steigerung der Biomasse durch Optimierung der Nettophotosynthese", Unterauftrag von der Universität Rostock

5. Bemerkungen

5.1 Hinweise zum Umgang mit GVO-Pflanzenmaterial und –Samen

Grundsätzlich ist im Umgang mit gentechnisch veränderten Pflanzen größte Sorgfalt geboten.

Alle Reste von genetisch veränderten *in vitro*-Pflanzen und Pflanzenteilen aus dem Gewächshaus sind in einem Autoklavierbeutel zu sammeln und zu autoklavieren.

Nach Beendigung der Arbeiten im Gewächshaus und im Aufreinigungsraum sind diese gründlich zu reinigen und zur Vermeidung von unbeabsichtigter Freisetzung von Tabaksamen die Fußböden mit dem Kärcher-Nass/Trockensauger abzusaugen und der Inhalt des Staubbehälters ebenfalls zu autoklavieren.

5.2 Hinweise zum Umgang mit Düngemitteln und Pflanzenschutzmitteln

5.1.1 Düngemittel

Es sind die Gebrauchsanweisungen sowie die Vorschriften der Sicherheitsdatenblätter gem. EG-Richtlinie 2001/58/EG zu beachten
 (siehe Z:\bioaktiv\Lagerdokumentation\Düngemittel\Sicherheitsdatenblätter).

5.1.2 Pflanzenschutz

Es sind die Gebrauchsanweisungen sowie die Vorschriften der Sicherheitsdatenblätter gem. EG-Richtlinie 2001/58/EG zu beachten
 (siehe Z:\bioaktiv\Lagerdokumentation\Pflanzenschutzmittel\Sicherheitsdatenblätter).

Einige Pflanzenschutzmittel dürfen gemäß Pflanzenschutzsachkundeverordnung nur von sachkundigen Personen angewendet werden.

5.3 Hinweise zur Entsorgung der verwendeten Pflanzenschutzmittel

Es sind die Gebrauchsanweisungen sowie die Vorschriften der Sicherheitsdatenblätter gem. EG-Richtlinie 2001/58/EG zu beachten
 (siehe Z:\bioaktiv\Lagerdokumentation\Pflanzenschutzmittel\Sicherheitsdatenblätter).

Anzucht des Saatgutes für den Simulationsversuch abiotische Stressfaktoren (1x Winter, 1 x Sommer)

Winter 2011/ 2012

24.09.2011 Aussaat der ersten Charge des Wildtyps Petit Havana. Die Aussaaterde wurde mit Wasser + Previcur-Zusatz (1,5 ml/l Wasser) angefeuchtet.

01.10.2011 Aussaat der zweiten Charge des Wildtyps Petit Havana.
Die Aussaaterde wurde mit Wasser + Previcur-Zusatz (1,5 ml/l Wasser) angefeuchtet.

Simulierte Stressbedingungen:

Lichtstress

Kabine 1:

normal

18 h Tageslänge

Kabine 2:

Stress

Schwachlicht, unter 6 kLx

Tageslicht: Zusatzbeleuchtung tagsüber bei < 20 kLx/ 6kLx Außenhelligkeit

Schattierung tagsüber bei > 20 kLx/ 6 kLx Außenhelligkeit

Sommer 2012

24.04.2012 Aussaat der ersten Charge des Wildtyps Petit Havana. Die Aussaaterde wurde mit Wasser + Previcur-Zusatz (1,5 ml/l Wasser) angefeuchtet.

01.05.2012 Aussaat der zweiten Charge des Wildtyps Petit Havana.
Die Aussaaterde wurde mit Wasser + Previcur-Zusatz (1,5 ml/l Wasser) angefeuchtet.

Simulierte Stressbedingungen:

Trockenstress

Kabine 1:

normal

tägliche Bewässerung

Kabine 2:

Stress

Bewässerung nur alle drei Tage

Aufgabenstellung:

WP I:

These: erhöhte Expression von PsBO --> weniger Stressanfälligkeit der Photosyntheseleistung --> höhere Biomasse

Kultivierung von Tabakpflanzen im Gewächshaus

Stressversuche: Wechsel zwischen Schwach- und Starklicht

Ziel: Messung Photosyntheseleistung

WP II:

These: erhöhte Expression von FBP/ SBPase --> effizientere Kohlenstofffixierung --> Steigerung Photosyntheseleistung --> höhere Biomasse

Kultivierung von Tabakpflanzen im Gewächshaus
Biomassebestimmung

Ziel: Messung Photosyntheseleistung

WP III:

These: Kombination erhöhte Expression von PsbO und erhöhte Expression von FBP/ SBPase --> weniger Stressanfälligkeit der Photosyntheseleistung und effizientere Kohlenstofffixierung --> Steigerung Photosyntheseleistung --> höhere Biomasse

Kultivierung von Tabakpflanzen im Gewächshaus
Biomassebestimmung

Messungen:

Biomasse über die Merkmale:

Pflanzenhöhe

Frischmasse ganze Pflanze

Trockenmasse ganze Pflanze

Wurzelvolumen

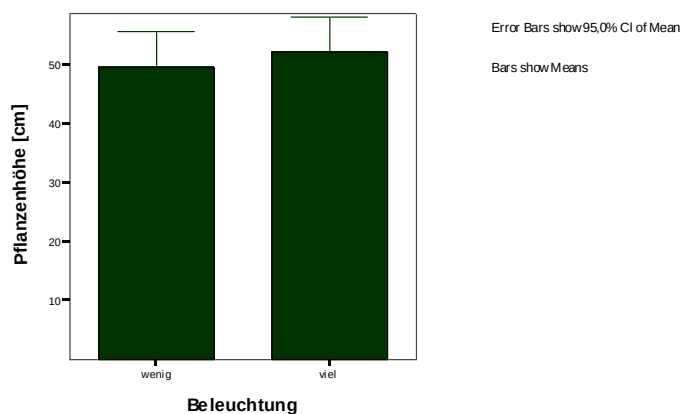
Frischmasse Blätter

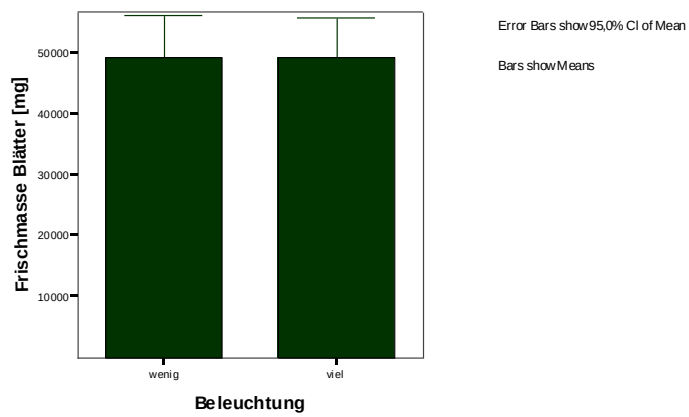
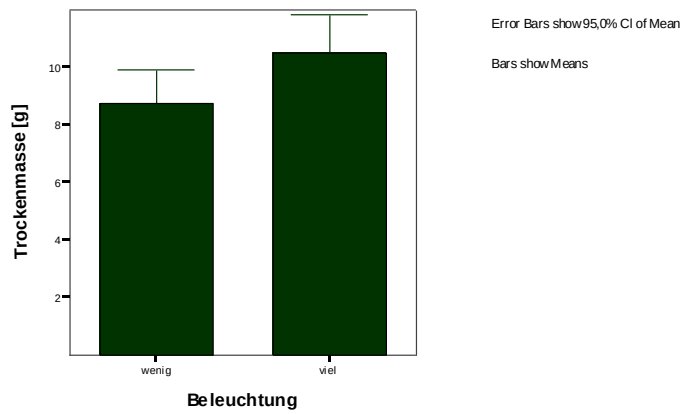
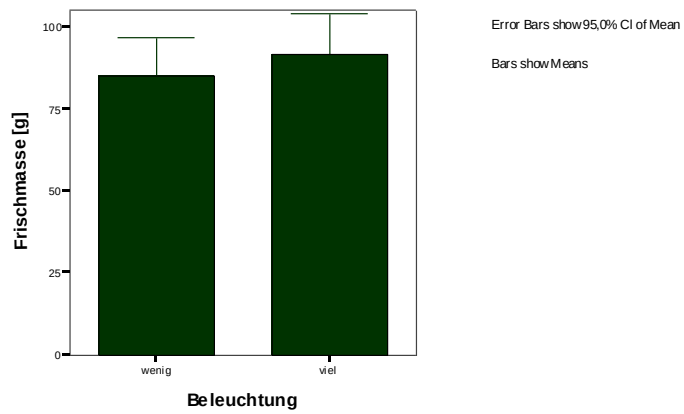
Trockenmasse Blätter

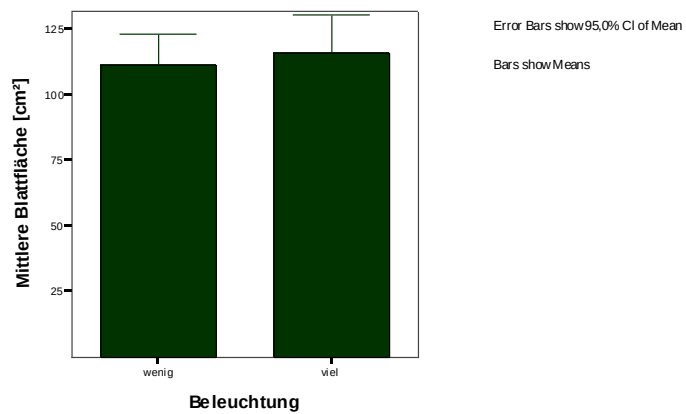
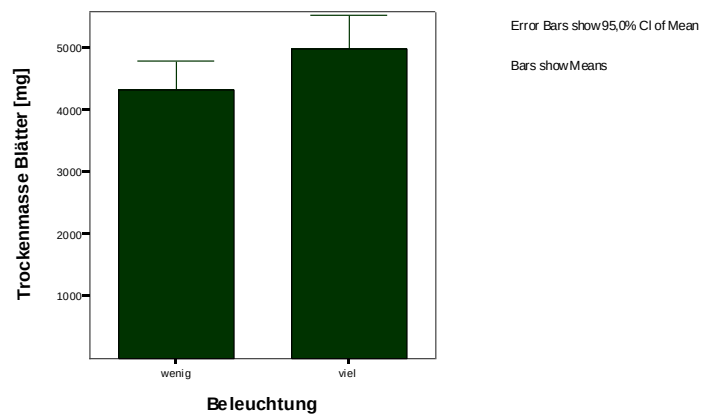
mittlere Blattfläche

Ergebnisse:

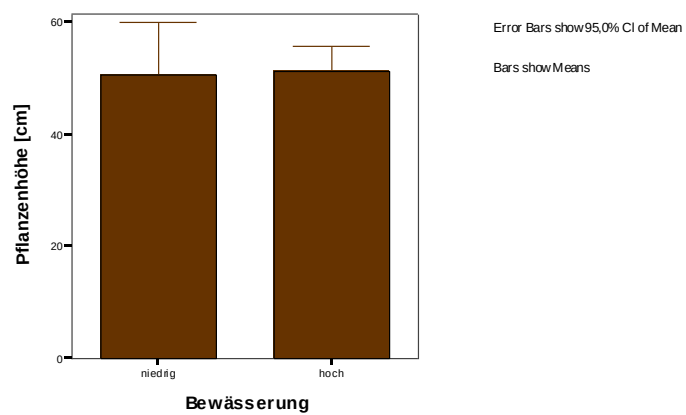
Simulation Lichtstress (wenig: Kabine mit Lichtstress, viel: Kabine mit normaler Beleuchtung):

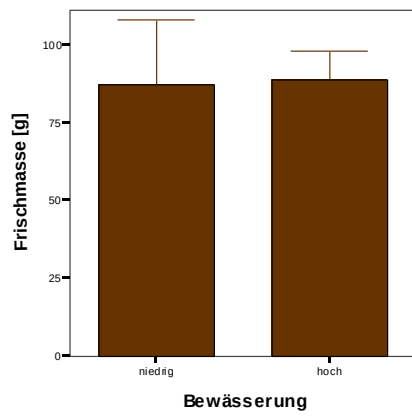




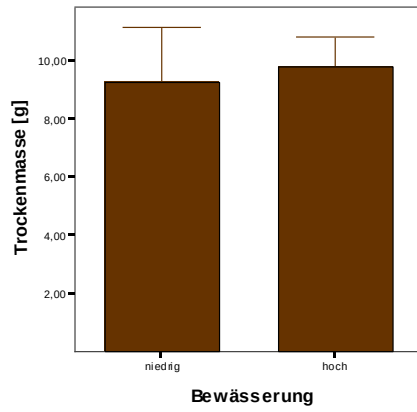


Simulation Trockenstress (niedrig: wenig Bewässerung, hoch: normale Bewässerung)

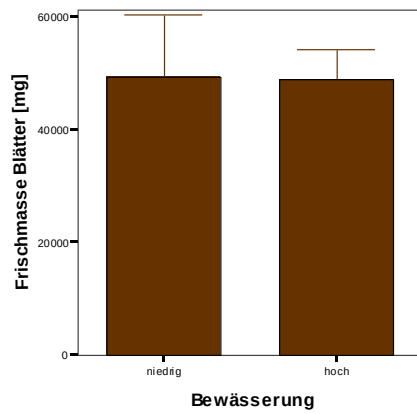




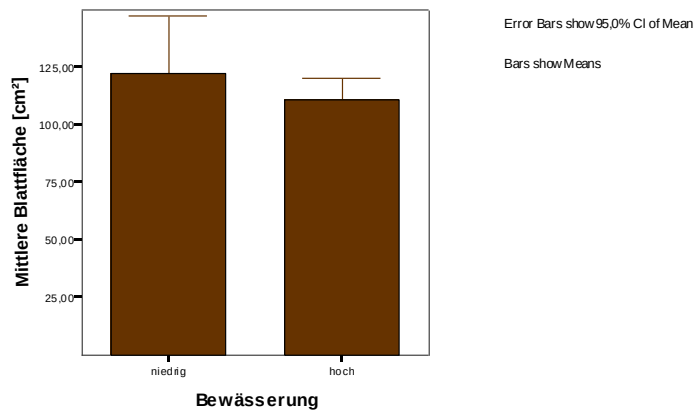
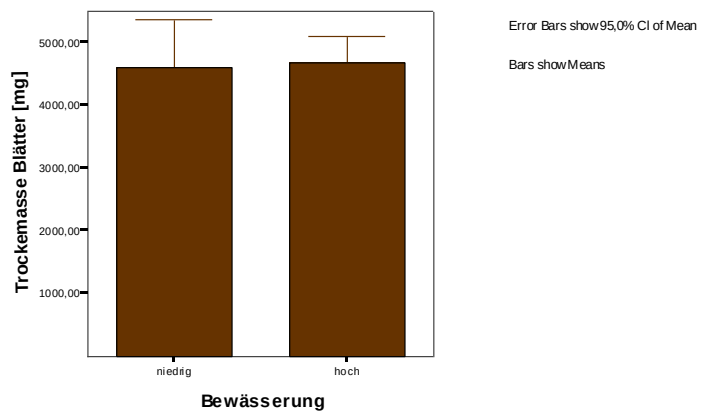
Error Bars show 95,0% CI of Mean
Bars show Means



Error Bars show 95,0% CI of Mean
Bars show Means



Error Bars show 95,0% CI of Mean
Bars show Means



Besprechung 28.10.2011:
 GWH Versuche vorbereiten
 Faktoren Licht/ Wasser quantifizieren