

# **Analyse des Wachstums von Tabakpflanzen bei ambienter (360 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO<sub>2</sub>-Konzentration**

Rolle von Phytohormonen bei der Wachstumsregulation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Ulrike Schaz**

aus Neuhausen ob Eck

Bayreuth, im Juli 2003

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1999 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth angefertigt.

Die Arbeit wurde eingereicht am 14. Juli 2003.

Das Rigorosum fand statt am 12. Dezember 2003.

Der Prüfungsausschuss bestand aus:

*Prof. Dr. H. K. Hoffmann* (Vorsitzender)

*Prof. Dr. E. Beck* (Erstgutachter)

*Prof. Dr. G. Gebauer* (Zweitgutachter)

*Prof. Dr. E. Steudle*

*Prof. Dr. K. Seifert.*

*Meinen Eltern*

*und*

*Axel*

Tu, was dir vor die Hände kommt; denn Gott ist mit dir.

(1.Samuel 10,7)

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Pflanzenanzucht.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Morphometrie.....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Nummerierung der Blätter .....	11
2.2.2 Bestimmung der Trockengewichte und des Spross-Wurzel-Verhältnisses .....	11
2.2.3 Bestimmung der Blattfläche und des Spezifisches Blattgewichts.....	12
2.2.4 Bestimmung des „physiologischen“ Alters.....	12
2.2.5 Berechnung der Relativen Wachsrates .....	13
<b>2.3 Gaswechsellmessungen .....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Assimilationsraten.....	13
2.3.2 Transpirationsraten.....	14
<b>2.4 Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Untersuchungen zur Limitierung des Wurzelraumes .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Untersuchung des Assimilattransports.....</b>	<b>15</b>
2.6.1 Herstellung von $^{14}\text{CO}_2$ .....	15
2.6.2 Markierung mit $^{14}\text{CO}_2$ .....	16
2.6.3 Probennahme .....	18
2.6.4 Bestimmung des $^{14}\text{C}$ -Gehaltes .....	18
2.6.5 Berechnung der Assimilationsraten während der radioaktiven Markierung.....	18
<b>2.7 Bestimmung der Phytohormongehalte.....</b>	<b>19</b>
2.7.1 Probennahme .....	21
2.7.2 Extraktion der Phytohormone aus den Pflanzenorganen .....	23
2.7.3 Aufreinigung des Extrakts.....	23
2.7.4 Messung der Cytokinine .....	24
2.7.5 Messung der Indol-3-essigsäure .....	33
<b>2.8 Statistik.....</b>	<b>36</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Einfluss des Wurzelraums auf das Pflanzenwachstum.....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Visuelle Beschreibung der Tabakpflanzen .....	37
3.1.2 Trockengewichte und Spross-Wurzel-Verhältnis.....	38
3.1.3 Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff in einzelnen Blättern.....	40
3.1.4 Wachstum der Tabakpflanzen im 10 l- und im 15 l-Topf .....	41
<b>3.2 Wachstum und Biomasseverteilung der Tabakpflanzen in 15 l-Töpfen.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Trockengewichtszunahme .....	44
3.2.2 Verteilung der Biomasse.....	47
3.2.3 Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff in einzelnen Blättern.....	50

<b>3.3</b>	<b>Assimilatverteilung</b> .....	<b>53</b>
3.3.1	Export- und Allokationsdauer der Assimilate .....	53
3.3.2	Verteilung der Assimilate einzelner Blätter .....	57
<b>3.4</b>	<b>Phytohormongehalte</b> .....	<b>63</b>
3.4.1	Cytokinine in den einzelnen Pflanzenorganen und im Xylemsaft.....	63
3.4.2	Transport und Umsatz der Cytokinine .....	75
3.4.3	Indol-3-essigsäure in den einzelnen Pflanzenorganen.....	81
3.4.4	Verhältnis der Indol-3-essigsäure-Konzentration und der Cytokininkonzentration ..	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>84</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss des Wurzelraumvolumens und der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum von Tabakpflanzen</b> .....	<b>85</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum und die Biomasseverteilung von Tabakpflanzen in ausreichend großem Wurzelraum</b> .....	<b>87</b>
<b>4.3</b>	<b>Assimilatverteilung</b> .....	<b>93</b>
<b>4.4</b>	<b>Phytohormone</b> .....	<b>97</b>
4.4.1	Cytokinine .....	97
4.4.2	Indol-3-essigsäure .....	106
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta w$	Wasserdampfsättigungsdefizit
Ab	Antikörper (antibody)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Biomasse
BMV	Biomasse-Verhältnis
BSA	Rinderserum-Albumin (bovin serum albumin)
CK	Cytokinin
DHZ	Dihydrozeatin
DHZ9G	Dihydrozeatin-9-Glukosid
DHZN	Dihydrozeatinnukleotid
DHZOG	Dihydrozeatin-O-Glukosid
DHZR	Dihydrozeatinribosid
DHZROG	Dihydrozeatinribosid-O-Glukosid
EDC	<i>N</i> '-(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FG	Frischgewicht
HPLC	High performance liquid chromatography
i.vac.	Im Vakuum (in vacuo)
IES	Indol-3-essigsäure
IP	Isopentenyladenin
IPA	Isopentenyladenosin
IPN	Isopentenyladenosinnukleotid
IRGA	Infrarot-Gasanalysator
K	Kinetin
Konz.	Konzentration
KR	Kinetinribosid
KR	Kreuzreaktivität
N	Anzahl der Wiederholungen
NAR	Nettoassimilationsrate
p	Signifikanz-Niveau
ppm	parts per million
RGR	Relative Wuchsrate (relative growth rate)
RSS	Relative Sink-Stärke
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
Sldw	Spezifisches Blatttrockengewicht (specific leaf dry weight)

---

t	Zeit
TBS	Tris buffered saline
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Z	<i>trans</i> -Zeatin
Z9G	<i>trans</i> -Zeatin-9-Glukosid
ZN	<i>trans</i> -Zeatin nukleotid
ZOG	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glukosid
ZR	<i>trans</i> -Zeatinribosid
ZROG	<i>trans</i> -Zeatinribosid-O-Glukosid

# 1 EINLEITUNG

## **Konzentrationsanstieg des Treibhausgases CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre und seine Auswirkungen auf die Pflanzen**

Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre stieg seit dem Beginn der Industrialisierung Anfang des 19. Jahrhunderts ausgehend von 280 ppm auf heute etwa 365 ppm an. In den 1980er Jahren betrug der jährliche Anstieg der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Durchschnitt 1,5 ppm. Bei gleich bleibender Tendenz ist im Jahr 2050, je nach Rechenmodell, eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 450 ppm bis 600 ppm CO<sub>2</sub> zu erwarten. Als Hauptursachen für den Anstieg der atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Konzentration sind die veränderte Landnutzung und die Verbrennung fossiler Brennstoffe zu nennen. Eine Folge dieser Erhöhung ist die Erderwärmung, zu der CO<sub>2</sub> als Treibhausgas einen Großteil beiträgt.

Die steigende CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre weckte das Interesse an den Auswirkungen dieser Erhöhung auf natürliche und landwirtschaftliche Ökosysteme. Bei der Photosynthese wird CO<sub>2</sub> in organische Verbindungen assimiliert und auf diese Weise der Atmosphäre entzogen. Die Photoassimilate werden zum Aufbau von Biomasse, zum Wachstum, verwendet. Um die Entwicklung der „grünen Senke“ für atmosphärischen Kohlenstoff und den zukünftigen Anstieg des CO<sub>2</sub> beurteilen und damit Vorhersagen über den damit verbundenen Klimawandel machen und Handlungsempfehlungen an die Politik geben zu können, ist es unerlässlich, die Reaktion der Pflanzen auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration zu kennen.

In einer Vielzahl von Experimenten, sowohl im Labor als auch im Freiland, wurde die Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum von Pflanzen untersucht (Makino und Mae, 1999; Poorter und Navas, 2003). Die vielen Untersuchungen zeigten bald, dass die Reaktionen von Pflanzen auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration vielfältig sind, da sie von vielen Faktoren abhängen (Kramer, 1981). Zu diesen Faktoren zählen u. a. exogene Umweltfaktoren wie Lichteinstrahlung, Temperatur, Wasser- und Nährstoffversorgung (Kramer, 1981; Makino und Mae, 1999; Poorter und Navas, 2003).

C<sub>3</sub>-Pflanzen, die mehr als 90 % der terrestrischen Pflanzenarten stellen, reagierten am stärksten, CAM-Pflanzen weniger stark und C<sub>4</sub>-Pflanzen am geringsten auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration. Bei C<sub>3</sub>-Pflanzen konnte in allen Versuchen stets eine kurzzeitige Steigerung der Photosyntheseraten und des Wachstums beobachtet werden. Die Langzeit-Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf C<sub>3</sub>-Pflanzen ist dagegen nicht einheitlich. In vielen Untersuchungen nahm die Wachstumsstimulierung bereits nach wenigen Versuchstagen wieder ab. Die Photosynthese und der Biomassezuwachs sanken dann sogar teilweise unter jene bei derzeitig



gegebener CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre ab (Kramer, 1981; Makino und Mae, 1999; Poorter und Navas, 2003).

Für die Abnahme der Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum wird ein interner Feedback-Mechanismus verantwortlich gemacht, die sog. Sink-Limitierung (Stitt, 1991). Ein unter gegebenen Bedingungen optimales Pflanzenwachstum setzt ein Gleichgewicht zwischen der Produktion von Photoassimilaten in den Source-Blättern und deren Verbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel, für die Verteidigung, für die Speicherung und für das Wachstum in den Meristemen voraus (Stitt und Schulze, 1994). Übersteigt die Produktion in den Quellen (Source) den Verbrauch in den Senken (Sink), so „stauen die Assimilate im Phloem zurück“ und akkumulieren als Stärke in den Plastiden. Dadurch kann die Photosynthese gehemmt werden, woraufhin der Biomassezuwachs sinkt (Stitt, 1991; Paul und Foyer, 2001). Die Reaktion der Pflanzen auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration wird demnach entscheidend von der Größe ihrer Sinks beeinflusst.

Maximierung der Stärke dieser Sinks, und damit der Biomasseproduktion, setzt optimale Wachstumsbedingungen voraus. Diese treten in der Natur kaum auf, da immer ein Faktor das Wachstum limitiert. Selbst unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern ist bisher eine systematische Optimierung aller Faktoren mit dem Ziel, das maximale Wachstum einer Pflanze auszuloten, nicht gelungen. Derartige Experimente sind schon vom Ansatz her problematisch, da man durch Optimierung des einen begrenzenden Faktors zwangsläufig in die Limitierung durch einen anderen Faktor gerät. Bei optimaler Belichtung, CO<sub>2</sub>-Konzentration und Wasserversorgung sind es v. a. die Makronährstoffe, allen voran der für das Pflanzenwachstum am meisten benötigte Stickstoff, welche schnell zu limitierenden Faktoren werden können. Bei zahlreichen Laborversuchen zum Einfluss erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf das Pflanzenwachstum stellte sich im Nachhinein heraus, dass die Reaktion der Pflanzen nicht durch CO<sub>2</sub>, sondern durch Stickstoff begrenzt war (Stitt und Krapp, 1999). Außerdem können auch andere Ursachen wie unzureichende Wasserverfügbarkeit oder ein zu kleiner Wurzelraum die wachstumssteigernde Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration annullieren (Arp, 1991; Rabha und Uprety, 1998).

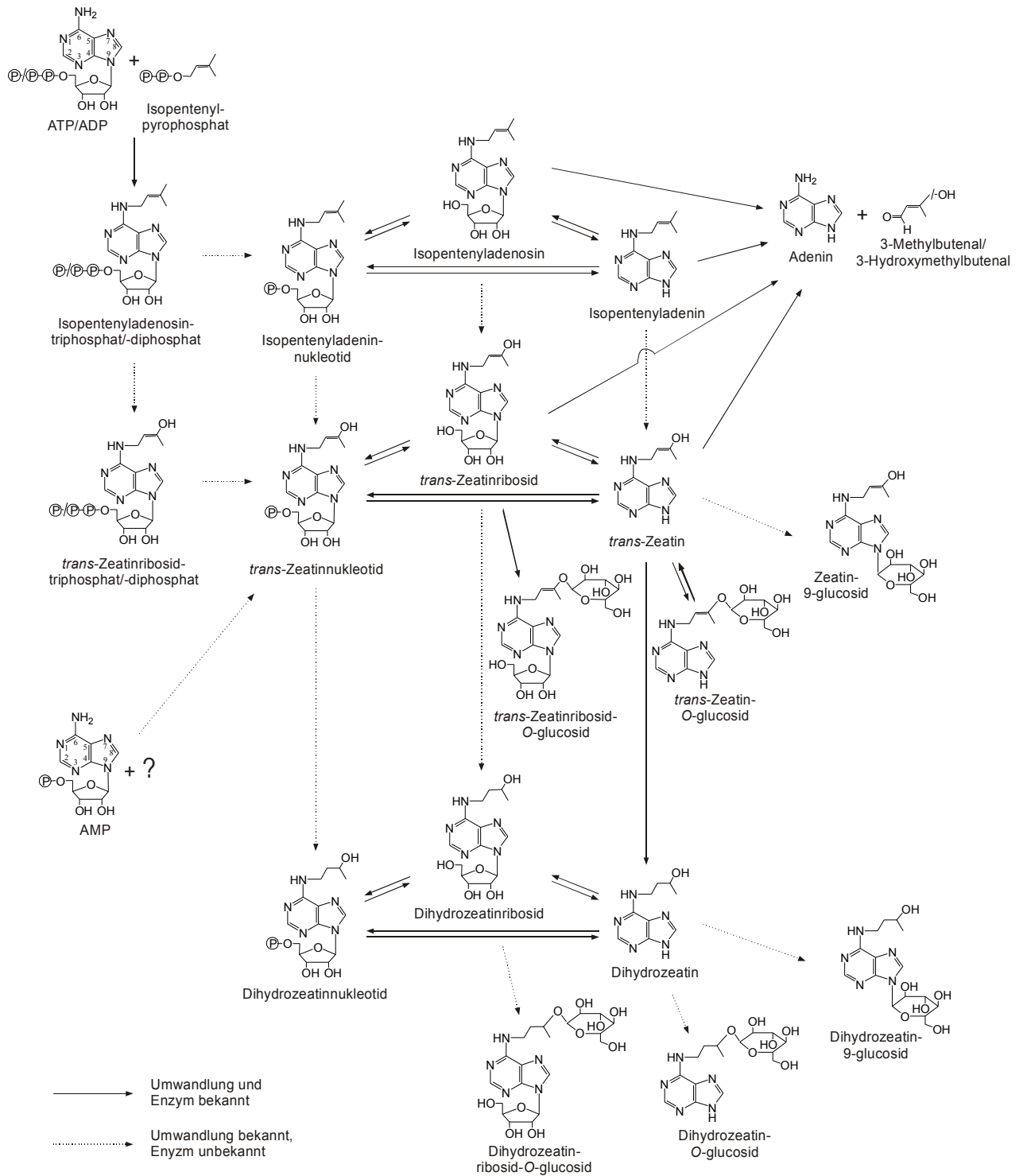
### **Endogene Wachstumsregulatoren: Die Phytohormonegruppen Cytokinine und Auxine**

Damit eine Pflanze bei den gegebenen Umweltbedingungen und mit den vorhandenen Ressourcen optimal wachsen kann, muss das Wachstum ihrer Organe genau reguliert und aufeinander abgestimmt sein. Für diese Koordination des Wachstums sind endogene Signale unerlässlich. Neben Stickstoffverbindungen (Stitt und Krapp, 1999) und Zuckern (Jang und Sheen, 1997) sind es v. a. Phytohormone, die intern, aber auch in Korrelation mit exogenen Faktoren, das Wachstum steuern (Jackson, 1993; Bradford und Trewavas, 1994; Beck, 1999).

Phytohormone sind niedermolekulare Verbindungen, die auf verschiedenen Wegen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels gebildet werden, und schon in sehr niedrigen Konzentrationen ihre Wirkung entfalten. Zu den bereits seit längerem bekannten fünf Phytohormongruppen – Auxine, Cytokinine, Gibberelline, Abscisinsäure und Ethylen – wurden in den letzten Jahren auch Brassinosteroide und Jasmonate als Phytohormone gezählt. Die Wirkmechanismen der Phytohormone sind komplex und noch weitgehend unverstanden. Ihre Konzentration am Wirkort wird durch Import und Export, Kompartimentierung und Konjugation, bspw. an Monosaccharide oder Aminosäuren, sowie durch Synthese und Abbau genau kontrolliert.

Zellteilung und Zellvergrößerung, die im wesentlichen die Stärke eines meristematischen Sinks ausmachen, werden grundsätzlich von Cytokinin und Auxin gesteuert, wobei allerdings auch hier die molekularen Wirkmechanismen erst teilweise bekannt sind. Im Folgenden wird auf diese beiden Phytohormongruppen, die auch in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurden, näher eingegangen.

Unter dem Begriff Cytokinine werden alle Substanzen (natürliche und synthetische), die die Namen gebende fördernde Wirkung auf die Zellteilung (Cytokinese) ausüben, sowie deren inaktive Derivate zusammengefasst (Chen, 1997). Die natürlichen Cytokinine sind  $N^6$ -substituierte Adenin-Derivate. Als Substituenten kommen sowohl Isopentenyl- (Isopentenyladenin) als auch Benzylreste (Benzyladenin) vor. Der Isopentenylrest kann durch Hydroxylierung (Zeatine) und zusätzliche Hydrierung (Dihydrozeatine) modifiziert sein (vgl. Abb. 1 und Tab. 3). Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von weiteren Modifikationsmöglichkeiten an den Positionen 3, 7 und 9 des Adeninrings und an der Hydroxyl-Gruppe von Zeatin und Dihydrozeatin. Als Substituenten kommen hierfür Ribosyl- und Glukosylreste, aber auch Alanylreste in Frage. Ribosylderivate gelten zusammen mit den freien Basen (Isopentenyladenin, Zeatin und Dihydrozeatin) als aktive, Glukosylderivate als inaktive Cytokinine. Der O-Glukosylrest kann durch  $\beta$ -Glukosidase wieder abgespalten werden, wohingegen die  $N^9$ -Glukosylierung irreversibel ist (Mok und Mok, 2001). Für den Abbau sind Cytokininoxidasen verantwortlich, die ungesättigte  $N^6$ -Isoprenseitenketten abspalten (Galuszka et al., 2000). Die biologische Bedeutung der Vielfalt an Cytokinin und die Regulation der Umwandlung ineinander ist noch völlig unbekannt (Mok und Mok, 2001). Bisher ist es nur in Einzelfällen gelungen, eine bestimmte zellbiologische Reaktion mit einem bestimmten Cytokinin in Zusammenhang zu bringen (bspw. Peters et al., 1995). In Abb. 1 sind die bisher bekannten metabolischen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Cytokinin zusammengefasst.



**Abb. 1: Biosynthese und Metabolismus von Cytokinin in Pflanzen** (nach Chen et al., 1993; Astot et al., 2000; Kakimoto, 2001; Mok und Mok, 2001; Takei et al. 2001a) . Es sind nur die für die vorliegende Arbeit relevanten Cytokinine und Stoffwechselwege dargestellt. Für detailliertere Angaben wird auf die Literatur verwiesen.

Es gibt Hinweise, dass Cytokinine eine Rolle bei der Steuerung des Spross- und des Wurzelwachstums spielen. Aus Versuchen mit Brennesseln ist bekannt, dass bei exogener Cytokiningabe über die Wurzel das Spross-Wurzel-Verhältnis durch Veränderung der Assimilatverteilung zu Gunsten des Sprosses verschoben wird (Fetene und Beck, 1992).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Cytokininkonzentration in der Brennesselwurzel mit dem Spross-Wurzel-Verhältnis korreliert und von der Stickstoffversorgung abhängt (Wagner und Beck, 1993). Ein Zusammenhang zwischen Stickstoffversorgung und Cytokininkonzentration konnte auch bei Bohnen und Mais gefunden werden (Samuelson und Larsson, 1993; Takei et al., 2001b). Takei et al. (2002) konnten durch ihre Versuchsserie mit Mais zeigen, dass Cytokinine, genauer das Cytokinin Zeatinribosid, als Signal für den Stickstoffstatus der Wurzel an den Spross dienen. Das bei Stickstofflimitierung beobachtete verstärkte Wurzel- und verringerte Spross-Wachstum (Brouwer, 1962) wird demnach wahrscheinlich unter anderem durch Cytokinine reguliert. Der Zusammenhang zwischen Stickstoffversorgung und Cytokininen zeigt sich auch darin, dass die Nitratreduktase-Aktivität nicht nur durch Nitrat selbst, sondern auch durch Cytokinine stimuliert wird (Peters et al., 1995; Samuelson et al., 1995).

Cytokinine werden hauptsächlich in den Meristemzellen der Wurzelspitzen gebildet und mit dem Xylemsaftstrom im ganzen Spross verteilt (Letham, 1994; Takei et al., 2002). Außerdem mehren sich Hinweise, dass auch die meristematischen Gewebe des Sprosses zur Cytokininbiosynthese befähigt sind (Letham, 1994). Es gibt Befunde, die vermuten lassen, dass exogenes Cytokinin die Cytokininbiosynthese in Zellen stimulieren kann (Kuiper et al., 1989). In diesem Sinne könnte ein Cytokininsignal, das aus der Wurzel über den Xylemstrom transportiert wird, die Cytokininbiosynthese in Sprossmeristemen beeinflussen.

Die zweite hier zu besprechende Phytohormongruppe, die Auxine, sind sowohl Synergisten als auch Antagonisten der Cytokinine. Synergistisch wirken diese beiden Phytohormone bei der Zellteilung. Das antagonistische Zusammenwirken von Auxinen und Cytokininen bei der Differenzierung von Pflanzenzellen ist lange bekannt, wobei unterschiedliche Verhältnisse dieser beiden Phytohormone verschiedene morphogenetische Effekte auslösen (Letham, 1978). Ein ausgeglichenes Verhältnis der beiden Phytohormone hält die Zellen im undifferenzierten Zustand, während eine Erhöhung des Verhältnisses die Sprossbildung und eine Erniedrigung die Wurzelbildung fördert. Als Antagonisten wirken Cytokinine und Auxine auch bei der Ausbildung der Apikaldominanz zusammen. Während vom Apikalmeristem freigesetztes Auxin das Austreiben der darunter liegenden Seitenknospen hemmt, fördern die hauptsächlich aus der Wurzel stammenden Cytokinine deren Austreiben (Wickson und Thimann, 1958; Bangerth et al., 2000). Der Einfluss der beiden Hormone auf das Austreiben von Seitenwurzeln ist genau umgekehrt: Auxine fördern das Austreiben der Seitenwurzeln, höhere Konzentrationen an Cytokininen wirken hemmend (Maclsaak et al., 1989).

Das in Pflanzen am weitesten verbreitete Auxin ist die Indol-3-essigsäure (IES). Daneben kommen auch Phenyllessigsäure, Indolacrylessigsäure und halogenierte Derivate der Indolessigsäure vor, deren Bedeutung als Auxine aber untergeordnet zu sein scheint. Neben diesen natürlich vorkommenden Auxinen ist auch eine Vielzahl synthetischer Auxine, wie 2,4-

Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 1-Naphtylessigsäure und Indolbuttersäure, bekannt, die aufgrund ihrer im Vergleich zu IES höheren Stabilität oft bei Versuchen eingesetzt werden (Moore, 1989).

Als Ausgangsverbindung der Synthese von IES gilt L-Tryptophan. IES-Konjugate sind grundsätzlich inaktiv und werden, falls die Konjugation reversibel ist, als IES-Speicher betrachtet. IES wird oxidativ abgebaut, wobei wie bei der Biosynthese mehrere Reaktionswege nebeneinander existieren (Schneider und Wightman, 1978; Moore, 1989).

Der Transport der Auxine erfolgt von Zelle zu Zelle und mit Hilfe des Phloems. Der vom Stoffwechsel abhängige Auxintransport ist basipetal. Auxine werden also vom Sprossapex nach unten zur Sprossbasis und in die Wurzel transportiert und können in den Wurzelspitzen akkumulieren (Marschner, 1995; Estelle, 2001). Dadurch entsteht ein Konzentrationsgefälle in der Pflanze mit den höchsten Konzentrationen an der Sprossspitze und den niedrigsten an der Sprossbasis und im Wurzelbereich (Jackson, 1993).

### **Ausgangspunkt, Fragestellung und Versuchsansatz**

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms „Stoffwechsel und Wachstum der Pflanzen bei erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen“ angefertigt. Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Pflanzenwachstum auf der Ebene der Phytohormone besser zu verstehen. Als Versuchspflanze wurde gemäß den Vereinbarungen im genannten Schwerpunktprogramm Tabak der Sorte Samsun (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) verwendet. Aufgrund der eingangs dargestellten Erkenntnisse sollte speziell auf die Rolle der Cytokinine und der Indol-3-essigsäure bei der Wachstumssteuerung eingegangen und ihr Einfluss auf die Source-Sink-Beziehungen innerhalb der Tabakpflanzen untersucht werden.

In vorher gehenden Untersuchungen konnte das Wachstum von *Nicotiana tabacum* cv. Samsun durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration nur wenige Tage lang gesteigert werden. Bei diesen Versuchen waren die Pflanzen in 1 l-Töpfen angezogen worden. Durch Vergrößerung des Topfvolumens auf 4 l und verbesserte Nährlösungsgabe konnte die wachstumssteigernde Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration bis zu einem Pflanzenalter von etwa 35 d verlängert werden. Bei der Anzucht in hydroponischer Kultur produzierten die Pflanzen bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration während der gesamten vegetativen Wachstumsphase von 42 d absolut mehr an Biomasse als bei 350 ppm CO<sub>2</sub> (Düll, 1998). Allerdings haben hydroponisch angezogene Pflanzen grundsätzlich ein unnatürlich hohes Spross-Wurzel-Verhältnis, da sie deutlich kleinere Wurzeln ausbilden als Pflanzen in festem Substrat (Walch-Liu, 1998). Damit schien die hydroponische Anzucht der Pflanzen für die Untersuchung der Wachstumsregulation als ungeeignet.

Sowohl von 42 d alten Tabakpflanzen, die im 1 l-Topf angezogen worden waren, als auch von hydroponisch angezogenen Pflanzen waren in den vorher gehenden Untersuchungen bereits Cytokininkonzentrationen in verschiedenen Organen von Tabakpflanzen gemessen worden. Bei beiden Anzuchtweisen lagen die Cytokininkonzentrationen bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration deutlich unter den Konzentrationen der bei 350 ppm CO<sub>2</sub> angezogenen Pflanzen. Die Ursache dafür wurde beim 1 l-Topf darin gesehen, dass die wachstumsstimulierende Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration bereits vor diesem Zeitpunkt nachgelassen hatte. Obwohl bei hydroponisch angezogenen Tabakpflanzen des selben Alters der wachstumssteigernde Effekt noch anhielt, wurden auch hier bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration deutlich niedrigere Cytokininkonzentrationen gefunden als bei 350 ppm CO<sub>2</sub>. Dies wurde mit einer beschleunigten Entwicklung der bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration gewachsenen Pflanzen in Verbindung gebracht (Beck, 1999).

Aus den Ergebnissen dieser früheren Untersuchungen folgten die Fragestellungen für die vorliegende Arbeit:

1. Kann die steigernde Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum von Tabakpflanzen noch verlängert werden? Und welchen Einfluss hat der Wurzelraum auf die Ausprägung des Hoch-CO<sub>2</sub>-Effekts?
2. Werden die Source-Sink-Beziehungen innerhalb der Tabakpflanzen durch ein anhaltend gesteigertes Wachstum bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration verändert?
3. Welche Bedeutung haben die Phytohormone Cytokinin und Indol-3-essigsäure bei einem durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration anhaltend gesteigerten Wachstum?
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Cytokinine und der Indol-3-essigsäure in den verschiedenen Organen der Tabakpflanzen und den Source-Sink-Beziehungen?

Zur Klärung dieser Fragen sollte folgendermaßen vorgegangen werden:

1. Zunächst sollte bei kontinuierlicher Nährlösungsgabe der Einfluss der Topfgröße, d. h. des Wurzelraumvolumens, auf das Pflanzenwachstum bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> untersucht werden. Dadurch sollte die minimale Topfgröße herausgefunden werden, bei der gerade kein hemmender Einfluss des Wurzelraumvolumens auf das Wachstum bei beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten mehr feststellbar ist. Ziel war dabei, die Wachstumsstimulierung durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration bis zum Ende der vegetativen Wachstumsphase zu verlängern.
2. Zur Analyse der Source-Sink-Beziehungen in Tabakpflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, sollte exemplarisch die Pflanzen interne Verteilung der Photoassimilate von drei Blättern verschiedenen Alters und verschiedener physiologischer Funktion (Source-Blatt, Sink-Blatt und Blatt im Sink-Source-Übergang) mit Hilfe der <sup>14</sup>C-Markierung untersucht werden.

3. Die wichtigsten Cytokinine und Indol-3-essigsäure sollten bei möglichst noch anhaltend gesteigertem (700 ppm CO<sub>2</sub>) und bei nicht gesteigertem Wachstum (360 ppm CO<sub>2</sub>) in verschiedenen Pflanzenorganen analysiert werden. In der entsprechenden Arbeitshypothese eines anhaltend gesteigerten Wachstums wurde postuliert, dass die durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration bedingte gesteigerte Biomasseproduktion nur so lange anhält, wie auch die Phytohormonspiegel mindestens diejenigen Konzentrationen erreichen, die auch beim Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> vorliegen. Damit sollten auch Korrelationen zwischen den Phytohormonkonzentrationen in den Sink-Organen und der jeweiligen Sink-Stärke aufgespürt werden. Darüber hinaus wurden Hinweise auf einen eventuellen Zusammenhang des Phytohormonhaushalts mit dem Nährsalzstatus der Pflanzen und den Bedingungen im Wurzelraum erwartet. Zum Vergleich der Phytohormonhaushalte von Tabakpflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> gewachsen waren, sollten die Cytokininkonzentrationen und -gehalte zu drei verschiedenen Zeitpunkten während des vegetativen Wachstums bestimmt werden. Zur Beurteilung des Cytokininhaushalts sollten auch die Cytokininkonzentrationen der Xylemsäfte und die Massenflüsse von der Wurzel zum Spross quantifiziert werden.
4. Anhand der Phytohormonstudien und der Untersuchung der Assimilatverteilung sollte es möglich sein, Zusammenhänge zwischen den Phytohormonen und den Source-Sink-Beziehungen zu erkennen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Pflanzenanzucht

Alle Untersuchungen wurden an *Nicotiana tabacum* L. c.v. Samsun durchgeführt. Die Tabakpflanzen wurden in zwei begehbaren Klimakammern (*York international*, Rauminhalt ca. 11,5 m<sup>3</sup>) mit einem Hell-/ Dunkelrhythmus von 14 h / 10 h bei einer Temperatur von 25 °C / 20 °C und einer Taupunkttemperatur von 19 °C / 16 °C (entspricht einem Wasserdampfdrucksättigungsdefizit  $\Delta w$  von 8,3 Pa·kPa<sup>-1</sup> / 3,8 Pa·kPa<sup>-1</sup>) angezogen. Die durchschnittliche Strahlungsintensität betrug an der Topfoberkante 700  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Lichtsensor: Quantum, *LI-COR Inc. Lincoln*, Nebraska, USA). Zur Dunkelphase zählten zwei halbstündige Dämmerungsphasen, in denen die 42 Lampen (*EYE Iwasaki* Typ MT 400 DL/BH, Japan) in vier Stufen an- bzw. ausgeschaltet wurden. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Kontrollkammer entsprach der Konzentration der Außenluft (ca. 360 ppm); in der anderen Kammer wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration dauernd bei 700 ppm gehalten.

Die Samen wurden in durchsichtige Kunststoffschachteln (*Phytatray II*, *Sigma* oder Fleischsalatdosen) auf Nähr-Agar ausgesät. 100 ml Agar enthielten 0,5 g Murashige-Skoog-Medium (*Sigma*) und 0,5 g Agar (*Sigma*). Der pH-Wert wurde mit 1 N Natronlauge auf 5,7 eingestellt. Zur Vermeidung von Pilzbefall wurde Aktivkohle bis zur Lichtundurchlässigkeit zugegeben. Direkt nach der Aussaat wurden die Schachteln verschlossen und zur Samenkeimung in die Klimakammern mit der entsprechenden CO<sub>2</sub>-Konzentration gebracht. Zur Schattierung der Keimlinge wurden die geschlossenen Schachteln mit einer Matte (Maschenweite 8 mm) abgedeckt. Nach einer Woche Keimzeit wurden die Schachteln täglich kurz geöffnet, um für ausreichende Luftzufuhr zu sorgen.

Nach dem vollständigen Entfalten der Keimblätter nach zwölf bis vierzehn Tagen wurden die Keimlinge in Kunststofftöpfe vereinzelt. Die Töpfe waren mit gewaschenem Quarzsand (Körnung 0,7 bis 1,2 mm; *Zapf*, Bayreuth) gefüllt. Vor dem Einpflanzen war der Sand mit einem Topfvolumen vollentsalztem Wasser und einem halben Topfvolumen 1 : 4 verdünnter Nährlösung gespült worden. Die Zusammensetzung der Nährlösung ist Tab. 1 zu entnehmen. Die Gesamtkonzentration an Stickstoff in Form von Nitrat betrug 12 mM. Über die Töpfe wurde zur Feuchthaltung und zum Schutz der jungen Tabakpflanzen vor Lichtschäden Frischhaltefolie gespannt (Dertinger, 2001).



**Tab. 1: Zusammensetzung der Nährlösung für die Anzucht von *Nicotiana tabacum* L.** (Epstein, 1972; Lauerer, 1996).

Nährsalze	Konz. (mM)	Spurenelemente	Konz. ( $\mu\text{M}$ )
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3	KCl	50
$\text{KNO}_3$	4	$\text{H}_3\text{BO}_3$	20
$\text{MgSO}_4$	2	$\text{MnSO}_4$	2
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	4	$\text{ZnSO}_4$	2
$\text{CaSO}_4$	4	$\text{CuSO}_4$	0,5
Fe-EDTA	0,02	$\text{MoO}_3$	0,5
pH 6,0 mit 7,1 % $\text{H}_2\text{SO}_4$ (1 ml auf 1 l Nährlösung)			

Nach zwei Tagen wurde die Folie entfernt und für weitere 12 Tage durch eine Schattiermatte ersetzt, die die Strahlungsintensität auf ungefähr  $200 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf Pflanzenhöhe senkte. Von nun an wurde den Pflanzen mittels Schlauchpumpen (IPC-N, *Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH*, Wertheim, Deutschland) kontinuierlich Nährlösung zugetropft. Die Konzentration und Menge der Nährlösung richteten sich nach der Pflanzen- und der Topfgröße. Da junge Tabakpflanzen sehr salzempfindlich sind (Marschner, 1995), wurden sie während der ersten zehn bis vierzehn Tage mit halbkonzentrierter Nährlösung versorgt. Um täglich einen vollständigen Austausch des Bodenwassers mit Nährlösung zu erreichen, wurde pro Tag das Volumen des im Topf enthaltenen Bodenwassers als Nährlösung zugetropft, d. s. pro Liter des verwendeten Quarzsandes 300 ml (Lauerer, 1996). Um verschiedene Wuchsbedingungen durch Unterschiede in der Lichtintensität, der Luftzufuhr und der Temperatur innerhalb den Klimakammern auszugleichen, wurden die Pflanzen zweimal wöchentlich  $180^\circ$  um ihre Achse gedreht und die Plätze getauscht.

Für die Untersuchungen zur Wachstumslimitierung durch die Topfgröße wurden die Pflanzen in 1 l-, 5 l-, 10 l-, 15 l- und 20 l-Töpfe gepflanzt. Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs (vgl. Abschnitt 3.2) wurden die Phytohormongehalte und die Assimilatverteilung von Pflanzen in 15 l-Töpfen untersucht. Lediglich für die Cytokininbestimmungen im Xylemsaft wurden die Pflanzen aufgrund der vorgegebenen Größe des Passioura-Drucktopfes (vgl. Abschnitt 2.7.1.2) in 10 l-Töpfen angezogen. Damit die Internodien zwischen den ersten fünf Blättern dieser Pflanzen für den Passioura-Drucktopf ausreichend lang wuchsen, wurden ihnen nach der Entfernung der Frischhaltefolie statt der Schattiermatte 5 cm hohe, schwarze Schaumstoffisolierrohre mit einem Innendurchmesser von 2 cm übergestülpt, durch die die kleinen Pflanzen wuchsen.

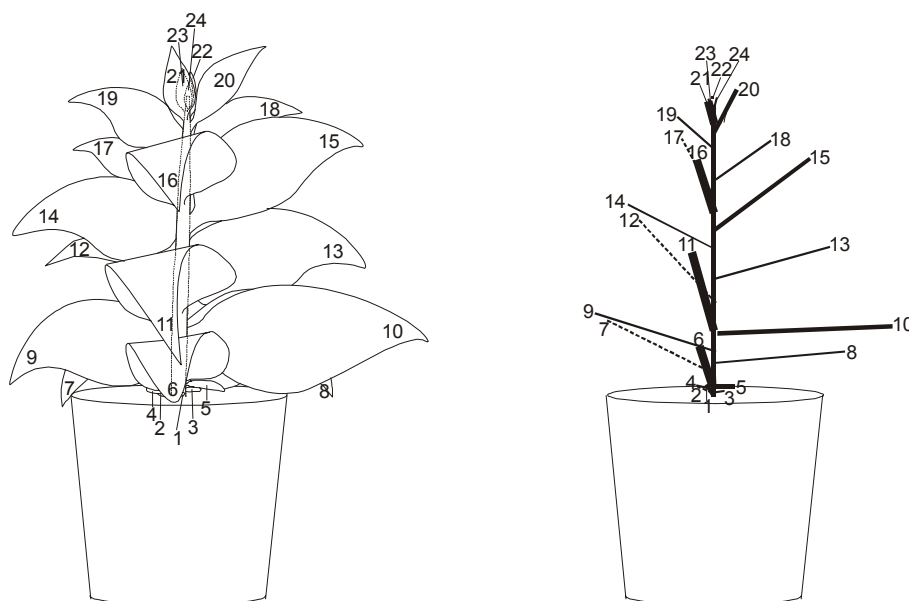
## 2.2 Morphometrie

Um das Wachstum der Pflanzen verfolgen und den Einfluss der beiden  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen darauf charakterisieren zu können, wurden die Blätter nach der zeitlichen Abfolge ihres

Erscheinens nummeriert (vgl. Abschnitt 2.2.1) und die Frisch- und Trockengewichte der untersuchten Pflanzen und Pflanzenteile und die Blattflächen bestimmt (vgl. Abschnitte 2.2.2 und 2.2.3). Daraus wurden die Parameter Spross-Wurzel-Verhältnis und spezifisches Blattgewicht berechnet. Die Variation des Pflanzenwachstums zwischen den Einzelpflanzen und den zeitlich aufeinanderfolgenden Anzuchten wurde durch die Festlegung des „physiologischen“ Alters (vgl. Abschnitt 2.2.4) anhand der Blattgrößen und Blattanzahl ausgeglichen. Die Geschwindigkeit des Biomassenzuwachs wurde durch die Berechnung der Relativen Wuchsrate bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.5).

### 2.2.1 Nummerierung der Blätter

Zur Definition der Blätter der Tabakpflanzen wurden diese nach der zeitlichen Abfolge ihres Erscheinens nummeriert. Dabei wurde mit dem ersten Folgeblatt nach den Keimblättern begonnen und jedes Blatt sofort nach dessen Erscheinen mitgezählt. In Abb. 2 ist die Nummerierung der Blätter einer 42 d alten Tabakpflanze exemplarisch dargestellt.



**Abb. 2: Nummerierung der Blätter.** Links: Zeichnung einer 42 d alten Tabakpflanze; rechts: schematische Darstellung der Blattstellung, wobei die Strichdicke die Ebene des Blattes wiedergibt.

### 2.2.2 Bestimmung der Trockengewichte und des Spross-Wurzel-Verhältnisses

Das Trockengewicht wurde routinemäßig nach dem Trocknen bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz bestimmt. Das Trockengewicht der Proben für die Messung der Phytohormongehalte und des Assimilattransports wurde nach deren Lyophilisierung bei 0,1 bar (Gefriertrocknung alpha 2-4, *Christ Gefriertrocknungsanlagen*, Aichach, Deutschland) gewogen. Die Spross-Wurzel-Verhältnisse wurden aus den Trockengewichten berechnet.

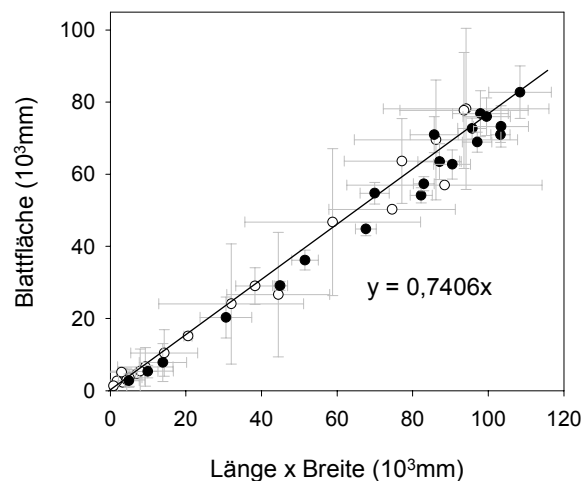
### 2.2.3 Bestimmung der Blattfläche und des Spezifisches Blattgewichts

Zur schnellen, routinemäßigen und nicht-invasiven Bestimmung der Blattflächen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der mit einem Areameter (*Delta-T Devices*, Bunwell, England) ermittelten Blattfläche und den einfach zu messenden Parametern Länge und maximale Breite eines Blattes hergestellt (vgl. Abb. 3). Die so bestimmte Formel entspricht der von Dertinger (2001) unter denselben Bedingungen (vgl. Abschnitt 2.1) in 1 l-Töpfen angezogenen Tabakpflanzen der selben Sorte und wurde generell für die Tabakpflanzen in allen Töpfen verwendet.

$$y = 0,74x, \quad \text{Gl. 1}$$

wobei  $x$  das Produkt aus Blattlänge und –breite und  $y$  die tatsächliche Blattfläche ist.

Zur Bestimmung des Spezifischen Blattgewichtes, dem Quotienten aus Blattgewicht und Blattfläche, wurden die Trockengewichte verwendet.



**Abb. 3:** Proportionaler Zusammenhang zwischen dem Produkt aus Länge und Breite eines Blattes und der mittels Areameter ermittelten Blattfläche für *Nicotiana tabacum* L. c.v. Samsun, angezogen in 15 l-Töpfen bei 360 ppm (○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5).

### 2.2.4 Bestimmung des „physiologischen“ Alters

Trotz sorgfältig überwachter Bedingungen für die Pflanzenanzucht (vgl. Abschnitt 2.1), waren Wachstumsunterschiede von Aussaat zu Aussaat und Variationen von Pflanze zu Pflanze festzustellen. Um die Untersuchungen der Phytohormongehalte und des Assimilattransportes immer an Pflanzen des gleichen „physiologischen“ Alters durchführen zu können, wurden zur Festlegung des Pflanzenalters die Blattanzahl und die Blattgröße (vgl. Abschnitte 2.2.1 und 2.2.3) herangezogen. Der Zusammenhang von Blattanzahl, Blattlänge und –breite und dem Pflanzenalter in beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ist in Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab. 2: Zusammenhang zwischen Blattanzahl und Alter bzw. zwischen Blattlänge und -breite (gerundete Werte) und Alter von Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>. Die Blätter wurden, wie in Abb. 2 dargestellt ist, gezählt. Blattlänge und -breite wurde von den jeweils größten Blättern bestimmt (28 d: 7. Blatt, 35 d: 8. Blatt, 42 d: 9. Blatt).**

Blattanzahl		Blattlänge x Blattbreite (mm x mm)		Pflanzenalter
360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	
11	12	105 x 80	130 x 100	<b>28 d</b>
15	16	170 x 125	195 x 145	<b>35 d</b>
22	23	210 x 180	250 x 200	<b>42 d</b>

### 2.2.5 Berechnung der Relativen Wachstumsrate

Die Relative Wachstumsrate (*RGR* = relative growth rate) gilt als Maß für die Geschwindigkeit der Biomasseproduktion einer Pflanze. Sie ist definiert als der Massenzuwachs (*dTG*) während einer Zeiteinheit (*dt*) bezogen auf die produzierende Biomasse (*TG<sub>0</sub>*) und wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$RGR = \frac{dTG}{dt} \cdot \frac{1}{TG} \approx \frac{\ln(TG_1 / TG_0)}{t_1 - t_0}, \quad \text{Gl. 2}$$

wobei *TG<sub>0</sub>* und *TG<sub>1</sub>* die Biomassen zu den Zeitpunkten *t<sub>0</sub>* und *t<sub>1</sub>* sind.

Die Relative Wachstumsrate wurde von der Aussaat bis zu einem Pflanzenalter von 61 d für beide CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bestimmt.

## 2.3 Gaswechselformen

Assimilationsraten einzelner Blätter 42 d alter Pflanzen wurden zum einen direkt in den Klimakammern bestimmt und zum anderen im Zuge der radioaktiven Markierung der Assimilate (vgl. Abschnitt 2.6.5). Die Transpirationsraten von Blättern und gesamten Pflanzen wurden von den Pflanzen bestimmt, die zur Xylemsaft-Gewinnung herangezogen wurden.

### 2.3.1 Assimilationsraten

Mit Hilfe des tragbaren Photosynthese-Messsystems HCM 1000 (*Heinz Walz GmbH*, Effeltrich, Deutschland) wurden die Nettphotosyntheseraten der Blätter 5 und 10 bei 35 d alten und der Blätter 10 und 15 bei 42 d alten Pflanzen unter Klimakammerbedingungen bestimmt.

Die Assimilationsrate wurde in einem offenen Gassystem bei den Lichtbedingungen der Klimakammern gemessen, wobei die Luft aus der Klimakammer durch eine 25 l-Flasche als Puffer angesaugt wurde. Ein intaktes Blatt wurde so in die Messküvette gespannt, dass es die gesamte Küvettenfläche ausfüllte. Der Massenfluss des in die Küvette fließenden Luftstroms und die darin und im ausfließenden Strom enthaltene CO<sub>2</sub>- und Wasserdampfmenge wurden im

Gerät von einem Absolut-/Differenzgas-Analysator (BINOS-100/4PS) mittels Differenzmessung bestimmt. Aus diesen Werten und der Blattfläche wurde direkt die Nettophotosyntheserate nach von Caemmerer und Farquhar (1981) berechnet und ausgegeben.

### 2.3.2 Transpirationsraten

Um für die Xylemsaft-Gewinnung (vgl. Abschnitt 2.7.1.2) zumindest einen Anhaltspunkt für die Geschwindigkeit des Xylemsaft-Flusses zu haben, wurden die Transpirationsraten sowohl der gesamten Tabakpflanze in Vorversuchen als auch von einzelnen Blättern direkt vor der Xylemsaft-Gewinnung bestimmt.

Die Gesamttranspiration wurde anhand des Gewichtsverlustes der Pflanze ermittelt (Kruse et al., 2002). Dazu wurde die kontinuierliche Versorgung mit Nährlösung abgebrochen und die Pflanze in der jeweiligen Klimakammer in einen Untertopf gestellt. Die Sandoberfläche und der Untertopf wurde mit Alufolie bedeckt, um Evaporation zu vermeiden. Die Transpiration entsprach dem Gewichtsverlust während der Messzeit.

Die Messung der Transpiration einzelner Blätter erfolgte mit Hilfe eines *Steady State* Porometers (Modell LI-1600 *Steady State* Porometer, *LI-COR Inc. Lincoln*, Nebraska, USA; Schulze et al., 1982) immer unmittelbar vor der Gewinnung des Xylemsaftes. Dazu wurde ein Blatt so in die Messküvette eingespannt, dass es die Küvettenfläche vollständig ausfüllte. Das Gerät misst die Transpiration dieser Blattfläche, indem es die Luftfeuchte im System durch quantifizierte Zugabe trockener Luft konstant hält.

## 2.4 Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts

Die Anteile von Kohlenstoff und Stickstoff am Blatttrockengewicht wurden exemplarisch mit einem Elementaranalysator (CHN-O-Rapid, *Elementar Analysesysteme GmbH*, Hanau) am Bitök (Bayreuther Institut für terrestrische Ökosystemforschung) bestimmt. Dazu wurden die getrockneten Blätter in einer Kugelmühle (Schwingmühle MM2000, *Retsch GmbH & Co. KG*, Haan) homogenisiert und in Zinnschiffchen eingewogen. Im Analysator wurden die Proben bei 900 °C in O<sub>2</sub>-Atmosphäre verbrannt, das Gasmisch bei 600 °C reduziert, durch Silicagelsäulen in CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> getrennt und die Konzentrationen mittels eines Wärmeleitfähigkeit-detektors bestimmt (Nachweisgrenzen: C: 28 µg, N: 10 µg). Als Standard wurde Acetanilid mit einem C-Anteil von 71,09 % und einen N-Anteil von 10,36 % eingesetzt.

## 2.5 Untersuchungen zur Limitierung des Wurzelraumes

Um Limitierung des Pflanzenwachstums durch begrenzten Wurzelraum zu vermeiden, wurde zu Beginn der Arbeit der Einfluss des Topfvolumens auf das Wachstum der Tabakpflanzen sowohl bei 360 ppm als auch bei 700 ppm CO<sub>2</sub> untersucht. Dazu wurden in drei zeitlich aufeinander

folgenden Anzuchten insgesamt je fünf Pflanzen in 1 l-, 5 l-, 10 l- und 15 l-Töpfe gepflanzt und drei Pflanzen in 20 l-Töpfe (vgl. Abschnitt 2.1).

Die Ernte dieser Tabakpflanzen erfolgte 61 d nach der Aussaat der Samen. Dabei wurden die Trockengewichte der einzelnen Blätter, des Stängels einschließlich der Blattstiele und der Wurzel bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.2).

## 2.6 Untersuchung des Assimilattransports

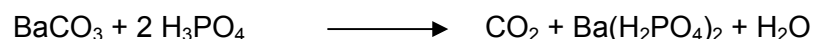
Zur Untersuchung des Assimilattransports in Tabakpflanzen wurden die Assimilate einzelner Blätter 42 d alter Pflanzen *in situ* durch Fixierung von  $^{14}\text{CO}_2$  radioaktiv markiert. Dazu wurde die in Abb. 5 beschriebene Apparatur verwendet. Der relativ kurzen Markierungsphase von 10 bis 20 Minuten Dauer (*pulse*) folgte eine relativ lange Verteilungsphase über mehrere Stunden bis Tage (*chase*).

Die Verteilung der Assimilate des 10., 15. und 20. Blattes (vgl. Abb. 2) wurde in Doppelproben untersucht. Um die für die Verteilung der Assimilate notwendige Zeit zu bestimmen, wurde die Verteilungsdauer der Assimilate des Blattes 10 von 10 h (über Nacht) bis 48 h (2 Tage) variiert. Außerdem wurde die Gleichmäßigkeit der Markierung der großen Blätter 10 überprüft. Dazu wurde sofort nach der Applikation des  $^{14}\text{CO}_2$  je eine Pflanze der beiden Anzuchsbedingungen geerntet und das radioaktiv markierte Blatt 10 in 10 Sektoren unterteilt, deren Radioaktivität einzeln bestimmt wurde. Ein Unterschied im  $^{14}\text{C}$ -Gehalt zwischen den einzelnen Sektoren eines Blattes konnte nicht festgestellt werden.

Anhand dieser Versuche mit 0 h Verteilungszeit konnte außerdem die Qualität der mit diesem System gemessenen Assimilationsraten bestimmt werden. Dazu wurde die im Blatt enthaltene Radioaktivität mit der Radioaktivität verglichen, die nach Berechnung der Photosyntheserate im Blatt zu erwarten war. Die berechneten Radioaktivitäten wichen von den gemessenen um  $\pm 20\%$  ab.

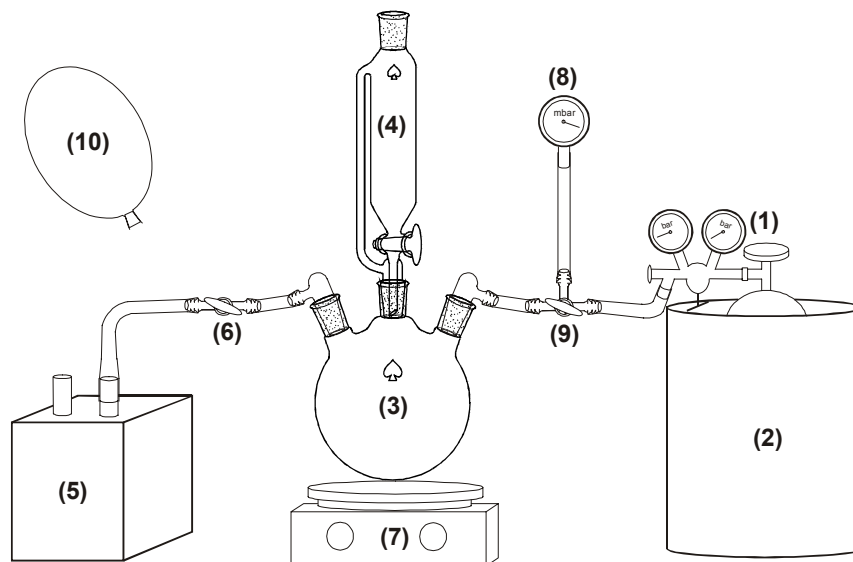
### 2.6.1 Herstellung von $^{14}\text{CO}_2$

Das für die Markierung benutzte  $^{14}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Gasgemisch wurde aus einer Mischung von  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  (Amersham Buchler GmbH & Co KG) und  $\text{Ba}^{12}\text{CO}_3$  durch Zugabe von konzentrierter Phosphorsäure nach folgender Gleichung hergestellt:



Das  $\text{CO}_2$ -Gasgemisch wurde in der in Abb. 4 dargestellten Apparatur entwickelt und in einer 1 l-Gasdruckflasche gefroren. Dazu wurde die Gasdruckflasche (1) evakuiert, in flüssigem Stickstoff gekühlt und an den Dreivegehahn (9) angeschlossen. In die auf Dichte geprüfte Glasapparatur wurden im Reaktionskolben (3) 8,81 g (44,6 mmol)  $\text{BaCO}_3$  vorgelegt und mit etwas bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt. 17,48 mg (87,7  $\mu\text{mol}$ ) davon waren  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  (spezifische Radioaktivität: 286  $\text{mCi}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Entsprechend wurden 5,05  $\text{mCi}$  eingesetzt.). In den

Tropftrichter (4) wurden 50 ml 85%ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$  eingefüllt. Die Glasapparatur wurde ohne Gasdruckflasche langsam unter Vakuum gesetzt bis das Wasser zu sieden begann. Dann wurde das System durch Schließen des Hahns (6) geschlossen. Unter Rühren wurde langsam (1 Tropfen in 2 s)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zugetropft und der Druckanstieg (8) durch das sich entwickelnde  $\text{CO}_2$  beobachtet. Kurz vor Erreichen des Atmosphärendrucks im System wurde der Dreiwegehahn (9) zur Gasflasche hin und die Gasdruckflasche selbst geöffnet, damit das  $\text{CO}_2$  in der stickstoffgekühlten Flasche ausfrieren konnte.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  wurde so lange zugetropft, bis die Lösung im Dreihalskolben klar war, das  $\text{BaCO}_3$  also vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  umgesetzt war. Die Vakuumpumpe (5) wurde nun entfernt, das Reaktionssystem mit dem mit  $\text{N}_2$  gefüllten Luftballon (10) verbunden und mit etwa 3 l  $\text{N}_2$  gespült, bevor die Gasflasche zugeht und sie dann mit  $\text{N}_2$  auf 10 bar Überdruck gesetzt wurde. Nach Erreichen der Raumtemperatur war das Gasgemisch in der Druckflasche einsatzbereit.

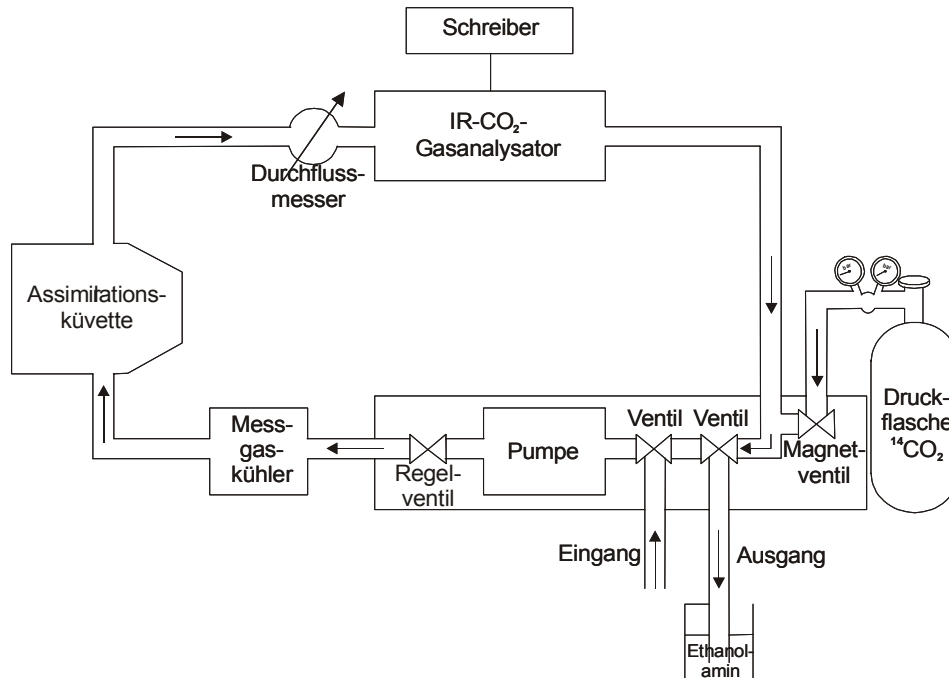


**Abb. 4: Schematische Darstellung der Apparatur zur Herstellung des  $^{14}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Gasgemisches.** (1) Gasdruckflasche mit Druckminderer, (2) Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff, (3) Reaktionskolben, (4) Tropftrichter, (5) Vakuumpumpe, (6) Zweiwegehahn, (7) Magnetrührer, (8) Druckmesser, (9) Dreiwegehahn, (10) Ballon mit gasförmigem Stickstoff (zum Anschluss an (6)).

### 2.6.2 Markierung mit $^{14}\text{CO}_2$

Das  $^{14}\text{CO}_2$  wurde dem Tabakblatt in einem geschlossenen Gaskreislaufsystem appliziert. Die Apparatur ist schematisch in Abb. 5 dargestellt und entspricht im wesentlichen der von Fetene et al. (1993) beschriebenen. Sie besteht aus einer Pumpe, die den Luftstrom im System erzeugt; der Durchfluss kann durch ein Regelventil gesteuert werden. Mit Hilfe zweier weiterer Ventile kann der Gaskreislauf geschlossen oder geöffnet werden. Ein Magnetventil erlaubt die Zugabe des  $^{14}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Gasgemisches aus der Gasdruckflasche. Zur Regelung der Luftfeuchte im System ist ein Messgaskühler (MKC 4, *Walz Mess- und Regeltechnik*, Effeltrich, Deutschland) in den Gaskreislauf eingebaut. Zur kontinuierlichen Messung der  $\text{CO}_2$ -Konzen-

tration dient ein Infrarot-Gasanalysator (IRGA; Binos 1.1, *Leybold-Heraeus GmbH*, Hanau, Deutschland), der der Assimilationskammer nachgeschaltet ist und dessen Daten durch einen Schreiber aufgezeichnet werden. Zur Überprüfung des Durchflusses dient ein Durchflussmesser.



**Abb. 5:** Schema der Apparatur zur  $^{14}\text{CO}_2$ -Markierung der Assimilate eines Blattes.

Zur Markierung der Assimilate eines Blattes an der Tabakpflanze wurde die Pflanze unter einen mit zwei Klimakammerlampen (EYE *Iwasaki* Typ MT 400 DL/BH, Japan) beleuchteten Abzug gestellt. Nach einer halbstündigen Akklimatisierung der Pflanze an die Bedingungen außerhalb der Klimakammer wurde das Versuchsblatt in eine passende Assimilationskammer aus Plexiglas gasdicht eingekittet und die Dichtheit durch Kontrolle des Gasflusses kontrolliert. Die Lichtstärke in der Kuvette lag in Abhängigkeit von der Höhe des Versuchsblattes zwischen 450 und 600  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die relative Luftfeuchte im System wurde mittels des Messgaskühlers auf 70 % relative Luftfeuchte eingeregelt. Das bis dahin offene System wurde durch Schließen der Ventile am Eingang und am Ausgang des Gaskreislaufs geschlossen und die Abnahme der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im System durch die Assimilation des Blattes am IRGA verfolgt. Durch wiederholtes kurzes Öffnen des Magnetventils zur Vorratsgasflasche wurde je nach Assimilationsrate 10 bis 20 min lang die  $\text{CO}_2$ -Konzentration entsprechend der Anzuchtbedingungen auf 360 ppm bzw. 700 ppm ( $\pm 50$  ppm)  $\text{CO}_2$  konstant gehalten. Am Ende der Applikation wurde kein  $\text{CO}_2$  mehr in das System gegeben. Wenn die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im System unter 200 ppm gefallen war, wurde das System geöffnet und das Gas zur Ausfällung des restlichen  $^{14}\text{CO}_2$  etwa 5 min lang durch Ethanolamin geleitet. Dann wurde die Kuvette entfernt und die Pflanze zur Verteilung der markierten Assimilate in die Klimakammer zurückgestellt. Über die Pflanze wurde eine Glocke aus Plexiglas gestellt, durch die mit Hilfe



einer Membranpumpe ein leichter Luftstrom gesaugt wurde. Diese Luft wurde durch Ethanolamin geleitet, um exhaltes radioaktives CO<sub>2</sub> aufzufangen.

### 2.6.3 Probennahme

Nach der jeweiligen Verteilungszeit der Assimilate aus dem markierten Blatt wurden die Blätter, die Internodien, der Apex und die Wurzel der Tabakpflanze, wie in Abschnitt 2.2.2 bereits beschrieben wurde, einzeln abgeschnitten bzw. im Fall der Wurzel vom Sand befreit, jeweils sofort gewogen und in Aluminiumtüten in flüssigem Stickstoff gefroren, bevor die Proben bei 0,1 bar Unterdruck gefriergetrocknet wurden (Gefrier Trocknung alpha 2-4, *Christ-Gefrier-trocknungsanlagen*, Aichach, Deutschland). Bis zur Messung der Radioaktivität in den einzelnen Pflanzenteilen wurden die getrockneten Proben im Exsikkator aufbewahrt.

### 2.6.4 Bestimmung des <sup>14</sup>C-Gehaltes

Die lyophilisierten Proben wurden nach Bestimmung der Trockengewichte in einer Kugelmühle (Schwingmühle MM2000, *Retsch GmbH & Co. KG*, Haan, Deutschland) homogenisiert. Etwa 20 mg des Probenpulvers wurden in Faltenfilter (Durchmesser 50 mm) eingewogen und jeweils Doppelproben in einem Veraschungsautomaten (Sample-Oxidizer Modell 307, *Packard BioScience GmbH*, Dreieich, Deutschland) verbrannt. Das bei der Veraschung entstehende CO<sub>2</sub> wurde automatisch quantitativ in 5 ml Carbosorb E<sup>+</sup> (*Packard BioScience GmbH*) absorbiert und mit einer Szintillationslösung (7 ml Permafluor E, *Packard BioScience GmbH*) versetzt. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (Tri-Carb 2900TR, *Packard BioScience GmbH*) gemessen. Um die Qualität der Verbrennung und der Absorption des CO<sub>2</sub> zu überprüfen, wurde vor der Veraschung jeder Pflanze ein radioaktives und ein nicht-radioaktives Standard-Präparat (Spec-Chec<sup>TM</sup>-<sup>14</sup>C und Spec-Chec<sup>TM</sup>-non radioactive, *Canberra-Packard GmbH*, Frankfurt/Main) verbrannt und die Wiederfindungsrate und der „Memory-Effekt“ des Gerätes bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen bei allen Versuchen zwischen 92 % und 98 %; der „Memory-Effekt“ lag stets unter 2 %.

Die mit Hilfe des Szintillationszählers gemessenen Radioaktivitäten der Doppelproben wurden gemittelt, auf das gesamte Pflanzenorgan hochgerechnet und als Anteil der insgesamt inkorporierten Radioaktivität in Prozent ausgedrückt. Das während der Verteilungszeit exhaltes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wurde in diese Berechnungen nicht mit einbezogen. Sein Anteil lag unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration bei allen Untersuchungen zwischen 3 und 6 % des insgesamt wiedergefundenen.

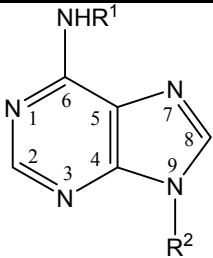
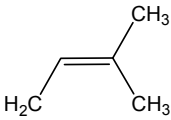
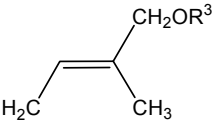
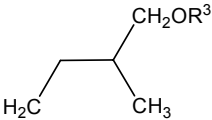
### 2.6.5 Berechnung der Assimilationsraten während der radioaktiven Markierung

Die Assimilationsraten des Blattes während der radioaktiven Markierung konnten aufgrund der mittels Schreiber aufgezeichneten CO<sub>2</sub>-Abnahmeraten aus den Steigungen der CO<sub>2</sub>-Messkurven ermittelt werden (vgl. Abschnitt 2.6.2).

## 2.7 Bestimmung der Phytohormongehalte

Es wurden die Gehalte der wichtigsten Vertreter der Cytokinine, nämlich Zeatin, Dihydrozeatin und Isopentenyladenosin, und einige ihrer Konjugate, sowie der freien Indol-3-essigsäure (IES) als wichtigstes Auxin bestimmt. Eine Übersicht über die analysierten Cytokinine, deren Strukturformeln und die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen (nach McGaw, 1987; Wagner und Beck, 1993) gibt Tab. 3. Die Phytohormone wurden im Apex, in den Sink-Blättern, im Stängel, in einem Source-Blatt und in der Wurzel von 28 d, 35 d und 42 d (bei den Cytokininen) und von 35 d (bei der IES) alten Pflanzen analysiert (vgl. auch Tab. 4), also in der vegetativen Tabakpflanze noch vor Ausbildung der Blütenknospen. Außerdem wurden die Cytokiningehalte im Xylemsaft 35 d alter Pflanzen bestimmt.

**Tab. 3: Die Strukturformeln der untersuchten Cytokinine und die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen** (McGaw, 1987; Wagner und Beck, 1993).

				
R¹	R²	R³	Trivialname	Abkürzung
	H	-	Isopentenyladenin	<b>IP</b>
	Ribosyl	-	Isopentenyladenosin	<b>IPA</b>
	Ribotid	-	Isopentenylnukleotid	<b>IPN</b>
	H	H	<i>trans</i> -Zeatin	<b>Z</b>
	Ribosyl	H	<i>trans</i> -Zeatinribosid	<b>ZR</b>
	Ribotid	H	<i>trans</i> -Zeatinnukleotid	<b>ZN</b>
	Glukosyl	H	<i>trans</i> -Zeatin-9-glukosid	<b>Z9G</b>
	H	Glukosyl	<i>trans</i> -Zeatin-O-glukosid	<b>ZOG</b>
Ribosyl	Glukosyl	<i>trans</i> -Zeatinribosid-O-Glukosid	<b>ZROG</b>	
	H	H	Dihydrozeatin	<b>DHZ</b>
	Ribosyl	H	Dihydrozeatinribosid	<b>DHZR</b>
	Ribotid	H	Dihydrozeatinnukleotid	<b>DHZN</b>
	Glukosyl	H	Dihydrozeatin-9-Glukosid	<b>DHZ9G</b>
	H	Glukosyl	Dihydrozeatin-O-Glukosid	<b>DHZOG</b>
	Ribosyl	Glukosyl	Dihydrozeatinribosid-O-Glukosid	<b>DHZROG</b>

Die einzelnen Schritte der Phytohormonanalyse sind in Abb. 6 zusammengefasst. IES und die Cytokinine wurden aus dem selben gereinigten Extrakt bestimmt (Lee et al., 1989; Fernández et

al., 1995). In Abschnitt 2.7.4 wird auf die Bestimmung der Cytokinine eingegangen und in Abschnitt 2.7.5 die IES-Quantifizierung erläutert.

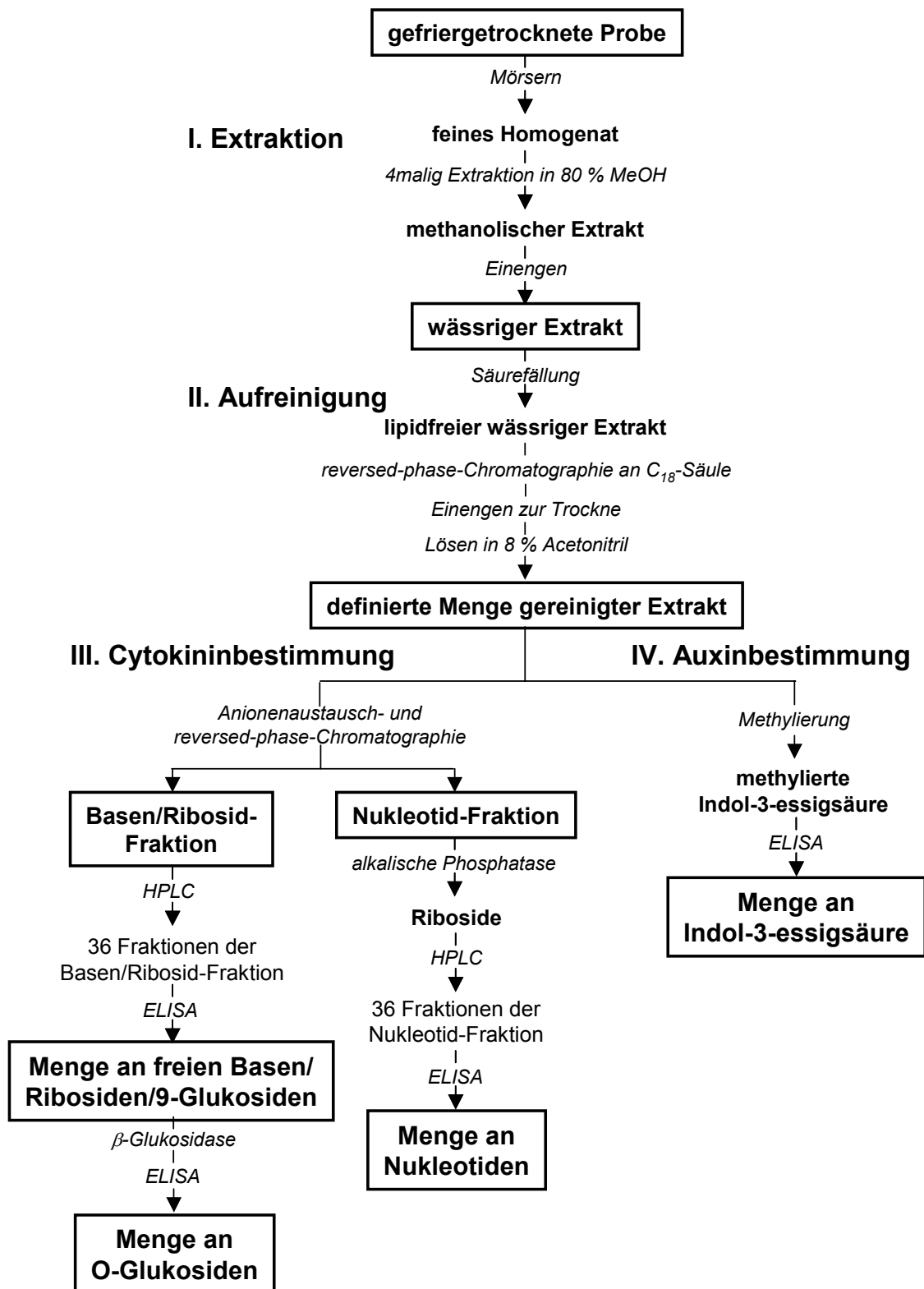


Abb. 6: Schema der Phytohormonanalyse.

### 2.7.1 Probennahme

Die Probennahme für die Phytohormonanalysen erfolgte immer in der Mitte der Lichtphase, um Schwankungen der Gehalte aufgrund von tageszeitlichen Änderungen zu vermeiden (Beck und Wagner, 1994). Die Phytohormongehalte wurden in den in Tab. 4 definierten Pflanzenteilen bestimmt. Als Apex wurde die Spitze des Sprosses mit den ihn noch fest umschließenden Blättchen untersucht; zur Sink-Blätter-Probe einer Pflanze wurden deren drei kleinste entfaltete Blätter an der Sprossspitze zusammengefasst; als Source-Blatt wurde das jeweils größte Blatt herangezogen; die Blattstiele wurden zum Stängel gezählt. Außerdem wurden die Cytokiningehalte im Xylemsaft 35 d alter Pflanzen am Blatteingang ins Source-Blatt und am Stängel über Blatt 4 in den gesamten Spross untersucht.

**Tab. 4:** Übersicht über die auf Phytohormongehalte untersuchten Pflanzenteile und die mindestens eingesetzten Frischgewichte. In den Xylemsäften wurden lediglich die Cytokinine analysiert.

Organ	Pflanzenalter						mindestens eingesetztes Frischgew. (g)
	28 d		35 d		42 d		
	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	
<b>Apex</b>	Sprossspitze einschließlich der noch eng anliegenden Blättchen						0,2
<b>Sink-Blätter</b>	Blatt 9-11	Blatt 10-12	Blatt 13-15	Blatt 14-16	Blatt 20-22	Blatt 21-23	0,3
<b>Stängel</b>	gesamter Stängel einschließlich aller Blattstiele						10
<b>Source-Blatt</b>	Blatt 7		Blatt 8		Blatt 9		15
<b>Wurzel</b>	gewaschene Wurzel						15
<b>Xylemsäfte</b>	zu Blatt 8, zum Spross						

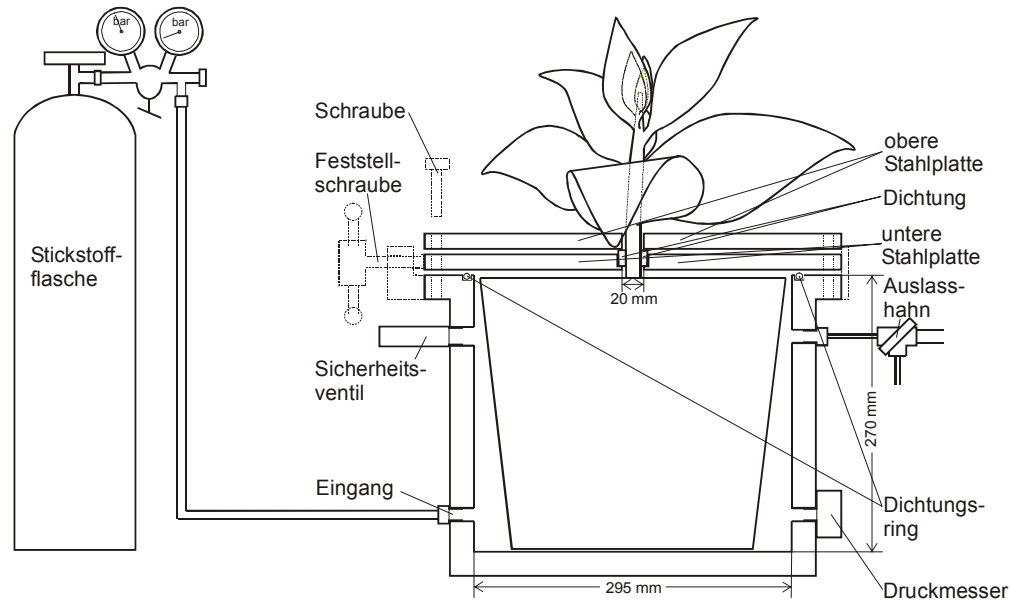
#### 2.7.1.1 Ernte der Pflanzenorgane

Source-Blatt, Sink-Blätter, Apex und Stängel wurden nacheinander abgeschnitten, die Frischgewichte und bei den Blättern Länge und Breite sofort bestimmt, die Proben in Aluminiumtüten in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und darin gelagert. Die Wurzel wurde zügig, aber sorgfältig aus dem Quarzsand gewaschen, mit Zellstoff abgetrocknet, gewogen und ebenfalls in Aluminiumtüten in Stickstoff gefroren. Nach der Lyophilisierung bei 0,1 bar wurden die Proben bei -40 °C gelagert.

#### 2.7.1.2 Xylemsaft-Gewinnung

Zur Gewinnung von Xylemsaft einer Pflanze wurde ihr Wurzelsystem im Topf in einem Passioura-Drucktopf (vgl. Abb. 7, Passioura, 1980) unter Druck gesetzt und das jeweilige Ziel-

organ des Xylemstroms, der ganze Spross oder ein Source-Blatt, abgeschnitten (Gollan et al., 1992). In dem Passioura-Topf fand gerade ein 10 l-Topf Platz; der Durchmesser der kleinsten Aussparung der oben aufliegenden Stahlplatten beschränkte die Größe bzw. das Alter der Pflanzen auf 35 d.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des verwendeten Passioura-Drucktopfs mit Tabakpflanze. Die gestrichelt dargestellten Teile des Passioura-Drucktopfes liegen außerhalb der Schnittebene.

Für ein dichtes Einspannen der Pflanze in den Drucktopf war ein möglichst glatter, mindestens 40 mm langer, unverletzter Stängel notwendig. Dafür wurden die untersten vier Blätter am Vortag der Xylemsaft-Gewinnung entfernt. Am Messtag wurde die Pflanze in der Mitte der Lichtphase in der Klimakammer in den Drucktopf gestellt. Der glatte Stängel wurde mit Schliff fett eingeschmiert und die vier halben Stahlplatten über Kreuz aufgelegt und festgeschraubt. Als Dichtung zwischen dem Stängel und den unteren Platten dienten passend zugeschnittene halbierte Gummistopfen (vgl. Abb. 7).

Der Druck im Passioura-Topf wurde langsam mit Stickstoff erhöht. Er richtete sich nach der Transpiration des zu untersuchenden Pflanzenteils und wurde so eingestellt, dass der Transpirationssog etwas überkompensiert wurde (vgl. Abschnitt 2.3.2). Dann wurde zunächst oberhalb des zu entfernenden Pflanzenteils das Xylem angeschnitten und der Fluss kontrolliert, bevor das Pflanzenorgan abgetrennt wurde. Mit Hilfe von skalierten Glaskapillaren wurde die Geschwindigkeit des Xylemsaft-Flusses ermittelt und über den Druck innerhalb der ersten drei Minuten eingeregelt. Um Verunreinigung des Safts durch angeschnittene Zellen zu vermeiden, wurden die ersten 100  $\mu\text{l}$  des Saftes verworfen. Der Xylemsaft wurde über einen Zeitraum von 1 h gewonnen und ohne weitere Aufarbeitung bis zur Messung der Cytokinine (vgl. Abschnitt 2.7.4) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.7.2 Extraktion der Phytohormone aus den Pflanzenorganen

Die Phytohormone wurden mit 80 % wässrigem Methanol aus gefriergetrocknetem, gemörsertem Pflanzenmaterial extrahiert (Lee et al., 1989; Fernández et al., 1995). Am Ende der Extraktion stand eine wässrige Lösung möglichst geringen Volumens, aus der lipidartige Bestandteile durch Gefrieren im Sauren ausgefällt und abzentrifugiert wurden (vgl. Abb. 6 I; (Weiler, 1980; Palmer et al., 1981).

Die Menge an zur Analyse eingesetzter Probe wurde den sehr unterschiedlichen Konzentrationen der Cytokinine in den verschiedenen Pflanzenorganen (vgl. Tab. 4) angepasst (Letham und Palni, 1983). Erreichte ein Organ einer Pflanze nicht das für die Quantifizierung erforderliche Frischgewicht, wurde Material mehrerer Pflanzen zu einer Probe vereint, so bspw. je zehn Apizes zu einer Apex-Probe und die drei oberen kleinen Blätter von drei Pflanzen zu einer Sink-Blätter-Probe.

Da IES sehr lichtempfindlich ist erfolgte die Extraktion der Phytohormone stets im Dunkeln. Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial wurde zunächst mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zerrieben, das gefrorene Pulver quantitativ in ein Becherglas überführt und 80%iges wässriges Methanol zugegeben (10 ml pro Gramm Frischgewicht). Die Suspension wurde, durch Alufolie vor Licht und Verdunstung geschützt, 1 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt, dann über einen Büchner-Trichter unter Vakuum abfiltriert; der Extrakt bei 37 °C i.vac. bis auf etwa 1 ml eingeengt und eisgekühlt. Die Extraktion wurde dreimal wiederholt und die wässrigen Extrakte in einem Zentrifugenbecher vereint (Wagner und Beck, 1993). Zur Fällung der lipidartigen Bestandteile wurde der pH-Wert der wässrigen Lösung mit konzentrierter Essigsäure auf 3,5 abgesenkt und bei -20 °C tiefgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde der saure Extrakt gefroren gelagert.

### 2.7.3 Aufreinigung des Extrakts

Nach der Säurefällung der Lipidbestandteile wurden die Extrakte weiter mittels C<sub>18</sub>-reversed-phase-Säulen-Chromatographie gereinigt. Nach Elution der reversibel an das C<sub>18</sub>-Material bindenden Cytokinine und des Auxins wurde das Eluat zu deren Analyse aufgeteilt (vgl. Abb. 6 II).

Die C<sub>18</sub>-reversed-phase-Chromatographie-Säulen (3 ml C<sub>18</sub>-Material, Bakerbond spe; Baker, Groß-Gerau, Deutschland) wurden vor Gebrauch äquilibriert: Über Nacht wurden die Säulen in 100 % Methanol eingelegt, dann zweimal mit 5 ml 80 % Methanol und dreimal mit 5 ml bidestilliertem Wasser gespült. Eine Säule wurde nach Empfehlung des Herstellers für maximal 10 ml Extrakt verwendet.

Die angesäuerten, gefrorenen Extrakte wurden aufgetaut und bei 12000 rpm 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Palmer et al., 1981). Die Präzipitate wurden mit je 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde ebenso wie die Überstände abgenommen, mit 1 N NaOH neutralisiert (pH 7) und auf die äquilibrierten C<sub>18</sub>-Säule aufgetragen. Überstände und

Waschwasser tropfen ohne weiteres Zutun langsam, je nach Probe über mehrere Stunden hinweg, durch die Säulen. Die beladenen Säulen wurden mit 10 ml bidestilliertem Wasser gewaschen, bevor die Phytohormone mit 10 ml 80 % wässrigem Methanol in einen Rundkolben eluiert wurden. Die Eluate wurden bei 37 °C i.vac. bis zur Trockne eingeeengt und konnten so bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für die anschließende Messung der Cytokinine wurde das eingeeengte Eluat in 1 ml 80 % wässrigem Methanol aufgenommen. 100 µl davon wurden für die spätere Bestimmung der Indol-3-essigsäure abgenommen und im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

#### 2.7.4 Messung der Cytokinine

Die quantitative Analyse der in Tab. 3 aufgelisteten Cytokinine erfolgte immunochemisch mittels ELISA (Weiler, 1986; Weiler et al., 1986; Fußeder et al., 1988). Dazu standen drei verschiedene Antikörper aus Kaninchen gegen die Riboside der drei wichtigsten Cytokinine zur Verfügung, nämlich gegen *trans*-Zeatinribosid (ZR), Dihydrozeatinribosid (DHZR) und Isopentenyladenosin (IPA). Für die Bestimmung der anderen in Tab. 3 angeführten Cytokinine wurde die Kreuzreaktivität der polyklonalen Antikörper mit den freien Basen *trans*-Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP) und mit den 9-Glukosiden (vgl. Abschnitt 2.7.4.4) ausgenutzt.

Die Nukleotide *trans*-Zeatinnukleotid (ZN), Dihydrozeatinnukleotid (DHZN) und Isopentenyladenosin (IPN) (Nukleotid-Fraktion) wurden nach deren Abtrennung von den übrigen Cytokininenzymatisch in ihre Ribosid-Formen umgesetzt (vgl. Abschnitt 2.7.4.1) und als solche nach Aufreinigung mittels HPLC (vgl. Abschnitt 2.7.4.2) immunochemisch gemessen (vgl. Abschnitt 2.7.4.3).

Um die Cytokinine der Basen/Ribosid-Fraktion, die auch die Glukoside enthielt, einzeln quantifizieren zu können, mussten sie vor dem Immunoassay voneinander mittels präparativer HPLC getrennt werden (vgl. Abschnitt 2.7.4.2). Zu dieser Fraktion wurden folgende Cytokinine gezählt: die Basen *trans*-Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ), Isopentenyladenin (IP), die Riboside *trans*-Zeatinribosid (ZR), Dihydrozeatinribosid (DHZR), Isopentenyladenosin (IPA) und die Glukoside *trans*-Zeatin-9-Glukosid (Z9G), Dihydrozeatin-9-Glukosid (DHZ9G), *trans*-Zeatin-O-Glukosid (ZOG), *trans*-Zeatinribosid-O-Glukosid (ZROG), Dihydrozeatin-O-Glukosid (DHZOG) und Dihydrozeatinribosid-O-Glukosid (DHZROG). Da die O-Glukoside mittels präparativer HPLC nicht vollständig von den anderen Cytokininenzymatisch abgetrennt werden konnten, wurden die O-Glukosyl-Reste nach der immunochemischen Analyse der Basen/Ribosid-Fraktion durch  $\beta$ -Glukosidase abgespalten und dann mittels ELISA als freie Basen bzw. Riboside gemessen (vgl. Abschnitt 2.7.4.3).

### 2.7.4.1 Auftrennung in Nukleotid-Fraktion und in Basen/Ribosid-Fraktion

Für die Abtrennung der Nukleotide wurden pro Probe 1 g Anionentauscher-Harz DEAE Sephadex<sup>TM</sup> A 25 (*Amersham Pharmcia Biotech AB*, Uppsala, Schweden) 12 h lang in 5 ml bidestilliertem Wasser gequollen. Anschließend wurde das Material über einen Büchner-Trichter abfiltriert, mit 2 M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, gewaschen und 4 h lang in diesem Puffer belassen. Nach erneutem Abfiltrieren wurde der Anionentauscher in eine Säule gepackt und mit 20 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, äquilibriert. Da die Cytokinine der Basen/Ribosid-Fraktion bei pH 6,5 den Anionentauscher durchlaufen, wurde an jede Anionenaustausch-Säule eine kleine Säule mit 1,5 ml reversed-phase-C<sub>18</sub>-Material (Sep-Pak<sup>®</sup>, *Waters Corporation*, USA) luftblasenfrei gekoppelt, in der sie aufgefangen wurden. Diese C<sub>18</sub>-Säulen wurde zuvor mit 5 ml 100 % Methanol, 5 ml 80 % Methanol und 5 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, äquilibriert.

Die 900 µl des für die Cytokinanalyse vorgesehenen Extrakts (vgl. Abschnitt 2.7.3) wurden in 10 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, aufgenommen und auf das oben beschriebene Säulensystem aus Anionentauscher und C<sub>18</sub>-Säule (Sep-Pak<sup>®</sup>) aufgetragen. Xylemsaft-Proben wurden vor dem Aufbringen mit 40 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, auf 10 ml verdünnt. Nach dem Durchlauf des Probenvolumens wurde das System mit 30 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, gewaschen. Die am Sep-Pak<sup>®</sup> gebundenen Cytokinine der Basen/Ribosid-Fraktion wurden, nach zusätzlichem Waschen mit 5 ml bidestilliertem Wasser, mit 5 ml 80% Methanol eluiert, bei 37 °C i.vac. zur Trockne eingengt und bis zur weiteren Auftrennung bei -20 °C gelagert (vgl. Abschnitt 2.7.4.2).

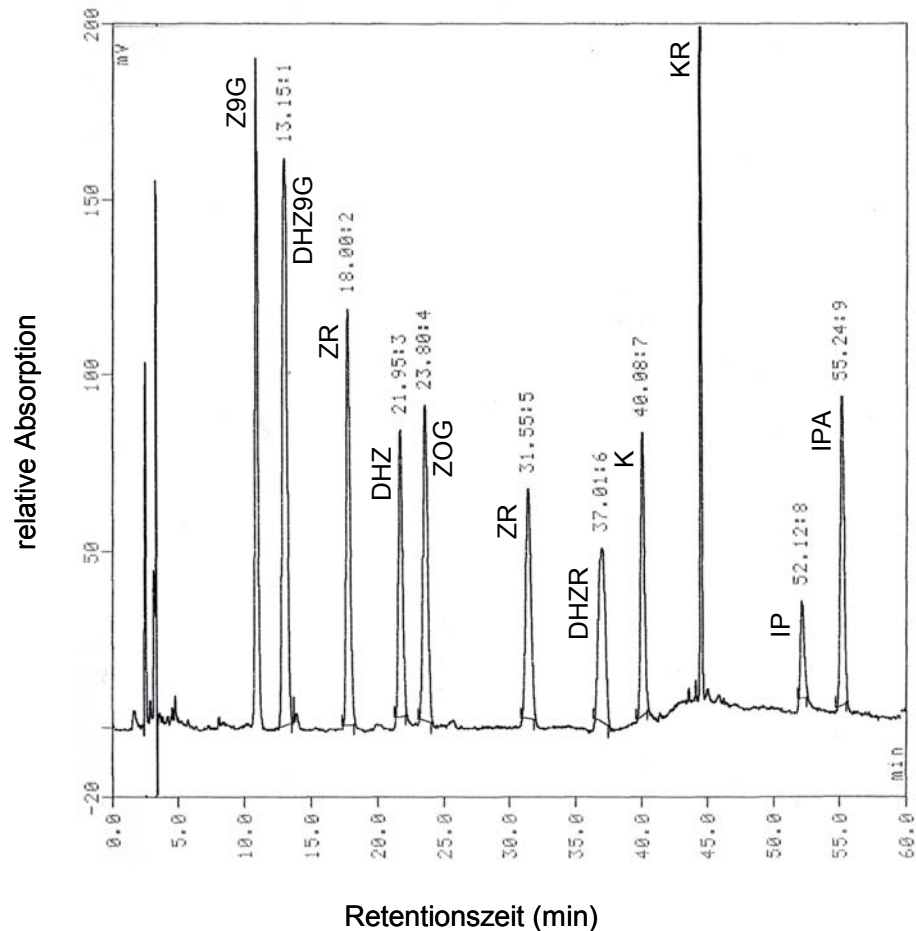
Die am Anionentauscher gebundenen Cytokinine der Nukleotid-Fraktion wurden mit 20 ml 6%iger (v/v) Ameisensäure in ein weiteres Sep-Pak<sup>®</sup> eluiert, das zuvor mit 5 ml 100 % Methanol, 5 ml 80 % Methanol und 5 ml 6 % (v/v) Ameisensäure äquilibriert worden waren. Nach Waschen des Sep-Paks<sup>®</sup> mit 5 ml bidestilliertem Wasser wurden die Nukleotide mit 5 ml 80 % Methanol in einen Rundkolben eluiert, bei 37 °C i.vac. zur Trockne eingengt und in etwa 2 ml 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer, pH 9,6, wieder gelöst. Diese Lösung wurde mit 10 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl; *EIA grade; Böhringer Mannheim*) versetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und wiederum bei 37 °C i.vac. zur Trockne gebracht. Die erhaltenen Riboside wurden in etwa 10 ml 40 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, aufgenommen und erneut analog zur oben bereits beschriebenen Behandlung der Basen/Ribosid-Fraktion nochmals über ein Anionentauscher-C<sub>18</sub>-Säule-System gereinigt.

Die Haltbarkeit der Cytokinine nach diesem Arbeitsschritt wurde überprüft. Es konnte innerhalb von sechs Monaten kein Verlust an Cytokinen durch die Lagerung der getrockneten Proben bei -20 °C festgestellt werden.



### 2.7.4.2 Auftrennung in einzelne Cytokinin-Fractionen mittels HPLC

Die Cytokinine der Basen/Ribosid- und der Nukleotid-Fraktion wurden mit Hilfe präparativer reversed-phase-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (reversed-phase-HPLC) in je 36 Fraktionen aufgetrennt. Dadurch, mit Hilfe der in Abschnitt 2.7.4.4 beschriebenen Kreuzreaktivität und der enzymatischen Behandlung war es möglich, mit nur drei Antikörpern ein breites Spektrum an Cytokininen zu quantifizieren. Ein Chromatogramm eines Standardgemisches ist in Abb. 8 exemplarisch abgebildet.



**Abb. 8:** HPLC Chromatogramm eines Cytokinin-Standardgemisches, bestehend aus den natürlich vorkommenden Cytokininen Z9G, DHZ9G, Z, DHZ, ZOG, ZR, DHZR, IP und IPA und den künstlichen Cytokininen Kinetin (K) und Kinetinribosid (KR).

Das verwendete HPLC-System umfasste folgende Komponenten:

zwei Pumpen (HPLC Pump 422, *Biotek*, Neufarn, Deutschland), zwei hintereinander geschaltete Mischer (M 800, *Biotek*), eine Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm Hypersil® ODS, *Muderer & Wochele*, Berlin, Deutschland), einen UV-Detektor (HPLC Detector 430, *Biotek*), einen Fraktionensammler (Fraction Collector Fra 100, *Pharmacia*, Freiburg) und eine Computereinheit mit dem Programm Data System 450-MT2 (*Biotek*) zur Aufzeichnung der Chromatogramme. Die Durchmesser der Stahlkapillaren betragen vor der Säule 0,5 µm und

nach der Säule 0,25 µm. Ein Gradient aus 0,1 % wässriger Triethylammoniumacetat-Lösung (*Fluka*), pH 6, und Acetonitril (*HPLC gradient grade; Roth*) bei einem Fluss von 1 ml·min<sup>-1</sup> diente als Laufmittel. Die Details der Läufe sind Tab. 5 zu entnehmen.

**Tab. 5: Bedingungen zur Auftrennung der Cytokinine mittels präparativer HPLC.**

	<b>Säule</b>	250 x 4,6 mm, 5 µm Hypersil® ODS	
<b>Laufmittel</b>	<b>A</b>	0,1 % Triethylammoniumacetat-Lösung, pH 6	
	<b>B</b>	100 % Acetonitril	
	<b>Flussgeschwindigkeit</b>	1 ml/min	
<b>Laufmittelgradient</b>	<b>0 - 10 min</b>	8,0 % B	92,0 % A
	<b>10,5 - 20 min</b>	8,5 % B	91,5 % A
	<b>21,5 - 29 min</b>	9,3 % B	90,7 % A
	<b>33,5 - 35 min</b>	14,0 % B	86,0 % A
	<b>36,0 - 55 min</b>	19,3 % B	80,7 % A
	<b>55,0 - 70 min</b>	100,0 % B	0,0 % A
<b>Fraktionen</b>	<b>Sammelbeginn</b>	11 min nach Start des Trennlaufs	
	<b>Fraktionsgröße</b>	1,4 min	
	<b>Sammelende</b>	61,4 min nach Start des Trennlaufs	

Die trockenen Basen/Ribosid- bzw. Nukleotid-Gemische (vgl. Abschnitt 2.7.4.1) wurden direkt vor der Injektion in 900 µl 8 % wässrigem Acetonitril gelöst und in das Auftragsventil injiziert. Nach jedem Probenlauf wurde die Säule innerhalb von 50 min mit einem Stufengradienten von 100 % Acetonitril auf 0 % Acetonitril gereinigt und erneut auf 8 % Acetonitril äquilibriert. Nach der Trennung wurde das Lösungsmittel aus den Fraktionen mit gereinigter Pressluft abgeblasen und die Proben bis zur Quantifizierung mittels ELISA bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.7.4.3 Quantifizierung der einzelnen Cytokinine mittels ELISA

Die Quantifizierung der Cytokinine in den einzelnen Fraktionen der präparativen HPLC erfolgte immunochemisch mittels ELISA. Wie in Abschnitt 2.7.4 erläutert wurde, standen drei Antikörper gegen *trans*-Zeatinribosid, Dihydrozeatinribosid und Isopentenyladenosin zur Verfügung, mit welchen auch die freien Basen und die 9-Glukoside direkt mit Hilfe der Kreuzreaktivität (vgl. Abschnitt 2.7.4.4, Tab. 6) bestimmt wurden, während alle anderen in Tab. 3 aufgelisteten Cytokinine erst nach enzymatischer Umwandlung in Riboside oder freie Basen quantifiziert werden konnten.

Beim verwendeten kompetitiven ELISA konkurrierte ein Antigen mit einem Antigen-Enzym-Komplex (Tracer) um die Bindungsstellen am Antikörper. Das Enzym des Tracers war alkalische Phosphatase (AP), der nach der Konkurrenzreaktion 4-Nitrophenylphosphat als

Substrat angeboten wurde. Dephosphoryliertes 4-Nitrophenylphosphat ist gelb; seine Konzentration kann damit photometrisch bestimmt werden. Durch den Vergleich der Extinktionen mit einer zugleich gemessenen Eichkurve und unter Berücksichtigung der Kreuzreaktivitäten konnten die Cytokinine quantifiziert werden.

Die praktische Durchführung des ELISA kann, wie in Abb. 9 dargestellt ist, in fünf Schritte untergliedert werden und folgte im wesentlichen der Vorgehensweise von Wagner (1991) und Sakuth (1996).

Verwendet wurden folgende Puffer:

Acetat-Puffer	50 mM NaOAc, pH 5,8
Carbonat-Puffer	50 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,6
TBS-Puffer	150 mM Tris, 450 mM NaCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,8
TBS-Gelatine	1 mg Gelatine pro 1 ml TBS-Puffer
TBS-Waschlösung	1,2 l TBS-Puffer, 650 µl Tween 20 auf 8 l H <sub>2</sub> O.

Für eine optimale Beschichtung der Vertiefungsoberfläche der Mikrotiter-Platten (M129A, *Thermo Bioscience GmbH*, Egelsbach, Deutschland) wurden die Antikörperlösungen in Carbonat-Puffer verdünnt:

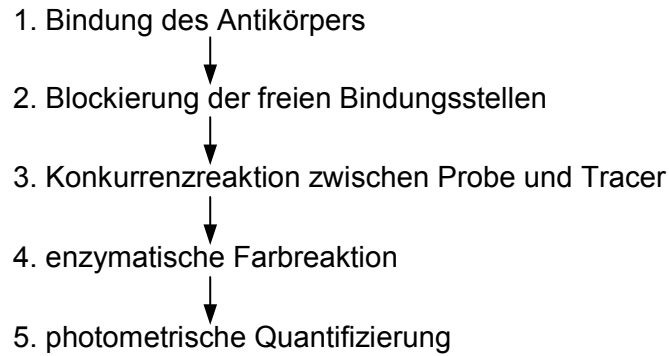
ZR	1 : 2500,
DHZR	1 : 5000,
IPA	1 : 1000.

Die Proteinkonzentrationen der Lösungen entsprachen damit etwa 0,8, 0,1 und 1,7 µg·ml<sup>-1</sup> BSA-Äquivalent (Bradford, 1976).

Die Tracerlösung wurde in TBS-Gelatine verdünnt:

ZR-AP	1 : 1250,
DHZR-AP	1 : 2000,
IPA-AP	1 : 1250.

Zur gleichzeitigen Füllung aller 96 Vertiefungen einer Proben-Mikrotiter-Platte wurden alle Lösungen außer den Antikörperlösungen zunächst in Transfer-Platten vorpipettiert. Darauf wurde die Proben-Platte gelegt und durch schnelles Drehen die Lösungen von der Transfer- in die Proben-Platte geschleudert. Die Proben-Mikrotiter- und die Transfer-Platten wurden vor jedem Transfer neuer Lösungen dreimal mit Hilfe eines Immunwashers (Nunc-Immuno Wash 12, *Nunc GmbH & Co.KG*, Wiesbaden, Deutschland) mit Waschlösung gespült und sorgfältig trocken geklopft. Jede Vertiefung wurde immer mit 200 µl Lösung gefüllt.



**Abb. 9: Übersicht über die Schritte des ELISA zur Quantifizierung der Cytokinine.**

Zur Bindung des Antikörpers an die Kunststoffoberfläche wurden in jede Vertiefung der Proben-Mikrotiter-Platte die Antikörperlösung direkt einpipetiert. Für jeweils zwei Proben wurden drei Platten mit je einem Antikörper beschickt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zur Blockierung der freien Bindungsstellen an der Vertiefungs-Wand wurde Rinderserumalbumin-Lösung (0,5 mg BSA (*minimum 98 %*; *Sigma*) in 1 ml TBS-Puffer) in die Proben-Mikrotiter-Platte transferiert und 1,5 h bei RT inkubiert.

Für die Konkurrenzreaktion zwischen Probe und Tracer wurde jeweils eine Mischung aus 100 µl Probe bzw. Standardlösung und 100 µl Tracerlösung in die abgesättigten Vertiefungen der Proben-Mikrotiter-Platten gegeben. Die 36 getrockneten Proben-Fractionen wurden dazu in je 750 µl (Basen/Ribosid-Fraktion) bzw. 500 µl (Nukleotid-Fraktion) Acetat-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationen der Standard-Verdünnungsreihe sind dem Pipetierschema in Abb. 10 zu entnehmen. Die Probe-Tracer-Mischungen wurden dann in die abgesättigten Proben-Platten transferiert und 3 h bei RT inkubiert.

Die enzymatische Farbreaktion wurde nach der Trennung der nicht gebundenen Antigene bzw. Tracer von den Antikörper-Antigen- bzw. Antikörper-Tracer-Komplexen mit Nitrophenylphosphat-Lösung (1 mg 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in 1 ml Carbonat-Puffer) gestartet. Die Konzentrationen der Tracer und der Nitrophenylphosphat-Lösung waren so abgestimmt, dass nach 70 min die Cytokinine durch die Gelbfärbung des Nitrophenols bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader photometrisch quantifiziert werden konnten.

Zu Beginn der Arbeiten wurde der ELISA-Reader EasyReader EAR 400 AT (*SLT-Laborinstruments*, Grödif, Österreich) mit dem Programm ELISA Ver. 2.10; Snoopysoft (Wagner, 1991) verwendet. Später konnte der neue ELISA-Reader PowerWave X340 der Firma *Packard BioScience GmbH*, Deutschland, mit dem Programm KVI verwendet werden. Beide Programme berechneten aus den beiden Standard-Verdünnungsreihen die Eichkurven und daraus die entsprechenden Cytokininkonzentrationen in den Vertiefungen und lieferten gleiche Ergebnisse. Durch den Vergleich der Fraktionsnummer in den Vertiefungen mit der Retentionszeit bei der präparativen HPLC (vgl. Abb. 8) konnte den gemessenen Konzentrationen die entsprechenden Cytokinine zugeordnet werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S 0,04	S 0,1	S 0,3	S 0,7	S 1,6	S 4,1	S 10,2	S 25,6	S 64	S 160	S 400	S 1000
<b>B</b>	F 31	F 25	F 19	F 13	F 7	F 1	F 31	F 25	F 19	F 13	F 7	F 1
<b>C</b>	F 32	F 26	F 20	F 14	F 8	F 2	F 32	F 26	F 20	F 14	F 8	F 2
<b>D</b>	F 33	F 27	F 21	F 15	F 9	F 3	F 33	F 27	F 21	F 15	F 9	F 3
<b>E</b>	F 34	F 28	F 22	F 16	F 10	F 4	F 34	F 28	F 22	F 16	F 10	F 4
<b>F</b>	F 35	F 29	F 23	F 17	F 11	F 5	F 35	F 29	F 23	F 17	F 11	F 5
<b>G</b>	F 36	F 30	F 24	F 18	F 12	F 6	F 36	F 30	F 24	F 18	F 12	F 6
<b>H</b>	S 1000	S 400	S 160	S 64	S 25,6	S 10,2	S 4,1	S 1,6	S 0,7	S 0,3	S 0,1	S 0,04

**Abb. 10: Pipettierschema der Standard-Verdünnungsreihe und der Proben** in die Transferplatten zur Messung der Cytokinine. F gibt die Fraktionennummer der HPLC-Fraktion an. S bedeutet Standard; die Konzentrationen der Standards für die Eichkurven (grau unterlegt) sind in nM angegeben.

Die Ausgangskonzentrationen für die Standard-Verdünnungsreihen wurden photometrisch bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  in Wasser, pH 7, im Absorptionsmaximum  $\lambda$  sind nach Wagner (1991):

$$\text{ZR} \quad \epsilon_{270\text{nm}} = 17,8$$

$$\text{DHZR} \quad \epsilon_{268\text{nm}} = 21$$

$$\text{IPA} \quad \epsilon_{268\text{nm}} = 20.$$

#### 2.7.4.4 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität (*KR*) beruht auf der Affinität von dem Antigen ähnlichen Substanzen zum Antikörper und wurde nach folgender Formel berechnet (Weiler und Zenk, 1976):

$$KR_{X-Ab} = \frac{50\% - Wert_X}{50\% - Wert_{Kompetitor}} \cdot 100\% . \quad \text{Gl. 3}$$

Dabei ist  $KR_{X-Ab}$  die Kreuzreaktivität eines *Kompetitors*, in diesem Fall die freien Basen, 9-Glukoside und O-Glukoside, mit dem Antikörper *Ab* (antibody) gegen ein Antigen *X*. Die 50 %-Werte der Antigene *X* und des *Kompetitors* sind diejenigen Konzentrationen, bei denen der für die Farbreaktion verantwortliche Tracer mit der Hälfte der zur Bindung zur Verfügung stehenden Antikörper reagiert. Bei Auftragung der Extinktion gegen den Logarithmus der Konzentration liegt der 50 %-Wert im Wendepunkt der sigmoidalen Kurve. Die optimalen Messbereiche der einzelnen Cytokinine liegen im linearen Bereich dieser sigmoidalen Standardkurven. Sie sind ebenso wie die Kreuzreaktivitäten in Tab. 6 zusammengefasst.

**Tab. 6: Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper und optimale Messbereiche für die direkt bestimmbaren Cytokinine.** Die Messbereiche wurden mit dem Antikörper ermittelt, zu dem das jeweilige Cytokinin die höchste Affinität zeigte. (n. b. – nicht bestimmt).

Kompetitor	% Kreuzreaktivität mit			Messbereich nM
	ZR-Antikörper	DHZR-Antikörper	IPA-Antikörper	
ZR	100	0,1	0,2	0,3-64
Z	75	0	0	0,7-160
Z9G	110	0,1	0	0,3-64
ZOG	4	n. b.	n. b.	-
ZROG	2	n. b.	n. b.	-
DHZR	6,5	100	0,2	0,7-160
DHZ	18	28	0	1,6-400
DHZ9G	10	115	0	0,7-160
IPA	0,2	0	100	0,3-160
IP	0,4	0	39	0,7-400

In dieser Arbeit wurden nur die Affinitäten der freien Basen und 9-Glukoside zu den zur Verfügung stehenden Antikörpern untersucht. Die hohe Kreuzreaktivität der freien Basen und 9-Glukoside und die geringe Kreuzreaktivität der O-Glukoside ist durch die Herstellungsmethode der Antikörper zu erklären (Fußeder et al., 1988). Wie Weiler (1986) zeigte, wird die höchste Affinität des Antikörpers zu den am weitesten von der Kopplungsstelle an das Trägerprotein entfernten molekularen Oberflächenstrukturen erreicht. Es konnten also lediglich die freien Basen und die 9-Glukoside direkt mit den drei Antikörpern quantifiziert werden, die O-Glukoside erst nach der Abspaltung ihres O-Glukosyl-Restes mittels  $\beta$ -Glukosidase (*Sigma*) als freie Basen bzw. Riboside (Wang et al., 1977). Die Nukleotide wurden, trotz ihrer von Wagner und Beck (1993) gezeigten hohen Kreuzreaktivität, nach enzymatischer Behandlung mit alkalischer Phosphatase als Riboside nachgewiesen, da sie bei den gewählten Bedingungen durch HPLC nicht abgetrennt werden konnten.

#### 2.7.4.5 Überprüfung der Reinigungsmethode und Absicherung der Messwerte

Vereinfachte Probenvorbereitung und breite Anwendbarkeit bei hoher Nachweisempfindlichkeit gelten als wichtige Vorteile der immunochemischen Quantifizierung. Die Möglichkeit, Rohextrakte zu analysieren, beruht auf der hohen Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung. Allerdings enthalten Extrakte pflanzlicher Gewebe in der Regel eine enorme Vielfalt unterschiedlichster und variierender Substanzen, die die Messung durch ihre Affinität zum Antikörper oder durch unspezifische Inhibition stören können. Deshalb ist es notwendig, neben der Quantifizierung der Ausbeute bei der Aufreinigung auch die Genauigkeit des immunochemischen Verfahrens für jede Pflanzenart und auch für jedes Pflanzengewebe zu überprüfen.

#### 2.7.4.5.1 Überprüfung der Aufreinigung der Proben

Um die für die genaue immunochemische Cytokininbestimmung erforderlichen Reinigungsschritte zu überprüfen, wurde die Ausbeute nach jedem Schritt mittels Ausbeutequantifizierung durch interne Standardisierung bestimmt. Sobald die Messwerte sich dabei durch weitere Reinigungsschritte nicht mehr ändern, sind sie ausreichend und das Ergebnis kann akzeptiert werden (Reeve und Crozier, 1980; Crozier et al., 1986). Es zeigte sich, dass zur Reinigung der Extrakte für eine immunochemische Quantifizierung Flüssigkeitsextraktion und Chromatographie an C<sub>18</sub>-Säulen ausreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die im wesentlichen von Wagner (1991) für Brennessel entwickelte Probenaufarbeitung aufgrund des großen Probenbedarfs lediglich in Stichproben auf Reinigungsverluste hin geprüft. Dazu wurden in Doppelproben die Wurzel- und die Source-Blatt-Proben je dreier 42 d alter Tabakpflanzen aus 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> eingesetzt (vgl. Tab. 4). Die Proben wurden nach der Homogenisierung in flüssigem Stickstoff in fünf gleiche Teile geteilt und jeder Teil, wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben wurde, extrahiert. Vieren dieser fünf Teile wurden unterschiedliche Mengen eines internen Standards aus Isopentenyladenosin, *trans*-Zeatin und Dihydrozeatin, deren Ribosiden und den 9-Glukosiden der beiden Letztgenannten gleich vor dem ersten Extraktionsschritt zugesetzt. Die fünfte Probe diente zur Bestimmung der endogenen Cytokinine. Nach der Reinigung und Auftrennung (vgl. Abschnitte 2.7.2 bis 2.7.4) wurden die Cytokinine mittels ELISA quantifiziert (vgl. Abschnitt 2.7.4.3). Die erhaltenen Wiederfindungsraten waren von der Art der Probe unabhängig und lagen im Mittel bei 90 %. Die niedrigste Wiederfindungsrate mit 86 % wurde für *trans*-Zeatin im Source-Blatt von Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren, ermittelt.

#### 2.7.4.5.2 Überprüfung des ELISA-Messergebnisses

Eine häufig angewendete Methode, um die Identität des immunoreaktiven Materials zu überprüfen, beruht auf der Messung von Probenreplikaten mit steigenden Standard-Konzentrationen (Crozier et al., 1986; Pengelly, 1986). Eine zugegebene und die entsprechende gefundene Antigenmenge werden gegeneinander aufgetragen. Durch die Punkte wird eine Regressionsgerade gelegt, deren Steigung von 1 abweicht, wenn sich in den Proben den Immunoassay störende Substanzen befinden, vorausgesetzt, die Störung ist unspezifisch oder die Störsubstanz bindet in anderer Weise an den Antikörper als das Antigen.

Auch die Untersuchung der Proben auf Störsubstanzen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in Stichproben, nämlich an Wurzel und Source-Blatt 42 d alter Pflanzen, die in 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren. Beide Proben wurden in vier Konzentrationen untersucht. Jeder Proben-Konzentration wurden vier verschiedene Mengen des beschriebenen Cytokininstandard-Gemisches zugesetzt und die gefundenen Mengen gegen die zugegebenen

Mengen aufgetragen. Alle so erhaltenen Geraden hatten eine Steigung nahe 1 und die Regressionskoeffizienten lagen über 0,98. Damit waren die Messungen akzeptabel.

Eine zusätzliche Überprüfung auf Störsubstanzen ergab sich aus der Dreifachmessung jeder HPLC-Fraktion mit den drei verschiedenen Antikörpern. Signifikante Abweichungen wurden in keiner Probe beobachtet.

### **2.7.5 Messung der Indol-3-essigsäure**

Indol-3-essigsäure (IES) wurde zusammen mit den Cytokininen mit 80 % wässrigem Methanol aus den in Tab. 4 aufgelisteten Pflanzenteilen extrahiert (vgl. Abschnitt 2.7.2). Dieser Extrakt wurde, wie in Abb. 6 gezeigt und in Abschnitt 2.7.3 beschrieben wurde, aufgearbeitet.

Die Quantifizierung der IES erfolgte, wie jene der Cytokinine, mittels ELISA nach der Methode von Valdes (persönlich Mitteilung). Dafür standen monoklonale Antikörper gegen IES aus Mäusen (18-III-C3) von Herrn Prof. Dr. Weiler zur Verfügung. Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die immunochemische Quantifizierung der durch Methylierung stabilisierten IES bessere Ergebnisse liefert als die direkte Quantifizierung der freien Säure (Weiler, 1981; Weiler et al., 1981).

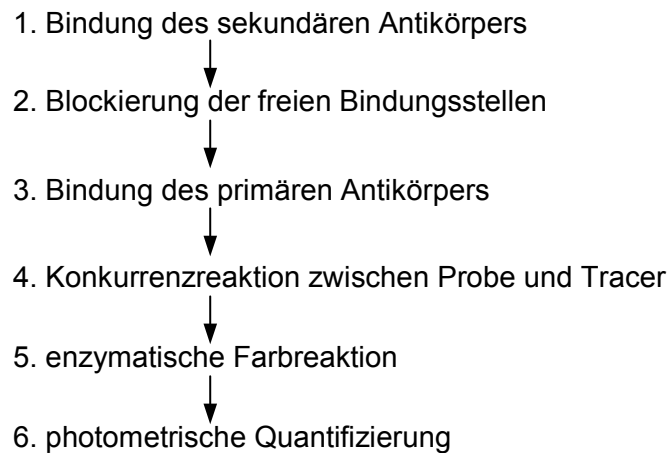
#### **2.7.5.1 Methylierung der Indol-3-essigsäure**

Die IES in den Extrakten wurde mit Diazomethan methyliert (Neill und Horgan, 1987). Eine etherische Diazomethan-Lösung stand am Lehrstuhl zur Verfügung. Von den 100 µl des in 80 % Methanol aufgenommenen Extraktes (vgl. Abschnitt 2.7.3) wurden 20 µl in 100 µl 100 % Methanol, die in Rundkolben vorgelegt waren, überführt. Unter einem Abzug wurde im Dunkeln 100 µl der etherischen Diazomethan-Lösung zupipettiert und die Kolben sofort mit Parafilm verschlossen. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurde der Parafilm entfernt. Diazomethan, Ether und Methanol verdampften bei Raumtemperatur innerhalb von 2 h, so dass ein nahezu trockener Rückstand (maximal 1 µl Wasser) mit der methylierten IES vorlag. Um den Methylierungsgrad in den Proben abschätzen zu können, wurde immer auch eine IES-Standardlösung (40 mM in 100 % Methanol) parallel zu den Proben methyliert und im ELISA mitgemessen.

#### **2.7.5.2 Quantifizierung der Indol-3-essigsäure mittels ELISA**

Die IES-Quantifizierung wurde im Prinzip analog dem ELISA für die Cytokininbestimmung durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.7.4.3). Im Unterschied zu der Cytokininanalyse wurde bei der Auxinbestimmung zunächst der sekundäre Antikörper (gegen Maus-Immunglobulin) an die Kunststoffoberfläche der Vertiefungen der Proben-Mikrotiter-Platten gebunden, die dann die primären Maus-Antikörper gegen IES banden und diese in Richtung des Vertiefungsinneren ausrichteten. Abb. 11 fasst die Schritte zur Durchführung des IES-ELISA zusammen.





**Abb. 11: Übersicht über die Schritte des ELISA zur Quantifizierung der Indol-3-essigsäure.**

Folgende Puffer wurden verwendet:

Carbonat-Puffer	50 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,6
DEA-Puffer	1 M Diethanolamin ( <i>Sigma</i> ), 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,8
TBS-Puffer	50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,8
TBS-Gelatine	1 mg Gelatine pro 1 ml TBS-Puffer
TBS-Waschlösung	1,2 l TBS-Puffer, 650 µl Tween 20 auf 8 l H <sub>2</sub> O.

Zur Bindung des sekundären Antikörpers wurden 25 µg dieses lyophilisierten Antikörpers pro 1 ml Carbonat-Puffer gelöst, in die Vertiefungen der Proben-Mikrotiter-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Die Blockierung der freien Protein-Bindungsstellen wurde durch eine nachfolgende Inkubation mit Rinderserumalbumin (BSA)- Lösung von 1 h Dauer bei RT erreicht (0,5 mg BSA (*minimum 98 %*; *Sigma*) auf 1 ml TBS-Puffer).

150 µg des Antikörpers gegen IES wurden in 1 ml Carbonat-Puffer gelöst und zur Bindung des primären Antikörpers zupipettiert und bei 4 °C im Dunkeln 24 h lang inkubiert. Die trockenen methylierten Proben wurden in 200 µl 100 % Methanol und 800 µl TBS-Puffer aufgenommen. Um sicher zu sein, dass die IES-Konzentrationen der Probelösungen innerhalb der Nachweisgrenzen des Testes liegen, wurden sechs Verdünnungen jeder Probelösung gemessen. Die Verdünnungsstufen sind ebenso wie die Konzentrationen der Standard-Reihen, die zur Erstellung der Eichkurve in jede Platte gegeben wurden, dem Pipettierschema in Abb. 12 zu entnehmen.

In die Vertiefungen der Transfer-Platte (vgl. Abschnitt 2.7.4.3) wurden jeweils 100 µl der Standard- bzw. der verdünnten Probelösungen gegeben, bevor dazu 100 µl der Tracerlösung (1 : 1500 in TBS-Gelatine) pipettiert wurden. Mit dem Transfer dieser Lösungs-Gemische in die Proben-Platte wurde die Konkurrenzreaktion zwischen Probe und Tracer gestartet.

Nach 3 h Inkubationszeit wurde für die Farbreaktion die Nitrophenylphosphat-Lösung (1 mg 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in 1 ml DEA-Puffer) in die Proben-Platten

transferiert. Nach 1 h wurde die Gelbfärbung mit Hilfe des ELISA-Readers PowerWave x 340 (*Packard BioScience GmbH*, Deutschland) bei 405 nm photometrisch bestimmt und durch den Vergleich mit der Eichkurve und unter Berücksichtigung des Methylierungsgrades der IES-Standardlösung die Konzentrationen an IES in den Proben quantifiziert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S 0,04	S 0,1	S 0,3	S 0,7	S 1,6	S 4,1	S 10,2	S 25,6	S 64	S 160	S 400	S 1000
<b>B</b>	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
<b>C</b>	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
<b>D</b>	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
<b>E</b>	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
<b>F</b>	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
<b>G</b>	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160	1: 160
<b>H</b>	S 1000	S 400	S 160	S 64	S 25,6	S 10,2	S 4,1	S 1,6	S 0,7	S 0,3	S 0,1	S 0,04

**Abb. 12:** Pipettierschema der Standard-Verdünnungsreihe und der Proben zur Messung der methylierten Indol-3-essigsäure. In den Reihen B bis G sind die Verdünnungen der jeweiligen Probenlösungen 1 bis 12 angegeben. S bedeutet Standard; die Konzentrationen des Standards für die Eichkurve (grau unterlegt) sind in nM angegeben.

### 2.7.5.3 Kopplung der Indol-3-essigsäure an alkalische Phosphatase – Herstellung des Tracers

Die Kopplung der IES an die alkalische Phosphatase (AP; *EIA grade, Böhringer Mannheim*) erfolgte mittels der Carbodiimid-Methode (Weiler, 1981). Dabei wird die IES über ihre Carboxyl-Gruppe an Amino-Reste des Enzyms gebunden. 1 mg IES (5,71  $\mu\text{mol}$ ) wurden in 0,25 ml Dimethylformamid in einem braunen Glasgefäß gelöst und mit einer Lösung aus 1 mg *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) in 0,25 ml 0,2 M Tris-Puffer, pH 5,5, versetzt. 50  $\mu\text{l}$  AP (10 mg Protein·ml<sup>-1</sup>, spezifische Aktivität > 2500 U) wurden mit 0,25 ml des Tris-Puffers in einem braunen Gefäß verdünnt, die IES-EDC-Lösung innerhalb von 1 h zugegeben und noch weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die nicht gebundene IES mit Hilfe eines Mikrokonzentratoren Centricon<sup>®</sup> 50 (*Millipore Corporations*, Schwalbach, Deutschland) vom Kopplungsprodukt IES-AP, dem Tracer, getrennt. Dieser wurde in 100  $\mu\text{l}$  TBS-Puffer (50 mM Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,8) aufgenommen und mit Glycerin 1 : 2 verdünnt. Diese Lösung konnte ein halbes Jahr lang ohne Aktivitätsverlust bei -20 °C aufbewahrt werden.

## 2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS Windows, Version 10.13. Zur Prüfung statistischer Unterschiede zweier Mittelwerte wurde der *U*-Test (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) verwendet, da die Daten nicht normalverteilt und die Varianzen nicht homogen waren. Zur Kennzeichnung der statistisch signifikanten Befunde wurde die Sternsymbolik verwendet ( $p < 0,25$ : <sup>x</sup>,  $p < 0,05$ : \*,  $p < 0,01$ : \*\*,  $p < 0,001$ : \*\*\*), die direkt in die Abbildungen eingetragen wurde.

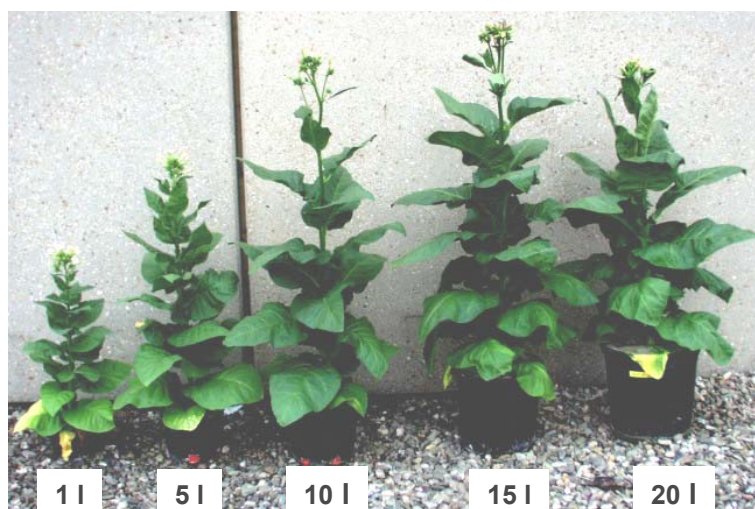
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Einfluss des Wurzelraums auf das Pflanzenwachstum

Der einer Pflanze zur Verfügung stehende Wurzelraum ist von zentraler Bedeutung für ihr Wachstum und ihre Reaktion auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration (Robbins und Pharr, 1988; Arp, 1991; Thomas und Strain, 1991). Um für die Untersuchungen über die Wirkung der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum, den Phytohormonhaushalt und die Assimilatverteilung Effekte durch Limitierung des Wurzelraumes ausschließen zu können, wurde zu Beginn der Arbeiten der Einfluss des Topfvolumens auf das Wachstum der Tabakpflanzen sowohl bei 360 ppm als auch bei 700 ppm CO<sub>2</sub> untersucht. Dazu wurden Pflanzen in fünf verschiedenen Topfgrößen angezogen und die Trockengewichte im Alter von 61 d, d. h. nach Blühbeginn, untersucht. Damit waren diese Pflanzen 19 d älter als die ältesten, von denen die Phytohormone und die Assimilatverteilung untersucht wurden.

##### 3.1.1 Visuelle Beschreibung der Tabakpflanzen

In Abb. 13 werden fünf 61 d alte Tabakpflanzen gezeigt, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> in verschieden großen Töpfen angezogen wurden, nämlich in einem 1 l-, 5 l-, 10 l-, 15 l- und 20 l-Topf. Die Sprossgröße steigt mit zunehmendem Topfvolumen zunächst an. Erst die Pflanzen im 15 l- und im 20 l-Topf sind in Bezug auf die Sprosshöhe und Blattfläche gleich groß. Unabhängig vom Wurzelraum begannen alle Pflanzen im Alter von 61 d zu blühen. Lediglich die abgebildete Pflanze im 20 l-Topf ist in der Entwicklung zwei Tage langsamer als die anderen Pflanzen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant und, wie die Wiederholungsversuche zeigten, nicht auf das Topfvolumen zurückzuführen. Die gleiche Abhängigkeit der Sprossgröße vom Wurzelraum zeigen auch die Pflanzen, die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden (nicht abgebildet).



**Abb. 13:** 61 d alte Tabakpflanzen, angezogen in verschiedenen Topfvolumina bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.

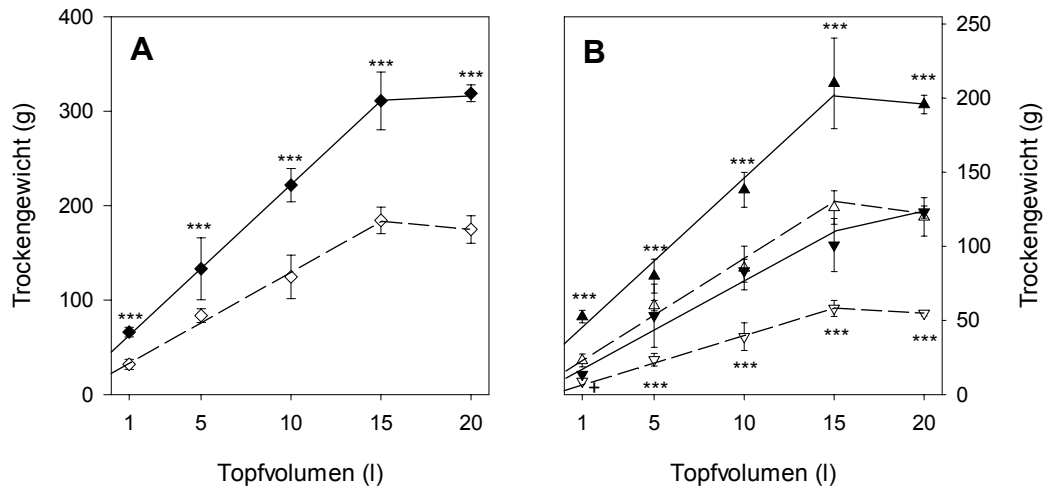
Ein direkter Vergleich der beiden Pflanzen im 1 l- und im 15 l-Topf (vgl. Abb. 14) zeigt, dass die Größenverhältnisse zwischen Blättern, Internodien und Sprosshöhe unabhängig von der Größe des Wurzelraumes sind: Die Pflanze im 1 l-Topf scheint wie ein verkleinertes Abbild der Pflanze im 15 l-Topf. Beide Pflanzen haben gleich viele Blätter und die Blüten sind gleich weit entwickelt. Lediglich die Blattseneszenz ist bei der Pflanze im 1 l-Topf weiter vorangeschritten; die unteren Blätter sind stärker gelb gefärbt als bei der Pflanze im 15 l-Topf.



**Abb. 14:** 61 d alte Tabakpflanzen im 1 l- und 15 l-Topf, angezogen bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.

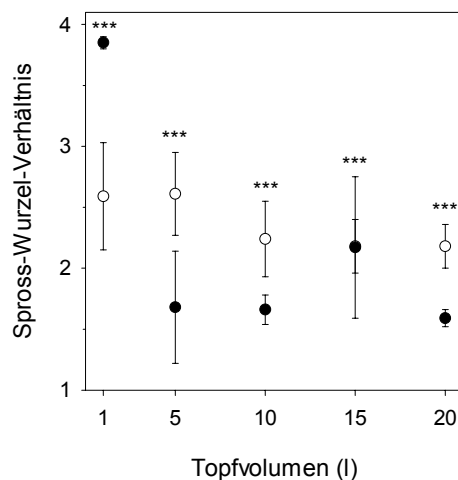
### 3.1.2 Trockengewichte und Spross-Wurzel-Verhältnis

In Abb. 15 sind die Gesamttrockengewichte der 61 d alten Pflanzen beider CO<sub>2</sub>-Behandlungen und ihre Spross- und Wurzeltrockengewichte gegen das Volumen des Wurzelraumes aufgetragen. Wie der visuelle Größenvergleich der Sprosse in Abb. 13 bereits andeutet, steigen mit zunehmendem Wurzelraum die Trockengewichte der Tabakpflanzen bis zu einem Topfvolumen von 15 l linear an. Eine weitere Erhöhung des Wurzelraums auf 20 l hat weder bei 360 ppm noch bei 700 ppm CO<sub>2</sub> eine Steigerung des Trockengewichts der Gesamtpflanzen zur Folge. Die Pflanzen in erhöhtem CO<sub>2</sub> sind in allen Topfvolumina fast doppelt so schwer wie die Kontrollpflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ). Die Spross- und die Wurzeltrockengewichte steigen mit zunehmendem Topfvolumen ebenso wie die Gesamtgewichte bis zu einem Wurzelraum von 15 l linear an und sind durch eine weitere Vergrößerung des Topfvolumens auf 20 l nicht zu steigern. Sie sind bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration, abgesehen vom Wurzelgewicht der Pflanzen im 1 l-Topf, signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.



**Abb. 15: Trockengewichte (A) 61 d alter Tabakpflanzen und (B) ihrer Sprosse und Wurzeln, angezogen bei 360 ppm (◇, △, ▽) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (◆, ▲, ▼), in Abhängigkeit vom Topfvolumen. △, ▲ - Sprosstrockengewichte; ▽, ▼ - Wurzeltrockengewichte. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5, beim 20 l-Topf n = 3). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den beiden CO<sub>2</sub>-Behandlungen.**

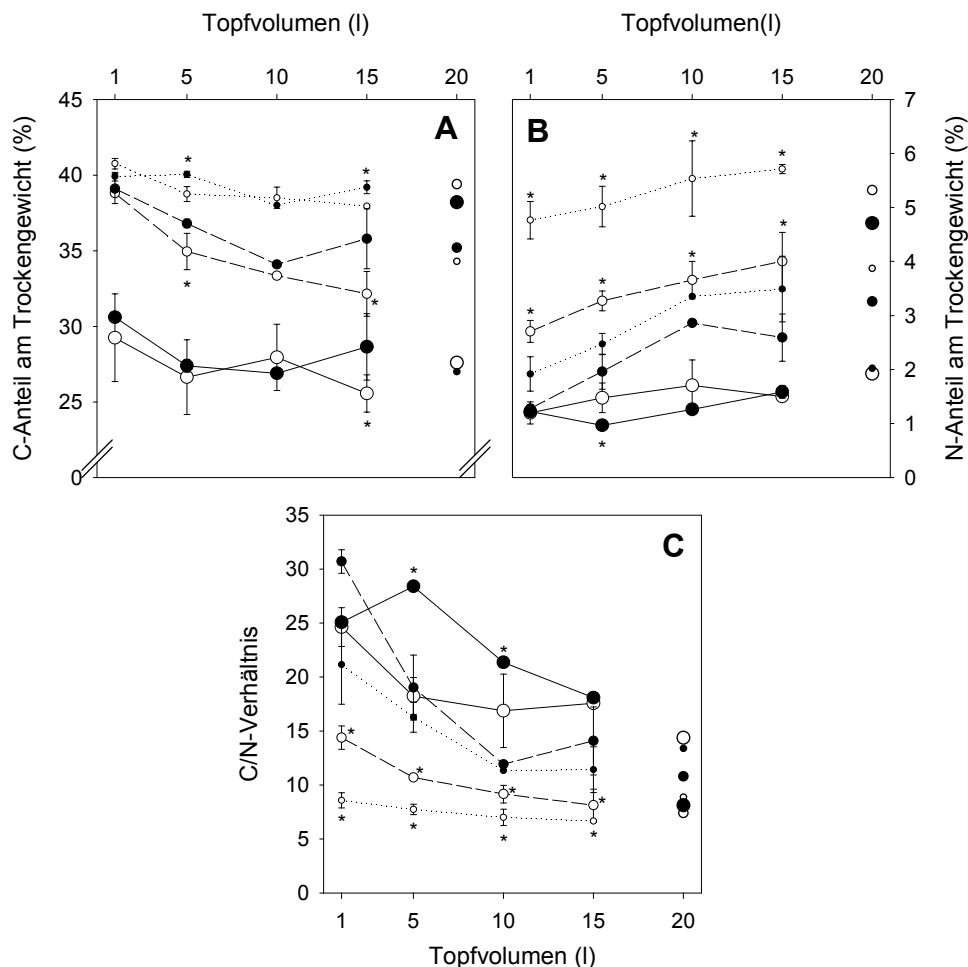
In Abb. 16 sind die Spross-Wurzel-Verhältnisse in Abhängigkeit vom Topfvolumen dargestellt. Bei den Pflanzen im 1 l-Topf liegt es bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auffällig hoch, d. h. die Wurzel dieser Pflanzen ist im Vergleich zum Spross sehr klein. Bei den übrigen Tabakpflanzen ist das Spross-Wurzel-Verhältnis deutlich niedriger und liegt bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration unter den Verhältnissen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ). Eine Ausnahme bilden die Pflanzen im 15 l-Topf, deren Mittelwerte sich nicht durch die CO<sub>2</sub>-Behandlung unterscheiden. Dies ist auf höhere Werte von zwei der fünf Pflanzen bei 700 ppm CO<sub>2</sub> zurückzuführen (2,5 und 2,9); die Spross-Wurzel-Verhältnisse der drei anderen Pflanzen liegen jedoch mit Werten zwischen 1,5 und 1,8 im Bereich der Verhältnisse der übrigen Pflanzen bei 700 ppm CO<sub>2</sub>.



**Abb. 16: Spross-Wurzel-Verhältnisse 61 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●), in Abhängigkeit vom Topfvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5, beim 20 l-Topf n = 3). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den beiden CO<sub>2</sub>-Behandlungen.**

### 3.1.3 Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff in einzelnen Blättern

Um die Versorgung der Pflanzen mit Stickstoff abschätzen und eine durch dessen Mangel mögliche Anreicherung von Kohlenstoff feststellen zu können (Stitt und Krapp, 1999), wurden die Kohlenstoff- und Stickstoffanteile am Trockengewicht der Blätter 6, 10 und 20 von Pflanzen in den fünf verschiedenen Topfgrößen bestimmt. Sie sind zusammen mit den C/N-Verhältnissen in Abb. 17 dargestellt. Es wurde nur je eine Pflanze im 20 l-Topf untersucht, deren Werte stark abweichen und in den folgenden Betrachtungen nicht berücksichtigt werden.



**Abb. 17:** (A) Kohlenstoff- und (B) Stickstoff-Anteil am Trockengewicht und (C) C/N-Verhältnis der Blätter 6 (○, ●), 10 (○, ●) und 20 (○, ●) 61 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (○, ○, ○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●, ●, ●), in Abhängigkeit vom Topfvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 3, beim 20 l-Topf n = 1). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den beiden CO<sub>2</sub>-Behandlungen.

Der Kohlenstoff-Anteil am Blatttrockengewicht (vgl. Abb. 17 A) ändert sich nicht deutlich mit zunehmendem Topfvolumen. Lediglich im Blatt 10 sinkt der Kohlenstoff-Gehalt mit zunehmendem Wurzelraum. Mit zunehmender Blatthöhe, d. h. mit abnehmendem Blattalter, steigt der Kohlenstoff-Anteil am Blatttrockengewicht. Der Stickstoff-Anteil am Trockengewicht (vgl. Abb. 17 B) von Blatt 6 ändert sich mit zunehmendem Wurzelraum nicht, während er bei den

jüngeren Blättern 10 und 20 mit dem Topfvolumen zunimmt. Diese Zunahme ist am stärksten bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration. Bei 360 ppm CO<sub>2</sub> sind die Stickstoff-Anteile bei den Blättern 10 und 20 der Pflanzen in allen Topfvolumina deutlich höher als bei 700 ppm. Mit zunehmender Insertionshöhe der Blätter nimmt dieser Unterschied ebenso wie der Stickstoff-Anteil am Blatttrockengewicht zu. Das C/N-Verhältnis (vgl. Abb. 17 C) nimmt mit steigendem Topfvolumen ab. Diese Abnahme ist wiederum am stärksten bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration. Bei 700 ppm CO<sub>2</sub> sind die C/N-Verhältnisse der einzelnen Blätter außerdem deutlich höher als bei 360 ppm. Mit steigender Blatthöhe nimmt das C/N-Verhältnis ab.

Deutliche Änderungen sowohl der C- und N-Anteile am Blatttrockengewicht als auch der C/N-Verhältnisse sind nur bis zu einem Topfvolumen von 10 l festzustellen. Im 10 und 15 l-Topf sind die Stickstoff-Gehalte am höchsten und die C/N-Verhältnisse am niedrigsten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stickstoff-Versorgung der Pflanzen durch die Vergrößerung des Topfvolumens verbessert werden kann und eine weitere Erhöhung des Wurzelraums über 15 l hinaus keine Verbesserung mit sich bringt.

### 3.1.4 Wachstum der Tabakpflanzen im 10 l- und im 15 l-Topf

Die Pflanzen zur Gewinnung des Xylemsafts konnten aufgrund der Größe des verwendeten Passioura-Drucktopfes nur in 10 l-Töpfen angezogen werden. Deshalb wurde der Einfluss dieses Wurzelraumvolumens auf das Pflanzenwachstum genauer untersucht. In Tab. 7 sind die Trockengewichte und die Spross-Wurzel-Verhältnisse 28, 35 und 42 d alter Pflanzen, die in 10 l- und in 15 l-Töpfen angezogen wurden, einander gegenübergestellt.

**Tab. 7: Vergleich der Gesamttrockengewichte und der Spross-Wurzel-Verhältnisse von Tabakpflanzen, angezogen in 10 l- und 15 l-Töpfen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>.** Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (beim 10 l-Topf n = 3, beim 15 l-Topf n = 5). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen; Unterschiede zwischen den beiden Topfgrößen sind in keinem Fall signifikant.

	Pflanzenalter	10 l-Topf		15 l-Topf	
		360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>
<b>Trockengewicht (g)</b>	28 d	1,34 ± 0,67 <sup>x</sup>	2,54 ± 0,53	1,10 ± 0,80 <sup>**</sup>	2,21 ± 0,40
	35 d	5,57 ± 0,88 <sup>*</sup>	7,97 ± 1,07	5,79 ± 1,53 <sup>x</sup>	8,21 ± 3,95
	42 d	22,81 ± 2,58 <sup>*</sup>	38,44 ± 6,28	22,84 ± 10,83 <sup>*</sup>	42,66 ± 17,80
<b>Spross-Wurzel-Verhältnis</b>	28 d	3,08 ± 0,31	3,00 ± 0,51	3,10 ± 1,20	3,39 ± 1,47
	35 d	2,85 ± 0,47	2,88 ± 0,42	3,10 ± 0,65	2,89 ± 0,86
	42 d	2,39 ± 0,41	2,41 ± 0,57	2,16 ± 1,05	2,41 ± 0,60

Die Trockengewichte steigen mit dem Pflanzenalter und sind bei 700 ppm CO<sub>2</sub> deutlich höher als bei 360 ppm ( $p < 0,25$ ). Die Unterschiede zwischen den beiden Topfvolumina sind in keinem Fall signifikant. Die Trockengewichte der 28 d alten Pflanzen im 10 l-Topf sind in beiden CO<sub>2</sub>-



Konzentrationen etwas höher als die Gewichte der Pflanzen im 15 l-Topf (um 18 bzw. 13 %). Dies entspricht der allgemein gemachten Beobachtung, dass die Pflanzen in den kleineren Töpfen nach dem Eintopfen zunächst etwas schneller wachsen. Bei den 35 d alten Pflanzen ist der Unterschied zwischen den beiden Topfgrößen deutlich geringer. Bei 42 d alten Pflanzen in 360 ppm CO<sub>2</sub> unterscheiden sich die Trockengewichte der Pflanzen in unterschiedlich großen Töpfen nicht, während bei erhöhtem CO<sub>2</sub> die Pflanzen im großen Topf um 10 % schwerer sind. Eine konsistente Abhängigkeit des Trockengewichts vom Wurzelraum ist nicht festzustellen. Das Wachstum der Tabakpflanzen wird bis zum Alter von 42 d nicht durch den Wurzelraum von 10 l limitiert. Die Spross-Wurzel-Verhältnisse sinken mit dem Pflanzenalter und zeigen bis zum Pflanzenalter von 42 d weder eine Abhängigkeit vom Topfvolumen noch von der CO<sub>2</sub>-Konzentration.

## Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen des Einflusses des Wurzelraumes auf das Wachstum der Tabakpflanzen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>

### Abhängigkeiten vom Wurzelraum

- |  |   |
|--|---|
| Bei Vergrößerung des Wurzelraumes, steigen             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pflanzengröße,</li> <li>• Trockengewichte der Gesamtpflanze, des Sprosses und der Wurzel,</li> <li>• N-Anteil am Blatttrockengewicht.</li> </ul> |
| Bei Vergrößerung des Wurzelraumes, sinken              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• C/N-Verhältnis in den Blättern,</li> <li>• C-Anteil am Blatttrockengewicht.</li> </ul>   |
| Bei Vergrößerung des Wurzelraumes, bleiben unverändert | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blattanzahl pro Pflanze,</li> <li>• Habitus,</li> <li>• Blühbeginn,</li> <li>• Spross-Wurzel-Verhältnis (außer im 1 l-Topf).</li> </ul>          |

Alle Aussagen können nur für 61 d alten Pflanzen gemacht und die Wirkungen bis zu einem Topfvolumen von 15 l festgestellt werden. Letztere sind unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration. Pflanzen bis zum Alter von 42 d in 10 l- und 15 l-Töpfen zeigen keine Abhängigkeiten vom Wurzelraumvolumen.

### Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration

- |   |   |
|---|---|
| Bei erhöhter CO <sub>2</sub> -Konzentration sind höher          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Trockengewichte der Gesamtpflanze, des Sprosses und der Wurzel,</li> <li>• C/N-Verhältnis in den Blättern.</li> </ul>      |
| Bei erhöhter CO <sub>2</sub> -Konzentration sind niedriger      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spross-Wurzel-Verhältnis (außer im 1 l-Topf),</li> <li>• N-Anteil am Blatttrockengewicht.</li> </ul>                       |
| Bei erhöhter CO <sub>2</sub> -Konzentration bleiben unverändert | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blattanzahl pro Pflanze,</li> <li>• Habitus,</li> <li>• Blühbeginn,</li> <li>• C-Anteil am Blatttrockengewicht.</li> </ul> |

## 3.2 Wachstum und Biomasseverteilung der Tabakpflanzen in 15 l-Töpfen

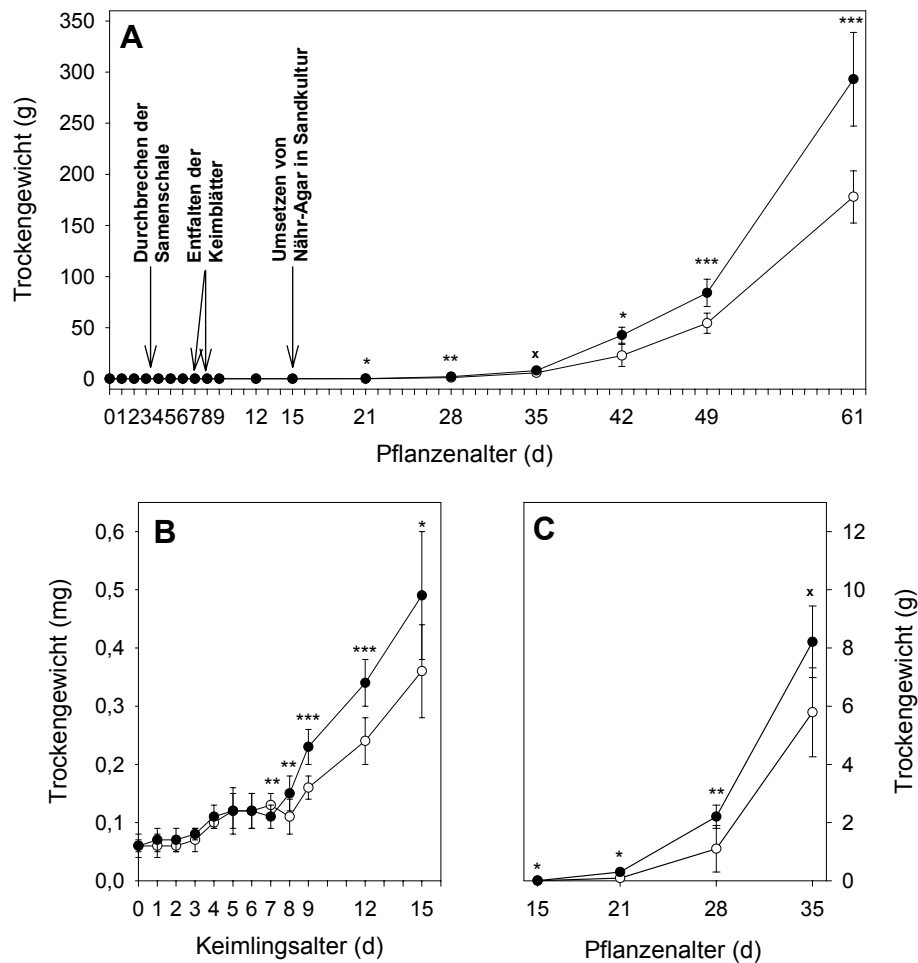
Für die weiteren Untersuchungen wurden die Tabakpflanzen in 15 l-Töpfen angezogen, da in diesen, wie im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte, das Wachstum bis zu einem Pflanzenalter von 61 d bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht limitiert wird. Das Wachstum der Tabakpflanzen wurde anhand der Trockengewichtszunahme von der Aussaat bis zum Beginn der Blüte verfolgt und die Relativen Wuchsraten der Pflanzen berechnet. Um einen möglichen Einfluss der erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Biomasseverteilung charakterisieren zu können (Kramer, 1981; Saralabai et al., 1997), wurde von Pflanzen im Alter von 21 d bis 61 d auch die Trockengewichtszunahme einzelner Pflanzenteile bestimmt und daraus das Spross-Wurzel- und das Stängel-Blätter-Verhältnis sowie das Spezifische Blatttrockengewicht berechnet. Zusätzlich wurden von einzelnen Blättern die Kohlenstoff- und Stickstoffanteile am Trockengewicht untersucht.

### 3.2.1 Trockengewichtszunahme

Die Trockengewichtszunahme von Tabakpflanzen in 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> von der Aussaat bis zum Alter von 61 d ist in Abb. 18 dargestellt. Aufgrund des exponentiellen Verlaufs des Zuwachses von etwa 0,07 mg Samentrockengewicht auf über 175 g bzw. 290 g Pflanzentrockengewicht werden einzelne Ausschnitte dieser Kurve vergrößert.

Die jungen Tabakkeimlinge nehmen unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration bereits drei Tage nach der Aussaat auf Nähr-Agar an Trockengewicht zu (vgl. Abb. 18 B). Die Samenschale ist zu diesem Zeitpunkt aufgebrochen und die Keimwurzel hat sich herausgestülpt, so dass bereits Nährsalze aus dem Medium aufgenommen werden können. Dies kann ebenso wie die Oxidation der Speicherlipide zum Anstieg des Trockengewichts beitragen. In den darauf folgenden zwei bis drei Tagen wächst die Wurzel weiter und das Hypokotyl wird sichtbar. Trotz des Wachstums bleibt das Trockengewicht konstant. Mobilisierung und Verbrauch des gespeicherten Kohlenstoffs sind offenbar im Gleichgewicht.

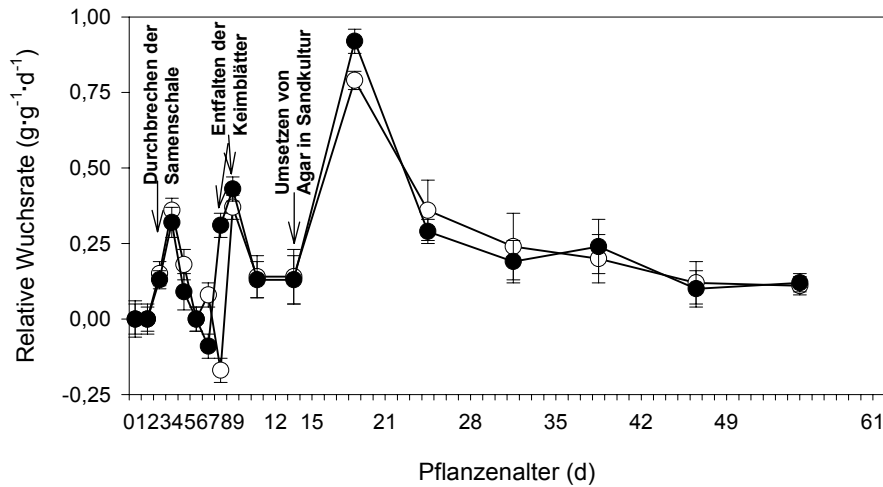
Dann sinkt das Trockengewicht der Keimlinge mit Beginn der Entfaltung der Keimblätter bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration am Tag 7 und bei Keimlingen in 360 ppm CO<sub>2</sub> am Tag 8 nach der Aussaat für einen Tag leicht ab. Bei der Keimblattentfaltung werden offensichtlich mehr Kohlenhydrate veratmet als durch Oxidation bereitgestellt werden können. Danach steigt das Trockengewicht bis zum übernächsten bzw. nächsten Tag steil an. Bereits am 8. Tag nach der Aussaat übersteigt das Trockengewicht der Pflänzchen in 700 ppm CO<sub>2</sub> jenes der Keimlinge in 360 ppm CO<sub>2</sub> signifikant ( $p < 0,01$ ). Dieser Unterschied vergrößert sich bis zum Alter von 61 d weiter (vgl. Abb. 18 A, C).



**Abb. 18:** Trockengewichtszunahme von Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●), mit dem Alter (A) vom Zeitpunkt der Aussaat bis zum Alter von 61 d, (B) von der Aussaat auf Nähr-Agar bis zum Vereinzeln in Sandkultur und (C) während der ersten drei Wochen nach dem Vereinzeln. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (bis zum Alter von 15 d: n = 30, ab dem Alter von 21 d: n = 5). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.

Aus den in Abb. 18 dargestellten Mittelwerten der Trockengewichte der Gesamtpflanzen wurden die Relativen Wuchsraten berechnet. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, ändern sie sich mit dem Pflanzenalter. Zu Beginn der Keimung steigen die Wuchsraten zunächst unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration an und sinken ab dem 4. Tag nach der Keimung, wenn der Keimling durch die Samenschale bricht, wieder ab. Von Tag 4 auf Tag 5 ist keine Gewichtszunahme festzustellen (vgl. Abb. 18 B), die Relative Wuchsrate ist 0. Während des Entfaltens der Keimblätter und Abstoßens der Samenschale sinkt die Relative Wuchsrate dann auf negative Werte. Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration steigt die Wuchsrate ab dem 7. Tag nach der Aussaat steil an, wohingegen dies bei 360 ppm CO<sub>2</sub> erst ab dem 8. Tag geschieht. Nach Tag 9 sinken die Relativen Wuchsraten während des weiteren Wachstums der Keimlinge auf Nähr-Agar wieder ab und sind dann unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration. Nach dem Vereinzeln der Keimlinge in Sand 15 d nach der Aussaat steigen die Relativen Wuchsraten drastisch von 0,14

auf 0,93 bei 700 ppm bzw. auf 0,79 bei 360 ppm CO<sub>2</sub> und sinken dann innerhalb einer Woche auf Werte unter 0,4. Von da an nehmen sie unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Behandlung langsam ab.



**Abb. 19: Relative Wuchsraten der Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●).** Sie wurden aus den Mittelwerten der Pflanzentrockengewichte berechnet (vgl. Abb. 18; bis zum Alter von 15 d: n = 30, ab dem Alter von 21 d: n = 5.)

In Tab. 8 sind die Relativen Wuchsraten in weiteren Zeitabständen noch einmal zusammengefasst, um die geringen, aber für die höhere Biomasse bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration wichtigen Unterschiede in den Raten des Wachstums in 360 und 700 ppm CO<sub>2</sub> zu verdeutlichen. Ein Vergleich der Relativen Wuchsraten zeigt bei erhöhtem CO<sub>2</sub> eine leicht höhere Wuchsrate in den ersten 15 d nach der Aussaat. Die Wuchsraten in der ersten Woche nach dem Umsetzen der Keimlinge vom Nähr-Agar in Sandkultur unterscheiden sich weitaus mehr; die Rate von 0,93 bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration übersteigt jene von 0,79 bei 360 ppm CO<sub>2</sub> sehr deutlich. Nach diesem Wachstumsschub sinken die Relativen Wuchsraten und unterscheiden sich bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht voneinander.

**Tab. 8: Relative Wuchsraten (g·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) der Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>.** Sie wurden aus den Mittelwerten der Pflanzentrockengewichte berechnet (vgl. Abb. 18; bis zum Alter von 15 d mit n = 30, ab 21 d mit n = 5.)

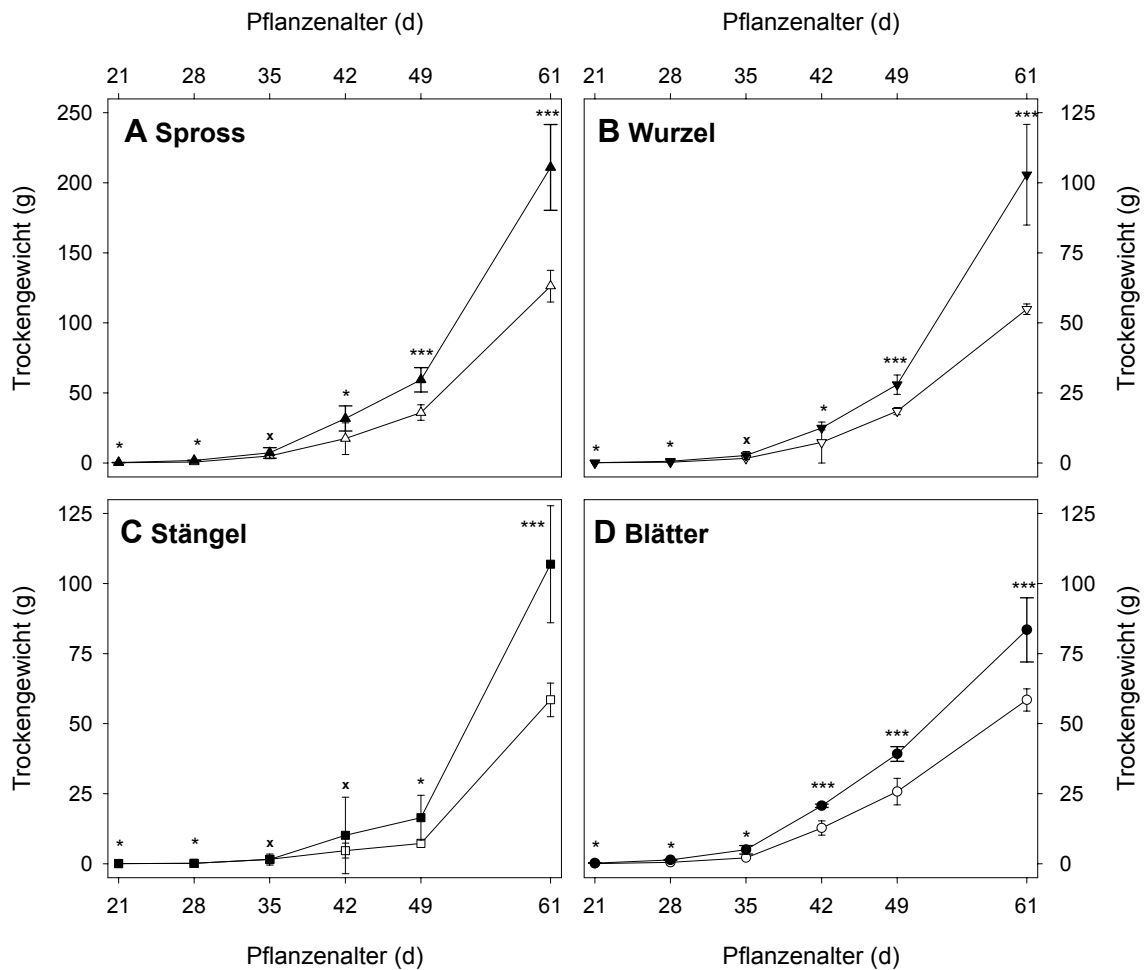
Zeitraum nach der Aussaat (d)	Relative Wuchsrate	
	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>
0 – 15	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,02
15 – 21	0,79 ± 0,05	0,93 ± 0,05
21 – 61	0,19 ± 0,10	0,18 ± 0,11

### 3.2.2 Verteilung der Biomasse

Um Änderungen in der Biomasseverteilung bei Anzucht bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration feststellen zu können, wurden die einzelnen Pflanzenorgane gewogen, daraus Spross-Wurzel- und Stängel-Blätter-Verhältnisse berechnet und die Spezifischen Blatttrockengewichte bestimmt. Um einen Eindruck von der Kohlenstoff- und Stickstoffverteilung der Pflanzen zu gewinnen, wurden die Anteile dieser beiden Elemente am Trockengewicht und die C/N-Verhältnisse von einzelnen Blättern bestimmt.

#### Trockengewichtszunahme einzelner Pflanzenteile

In Abb. 20 sind die Zunahmen der Trockengewichte verschiedener Pflanzenteile, nämlich des Sprosses, der Wurzel, des Stängels und der Blätter, mit dem Pflanzenalter dargestellt und in Tab. 9 die jeweiligen Relativen Wuchsraten aufgelistet. Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sind die Trockengewichte zu allen Messzeitpunkten höher als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Dieser absolute Unterschied vergrößert sich bei allen Pflanzenteilen mit zunehmendem Pflanzenalter. Spross und Wurzel nehmen mit der Zeit gleichmäßig an Trockengewicht zu (vgl. Abb. 20 A und B). Der Verlauf der Biomassezunahme von Spross und Wurzel entspricht dem Zunahmeverlauf der Gesamtpflanze (vgl. Abb. 18), was auch der Vergleich der Relativen Wuchsraten von Spross und Wurzel mit den Relativen Wuchsraten der Gesamtpflanze zeigt (vgl. Tab. 9). Während die Relativen Wuchsraten sowohl der Gesamtpflanze als auch des Sprosses und der Wurzel mit zunehmendem Alter von 21 bis 61 d sinken, erreichen die Wuchsraten der Stängel zwischen 28 d und 42 d ein Maximum. Zwischen 42 d und 49 d nimmt der Stängel dann kaum mehr an Biomasse zu. Ab einem Alter von 49 d steigt das Gewicht dann wieder deutlich an. Das Trockengewicht der Blätter nimmt ab einem Pflanzenalter von 35 d nahezu linear zu. Erst ab diesem Zeitpunkt sinken die Relativen Wuchsraten der Blätter.



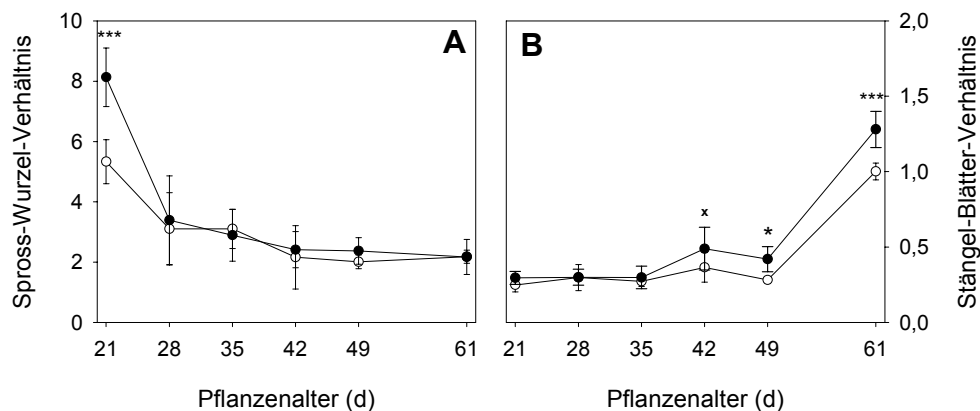
**Abb. 20:** Trockengewichtszunahme mit dem Pflanzenalter von Spross ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ), Wurzel ( $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ ), Stängel ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ) und Blätter ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) der Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm ( $\triangle$ ,  $\nabla$ ,  $\diamond$ ,  $\circ$ ) und 700 ppm CO<sub>2</sub> ( $\blacktriangle$ ,  $\blacktriangledown$ ,  $\blacklozenge$ ,  $\bullet$ ). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.

**Tab. 9:** Relative Wuchsraten ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) verschiedener Pflanzenteile von Tabak, angezogen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>. Sie wurden aus den Mittelwerten der Trockengewichte (n = 5) berechnet.

Zeitraum nach der Aussaat (d)	Spross		Wurzel		Stängel		Blätter	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
21 – 28	0,29	0,28	0,39	0,42	0,13	0,12	0,28	0,27
28 – 35	0,20	0,20	0,29	0,22	0,26	0,35	0,20	0,19
35 – 42	0,18	0,21	0,22	0,22	0,25	0,27	0,20	0,20
42 – 49	0,10	0,12	0,13	0,12	0,06	0,07	0,10	0,09
49 – 61	0,10	0,11	0,09	0,11	0,17	0,16	0,07	0,06

### Spross-Wurzel- und Stängel-Blätter-Verhältnis

Die Spross-Wurzel- und Stängel-Blätter-Verhältnisse sind in Abb. 21 in Abhängigkeit vom Pflanzenalter dargestellt. Die Spross-Wurzel-Verhältnisse sind ab einem Pflanzenalter von 28 d unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Behandlung und liegen zwischen 3,3 und 2,1, wobei sie mit dem Alter leicht absinken. Die Biomasse der Wurzel nimmt also im Vergleich zur Biomasse des Sprosses unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration mit dem Alter leicht zu. Im Alter von 21 d sind die Spross-Wurzel-Verhältnisse mit 8,2 und 5,5 deutlich höher als bei älteren Pflanzen und unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ) in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration, wobei das Verhältnis bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration höher ist.



**Abb. 21:** (A) Spross-Wurzel-Verhältnis und (B) Stängel-Blätter-Verhältnis von Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●), in Abhängigkeit vom Pflanzenalter. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 5$ ). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.

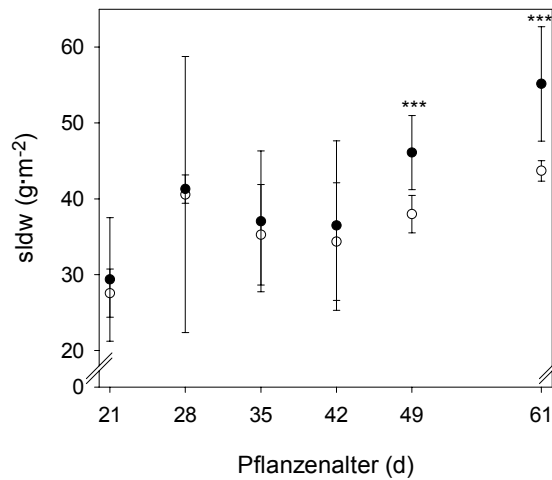
Das Stängel-Blätter-Verhältnis liegt bis zum Pflanzenalter von 35 d CO<sub>2</sub>-unabhängig etwas unter 0,3 und steigt innerhalb der darauf folgenden sieben Tage an. Dieser Anstieg ist bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration deutlich steiler, wodurch sich die Stängel-Blätter-Verhältnisse ab einem Alter von 42 d in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration unterscheiden; ab 49 d ist das Verhältnis der Pflanzen bei 700 ppm CO<sub>2</sub> signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Ab dem Alter von 42 d ist bei 700 ppm CO<sub>2</sub> im Stängel im Vergleich zu den Blättern mehr Biomasse zu finden als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Bis zum Alter von 49 d sinkt das Stängel-Blätter-Verhältnis leicht und steigt dann bis zum Alter von 61 d steil auf einen Wert von über 1 an. Das bedeutet, dass in diesem Alter das Stängelgewicht das Gewicht der Blätter übersteigt.

### Spezifisches Blatttrockengewicht

Das Spezifische Blatttrockengewicht (specific leaf dry weight, sldw) ist das Verhältnis des Blatttrockengewichts zur Blattfläche. In Abb. 22 sind die Spezifischen Blatttrockengewichte pro Pflanze gegen das Pflanzenalter aufgetragen. Die Spezifischen Blatttrockengewichte sind bis zu einem Pflanzenalter von 42 d unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Behandlung, wenngleich die sldw bei



erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration tendenziell höher sind als bei 360 ppm. Ab einem Alter von 49 d liegt das sldw bei 700 ppm CO<sub>2</sub> signifikant ( $p < 0,001$ ) über dem sldw der Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub>; eine bestimmte Blattfläche ist ab diesem Alter bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration also signifikant schwerer als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.



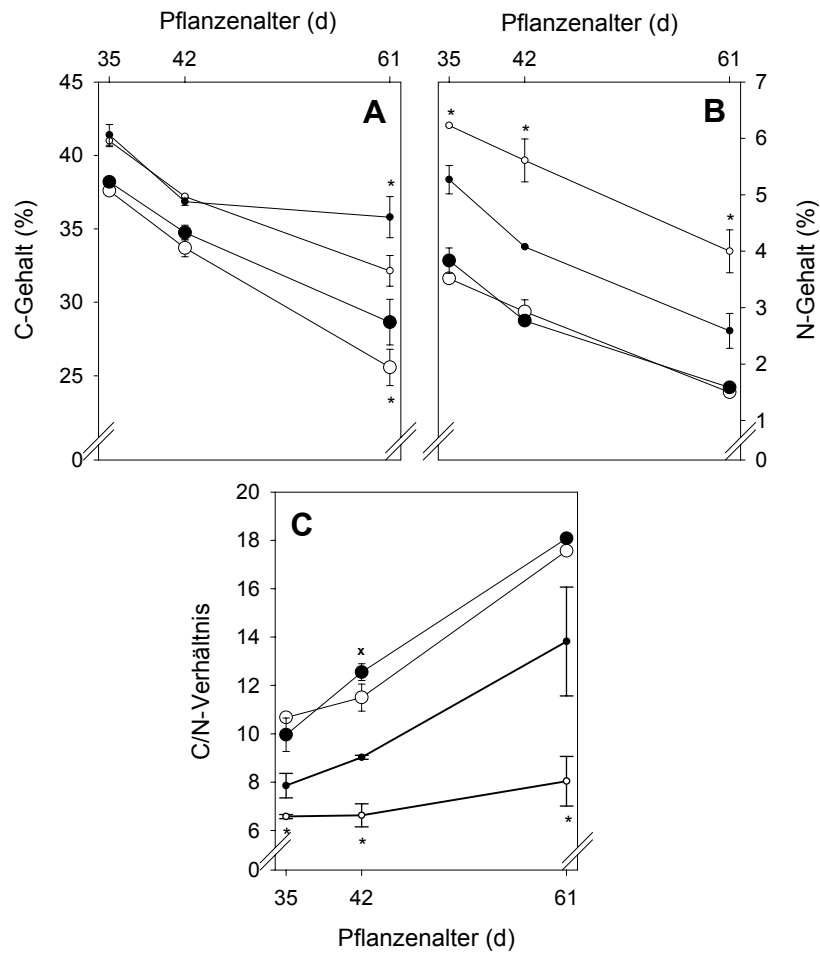
**Abb. 22: Spezifisches Blatttrockengewicht (sldw) pro Pflanze in Abhängigkeit vom Pflanzenalter.** Die Pflanzen wurden bei 360 ppm (○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●) angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 5$ ). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.

### 3.2.3 Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff in einzelnen Blättern

Die Kohlenstoff- und die Stickstoffanteile am Trockengewicht von zwei verschiedenen Blättern, Blatt 6 und 10, wurden bei 35, 42 und 61 d alten Tabakpflanzen bestimmt. Sie sind ebenso wie die daraus berechneten C/N-Verhältnisse in Abb. 23 dargestellt. Der Kohlenstoffanteil in beiden Blättern ist bis zu einem Pflanzenalter von 42 d unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration, wobei Blatt 6 bei 700 ppm CO<sub>2</sub> tendenziell mehr Kohlenstoff enthält als bei 360 ppm. Erst die Blätter 61 d alter Pflanzen enthalten bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Kohlenstoff als bei 360 ppm. Mit dem Alter nimmt der Kohlenstoffanteil in beiden Blättern und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ab, wobei sein Anteil beim oberen, jüngeren Blatt 10 in allen Pflanzenaltern über dem Kohlenstoffanteil im Blatt 6 liegt. Dies ist auch für den Stickstoffanteil in diesen Blättern zu beobachten: Er sinkt ebenfalls mit dem Pflanzenalter und ist im Blatt 10 höher als im Blatt 6. Während sein Anteil im Blatt 6 in allen Altern unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration ist, liegen die Stickstoffanteile bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blatt 10 immer signifikant ( $p < 0,05$ ) unter jenen bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.

Die C/N-Verhältnisse von Blatt 6 liegen bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen dicht beisammen, wohingegen die Verhältnisse von Blatt 10 bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration signifikant ( $p < 0,05$ ) höher sind als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Mit zunehmendem Pflanzenalter steigt das C/N-Verhältnis der Blätter 6 in beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, während es bei Blatt 10 lediglich bei erhöhtem CO<sub>2</sub> deutlich zunimmt. Der Stickstoffanteil am Blatttrockengewicht sinkt also im Vergleich zum

Kohlenstoffanteil mit zunehmendem Pflanzenalter und steigt mit zunehmender Insertionshöhe der Blätter, d.h. mit abnehmendem Blattalter.



**Abb. 23:** (A) Kohlenstoffgehalt, (B) Stickstoffgehalt und (C) C/N-Verhältnis von Blatt 6 (○, ●) und Blatt 10 (○, ●) von Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (○, ○) und 700 ppm CO<sub>2</sub> (●, ●), in Abhängigkeit vom Pflanzenalter. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 3). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.

## Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen des Wachstums und der Biomasseverteilung der Tabakpflanzen in 15 I-Töpfen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>

### Abhängigkeit vom Pflanzenalter

Mit zunehmendem Pflanzenalter steigen

- Trockengewichte aller Pflanzenorgane,
- Spross-Blätter-Verhältnis,
- Spezifisches Blatttrockengewicht,
- C/N-Verhältnis.

Mit zunehmendem Pflanzenalter sinken

- Spross-Wurzel-Verhältnis,
- C-Anteil am Blatttrockengewicht,
- N-Anteil am Blatttrockengewicht.

Alle Abhängigkeiten vom Pflanzenalter sind abgesehen vom C-Anteil am Blatttrockengewicht bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ausgeprägter als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.

### Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sind höher

- Trockengewichte aller Pflanzenorgane,
- Relative Wachsrates,
- Spross-Wurzel-Verhältnis (ab 42 d),
- Spezifisches Blatttrockengewicht (ab 42 d),
- C/N-Verhältnis in Blatt 10.

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sind niedriger

- N-Anteil am Blatttrockengewicht von Blatt 10.

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration bleiben unverändert

- Spross-Wurzel-Verhältnis (außer 21 d)
- C-Anteil am Blatttrockengewicht (außer 61 d).

Alle CO<sub>2</sub>-abhängigen Unterschiede nehmen, abgesehen von der Relativen Wachsrates und dem Spross-Wurzel-Verhältnis, mit dem Pflanzenalter zu.

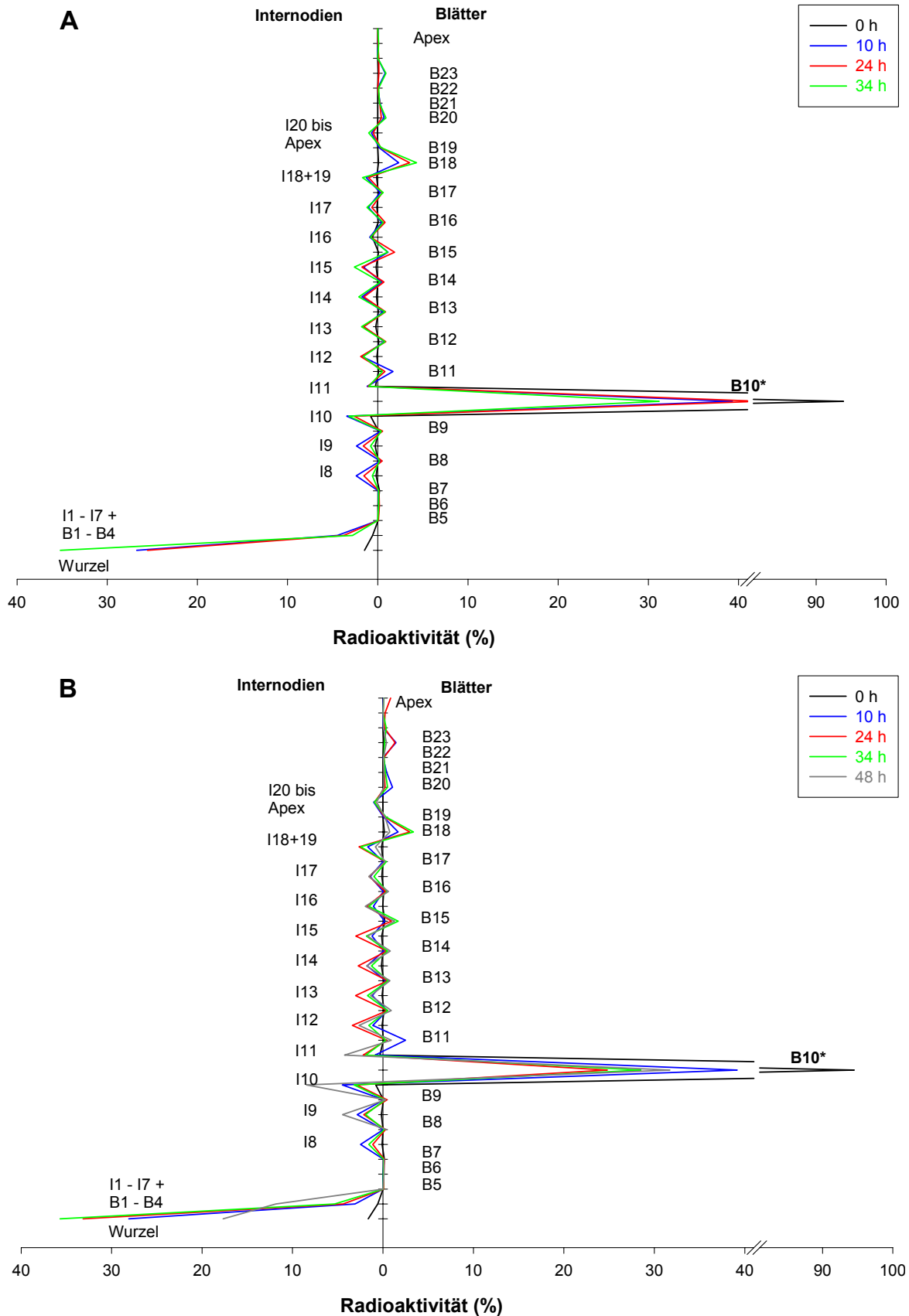
### 3.3 Assimilatverteilung

Durch die Bestimmung der Assimilatverteilung in der Tabakpflanze kann ein möglicher Einfluss erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Source-Sink-Beziehungen und damit auf die Wachstumssteuerung ermittelt werden (Fetene et al., 1993). Zur Untersuchung der Assimilatverteilung wurde einem Blatt am Ende der Lichtphase eine Mischung aus <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> und <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> zur Assimilation angeboten und der Verbleib der radioaktiven Photoassimilate in der Pflanze untersucht. Anhand der in der ganzen Pflanze insgesamt gefundenen Radioaktivität wurden die Anteile an markierten Assimilaten in den einzelnen Pflanzenteilen bestimmt. Der gemessene Anteil an veratmetem <sup>14</sup>C, der bei allen Untersuchungen zwischen 3 und 6 % lag, wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt. Aus den auf diese Weise erhaltenen Verteilungsmustern ergeben sich die Source-Sink-Beziehungen. Diese ermöglichen dann die Berechnung und den Vergleich von Relativen Sinkstärken.

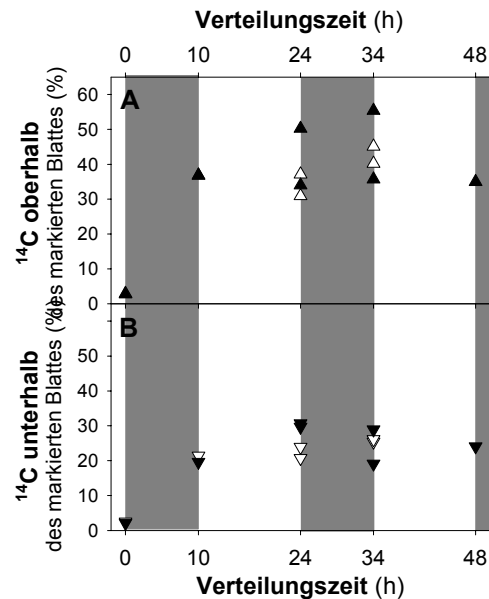
#### 3.3.1 Export- und Allokationsdauer der Assimilate

Für die Bestimmung des Allokationsmusters der Assimilate in den Pflanzen sowie der Relativen Sink-Stärken und damit der endogenen Source-Sink-Beziehungen ist es wichtig, dass die Assimilatverteilung zum Zeitpunkt der Messungen abgeschlossen ist. Deshalb wurde die Kinetik der Verteilung der Assimilate des 10. Blattes 42 d alter Tabakpflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren, erstellt. Gemessen wurde nach 0, 10, 24 und 34 h, sowie bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auch nach 48 h. Der 10/14-Stunden-Rhythmus ergibt sich aus der Dauer der Dunkel- und der Lichtphase. Im markierten Blatt waren die radioaktiven Assimilate gleichmäßig verteilt (Daten nicht gezeigt). Die Allokationsmuster sind in Abb. 24 für die einzelnen Organe und in Abb. 25 für die Pflanzenteile oberhalb und unterhalb des markierten Blattes dargestellt. In Tab. 10 werden die Anteile des exportierten <sup>14</sup>C am insgesamt wiedergefundenen <sup>14</sup>C aufgelistet und gezeigt, wie sich dieses exportierte <sup>14</sup>C auf die drei Pflanzenteile Wurzel, Internodien und Blätter verteilt. Internodium 10, das auch den Blattstiel des markierten Blatts einschloss, wurde bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Die Allokationsmuster der Photoassimilate von Blatt 10 sind bei beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten nach allen Verteilungszeiten ähnlich. Dies gilt sowohl für die Allokation in einzelne Organe als auch für die Verteilung in die Pflanzenteile oberhalb und unterhalb des markierten Blattes. Sowohl oberhalb als auch unterhalb werden mehr radioaktive Assimilate in den Internodien als in den Blättern gefunden. Die Photoassimilate aus Blatt 10 werden bevorzugt in das direkt darüber liegende Blatt 11 (v. a. nach 10 h) und in die Blätter 15, 18, 20 und 23 transportiert.



**Abb. 24:** Allokationsmuster der  $^{14}\text{C}$ -markierten Photoassimilate des Blattes 10 42 d alter Tabakpflanzen nach verschiedenen Allokationszeiten in (A) 360 ppm und (B) 700 ppm  $\text{CO}_2$ . Bei den Allokationszeiten 24 und 34 h sind Mittelwerte von Doppelproben dargestellt, die übrigen Werte sind Einzelmessungen.



**Abb. 25:** Anteile des  $^{14}\text{C}$  am wiedergefundenen  $^{14}\text{C}$  (A) in den Pflanzenteilen oberhalb ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) und (B) in den Pflanzenteilen unterhalb ( $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ ) des markierten Blattes 10 in Abhängigkeit von der Allokationszeit. Die Pflanzen wurden bei 360 ppm ( $\Delta$ ,  $\nabla$ ) bzw. 700 ppm  $\text{CO}_2$  ( $\blacktriangle$ ,  $\blacktriangledown$ ) angezogen. Dargestellt sind Einzelmessungen. ■ - Dunkelphase, □ - Lichtphase.

**Tab. 10:** Anteil des exportierten  $^{14}\text{C}$  am wiedergefundenen  $^{14}\text{C}$  und Anteile des exportierten  $^{14}\text{C}$  in der Wurzel, in den Internodien und in den Blättern 42 d alter Tabakpflanzen nach verschiedenen Allokationszeiten. Die Pflanzen wurden bei 360 ppm bzw. 700 ppm  $\text{CO}_2$  angezogen. Bei den Allokationszeiten 24 und 34 h sind Mittelwerte von Doppelproben dargestellt, die übrigen Werte sind Einzelmessungen.

Verteilungszeit (h)	exportiertes $^{14}\text{C}$ aus B 10* (% des Gesamt $^{14}\text{C}$ )		Anteil am export. $^{14}\text{C}$ in Wurzel (%)		Anteil am export. $^{14}\text{C}$ in Internodien (%)		Anteil am export. $^{14}\text{C}$ in Blättern (%)	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
0	6,1	5,5	24,6	29,1	45,9	36,4	29,5	34,5
10	60,7	60,8	44,0	46,2	34,6	32,4	21,4	21,4
24	57,5	75,5	44,2	44,0	30,8	38,5	25,0	17,6
34	68,8	71,5	51,2	50,0	26,0	31,3	22,8	18,9
48		68,3		25,9		48,5		25,6

Wie das Assimilatverteilungsmuster unmittelbar nach der 15-minütigen Gabe des  $^{14}\text{CO}_2$  (0 h) zeigt, beginnt der Assimilatexport aus dem Blatt bereits während der  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung. Rund 6 % des assimilierten  $^{14}\text{C}$  sind am Ende der 15-minütigen Markierungszeit bereits exportiert: etwa 3 % nach oben und etwas weniger als 2,5 % nach unten. Ein Viertel des exportierten  $^{14}\text{C}$  ist bereits in die Wurzel gelangt.

Nach 10 h Verteilungsdauer sind bei beiden CO<sub>2</sub>-Varianten ungefähr 60 % der radioaktiven Assimilate aus Blatt 10 exportiert. Diese teilen sich auf etwa 35 % oberhalb und etwa 20 % unterhalb des markierten Blattes. Etwas weniger als die Hälfte des exportierten <sup>14</sup>C ist in den Wurzeln enthalten. Auffallend hoch, im Vergleich zum Einbau von <sup>14</sup>C in die übrigen Blätter, ist der <sup>14</sup>C-Gehalt von Blatt 18, in dem etwa 3 % des exportierten radioaktiven Kohlenstoffs zu finden waren.

Durch Verlängerung der Allokationszeit auf 24 h ändert sich der Anteil an exportierten Assimilaten aus Blatt 10 an den insgesamt wiedergefundenen bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen, kaum, wohingegen bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen deutlich mehr Assimilate exportiert wurden. Die Verteilung dieser Assimilate nach oben und nach unten ist bei Pflanzen beider Anzuchtvarianten gleich, so dass bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen beide Anteile etwas höher liegen. Bei allen Pflanzen befinden sich in der Wurzel wiederum knapp die Hälfte der exportierten Assimilate. In den oberen Pflanzenteilen, insbesondere den Blättern 15, 18, 20 und 23, sind die relativen Mengen an exportierten Assimilaten bei beiden Anzuchtvarianten nach 24 h Allokationszeit deutlich höher als nach 10 h.

Nach 34 h Allokationszeit ist der exportierte <sup>14</sup>C-Anteil am insgesamt wiedergefundenen bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen waren, etwas höher und bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen geringfügig niedriger als nach 24 h. Ebenfalls kaum ändern sich die Anteile an radioaktiv markierten Assimilaten, die nach oben bzw. nach unten transportiert wurden, mit der Zeit. Der in der Wurzel gefundene Anteil an exportierten Assimilaten liegt bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nach 34 h etwas höher als nach 24 h. Die relativen Mengen, die in die oberen Pflanzenteile transportiert wurden, ändern sich durch die Verlängerung der Allokationszeit von 10 auf 34 h kaum, während die Mengen in den unteren Internodien mit zunehmender Verteilungsdauer sinken.

Durch eine weitere Verlängerung der Allokationszeit auf 48 h ändert sich der Anteil des exportierten <sup>14</sup>C und auch die <sup>14</sup>C-Verteilung nach oben bzw. unten kaum mehr. Allerdings sinkt der Anteil am exportierten <sup>14</sup>C, der in der Wurzel gefunden wurde, um fast die Hälfte. Auffallend ist außerdem, dass der relative <sup>14</sup>C-Gehalt im unteren Stängel bis zum Internodium 10 nach 48 h am höchsten ist. Zusammen wurden in der Wurzel und im unteren Stängelbereich 43 % der exportierten Assimilate gefunden. Dieser Anteil liegt kaum unter dem nach 10 und 24 h Allokationszeit in den Wurzeln gefundenen Anteil des <sup>14</sup>C.

Interessant ist der Zeitverlauf des relativen <sup>14</sup>C-Gehalts in den Internodien und Blättern unterhalb und oberhalb des markierten Blattes: Während bis zum Zeitpunkt 34 h der <sup>14</sup>C-Gehalt in den unteren Internodien mit zunehmender Dauer sinkt, ist er nach 48 h deutlich höher als nach den übrigen Allokationszeiten. Dagegen ist in den Blättern und Internodien oberhalb des <sup>14</sup>C-markierten Blattes nach dieser Zeit weniger radioaktiver Kohlenstoff als nach 24 und 34 h.

Die Kinetik zeigt, dass sich das Allokationsmuster der Assimilate zwischen 24 und 34 h Verteilungszeit kaum, durch Verlängerung der Allokationszeit auf 48 h aber deutlich ändert. Diese Veränderung kann ganz verschiedene Gründe haben, u. a. unterschiedlich starke Veratmung der radioaktiven Kohlenhydrate. Da der Export der Assimilate aus Blatt 10 bei 360 ppm CO<sub>2</sub> nach 10 h und bei 700 ppm CO<sub>2</sub> nach 24 h und die Allokation der Assimilate nach oben und nach unten bei beiden Anzuchtvarianten nach 24 h im wesentlichen abgeschlossen zu sein scheint, wurde für die weiteren Untersuchungen der Assimilatverteilung die Allokationszeit von 24 h gewählt.

### 3.3.2 Verteilung der Assimilate einzelner Blätter

Zur Untersuchung des Einflusses der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Assimilatverteilung jüngerer Blätter wurde außer dem Blatt 10 auch den Blättern 15 und 20 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> zur Photosynthese angeboten. Die erhaltenen <sup>14</sup>C-Allokationsmuster sind in Abb. 26 zusammengefasst. Tab. 11 enthält die Anteile des exportierten <sup>14</sup>C am insgesamt wiedergefundenen und dessen Verteilung auf die drei Pflanzenteile Wurzel, Stängel und Blätter.

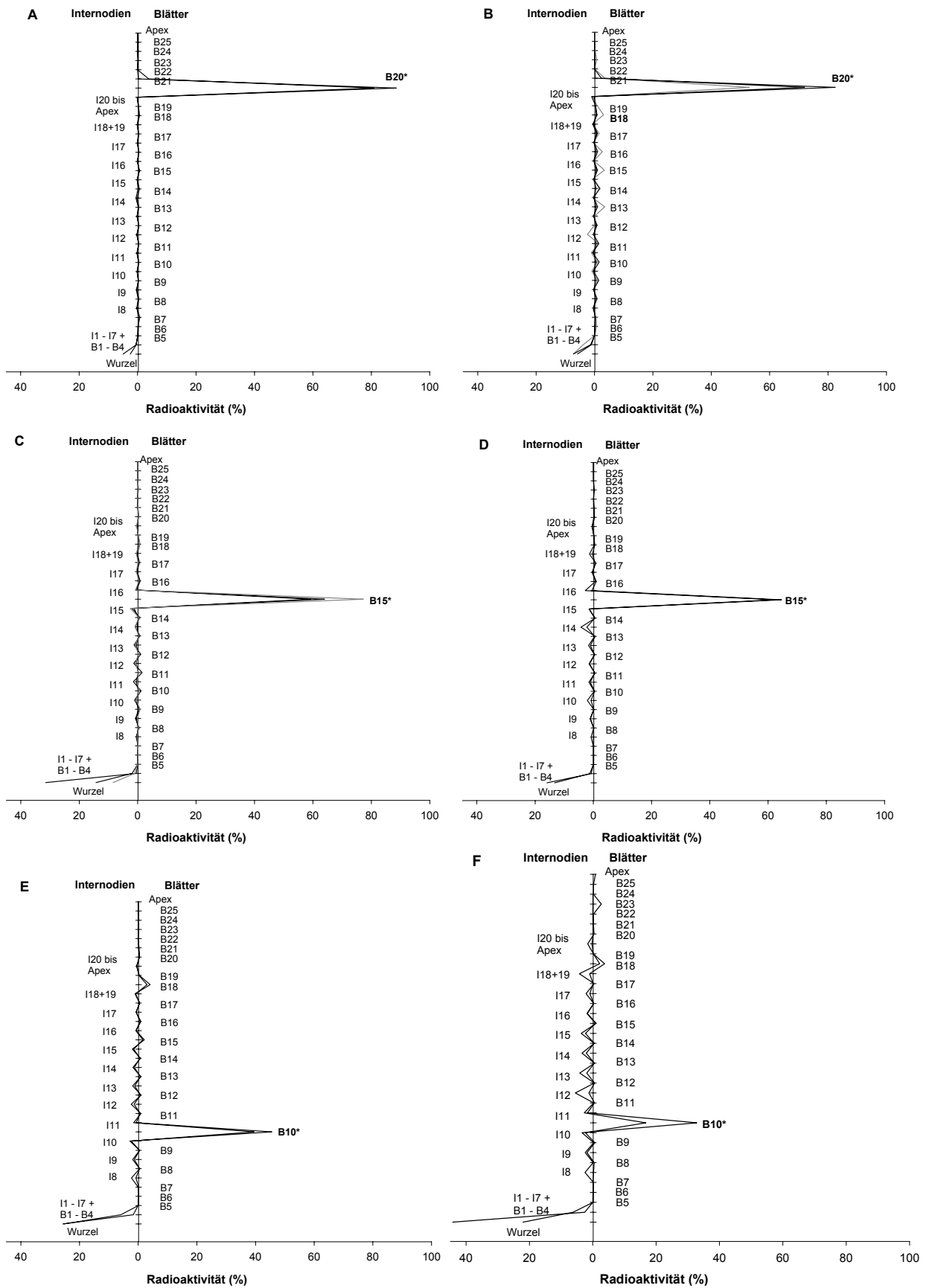
#### Assimilatexport und Transport in die Wurzel

Mit zunehmender Insertionshöhe des markierten Blattes nimmt der darin gemessene Anteil an radioaktiven Assimilaten an den insgesamt wiedergefundenen deutlich zu (vgl. Abb. 26 und Tab. 11). Bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen wird aus allen Blättern ein größerer Anteil an radioaktiven Assimilaten exportiert als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen. Besonders deutlich ist, wie bereits erwähnt, der Unterschied im Export bei Blatt 10. Bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen werden etwa 75 % der wiedergefundenen Radioaktivität außerhalb des markierten Blattes gemessen, bei Pflanzen, die bei 360 ppm wuchsen, dagegen etwas weniger als 60 %. Von diesen exportierten Assimilaten werden unabhängig von der Anzuchtvariante ungefähr 44 % in die Wurzel transportiert.

Aus Blatt 15 werden bei beiden CO<sub>2</sub>-Bedingungen mit 33 % bzw. 36 % deutlich weniger Assimilate exportiert als aus Blatt 10. Der davon in die Wurzel transportierte Anteil ist bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen mit rund 40 % etwas niedriger als bei Blatt 10. Bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen, steigt dieser Anteil scheinbar leicht mit der Blatthöhe, was aber auf den untypisch hohen Export von fast 70 % in einer der untersuchten Pflanzen zurückzuführen ist.

Aus Blatt 20 werden bei 700 ppm CO<sub>2</sub> etwa doppelt soviel Assimilate exportiert wie bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Von den drei untersuchten Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen fällt eine Tabakpflanze durch ihren hohen Anteil an exportierten Assimilaten von 67 % auf, während die exportierten Anteile bei 700 ppm CO<sub>2</sub> sonst um 23 % liegen. Diese hohe relative Menge an Assimilaten wurde im wesentlichen nach unten und dort v. a. in die Blätter 18, 15 und 13 exportiert. Bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen werden gleiche Anteile der exportierten Assimilate, nämlich fast 25 %, in die Wurzel transportiert.





**Abb. 26:** Verteilungsmuster der Assimilate der Blätter 10, 15 und 20 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen in (A, B, C) 360 ppm und (D, E, F) 700 ppm CO<sub>2</sub> nach der Allokationszeit 24 h. Dargestellt sind jeweils Einzelmessungen als schwarze bzw. graue Spitzen.

**Tab. 11: Anteil des exportierten  $^{14}\text{C}$  am wiedergefundenen  $^{14}\text{C}$  und Anteile des exportierten  $^{14}\text{C}$  in der Wurzel, in den Internodien und in den Blättern 42 d alter Tabakpflanzen nach Markierung der Blätter 10, 15 bzw. 20.** Die Pflanzen wurden bei 360 ppm bzw. 700 ppm  $\text{CO}_2$  angezogen. Angegeben sind Mittelwerte ( $n = 2$ , bei Blatt 15 bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  und bei Blatt 20 bei 700 ppm  $\text{CO}_2$   $n = 3$ ).

Blatt	exportiertes $^{14}\text{C}$ aus markiertem Blatt*		Anteil am export. $^{14}\text{C}$ in Wurzel		Anteil am export. $^{14}\text{C}$ in Internodien		Anteil am export. $^{14}\text{C}$ in Blättern	
	(%)		(%)		(%)		(%)	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
<b>10</b>	57,5	75,5	44,4	44,0	30,9	38,5	25,0	17,6
<b>15</b>	33,1	36,4	46,4	40,3	23,7	30,8	30,9	30,0
<b>20</b>	15,3	30,8	24,2	24,7	19,2	23,3	56,6	52,0

Ebenso wie die Anteile der exportierten Assimilate, die in die Wurzel transportiert werden, sind auch die Anteile, die im Spross wiedergefunden werden, bei allen drei untersuchten Blättern bei beiden  $\text{CO}_2$ -Behandlungen sehr ähnlich. Die Assimilatverteilung im Spross zwischen Internodien und Blättern zeigt dagegen  $\text{CO}_2$ -abhängige Unterschiede. Bei Blatt 10 werden zwar bei beiden Anzuchtvarianten mehr  $^{14}\text{C}$ -markierte Assimilate in den Internodien als in den Blättern gefunden, während aber bei den Pflanzen, die bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  wuchsen, das Verhältnis der Anteile nur 1,2 ist, liegt das Verhältnis zwischen dem Anteil in den Internodien und jenem in den Blättern bei Hoch- $\text{CO}_2$ -Pflanzen bei 2,1. Die Verteilung der Assimilate aus Blatt 15 fällt bei 360 ppm mit einem Verhältnis von 0,8 zugunsten der Blätter aus. Bei 700 ppm dagegen ist das Verhältnis 1; sowohl in den Blättern als auch in den Internodien sind also gleich viel radioaktive Assimilate enthalten. Die Assimilate aus Blatt 20 werden bei beiden  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen bevorzugt in die Blätter transportiert. Das Verhältnis zwischen dem Anteil in den Internodien und jenem in den Blättern beträgt bei Pflanzen, die bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  angezogen wurden, 0,3 und bei Hoch- $\text{CO}_2$ -Pflanzen 0,4.

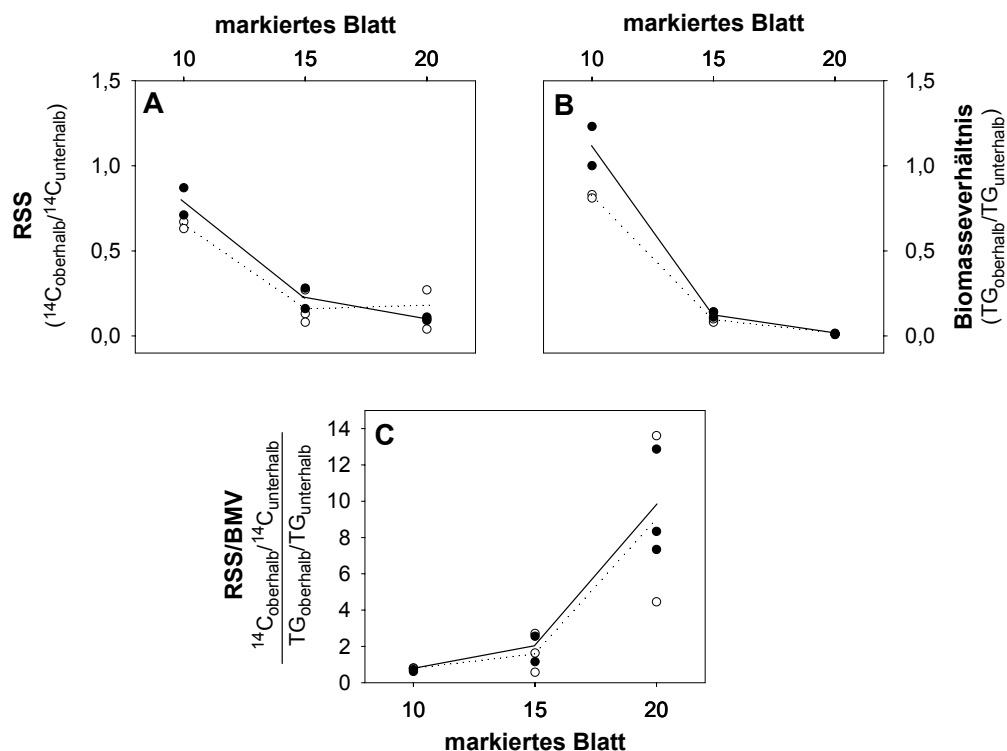
### Relative Sink-Stärke

Als Relative Sink-Stärke (RSS) wird die Akquisition von Assimilaten durch ein Sink (oder eine Sink-Gruppe) im Vergleich zu jener durch die übrigen Sinks bezeichnet. Sie lassen sich durch Vergleich bspw. der  $^{14}\text{C}$ -Allokation ermitteln. Die RSS beziehen sich stets auf die Assimilate aus einem bestimmten Blatt. Nach Fetene und Beck (1993) wurden die RSS aus den  $^{14}\text{C}$ -Gehalten der Pflanzenteile oberhalb und unterhalb des Versuchsblattes berechnet. Die Biomasseverteilung bleibt bei ihrer Berechnung unberücksichtigt. In Abb. 27 wird der RSS das Biomasseverhältnis (BMV) des Sprosses oberhalb des markierten Blattes 10, 15 bzw. 20 im Vergleich zum Pflanzenteil unterhalb gegenübergestellt. Außerdem wird das Verhältnis dieser beiden Größen (RSS/BMV) gezeigt. Dieses gibt die Sink-Stärke eines bestimmten Trockengewichts des Pflanzenteils oberhalb des markierten Blattes im Vergleich zur Sink-Stärke des gleichen Trockengewichts des Pflanzenteils unterhalb des Blattes an.

Die RSS nehmen bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen mit zunehmender Insertionshöhe des markierten Blattes ab (vgl. Abb. 27 A). Etwa die Hälfte der Assimilate des Blattes 10 werden nach oben bzw. nach unten transportiert. Blatt 15 exportiert dagegen mehr als 75 % seiner Assimilate nach unten. Die exportierten Assimilate aus Blatt 20 werden, mit einer Ausnahme bei 360 ppm CO<sub>2</sub>, zu über 80 % nach unten transportiert.

Die BMV sinken mit zunehmender Blatthöhe (vgl. Abb. 27 B), denn während bei Blatt 10 der Pflanzenteil oberhalb des Blattes etwa gleich viel wiegt wie der Teil unterhalb, macht die Biomasse des Pflanzenteils oberhalb von Blatt 15 nur etwa 13 % des Gesamtrockengewichts der Pflanze aus. Bei Blatt 20 sinkt das Biomasseverhältnis unter 0,02; die Sprossspitze oberhalb des Blattes 20 trägt also nur rund 1 % zum Gesamtpflanzengewicht bei.

Das RSS/BMV-Verhältnis nimmt unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration mit zunehmender Blatthöhe zu. Bei Blatt 10 liegt es um 0,7 (vgl. Abb. 27 C). Bei Blatt 15 ist es, mit einer Ausnahme, größer als 1; eine bestimmte Biomasse oberhalb von Blatt 15 enthält also mehr Photoassimilate aus Blatt 15 als die entsprechende Biomasse unterhalb des Blattes. Am größten sind die RSS/BMV-Verhältnisse bei Blatt 20. Sie liegen zwischen 4 und 14. Eine bestimmte Biomasse oberhalb des Blattes 10 erhält weniger Assimilate aus diesem, als die gleiche Biomasse oberhalb der Blätter 15 bzw. 20 aus diesen jeweiligen Blättern bekommt.



**Abb. 27:** (A) Relative Sink-Stärke (RSS) und (B) Biomasseverhältnis (BMV), jeweils ausgedrückt als Verhältnis zwischen dem wiedergefundenen <sup>14</sup>C bzw. dem Trockengewicht des Sprosses oberhalb und dem <sup>14</sup>C bzw. dem Trockengewicht der Organe unterhalb des markierten Blattes und (C) RSS/BMV. Alle Werte stammen von 42 d alten Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (---○---) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (—●—). Dargestellt sind Einzelmessungen.

### Assimilationsraten

Anhand der CO<sub>2</sub>-Abnahme im Gaswechsellsystem während der Applikation des <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> konnten die Nettoassimilationsraten (NAR) während den Markierungen berechnet werden. Diese Photosyntheseraten werden in Tab. 12 mit den NAR, die mit dem Photosynthese-Messsystem HCM 1000 in den Klimakammern gemessen wurden, verglichen. Demnach liegen die NAR während des Markierungsexperiments sowohl bei Blatt 10 als auch bei Blatt 15 bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen deutlich unter jenen der in der Klimakammer gemessenen. Da die NAR bei den konstanten Bedingungen in der Klimakammer keinen Tagesgang aufweist, spielt die unterschiedliche Tageszeit, zu denen die Messungen durchgeführt wurden, keine Rolle. Als Ursache für die Unterschiede kommen die veränderten Bedingungen während der Markierungsversuche, insbesondere die etwas geringere Lichtintensität als in der Klimakammer, in Frage. Bei beiden Messbedingungen sind die NAR der älteren Blätter 10 deutlich niedriger als bei den Blättern 15. Während die in der Klimakammer gemessenen Photosyntheseraten von Blatt 10 unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration sind, liegen sie bei Blatt 15 bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen etwas über den Raten der Pflanzen, die bei 360 ppm wuchsen. Die NAR während der Markierung liegen dagegen bei beiden Blättern bei 700 ppm CO<sub>2</sub> über den Werten bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.

**Tab. 12: Nettoassimilationsraten (NAR) der Blätter 10 und 15 während der radioaktiven Markierung der Assimilate und in der Klimakammer.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von n Proben.

	NAR während Markierung		NAR in Klimakammer	
	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>
<b>Blatt 10</b>	1,5 ± 0,3 (n = 6)	2,9 ± 1,2 (n = 6)	6,4 ± 0,2 (n = 5)	6,4 ± 0,7 (n = 5)
<b>Blatt 15</b>	3,0 (n = 2)	6,1 (n = 2)	10,3 ± 2,2 (n = 5)	12,6 ± 0,7 (n = 5)

## **Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der Assimilatverteilung aus verschiedenen Blättern bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>**

### Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sind höher

- Assimilatexport aus Blatt 10 und 20,
- Assimilatexportzeit aus Blatt 10,
- RSS und BMV des Sprosses oberhalb im Vergleich zu unterhalb des markierten Blattes 10 bzw. 15.

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration bleiben unverändert

- Assimilatverteilungsmuster,
- Assimilatverteilungszeit,
- RSS/BMV des Sprosses oberhalb im Vergleich zu unterhalb des markierten Blattes.

### Abhängigkeit von der Blatthöhe

Mit zunehmender Blatthöhe steigt

- RSS/BMV des Sprosses oberhalb im Vergleich zu unterhalb des markierten Blattes.

Mit zunehmender Blatthöhe sinkt

- RSS des Sprosses oberhalb im Vergleich zu unterhalb des markierten Blattes,
- Assimilatexport,
- Anteil der exportierten Assimilate in den Blättern im Vergleich zum Anteil in den Internodien. Aus Blatt 10 werden mehr Assimilate in die Internodien als in die Blätter exportiert.

### 3.4 Phytohormongehalte

Cytokinine und Auxine spielen als Wachstumshormone während der gesamten Pflanzenentwicklung in den verschiedenen Organen entscheidende Rollen. Um den Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft auf die Regulation des Pflanzenwachstums besser verstehen zu können, wurden die Konzentrationen der wichtigsten Cytokinine und des Auxins Indol-3-essigsäure in verschiedenen Organen der Tabakpflanzen im Laufe der Entwicklung bestimmt und die Gehalte in den Organen berechnet. Außerdem wurden die Cytokininkonzentrationen im Xylemsaft untersucht, da darin die Cytokinine von ihrem Hauptsyntheseort, der Wurzel, in die Sprossorgane transportiert werden.

#### 3.4.1 Cytokinine in den einzelnen Pflanzenorganen und im Xylemsaft

Die Cytokininkonzentrationen und -gehalte wurden im Apex, in den Sink-Blättern, in einem Source-Blatt, im Stängel und in der Wurzel von 28, 35 und 42 d alten Tabakpflanzen bestimmt, die bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der Cytokinine im Xylemsaft an der Sprossbasis bzw. am Blattstiel des Source-Blattes bei 35 d alten Pflanzen untersucht. Die 15 mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode quantifizierbaren Cytokinine der drei Familien Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP) wurden in je drei Gruppen zusammengefasst:

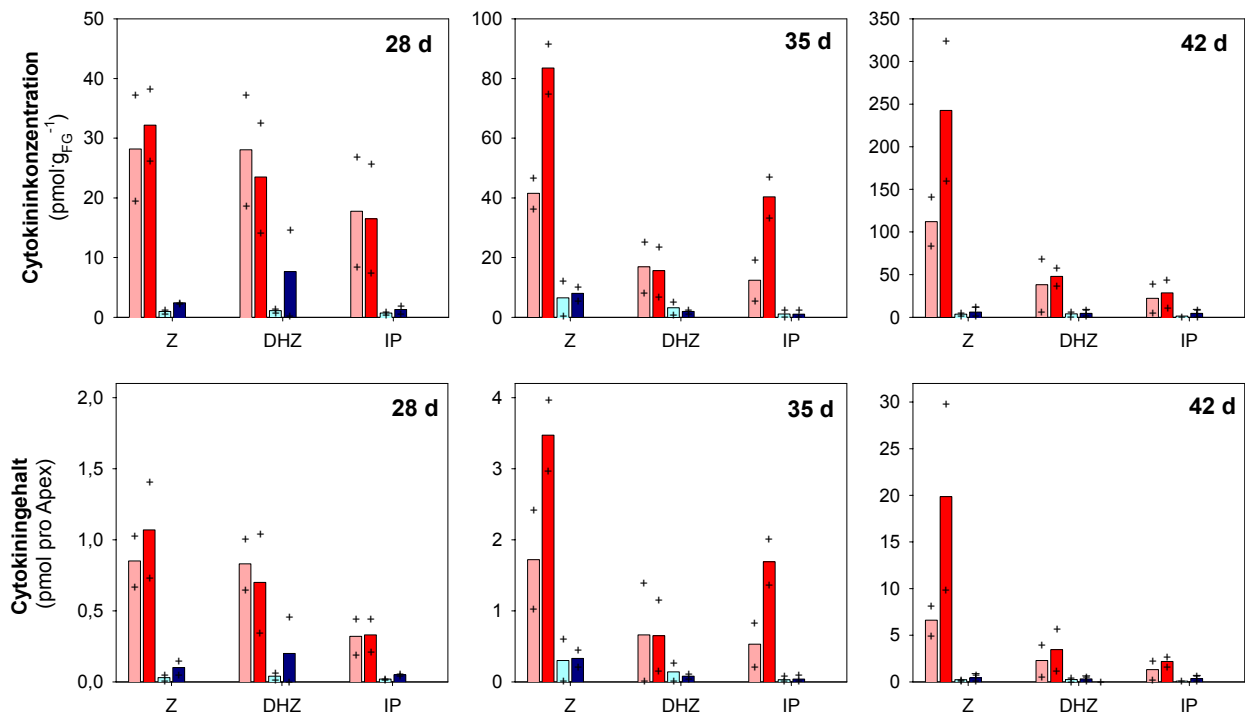
- in die „aktiven“ Cytokinine, welche die freien Basen und Riboside umfassen, also Z und ZR, DHZ und DHZR und IP und IPA,
- in die Nukleotide, also ZN, DHZN und IPN und
- in die „inaktiven“ Cytokinine, zu denen sowohl die irreversibel inaktivierten 9-Glukoside als auch die O-Glukoside, die als Speicherformen gelten, gezählt wurden.

Es sei betont, dass die hier getroffene Einteilung in „aktive“ und „inaktive“ Cytokinine für Tabak nicht nachgewiesen ist und die O-Glukoside zudem durch Abspaltung des Glukosylrestes leicht in die freien Basen bzw. Riboside umgesetzt werden können. Außerdem wird angenommen, dass die Cytokinin-Nukleotide ebenfalls nicht-aktive Formen sind (Mok und Mok, 2001).

Trotz des Zusammenfassens in die drei Gruppen ergibt sich aus den Messungen eine große Fülle an Grunddaten, auf deren Darstellung nicht verzichtet wurde, damit bei weiteren Untersuchungen auf sie zurückgegriffen werden kann. Die für diese Arbeit wichtigen Ergebnisse werden im Text erläutert.

Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands der Cytokininanalytik und des großen Probenbedarfs konnten die Messungen nur maximal fünf Mal wiederholt werden. Bei einigen Analysen wurden lediglich Doppelproben untersucht. Die allgemein bei Phytohormonuntersuchungen beobachtete Varianz zwischen den Pflanzen konnte damit nicht verringert werden, so dass die meisten Unterschiede nicht signifikant sind, sondern lediglich Tendenzen anzeigen.

## Apex



**Abb. 28: Cytokininkonzentrationen** (obere Reihe) und **-gehalte** (untere Reihe) im Apex 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■) im 15 l-Topf. □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)); □, ■ - Nucleotide. Dargestellt sind Mittelwerte (n = 2) und Einzelwerte (+), wobei je 10 Apizes zu einer Probe zusammengefasst wurden. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.

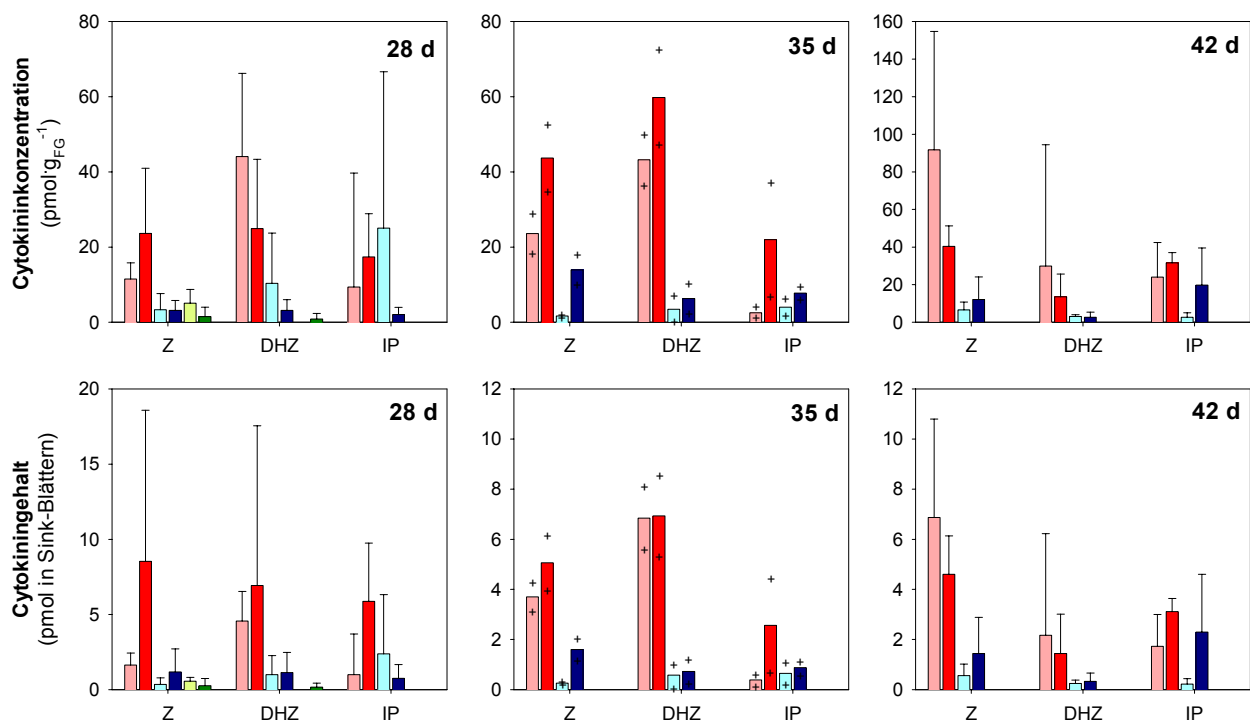
In Abb. 28 sind die Cytokininkonzentrationen und -gehalte im Apex der 28, 35 und 42 d alten Tabakpflanzen im 15 l-Topf dargestellt. Aufgrund der sehr ähnlichen Frischgewichte der Apizes von Pflanzen, die in 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren, sind sich die beiden Graphen für ein Pflanzenalter sehr ähnlich. Während sich bei 28 d alten Pflanzen die Konzentrationen und Gehalte der „aktiven“ Cytokinine in Abhängigkeit der CO<sub>2</sub>-Konzentration nicht unterscheiden, sind bei 35 d alten Pflanzen bei 700 ppm CO<sub>2</sub> die Konzentrationen und Gehalte der Cytokinine der Z- und IP-Familie und bei 42 d alten Pflanzen der Z-Familie deutlich höher als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Allgemein steigen die Konzentrationen und Gehalte der „aktiven“ Cytokinine mit dem Pflanzenalter. Im Apex 28 d alter Pflanzen sind die Konzentrationen und Gehalte der „aktiven“ Cytokinine der Z- und DHZ-Familie ähnlich hoch, während jene der IP-Familie etwas niedriger sind. Bis zum Alter von 35 d steigen die Konzentrationen und Gehalte der „aktiven“ Vertreter der Z- und IP-Familie besonders bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration, wodurch Erstere alleine dominieren und Letztere das Niveau der DHZ-Familie erreichen und bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sogar übersteigen. In 42 d alten Pflanzen dominiert die Z-Familie dann deutlich, während die Cytokinine der DHZ- und IP-Familie auf ähnlichem Niveau liegen. Bei allen Cytokininfamilien machen die Riboside in den Apizes die Hauptmenge der „aktiven“

Cytokinine aus (vgl. Tab. 13). Eine Ausnahme bilden 42 d alte Pflanzen in erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration, bei denen mehr freie Base als Ribosid vorliegt. Die im Vergleich zu den Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine niedrigen Konzentrationen und Gehalte der Nukleotide, die in allen Altern gefunden wurden, ändern sich nicht mit dem Alter. „Inaktive“ Cytokininformen waren im Apex nicht messbar.

**Tab. 13: Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine im Apex (pmol·g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>) 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> im 15 l-Topf. Dargestellt sind Mittelwerte (n = 2), wobei je 10 Apizes zu einer Probe zusammengefasst wurden. n. n. – nicht nachweisbar.**

	28 d		35 d		42 d	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
<b>Z</b>	7,1	8,7	3,8	3,4	13,3	140,0
<b>ZR</b>	21,1	23,5	37,7	80,0	98,8	102,8
<b>DHZ</b>	11,4	7,9	4,7	0,4	16,2	20,0
<b>DHZR</b>	16,6	15,6	12,1	15,2	22,1	27,8
<b>IP</b>	6,7	n. n.	5,0	12,9	1,0	0,0
<b>IPA</b>	11,0	16,5	7,2	27,5	21,3	28,5

### Sink-Blätter



**Abb. 29: Cytokininkonzentrationen (obere Reihe) und -gehalte (untere Reihe) in den Sink-Blättern 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□, □, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■, ■) im 15 l-Topf. □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)), □, ■ - Nukleotide und □, ■ - „inaktive“ Cytokinine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Einzelwerte (+) (bei 35 d: n = 2; bei 28 und 42 d: n = 3), wobei je die obersten drei Blätter dreier Pflanzen zu einer Probe zusammengefasst wurden. Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen sind in keinem Fall signifikant. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.**

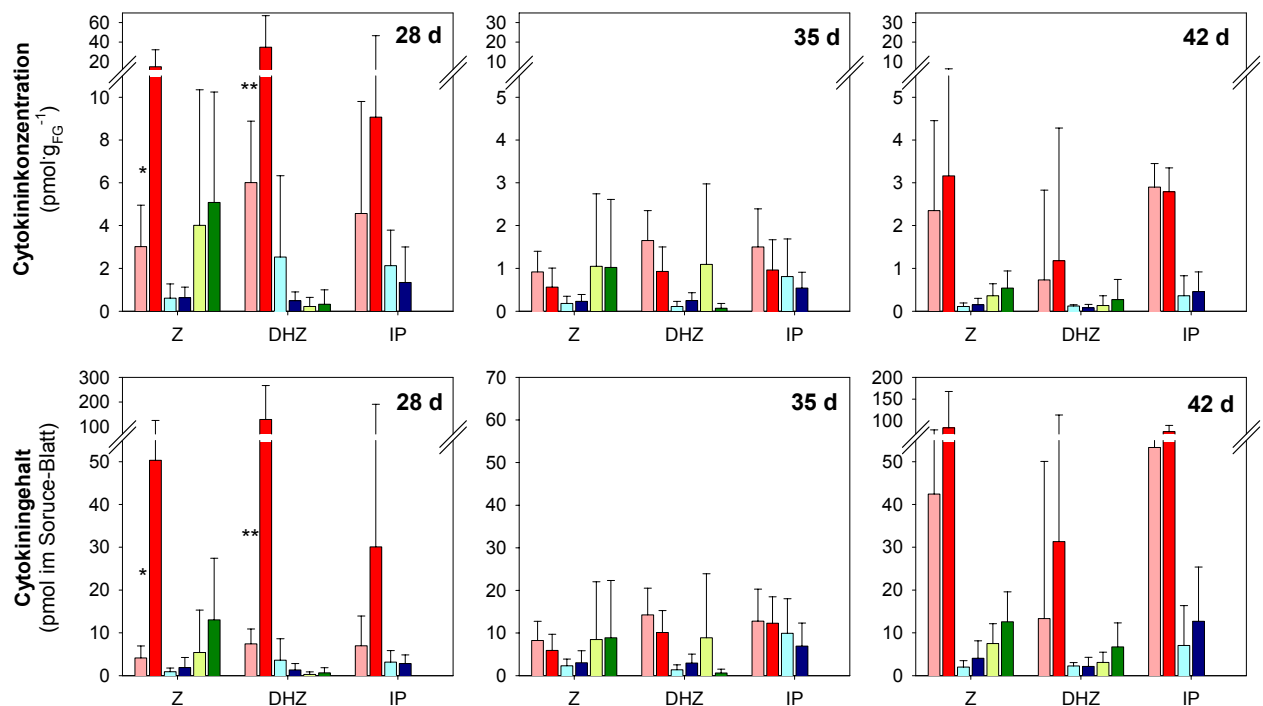


Die Cytokininkonzentrationen und -gehalte in den Sink-Blättern (vgl. Tab. 4) sind in Abb. 29 wiedergegeben. Allgemein sind die Konzentrationen bei allen drei Pflanzenaltern ähnlich hoch wie in den Apizes; lediglich die sehr hohe Konzentration der „aktiven“ Cytokinine der Z-Familie von etwa  $245 \text{ pmol} \cdot \text{g}_{\text{FG}}^{-1}$  im Apex der 42 d alten Hoch- $\text{CO}_2$ -Pflanzen wird in den Sink-Blättern von keinem Cytokinin erreicht. Die Konzentrationen und Gehalte aktiver Cytokinine in den Sink-Blättern zeigen ganz unterschiedliche Abhängigkeiten vom Pflanzenalter, die zusätzlich von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration beeinflusst werden. Dadurch unterscheiden sich die Cytokininmuster in den verschiedenen Pflanzenaltern. Allgemein dominiert keine der Cytokinfamilien so deutlich wie beim Apex. Nur bei 28 d alten Pflanzen bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  überwiegen die „aktiven“ Vertreter der DHZ-Familie, während im selben Alter bei 700 ppm  $\text{CO}_2$  alle „aktiven“ Cytokinine in gleichen Konzentrationen und Gehalten enthalten sind. Bei 35 d alten Pflanzen überwiegen bei beiden  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen die „aktiven“ Cytokinine der DHZ-Familie; die Vertreter der IP-Familie sind in den geringsten Konzentrationen und Gehalten vorhanden. Auffallend hoch ist die Konzentration der „aktiven“ Formen der Z-Familie bei 42 d alten Pflanzen bei 360 ppm  $\text{CO}_2$ . Den Hauptanteil der „aktiven“ Cytokinine der Z- und IP-Familie machen in allen Altern die Riboside aus, während bei der DHZ-Familie die Konzentrationen der freien Basen bei den jüngeren Pflanzen jene der Riboside deutlich übersteigen (vgl. Tab. 14). Die Nukleotid-Formen aller drei Cytokinfamilien sind in allen drei Altern vorhanden. Ihre Konzentrationen und Gehalte liegen meist deutlich unter jenen der „aktiven“ Formen; lediglich IPN kommt bei Sink-Blättern 28 und 42 d alter Pflanzen in ähnlich hohen Konzentrationen vor. „Inaktive“ Cytokinine waren nur in geringen Mengen und nur in den jüngsten Pflanzen messbar.

**Tab. 14: Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine in den Sink-Blättern ( $\text{pmol} \cdot \text{g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 bzw. 700 ppm  $\text{CO}_2$  im 15 l-Topf. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (bei 35 d:  $n = 2$ ; bei 28 und 42 d:  $n = 3$ ), wobei je die obersten drei Blätter dreier Pflanzen zu einer Probe zusammengefasst wurden. Unterschiede zwischen den  $\text{CO}_2$ -Behandlungen sind in keinem Fall signifikant. n. n. – nicht nachweisbar.**

	28 d		35 d		42 d	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
<b>Z</b>	$4,1 \pm 2,0$	$4,0 \pm 3,4$	2,7	5,2	$5,0 \pm 6,7$	$1,2 \pm 2,0$
<b>ZR</b>	$7,4 \pm 3,8$	$19,7 \pm 17,0$	20,9	38,5	$86,7 \pm 62,7$	$39,1 \pm 10,8$
<b>DHZ</b>	$29,9 \pm 21,8$	$15,5 \pm 7,1$	26,6	44,3	$14,1 \pm 5,6$	$5,2 \pm 5,5$
<b>DHZR</b>	$14,2 \pm 21,0$	$9,4 \pm 9,0$	16,6	15,4	$15,8 \pm 9,8$	$8,3 \pm 0,3$
<b>IP</b>	n. n.	$4,4 \pm 7,7$	1,7	5,8	$3,7 \pm 6,4$	$13,7 \pm 19,8$
<b>IPA</b>	$9,4 \pm 7,9$	$12,9 \pm 12,2$	1,2	16,2	$20,3 \pm 18,7$	$17,8 \pm 5,8$

## Source-Blatt



**Abb. 30: Cytokininkonzentrationen** (obere Reihe) **und -gehalte** (untere Reihe) **im Source-Blatt 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□, □, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■, ■) im 15 l-Topf.** □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)), □, ■ - Nukleotide und □, ■ - „inaktive“ Cytokinine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5), wobei je das größte Blatt herangezogen wurde und bei 28 d alten Pflanzen je ein Source-Blatt zweier Pflanzen zu einer Probe zusammengefasst wurden. Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.

In Abb. 30 werden die Konzentrationen und Gehalte der Cytokinine im Source-Blatt (vgl. Tab. 4) gezeigt. Die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine sind in den Source-Blättern generell niedriger als in den Sink-Blättern. Lediglich in den Source-Blättern der 28 d alten Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen sind die Konzentrationen mit Werten zwischen 9 und 40 pmol·g<sub>FG</sub><sup>-1</sup> deutlich höher als in den Source-Blättern aller übrigen Pflanzen und damit auf dem Niveau der Sink-Blätter. Bei Source-Blättern 28 d alter Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, liegen die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine der Z- und DHZ-Familie deutlich niedriger (p < 0,05) und damit in derselben Größenordnung wie die Cytokininkonzentrationen der Source-Blätter der älteren Pflanzen. Deren Konzentrationen sind ebenso wie ihre Gehalte CO<sub>2</sub>-unabhängig. Die Gehalte in den Source-Blättern 28 d alter Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen sind aufgrund ihrer wesentlich höheren Biomasse deutlich höher als in den Sink-Blättern. Dagegen sind die Gehalte in den Source-Blättern der Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub>, wie auch ihre Konzentrationen, niedriger und nur etwa doppelt so hoch wie in den Sink-Blättern. Obwohl sich die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinin zwischen den Altern maximal um den Faktor 3 unterscheiden

(ausgenommen sind die 28 d alten Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen), nehmen die Cytokiningehalte in den Source-Blättern aufgrund der starken Biomassezunahme mit dem Pflanzenalter von 35 auf 42 d stark zu. Beim Vergleich der Cytokininmuster fällt auf, dass, abgesehen von der DHZ-Familie in den Blättern der 28 d alten Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen, in den Source-Blättern keines der „aktiven“ Cytokinine dominiert. In den Source-Blättern sind nur die Konzentrationen der Ribosid-Formen der Z-Familie teilweise deutlich höher als jene der freien Basen (vgl. Tab. 15). Bei der DHZ- und IP-Familie sind freie Basen und Riboside zu gleichen Anteilen vertreten, jedoch übersteigt bei 42 d alten Pflanzen der Anteil an IP den Anteil an IPA. Die Konzentrationen und Gehalte der Nukleotide bei den 28 d alten Pflanzen sind CO<sub>2</sub>-unabhängig. In allen Pflanzenaltern sind die Konzentrationen von IPN höher als von ZN und DHZN. „Inaktive“ Cytokinine waren in allen Source-Blättern messbar. Ihre Konzentrationen und Gehalte erreichen teilweise, wie bspw. die Z-Glukoside bei 35 d alten Pflanzen, die Werte der „aktiven“ Cytokinine und sinken mit dem Pflanzenalter.

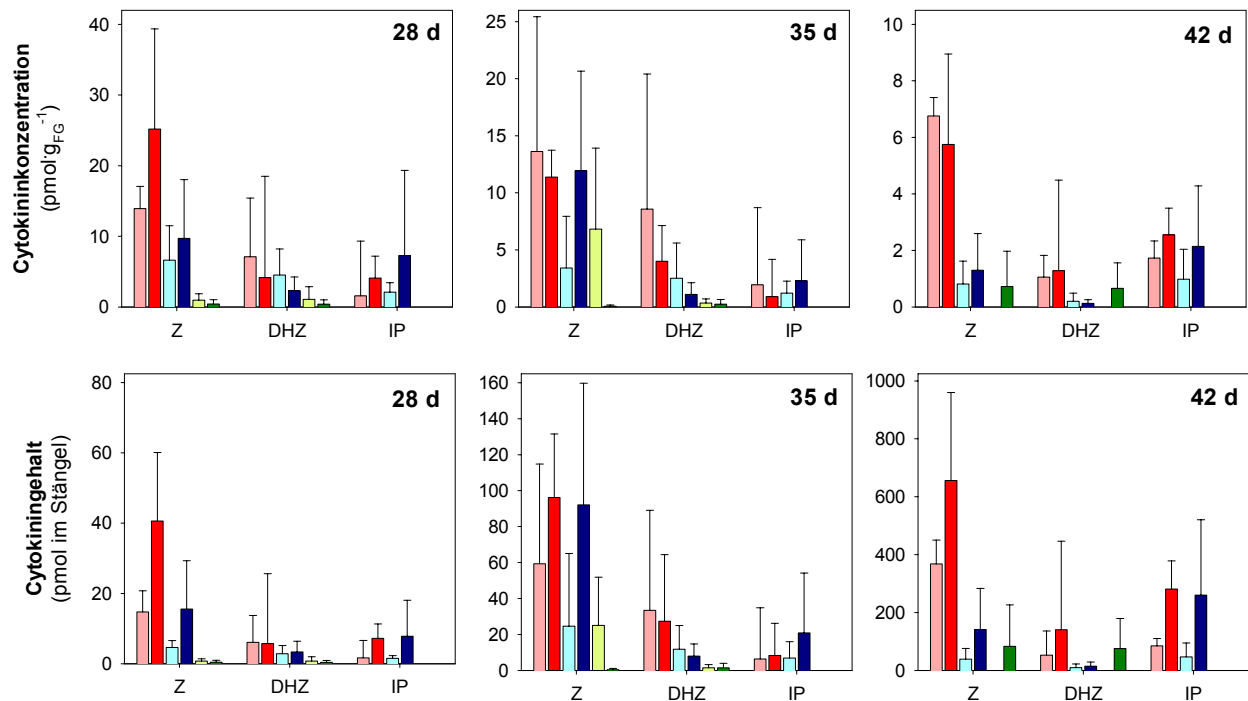
**Tab. 15: Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine im Source-Blatt (pmol·g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>) 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> im 15 l-Topf. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5), wobei bei 28 d alten Pflanzen je ein Source-Blatt zweier Pflanzen zu einer Probe zusammengefasst wurden. Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.**

	28 d		35 d		42 d	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
<b>Z</b>	1,7 ± 0,8*	2,9 ± 1,4	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,7
<b>ZR</b>	1,4 ± 1,8***	12,9 ± 17,2	0,6 ± 0,5	0,3 ± 0,3	1,9 ± 2,1	2,4 ± 3,1
<b>DHZ</b>	2,5 ± 2,3***	16,7 ± 27,4	0,9 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,3
<b>DHZR</b>	3,5 ± 4,7***	18,2 ± 25,6	0,7 ± 0,7	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,6	0,4 ± 0,4
<b>IP</b>	2,9 ± 2,9	2,2 ± 2,0	0,7 ± 0,6	0,4 ± 0,3	2,0 ± 1,4	1,9 ± 0,2
<b>IPA</b>	1,7 ± 1,6	6,9 ± 6,7	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,3

## Stängel

Die Cytokininkonzentrationen und -gehalte der Stängel sind in Abb. 31 dargestellt. Zum Stängel wurden auch die Blattstiele gezählt. Die Konzentrationen der meisten „aktiven“ Cytokinine in den Stängeln der 28 d und 35 d alten Pflanzen sind gleich, während sie bei 42 d alten Pflanzen etwas niedriger liegen. Die Gehalte dagegen nehmen mit dem Pflanzenalter und dem Stängelgewicht deutlich zu. Weder die Cytokininkonzentrationen noch die -gehalte sind CO<sub>2</sub>-abhängig. In allen Stängeln dominiert die Z-Familie. Den Hauptanteil an „aktiven“ Cytokininformen der Z-Familie stellen in allen Pflanzenaltern die Riboside, während die freien Basen und Riboside der DHZ- und IP-Familie gleiche Konzentrationen erreichen, wobei der Anteil der IP-Familie mit dem Pflanzenalter tendenziell zunimmt (vgl. Tab. 16). Die Konzentrationen der Nukleotide und „aktiven“ Formen der IP-Familie sind in allen Altern etwa gleich hoch. Dagegen erreichen ZN und DHZN bei 28 d und 35 d alten Pflanzen nur etwa die Hälfte der

Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine und bei 42 d alten Pflanzen nur etwa ein Fünftel. „Inaktive“ Cytokinine waren in allen Proben messbar. In den Stängeln 28 d alter Pflanzen sind sie in ganz geringen Mengen vorhanden. In älteren Stängeln erreichen ihre Konzentrationen und Gehalte vereinzelt ähnlich hohe Werte wie jene der übrigen Cytokinine.



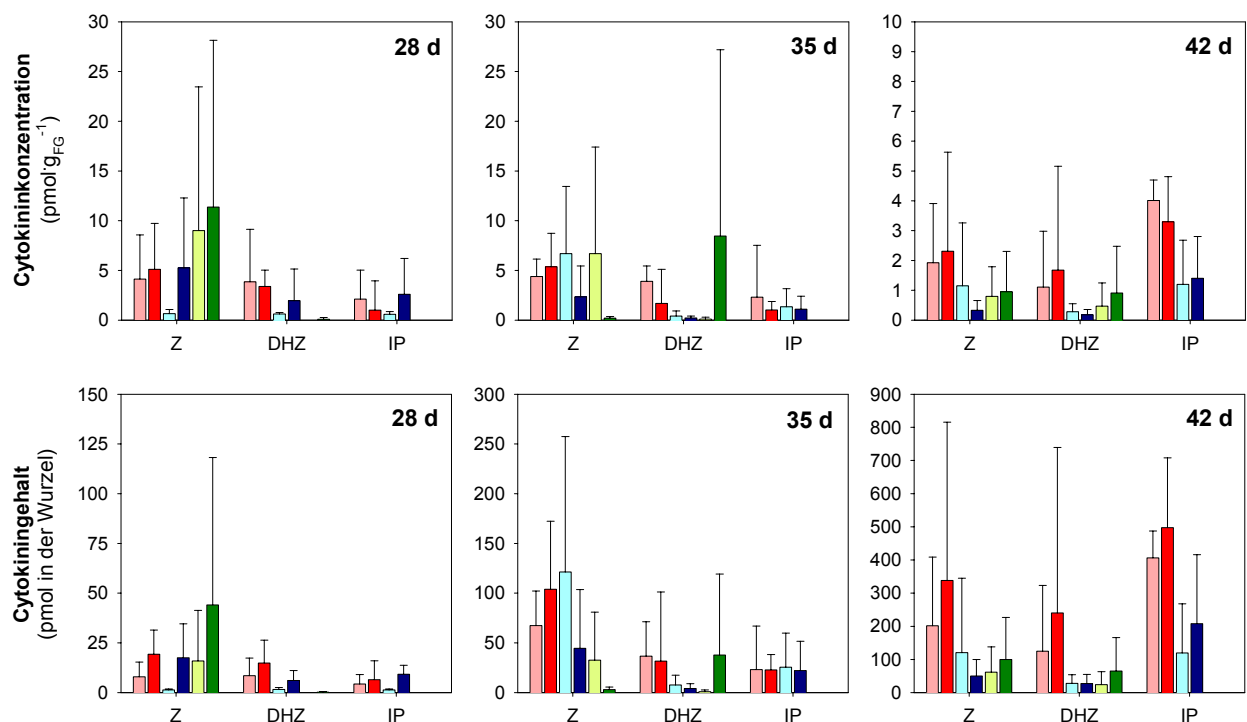
**Abb. 31: Cytokininkonzentrationen** (obere Reihe) und **-gehalte** (untere Reihe) im Stängel 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□, □, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■, ■) im 15 l-Topf. □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)), □, ■ - Nukleotide und □, ■ - „inaktive“ Cytokinine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.

**Tab. 16: Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine in den Stängeln (pmol·g<sub>FG</sub><sup>-1</sup>) 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> im 15 l-Topf. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen. n. n. – nicht nachweisbar.**

	28 d		35 d		42 d	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
<b>Z</b>	1,6 ± 0,7	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,9	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,5
<b>ZR</b>	12,3 ± 3,1 <sup>*</sup>	24,0 ± 14,2	12,5 ± 11,8	10,7 ± 2,3	6,0 ± 0,7	4,9 ± 3,2
<b>DHZ</b>	5,9 ± 7,7	2,1 ± 2,1	1,5 ± 1,4	1,6 ± 2,1	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,6
<b>DHZR</b>	1,2 ± 0,4	2,1 ± 2,3	7,1 ± 6,6	2,4 ± 2,5	0,5 ± 0,5	0,8 ± 0,7
<b>IP</b>	n. n.	n. n.	0,6 ± 1,0	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,9	0,8 ± 1,3
<b>IPA</b>	1,6 ± 0,6	4,1 ± 3,1	1,4 ± 1,4	0,8 ± 0,6	1,2 ± 0,7	1,8 ± 1,7

## Wurzel

In Abb. 32 werden die Konzentrationen und Gehalte der Cytokinine in den Wurzeln gezeigt. Sie sind in jedem Alter bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> meist ähnlich hoch. Die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine in den Wurzeln der 28 und 35 d alten Pflanzen sind, ebenso wie im Stängel, etwa gleich hoch. Die Konzentrationen in den Wurzeln der älteren Pflanzen sind dagegen, abgesehen von jenen der Vertretern der IP-Familie, um etwa die Hälfte niedriger als in den jüngeren Pflanzen. Wie im Stängel nehmen die Gehalte der „aktiven“ Cytokinine in den Wurzeln mit dem Alter durch den Biomassezuwachs deutlich zu. Keines der „aktiven“ Cytokinine dominiert in der Wurzel deutlich; während in den Wurzeln der jüngeren Pflanzen „aktive“ Cytokinine der Z- und DHZ-Familie leicht überwiegen, dominieren tendenziell jene der IP-Familie bei 42 d alten Pflanzen. Auch in der Wurzel dominiert bei den „aktiven“ Cytokininformen der Z-Familie die Ribosid-Form, während bei der DHZ- und IP-Familie freie Basen und Riboside gleiche Konzentrationen erreichen und bei 42 d alten Wurzeln die Konzentrationen von IP jene von IPA übersteigen (vgl. Tab. 17). Die Konzentrationen und Gehalte der Nukleotide erreichen in der Wurzel, ebenso wie im Stängel, teilweise das Niveau jener der „aktiven“ Formen. Die Konzentrationen und Gehalte der „inaktiven“ Cytokinine übersteigen in den Wurzeln teilweise die Werte der „aktiven“ Cytokinine. Während in den jüngeren Wurzeln v. a. „inaktive“ Z-Konjugate vorkommen, enthalten die alten auch „inaktive“ DHZ-Konjugate.



**Abb. 32: Cytokininkonzentrationen (obere Reihe) und -gehalte (untere Reihe) in der Wurzel 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□, □, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■, ■) im 15 l-Topf. □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)), □, ■ - Nukleotide und □, ■ - „inaktive“ Cytokinine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5). Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen sind in keinem Fall signifikant. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.**

**Tab. 17: Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine in der Wurzel ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) 28, 35 und 42 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 bzw. 700 ppm  $\text{CO}_2$  im 15 l-Topf. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 5$ ). Unterschiede zwischen den  $\text{CO}_2$ -Behandlungen sind in keinem Fall signifikant.**

	28 d		35 d		42 d	
	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm	360 ppm	700 ppm
<b>Z</b>	$0,3 \pm 0,0$	$2,7 \pm 4,4$	$1,0 \pm 1,2$	$0,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,4$
<b>ZR</b>	$3,8 \pm 4,4$	$2,4 \pm 1,6$	$3,4 \pm 1,2$	$5,2 \pm 3,3$	$1,3 \pm 1,8$	$1,9 \pm 3,2$
<b>DHZ</b>	$2,7 \pm 2,8$	$0,7 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,6$	$1,0 \pm 1,1$
<b>DHZR</b>	$1,1 \pm 0,5$	$2,7 \pm 2,9$	$3,3 \pm 5,1$	$0,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,3$	$0,7 \pm 1,0$
<b>IP</b>	$0,2 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,2$	$0,9 \pm 1,3$	$0,1 \pm 0,1$	$2,9 \pm 6,0$	$2,2 \pm 4,6$
<b>IPA</b>	$2,0 \pm 2,7$	$0,9 \pm 0,7$	$1,4 \pm 1,9$	$1,0 \pm 0,9$	$1,2 \pm 1,2$	$1,1 \pm 1,7$

### Zusammenfassung der CO<sub>2</sub>-, Alters- und Organabhängigkeit der Cytokinine in den Pflanzenorganen

Eine offensichtliche Abhängigkeit der Cytokininkonzentrationen und -gehalte von der CO<sub>2</sub>-Konzentration ist nicht festzustellen. In etwa der Hälfte der Fälle sind die Cytokininkonzentrationen und -gehalte CO<sub>2</sub>-unabhängig, in ca. einem Drittel bei 700 ppm CO<sub>2</sub> höher und im verbleibenden Sechstel niedriger als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Sie sind aber, wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurde, organspezifisch und ändern sich in den einzelnen Organen mit dem Pflanzenalter. Um einen Überblick zu geben, werden diese Abhängigkeiten in den folgenden beiden Tabellen noch einmal schematisch zusammengefasst. Die Altersabhängigkeit der Konzentrationen und Gehalte in den einzelnen Pflanzenorganen wird in Tab. 18 und die Konzentrations- und Gehaltunterschiede zwischen den Organen in Tab. 19 wiedergegeben.

**Tab. 18:** Altersabhängigkeit der Konzentrationen und -gehalte der „aktiven“ Cytokinine in den einzelnen Organen.

Organ	Konzentration		Gehalt	
	28 bis 35 d	35 bis 42 d	28 bis 35 d	35 bis 42 d
Apex	↑	↑	↑	↑
Sink-Blätter	→	→	→	→
Source-Blatt	→	→	→	↑
Stängel	→	↓	↑	↑↑
Wurzel	→	↓	↑	↑

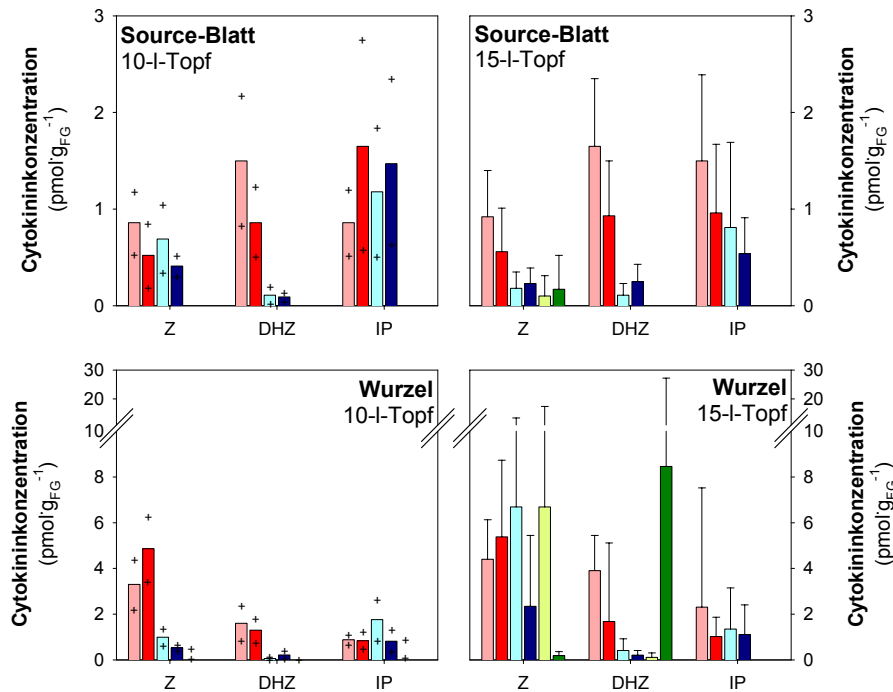
↑↑ steigt stark, ↑ steigt, ↓ sinkt, → ändert sich nicht.

**Tab. 19:** Konzentration und -gehalt der „aktiven“ Cytokinine in den einzelnen Pflanzenorganen.

Zunahme	niedrig	—————→			hoch
Konzentration	Wurzel	Source-Blatt	Stängel	Sink-Blätter	Apex
Gehalt	Apex	Sink-Blätter	Stängel	Source-Blatt	Wurzel

## Vergleich der Cytokininkonzentrationen in Source-Blatt und Wurzel der Pflanzen im 10 l- und im 15 l-Topf

Die Größe des Passioura-Drucktopfes, mit dessen Hilfe der Xylemsaft gewonnen wurde, legte das Topfvolumen für die Pflanzenanzucht auf 10 l und das Untersuchungsalter auf 35 d fest. In Abschnitt 3.1.4 wurde gezeigt, dass dieses kleinere Wurzelraumvolumen keinen nennenswerten Einfluss auf das Pflanzenwachstum bis zum Alter von 42 d hat. Um zumindest eine grobe Aussage über den Einfluss der Topfvolumina von 10 l und 15 l auf die Cytokininkonzentrationen und -muster der 35 d alten Tabakpflanzen machen zu können, wurden die Cytokininkonzentrationen des Source-Blattes und der Wurzel je zweier Pflanzen aus 10 l-Töpfen bei den beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen gemessen. Sie werden in Abb. 33 den bereits gezeigten Konzentrationen der 15 l-Topf-Pflanzen (vgl. Abb. 30 und Abb. 32) gegenübergestellt.



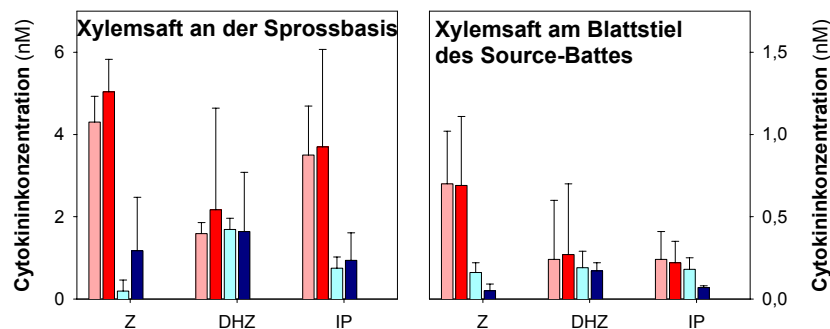
**Abb. 33:** Vergleich der Cytokininkonzentrationen in 10 l- und 15 l-Töpfen im Source-Blatt (obere Reihe) und der Wurzel (untere Reihe) von 35 d alten Tabakpflanzen bei 360 ppm (□, □, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■, ■). □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)), □, ■ - Nukleotide und □, ■ - „inaktive“ Cytokinine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Einzelwerte (+) (beim 10 l-Topf n = 2, beim 15 l-Topf n = 5). Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen sind in keinem Fall signifikant.

Die Cytokininkonzentrationen in den Source-Blättern und in den Wurzeln liegen jeweils in derselben Größenordnung und auch die Cytokinmuster sind jeweils sehr ähnlich. Die „aktiven“ Cytokinine und die Nukleotide in den Source-Blättern erreichen in beiden Töpfen annähernd dieselben Konzentrationen. Lediglich die Konzentrationen von ZN und den „aktiven“ Cytokininen der IP-Familie und bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auch von IPN unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Topfvolumen etwa um den Faktor zwei: Sie sind, abgesehen von den



„aktiven“ Vertretern der IP-Familie bei 360 ppm CO<sub>2</sub>, im 10 l-Topf höher als im 15 l-Topf. Während im Source-Blatt der Pflanzen im 15 l-Topf geringe Konzentrationen und Gehalte von „inaktiven“ Z-Konjugaten messbar waren, enthalten die Source-Blätter in den 10 l-Töpfen keine „inaktiven“ Cytokinine. Auch in den Wurzeln erreichen die meisten „aktiven“ Cytokinine und Nukleotide, unabhängig vom Topfvolumen, ähnlich hohe Konzentrationen. Allerdings sind die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine der DHZ und IP-Familie in den Wurzeln der Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> im 15 l-Topf doppelt so hoch wie jene im 10 l-Topf und auch die Konzentrationen von ZN in den Wurzeln der Pflanzen im 15 l-Topf sind deutlich höher als im 10 l-Topf. In den Wurzeln der Pflanzen im 10 l-Topf konnten bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen keine „inaktiven“ Cytokinine gemessen werden, während in den Wurzeln aus den 15 l-Töpfen teilweise sehr hohe Konzentrationen inaktiver Cytokinine messbar waren. Die hohen Standardabweichungen deuten an, dass es aber auch hier Wurzeln gab, in denen keine „inaktiven“ Cytokinine nachgewiesen werden konnten.

### Xylemsaft



**Abb. 34: Cytokininkonzentrationen im Xylemsaft an der Sprossbasis und am Source-Blattstiel 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□, □, □) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■, ■, ■).** □, ■ - „aktive“ Cytokinine (freie Basen und Riboside von Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP)), □, ■ - Nukleotide und □, ■ - „inaktive“ Cytokinine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 5). Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen sind in keinem Fall signifikant. Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.

Für die Untersuchungen der Cytokininkonzentrationen im Xylem wurde an zwei verschiedenen Stellen 35 d alter Tabakpflanzen, die im 10 l-Topf angezogen worden waren, Xylemsaft entnommen: am Stängel oberhalb der Insertionsstelle von Blatt 4 (Xylemsaft an der Sprossbasis) und am Blattstiel des Source-Blattes (Xylemsaft am Blattstiel des Source-Blattes). In Abb. 34 sind die Cytokininkonzentrationen im Xylemsaft an der Sprossbasis und am Source-Blattstiel dargestellt. Sie sind unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Pflanzenanzucht. Die Cytokininkonzentrationen im Xylemsaft an der Sprossbasis sind meist mindestens viermal so hoch wie jene im Saft am Blattstiel. Während in Letzterem „aktive“ Cytokinine der Z-Familie überwiegen, erreichen die Konzentrationen der „aktiven“ Vertreter der IP-Familie im Xylemsaft an der Sprossbasis annähernd die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine der Z-Familie. Der

Anteil der Ribosid-Form an den „aktiven“ Cytokinin der Z-Familie ist in beiden Xylemsäften höher als der Anteil der freien Base (vgl. Abb. 35). Beide Formen der „aktiven“ Cytokinine der DHZ-Familie kommen im Xylemsaft am Blattstiel des Source-Blattes zu etwa gleichen Teilen vor. Im Xylemsaft an der Sprossbasis dagegen war bei Pflanzen, die in 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen waren, von den „aktiven“ Cytokinin der DHZ-Familie nur die Ribosid-Form messbar, während bei Pflanzen in 700 ppm CO<sub>2</sub> die freie Base den Hauptteil der „aktiven“ Vertreter ausmachte. In keinem der Säfte war die freie Base IP nachweisbar. In beiden Xylemsäften waren alle Nukleotid-Formen enthalten. Während DHZN immer die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine seiner Familie erreicht, liegen die Konzentrationen von ZN immer deutlich unter jenen der „aktiven“ Cytokinine seiner Familie (vgl. Abb. 34). Die Konzentrationen von IPN sind im Xylemsaft an der Sprossbasis und bei 700 ppm CO<sub>2</sub> auch im Xylemsaft am Source-Blattstiel deutlich niedriger als die Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine der IP-Familie. Bei 360 ppm CO<sub>2</sub> erreicht IPN die gleichen Konzentrationen wie IPA, das, wie erwähnt, in den Xylemsäften die Gesamtmenge aktiver IP-Vertreter stellt. „Inaktive“ Cytokinine waren im Xylemsaft nicht messbar.

### 3.4.2 Transport und Umsatz der Cytokinine

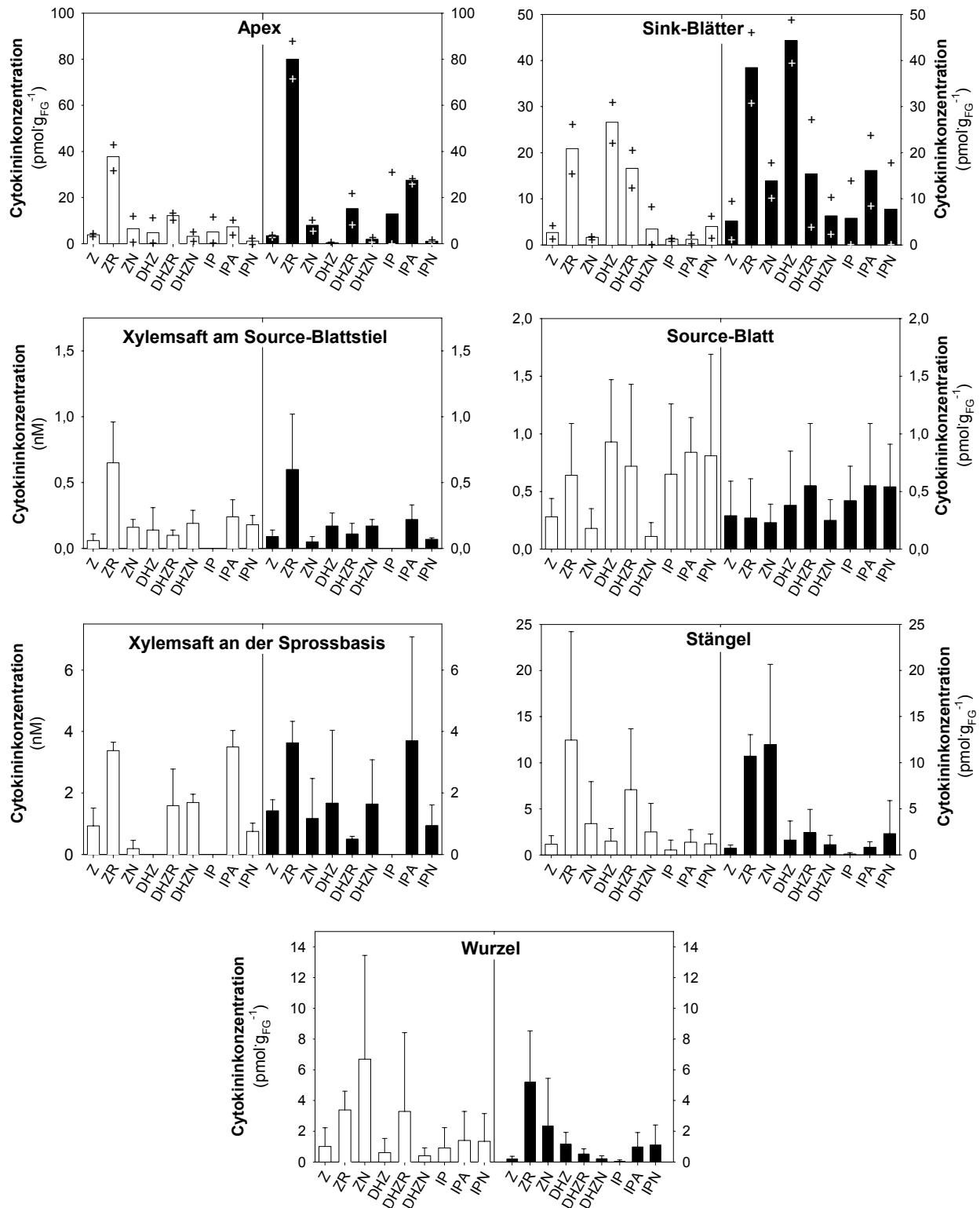
Durch Vergleich der Cytokininmuster in den Pflanzenorganen und in den Xylemsäften an der Sprossbasis und am Source-Blattstiel wird im Folgenden zunächst versucht, Transportwege und Umwandlungsprozesse der Cytokinine zu verfolgen. Anhand der Massenflussraten im Xylemsaft und der Cytokiningehalte in der Wurzel bzw. im Source-Blatt können außerdem *turnover*-Zeiten der Pools xylemmobiler Cytokinine in der Wurzel bzw. im Source-Blatt abgeschätzt werden. Die Massenflussrate wurde aus der Konzentration im Xylemsaft und der Transpirationsrate berechnet.

### Vergleich der Cytokinine im Xylemsaft und den Pflanzenorganen

Zum Vergleich der Cytokininmuster in den Organen und in den Xylemsäften der 35 d alten Pflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren, sind in Abb. 35 die Konzentrationen in den Organen und in den Xylemsäften dargestellt. Die in der Wurzel, dem Stängel und dem Source-Blatt messbaren „inaktiven“ Cytokinine werden hier nicht gezeigt; sie sind Abb. 28 bis Abb. 32 zu entnehmen.

Die Organe und Xylemsäfte einer Pflanze unterscheiden sich nicht nur durch ihre Cytokininkonzentrationen (vgl. auch Tab. 19) sondern auch durch ihre Cytokininmuster voneinander. Wurzel und Stängel haben ähnliche Cytokininmuster. In beiden Organen überwiegen die Cytokinine der Z-Familie. Während in den Wurzeln der Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, ZN dominiert, überwiegt in den Stängeln dieser Pflanzen allerdings ZR. In den Wurzeln der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen dagegen dominiert ZR, während in den Stängeln tendenziell mehr ZN als ZR enthalten ist. Das Cytokininmuster des Xylemsafts zum Gesamtspross unterscheidet sich davon

deutlich. Am auffallendsten ist dabei, dass hier zwar ebenfalls ZR überwiegt, die Konzentrationen von IPA erreichen aber dieselben Werte. Dagegen ähnelt das Cytokininmuster des Xylemsafts am Source-Blattstiel mit seiner deutlichen Dominanz des ZR den Mustern von Wurzel und Stängel eher. Im Source-Blatt ist keine Dominanz eines einzelnen Cytokinins feststellbar und alle drei Cytokininfamilien sind ähnlich stark vertreten, wobei die Z-Familie besonders in den Source-Blättern der Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, einen etwas kleineren Anteil als die anderen beiden Familien ausmacht. In den Sink-Blättern überwiegen DHZ und ZR. Ihre Cytokininmuster ähneln damit keinem anderen. Eine deutliche Dominanz von ZR zeigt sich im Apex, dessen Cytokininmuster damit dem Muster des Xylemsafts zum Source-Blatt ähnelt. Auffallend ist, dass IP zwar in allen Organen, aber in keinem Xylemsaft nachweisbar war. Einen zusammenfassenden Überblick über die Cytokininmuster in den Organen und Xylemsäften gibt Tab. 20.



**Abb. 35:** Überblick über die Konzentrationen einzelner Cytokinine im Xylemsaft an der Sprossbasis und am Source-Blattstiel und die Konzentrationen in den Organen 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm (□) bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> (■). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Einzelwerte (+) (bei Apex und Sink-Blättern n = 2, bei Stängel, Source-Blatt, Xylemsäften und Wurzel n = 5). Es wird auf die verschiedene Skalierung der Ordinaten hingewiesen.

**Tab. 20: Überblick über die Cytokininmuster in den Organen und Xylemsäften 35 d alter Tabakpflanzen.**

	Z	ZR	ZN	DHZ	DHZR	DHZN	IP	IPA	IPN
<b>Apex</b>	++	+++	++	++	++	+	++	++	+
<b>Sink-Blätter</b>	++	+++	++	+++	++	++	++	++	++
<b>Source-Blatt</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Xylemsaft am Source-Blattstiel</b>	++	+++	++	++	++	++	o	++	++
<b>Xylemsaft an der Sprossbasis</b>	++	+++	++	++	++	++	o	+++	++
<b>Stängel</b>	++	+++	+++	++	++	++	+	++	++
<b>Wurzel</b>	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++

+++ dominiert, ++ durchschnittliche Mengen, + geringe Mengen, o nicht vorhanden.

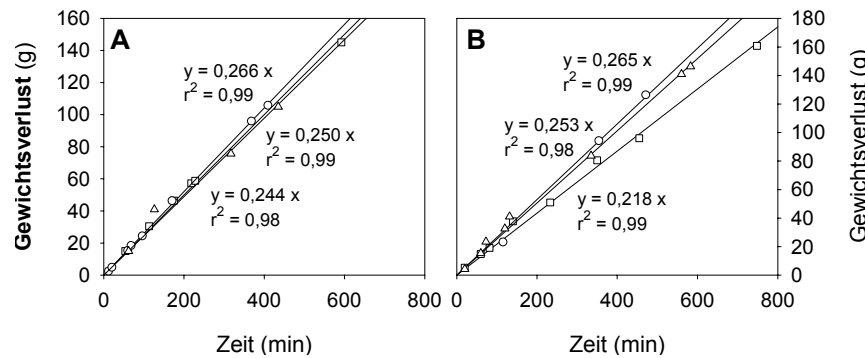
### Transpiration

Die Transpirationsraten der Source-Blätter 35 d alter Pflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, sind in Tab. 21 zusammen mit den Transpirationsraten der Gesamtsprosse dieser Pflanzen aufgelistet. Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ist die Transpirationsrate des Source-Blattes pro Bezugsfläche niedriger als bei 360 ppm CO<sub>2</sub> ( $p < 0,25$ ), während die Transpirationsraten pro Source-Blatt aufgrund der größeren Blattfläche bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen etwa gleich sind. Die Transpirationsrate des Sprosses ist bei 700 ppm CO<sub>2</sub> tendenziell etwas niedriger als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.

**Tab. 21: Transpirationsraten des Source-Blattes und des Gesamtsprosses 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> im 10 l-Topf. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (beim Source-Blatte n = 5, beim Spross n = 3). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.**

CO <sub>2</sub> -Konz. (ppm)	Transpiration des Source-Blattes (nl·cm <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Transpiration des Sprosses (ml·h <sup>-1</sup> ·Blatt <sup>-1</sup> )	Transpiration des Sprosses (ml·h <sup>-1</sup> ·Spross <sup>-1</sup> )
<b>360</b>	10,60 ± 1,59 <sup>x</sup>	5,51 ± 0,92	15,20 ± 0,68
<b>700</b>	8,04 ± 1,61	5,84 ± 1,11	14,50 ± 2,37

Die Transpirationsraten des Sprosses wurden durch Bestimmung der transpirationsbedingten Gewichtsabnahmen dreier Pflanzen mit der Zeit gemessen. Wie in Abb. 36 dargestellt ist, nimmt das Gewicht jeder Pflanze während der Messung in der Lichtphase linear mit der Zeit ab; die Transpiration ist in der Lichtphase also konstant.



**Abb. 36:** Transpiration des gesamten Sprosses in (A) 360 ppm bzw. (B) 700 ppm CO<sub>2</sub> gemessen durch den Gewichtsverlust mit der Zeit. Aufgetragen sind die Einzelwerte dreier Pflanzen, durch die jeweils eine Regressionsgerade gelegt wurde.

### **turnover-Zeiten des Cytokinin-Pools in Wurzel und Source-Blatt**

Aus den Cytokininkonzentrationen in den Xylemsäften und den Transpirationsraten der Pflanze bzw. des Source-Blattes wurde die Massenflussrate der Cytokinine im Transpirationsstrom berechnet. Unter der Annahme, dass die Cytokininkonzentrationen in der Wurzel bzw. im Source-Blatt über längere Zeit konstant sind, entspricht die Massenflussrate der Cytokinine aus der Wurzel der Biosyntheserate in der Wurzel. Entsprechend ergäbe die Massenflussrate ins Source-Blatt die *turnover*-Rate im Source-Blatt. Gilt dieses Fließgleichgewicht der Cytokinine in der Wurzel bzw. im Source-Blatt, dann lassen sich die *turnover*-Zeiten des Cytokinin-Pools anhand der Massenflüsse aus der Wurzel bzw. ins Source-Blatt und der Gehalte in der Wurzel bzw. im Source-Blatt abschätzen. Dazu wurden die in den Xylemsäften messbaren (xylem-mobilen) Cytokinine jeder Familie, nämlich die freien Basen, Riboside und Nukleotide, zusammengefasst. Die im Source-Blatt und in der Wurzel enthaltenen „inaktiven“ Cytokinin-Konjugate blieben unberücksichtigt.

In Tab. 22 sind die Cytokiningehalte der Wurzel und die Massenflussraten aus der Wurzel in den Spross jeweils für die bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogenen Pflanzen dargestellt. Ein Vergleich der Cytokiningehalte des Xylemsafts zeigt, dass die Massenflussrate der Cytokinine der Z-Familie bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen aufgrund ihrer höheren Konzentration höher ist als bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden. Die Konzentrationen im Xylemsaft und die Massenflussraten der Cytokinine der DHZ- und IP-Familie sind dagegen bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen etwa gleich groß. Damit liegen lediglich die Biosyntheseraten von Z bei 700 ppm CO<sub>2</sub> etwas über den Raten bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Die *turnover*-Zeiten des Cytokinin-Pools in der Wurzel sind bei allen drei Familien bei beiden Anzuchtvarianten etwa gleich, bei 700 ppm CO<sub>2</sub> tendenziell etwas niedriger als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Die Cytokinine der Z-Familie haben eine etwa doppelt so lange *turnover*-Zeit wie die Cytokinine der DHZ- und IP-Familie.

**Tab. 22: Konzentrationen und Gehalte der xylemmobilen Cytokinine (CK) in der Wurzel und im Xylemsaft an der Sprossbasis und *turnover*-Zeit des CK-Pools in der Wurzel 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub>.** Zur Berechnung wurden die Mittelwerte (bei den Cytokininbestimmungen aus n = 5, bei der Transpiration aus n = 3 (vgl. Tab. 21)) herangezogen.

[CO <sub>2</sub> ] (ppm)	CK in der Wurzel ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{Wurzel}^{-1}$ )			CK im Xylemsaft an Sprossbasis (nM) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{Pflanze}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )			<i>turnover</i> -Zeit des CK-Pools in der Wurzel (h)		
	Z	DHZ	IP	Z	DHZ	IP	Z	DHZ	IP
	<b>360</b>	11,1 160	4,3 62,1	4,3 62,5	4,5 68,2	3,3 49,9	4,3 64,6	2,3	1,2
<b>700</b>	7,7 193	1,9 47,3	2,1 53,3	6,2 90,0	3,8 55,2	4,7 67,4	2,1	0,9	0,8

In Tab. 23 sind die Cytokiningehalte im Source-Blatt und die Cytokinin-Massenflussraten ins Source-Blatt dargestellt. Die Cytokininkonzentrationen in den Source-Blättern sind bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen niedriger als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>, wohingegen die Cytokiningehalte aufgrund des größeren Gewichts bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration höher sind. Im Xylemsaft am Source-Blattstiel sind die Konzentrationen bei 700 ppm CO<sub>2</sub> wiederum niedriger als bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Die Massenflussraten der Cytokinine sind dagegen bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ähnlich hoch. Dies ist auf die Transpirationsraten zurückzuführen, die bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration zwar deutlich unter den Raten bei 360 ppm CO<sub>2</sub> liegen, jedoch die Gesamttranspiration des Source-Blattes der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen aufgrund ihrer größeren Blattfläche aber etwas höher ist (vgl. Tab. 21). Auffällig ist, dass die Cytokinine der Z-Familie im Source-Blatt eine deutlich höhere *turnover*-Rate zeigen als die Cytokinine der DHZ- und IP-Familie. Im Gegensatz zu den *turnover*-Zeiten der Cytokinin-Pools in den Wurzeln, sind die *turnover*-Zeiten im Source-Blatt abhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration. Bei erhöhter Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen liegen sie durchweg über jenen bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Während in der Wurzel die *turnover*-Zeit des Pools der Cytokinine der Z-Familie am höchsten ist, ist seine *turnover*-Zeit im Source-Blatt am niedrigsten. Die höchste *turnover*-Zeit im Source-Blatt haben die Cytokinine der IP-Familie.

**Tab. 23: Konzentrationen und Gehalte der xylemmobilen Cytokinine (CK) im Source-Blatt und im Xylemsaft am Source-Blattstiel und turnover-Zeit des CK-Pools im Source-Blatt 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen in 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub>. Zur Berechnung wurden die Mittelwerte (n = 5) herangezogen.**

	CK im Source-Blatt ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{Blatt}^{-1}$ )			CK im Xylemsaft ins Blatt (nM) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{Blatt}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )			turnover-Zeit des CK-Pools im Source-Blatt (h)		
	Z	DHZ	IP	Z	DHZ	IP	Z	DHZ	IP
<b>360</b>	1,11	1,76	2,31	0,89	0,44	0,42	1,0	3,2	4,4
	4,91	7,80	10,23	4,73	2,42	2,31			
<b>700</b>	0,78	1,17	1,51	0,74	0,44	0,28	1,8	4,4	9
	7,58	11,37	14,68	4,32	2,57	1,63			

### 3.4.3 Indol-3-essigsäure in den einzelnen Pflanzenorganen

Die Konzentrationen und Gehalte freier Indol-3-essigsäure (IES) in den Organen 35 d alter Tabakpflanzen werden in Tab. 24 aufgelistet. Ebenso wie die Cytokininkonzentrationen unterscheiden sich auch die IES-Konzentrationen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub> im Apex, in den Sink-Blättern, im Source-Blatt und in der Wurzel nicht deutlich voneinander. Lediglich die Konzentrationen im Stängel der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen sind bei 700 ppm CO<sub>2</sub> höher als bei 360 ppm CO<sub>2</sub> ( $p < 0,25$ ). Dagegen sind die Gehalte an IES im Source-Blatt, im Stängel und in der Wurzel bei 700 ppm CO<sub>2</sub> deutlich höher als bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden ( $p < 0,25$  bzw.  $p < 0,05$ ). Beide, die Konzentrationen und Gehalte von IES sind wie jene der Cytokinine organspezifisch. Die höchsten IES-Konzentrationen sind im Apex und in den Sink-Blättern zu finden, während sie im Source-Blatt und in der Wurzel am geringsten sind. Die Gehalte dagegen sind im Apex und den Sink-Blättern aufgrund der geringeren Biomasse kleiner als im Source-Blatt und in der Wurzel. Die höchsten IES-Gehalte sind im Stängel enthalten.

**Tab. 24: Konzentrationen und Gehalte freier Indol-3-essigsäure in verschiedenen Organen 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub>. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (bei Apex und Sink-Blättern n = 2, bei Stängel n = 4, bei Source-Blatt und Wurzel n = 5). Sternsymbolik kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den CO<sub>2</sub>-Behandlungen.**

	Konzentration ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}_{\text{FG}}^{-1}$ )		Gehalt ( $\mu\text{mol}\cdot\text{Organ}^{-1}$ )	
	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>	360 ppm CO <sub>2</sub>	700 ppm CO <sub>2</sub>
<b>Apex</b>	184,4	212,9	7,7	8,9
<b>Sink-Blätter</b>	191,6	196,1	30,0	22,6
<b>Source-Blatt</b>	6,6 ± 1,6	7,4 ± 1,3	58,5 ± 20,2 <sup>x</sup>	90,0 ± 18,7
<b>Stängel</b>	13,5 ± 3,9 <sup>x</sup>	22,6 ± 6,1	61,8 ± 32,8 <sup>*</sup>	182,7 ± 48,9
<b>Wurzel</b>	3,8 ± 1,5 <sup>x</sup>	4,7 ± 1,4	49,5 ± 38,1 <sup>x</sup>	95,6 ± 52,8



### 3.4.4 Verhältnis der Indol-3-essigsäure-Konzentration und der Cytokininkonzentration

Die Konzentrationsverhältnisse von IES und der „aktiven“ Cytokinine ( $CK_{\text{aktive}}$ ) sind in Tab. 25 dargestellt. In allen Sprossorganen liegen die Konzentrationen der IES um den Faktor 1,5 bis 2,75 höher als die Cytokininkonzentrationen. Bei den Pflanzen, die in 360 ppm  $CO_2$  angezogen wurden, sind die  $[IES]/[CK_{\text{aktive}}]$ -Verhältnisse im Apex und in den Sink-Blättern am höchsten und in den Source-Blättern etwas niedriger, während das Verhältnis bei Hoch- $CO_2$ -Pflanzen im Source-Blatt höher ist als in den Spross-Sinks. Bei beiden  $CO_2$ -Konzentrationen sind die Verhältnisse im Stängel tendenziell etwas niedriger als in den übrigen Sprossorganen. Die niedrigsten Verhältnisse finden sich in den Wurzeln ( $<1$ ). Die  $[IES]/[CK_{\text{aktive}}]$ -Verhältnisse des Source-Blattes, des Stängels und der Wurzel zeigen keine Abhängigkeit von der  $CO_2$ -Konzentration. Der deutlich erscheinende  $CO_2$ -abhängige Unterschied der Verhältnisse in den Apizes und den Sink-Blättern rührt von relativ kleinen, gegenläufigen Unterschieden der IES- bzw. Cytokininkonzentrationen her.

**Tab. 25: Verhältnis der Konzentrationen der freien Indol-3-essigsäure (IES) und der „aktiven“ Cytokinine ( $CK_{\text{aktive}}$ ) in verschiedenen Organen 35 d alter Tabakpflanzen, angezogen bei 360 ppm bzw. 700 pm $CO_2$ .** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (bei Apex und Sink-Blättern  $n = 2$ , bei Stängel  $n = 4$ , bei Source-Blatt und Wurzel  $n = 5$ ). Die Unterschiede zwischen den beiden  $CO_2$ -Behandlungen waren in keinem Fall signifikant.

	$[IES]/[CK_{\text{aktive}}]$	
	360 ppm $CO_2$	700 ppm $CO_2$
<b>Apex</b>	2,60	1,91
<b>Sink-Blätter</b>	2,75	1,76
<b>Source-Blatt</b>	2,22 ± 1,63	2,57 ± 0,77
<b>Stängel</b>	1,77 ± 1,91	1,52 ± 0,06
<b>Wurzel</b>	0,75 ± 0,54	0,68 ± 0,12

## Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der Cytokinine und der Indol-3-essigsäure in Tabakpflanzen bei 360 ppm und 700 ppm CO<sub>2</sub>

### Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sind höher

- *turnover*-Zeit des Cytokinin-Pools im Source-Blatt,
- IES-Gehalte im Stängel, im Source-Blatt und in der Wurzel.

Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration bleiben unverändert

- Cytokininkonzentration und -gehalt in den Organen und im Xylemsaft,
- alters- und organabhängige Unterschiede in den Cytokininkonzentrationen und -gehalten,
- *turnover*-Zeit des Cytokinin-Pools in der Wurzel,
- IES-Konzentrationen in allen Organen und IES-Gehalte im Apex und in den Sink-Blättern.

### Abhängigkeit vom Pflanzenalter

Mit zunehmendem Pflanzenalter steigen

- Cytokininkonzentrationen im Apex,
- Cytokiningehalte im Apex, im Source-Blatt, im Stängel und in der Wurzel,
- organabhängige Unterschiede in den Cytokininkonzentrationen und -gehalten.

Mit zunehmendem Pflanzenalter sinken

- Cytokininkonzentrationen im Stängel und in der Wurzel.

Mit zunehmendem Pflanzenalter bleibt unverändert

- Cytokiningehalt in den Sink-Blättern.

Mit dem Pflanzenalter ändert sich

- Cytokininmuster in den Pflanzenorganen.

### Abhängigkeit vom Pflanzenorgan bzw. Xylemsaft

Organe bzw. Xylemsäfte unterscheiden sich voneinander durch

- Cytokinin- und IES-Konzentrationen, die im Apex und in den Sink-Blättern höher sind als im Source-Blatt, im Stängel und in der Wurzel,
- Cytokinin- und IES-Gehalte, die im Apex und in den Sink-Blättern niedriger sind als im Source-Blatt, im Stängel und in der Wurzel,
- Cytokininmuster. Im Source-Blatt überwiegt kein einzelnes Cytokinin; sonst überwiegt überall ZR, in Sink-Blättern zusammen mit DHZ, im Xylemsaft zur Pflanze mit IPA, im Stängel und in der Wurzel mit ZN. IP war in den Xylemsäften nicht messbar.

## 4 DISKUSSION

Die Möglichkeit, das Pflanzenwachstum durch Variation von exogenen Faktoren, wie bspw. Wasser- und Nährstoffversorgung, Lichteinstrahlung und Temperatur, zu steuern, ist seit langem bekannt. Die endogenen biochemischen Mechanismen der Steuerung des Pflanzenwachstums, die Verteilung der Biomasse auf Wurzel und Spross, sind dagegen nur auf der korrelativen Ebene beschrieben. Als Wachstumssignale werden neben Zuckern (Jang und Sheen, 1997) und Stickstoffverbindungen (Stitt und Krapp, 1999) v. a. Phytohormone, insbesondere Cytokinine und Auxine, diskutiert (Jackson, 1993; Bradford und Trewavas, 1994; Beck, 1999; Werner et al., 2001). Auxine und verschiedene Vertreter der Cytokinine sind einerseits mitogene Signale, andererseits ist Auxin dasjenige Phytohormon, welches die Zellstreckung reguliert (Moore, 1989; Mok, 1994). Beides, Zellteilungsaktivität und Zellstreckung bestimmen das Wachstum in den Meristemen der Pflanze.

Bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration steigt die Carboxylierungs- und sinkt die Oxygenierungsaktivität der RubisCO bei  $\text{C}_3$ -Pflanzen (Stitt, 1991). Dadurch nimmt die Photosyntheserate zu und mehr Assimilate stehen für das Wachstum der Pflanze zur Verfügung (Lawlor und Mitchell, 1991; Van der Kooij et al., 1999). Bei vielen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass die stimulierende Wirkung erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration auf das Pflanzenwachstum nur wenige Tage lang anhält. Danach kann das Wachstum sogar geringer sein als bei nicht erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (Kramer, 1981; Makino und Mae, 1999; Poorter und Navas, 2003). Eine entsprechende Beobachtung wurde auch für Tabakpflanzen beschrieben, die in Topfkultur angezogen wurden (Düll, 1998; Geiger et al., 1999). Eine nahe liegende Erklärung für das als „Adaptation“ bezeichnete Nachlassen der  $\text{CO}_2$ -bedingten Wachstumsstimulation ist die Limitierung der Biomasseproduktion durch andere Faktoren, wie bspw. Nährstoffversorgung oder Wurzelraumvolumen (Makino und Mae, 1999; Poorter und Navas, 2003). Bereits Düll (1998) hatte in ihrer Zulassungsarbeit festgestellt, dass die Wachstumsstimulierung bei Tabakpflanzen durch erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration bei Vergrößerung des Topfvolumens von 1 l auf 4 l länger anhält, was auf eine bessere Nährsalzversorgung infolge weniger limitierten Wurzelwachstums zurückgeführt wurde. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss des Wurzelraumvolumens auf das Wachstum von Tabakpflanzen bei derzeitig gegebener und bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration ermittelt. Da sich ein Ressourcen-Ungleichgewicht in einer Veränderung des Spross-Wurzel-Verhältnisses widerspiegelt, wurde dann der Einfluss der  $\text{CO}_2$ -Konzentration auf die Source-Sink-Beziehungen untersucht. Source-Sink-Beziehungen werden wiederum von den das Wachstum kontrollierenden Phytohormonen Auxin und Cytokinin gesteuert. Deshalb wurde auch der Zusammenhang zwischen dem Phytohormonhaushalt und dem Wachstum bei den zwei unterschiedlichen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen untersucht. Die Tabakpflanzen wurden bei derzeitig gegebener (360 ppm) bzw. erhöhter (700 ppm)  $\text{CO}_2$ -Konzentration

bei sättigender Lichtintensität sowie optimaler Temperatur und Luftfeuchte angezogen. Bei optimalem Nährsalz- und Wasserangebot sollte deshalb die Biomasseproduktion der Tabakpflanzen bei sättigendem CO<sub>2</sub>-Angebot nur mehr durch innere Faktoren limitiert sein.

#### **4.1 Einfluss des Wurzelraumvolumens und der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum von Tabakpflanzen**

Optimales Pflanzenwachstum kann nur aufrecht erhalten werden, wenn keiner der äußeren Faktoren limitiert. Dies gilt in besonderer Weise, wenn sättigende Lichtintensität und erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration angeboten werden (Stitt und Krapp, 1999). Das Pflanzenwachstum und seine Reaktion auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration wird ganz entscheidend durch die Stärke der Sinks beeinflusst. Solange der Verbrauch der Assimilate in den Sinks mit ihrer Bildung in den Source-Blättern Schritt halten kann, hält der wachstumsstimulierende Effekt erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration an. Ein Ressourcen-Überangebot führt zur Endprodukthemmung der Photosynthese und damit zu verringertem Wachstum (Robbins und Pharr, 1988). Dies gilt als Ursache für die „Adaptation“, d. h. das Nachlassen der wachstumsstimulierenden Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration (Arp, 1991; Stitt, 1991; Saralabai et al., 1997). Die Sink-Stärke ihrerseits wird letztlich von exogenen Wachstumsfaktoren kontrolliert. Dies gilt insbesondere für die Wurzel, die zum einen ein wichtiges Sink für Photoassimilate ist, zum anderen als Sensor für die bodenbürtigen exogenen Faktoren wirkt. Mechanische Limitierung des Wurzelwachstums muss daher auch auf die Sink-Stärke und damit auf das Wachstum insgesamt zurückwirken.

##### **Wurzelraum kann eine wachstumslimitierende Größe sein.**

Robbins und Pharr (1988) zeigten, dass sich das Pflanzenwachstum in bestimmtem Umfang der Topfgröße anpasst (Bonsai-Effekt), wobei Spross- und Wurzelwachstum genau koordiniert werden. Diese Anpassung des Wachstums an das Wurzelraumvolumen und die Koordination von Wurzel- und Sprosswachstum wird durch die Ergebnisse mit Tabakpflanzen eindrücklich bestätigt: In allen fünf verwendeten Topfvolumina (1 l, 5 l, 10 l, 15 l, 20 l) haben die Pflanzen einen vergleichbaren Habitus. Während also die Blattanzahl und die Entwicklungsgeschwindigkeit der Tabakpflanzen vom Wurzelraumvolumen weitgehend unbeeinflusst sind, werden die Pflanzen und Blätter mit zunehmender Topfgröße deutlich größer (vgl. Abb. 13) und die Biomasseproduktion der Pflanzen nimmt mit der Topfgröße linear bis zu einem Volumen von 15 l zu (vgl. Abb. 15). Die Spross-Wurzel-Verhältnisse der Biomassen aber bleiben innerhalb einer CO<sub>2</sub>-Behandlung bei allen Topfvolumina gleich (vgl. Abb. 21 A). Lediglich im 1 l-Topf ist das Spross-Wurzel-Verhältnis der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen deutlich höher als in den übrigen Töpfen. Die weitgehende Unabhängigkeit des Spross-Wurzel-Verhältnisses von der Topfgröße zeigt die strikte Koordination des Wachstums von Wurzel und Spross beim Tabak. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die Topfgröße das Nährsalzangebot nicht be-

einflusste, da das Wurzelbett aus Sand bestand, der kontinuierlich mit einer optimierten anorganischen Nährlösung perkoliert wurde. Gleichwohl beeinflusst das Wurzelraumvolumen aber die Nährstoffaufnahme, die eng an das Wurzelwachstum gekoppelt ist.

### **Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Biomasseproduktion der Tabakpflanzen im 1 l-Topf fällt aus dem Rahmen.**

Arp (1991) trug die Ergebnisse von Untersuchungen verschiedener Autoren zur Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf verschiedene Pflanzen zusammen, bei denen unterschiedlich große Töpfe für die Anzuchten verwendet wurden. Der Vergleich ergab, dass Topfvolumina unterhalb 3,5 l die Photosyntheserate bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration immer verringerten, während bei Topfvolumina über 12,5 l oder bei Freilandversuchen erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration immer eine Steigerung der Assimilationsraten mit sich brachte. Bei Topfvolumina zwischen 3,5 l und 12,5 l war je nach Pflanzenart und Untersuchungsbedingungen entweder ein hemmender oder ein stimulierender Effekt des erhöhten CO<sub>2</sub>-Angebots auf die Photosyntheserate zu beobachten. Thomas und Strain (1991) zeigten bei Baumwolle, dass die Limitierung der Photosynthese durch Erhöhung des Wurzelraumvolumens reversibel ist.

Bei den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen sind die Biomassen der 61 d alten Tabakpflanzen, die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, in allen Töpfen deutlich höher als jene der bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogenen (vgl. Abb. 15). Der Einfluss der erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Biomasseproduktion zeigt sich im Verhältnis der Trockengewichte bei 700 ppm CO<sub>2</sub> zu den Trockengewichten bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (vgl. Tab. 26 und McConnaughay et al., 1993). Entsprechend den Ergebnissen von Arp (1991) wäre zu erwarten, dass dieses Verhältnis mit dem Topfvolumen ansteigt. Dies ist jedoch nicht grundsätzlich der Fall: Im kleinsten Topf ist das Verhältnis der Biomassen sogar höher als in den größeren Töpfen und bleibt ab einem Topfvolumen von 5 l konstant, obwohl die Biomasseproduktion selbst bis zu einem Volumen von 15 l durch die Topfgröße limitiert wird.

**Tab. 26: Effekt der CO<sub>2</sub>-Konzentration und der Topfvolumina auf die Biomasse 61 d alter Tabakpflanzen**, ausgedrückt als Verhältnis der Biomasse (BM) bei 700 ppm CO<sub>2</sub> zu jener bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Die Verhältnisse wurden aus den Mittelwerten von fünf Pflanzen gebildet (beim 20 l-Topf von drei Pflanzen).

Topfvolumen (l)	<b>BM<sub>700</sub>/BM<sub>360</sub></b> <b>Gesamtpflanze</b>	<b>BM<sub>700</sub>/BM<sub>360</sub></b> <b>Spross</b>	<b>BM<sub>700</sub>/BM<sub>360</sub></b> <b>Wurzel</b>
1	2,1	2,3	1,5
5	1,6	1,3	2,3
10	1,8	1,6	2,1
15	1,7	1,5	2,1
20	1,8	1,6	2,2

McConnaughay et al. (1993) wiesen nach, dass die Verminderung des Wurzelraumvolumens nicht zwangsläufig zu einer Verringerung der Biomasseproduktion bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration führen muss. Vielmehr war in ihren Experimenten die Nährstoffkonzentration wichtiger als das Wurzelraumvolumen oder die Nährstoffmenge. In den vorliegenden Experimenten wurde die Menge an Nährlösung dem Topfvolumen angepasst, so dass die Nährstoffkonzentrationen in allen Töpfen gleich hoch waren. Die Unabhängigkeit der Reaktion auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration vom Wurzelraumvolumen ab einem Topfvolumen von 5 l kann also durch die in allen Töpfen gleiche Nährstoffkonzentration erklärt werden.

Die stärkere Biomasseproduktion der im 1 l-Topf angezogenen Pflanzen bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration geht mit einem veränderten Allokationsmuster der Photoassimilate einher. Das Spross-Wurzel-Verhältnis der Pflanzen im 1 l-Topf ist bei der Anzucht bei 700 ppm CO<sub>2</sub> exzeptionell hoch (vgl. Abb. 16), was auch durch die Daten in Tab. 26 zum Ausdruck kommt. Eine Erklärung könnte in einer starken Ligninbildung im Stängel oder in der Akkumulation von Stärke in den Blättern liegen. Für beides liegen aber keine detaillierten Analysen vor.

## **4.2 Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum und die Biomasseverteilung von Tabakpflanzen in ausreichend großem Wurzelraum**

Aus den unterschiedlichen Befunden in der Literatur über den Einfluss erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Pflanzenwachstum lässt sich schließen, dass es keine einfache, allgemein gültige Wirkung gibt, sondern dass die Reaktion der Pflanzen auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration von verschiedenen Faktoren, wie der Pflanzenart, dem Entwicklungsstadium der Pflanze, der Lichtintensität, der Nährstoffversorgung und dem Zeitpunkt der Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration abhängt. Während bei allen C<sub>3</sub>-Pflanzen zumindest kurzzeitig ein wachstumsstimulierender Effekt der erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration zu finden ist, ist die Langzeitwirkung sehr variabel: Bei vielen Untersuchungen lässt die anfängliche Wachstumsstimulation nach wenigen Tagen nach und die Wuchsraten bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration können sogar unter jene bei derzeit gegebener CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft sinken (Kramer, 1981; Makino und Mae, 1999; Poorter und Navas, 2003). Die Variabilität der Reaktion auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration hat ihre Ursache in der Komplexität des Pflanzenwachstums selbst. Die verschiedenen und zum Teil nicht klar definierten Versuchsbedingungen machen einen Vergleich der Ergebnisse deshalb sehr schwierig. Zur Untersuchung des Pflanzenwachstums in einer Atmosphäre mit erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ist es selbstverständlich, die Pflanzen von Beginn der Anzucht an in dieser Atmosphäre wachsen zu lassen. Dennoch wird dies häufig versäumt, obwohl bereits Kramer (1981) beschrieben hat, dass sehr junge Keimlinge auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration reagieren.

Bei bisherigen Untersuchungen mit Tabakpflanzen, die wie in der vorliegenden Arbeit von der Aussaat an erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ausgesetzt waren, war das Wachstum jedoch nur kurzzeitig stimuliert und der Forschungsschwerpunkt lag auf den Ursachen und Mechanismen

des Nachlassens des wachstumsstimulierenden Effekts (Düll, 1998; Geiger et al., 1999). Bei Messbeginn waren die Pflanzen bereits mindestens 18 d alt und die Biomasse der Pflanzen bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration war bereits deutlich höher als die Biomasse bei momentan gegebener CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre. Im Unterschied dazu wurde in der vorliegenden Arbeit der Biomassezuwachs von der Aussaat, die bereits bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> erfolgte, bis zum Alter von 61 d verfolgt.

**Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ist die Relative Wachsrates bereits 8 d nach der Aussaat erhöht und der absolute Biomassezuwachs bis zur Blühphase gesteigert.**

Das Trockengewicht der Tabakkeimlinge übersteigt bereits bei der Keimblattentfaltung, d. h. 8 d nach der Aussaat, bei 700 ppm CO<sub>2</sub> jenes der Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden. Dieser Wachstumsvorsprung rührt von der um einen Tag früheren Entfaltung der Keimblätter bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration her (vgl. Abb. 18 B). Auch Geiger et al. (1998) beschrieben einen CO<sub>2</sub>-abhängigen Unterschied des Frischgewichts von Tabakkeimlingen im Alter von 6 d. Die Keimlinge von Tabak reagieren, ebenso wie Keimlinge von Sojabohne und anderen Pflanzen (Kramer, 1981; Sicher et al., 1995), schon sehr früh in ihrer Entwicklung auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration.

Die hohen Relativen Wachsrates zu Beginn der Keimblattentfaltung sinken bereits einen Tag später, d. h. 9 d nach der Aussaat, bei beiden Anzuchtvarianten wieder ab (vgl. Abb. 19). Obwohl die Relativen Wachsrates 10 d nach der Keimung auf Nähr-Agar bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen gleich sind, nehmen die Keimlinge bei 700 ppm CO<sub>2</sub> aufgrund ihres bereits höheren Gewichts absolut mehr an Biomasse zu. Da nach dem Umsetzen der Keimlinge von Nähr-Agar- in Sandkultur die Relativen Wachsrates drastisch ansteigen, kann man schließen, dass das Wachstum der Keimlinge auf dem Nähr-Agar bereits im Alter von 9 d eingeschränkt war. Als Ursache dafür kommen Wasser- und/oder Nährsalzmangel und/oder die geringe Licht-einstrahlung in die abgedeckten Anzuchtschalen in Frage.

Direkt nach dem Vereinzeln der Keimlinge von Nähr-Agar- in Sandkultur sind die Relativen Wachsrates am höchsten. Sie sind bei den Pflanzen, die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> gewachsen sind, höher als bei jenen bei 360 ppm. Die Relative Wachsrates der Wurzel ist zu diesem Zeitpunkt deutlich höher als jene des Sprosses. Das Umsetzen von Nähr-Agar- in Sandkultur ist mit vielen Änderungen für den Keimling verbunden. Durch das Herausziehen der Pflänzchen aus dem Agar und das Einschwemmen in Sand sind feine Verletzungen der Wurzel nicht zu vermeiden. Dadurch könnten das Wurzelwachstum und damit die Biosynthese von Cytokininen angeregt werden, wodurch in der Folge wiederum das Spross-Wachstum stimuliert würde.

Die drastische Abnahme des Spross-Wurzel-Verhältnisses innerhalb der ersten beiden Wochen in Sandkultur (vgl. Abb. 21 A) unterstützt die Vermutung, dass das Wurzelwachstum durch mechanische Verletzung angeregt wird. Nach dem Umsetzen in Sand wurden die Keimlinge

kontinuierlich mit Nährlösung versorgt und die Lichtintensität war mit  $200 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mehr als doppelt so hoch wie in den Keimschalen. Aus der deutlich höheren Relativen Wuchsrate der Pflanzen bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (vgl. Abb. 19) ist zu schließen, dass nach dem Umsetzen  $\text{CO}_2$  der wachstumslimitierende Faktor für die 360 ppm- $\text{CO}_2$ -Pflanzen war. Da der Unterschied der Wuchsraten durch die höhere Wuchsrate der Wurzeln bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration verursacht wird, ist die Wurzel offenbar das wichtigste Sink für die vermehrt gebildeten Assimilate.

Auffällig ist, dass sich die Relativen Wuchsraten zwischen den Pflanzen der beiden  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen immer dann unterscheiden, wenn die Wuchsraten selbst am höchsten sind, nämlich während der Keimblattentfaltung und nach dem Umsetzen von Nähr-Agar- in Sandkultur. Damit ist die Reaktion auf erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration in solchen Entwicklungsstadien besonders hoch, in denen die Pflanzen am schnellsten wachsen, d. h. ihre Sink-Kapazität folglich besonders groß ist (vgl. Stitt und Krapp, 1999). Schnell wachsende Keimlinge sind wahrscheinlich Source limitiert (Stitt, 1991), was mit dem hohen Spross-Wurzel-Verhältnis der 21 d alten Tabakpflanzen in Einklang steht. Tabakkeimlinge sind damit in der Lage, die bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration vermehrt gebildeten Photoassimilate für ihr Wachstum zu verwenden.

Eine Woche nach dem Vereinzeln der Tabakkeimlinge sinken die Relativen Wuchsraten zunächst stark und dann mit fortschreitendem Alter weiter leicht ab. Dies ist ein allgemein beobachtetes Phänomen, das seine Ursache in dem mit dem Alter steigenden Anteil sich nicht mehr teilender Zellen hat (Thomas et al., 1975; Geiger et al., 1999). Während sich ab einem Alter von 28 d die Relativen Wuchsraten nicht durch die  $\text{CO}_2$ -Behandlung unterscheiden, nehmen die Tabakpflanzen absolut gesehen bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration bis zum Alter von 61 d mehr an Biomasse zu als die Pflanzen aus der 360 ppm  $\text{CO}_2$ -Anzucht (vgl. Abb. 18 A).

Diese anhaltend stimulierende Wirkung erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration auf den absoluten Biomassezuwachs der Tabakpflanzen war bisher in Sandkultur nicht beobachtet worden. Zwar konnte Düll (1998) durch Vergrößerung des Topfvolumens von 1 l auf 4 l den Effekt verlängern, dennoch nahmen die Biomassen der Hoch- $\text{CO}_2$ -Pflanzen im 4 l-Topf nach 35 d nur noch in gleichem Maße zu wie jene der Pflanzen, die bei 350 ppm  $\text{CO}_2$  angezogen worden waren. Bei hydroponischer Kultur dagegen hielt der wachstumssteigernde Effekt erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration bis zum Alter von 42 d an (Düll, 1998). Allerdings waren die hydroponisch angezogenen Pflanzen trotz nicht begrenzendem Wurzelraum und ausreichender Nährsalzversorgung kleiner als die Pflanzen im 4 l-Topf und damit erheblich kleiner als die in dieser Arbeit kultivierten Pflanzen im 15 l-Topf. Für ein maximales Wachstum und eine anhaltend steigernde Wirkung erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration auf dieses Wachstum ist demnach nicht nur ein ausreichend großer Wurzelraum unabdingbar, sondern offensichtlich außerdem ein festes Wurzelbett wichtig. Auf



die Bedeutung des Wurzelbettes für das Pflanzenwachstum wird weiter unten eingegangen (vgl. Abschnitt 4.4.1).

**Die Biomasseallokation unterscheidet sich bei den Pflanzen der beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten nur direkt nach dem Umsetzen von Nähr-Agar- in Sandkultur und beim Übergang vom vegetativen Wachstum zur Blühphase.**

Die Allokation der Photoassimilate und damit die Biomasseverteilung kann sich durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration ändern (Kramer, 1981). Zum Beispiel werden in Pflanzen mit großen Speicher-Sinks bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration relativ mehr Assimilate in diese Speicher transportiert (Reekie et al., 1998). Das Spross-Wurzel-Verhältnis ist bei krautigen Pflanzen, die bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration wuchsen, oft erniedrigt (Saralabai et al., 1997), wie es auch in dieser Arbeit bei 61 d alten Tabakpflanzen beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 4.1). Das Spezifische Blatttrockengewicht dagegen ist beim Wachstum in erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration oft größer, was in der Regel mit einer vermehrten Stärkespeicherung im Blatt zusammen hängt (Saralabai et al., 1997). Da die Verteilung der Assimilate auch entscheidend vom Nährstoffstatus der Pflanze bestimmt wird, ist eine alleinige Ursache einer Änderung schwer herauszuarbeiten (Stitt und Krapp, 1999).

Spross und Wurzel der Tabakpflanzen nehmen mit dem Alter gleichermaßen an Biomasse zu (vgl. Abb. 20). Ihre jeweiligen Relativen Wuchsraten sinken jedoch mit zunehmendem Pflanzenalter (vgl. Tab. 9). Nur eine Woche nach dem Vereinzeln, im Alter von 21 d, ist ein Unterschied in der Biomasseverteilung zwischen Wurzel und Spross bei den beiden Anzuchtvarianten festzustellen. Bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen ist die Relative Wuchsrate der Wurzel deutlich höher als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen, während die Wuchsraten der Sprosse gleich sind. Demnach werden in diesen jungen Pflanzen bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration mehr Assimilate in die Wurzel transportiert als in den bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogenen. Dies spiegelt sich auch im Spross-Wurzel-Verhältnis der 21 d alten Tabakpflanzen wider, das, wie bereits besprochen wurde, bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen deutlich höher ist als bei Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Durch stärkeres Wurzelwachstum in diesem Alter wird dieser Unterschied ausgeglichen, so dass sich die Verhältnisse ab einem Pflanzenalter von 28 d bei beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten nicht mehr unterscheiden. Die Tabakpflanzen optimieren offenbar ihr Spross-Wurzel-Verhältnis an die Anzuchtbedingungen.

Während sich bei jungen Pflanzen der Biomassezuwachs auf die ganze Pflanze erstreckt, steigen zwischen Tag 35 und Tag 42 die Biomassen der Stängel besonders stark (vgl. Abb. 20, Tab. 9). In diesem Zeitraum streckt sich die Sprossachse und ihre relative Biomassezunahme ist bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen deutlich höher als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen, was auch im Stängel-Blätter-Verhältnis ab dem Pflanzenalter von 42 Tagen zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 21 B). Dieser Unterschied vergrößert sich bis zum Alter von 61 d kaum mehr. Damit

ist beim Vergleich der Sink-Stärke der jeweiligen Pflanzenteile bei den beiden Anzuchtvarianten nur der sich stark streckende Stängel bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen ein stärkeres Sink als bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen. Dies zeigt, dass nicht nur schnell wachsende Pflanzen (Saralabai et al., 1997) sondern auch schnell wachsende Pflanzenteile in besonderem Ausmaß in der Lage sind, auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration zu reagieren.

Die Spezifischen Blatttrockengewichte sind bis zu einem Pflanzenalter von 42 d unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration bei der Anzucht (vgl. Abb. 22). In diesem Alter sind die Blütenknospen noch nicht sichtbar. Bei 49 d alten Pflanzen, bei denen die Blütenknospen bei beiden Anzuchtvarianten schon erkennbar sind, ist das Spezifische Blattgewicht bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen deutlich höher als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen. Mit dem Übergang vom vegetativen zum generativen Wachstum verbleiben demnach bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen mehr Kohlenhydrate in den Blättern als bei 360 ppm (vgl. Saralabai et al., 1997). Bei beiden CO<sub>2</sub>-Varianten steigt das Spezifische Blattgewicht von da an bis zum Alter von 61 d. Bei vielen Pflanzen nimmt die Kohlenhydratspeicherung direkt vor Blühbeginn und während der Blütezeit zu. Diese Speicher werden dann zur Versorgung der Samen verwendet (Saralabai et al., 1997). Die Tabaksamen der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen sind nicht schwerer als bei Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (Daten nicht gezeigt). Die Pflanzen haben aber mehr Blüten und bilden damit mehr Samenkapseln aus, was vermutlich zu einer erhöhten Samenproduktion führt. Es bleibt die Frage, ob die bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration zusätzlich im Blatt gespeicherten Kohlenhydrate bei der Samenbildung vollständig aufgebraucht werden. Von der Sojabohne ist bekannt, dass der Speicher nicht vollständig abgebaut wird, obwohl die Samen bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration deutlich schwerer sind (Saralabai et al., 1997).

#### **Ist die Biomasseproduktion bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration durch bessere Stickstoffversorgung noch zu steigern?**

Die Source-Sink-Verhältnisse sind eng verknüpft mit der Nährsalzaufnahme. Sie können nur aufrecht erhalten werden, wenn ausreichend Nährstoffe, insbesondere Stickstoff, zur Verfügung steht, um die Stärke der Sinks der gesteigerten Photoassimilationsrate bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration anzupassen (Stitt, 1991; Fischer et al., 1997) oder neue Sinks zu bilden (Kramer, 1981; Morin et al., 1992). Als für die Verbesserung der Nährsalzaufnahme beim Wachstum bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration besonders wichtiges Sink gilt, wie schon erwähnt, die Wurzel, was sich durch ein verringertes Spross-Wurzel-Verhältnis bei Nährstoffmangel bemerkbar macht (Brouwer, 1962; Fetene et al., 1993). Beim Wachstum bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sollte Stickstoffmangel aufgrund der Wachstumsstimulation und dem damit verbundenen größeren Bedarf verstärkt auftreten und das Spross-Wurzel-Verhältnis entsprechend beeinflussen (Stitt und Krapp, 1999), was in zahlreichen Untersuchungen auch beobachtet wurde (Saralabai et al., 1997). Es stellt sich die Frage, ob bei den hier beschriebenen Experimenten das Wachstum der Tabakpflanzen bei 700 ppm CO<sub>2</sub> Stickstoff limitiert war.

Die Gleichheit des Spross-Wurzel-Verhältnisses der Pflanzen beider Anzuchtvarianten bis zum Alter von 42 d (vgl. Abb. 21) deutet auf eine gleich gute Stickstoffversorgung bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen hin. Bei den 61 d alten Pflanzen, die in den verschiedenen Topfvolumina angezogen wurden (vgl. Abb. 16), ist das Spross-Wurzel-Verhältnis der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen, mit Ausnahme im 1 l-Topf (vgl. Abschnitt 4.1), aber erniedrigt, was auf eine Stickstofflimitierung hinweist. Diese kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist aber zu berücksichtigen, dass die 61 d alten Pflanzen bereits blühten und das verringerte Spross-Wurzel-Verhältnis auch auf einen gesteigerten Bedarf an Mineralstoffen für die Ausbildung der Samen hindeuten kann.

Als integrierender Parameter für den Stickstoff-Status einer Pflanze wird meist das C/N-Verhältnis der Blätter herangezogen. Es steigt allgemein durch Stickstoffmangel, da der Stickstoffgehalt sinkt. Bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen ist das C/N-Verhältnis in den jüngeren Blättern deutlich höher als bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden (vgl. Abb. 17 und Abb. 23), was einem um die Hälfte niedrigeren N-Gehalt bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration zugeschrieben werden kann. Eine solche Erhöhung des C/N-Verhältnisses bzw. Verringerung des N-Gehalts bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass dadurch die Photosynthese und das Wachstum gehemmt sein müssen, denn in den meisten Blättern werden große Mengen an Nitrat-Stickstoff in den Vakuolen gespeichert. Ohne die Kenntnis der chemischen Form, in welcher der Stickstoff vorliegt, kann bei mehr als ausreichender Stickstoffversorgung die Betrachtung des C/N-Verhältnisses als Parameter für den Stickstoff-Status zu Missinterpretationen führen, da mit dem C/N-Verhältnis auch die Stickstoff-Speicherformen miterfasst werden (Tissue et al., 1993; Baxter et al., 1997; Stitt und Krapp, 1999): Gut versorgte Tabakpflanzen speichern viel Nitrat in ihren Blättern (Scheible et al., 1997), dessen Gehalt noch als hoch gelten kann, auch wenn der Gesamt-Stickstoffgehalt bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sinkt (Geiger et al., 1999). Ein weiterer wichtiger Stickstoffspeicher ist RubisCO. In C<sub>3</sub>-Pflanzen sind bis zu 30 % des Blattstickstoffs in RubisCO gebunden (Bainbridge et al., 1995). Ihr Anteil am Blattprotein macht im Tabak bis zu 50 % aus und kann drastisch gesenkt werden, ohne dass die Photosyntheseleistung sinkt (Fichtner et al., 1993). Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration werden allgemein geringere RubisCO-Gehalte gefunden (Geiger et al., 1999).

Der deutliche Unterschied in den Stickstoffgehalten der jungen Blätter der Tabakpflanzen der beiden Anzuchtvarianten (vgl. Abb. 17 und Abb. 23) könnte zumindest teilweise auf einen geringeren Stickstoff-Speicheranteil zurückzuführen und damit nicht wachstumsrelevant sein. Bei den alten Blättern ist der Stickstoff-Gehalt kaum von der CO<sub>2</sub>-Konzentration abhängig. Bei beiden Anzuchtvarianten verbleibt demnach etwa gleich viel Stickstoff in den Blättern, was gegen eine Stickstofflimitierung des Pflanzenwachstums bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration spricht.

Insgesamt liefern die Daten dieser Arbeit keinen handfesten Hinweis auf eine Stickstoffmangelsituation bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen. Sie kann aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Auch wegen der kontinuierlichen Zufuhr einer für Tabak optimierten Nährlösung (Lauerer, 1996) ist eine Nährsalzunterversorgung eher unwahrscheinlich. Wie in Abschnitt 4.4.1 gezeigt wird, ergeben auch die Phytohormonkonzentrationen in den verschiedenen Pflanzenteilen keinen Anhaltspunkt für eine Nährsalzmangelsituation. Dementsprechend ist es unwahrscheinlich, dass eine Erhöhung der Nährsalzkonzentration in der Nährlösung zu einer weiteren Stimulierung des Wachstums geführt hätte.

### **4.3 Assimilatverteilung**

Wachstum bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration führt zu einer höheren Biomasseproduktion, solange der Mineralstoffstatus der Pflanzen ausreichend hoch ist (vgl. Abschnitt 4.2). Ein Einfluss auf die internen Source-Sink-Beziehungen, wie er in vielen Untersuchungen beobachtet wurde (Saralabai et al., 1997), kann anhand der Verteilung der Photoassimilate eines Blattes in der Pflanze direkt aufgedeckt werden (Wardlaw, 1990; Fetene et al., 1993). Bei den Experimenten dieser Arbeit wurden die Assimilate ausgewählter Blätter radioaktiv markiert, indem eine Mischung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> und <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> zur Assimilation angeboten wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Applikationsküvette während der viertelstündigen Markierung derjenigen während der Anzucht entsprach, wohingegen aus technischen Gründen für den Rest der Pflanze während der Zeit der Markierung auch bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen die derzeitige gegebene CO<sub>2</sub>-Konzentration in Kauf genommen werden musste. Zur Assimilat-allokation wurden die Pflanzen wieder in die jeweilige CO<sub>2</sub>-Konzentration der Anzucht gebracht. Geringfügig geringere Lichtintensitäten während der Zeit der Markierung und der Assimilatverteilung waren zudem nicht zu vermeiden.

#### **Kinetik des Exports und der Allokation der Assimilate aus einem Source-Blatt (Blatt 10)**

Um die internen Source-Sink-Beziehungen mittels markierter Assimilate feststellen zu können, ist es wichtig, dass die Verteilung der aus einem Blatt exportierten Assimilate zum Zeitpunkt der Messung weitestgehend abgeschlossen ist. Ein unterschiedlich großer Teil der Photosyntheseprodukte kann zum einen im assimilierenden Blatt als Struktur- oder Speicherkohlenstoff verbleiben oder dort zur Energiegewinnung veratmet werden. Der übrige Teil der Assimilate wird exportiert und an anderen Stellen der Pflanze immobilisiert oder veratmet. Dabei ist zu bedenken, dass Allokation und Veratmung gleichzeitig stattfinden und nicht voneinander getrennt werden können. Damit kann sich die Assimilatverteilung nicht nur durch Verteilung sondern auch durch Respiration, die für die einzelnen Organe kaum getrennt bestimmbar ist, mit der Verteilungszeit ändern. Die angegebene quantitative Verteilung kann demnach immer nur eine Momentaufnahme sein. Da der während der Verteilung veratmete <sup>14</sup>C-Anteil am insgesamt wiedergefundenen <sup>14</sup>C in allen Experimenten immer zwischen 3 und 6 % lag, kann dieser Anteil bei den Betrachtungen zur Assimilatallokation weitgehend vernachlässigt werden.

Die Kinetik des Markierungsversuches mit Blatt 10, einem typischen Source-Blatt, zeigt, dass bereits während der Assimilation des  $^{14}\text{C}$  Radiokohlenstoff exportiert und verteilt wird. In den darauf folgenden 10 h werden die meisten Assimilate exportiert und nach 24 h ist der Assimilatexport weitestgehend abgeschlossen (vgl. Abb. 24 und Tab. 10). Dasselbe gilt auch für die Assimilatverteilung sowohl zu den oberhalb bzw. unterhalb des markierten Blattes liegenden Pflanzenteilen als auch in die einzelnen Pflanzenteile (vgl. Abb. 25 und Tab. 10).

Besonders interessant ist hier die Kinetik der Assimilatverteilung in die Wurzel und in die Internodien, denn Ergebnisse früherer Untersuchungen an Tabakpflanzen, die im 1 l-Topf angezogen worden waren, legten nahe, dass alle Assimilate eines Blattes zunächst in die Wurzel transportiert werden und von dort möglicherweise im internen Phloem des bikollateralen Leitbündels des Tabaks wieder nach oben transportiert werden (Beck, persönliche Mitteilung). Diese Vermutung lässt sich durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigen. Der Anteil an radioaktiven Assimilaten, der in der Wurzel gefunden wird, ändert sich nämlich zwischen 10 und 34 h nicht wesentlich.

Der anfängliche Anstieg der Radioaktivität im Spross oberhalb von Blatt 10 ist mit zunehmendem Import in die einzelnen Pflanzenteile zu erklären. Die konstanten Anteile radioaktiv markierter Assimilate oberhalb von Blatt 10 zwischen 24 h und 34 h Verteilungszeit lassen zwei Schlüsse zu: Entweder werden während dieser Zeit genau so viele Assimilate nach oben transportiert wie veratmet, oder Assimilate werden weder weiter verteilt noch veratmet, was eher unwahrscheinlich ist. Nach 34 h werden keine radioaktiven Assimilate mehr aus dem Source-Blatt angeliefert und ein kleiner Teil der bereits importierten wird veratmet, was die leichte Abnahme der Radioaktivität zwischen 34 h und 48 h erklären kann.

Die Abnahme der Radioaktivität im Stängelbereich unterhalb des Blattes 10 mit zunehmender Verteilungsdauer von 10 h auf 24 h spricht zum einen gegen die Annahme, dass Assimilate aus der Wurzel in den Spross rücktransportiert werden, zum anderen aber dafür, dass der Export in die Wurzel nach 24 h abgeschlossen ist. Wird die Blattstellung des Tabaks (2/5) berücksichtigt, mit der die Anordnung der Parastichen eng verknüpft ist (Esau, 1969), so stützt die Abnahme der Radioaktivität im Stängelteil unterhalb des Source-Blattes die Vorstellung, dass nach 24 h keine Assimilate mehr aus Blatt 10 exportiert werden.

### **Verteilungsmuster der Assimilate zu den einzelnen Organen**

Erwartungsgemäß besteht bei beiden Anzuchtvarianten eine enge Source-Sink-Beziehung zwischen den Blättern der gleichen Parastichen. In den Tabakpflanzen folgen die Parastichen der Anordnung (2+III), durch die der deutlich bevorzugte Transport der Assimilate in die Blätter drei und fünf Positionen über dem markierten Blatt zu erklären ist (vgl. Abb. 2; Esau, 1969). Es liegt die noch nicht nachgewiesene Annahme nahe, dass bei Tabakpflanzen ein ähnlicher Assimilattransportweg wie bei Tomatenpflanzen existiert, die ebenfalls zu den Solanaceen

gehören und auch bikollaterale Leitbündel besitzen. Bei Tomatenpflanzen werden die Assimilate eines Blattes zunächst im externen Phloem nach unten transportiert. Erst im Blattknoten, an dem das darunter liegende Blatt inseriert ist, sind die Blattleitbündel mit dem Sprossleitbündelsystem und das externe Phloem mit dem internen Phloem verbunden. Damit können die Assimilate sowohl im externen als auch im internen Phloem erst ab dieser Stelle nach oben transportiert werden (Bonnemain, 1968). Aufgrund seiner 2/5-Blattstellung bedeutet dies für Tabak, dass die Assimilate eines Blattes zunächst fünf Blattknoten nach unten transportiert werden müssen, bevor sie von dort im Sprossleitbündelsystem weiter nach unten oder nach oben gelangen können. Über eine unter dem betrachteten Blatt liegende Strecke von fünf Knoten kann also nicht entschieden werden, ob die darin vorhandenen Assimilate letztlich weiter nach unten oder nach oben transportiert werden. Ebenso wenig kann darüber etwas ausgesagt werden, ob der Transport im Sproßbündelsystem das innere oder das äußere Phloem benutzt. Aufgrund der Ergebnisse bei Tomatenpflanzen (Bonnemain, 1968) ist zu erwarten, dass im internen Phloem nur ein Transport in Richtung Sprossspitze möglich ist.

#### **Der Stängel als ein wichtiges Sink der 42 d alten Tabakpflanze**

Bei den Untersuchungen der Source-Sink-Beziehungen in der großen Brennnessel (Fetene et al., 1993) und anderen Pflanzen (Wardlaw, 1990), wurde davon ausgegangen, dass die radioaktiv markierten Assimilate, die im Stängel gefunden wurden, auf dem Weg zu den beiden Sink-Polen Sprossspitze und Wurzel sind. Daher wurden alle Assimilate oberhalb eines markierten Blattes dem Spross-Sink und alle unterhalb dem Wurzel-Sink zugesprochen. Nach den oben gemachten Ausführungen ist dies bei Tabak nicht ohne weiteres möglich.

Ein weiterer Grund, warum die Assimilate im Stängel nicht einem der beiden Sinks Sprossspitze und Wurzel zugesprochen werden können, ist, dass der Stängel bei Tabak offenbar ebenfalls ein Sink ist. Die Kinetik der  $^{14}\text{C}$ -Allokation in die Blätter und die entsprechenden Internodien zeigt (vgl. Tab. 10), dass die im Stängel gefundenen radioaktiven Assimilate hauptsächlich eingebaut wurden. In den Blättern dagegen wurden sie zu einem großen Teil veratmet. Bei Tabak kann demnach nicht davon ausgegangen werden, dass der Hauptanteil des im Stängel nachgewiesenen  $^{14}\text{C}$  auf dem Weg zu einem der Sink-Pole ist. Da der Tabakstängel stark verholzt, ist es wahrscheinlich, dass ein nicht unbedeutender Anteil der Assimilate auch für das sekundäre Dickenwachstum und die Holzbildung im Xylem verwendet wird.

#### **Die Allokation der Assimilate in die Wurzel und in den Spross sind bei beiden Anzuchtvarianten gleich – der Export und die Verteilung auf Stängel und Blätter sind dagegen unterschiedlich.**

Die Verteilung der Photoassimilate aller drei untersuchten Blätter auf Wurzel und Spross sind bei den Tabakpflanzen beider Anzuchtvarianten gleich (vgl. Tab. 11 und Abb. 26). Da mit dem Assimilatimport in ein Organ auch immer dessen Biomassezuwachs verbunden ist, war dieses

Ergebnis aufgrund der gleichen Spross-Wurzel-Verhältnisse der Pflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, zu erwarten (ab dem Pflanzenalter von 28 d, vgl. Abschnitt 4.2). Im Gegensatz zur Allokation in die Wurzel und in den Spross ist die Verteilung auf Stängel und Blätter bei den beiden Anzuchtvarianten unterschiedlich: Beim Vergleich der Allokation in Internodien und Blätter wurden bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen aus allen Blättern prozentual mehr Photosynthate in die Internodien transportiert als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen (vgl. Tab. 11). Das Sink des Stängels spielt demnach beim Wachstum bei 700 ppm CO<sub>2</sub> eine größere Rolle als beim Wachstum bei 360 ppm. Dies zeigt sich auch im höheren Stängel-Blätter-Verhältnis der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen ab einem Alter von 42 d (vgl. Abb. 21 A).

Der Anteil der aus dem markierten Blatt exportierten Assimilate ist bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen besonders beim Source-Blatt (Blatt 10), aber auch beim Sink-Blatt (Blatt 20) höher als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden (vgl. Tab. 11). Dieses Ergebnis zeigt einerseits, dass die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> vermehrt gebildeten Assimilate den Bedarf der untersuchten Blätter überstieg, andererseits aber noch keine Feedback-Hemmung durch Überfrachtung der Sinks der Pflanze deutlich wird. Unter diesen Bedingungen können die bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration vermehrt exportierten Photosynthate zur Verstärkung des Wachstums der ganzen Pflanze beitragen. Eine Steigerung des Kohlenhydrattransports aus einem Source-Blatt von Hoch-CO<sub>2</sub>-Tomatenpflanzen ist ebenfalls beschrieben worden (Behboudian und Robert, 1995).

Außerdem trägt der Wachstumsvorsprung von etwa 2 d bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration (vgl. Abschnitt 4.2) möglicherweise einen Teil zum höheren Export insbesondere aus Blatt 20 bei. Denn durch diesen Vorsprung sind die Blätter der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen um etwa 2 d älter als die Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> kultiviert wurden, und werden damit bezüglich des Pflanzenalters etwas früher zu einem Source-Blatt.

#### **Source-Blätter versorgen nächst gelegene Sinks.**

Bei Untersuchungen mit der großen Brennnessel wurde gezeigt, dass die oberen Source-Blätter den Spross-Apex und die jüngsten wachsenden Blätter mit Assimilaten versorgen, während die Assimilate der unteren Blätter in die Wurzel transportiert werden (Fetene et al., 1993). Bei Jutepflanzen beliefern die mittleren Blätter zudem bevorzugt den Stängel mit Kohlenhydraten (Palit, 1985). Werden beim Tabak die Relativen Sink-Stärken des Sprosses oberhalb der drei untersuchten Blätter betrachtet, scheinen die Präferenzen gerade umgekehrt zu sein: Die Relative Sink-Stärke des Sprosses oberhalb des markierten Blattes ist bei Blatt 10 deutlich höher als bei Blatt 20 (vgl. Abb. 27 A). Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen mit anderen Pflanzen ist zum Teil durch die verhältnismäßig große Sink-Stärke des Stängels zu erklären. Außerdem hängt die Sink-Stärke eines Organs der Tabakpflanze nicht nur von seinem

Entwicklungsstadium und seiner relativen Lage zum untersuchten Source-Blatt ab, sondern zu einem großen Teil auch von seiner Biomasse (vgl. Abb. 27 B).

Interessant ist, dass auch aus Blatt 20 etwa ein Viertel der exportierten Assimilate in die Wurzel und ein weiterer großer Teil, besonders bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen, in darunter liegende Blätter gelangen (vgl. Tab. 11). Das Gleiche gilt auch für Blatt 15 (vgl. Abb. 26). Allgemein wird davon ausgegangen, dass Source-Blätter nur bei extremen Bedingungen Assimilate importieren (Wardlaw, 1990). Jedoch wurde auch bei Tomate gezeigt, dass Source-Blätter Assimilate aus darüber liegenden Blättern importieren und Assimilate von den obersten Blättern in die Wurzel transportiert werden. Behboudian und Robert (1995) vermuteten, dass diese Eigenart möglicherweise mit dem bikollateralen Leitbündelsystem zusammen hängt.

#### **4.4 Phytohormone**

Bei der Anpassung des Pflanzenwachstums an die Umweltbedingungen spielen Phytohormone, insbesondere Auxine und Cytokinine, eine ausschlaggebende Rolle (Beck, 1999). Cytokinine werden vorwiegend in der Wurzel gebildet und als Wachstumssignal mit dem Xylemstrom in den Spross transportiert, wo sie die Zellteilung fördern und der Seneszenz entgegenwirken. Die in den Sprossspitzen gebildeten und basipetal transportierten Auxine fördern zusammen mit den Cytokinin die Zellteilung und sind verantwortlich für die Zellstreckung (Moore, 1989).

Um Erkenntnisse über die Rollen dieser beiden Phytohormongruppen bei der Wachstumsregulation der Tabakpflanzen zu gewinnen, wurden ihre Gehalte und ihre Verteilung in der Pflanze während der Phase der anhaltend gesteigerten absoluten Biomasseproduktion untersucht. Damit sollte insbesondere Aufschluss darüber erhalten werden, ob sich das verstärkte Wachstum der Pflanzen, die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden, auch in ihrem Phytohormonhaushalt widerspiegelt. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Untersuchung der Cytokinine gelegt, da diese Gruppe von Phytohormonen besonders empfindlich den Ernährungszustand der Pflanzen reflektiert (Wagner und Beck, 1993; Takei et al., 2001b). Zusätzlich wurden auch die Konzentrationen und Gehalte der freien Indol-3-essigsäure (IES) in den Pflanzenorganen untersucht.

##### **4.4.1 Cytokinine**

###### **Cytokininhaushalt der Tabakpflanze**

Cytokinine sind wahrscheinlich in allen lebenden Zellen höherer Pflanzen enthalten (Letham, 1994). Allerdings unterscheiden sich die verschiedenen Organe einer Pflanze deutlich in ihren Cytokininmustern und -konzentrationen (Wagner und Beck, 1993), was auch mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden kann. Phytohormone wirken allgemein konzentrationsabhängig, wobei sich die Sensitivität mit dem Alter der Pflanze bzw. des Pflanzenorgans ändern kann (Bradford und Trewavas, 1994).



Die höchsten Cytokininkonzentrationen wurden erwartungsgemäß in den Apizes und in den Sink-Blättern der Tabakpflanzen gefunden (vgl. Abb. 28 bis Abb. 32, Tab. 19). Dies kann auf den großen Anteil an meristematischen Zellen im Apex und den Sink-Blättern zurückgeführt werden, deren Teilungsaktivität durch hohe Cytokininkonzentrationen aufrecht erhalten wird (Jaquard et al., 1994). Die Herkunft der Cytokinine in diesen Pflanzenteilen ist allerdings noch unklar: Sie stammen wahrscheinlich zu einem gewissen Teil aus der Wurzel und gelangen mit dem Xylemstrom und schließlich durch Zell-zu-Zell-Transport in die Sprossmeristeme. Es gibt aber kaum mehr Zweifel, dass auch in den Meristemen des Sprosses Cytokinine synthetisiert werden können (Letham, 1994). In den übrigen Organen, in denen der Großteil des Gewebes ausdifferenziert ist, liegen die Cytokininkonzentrationen erheblich niedriger. Vergleicht man jedoch die Cytokiningehalte, so liegen aufgrund der höheren Biomasse dieser übrigen Organe dort mehr Cytokinine vor als im Apex und in den Sink-Blättern. (vgl. Abb. 28 bis Abb. 32, Tab. 19). Die Cytokinine in den ausgewachsenen Pflanzenteilen sollten im wesentlichen aus dem Xylemsaft vermittelten Import aus der Wurzel stammen, denn von sich nicht mehr teilenden Zellen ist nicht bekannt, dass sie zur eigenen Cytokininbiosynthese fähig wären. Es gibt aber Hinweise, dass ausgewachsene Blätter Cytokinine, die mit dem Xylemsaft antransportiert werden, metabolisieren können (Liegl, 1993).

Ob dies auch für die älteren Bereiche der Wurzel gilt, ist nicht bekannt. Als Hauptsyntheseort der Cytokinine gelten die wachsenden Wurzelspitzen, also die Wurzelmeristeme, welche die Cytokinine in das Leitbündel abgeben. In den Wurzelspitzen werden auch deutlich höhere Cytokininkonzentrationen gefunden als in den übrigen Teilen der Wurzel (Letham, 1994). Da die Wurzelspitzen jedoch nur einen geringen Anteil am Gewicht der gesamten Wurzel ausmachen, sind die Konzentrationen im meristematischen Wurzelgewebe wahrscheinlich sehr viel höher als die in der Gesamtwurzel gemessenen Cytokininkonzentrationen (vgl. Abb. 32).

Die Cytokinine werden im Xylemsaft aus der Wurzel in den Spross transportiert (Liegl, 1993; Beck und Wagner, 1994; Takei et al., 2001b). Damit ist die Verteilung der Cytokinine auch abhängig von der Transpiration. Die Source-Blätter transpirieren deutlich mehr als die wachsenden Gewebe des Sprosses und erhalten damit wahrscheinlich auch mehr Cytokinine über den Xylemsaftstrom. Darauf ist ihr im Vergleich zu den Sink-Geweben deutlich höherer Cytokininhalt zurückzuführen. Die Konzentration in den Source-Blättern ist allerdings aufgrund ihrer größeren Biomasse deutlich niedriger. Es stellt sich die Frage nach der Funktion der Cytokinine in den Source-Blättern. Cytokinine stimulieren nicht nur die Zellteilung, sie haben auch eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Photosynthese und wirken der Seneszenz entgegen (Mok, 1994). Vermutlich sind für diese Aufgaben geringere Cytokininkonzentrationen notwendig als für die Zellteilung. Cytokinine werden möglicherweise in den Source-Blättern metabolisiert, ins Phloem geladen und so zu den Spross-Sinks transportiert. Dieser Aspekt wird weiter unten genauer diskutiert. Darüber hinaus dienen Source-Blätter möglicherweise auch als

Cytokininspeicher. Dafür würde der zu beobachtende Anstieg der Cytokininkonzentration in den Source-Blättern älterer Pflanzen sprechen.

Im Stängel bleiben die Cytokininkonzentrationen hoch, solange die Streckung der Sprossachse anhält (vgl. Abb. 31). Aufgrund des sekundären Dickenwachstums bleiben im Stängel jedoch immer Zellen teilungsaktiv. Hierauf ist möglicherweise die verhältnismäßig geringe Abnahme der Cytokininkonzentration mit dem Alter zurückzuführen. Der Cytokininesamtgehalt des Stängels steigt aufgrund seiner Biomassezunahme mit dem Alter ebenso wie jener der Wurzel und des Source-Blattes stark an. Es muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass die Cytokinine im Stängel die in den Leitbahnen transportierten Cytokinine einschließen.

### **Das Cytokininmuster im Xylemsaft ändert sich auf dem Transportweg von der Wurzel zum Source-Blatt.**

Zur Untersuchung des Cytokinintransports wurde Xylemsaft 35 d alter Tabakpflanzen an zwei Stellen entnommen: aus dem Stängel über Blatt 4 (Xylemsaft an der Sprossbasis) und aus dem Blattstiel des Source-Blattes (Xylemsaft am Source-Blattstiel). Die beiden Xylemsäfte unterscheiden sich deutlich in den Cytokininmustern (vgl. Abb. 34). Während im Xylemsaft an der Sprossbasis ZR und IPA überwiegen, dominiert im Saft am Stiel des Source-Blattes allein ZR.

Ähnlich unterschiedliche Cytokininmuster wurden auch bei *Rizinus communis* festgestellt. Im Wurzeldruckexsudat dominierten Cytokinine der IP-Familie deutlich, während im Xylemsaft, der aus der Mittelrippe eines Blattes gewonnen wurde, die Cytokinine der Z-Familie überwogen (Liegl, 1993). Daraus und aus den Cytokininmustern im Phloemsaft wurde auf einen Austausch zwischen Xylem und Phloem geschlossen, der im Blatt stattfindet und mit metabolischer Umwandlung der Cytokinine verbunden sein kann (Beck, 1999). Auch bei Baumwollpflanzen konnte eine Dominanz der Cytokinine der Z-Familie im Xylemsaft, der am Blattstiel entnommen wurde, festgestellt werden (Yong et al., 2000). Im Wurzeldruckexsudat von blühenden Brennnesseln waren Cytokinine der Z- und IP-Familie zu gleichen Anteilen nachweisbar (Fußeder et al., 1988), während im Exsudat vegetativ wachsender Pflanzen ZR deutlich dominierte (Wagner und Beck, 1993). Dieser Unterschied wurde von Wagner und Beck (1993) auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Brennnesselpflanzen zurückgeführt.

Auffällig ist, dass sowohl bei Tabak- als auch bei Rizinuspflanzen im Xylemsaft am Blattstiel Cytokinine der Z-Familie überwiegen, während im Xylemsaft an der Stängelbasis des Tabaks jene der Z- und IP-Familie in denselben Größenordnungen vorkommen und bei Rizinus die Vertreter der IP-Familie dominieren (vgl. Abb. 34; Liegl, 1993). Aufgrund dieser Beobachtungen muss angenommen werden, dass das Cytokininmuster im Xylemsaft auf ihrem Transport von der Wurzel zu den Sprossorganen verändert wird. Dies kann zum einen durch eine selektive Entnahme der Cytokinine aus dem Xylemsaft und/oder eine selektive Rückbeladung in den Xylemsaft verursacht werden. Meist werden mit der Modifikation des Cytokinin-

musters im Xylemsaft auch Umwandlungsprozesse in den Blättern in Verbindung gebracht (Beck, 1999; Takei et al., 2001a). Die Möglichkeit der schnellen Umwandlung der Cytokinine ineinander in den Pflanzegeweben ist seit langem bekannt, auch wenn ihre Regulation und Funktion noch weitgehend ungeklärt ist (Mok und Mok, 2001).

### **Cytokinine werden in allen Sprossorganen metabolisiert und wahrscheinlich auch synthetisiert.**

Die große Vielfalt an endogenen Cytokininmolekülen rührt von der Vielzahl an Umwandlungsprozessen her, denen Cytokininmoleküle unterliegen können (vgl. Abb. 1). Am Anfang des Cytokininmetabolismus stehen die Cytokinin-Nukleotide, insbesondere IPN (Mok und Mok, 2001). Das Vorkommen der Nukleotide galt bereits vor der Identifizierung der *ipt*-Gene in Pflanzen (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001a) als möglicher Indikator für die Cytokininbiosynthese in diesen Pflanzenteilen, da IPN das direkte Produkt der bereits seit längerem bekannten Isopentenyltransferase (IPT) in Bakterien ist und IPT-Aktivität in Pflanzenextrakten nachgewiesen werden konnte (Letham und Palni, 1983). Da bisher weder die Regulation des Cytokininmetabolismus noch die Funktionen der Cytokinine im Einzelnen bekannt sind, können Konzentrationen einzelner Cytokinine kaum physiologisch interpretiert werden (Mok und Mok, 2001). Unterschiede der Cytokininmuster zwischen Organen können aber Hinweise auf deren mögliche metabolische und synthetische Aktivität und auf die Funktion der Cytokinine in diesen Pflanzenteilen geben.

#### *Cytokinine in der Wurzel*

Das Cytokininmuster der Wurzel 35 d alter Tabakpflanzen unterscheidet sich deutlich vom Muster des Xylemsafts an der Sprossbasis (vgl. Abb. 35). In der Wurzel dominieren ZR und ZN, während im Saft zum Spross IPA ähnliche Konzentrationen erreicht wie ZR. Eine Ursache dafür kann eine selektive Beladung des Xylems mit Cytokininmolekülen in der Wurzel sein. Darauf deutet das Vorkommen von IP und Glukosiden in der Wurzel hin, die im Xylemsaft nicht nachgewiesen werden konnten. Die Nukleotide kommen in den Wurzeln in ähnlichen Konzentrationen vor wie die „aktiven“ Cytokinine (vgl. Abb. 32), was für die Vorstellung von der Wurzel als Hauptsyntheseort der Cytokinine spricht.

#### *Cytokinine im Source-Blatt*

Im Source-Blatt der Tabakpflanzen überwiegt keines der „aktiven“ Cytokinine. Damit unterscheidet sich sein Muster deutlich von dem von ZR dominierten Muster des Xylemsafts, der am Stiel des Source-Blattes entnommen wurde (vgl. Abb. 35). Auch bei Baumwolle wurden deutliche Unterschiede der Cytokininmuster zwischen antransportiertem Xylemsaft und Blattgewebe gefunden (Yong et al., 2000). Eine selektive Entladung der Cytokinine aus dem Xylemsaft ins Source-Blatt scheint daher möglich. Die deutlich verschiedenen Cytokininmuster und das Vorkommen von Glukosiden und IP im Source-Blatt (vgl. Abb. 30) lassen außerdem auf

Umwandlungsprozesse im Source-Blatt schließen. Die Nukleotide im Source-Blatt, insbesondere IPN, erreichen die Konzentrationen der aktiven Cytokinine. Dies spricht zunächst für eine Biosyntheseaktivität in Source-Blättern, da ein Stoffwechselweg von den Ribosiden-Formen und den freien Basen zurück zu den Nukleotiden nicht bekannt ist (vgl. auch Abb. 1) und scheint damit der Annahme zu widersprechen, dass ausdifferenzierte Zellen nicht befähigt sind, Cytokinine zu synthetisieren. Zum einen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass undifferenzierte Zellen im Source-Blatt für die Biosyntheseaktivität verantwortlich sind, und zum anderen wird IPN mit dem Xylemsaft angeliefert.

#### *Cytokinine im Stängel*

Das Cytokininmuster des Stängels ähnelt mit seiner Dominanz von ZR und ZN jenem der Wurzel. Da zusammen mit den Cytokinin des Stängels auch die im Xylemsaft transportierten mitgemessen wurden, muss man davon ausgehen, dass das eigentliche Cytokininmuster des Stängels durch das des Xylemsafts etwas überlagert wurde. Allerdings zeigt der Vergleich der Konzentrationen, dass der Beitrag des Xylemsafts zu den Cytokinin des Stängels nicht besonders hoch sein kann. Des weiteren muss beachtet werden, dass die Cytokinin-konzentration des Xylemsafts mit zunehmender Entfernung von der Wurzel geringer wird, wie der Vergleich zwischen den an der Sprossbasis und am Blattstiel des Source-Blattes entnommenen Xylemsaftproben zeigt (vgl. Abb. 34).

Auffallend hoch sind die Anteile der Nukleotide in den Stängeln aller Altersstufen (vgl. Abb. 31). Dies könnte auf Cytokininsynthese auch im Stängelgewebe hindeuten. In Frage kommen hierfür Wachstumszonen zumindest der jüngeren Internodien. Diese Interpretation steht im Einklang mit der Feststellung, dass die Cytokininkonzentrationen abnehmen, wenn im Alter von 42 d das Längenwachstum des Stängels abgeschlossen wird. Das Vorkommen von Glukosiden und IP im Stängel zeigt, dass auch hier Cytokinine metabolisiert werden.

#### *Cytokinine im Apex*

Das Cytokininmuster des Apex entspricht weitgehend dem Muster der Xylemsaftprobe aus dem Blattstiel des Source-Blattes (vgl. Abb. 35). Die Ähnlichkeit der Cytokininmuster könnte auf die Cytokininversorgung des Apex aus dem Xylemsaft hinweisen. Sicherlich spielt jedoch auch die Anlieferung von Cytokinin im Phloem eine wichtige Rolle (vgl. Liegl, 1993). Da die meristematischen Zellen noch keinen Kontakt zu den Leitbündeln haben, können exogene Cytokinine nur auf dem zellulären Weg antransportiert werden. Das Vorkommen von IP deutet darauf hin, dass im Apex metabolische Prozesse stattfinden. Auffällig sind die geringen Konzentrationen der Nukleotide. Dies könnte bedeuten, dass im Sprossmeristem keine Cytokininsynthese stattfindet, was aber vom Verständnis der Biochemie des Zellzyklus her kaum möglich ist, oder aber, dass im Meristem ein besonders schneller Umsatz der Nukleotide deren Spiegel niedrig hält. Im Apex waren keine Glukoside der Cytokinine nachweisbar, was durch die Teilungsaktivität des Gewebes erklärt werden kann. Besonders auffallend ist die

Dominanz der Cytokinine der Z-Familie in den Apizes aller untersuchten Altersstufen (vgl. Abb. 28), was den von Dewitte et al. (1999) gewonnenen Ergebnissen über die direkte Förderung der Zellteilung durch Cytokinine der Z-Familie im Apexmeristem von Tabakpflanzen entspricht.

#### *Cytokinine in den Sink-Blättern*

Die Cytokininmuster der Sink-Blätter 35 d alter Tabakpflanzen unterscheiden sich durch den auffallend hohen Anteil an Cytokinin der DHZ-Familie deutlich von allen anderen Mustern (vgl. Abb. 35). Insbesondere die Konzentration der freien Base Z wird bei weitem von derjenigen des DHZ übertroffen, welches in den übrigen Organen der Pflanze eine eher untergeordnete Rolle spielt. Eine spezifische Rolle des freien DHZ ebenso wie der anderen Vertreter der DHZ-Familie, die von der Cytokininoxidase kaum abgebaut werden, ist bislang nicht bekannt. Abgesehen von diesen Cytokinin überwiegt in den Sink-Blättern ebenso wie im Apex ZR, was wahrscheinlich mit der meristematischen Aktivität in diesen beiden wachsenden Pflanzenteilen zusammen hängt. Nukleotide kommen in den Sink-Blättern in höheren Anteilen vor als in den Apizes. Dies könnte in Umkehrung der Argumentation beim Apex auf einen langsameren Metabolismus als im Apex hinweisen. Mit dem Pflanzenalter sinkt der Anteil der Cytokinine der DHZ-Familie am Gesamt-Cytokingehalt und der Anteil der Vertreter der Z-Familie steigt auffallend.

Zusammenfassend kann aus dem Vergleich der Cytokininmuster geschlossen werden, dass in allen Organen der Tabakpflanzen Cytokinine metabolisiert und zumindest in geringem Umfang auch synthetisiert werden können. Diese Interpretation stellt eine grundlegende Erweiterung des derzeitigen Bildes vom Cytokininhaushalt der Höheren Pflanzen dar, in dem die Cytokinbiosynthese fast ausschließlich der Wurzel zugeschrieben wurde.

#### **Die Cytokinin-Massenflussraten unterscheiden sich kaum bei den Pflanzen der beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten**

Anhand des Cytokingehalts in der Wurzel bzw. im Source-Blatt und der Massenflussrate der Cytokinine von der Wurzel in den Spross bzw. vom Stängel ins Source-Blatt kann unter der Annahme eines Fließgleichgewichts die *turnover*-Zeit der Cytokinin-Pools in der Wurzel bzw. im Source-Blatt abgeschätzt werden. Da die Wurzeln Cytokinine möglicherweise selektiv ins Xylem laden und die Cytokinine im Source-Blatt metabolisiert werden, können diese Berechnungen nur ein grober Anhaltspunkt für die *turnover*-Zeiten der Cytokinin-Pools sein. Außerdem wurden für die Berechnungen nur die xylemmobilen Cytokinine herangezogen.

Die bei Untersuchungen mit Brennnesseln beobachtete Abhängigkeit der Cytokininkonzentration im Xylemsaft von der Transpiration und damit von der Tageszeit (Beck und Wagner, 1994) kann für Tabak nicht ausgeschlossen werden. Beck und Wagner (1994) schlossen aus ihren Ergebnissen auf konstante Biosynthese- und Xylembeladungsraten aber unterschiedliche

Flussraten in der Wurzel. Sie nahmen eine Akkumulation der Cytokinine im Xylem durch geringe Transpiration während der Dunkelphase und einen Abtransport mit dem Beginn der Transpiration in der Lichtphase an. Ab der Mitte der Lichtphase sind bei Brennesseln die Biosyntheserate und der Export der Cytokinine aus der Wurzel in den Spross im Gleichgewicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Xylemsäfte in der Mitte der Lichtphasen gewonnen, so dass unter der Annahme eines ähnlichen Tagesganges wie bei Brennesseln auch bei den Tabakpflanzen Cytokininsynthese und Export aus der Wurzel im Gleichgewicht sein sollten.

Die *turnover*-Zeiten des Cytokinin-Pools in Tabakwurzeln liegen im Stundenbereich (zwischen 0,8 und 2,3 h; vgl. Tab. 22). Sie sind für die Cytokinine der Z-Familie etwa doppelt so hoch wie für jene der DHZ- und IP-Familie und bei den 35 d alten Pflanzen beider CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten sehr ähnlich. Zwar konnten in der Literatur keine Vergleichswerte gefunden werden, aber Yong et al. (2000) schätzten die Transportrate der Cytokinine aus den Wurzeln von Baumwollpflanzen ab, die bei 360 ppm und bei 720 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren, und kamen dabei zu ähnlichen Ergebnissen.

#### **Die *turnover*-Zeiten der Cytokinin-Pools in den Source-Blättern unterscheiden sich bei den Pflanzen der beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten.**

Die *turnover*-Zeit der Cytokinin-Pools in einem Baumwollblatt wurde von Yong et al. (2000) mit 2 bis 3 h berechnet. Sie war bei ausreichender Stickstoffernährung unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Pflanzenanzucht. Im Source-Blatt der Tabakpflanze lagen die Zeiten (mit Ausnahme des etwas langsameren IP-Pools bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen) zwischen 1 und 4,4 h und damit in der gleichen Größenordnung wie in den Baumwollblättern (vgl. Tab. 23). Aber der Umsatz der Cytokinin-Pools im Source-Blatt der Tabakpflanzen war im Gegensatz zum Baumwollblatt von der angebotenen CO<sub>2</sub>-Konzentration abhängig. Die Source-Blätter der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen setzten die Pools der drei Cytokininfamilien langsamer um als die Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Dieser Unterschied kann sowohl von einer höheren Cytokinin-Biosyntheseaktivität als auch einer geringeren Abbauaktivität in den Source-Blättern der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen herrühren. Durch die geringere *turnover*-Zeit kann jedenfalls bei gleichen Massenflussraten ins Source-Blatt bei beiden Anzuchtvarianten im größeren Blatt der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanze dieselbe Cytokininkonzentration erreicht werden wie im kleineren Blatt der Pflanze, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchs. Worauf der langsamere Umsatz der Cytokinin-Pools im Source-Blatt der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

#### **Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration bei der Anzucht auf die Cytokininkonzentrationen in den einzelnen Organen der Tabakpflanzen**

Die Cytokininkonzentration in den meisten Organen der Tabakpflanzen zeigten bei den optimierten Anzuchtbedingungen keine Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der

Anzucht (vgl. Abb. 28 und Abb. 32), obwohl die absolute Biomassezunahme der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen während des gesamten vegetativen Wachstums und darüber hinaus signifikant höher ist als bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen (Abb. 18). Die Cytokininkonzentration korreliert demnach nicht mit der absoluten Biomasseproduktion sondern offensichtlich mit der Relativen Wuchsrate, die ebenso wie die Cytokininkonzentration ab dem Pflanzenalter von 28 d bei beiden Anzuchtvarianten gleich hoch ist (vgl. Abb. 19). In einer bestimmten Biomasse bewirkt damit eine bestimmte Cytokininkonzentration eine bestimmte Biomasseproduktion. Diese Interpretation stimmt mit der Vorstellung überein, dass Phytohormone konzentrationsabhängig wirken (Bradford und Trewavas, 1994). Auch bei ausreichend ernährten Baumwollpflanzen hatte die CO<sub>2</sub>-Konzentration keinen Einfluss auf die Cytokininkonzentration in den Blättern (Yong et al., 2000).

Lediglich die Cytokininkonzentrationen der Apizes 35 d und 42 d alter und des Source-Blattes 28 d alter Pflanzen unterscheiden sich bei den beiden Anzuchtvarianten (vgl. Abb. 28 und Abb. 31). Die höheren Konzentrationen der „aktiven“ Cytokinine der Z-Familie in den Apizes der 35 d und 42 d alten Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen könnten im zweitägigen Wachstums- und Entwicklungsvorsprung und einer entsprechend früheren Umdifferenzierung des Apex hin zur Blütenbildung liegen.

Beim Übergang vom vegetativen zum generativen Wachstum, der bei den in dieser Arbeit angezogenen Tabakpflanzen wahrscheinlich zwischen dem Alter von 35 d und 42 d bereits einsetzt, ändern sich die Konzentrationen der Cytokinine insbesondere im Apex, woraus auf eine Funktion der Cytokinine bei der Blühinduktion geschlossen wird (vgl. Bernier et al., 1990; Dewitte et al., 1999).

Die im Vergleich zu den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen, deutlich höhere Cytokininkonzentration im Source-Blatt der 28 d alten Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen kann zumindest zum Teil durch die wahrscheinlich noch höhere Wachstumsaktivität dieses Blattes bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration erklärt werden. Darauf weist das Cytokininmuster hin, das in diesen Source-Blättern mit der Dominanz der Cytokinine der DHZ-Familie eher dem Muster in den Sink-Blättern ähnelt als jenem der übrigen Source-Blätter.

Die in dieser Arbeit gefundene Unabhängigkeit der Cytokininkonzentrationen der in 15 l-Töpfen angezogenen Tabakpflanzen von der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht und die erhöhten Cytokininkonzentrationen im Apex und im Source-Blatt unterscheiden sich grundlegend von den Ergebnissen, die bei 42 d alten Tabakpflanzen, die in 1 l-Töpfen oder hydroponischer Kultur angezogen worden waren, gewonnen wurden (Beck, 1999). Dort wurden bei den Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen generell niedrigere Cytokininkonzentrationen gefunden als bei den Pflanzen, die bei 350 ppm CO<sub>2</sub> gewachsen waren. Während bei der hydroponischen Anzucht der schnellere Entwicklungsverlauf bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration als Hauptursache dafür gesehen wurde, wurde bei den 1 l-Sandkulturen Nährsalzmangel durch Wurzelraumlimitierung für die

niedrigeren Cytokininkonzentrationen verantwortlich gemacht (Beck, 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern wichtige Hinweise auf den Einfluss des zur Verfügung stehenden Wurzelraumes auf das Wurzelwachstum und damit auf die Nährsalzversorgung und den Cytokininhaushalt der Tabakpflanzen (vgl. Abschnitt 1).

Da Cytokinine in den teilungsaktiven Geweben und da vor allem in den Wurzelspitzen gebildet werden (Letham, 1994), hemmt ein geringeres Wurzelwachstum nicht nur die Nährsalzaufnahme, sondern auch die Cytokininsynthese. Zusätzlich werden bei geringer Nährsalzaufnahme auch weniger Cytokinine gebildet, da die Cytokininsynthese vom Nährstoff- insbesondere vom Stickstoffstatus der Wurzel abhängt (Beck, 1999; Takei et al., 2001b). Dies zeigt sich beim Vergleich des Wachstums und der Cytokininkonzentrationen der Tabakpflanzen, die im 1 l- bzw. im 15 l-Topf angezogen wurden. Die Biomassen und die Cytokininkonzentrationen der 15 l-Topf-Pflanzen sind bei beiden Anzuchtsvarianten deutlich höher als jene der 1 l-Topf-Pflanzen, da im 15 l-Topf das Wurzelwachstum nicht beschränkt wird und so für ein maximales Wachstum bei beiden CO<sub>2</sub>-Varianten ausreichend Nährsalze aufgenommen und Cytokinine produziert werden können.

### **Der Einfluss des Substrats auf das Wachstum der Pflanzen**

Das Wurzelwachstum der hydroponisch angezogenen Pflanzen sollte naturgemäß nicht durch das Wurzelraumvolumen beschränkt werden, so dass ausreichend Nährsalze für ein maximales Wachstum aufgenommen werden sollten. Dennoch waren die in früheren Arbeiten ermittelten Biomassen und Cytokininkonzentrationen der hydroponisch angezogenen Pflanzen bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen während der Anzucht deutlich niedriger als bei den Pflanzen, die in der 15 l-Sandkultur wuchsen. Der Grund dafür hängt offensichtlich mit der Wurzelgröße zusammen: Bei hydroponisch angezogenen Pflanzen ist das Wurzelsystem im Verhältnis zum Spross immer kleiner als bei der Anzucht in einem festen Wurzelbett (Walch-Liu, 1998). Diese kleinere Wurzel, die an sich für eine ausreichende Versorgung der Pflanze mit Nährsalzen spricht, produziert offenbar weniger Cytokinine als das größere Wurzelsystem der Pflanzen in Sandkultur. Demnach ist neben der Nährsalzversorgung auch die Beschaffenheit des Wurzelbettes ein Faktor, der die Cytokininsynthese und damit die Cytokininkonzentrationen in der Pflanzen und somit wiederum ihr Wachstum beeinflusst. Ein Faktor, der dabei nicht außer Acht gelassen werden sollte, sind die feinen Verletzungen, die an den Wurzeln bzw. Wurzelhaaren beim Durchdringen fester Substrate entstehen, und die die Cytokininsynthese ebenfalls stimulieren.

Aus der anhaltend höheren Biomasseproduktion der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen in 15 l-Sandkultur bei gleichem Spross-Wurzel-Verhältnis wie bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen, ist demnach zu schließen, dass ausreichendes Wurzelraumvolumen eine optimale Nährsalzaufnahme und im Zusammenhang mit dem festen Substrat eine optimale Cytokininsynthese



ermöglicht. Beides, die Versorgung mit Nährsalzen und mit Cytokininen, ist die Grundvoraussetzung für maximales Wachstum.

#### 4.4.2 Indol-3-essigsäure

Die gesteigerte Biomasseproduktion bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ist nur möglich, wenn auch ausreichende Konzentrationen von Indol-3-essigsäure (IES) für das Streckungswachstum der Zellen zur Verfügung stehen. Bei den in den Untersuchungen dieser Arbeit verwendeten, im 15 l-Topf angezogenen 35 d alten Tabakpflanzen sind die IES-Konzentrationen in allen Pflanzenteilen (mit Ausnahme des Stängels) unabhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht (vgl. Tab. 24). Im Stängel der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen ist die IES-Konzentration höher als in den Stängeln der Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen wurden. Dies korreliert mit der Assimilatverteilung im Spross und dem Blätter-Stängel-Verhältnis (vgl. Abb. 26 und Abb. 21 B): Bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen werden verhältnismäßig mehr Assimilate im Stängel inkorporiert als bei den Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Verursacht werden könnte die höhere IES-Konzentration im Stängel bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen durch den Entwicklungsvorsprung von etwa 2 d: Die höheren IES-Konzentrationen korrelieren mit dem stärkeren Streckungswachstum des Sprosses zum Messzeitpunkt.

Die Verhältnisse von IES- und Cytokininkonzentrationen liegen in allen Organen der Tabakpflanze dicht beieinander (vgl. Tab. 25 und Okuba et al., 1991). Sie unterscheiden sich lediglich in den Sinks der Sprossspitze und zwar in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration. In der Sprossspitze ist das Verhältnis von IES- und Cytokininkonzentration wichtig für die Ausbildung der Apikaldominanz: Eine verhältnismäßig hohe IES-Konzentration verhindert das Austreiben von Seitenknospen, während eine hohe Cytokininkonzentration das Austreiben fördert. Das bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen niedrigere IES-Cytokinin-Verhältnis weist auf eine Schwächung der Apikaldominanz bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration hin. Wiederum kann der Wachstumsvorsprung eine Erklärung für eine frühere Aufhebung der Apikaldominanz liefern, denn während der Ausbildung der Blütenknospen treiben an der Sprossspitze der Tabakpflanze gewöhnlich die Seitenknospen aus. Es ist aber auch möglich, dass bei 700 ppm CO<sub>2</sub> durch die Ausbildung von Seitenknospen zusätzliche Sinks für die vermehrt produzierten Assimilate gebildet werden.

### Resumée

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über die Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum, den Cytokinin- und Indol-3-essigsäure-Haushalt und die Assimilatverteilung beruhen auf Versuchen an Tabakpflanzen, die unter optimierten und kontrollierten Anzuchtbedingungen (Lichtintensität, Temperatur, Wurzelraumvolumen, Wasser- und Nährstoffversorgung) angezogen worden waren. Unter natürlichen Bedingungen ist das Pflanzenwachstum

jedoch durch vielfältige Restriktionen beeinträchtigt und begrenzt. Daher können die hier gewonnenen Ergebnisse nicht direkt auf Pflanzen in natürlicher Umgebung und deren Reaktion auf die steigende CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre übertragen werden. Trotzdem können die Ergebnisse dieser Arbeit helfen, eine Antwort auf die Frage zu finden, ob und wie die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre das Pflanzenwachstum in der Natur verändern kann.

In dieser Arbeit konnte mit Tabakpflanzen gezeigt werden, dass bei optimierten Anzuchtbedingungen, insbesondere bezüglich des Wurzelraumes, erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration zu adäquater Nährsalzaufnahme und Cytokininbiosynthese und damit zu einem anhaltend gesteigerten Wachstum führt. In der Natur sind die Lichtintensität und der Wurzelraum in der Regel nicht wachstumsbegrenzend. Dagegen wurde in der Vergangenheit oft von Wachstums-limitierung durch Nährstoffe berichtet. Aufgrund dieser Nährstofflimitierung kann nach dem von Liebig gefundenen *Gesetz des Minimums* das Pflanzenwachstum nicht durch die CO<sub>2</sub>-Konzentration beeinflusst werden. Insbesondere der am meisten benötigte Makronährstoff Stickstoff gilt oft als wachstumsbegrenzend. Anthropogener Stickstoffeintrag in die Umwelt (bspw. durch Düngung und Straßenverkehr) hat insbesondere in den Industrieländern dazu geführt, dass Stickstoff nicht mehr als limitierender Faktor für das Pflanzenwachstum gelten kann (Ferm, 1998; FAO, 2001; Hall und Matson, 2002). Diese Rolle könnten dann andere bodenbürtige Faktoren oder aber auch die atmosphärische CO<sub>2</sub>-Konzentration übernehmen.

Die Ursache für die bei vielen bisherigen Untersuchungen gefundene nur kurzzeitige (Tage) wachstumsstimulierende Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration liegt darin, dass oft nicht CO<sub>2</sub> sondern andere Faktoren, wie die Stickstoffverfügbarkeit oder das Wurzelraumvolumen, das Wachstum begrenzen (Kramer, 1981; Arp, 1991; Poorter und Navas, 2003). Die vorliegende Arbeit zeigt eindeutig, dass wenn kein anderer Faktor das Wachstum limitiert, der wachstumsstimulierende Effekt erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration über die gesamte Wachstumsperiode anhalten kann (vgl. auch Poorter und Navas, 2003).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) wurde in dieser Arbeit insbesondere auf der Ebene der Phytohormone untersucht. Da Zellteilung und Zellstreckung im wesentlichen die Stärke eines meristematischen Sinks ausmachen und beide grundsätzlich von Cytokinin und Auxin gesteuert werden, wurden diese beiden Phytohormongruppen analysiert.

Die Pflanzen wurden in Sandkultur unter kontrollierten Bedingungen angezogen und waren bereits von der Aussaat an 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> ausgesetzt. Die Source-Sink-Beziehungen wurden exemplarisch anhand der Verteilung <sup>14</sup>C-markierter Photoassimilate dreier verschiedener Blätter 42 d alter Pflanzen untersucht. 15 verschiedene Cytokinine und freie Indol-3-essigsäure (Auxin) wurden in verschiedenen Pflanzenorganen immunochemisch quantifiziert. Die Cytokinine wurden in drei verschiedenen Altern während der vegetativen Wachstumsphase analysiert; Indol-3-essigsäure ausschließlich in 35 d alten Pflanzen. Cytokininkonzentrationen wurden zusätzlich im Xylemsaft, der an der Sprossbasis bzw. am Stiel eines Source-Blattes 35 d alter Pflanzen entnommen wurde, gemessen.

Bei den gewählten optimierten Anzuchtbedingungen (Lichtintensität, Temperatur, Wasser- und Nährstoffversorgung) stellte sich das Wurzelraumvolumen von 15 l bei beiden CO<sub>2</sub>-Anzuchtvarianten über den gesamten Zeitraum des vegetativen Wachstums hinaus bis zum Messende im Alter von 61 d als nicht wachstumsbegrenzend heraus, während kleinere Topfvolumina das Pflanzenwachstum limitierten. Daher wurden die Pflanzen für die weiteren Versuche in 15 l-Töpfen angezogen.

Die Relativen Wuchsraten der Pflanzen wiesen bei beiden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bis zum Alter von 61 d zwei Maxima auf: bei der Entfaltung der Keimblätter und direkt nach dem Vereinzeln der Keimlinge in 15 l-Sandkultur. Ausschließlich in diesen beiden frühen Wachstumsphasen, die durch erhöhte Sink-Kapazität gekennzeichnet sind, steigerte die erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration die Relative Wuchsrate. Dadurch wurde ein Wachstums- und Entwicklungsvorsprung der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen um 2 d erreicht, der auch in den übrigen Phasen, mit gleichem relativem Wachstum, zu erhöhter absoluter Biomassezunahme führte. Daraus resultierte bei Pflanzen, die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> gewachsen waren, am Ende der vegetativen Wachstumsphase eine fast doppelt so hohe Biomasse wie bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> gewachsen waren.

Die erhöhte Assimilatproduktion der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen drückte sich im verstärkten Export der Photoassimilate aus den Blättern aus. Dabei wurde die Assimilatverteilung zwischen Spross und Wurzel aber nicht verändert, was sich auch im bei beiden Anzuchtvarianten gleichen Spross-Wurzel-Verhältnis widerspiegelt. Die Relative Sink-Stärke pro Biomasse des Pflanzenteils oberhalb im Vergleich zum Teil unterhalb eines mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> begasten Blattes war ebenfalls CO<sub>2</sub>-unabhängig. Die Assimilat- und Biomasseverteilung innerhalb des Sprosses

änderten sich dagegen: Bei Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen wurden relativ mehr Assimilate in die Stängelbiomasse und weniger in die Blattbiomasse eingebaut als bei Pflanzen, die bei 360 ppm CO<sub>2</sub> gewachsen waren. Der Stängel kann also als Aufnahmeort für die bei 700 ppm CO<sub>2</sub> verstärkt produzierten Assimilate dienen. Diese erhöhte Sink-Kapazität des Stängels korreliert mit einer erhöhten Relativen Wuchsrates und mit einer erhöhten Indol-3-essigsäure-Konzentration im Stängel.

Abgesehen vom Stängel hatte die CO<sub>2</sub>-Konzentration keinen Einfluss auf die Konzentration und den Gehalt der Indol-3-essigsäure in den Organen der Tabakpflanzen. Ebenso wenig unterschieden sich die Cytokininkonzentrationen und -gehalte in diesen Organen der Pflanzen, die bei 360 ppm bzw. 700 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden waren, wesentlich voneinander. Lediglich in den Apizes im Alter von 35 d und 42 d, dem Zeitraum der Blühinduktion, waren die Konzentrationen deutlich höher, was durch den genannten Entwicklungsvorsprung der Hoch-CO<sub>2</sub>-Pflanzen begründet wird. In den meisten Organen dominierten die Cytokinine der Zeatin-Familie, insbesondere die Riboside. Lediglich in den Blättern waren besonders die Cytokinine der Dihydrozeatin- (Sink-Blätter) aber auch jene der Isopentenyladenin-Familie (Source-Blätter) etwa gleich stark vertreten. Aufgrund der Unterschiede in den Cytokininmustern zwischen Organen und Xylemsäften konnte geschlossen werden, dass Cytokinine in allen Organen metabolisiert und wahrscheinlich auch synthetisiert werden.

Die deutlich höheren Biomassen und Cytokininkonzentrationen der 15 l-Topf-Tabakpflanzen im Vergleich zu den 1 l-Topf-Pflanzen vorangegangener Experimente zeigen, dass ein durch den Wurzelraum nicht begrenztes Wurzelwachstum wichtig ist für die Nährsalzaufnahme und die Cytokininproduktion und damit für ein optimales Wachstum der Pflanze. Außerdem wird die Cytokininsynthese in der Wurzel offensichtlich durch ein festes Wurzelbett stimuliert, wie ein Vergleich der Biomassen und der Cytokininkonzentrationen zwischen hydroponisch und in 15 l-Sandkultur angezogenen Pflanzen zeigt.

Diese Arbeit zeigt, dass so lange das Wurzelsystem optimal wachsen und die Pflanze adäquat mit Nährsalzen und Cytokinen versorgen kann, bei optimalen Anzuchtbedingungen die stimulierende Wirkung erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Pflanzenwachstum erhalten bleibt.

## 6 SUMMARY

The effect of the CO<sub>2</sub> concentration on the growth of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) was investigated with particular respect to phytohormones. Cytokinins and auxins were subjected to analysis, since these two groups of phytohormones control mitosis and cell elongation, which are quite basically responsible for the strength of a meristematic sink.

The plants were cultured in sand under controlled conditions and were exposed to either 360 ppm or 700 ppm CO<sub>2</sub> from sowing onwards. Their source-sink relations were exemplarily investigated by determining the distribution of radioactively labelled photoassimilates of three different leaves of 42 d old plants. Fifteen different cytokinins and free indole-3-acetic acid were quantified immunochemically in different plant organs. The cytokinins were analysed at three different ages during the vegetative growth phase, while indole-3-acetic acid was determined only once at the age of 35 d. Cytokinin concentrations were also analysed in xylem sap of 35 d old plants which was obtained at the shoot base and from the petiole of a source leaf.

Under optimised growth conditions with respect to light intensity, temperature, and water and nutrient supply, it could be shown that pot volumes of 15 l were large enough to not restrict plant development. No limitation on plant development was detectable under either of the two experimental CO<sub>2</sub> concentrations throughout the entire period of vegetative growth and beyond until the end of the measurements at 61 d, whereas smaller pots did limit growth. Further experiments were carried out with plants grown in 15 l pots.

The relative growth rates of the plants showed two maxima at each of the two experimental CO<sub>2</sub> levels during the 61 d experimental period: the first during the unfolding of the cotyledons and the second one directly after transfer of the seedlings into 15 l pots. The relative growth rates were enhanced by the higher CO<sub>2</sub> level only during these early growth phases, which are characterised by elevated sink capacities. Hence, the plants under 700 ppm CO<sub>2</sub> attained a growth rate advantage of about two days, which led to a higher absolute increase in biomass during the other phases as well, during which the relative growth rates were identical. This resulted in the biomass of plants at elevated CO<sub>2</sub> being nearly twice that of the control plants at the end of the vegetative growth.

The increased production of assimilates under 700 ppm CO<sub>2</sub> corresponded to an increased export of photoassimilates out of the leaves. The distribution of assimilates between the shoot and the root was not, however, affected by the higher export rate, which is reflected by the same shoot-root ratio under both growth conditions. The relative sink strength per unit biomass of the part of the plant above and the part below a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-labelled leaf was also independent of the CO<sub>2</sub> level. On the other hand, the distribution of assimilates and biomass varied within the shoot: in high-CO<sub>2</sub> plants a higher proportion of produced assimilates was incorporated into the stem biomass and less into the leaf biomass than in plants grown under 360 ppm CO<sub>2</sub>. The

stem can thus serve as a sink for the additional assimilates produced at 700 ppm CO<sub>2</sub>. This increased sink capacity correlates with an increased relative growth rate and an increased concentration of indol-3-acetic acid in the stem.

Apart from the stem, the CO<sub>2</sub> concentration had no influence on the concentrations and the contents of free indole-3-acetic acid found in the organs of the tobacco plants. The concentrations and contents of cytokinins did not differ significantly either in the organs of the plants grown at 360 ppm and 700 ppm CO<sub>2</sub>. Only in the apices at the age of 35 d and 42 d, the period of flowering induction, were the cytokinin concentrations notably higher in the plants grown at 700 ppm CO<sub>2</sub>: this can be explained by the developmental advantage of the plants of the high-CO<sub>2</sub> plants. In most of the organs the cytokinins of the zeatin family, especially the ribosides, were dominant. Only in the leaves were cytokinins of the dihydrozeatin (sink leaves) as well as the isopentenyladenin family (source leaves) present in comparable amounts. The differences in the cytokinin patterns between the plant organs and the xylem sap led to the conclusion that cytokinins are metabolised and probably also synthesised in all of the organs.

The considerably higher biomasses and cytokinin concentrations of plants grown in 15 l pots compared to those in 1 l pots, which had been shown in previous investigations, show that root growth not restricted by the volume available for it is important for the nutrient uptake and cytokinin synthesis required for optimal plant growth. Furthermore, the synthesis of cytokinins in the root appears to be stimulated by a solid root bed, as shown by the comparison of the biomasses and the concentrations of cytokinins of plants grown in 15 l sand culture and in hydroponic culture.

The results presented here show that the stimulating effect of an increased CO<sub>2</sub> level on plant growth will be maintained as long as the root can grow optimally and consequently provide the plant with optimal supply of nutrients and cytokinins.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Arp, W.J.** (1991) Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment* **14**: 869-875
- Astot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.-H., Sandberg, G.** (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 14778-14783
- Bainbridge, G., Madgewick, T., Parmar, S., Mitchell, R., Paul, M., Pitts, J., Keys, A.J., Martin, A.J.P.** (1995) Engineering Rubisco to change its catalytic properties. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1269-1276
- Bangerth, F., Li, C.-J., Gruber, J.** (2000) Mutual interaction of auxin and cytokinins in regulating correlative dominance. *Plant Growth Regulation* **32**: 205-217
- Baxter, R., Ashenden, T.W., Farrar, J.F.** (1997) Effect of elevated CO<sub>2</sub> and nutrient status on growth, dry matter partitioning and nutrient content of *Poa alpina* var. *vivipara* L. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1477-1486
- Beck, E.** (1999) Towards an understanding of plant growth regulation: cytokinins as major signals for biomass distribution. *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*: 97-110
- Beck, E., Wagner, B.M.** (1994) Quantification of the daily cytokinin transport from the root to the shoot of *Urtica dioica* L. *Botanica Acta* **107**: 342-348
- Behboudian, M.H., Robert, L.** (1995) Partitioning of photoassimilates in <viroso> tomatoes under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Journal of Plant Physiology* **147**: 43-48
- Bernier, G., Lejeune, P., Jaquard, A., Kinet, J.-M.** (1990) Cytokinins in flower initiation. *In* Rood, S.B., ed, *Plant Growth Substances*, 1988. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona
- Bonnemain, J.-L.** (1968) Transport du <sup>14</sup>C assimilé chez les Solanacées. *Revue Général de Botanique* **75**: 576-610
- Bradford, K.J., Trewavas, A.J.** (1994) Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiology* **105**: 1029-1036
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Brouwer, A.** (1962) Nutrient influences on the distribution of the dry matter in the plant. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences* **10**: 399-408
- Chen, C.** (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum* **101**: 665-673
- Chen, C., Jin, G., Andersen, B.R., Ertl, J.R.** (1993) Modulation of plant gene expression by cytokinins. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**: 609-619
- Crozier, A., Sandberg, G., Monteiro, A.M., Sundberg, B.** (1986) The use of immunological techniques in plant hormone analysis. *In* Bopp, M., ed, *Plant Growth Substances* 1985. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York Tokyo, pp 13-21
- Dertinger, U.** (2001) Antioxidantien in *Nicotiana tabacum* mit erhöhter Glutathionreduktaseaktivität oder erhöhter seneszenzinduzierter Cytokininproduktion bei natürlicher Alterung und unter dem Einfluss von oxidativem Stress durch Fe-Ionen. Dissertation, Universität Bayreuth

- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, D., Van Onckelen, H.** (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* **119**: 111-121
- Düll, B.** (1998) Adaption der Wachstumsbedingungen von Tabak an eine Atmosphäre mit erhöhtem Kohlendioxid. Zulassungsarbeit, Universität Bayreuth
- Epstein, E.** (1972) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. Wileys, New York
- Esau, K.** (1969) Pflanzenanatomie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Estelle, M.** (2001) Transporters on the move. *Nature* **413**: 374-375
- FAO** (2001) FAO fertilizer yearbook 2001, Rome
- Ferm, M.** (1998) Atmospheric ammonia and ammonium transport in Europe and critical loads: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **51**: 5-17
- Fernández, B., Centeno, M.L., Feito, I., Sánchez-Tamés, R., Rodríguez, A.** (1995) Simultaneous analysis of cytokinins, auxins and abscisic acid by combined immunoaffinity chromatography, high performance liquid chromatography and immunoassay. *Phytochemical Analysis* **6**: 49-54
- Fetene, M., Beck, E.** (1992) Reversal of the Direction of Photosynthate Allocation in *Urtica dioica* L. Plants by Increasing Cytokinin Import into the Shoot. *Botanica Acta* **106**: 235-240
- Fetene, M., Möller, I., Beck, E.** (1993) The effect of nitrogen supply to *Urtica dioica* L. plants on the distribution of assimilate between shoot and root. *Botanica Acta* **106**: 228-238
- Fichtner, K., Quick, W.O., Schulze, E.-D., Mooney, H.A., Rodermel, S.R., Bogorad, L., Stitt, M.** (1993) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS. Relationship between photosynthetic rate, storage strategy, biomass allocation and vegetative plant growth at three different nitrogen supplies. *Planta* **190**: 1-9
- Fischer, B.U., Frehner, M., Hebeisen, T., Zanetti, S., Stadelmann, F., Lüscher, A., Hartwig, U.A., Hendrey, G.C., Blum, H., Nösberger, J.** (1997) Source-sink relations in *Lolium perenne* L. as reflected by carbohydrate concentration in leaves and pseudo-stems during regrowth in the free air carbon dioxide enrichment (FACE) experiment. *Plant, Cell and Environment* **20**: 945-952
- Fußeder, A., Wagner, B., Beck, E.** (1988) Quantification by ELISA of cytokinins in root-pressure exudates of *Urtica dioica* plants grown under different nitrogen levels. *Botanica Acta* **101**: 214-219
- Galuszka, P., Frébort, I., Saebela, M., Pec, P.** (2000) Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation* **32**: 315-327
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., Stitt, M.** (1999) The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1177-1199
- Gollan, T., Schurr, U., Schulze, E.-D.** (1992) Stomatal response to drying soils in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylemsap. *Plant, Cell and Environment*: 551-559
- Hall, A.E., Matson, P.A.** (2002) Acid rain and N deposition. Trace Gas exchange in Forest Ecosystems **3**: 279-306
- Jackson, M.B.** (1993) Are plant hormones involved in root to shoot communication? *Advances in Botanical Research* **19**: 103-187



- Jang, J.-C., Sheen, J.** (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Sciences* **2**: 208-214
- Jaquard, A., Houssa, C., Bernier, G.** (1994) Regulation of the cell cycle by cytokinins. *In* Mok, M.C., ed, Cytokinins - Chemistry, Activity, and Function. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo
- Kakimoto, T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**: 677-685
- Kramer, P.J.** (1981) Carbon dioxide concentration, photosynthesis, and dry matter production. *BioScience* **31**: 29-33
- Kruse, J., Hetzger, I., Hänsch, R., Mendel, R.-R., Walch-Liu, P., Engels, C., Rennenberg, H.** (2002) Elevated  $p\text{CO}_2$  favours nitrate reduction in the roots of wild-type tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Gat.) and significantly alters N-metabolism in transformants lacking functional nitrate reductase in the roots. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2351-2367
- Kuiper, D., Kuiper, P.J.C., Lambers, H., Schuit, J., Staal, M.** (1989) Cytokinin concentration in relation to mineral nutrition and benzyladenin treatment in *Plantago major* ssp., *pleiosperma*. *Physiologica Plantarum* **75**: 511-517
- Lauerer, M.**, ed (1996) Wachstum, Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalt von *Nicotiana tabacum* mit reduzierter Nitratreduktaseaktivität. BITÖK, Bayreuth
- Lawlor, D.W., Mitchell, A.R.C.** (1991) The effect of increasing  $\text{CO}_2$  on crop photosynthesis and productivity: a review of field studies. *Plant, Cell and Environment* **14**: 807-818
- Lee, B., Martin, P., Bangerth, F.** (1989) The effect of sucrose on the levels of abscisic acid, indoleacetic acid and zeatin/zeatin riboside in wheat ears growing in liquid culture. *Physiologica Plantarum* **77**: 73-80
- Letham, D.S.** (1978) Cytokinins. *In* Letham, D.S., Goodwin, P. B., Higgins, T. J. V., ed, Phytohormones and Related Compounds - A Comprehensive Treatise. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Letham, D.S.** (1994) Cytokinins as phytohormones: sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. *In* Mock, M.C., ed, Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp 57-80
- Letham, D.S., Palni, L.M.S.** (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **34**: 163-197
- Liegl, I.** (1993) Das Cytokininmuster im Phloemsaft und Xylemsaft von *Ricinus communis* L. Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Maclsaak, S.A., Sawhney, V.K., Pohorecky, Y.** (1989) Regulation of lateral root formation in lettuce (*Lactuca sativa*) seedling roots: Interaction effects of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid and kinetin. *Physiologia Plantarum* **77**: 287-293
- Makino, A., Mae, T.** (1999) Photosynthesis and plant growth at elevated  $\text{CO}_2$ . *Plant and Cell Physiology* **40**: 999-1006
- Marschner, H.** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto
- McConnaughay, K.D.M., Bernston, G.M., Bazzaz, F.A.** (1993) Limitations of  $\text{CO}_2$ -induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia* **94**: 550-557
- McGaw, B.A.** (1987) Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. P.J. Davis (ed.), Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development, 1987, Martinus Nijhoff Publishers, Lancaster: 76-93

- Mok, D.W.W., Mok, M.C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology* **52**: 89-118
- Mok, M.C.** (1994) Cytokinins and plant development - an overview. *In* Mok, M.C., ed, Cytokinins - Chemistry, Activity, and Function. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo
- Moore, C.T.** (1989) Auxins. *In* Moore, C.T., ed, Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer Verlag, New York, pp 28-93
- Morin, F., Andre, M., Betsche, T.** (1992) Growth kinetics, carbohydrate, and leaf phosphate content of clover (*Trifolium subterraneum* L.) after transfer to high CO<sub>2</sub> atmosphere, to high light and ambient air. *Plant Physiology* **99**: 89-95
- Neill, S.J., Horgan, R.** (1987) Abscisic acid and related compounds. *In* Rivier, C., Crozier, A., ed, Principles and Practice of Plant Hormone Analysis, Vol 1. Academic Press, London
- Okuba, H., Wada, K., Uemoto, S.** (1991) In vitro morphogenetic response and distribution of endogenous plant hormones in hypocotyl segments of snapdragon (*Antirrhinum majus*, L.). *Plant Cell Reports* **10**: 501-504
- Palit, P.** (1985) Translocation and distribution of <sup>14</sup>C-labelled assimilate associated with growth of jute (*Corchorus olitorius* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* **12**: 527-534
- Palmer, M.V., Horgan, R., Wareing, P.F.** (1981) Cytokinin metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **153**: 297-302
- Passioura, J.B.** (1980) The transport of water from soil to shoot in wheat seedlings. *Journal of Experimental Botany* **31**: 333-345
- Paul, M., Foyer, C.** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1383-1400
- Pengelly, W.L.** (1986) Validation of immunoassays. *In* Bopp, M., ed, Plant Growth Substances 1985. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp 35-43
- Peters, W., Fürchtbauer, B., Beck, E.** (1995) Nitrate reductase activity is endogenously induced by zeatin riboside in habituated suspension cultured *chenopodium rubrum* cells. *Journal of Plant Physiology* **147**: 401-407
- Poorter, H., Navas, M.-L.** (2003) Plant growth and competition at elevated CO<sub>2</sub>: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* **157**: 175-198
- Rabha, B.K., Uprety, D.C.** (1998) Effects of elevated CO<sub>2</sub> and moisture stress on *Brassica juncea*. *Photosynthetica* **34**: 597-602
- Reekie, E.D., MacDougall, G., Wong, I., Hicklenton, P.R.** (1998) Effect of sink size on growth response to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> within the genus *Brassica*. *Canadian Journal of Botany* **76**: 826-835
- Reeve, D.R., Crozier, A.** (1980) Hormonal regulation of development I. Molecular aspects of plant hormones. *In* Crozier, A., ed, Encyclopedia of plant physiology, new series, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Robbins, N.S., Pharr, D.M.** (1988) Effect of restricted root growth on carbohydrate metabolism and whole plant growth of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology* **87**: 409-413
- Sakuth, T.** (1996) Die Bedeutung der Cytokinine für Entstehung und Wachstum von *Urphora cardui* - Gallen im Stengel der Ackerdistel (*Cirsium arvense*). Dissertation, Universität Bayreuth
- Samuelson, M.E., Campbell, W.H., Larsson, C.-M.** (1995) The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in barley. *Physiologia Plantarum* **93**: 533-539

- Samuelson, M.E., Larsson, C.-M.** (1993) Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Science* **93**: 77-84
- Saralabai, V.C., Vivekananddan, M., Suresh Babu, R.** (1997) Plant response to high CO<sub>2</sub> concentration in the atmosphere. *Photosynthetica* **33**: 7-37
- Scheible, W.-R., Lauerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M., Stitt, M.** (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* **11**: 617-691
- Schneider, E.A., Wightman, F.** (1978) Auxins. In Higgins, T.J.V., ed, *Phytohormones and Related Compounds: A comprehensive Treatise*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Schulze, E.-D., Hall, A.E., Lange, O.L., Walz, H.** (1982) A portable steady-state porometer for measuring the carbon dioxide and water vapour exchanges of leaves under natural conditions. *Oecologia* **53**: 141-145
- Sicher, R.C., Kremer, D.F., Bunce, J.A.** (1995) Photosynthetic acclimation and photosynthate partitioning in soybean leaves in response to carbon dioxide enrichment. *Photosynthesis Research* **46**: 409-417
- Stitt, M.** (1991) Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14**: 741-762
- Stitt, M., Krapp, A.** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* **22**: 583-621
- Stitt, M., Schulze, E.-D.** (1994) Plant growth, storage, and resource allocation: from flux control in a metabolic chain to the whole-plant level. In Schulze, E.-D., ed, *Flux control in biological systems. From enzymes to populations and ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp 57-113
- Takei, K., Sakakibara, H., Sugiyama, T.** (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 26405-26410
- Takei, K., Sakakibara, H., Tanigucchi, M., Sugiyama, T.** (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinins species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**: 85-93
- Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaya, T., Sakakibara, H.** (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **53**: 971-977
- Thomas, J.F., Raper, D., Anderson, C.E., Downs, R.J.** (1975) Growth of young tobacco plants as affected by carbon dioxide and nutrient variables. *Agronomy Journal* **67**: 685-689
- Thomas, R.B., Strain, B.R.** (1991) Root restriction as a factor in photosynthetic acclimation of cotton seedlings grown in elevated carbon dioxide. *Plant Physiology* **96**: 627-634
- Tissue, D.T., Thomas, R.B., Strain, B.R.** (1993) Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant, Cell and Environment* **16**: 859-865
- Van der Kooij, T.A.W., De Kok, L.J., Stulen, I.** (1999) Biomass production and carbohydrate content of *Arabidopsis thaliana* at atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations from 390 to 1680 µl l<sup>-1</sup>. *Plant Biology* **1**: 482-4386
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D.** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376-387

- Wagner, B.M.** (1991) Der Cytokininhaushalt der Brennessel. Dissertation, Universität Bayreuth
- Wagner, B.M., Beck, E.** (1993) Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. *Planta* **190**: 511-518
- Walch-Liu, P., Engels, C.** (1998) Pflanzenunterschiede im Wurzelwachstum bei verscheidener N-Ernährung: N-Form-Effekt und/oder pH-Effekt? *In* Merbach, W., ed, Pflanzenernährung, Wurzelanleitung und Exsudation. 8. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes. Teubner Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Wang, T.L., Thompson, A.G., Horgan, R.** (1977) A cytokinin glucoside from the leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **135**: 285-288
- Wardlaw, I.F.** (1990) The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* **116**: 341-381
- Weiler, E.W.** (1980) Radioimmunoassays for *trans*-zeatin and related cytokinins. *Planta* **149**: 155-162
- Weiler, E.W.** (1981) Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable [<sup>125</sup>I]- and [<sup>3</sup>H]IAA derivatives as radiotracer. *Planta* **153**: 319-325
- Weiler, E.W.** (1986) Plant hormone immunoassays based on monoclonal and polyclonal antibodies. *In* Linskens, H.F., Jackson, J. F., ed, Immunology in Plant Sciences. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-17
- Weiler, E.W., Eberle, J., Mertens, R.** (1986) Immunoassays for the quantification of plant growth regulators using monoclonal antibodies. *In* Bopp, M., ed, Plant Growth Substances 1985. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp 22-25
- Weiler, E.W., Jourdan, P.S., Conrad, W.** (1981) Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta* **153**: 561-571
- Weiler, E.W., Zenk, M.H.** (1976) Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *digitalis lanata*. *Phytochemistry* **15**: 1537-1545
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **28**: 10487-10492
- Wickson, M., Thimann, K.V.** (1958) The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. *Physiologia Plantarum* **11**: 62-74
- Yong, J.W.H., Wong, S.S., Letham, D.S., Hocart, C.H., Farquhar, G.D.** (2000) Effects of elevated [CO<sub>2</sub>] and nitrogen nutrition on cytokinins in the xylem sap and leaves of cotton. *Plant Physiology* **124**: 767-779

---

## Ich **DANKE**

Herrn Prof. Dr. E. Beck für die Vergabe des interessanten Themas, seine konstruktive Kritik und den Freiraum, den er mir gewährte.

Herrn Reinhard Franke und seinen Mitarbeitern von der Zentralen Technik für die vielen Reparaturen tags und nachts.

Jörg Kastner für die gute Zusammenarbeit, das Messen vieler Cytokininproben und das Waschen so einiger Wurzeln.

Burkhardt Stumpf für seine Hilfe nicht nur bei mechanischen und technischen Problemen.

Christian für seine „kräftige“ Unterstützung bei der Pflanzenanzucht.

Gabi für ihr allzeit offenes Ohr, ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre vielen guten Worte und ihre Ruhe.

Nicole für ihr geduldiges Zulesen und Zuhören, ihre kritischen Bemerkungen und ihre Aufmunterungen.

Axel für seine Geduld, sein unerschöpfliches Vertrauen in mich und zu mir und seine Nähe.

Frank für seine Gießesätze und seine aufmunternde Art.

Birgit für ihre Hilfe bei und außerhalb der Arbeit.

Katja für das gute Miteinander, nicht nur im Labor, und ihre stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft.

Pascale und Wiltrud, die zusammen mit Gabi und Katja zum freundlichen und fruchtbaren Klima im Diplomandenzimmer beitrugen, für ihre Anregungen und Hilfen.

allen Mitgliedern des Lehrstuhls für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Toleranz und ihre Freundlichkeit.

allen Freunden für ihr Dasein.

meinen Eltern für ihre Erziehung und Unterstützung, durch die sie mir so viele Türen öffneten.

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 14. Juli 2003

*Ulrike Schaz*