



Jens Tilsner (Autor)

Aminosäuretransport in Raps unter besonderer Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums der Pflanze und der Stickstoffdüngung

Jens Tilsner

Aminosäuretransport in Raps unter besonderer Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums der Pflanze und der Stickstoffdüngung



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3133>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stickstoff als pflanzliches Nährelement	1
1.2	Assimilation von anorganischem Stickstoff	2
1.3	Ferntransport von Assimilaten und Ionen in der Pflanze	3
1.4	Anatomie des Phloems	5
1.5	Phloem-Beladungsmechanismen	5
1.6	Phloem-Entladung	7
1.7	Verlagerung von Stickstoff in der Pflanze: Source-Sink-Verhältnisse	8
1.8	Identifizierung pflanzlicher Aminosäuretransporter	9
1.9	Familien von Aminosäuretransportern in Arabidopsis	11
1.10	Die Problematik der Stickstoffnutzung bei Raps	15
1.11	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Allgemeines	17
2.2	Material	17
2.2.1	Pflanzenmaterial und Anzucht	17
2.2.2	Bakterienstämme	18
2.2.3	Häufig verwendete Nährmedien	19
2.2.4	Plasmide	20
2.3	Feldversuch zur Untersuchung der genetischen Variabilität der Stickstoffnutzung bei Winterraps	20
2.3.1	Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität (NRA)	21
2.4	Extraktion von Metaboliten aus Pflanzengeweben	23
2.4.1	Chloroform-Methanol-Extraktion von Blattgeweben	23
2.4.2	Nichtwässrige Fraktionierung	23
2.4.2.1	α -Mannosidase-Test	26
2.4.2.2	Saure Phosphatase-Test	26
2.4.2.3	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Test	27

2.4.2.4	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Test	27
2.4.3	Extraktion von Apoplastensaft	28
2.5	Metabolit-Messungen	29
2.5.1	Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren	29
2.5.2	Chromatographische Bestimmung von Zuckern	31
2.5.3	Chromatographische Bestimmung von Ionen	32
2.6	Methoden zur Isolierung von Proteinen	33
2.6.1	Isolierung von Plasmamembran-Proteinen aus Pflanzen	33
2.6.1.1	Anreicherung von Plasmamembran-Proteinen in einem Zwei-Phasen System	33
2.6.1.2	P-ATPase-Test	36
2.7	Quantitative Proteinbestimmung	37
2.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	37
2.7.2	Proteinbestimmung nach Lowry	38
2.7.3	Proteinbestimmung mit dem „D _C Protein Assay“	38
2.7.4	Chlorophyllbestimmung	39
2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	39
2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.8.2	Coomassie-Färbung	42
2.8.3	Silverstain-Färbung	42
2.8.4	KCl-Färbung und Elution von Proteinen aus präparativen SDS-Gelen	43
2.9	Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren	44
2.9.1	Isolation von RNA	44
2.9.1.1	Mini-Präparation pflanzlicher Gesamt-RNA	44
2.9.1.2	Extraktion großer Mengen pflanzlicher Gesamt-RNA	44
2.9.2	Isolation genomischer pflanzlicher DNA	45
2.9.3	Isolation bakterieller Plasmid-DNA	47
2.9.3.1	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	47
2.9.3.2	Plasmid-Maxi-Präparation aus <i>E. coli</i>	48
2.9.3.3	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
2.9.4	Ethanol-fällung von DNA oder RNA	49
2.9.5	Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA oder RNA	49
2.9.6	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	50

2.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	50
2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	50
2.10.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
2.11	Hybridisierungsmethoden	52
2.11.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („Random Priming“)	52
2.11.2	Northern Blot	53
2.12	cDNA-Synthese	56
2.13	Auf der Polymerase-Kettenreaktion basierende Methoden	56
2.13.1	Kriterien bei der Ableitung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern)	57
2.13.2	Polymerase-Kettenreaktion	59
2.13.3	Kolonie-PCR	61
2.13.4	Amplifikation von cDNA-Enden (RACE)	62
2.13.4.1	Identifizierung des Transkriptions-Endpunktes durch 3' RACE	63
2.13.4.2	Identifizierung des Transkriptions-Startpunktes durch 5'	65
	RACE	67
2.13.5	Amplifikation von Promotoren durch „Genome Walking“	67
2.13.5.1	Herstellung einer „Genome Walker Library“	70
2.13.5.2	„Genome Walking“ PCR	72
2.13.6	DNA-Sequenzierung	74
2.14	Klonierungsmethoden	74
2.14.1	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	74
2.14.2	Auffüllen von überstehenden Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle	75
2.14.3	Alkalische Phosphatase-Behandlung	75
2.14.4	Ligation von DNA	76
2.14.5	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	
2.14.5.1	Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode	76 77
2.14.5.2	Herstellung kompetenter Zellen nach Inoue <i>et al.</i> (1990)	78
2.14.6	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	79
2.14.7	Herstellung elektrokompeter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen	80
2.14.8	Elektroporation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	80
2.14.9	Bakteriendauerkultur	80
2.14.10	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	

2.15	Funktionelle Expression von Membranproteinen in <i>Xenopus</i> Oocyten	82
2.16	Nachweis der Promotoraktivität durch einen histochemischen GUS-Test	83
2.17	Immunologische Methoden	84
2.17.1	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	85
2.17.2	Western-Blot	87
2.17.3	Immunohistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten	89
2.17.3.1	Einbettung von Pflanzengewebe in Methacrylat	89
2.17.3.2	Herstellung von Dünnschnitten	90
2.17.3.3	Behandlung der Schnitte mit Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen	90
2.18	Computergestützte Analyseverfahren	91
2.18.1	Sequenzanalyse von DNA und Proteinen	91
2.18.2	Untersuchungen zur Proteinstruktur	92
2.19	Statistische Auswertung der Experimente	92
3	Ergebnisse	93
3.1	Feldversuche zur Variabilität der Stickstoffnutzung und -verteilung in <i>B. napus</i>	93
3.2	Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen	99
3.3	Aminosäurekonzentrationen im Apoplasten und Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung in den untersuchten Kompartimenten	103
3.4	Identifizierung von <i>Brassica napus</i> Aminosäuretransportern	107
3.4.1	<i>BnAAP1</i>	108
3.4.2	<i>BnAAP6</i>	109
3.4.3	<i>BnAAP2</i>	111
3.5	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Substratspezifität von BnAAP1 und BnAAP6 durch funktionelle Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten	113
3.6	Untersuchungen zur Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> in der Pflanze	117
3.6.1	Untersuchung einer <i>BnAAP6</i> -Promotor-Reporterfusion	117
3.6.2	Herstellung von BnAAP6-spezifischen polyklonalen Antikörpern	119

3.6.3	Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> in verschiedenen Blattaltersstufen	123
3.6.3.1	<i>BnAAP1</i>	123
3.6.3.2	<i>BnAAP6</i>	125
4	Diskussion	127
4.1	Variabilität der Stickstoffeffizienz bei Winterraps	127
4.2	Subzelluläre Konzentrationen und Phloembeladung von Aminosäuren in Raps	130 134
4.3	Charakterisierung von Aminosäuretransportern aus Raps	137
4.4	Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> in der Pflanze	140
4.5	Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> während der Blattentwicklung	
4.6	Möglichkeiten zur gentechnischen Verbesserung der Stickstoffeffizienz von Raps	141 146
5	Zusammenfassung	149
6	Abkürzungsverzeichnis	152
7	Literaturverzeichnis	172
8	Anhang	172
8.1	Verteilung der Markerenzyme bei der nichtwässrigen Fraktionierung	174
8.2	cDNA- und Aminosäuresequenz von <i>BnAAP1</i>	176
8.3	cDNA- und Aminosäuresequenz von <i>BnAAP6</i>	178
8.4	Nukleotidsequenz des <i>BnAAP6</i> -Promotors	180
8.5	Partielle cDNA- und Aminosäuresequenz von <i>BnAAP2</i>	181
8.6	Vektorkarten	