

**Einfluss einer temporären kalten Dunkelbehandlung auf
die Adventivwurzelbildung in Petunienstecklingen unter
Berücksichtigung des Kohlenhydratmetabolismus**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Yvonne Klopotek

geboren am 05. Oktober 1980 in Erfurt

Gutachterin/Gutachter:

1. PD Dr. Dr. Bettina Hause
2. Prof. Dr. Eckhard George
3. Prof. Dr. Klaus Humbeck

Halle (Saale), 20.09.2010

„Umwege erhöhen die Ortskenntnis...“

– Michael Fullan –

„...und wer nicht vom Weg abkommt, wird auf der Strecke bleiben.“

– Reinhard K. Sprenger –

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Petunien in der Jungpflanzenproduktion.....	1
1.2 Auswirkungen einer kalten Dunkelperiode in der Jungpflanzenproduktion	2
1.3 Vegetative Vermehrung und Adventivwurzelbildung (AWB)	4
1.3.1 Funktion von Phytohormonen in der AWB.....	4
1.3.2 Ablauf und Phaseneinteilung der AWB	7
1.3.2.1 Traditionelle Konzepte.....	7
1.3.2.2 Funktion der Wundreaktion in der AWB	9
1.3.2.3 Allgemeines 3-Phasenmodell der AWB.....	10
1.3.2.4 Phaseneinteilung der AWB in Petunienstecklingen.....	12
1.3.3 Schlüsselrolle der Kohlenhydrate in der AWB	14
1.3.3.1 Einfluss des Transports von Kohlenhydraten.....	15
1.3.3.2 Beeinflussung der Photosyntheseaktivität.....	16
1.3.3.3 Regulatorische Enzyme im Kohlenhydratstoffwechsel	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Geräte und Apparaturen	21
2.2 Chemikalien und Enzyme.....	21
2.3 Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen	22
2.4 Versuchsbedingungen	23
2.5 Probennahme von Stecklingsmaterial	24
2.6 Wurzelbonitur von Stecklingen.....	24
2.7 Bestimmung der Trockenmasse, der Blattfläche und der Stängellänge.....	25
2.8 Histologische Analysen.....	26
2.9 Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes	27
2.9.1 Prinzip der Methode.....	27
2.9.2 Probenextraktion	28
2.9.3 Bestimmung der löslichen Zucker und Stärke.....	28
2.10 Bestimmung des Gesamtstickstoff- und Kohlenstoffgehaltes.....	30
2.11 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	30

2.12 Bestimmung der Aktivitäten von ausgewählten Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels	31
2.12.1 Prinzip der Methode	31
2.12.2 Probenextraktion	31
2.12.3 Vakuoläre und cytosolische Invertasen	32
2.12.4 Glucokinase	33
2.12.5 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	34
2.12.6 Phosphofruktokinase	34
2.12.7 Cytosolische Fructose-1,6-bisphosphatase	35
2.12.8 Pyruvatkinase	35
2.13 CO₂-Gaswechselformen	35
2.13.1 Messprinzip des CO ₂ -Gaswechsels	35
2.13.2 Berechnungen	37
2.13.2.1 Netto-CO ₂ -Gaswechsel	37
2.13.2.2 Berechnung der Bilanz	38
2.13.2.3 Carbon Use Efficiency (CUE)	39
2.13.2.4 Optimums- und Sättigungskurven der Netto-CO ₂ -Gaswechselraten	40
2.14 Statistische Auswertung	41
3 ERGEBNISSE	42
3.1 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Bewurzelung von Petunienstecklingen	42
3.1.1 Einfluss einer Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung	43
3.1.2 Einfluss unterschiedlicher Lichtintensitäten und Temperaturen auf den Bewurzelungseffekt einer Dunkelbehandlung	48
3.2 Einfluss der kalten Dunkelbehandlung auf morphologische Veränderungen während der AWB in Petunienstecklingen	51
3.2.1 Morphologische Veränderungen während der AWB in unbehandelten Stecklingen	53
3.2.2 Morphologische Veränderungen während der AWB in kalt-dunkel behandelten Stecklingen	54
3.2.3 Vergleich morphologischer Veränderungen in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen	55
3.3 Einfluss der kalten Dunkelbehandlung auf Veränderungen des Kohlenhydratstatus während der AWB in Petunienstecklingen	56
3.3.1 Kohlenhydratstatus in Blättern und Stängelbasis während der AWB in unbehandelten Stecklingen	56
3.3.2 Kohlenhydratstatus in Blättern und Stängelbasis während der AWB in kalt-dunkel behandelten Stecklingen	57
3.3.3 Vergleich des Kohlenhydratstatus in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen während der Lichtphase	60
3.4 Aktivitätsbestimmung von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes während der AWB in Petunienstecklingen	66
3.4.1 Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes in unbehandelten Stecklingen	68
3.4.2 Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes in kalt-dunkel behandelten Stecklingen	69

3.4.3	Vergleich von Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen während der Lichtphase	72
3.5	CO₂-Gaswechsel von Petunienstecklingen	75
3.5.1	CO ₂ -Gaswechsel von unbehandelten Stecklingen.....	75
3.5.2	Einfluss der Lichtintensität auf den CO ₂ -Gaswechsel von unbehandelten Stecklingen.....	79
3.5.3	CO ₂ -Gaswechsel von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase	82
4	DISKUSSION	85
4.1	Veränderungen des zeitlichen Verlaufs der AWB.....	85
4.1.1	Eine kalte Dunkelbehandlung induziert eine beschleunigte Bewurzelung während der Lichtphase...	85
4.1.2	Eine kalte Dunkelbehandlung stabilisiert die Bewurzelungsfähigkeit und reduziert donorpflanzenabhängige Schwankungen der AWB.....	87
4.1.3	Während der kalten Dunkelbehandlung wird die AWB initiiert und der Phasenverlauf verzögert.....	89
4.1.4	Eine kalte Dunkelbehandlung induziert die Etablierung eines Sinks während der Dunkelphase und beschleunigt den Phasenverlauf in der Lichtperiode.....	90
4.2	Veränderungen des Energiestoffwechsels während der AWB	91
4.2.1	Eine kalte Dunkelbehandlung führt zu einer Verarmung der Kohlenhydrate während der Dunkelphase	92
4.2.2	Eine kalte Dunkelbehandlung steigert die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten in der Lichtphase.....	95
4.3	Veränderungen der Photosyntheseaktivität während der AWB	97
4.3.1	Eine kalte Dunkelbehandlung beeinflusst die Nettophotosyntheserate und die Dunkelatmung in der Lichtphase nicht	98
4.3.2	Einfluss der Lichtintensität auf die Photosyntheseaktivität.....	101
4.4	Veränderungen des Stickstoffgehaltes während der AWB.....	102
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	104
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	LITERATURVERZEICHNIS	108
7	ANHANG	X
DANKSAGUNG		XIII
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		XIV
LEBENS LAUF		XV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Flussdiagramm der Adventivwurzelbildung.....	9
Abb. 2: Schematischer Ablauf des 3–Phasen Modells der Adventivwurzelbildung.....	12
Abb. 3: Darstellung der metabolischen Ereignisse während der Adventivwurzelbildung in Petunie.....	13
Abb. 4: Übersicht der pflanzlichen Invertase-Isoformen und ihrer wichtigsten Funktionen.....	18
Abb. 5: Anordnung des Mutterpflanzenbestandes im Gewächshaus.	23
Abb. 6: Stecklingsbeprobung.....	24
Abb. 7: Prinzip der enzymatischen Kohlenhydratbestimmung.....	27
Abb. 8: Prinzip der Gaswechselformung.....	36
Abb. 9: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Bewurzelung.....	42
Abb. 10: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung mit unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen.....	43
Abb. 11: Einfluss einer kurzzeitigen kalt-dunkel Behandlung auf die Bewurzelung.....	44
Abb. 12: Einfluss einer kurzzeitigen kalten Dunkelbehandlung (KDB) auf die Varianzhomogenität der Wurzelanzahl und der Gesamtwurzellänge....	45
Abb. 13: Trockenmassezuwachs von unbehandelten (Kontrolle) und kalt-dunkel behandelten (KDB) Stecklingen ab Zeitpunkt des Schneidens bis zum 16. Versuchstag.....	46
Abb. 14: Einfluss unterschiedlicher Stecklingsdichten während der Lichtphase von kalt-dunkel behandelten Stecklingen (KDB) und unbehandelten Kontrollen (Ktr.) auf die Bewurzelung.....	47
Abb. 15: Einfluss der Dauer einer kalten Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung.....	48
Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher Lichtintensitäten auf die Bewurzelungsintensität von unbehandelten Stecklingen (Ktr.) und kalt-dunkel behandelten Stecklingen (KDB).....	49
Abb. 17: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen während der Dunkel- und Lichtphase auf die Bewurzelung.....	50
Abb. 18: Einteilung von charakteristischen Entwicklungsstadien der Adventivwurzelbildung in der Stängelbasis von Petunienstecklingen.....	52
Abb. 19: Entwicklung früher Abläufe der Adventivwurzelbildung in der Stängelbasis von unbehandelten Petunienstecklingen.....	53
Abb. 20: Entwicklung früher Abläufe der Adventivwurzelbildung in der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen.....	54
Abb. 21: Veränderungen des Kohlenhydratstatus im Blatt und der Stängelbasis von unbehandelten Stecklingen.....	57
Abb. 22: Veränderungen des Kohlenhydratstatus im Blatt und der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Dunkelphase.....	58

Abb. 23: Veränderungen des Kohlenhydratstatus im Blatt und der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase..... 59

Abb. 24: Vergleich der Gehaltsänderungen von Glucose, Fructose, Saccharose und Stärke im Blatt und der Stängelbasis von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase..... 62

Abb. 25: Veränderungen des Stickstoffgehaltes, des Kohlenstoffgehaltes und des C / N-Verhältnisses während der Adventivwurzelbildung in unbehandelten (hpe = hpin) und kalt-dunkel behandelten Stecklingen (hpe ≠ hpin)..... 65

Abb. 26: Reaktionsschema ausgewählter Schlüsselenzyme des Kohlenhydratmetabolismus..... 67

Abb. 27: Enzymaktivitäten von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase (GK) und Pyruvatkinase (PK) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH), FB Pase und Phosphofruktokinase (PFK) im Blatt und der Stängelbasis von unbehandelten Stecklingen während der Lichtphase..... 68

Abb. 28: Enzymaktivitäten von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase (GK) und Pyruvatkinase (PK) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH), FB Pase und Phosphofruktokinase (PFK) im Blatt und der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Dunkelphase..... 70

Abb. 29: Enzymaktivitäten von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase (GK) und Pyruvatkinase (PK) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH), FB Pase und Phosphofruktokinase (PFK) im Blatt und der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase..... 71

Abb. 30: Vergleich der Aktivitätsänderungen von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase und Pyruvatkinase im Blatt und der Stängelbasis von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase..... 73

Abb. 31: Vergleich der Aktivitätsänderungen von FB Pase im Blatt und der Stängelbasis sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) in der Stängelbasis und Phosphofruktokinase in der Stängelbasis von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase..... 74

Abb. 32: Verlauf der Tagesmittelwerte der Nettophotosyntheserate, bezogen auf die Blatt-fläche (P_{net}) oder pro Steckling (P_{net2}) und der Dunkelatmung, bezogen auf die Blatt-fläche (D_A) oder pro Steckling (D_{A2})..... 76

Abb. 33: Netto- CO_2 -Gaswechselraten in Abhängigkeit von der eingestrahnten Lichtintensität, der CO_2 -Konzentration sowie der Temperatur im Licht und im Dunkeln 78

Abb. 34: Verlauf der Tagesmittelwerte der Nettophotosyntheseraten, bezogen auf die Blattfläche (P_{net}) oder pro Steckling (P_{net2}) und der Dunkelatmung, bezogen auf die Blattfläche (D_A) oder pro Steckling (D_{A2})..... 80

Abb. 35: Lichtsättigungskurven von Stecklingen, die mit zwei unterschiedlichen Lichtintensitäten behandelt wurden..... **82**

Abb. 36: Verlauf der Tagesmittelwerte der Nettophotosyntheseraten, bezogen auf die Blattfläche (P_{net}) oder pro Steckling (P_{net2}) und der Dunkelatmung, bezogen auf die Blattfläche (D_A) oder pro Steckling (D_{A2}) **83**

Abb. I: Veränderung der Gesamttrockenmasse, der Blatttrockenmasse und Stängeltrockenmasse sowie der Stängellänge von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen.... **XI**

Abb. II: Nettophotosynthese (P_{net}) in Abhängigkeit von der eingestrahnten Lichtintensität (PPFD) in Kombination mit der CO_2 -Konzentration **XII**

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Methode der Probeneinbettung in Paraffin nach Morphisto®	26
Tab. 2: Übersicht der Pufferzusammensetzung zur Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	32
Tab. 3: Gegenüberstellung des Entwicklungsverlaufs der Adventivwurzelbildung in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen.....	55
Tab. 4: Einfluss einer kalt-dunkel Behandlung von Stecklingen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt im Blattgewebe und der Stängelbasis während der Lichtphase (0–168 hpin).....	63
Tab. 5: Einfluss einer kalt-dunkel Behandlung von Stecklingen auf das Hexose / Saccharose- Verhältnis im Blatt und in der Sprossbasis während der Lichtphase (t = 0–168 hpin).....	64
Tab. 6: Vergleich des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO ₂ -Aufnahme (C _{net}) und aus der Pflanzentrockenmasse (C _{TM}) pro Steckling sowie der Carbon Use Efficiency (CUE) von unbehandelten Petunienstecklingen in verschiedenen Zeitintervallen.....	77
Tab. 7: Vergleich des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO ₂ -Aufnahme (C _{net}) und aus der Pflanzentrockenmasse (C _{TM}) pro Steckling, der Carbon Use Efficiency (CUE) sowie der Zunahme der Blattfläche (ΔBF) und Trockenmasse (ΔTM) pro Steckling von Stecklingen, die mit unterschiedlichen Lichtintensitäten behandelt wurden.....	81
Tab. 8: Vergleich des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO ₂ -Aufnahme (C _{net}) und aus der Pflanzentrockenmasse (C _{TM}) pro Steckling, der Carbon Use Efficiency (CUE) sowie der Zunahme der Blattfläche (ΔBF) und Trockenmasse (ΔTM) pro Steckling 0–168 hpin von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten (KDB) Stecklingen.....	84
Tab. I: Gegenüberstellung der chemische Zusammensetzung des zum Gießen genutzten Leitungswassers am Standort Erfurt und Großbeeren.....	X

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
ABA	engl.: <i>Abscisic Acid</i> , Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropancarbonsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Aqua dest.	lat.: <i>Aqua destillata</i> , einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AWB	Adventivwurzelbildung
BF	Blattfläche
BSA	engl.: <i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
bwz.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CUE	engl.: <i>Carbon Use Efficiency</i>
d. h.	dass heisst
DTT	Dithiothreitol (Threio-1,4-Dithio-2,3-dihydroxybutan)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
E	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	lat.: <i>et altera</i> , und andere
F1,6-BP	Fructose-1,6-bisphosphat
FAE	engl.: <i>Formalin / Acetic acid / Ethanol</i> , Formalin / Eisessig / Ethanol-Lösung
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
FM	Frischmasse
g	Gramm
h	Stunde
hpe	engl.: <i>hours post excision</i> , Stunden nach Abschneiden
hpin	engl.: <i>hours post insertion</i> , Stunden nach Stecken
IBA	engl.: <i>Indole-3-butyric acid</i> , Indol-3-ylbuttersäure
Kap.	Kapitel
KDB	Kalte Dunkelbehandlung
L	Liter
lat.	lateinisch
LKDB	Lange kalte Dunkelbehandlung

LSP	Lichtsättigungspunkt
m	Meter
M	Molar
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Min.	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mrd.	Millarde
n	Stichprobengröße
N	Normal
NAA	engl.: <i>Naphthyl acetic acid</i> , Naphtylelessigsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OPDA	cis-(+)-12-Oxophytodiensäure
p	Signifikanzniveau
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	lat.: <i>pondus hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PPFD	engl.: <i>Photosynthetic Photon Flux Density</i> , photosynthetische Photonenflussdichte [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
ppm	engl.: <i>parts per million</i> , Teile von einer Million
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	<i>Sekunde</i>
SDS	engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natrium-Dodecylsulfat
SUSY	engl.: <i>Sucrose Synthase</i> , Saccharosesynthase
Tab.	Tabelle
TES	N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethansulfonsäure
TM	Trockenmasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	engl.: unit, Einheit der Enzymaktivität
UDP	Uridin-5'-diphosphat
vs.	lat.: <i>versus</i> , gegen
W	Watt
WDB	Warme Dunkelbehandlung
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Petunien in der Jungpflanzenproduktion

Die wirtschaftliche Bedeutung von Beet- und Balkonpflanzen nimmt weltweit zu. Der Umsatz dieser Pflanzen auf dem deutschen Absatzmarkt betrug im Jahr 2006 bereits 1,94 Mrd. € und stieg im Jahr 2008 auf 2,01 Mrd. € an (ZMP, 2006, 2009). Dabei ist die Petunie von großer wirtschaftlicher Bedeutung. In den Jahren 2006 und 2008 schaffte es diese Zierpflanze mit jeweils 4 % auf Platz fünf bzw. sechs der beliebtesten Beet- und Balkonpflanzen in Deutschland (ZMP, 2006, 2009). Auch in anderen Ländern, z. B. den USA, konnte sich die Petunie seit einigen Jahren als feste Größe auf dem Markt der populärsten Beet- und Balkonpflanzen etablieren (USDA, 2008).

Die Gattung *Petunia* besteht aus über 35 Arten, gehört zu der Pflanzenfamilie der *Solanaceae* und ist in Süd- und Mittelamerika heimisch (Hunziker, 1979; Dole und Wilkins, 2004). Aufgrund der genetischen Ähnlichkeiten mit für die Forschung bedeutenden Arten (Tomate, Kartoffel, Tabak) der Familie der *Solanaceae*, nimmt die Petunie als Modellorganismus eine wichtige Stellung ein (Dole und Wilkins, 2004). *Petunia hybrida* ist dem Verbraucher als Gartenpetunie bekannt und erlangte ihren Beliebtheitsgrad vor allem aufgrund ihrer Blütenvielfalt und Farbenpracht (Oud et al., 1995). In Folge der zunehmenden Globalisierung und der immer stärkeren Nachfrage nach neuen und nicht einheimischen Pflanzenarten, befinden sich sogenannte „Blumenfarmen“ nicht mehr in unmittelbarer Nähe von Bewurzelungsstationen und potentiellen Kunden (Rudnicki et al., 1991). Ausgangsorte der Petunienpflanzenproduktion sind meist Mittel- und Südamerika sowie andere ähnlich klimatisierte Regionen mit einer hohen Lichteinstrahlung, wie beispielsweise Asien, Afrika sowie Südeuropa. Es ist von besonderer Bedeutung, dass die Donorpflanzen unter optimalen Bedingungen gezüchtet und kultiviert werden (Veierskov et al., 1982). Dazu gehören z. B. ideale Temperaturen, Tageslängen und Lichtintensitäten, aber auch die Vermeidung von Pathogenbefall und Wasserstress (von Hentig und Knösel, 1986; Hartmann et al., 1990). Die Vermehrung der Pflanzen erfolgt vegetativ über Stecklinge, da so die Uniformität der Pflanzen gewährleistet werden kann und es sich überdies um eine in der Durchführung unkomplizierte Vermehrungsmethode handelt. Die vegetative Vermehrung beruht auf der Bildung von Adventivwurzeln an der Schnittfläche des Stecklings. Das Bewurzelungspotential der geernteten Stecklinge wird maßgeblich durch den physiologischen Zustand der Donorpflanze beeinflusst (Veierskov et al., 1982; Pellicer et al., 2000). Chandler (1959)

berichtete bereits vor einem halben Jahrhundert, dass ein hohes Alter der Donorpflanzen die Bewurzelungskapazität der Stecklinge reduzieren kann. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Umweltbedingungen und der Zustand der Pflanzen unmittelbar vor und während des Zeitpunkts der Ernte eine große Rolle für den späteren Bewurzelungserfolg der Stecklinge spielen (Conover, 1976). Somit muss besonderes Augenmerk auf den Zustand der Donorpflanzen, aber auch auf die Auswahl des Stecklingsmaterials gelegt werden, damit qualitativ hochwertiges Material zu Beginn der Produktionskette gesichert werden kann.

Um die bedeutendsten Absatzmärkte in Mitteleuropa sowie Nordamerika mit Petunienpflanzen versorgen zu können und die wachsende Nachfrage der Verbraucher zu befriedigen, sind die Züchter auf steigende Importe von Stecklingen aus den Produktionsländern angewiesen (Mutui et al., 2005). Für den Transport werden zur Platz- und Kostenersparnis überwiegend unbewurzelte Stecklinge dicht in Plastiktüten gepackt und in Pappkartons aufbewahrt (Wang, 1987). Die Verschickung wird mittels Lastkraftwagen und Flugzeugen innerhalb weniger Tage bis zu einer Woche realisiert (Conover, 1976; Hartmann et al., 1990; Rudnicki et al., 1991; Rapaka et al., 2008). Die Anwendung von niedrigen Temperaturen (4–12 °C) und die Aufbewahrung von Stecklingen im Dunkeln während des Transports sind eine weit verbreitete Methode, um die metabolische Aktivität und die Respiration des Pflanzenmaterials abzusenken, so dass eine möglichst hohe Produktqualität erhalten werden kann (Rudnicki et al., 1991; Gollagunta et al., 2004; Sato et al., 2004). Nach Ankunft in den Bewurzelungsstationen in Ländern mit einem kühleren Klima und geringerer Lichtintensität werden die Stecklinge entweder sofort bewurzelt oder erneut für einige Tage bei niedrigen Temperaturen im Dunkeln gelagert, um eine eventuelle Überproduktion zu vermeiden. Die Pflanzen können so sukzessive angeboten werden, so dass die aktuelle Produktionsmenge auf die Nachfrage abgestimmt werden kann (Rajapakse und Kelly, 1995; Sato et al., 2004).

1.2 Auswirkungen einer kalten Dunkelperiode in der Jungpflanzenproduktion

In der weltweiten Jungpflanzenproduktion ist eine kalte Dunkelbehandlung (4–12 °C) von Stecklingen für eine koordinierte Marktregulierung wichtig und für den Transport aus den Produktionsländern zu den Bewurzelungsstationen notwendig. Diese Anwendungsschritte

bringen jedoch oft Probleme der Qualitätsverringering mit sich. Je länger das Pflanzenmaterial einer Dunkelperiode ausgesetzt ist, desto höher könnte der mögliche Qualitätsverlust sein. Besonders Pflanzensorten aus tropischen und subtropischen Regionen erleiden Verkühlungen und Gewebsnekrosen, was eine gehemmte Bewurzelungs- und Wachstumsfähigkeit sowie eine geringere Photosyntheseleistung nach sich zieht (Joyce et al., 2000; Allen und Ort, 2001; Lopez und Runkle, 2008). Das Lagerungspotential und die Toleranz für kühle Temperaturen wird von der Ausgangsqualität der Stecklinge, den Bedingungen während der Dunkelphase aber auch von der Pflanzenart und dem Genotyp bestimmt (Pellicer et al., 2000; Hu et al., 2006). Besonders Pelargonienstecklinge zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber kühlen und dunklen Lagerbedingungen, die zu Feuchtigkeitsverlusten und Blattseneszenz infolge von verringerten Chlorophyllgehalten sowie unzureichender Bewurzelung führten (Paton und Schwabe, 1987; Purer und Mayak, 1989; Arteca et al., 1996; Serek et al., 1998; Druge et al., 2004; Rapaka et al., 2008). Neben der Pelargonie ist aber auch bei Lilien- und Chrysanthenenstecklingen eine schnell einsetzende Blattseneszenz als Folge einer kalten Dunkellagerung bekannt (Mutui et al., 2005). Eine weniger starke Einschränkung in der Bewurzelungsfähigkeit konnte für Nelken und Chrysanthenen festgestellt werden, wenn die Stecklinge zuvor bei niedrigen Temperaturen (Nelken: 4 °C bzw. 0,5 °C; Chrysanthenen: 5 °C) gelagert wurden (Garrido et al., 1996 und 1998; Druge et al., 2000).

Um den Gewinn in der Jungpflanzenproduktion so hoch wie möglich und die Verluste so gering wie nötig zu halten, muss die Produktionskapazität ausgelastet und die Produktion effektiv gestaltet werden. Dies kann nur gelingen, wenn die Qualität der Stecklinge auch in der Nachernteperiode gesichert werden kann. Obwohl kommerzielle Vermehrungsbetriebe eine Vielzahl an Technologien entwickelt haben, um die Bewurzelung über Veränderungen von Umweltfaktoren mehr oder weniger erfolgreich zu manipulieren, sind fundamentale Vorgänge der Nacherntephysiologie sowie der biochemischen und molekularbiologischen Regulation der Adventivwurzelbildung in Stecklingen der meisten Zierpflanzen weitgehend unbekannt (Hartmann et al., 1990; Pellicer et al., 2000; Rapaka et al., 2007). *Petunia hybrida* ist als Vertreter der vegetativ vermehrten Zierpflanzen häufig Gegenstand der Forschung, vor allem zu Themen der Blütenbiologie, aber auch zu Fragestellungen der Adventivwurzelbildung (Gerats and Vandenbussche, 2005; Ahkami et al., 2009).

1.3 Vegetative Vermehrung und Adventivwurzelbildung (AWB)

Die Stecklingsvermehrung ist eine der wichtigsten vegetativen Vermehrungsmethoden (Bärtels, 1996; Spethmann, 1997; Litauszky, 1999). Sie ermöglicht in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl von gleichartigen Pflanzen (Klone) zu produzieren und findet deshalb im besonderen Maße Anwendung in der Zierpflanzenbranche (Ford et al., 2002). Nach dem Abschneiden des Stecklings von der Donorpflanze kommt es zur Bildung von Adventivwurzeln, welche die Entstehung eines neuen Wurzelsystems und folglich einer neuen Pflanze einleiten (Blakesley et al., 1991^b). Das Wurzelsystem der Pflanze dient nicht nur der überlebenswichtigen Aufgabe der Wasser- und Mineralstoffaufnahme, sondern auch der Speicherung von Reservestoffen und der Verankerung der später vollentwickelten Pflanze im Boden (Blakesley et al., 1991^b; Kull, 1993). Die Bedeutung der Adventivwurzelbildung (AWB) wird ersichtlich, wenn man beachtet, dass über 70 % der im Gartenbau angewandten Vermehrungssysteme von einer erfolgreichen Bewurzelung durch AWB abhängen (Davies et al., 1994). Der Vorgang der AWB ist somit ein entscheidender Schlüsselprozess um Pflanzen erfolgreich vermehren zu können (Martellet Fogaça und Fett-Neto, 2005; Ahkami et al., 2009). Trotz intensiver Studien über den Einfluss von Umweltfaktoren, z. B. Lichtintensität und Temperatur, auf die AWB, sind die wirtschaftlichen Verluste in Folge einer unzureichenden Bewurzelung noch immer relativ hoch (Sorin et al., 2006).

1.3.1 Funktion von Phytohormonen in der AWB

Phytohormone sind pflanzliche Signalstoffe, die mehrere physiologische Antworten in der Pflanze auslösen können und somit relativ unspezifisch sind (Pollmann, 2002). Ihre Wirkungsweise wird über die Konzentration, die Kompetenz der reagierenden Gewebe und synergistische bzw. antagonistische Wechselwirkung mit Wirkstoffen anderer Hormongruppen reguliert, so dass ein interaktives Netzwerk auf unterschiedlichen Reaktionsebenen aufgebaut wird (Trewavas und Cleland, 1983; Rodrigues-Pousada et al., 1999; Pollmann, 2002).

Zu den klassischen Phytohormonen zählen Auxine, Cytokinine, Ethylen, Abscisinsäure (ABA) und Gibberilline (Kende und Zeevaart, 1997). Auxine sind nahezu an allen Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt, z. B. bei der Koordinierung der Vaskular-

entwicklung, der Stimulation der Zellteilung- und differenzierung, der Wurzelbildung und Sprossstreckung sowie der Apikaldominanz (Gaspar und Hofinger, 1988; Hartmann et al., 1990; Nordström und Eliasson, 1991; Davies, 1995). Indol-3-essigsäure (IAA) wurde als erstes endogenes Phytohormon entdeckt und gilt als Hauptvertreter der Auxine (Davis und Haisig, 1994; Normanly, 1997; Östin et al., 1998). Der AWB-fördernde Effekt von IAA wurde in Studien mittels exogener Zufuhr aber auch mit auxinüberproduzierenden und auxinsensitiven Mutanten von *Arabidopsis* beschrieben (Moncousin et al., 1988; Blakesley et al., 1991^b; Koukourikou-Petridou and Bangerth, 1997; Casimiro et al., 2003). Ljung et al. (2001^a, 2001^b) publizierten, dass alle pflanzlichen Gewebe der Pflanze befähigt sind IAA zu bilden. Als Hauptsyntheseorte werden jedoch obere Pflanzenteile, wie Apikalmeristeme, junge Blätter und Knospen beschrieben (Moore, 1989; Normanly, 1997; Gattineau et al., 1997). Die Auxine gelangen über polaren Transport in die Sprossbasis des Stecklings und akkumulieren in der Wurzelzone (Moore, 1989; Estelle, 2001; Garrido et al., 2002). Die Regulation des endogenen Gehalts erfolgt über die Oxidation oder Konjugatbildung (z. B. mit Zuckern, Aminosäuren) der physiologisch aktiven freien IAA zur inaktiven Form (Blakesley et al., 1991^b; Östin et al., 1998). Studien zur IAA-Biosynthese, z. B. in *Arabidopsis* (Normanly et al., 1993; Müller und Weiler, 2000; Eckhardt, 2001) und Mais (Wright et al., 1991) tragen zur allgemeinen Auffassung bei, dass der Bewurzelungsvorgang vom Zustand der Auxinsensitivität der Zellen beeinflusst wird, welcher von der Höhe der IAA-Transport- und Akkumulationsrate in der Wurzelzone reguliert ist (Ford et al., 2002; Garrido et al., 2002; Martellet Fogaça und Fett-Neto, 2005). In der Industrie werden für die kommerzielle Vermehrung und beim Auftreten von IAA-Limitierungen auch synthetische Auxine wie Indol-3-ylbuttersäure (IBA) oder Naphtylessigsäure (NAA) exogen angewendet (Zimmerman und Wilcoxon, 1935; Martellet Fogaça und Fett-Neto, 2005). Vor allem IBA wird eine bessere Förderung der Wurzelinduktion als IAA nachgesagt, jedoch ist die Wirkung dieses Auxins speziesabhängig (Epstein und Wiesman, 1987; Hartmann et al., 1990; De Klerk et al., 1997 und 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass IBA auch in einigen Pflanzenarten endogen vorkommt (Epstein et al., 1988; Nordström et al., 1991; Ludwig-Müller, 2000).

Cytokinine werden hauptsächlich in den Wurzeln synthetisiert und über das Xylem in der Pflanze verteilt (Letham, 1994). Sie wirken in zahlreichen pflanzlichen Entwicklungsstadien indem sie u. a. Zellteilungs- und differenzierungsvorgänge kontrollieren, die Samenkeimung induzieren, die Bewurzelung besonders in der frühen Phase inhibieren und die AWB regulieren (Eriksen, 1974; Bollmark und Eliasson, 1986; Bollmark et al., 1988; Binns, 1994;

Davies, 1995). Wechselwirkungen mit Auxinen wurden in verschiedenen Studien beschrieben. Die Akkumulation in der Sprossbasis, die Biosynthese und der Export von Cytokininen aus der Wurzel scheint über Auxine kontrolliert zu werden (Hansen et al., 1987; Bangerth, 1994; Li et al., 1995; Eklöf et al., 1996). Zudem wurde festgestellt, dass ein hoher Auxingehalt in Kombination mit einem niedrigen Cytokiningehalt die AWB positiv beeinflusst (Hartmann et al., 1990). Transkriptanalysen in Arabidopsis zur Expression von *ipt*-Genen in Wurzelspitzen lassen Rückschlüsse auf die Wirkung der Cytokinine als Expressionsrepressoren zu (Miyawaki et al., 2004). Die untersuchten Gene codieren das Enzym Isopentenyltransferase, welches den ersten Schritt der Cytokininbiosynthese katalysiert.

Ethylen ist ein weiteres Phytohormon, das an der Regulation der AWB beteiligt ist (Clark et al., 1999; Shibuya et al., 2004). Zimmerman und Hitchcock (1933) schrieben Ethylen eine fördernde Funktion in der AWB zu. Gegensätzliche Ergebnisse stellten jedoch Nordström und Eliasson (1984) fest. Auch andere Untersuchungen zur Ethylenbeteiligung an dem Prozess der Bewurzelung variieren recht stark. So konnte für die Bewurzelung von Stecklingen der Mungbohne und Tomate eine stimulierende (Hitchcock und Zimmerman, 1940; Robbins et al., 1983 und 1985) oder hemmende (Roy et al., 1972; Coleman et al., 1980; Geneve und Heuser, 1983) Wirkung von Ethylen beobachtet werden. Mudge und Swanson (1978) stellten keinen Einfluss von Ethylen an der AWB bei Mungbohnen fest. Die Ursache der hohen Variabilität der Ethyleneffekte auf die Bewurzelung begründen Clark et al. (1999) damit, dass Pflanzen eine unterschiedliche Ethylensensitivität in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstadiums aufweisen. Die Autoren führten Versuche mit ethyleninsensitiven Mutanten von Tomate (NR) und Petunie (44568) durch und stellten fest, dass in beiden Fällen die Mutanten weniger Wurzeln entwickelten als die Wildtyp-Pflanzen (Clark et al., 1999). Auch durch die Zugabe von IBA oder 1-Aminocyclopropancarbonsäure (ACC) zeigten die Mutanten der Tomaten- und Petunienpflanzen eine schlechtere AWB als die Wildtypen (Clark et al., 1999). Im Gegensatz dazu wird der fördernde Effekt von Ethylen auf den Bewurzelungsprozess in anderen Publikationen vor allem in Zusammenhang mit Auxinen gebracht (Hartmann et al., 1990). Auffassung ist es, dass Ethylen den Auxintransport in den Gefäßbündeln beeinflusst und IAA akkumuliert wird, was die AWB initiiert (Aloni et al., 2006).

Die Rolle von ABA in der AWB ist noch unklar und wird immer wieder mit konträren Ergebnissen beschrieben. So soll ABA hemmend (Hartmann et al., 1990) bzw. fördernd (Basu

et al., 1968) auf die Bewurzelung wirken oder keinen Effekt aufweisen (Biran und Halevy, 1973). Zu den Gibberellinen sind wenige Untersuchungen bekannt. Sie werden mit ihrer Wirkungsweise meist nicht in Verbindung mit dem Bewurzelungsprozess gebracht (Hansen, 1988). Dennoch zeigte sich eine hemmende Beeinflussung auf die AWB, wenn Gibberelline dem Wachstumsmedium zugegeben wurden (Hansen, 1988; Hartmann et al., 1990).

1.3.2 Ablauf und Phaseneinteilung der AWB

1.3.2.1 Traditionelle Konzepte

Zu Beginn der Forschungsarbeiten wurde der Bewurzelungsvorgang als einzelner Prozess angesehen, welcher über den Hauptfaktor Auxin gesteuert wird (Davis und Haissig, 1994). IAA, als wichtigster Vertreter der Auxine, wurde als erstes endogenes Phytohormon mit einem fördernden Effekt auf die Bewurzelung entdeckt (Davis und Haissig, 1994; Normanly, 1997; Östin et al., 1998). Man ging davon aus, dass IAA während des gesamten Verlaufs der AWB nötig ist (Haissig, 1972; Eriksen und Mohammed, 1974). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass IAA die Wurzelinduktion fördert, im späteren Prozess der AWB die Differenzierung und das Längenwachstum der Adventivwurzeln allerdings hemmt (Collet, 1985; Geneve et al., 1988; Lyndon, 1990; Ripetti et al., 1994). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die AWB in einen zwei Phasen Prozess unterteilt: die etwa vier Tage dauernde auxinaktive Phase (i) und die sich anschliessende auxininaktive Phase (ii) (Hartmann et al., 1990). Die Aufgliederung verdeutlichte die antagonistische Rolle der Auxine während der Bewurzelung (Blakesley et al., 1991^b). Zudem wurden auch weitere Substanzen, wie Zucker, Phenole und Oxidasen entdeckt, die mit Auxin in einem Hormonkomplex, dem Rhizokalin, assoziiert sein sollten (Bouillenne und Went, 1933; Bouillenne und Bouillenne-Walrand, 1947). Dieser Komplex wurde aber nie identifiziert oder isoliert.

Es folgten eine Vielzahl von histologischen Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenarten, die morphologische Veränderungen während der AWB aufzeigen sollten (Favre et al., 1970 und 1973; Hicks, 1987; Moncousin et al., 1988; Bollmark et al., 1988; Ranjit et al., 1988). Daraus ergab sich eine detaillierte Phasenbeschreibung unter histologischen Gesichtspunkten (Blakesley et al., 1991^b; Kevers et al., 1997). Anfangs wurden zytologische Ereignisse, wie die Verdichtung des Zytoplasmas und das Anschwellen von Nuclei beschrieben, gefolgt von

ersten Zellteilungen, meristematischen Zellen (Chang und Chan, 1976) und einer erhöhten RNA-Synthese (Lee et al., 1978). Die meristematischen Zellen formieren sich zu Wurzelmeristemen und differenzieren sich zu organisierten Strukturen, den Wurzelprimordien (Hartmann et al., 1990). Anschliessend erfolgen das Längenwachstum und die Bildung von Wurzeln, bis es zum Ausbruch der Wurzelstrukturen aus der Stängelbasis kommt (Hartmann et al., 1990).

Die erhaltenen morphologischen Erkenntnisse wurden mit weiteren Untersuchungen zum Verlauf der Auxinkonzentration während der AWB kombiniert (Abb. 1) (Kevers et al., 1997). Aus biochemischer Sicht findet eine Dedifferenzierungsphase statt in der Zellen kompetent werden (d. h. nur diese Zellen besitzen das Potential auf einen Wurzelstimulus zu reagieren) und sich dann zu Wurzelmeristemen entwickeln (Christianson und Warnick, 1983; Wilson, 1994; Jasik und De Klerk, 1997).

Danach setzt eine Erhöhung des endogenen Gehalts an freier IAA im Wurzelbereich der Sprossbasis ein (Maldiney et al., 1986; Moncousin et al., 1988; Jarvis, 1986). Der Gehalt an konjugierter, physiologisch inaktiver IAA sinkt (Blakesley et al., 1991^b). Ludwig-Müller et al. (1993) beobachteten, dass der Gehalt an freier IAA in Arabidopsis am dritten Tag am höchsten war und eine vermehrte Zellteilung stattfand. Der Anstieg von IAA induziert bei den kompetenten Zellen die Teilung sowie die Bildung von Wurzelmeristemen, bis hin zur Differenzierung und Wachstum von Wurzelprimordien innerhalb der Sprossbasis (Christianson und Warnick, 1983; Jarvis, 1986; Blakesley et al., 1991^b). Die bereits von Hartmann et al. (1990) definierte auxinaktive Phase kann unter Einbeziehung der histologischen Ereignisse als Induktionsphase (i) bezeichnet werden (Christianson und Warnick, 1983).

Die endogene Konzentration von freier IAA sinkt während der weiteren morphologischen Differenzierung ausserhalb der Stängelbasis des Stecklings wieder ab (Christianson und Warnick, 1983; Koukourikou-Petridou and Bangerth, 1997). Experimente zeigten, dass eine Zufuhr von exogener IAA den Ausbruch der Wurzelprimordien aus der Stängelbasis hemmt (De Klerk et al., 1990). Diese auxininaktive Phase determiniert das Längenwachstum der Adventivwurzeln, wohingegen in der Induktionsphase die Wurzelanzahl festgelegt wird (Hartmann et al., 1990; Garrido et al., 1998).

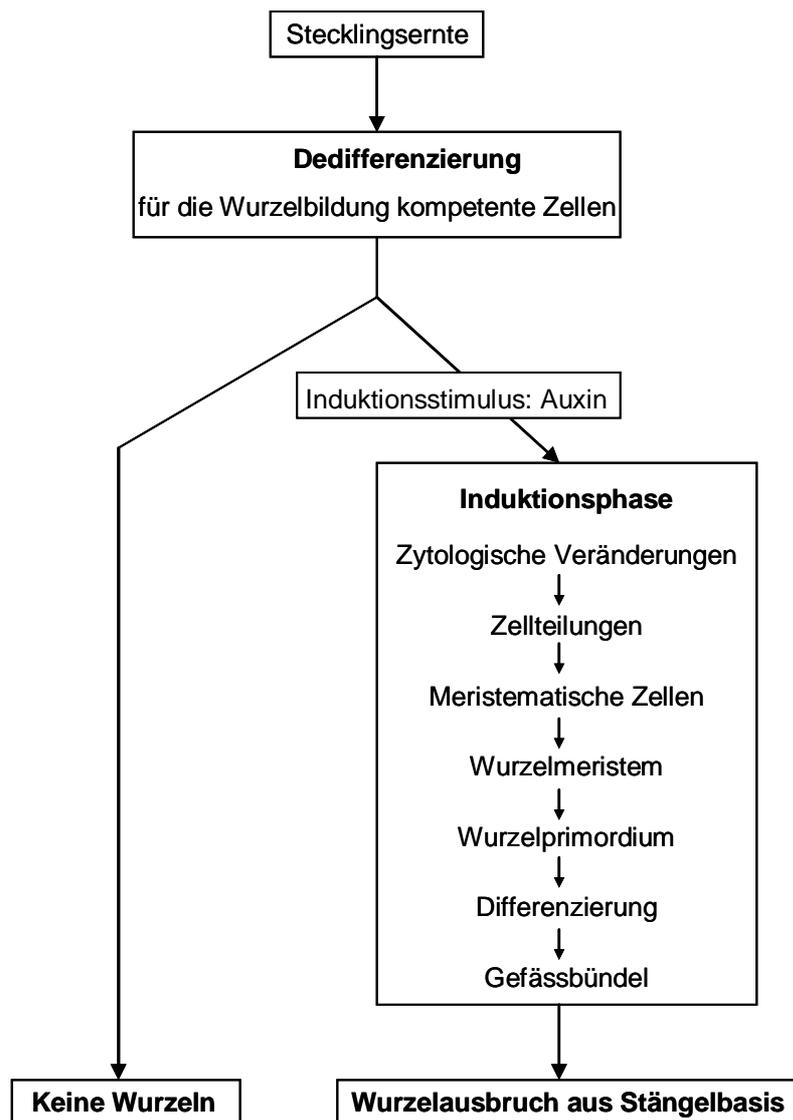


Abb. 1: Flussdiagramm der Adventivwurzelbildung.

Zellen erlangen während der Dedifferenzierung die Kompetenz zur Wurzelbildung, die durch ein Stimulus (Auxin) induziert werden muss, damit es zu Zellteilungen und zur weiteren Differenzierung innerhalb des Sprosses (Induktionsphase) und danach zum Ausbruch der Wurzeln aus der Stängelbasis kommt (verändert nach Lovell and White, 1986, Hartmann et al., 1990 und Geneve, 1991).

1.3.2.2 Funktion der Wundreaktion in der AWB

Die AWB ist wundinduziert, d. h. mit dem Abschneiden des Stecklings von der Donorpflanze wird eine Wundreaktion hervorgerufen, die ausschlaggebend für die spätere Bewurzelung ist (Hartmann et al., 1990; De Klerk et al., 1999). Dieser Verletzungsvorgang stellt die Initiationsreaktion für den Beginn der AWB dar (De Klerk et al., 1999). In den Zellen kommt es zur Synthese und Freisetzung von katabolischen Enzymen (z. B. Peroxidasen, Phospholipasen, Glucanasen), die Zellstrukturen wie Zellwände- und membranen abbauen (De Klerk et al., 1999). Diese Abbauprodukte werden *wounding-related compounds* genannt

und sollen den Bewurzelungsprozess fördern, indem sie beispielsweise durch Konjugation mit IAA-Oxidasen die Auxinsynthese positiv beeinflussen (Van der Krieken et al., 1997; De Klerk et al., 1999). Es wurde festgestellt, dass Wundenzyme, wie die Peroxidasen, die den Auxinkatabolismus vorantreiben, zu Beginn der AWB in ihrer Aktivität reduziert sind und der Gehalt freier IAA erhöht ist. Im weiteren Verlauf der Wurzelbildung steigt die Peroxidaseaktivität wieder an und der Gehalt an freier IAA sinkt (Moncousin et al., 1988; Berthon et al., 1989; Gaspar et al., 1992).

Polyphenolische Verbindungen sind Antioxidantien und wichtige Hilfsstoffe zu Beginn der AWB. Sie verhindern die Oxidation freier IAA und schützen das Pflanzengewebe, indem sie mit reaktiven Sauerstoffspezies, die während der Wundreaktion unter Stress entstehen, reagieren (De Klerk et al., 1999; Naija et al., 2008). Aufgrund ihrer antioxidativen Wirksamkeit tragen Phenole zum Erhalt physiologisch aktiver IAA bei und fördern in der frühen Phase die AWB (Gaspar et al., 1990; De Klerk et al., 1999).

Eine Verwundung resultiert in allen Pflanzen in einer Erhöhung des endogenen Gehalts von Jasmonsäure, welche damit eine weitere wundreaktionsspezifische Verbindung darstellt (Van der Krieken et al., 1997; Schilmiller und Howe, 2005). Durch den schnellen, transienten Anstieg des endogenen Jasmonatlevels kommt es zur Expression spezifischer Gene, die für Enzyme der Jasmonatbiosynthese, Abwehrproteine, aber auch für Enzyme des Zuckermetabolismus (z. B. Zellwandinvertase) codieren (Roitsch und González, 2004; Schaarschmidt et al., 2006; Wasternack, 2007).

Neben den aufgeführten Verbindungen gibt es weitere Signalmoleküle, wie Stickstoffmonoxid, Wasserstoffperoxid oder Kohlenstoffmonoxid, die ebenfalls Einfluss auf die Bildung von Adventivwurzeln haben sollen (Pagnussat et al., 2004; Xu et al., 2006; Li et al., 2007 und 2009).

1.3.2.3 Allgemeines 3-Phasenmodell der AWB

Aus den neuen biochemischen und histologischen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass die AWB ein Prozess aus verschiedenen voneinander abhängigen Phasen ist, der unterschiedliche Konzentrationsansprüche an Auxin stellt (Kevers et al., 1997; De Klerk et al., 1999). Dennoch

ist eine exakte Definition der Phasen und Abläufe relativ schwierig, weil die Beobachter die Phasen unterschiedlich einteilen und die Phasenlänge bei verschiedenen Pflanzenspezies stark variieren kann (Blakesley et al., 1991^b). Zudem können in manchen Arten (Pappel, Mungbohne, Salix) die Wurzelmeristeme schon lateral vorgebildet sein, so dass die AWB der Stecklinge bereits in einem späteren Stadium der Induktionsphase beginnt (Hartmann et al., 1990; De Klerk et al., 1999). Weit verbreitet ist das Modell zur AWB, welches den Bewurzelungsprozess in drei Phasen unterteilt (Abb. 2) (Jarvis, 1986; Moncousin, 1991; Klevers et al., 1997; De Klerk, et al., 1999).

Die physiologische Induktionsphase (i) ersetzt den in vorherigen Einteilungen definierten Zeitraum der Dedifferenzierung (Hand, 1994). Die Induktion ist durch molekulare und biochemische Schritte gekennzeichnet, ohne dass morphologische Veränderungen sichtbar sind (Kevers et al., 1997; De Klerk et al., 1999). Zellen erlangen ihre Kompetenz zur Bildung von Wurzelmeristemen, die Wundreaktion läuft ab, es werden wundresponsive Gene exprimiert und Auxin akkumuliert in der Stängelbasis. Anschließend werden in der Initiation (ii) durch die Stimulierung von Auxin Zellen zur Teilung angeregt, wodurch es zur Bildung von Wurzelmeristemen kommt. Das Wachstum und die Differenzierung dieser Zellen führen zur Anordnung von organisierten Strukturen, den Wurzelprimordien mit einer typischen Dom-Form. In diesem Stadium sinkt der Gehalt von Auxin ab. Die letzte Phase wird als Expression (iii), der Differenzierung der Primordien zu Wurzeln, dem Längenwachstum und Austritt der Wurzeln aus der Stängelbasis, definiert (Kevers et al., 1997; Fett-Neto et al., 2001). Die Rolle der Kohlenhydrate wird vor allem in der Wachstums- und Differenzierungsphase von Wurzelstrukturen als Quellen für Energie und Kohlenstoff-Skelette angesehen (Haissig, 1986; Veierskov, 1988).

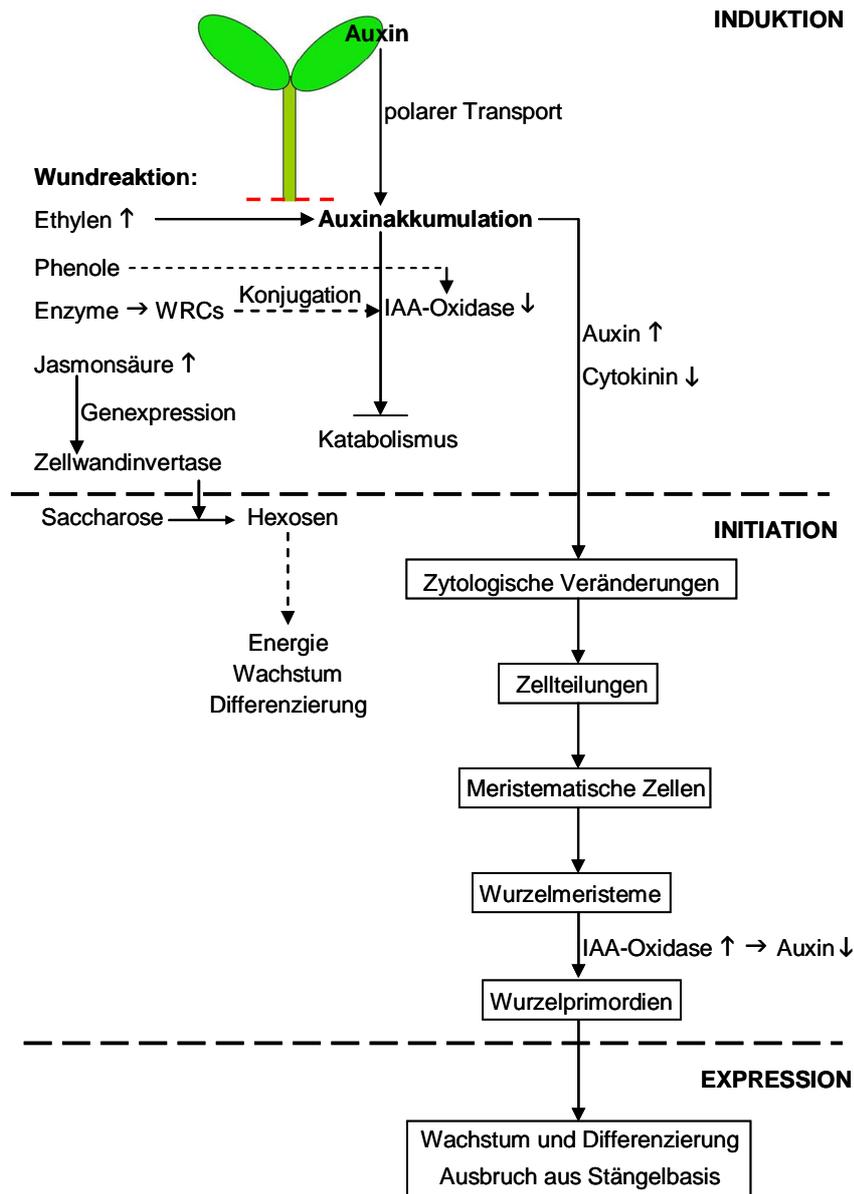


Abb. 2: Schematischer Ablauf des 3-Phasen Modells der Adventivwurzelbildung.

In der Induktionsphase finden molekulare und biochemische Prozesse wie die Wundreaktion statt. Es kommt zur Ansammlung von Auxinprotektoren sowie wounding-related compounds (WRCs) und zur Expression von wundresponsiven Genen. Auxin stimuliert kompetente Zellen zur Bildung von Wurzelstrukturen. In der Initiationsphase kommt es zu zytologischen Veränderungen (Verdichtung des Zytoplasmas, Anschwellen von Zellkernen) und ersten Zellteilungen. Meristematische Zellen formieren sich zu Wurzelmeristemen, die sich zu Wurzelprimordien organisieren. Kohlenhydrate dienen als Energielieferant. Zu diesem Zeitpunkt sinkt der Auxingehalt durch eine erhöhte IAA-Oxidaseaktivität. Die dritte Phase umfasst das weitere Wachstum und die Differenzierung zu Wurzeln und der Austritt aus der Stängelbasis.

1.3.2.4 Phaseneinteilung der AWB in Petunienstecklingen

Ahkami et al. (2009) untersuchten in einer kürzlich publizierten Studie den Verlauf der AWB in Petunienstecklingen. Dabei wurde nicht nur der zeitliche Verlauf von morphologischen Veränderungen in der Stängelbasis untersucht, sondern auch biochemische und molekulare

Prozesse analysiert. Die Gehaltsänderungen von Jasmonsäure und ihrer Vorstufe Oxo-Phytodiensäure (OPDA), von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Metaboliten des Tricarbonsäurezyklus wurden bestimmt. Des Weiteren wurden Transkriptanalysen von Genen, die für Enzyme aus dem Kohlenhydratmetabolismus codieren, durchgeführt und Aktivitäten bestimmter Enzyme des Kohlenhydrathaushaltes gemessen. Beruhend auf den neuen Erkenntnissen aus metabolischen Vorgängen definierten die Autoren einen 3-Phasen Mechanismus der ersten zwei „klassischen“ Phasen der AWB in Petunienstecklingen (Abb. 3).

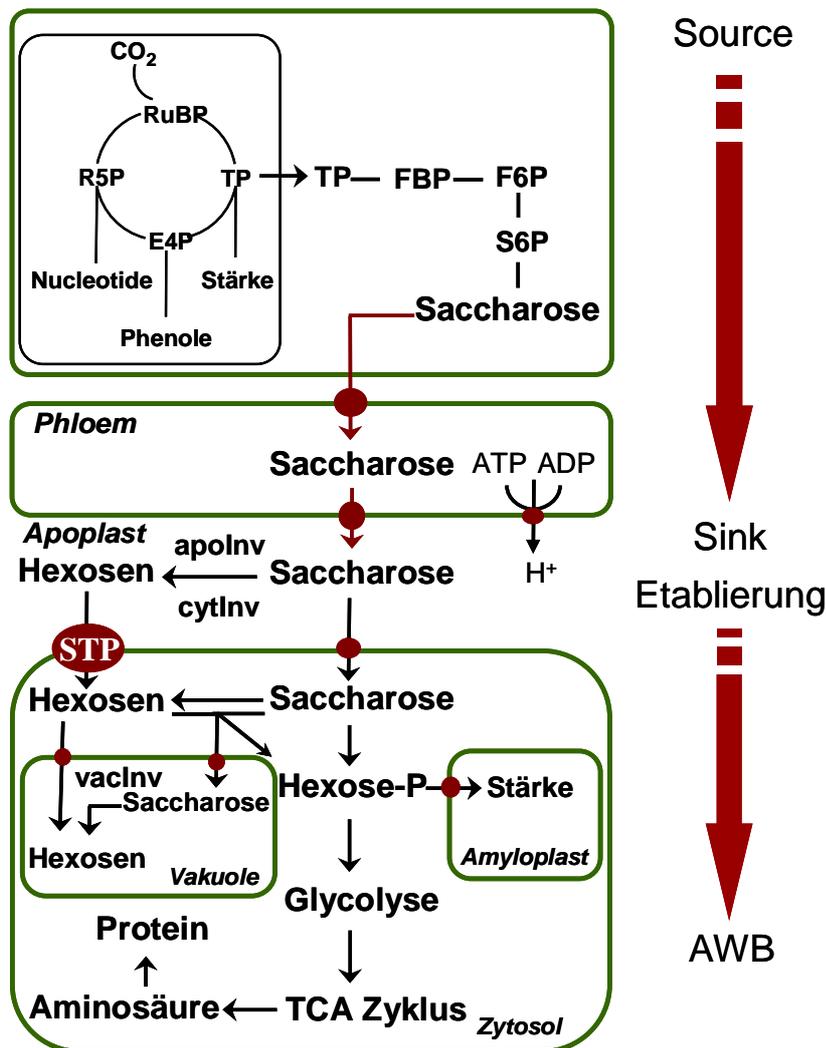


Abb. 3: Darstellung der metabolischen Ereignisse während der Adventivwurzelbildung in Petunie.

Assimilate werden in Source-Geweben (Blätter) synthetisiert und in die Stängelbasis transportiert, um dort einen neu etablierten Sink zu versorgen. Wundreaktionsspezifische Verbindungen induzieren u. a. die Genexpression der Zellwandinvertase, die Saccharose in Hexosen spaltet, welche über den Monosaccharidtransporter STP in die Zellen gelangen. 48 Stunden nach dem Abschneiden des Stecklings beginnt die Recovery Phase, welche ab 72 Stunden in die Maintenance Phase übergeht. Sie ist gekennzeichnet durch symplastischen Saccharosetransport aus den Blättern in das Sink-Gewebe. Die synthetisierten Hexosen stehen als Energiequelle für das Wurzelwachstum zur Verfügung oder werden in Form von Stärke im Plastiden gespeichert. (verändert nach Ahkami et al., 2009).

Die *Sink-establishment Phase* wird von der Wundreaktion nach dem Abschneiden des Stecklings von der Mutterpflanze eingeleitet. Die Wundreaktion in der Stängelbasis initiiert die Etablierung eines *Sinks*, ein photosynthetisch inaktives Gewebe, indem Jasmonat und der Precursor OPDA stark ansteigen und wundresponsive Gene induzieren. Folglich kommt es z. B. zur erhöhten Aktivität der Zellwandinvertase und eines Monosaccharidtransporters (STP4), welcher im Apoplast lokalisiert ist. Saccharose wird in dieser frühen Phase aus photosynthetisch aktiven *Source*-Gewebe (Blätter) in die Stängelbasis transportiert. Im Apoplast wird das Disaccharid durch die Zellwandinvertase in Hexosen gespalten, welche über den STP4-Transporter in das Zytosol gelangen, wo sie zur Wundheilung und für metabolische Vorgänge aufgebraucht werden.

Der Zeitabschnitt von 48 bis 72 Stunden nach der Stecklingsernte wird als *Recovery Phase* bezeichnet. In dieser Phase kommt es zur Synthese und Translokation von Assimilaten in das *Sink*-Gewebe. Der Gehalt an Gesamtprotein, von Aminosäuren und Kohlenhydraten sowie die Aktivität der in den Kohlenhydratmetabolismus involvierten Enzyme steigen an, Saccharose-abbauende Enzyme sinken in ihrer Aktivität. Zudem wird über eine gesteigerte Genexpression von CycB1, ein Markergen für mitotische Zellteilung (Porceddu et al., 1999), der Übergang zur *Maintenance Phase* (ab 72 Stunden) eingeleitet. In dieser Phase differenzieren sich meristematische Zellen zu Wurzelprimordien. Saccharose steigt in den Blättern an, wird in die Sprossbasis transportiert und symplastisch entladen und zu Hexosen abgebaut. Diese werden entweder als Stärke gespeichert oder stehen als Energiequelle zur Verfügung. Das Wachstum und die Differenzierung von Wurzelstrukturen werden durch einen erhöhten Verbrauch von Energie und Assimilaten sowie einer gesteigerten Proteinsynthese vorangetrieben.

1.3.3 Schlüsselrolle der Kohlenhydrate in der AWB

Im Verlauf der Bewurzelung treten morphologische Veränderungen auf, gekennzeichnet durch Zellzuwachs und Wachstum sowie Ausdifferenzierung zu Wurzelstrukturen. Grundlage dafür bilden Syntheseprozesse von z. B. Nucleinsäuren und Proteinen aus Kohlenstoffgerüsten, welche über den Kohlenhydratmetabolismus zur Verfügung gestellt werden (Haissig, 1974; Stitt und Krapp, 1999). Zudem spielt eine adäquate Nährstoffzufuhr in Form von Kohlenhydraten als Energiequelle und Strukturkomponenten bei der Wurzelmorphogenese eine Schlüsselrolle. Nur eine genügende Energiebereitstellung in der Sprossbasis

gewährleistet einen Massezuwachs und ist damit von unmittelbarer Bedeutung für die Festlegung der Fähigkeit zur Wurzelbildung (Haissig, 1984; Veierskov, 1988; Davis, 1988; Kevers et al., 1997; Li und Leung, 2000). Neben der Interaktion mit dem Stickstoff- und Nucleinsäuremetabolismus sind Kohlenhydrate auch in Lichtresponse- und Phytohormonpathways involviert (Coruzzi und Zhou, 2001; Ellis et al., 2002; Léon und Sheen, 2003), indem sie z. B. als Signalmoleküle den Transport von Auxin (IAA) modulieren und Gene der IAA-Biosynthese kontrollieren können (Léon und Sheen, 2003; Takahashi et al., 2003; Gibson, 2004). Hexosen können über Feedback-Hemmung die Aktivität von Saccharoseabbauenden Enzymen (Invertase, Saccharosesynthase) regulieren (Koch, 2004; Gibson, 2005).

1.3.3.1 Einfluss des Transports von Kohlenhydraten

Die zelluläre Physiologie und die Entwicklungsetappen während der Rhizogenese sind eng mit der Synthese, dem Transport und der Speicherung sowie dem Verbrauch von Kohlenhydraten verknüpft (Sheen et al., 1999; Gibson, 2000; Smeekens, 2000). Höhere Pflanzen besitzen die Fähigkeit, Photosynthese zu betreiben. Dieser Prozess ist eine endergonische Reaktion, bei der unter Ausnutzung von Lichtenergie CO_2 aus der Umgebungsluft mit Wasser zu Glucose und Sauerstoff umgewandelt wird (Heß, 1993). Sogenannte *Source*-Gewebe sind photosynthetisch aktive Gewebe, wie zum Beispiel vollentwickelte Blätter, in denen die Kohlenstoffassimilation erfolgt. Sie produzieren Photoassimilate, welche überwiegend in Form von Saccharose über das Phloem zu photosynthetisch eingeschränkten oder inaktiven Geweben (*Sinks*), wie z. B. junge Blätter, Wurzeln sowie Sprossmeristeme, transportiert werden und dort die Nährstoffversorgung garantieren (Benjamin und Wren, 1978; Sonnewald und Ebner, 1998). Die Hauptprodukte der Photosynthese sind Saccharose und Stärke (Huber, 1983; Pammeter et al., 1993).

Aufgrund des Tag- und Nachtrhythmus kommt es zu großen Unterschieden im Kohlenstoffhaushalt. Die Photoassimilatsynthese kann nur während der Lichtperiode stattfinden, so dass Veränderungen ausgeglichen werden müssen. Überschüssig gebildete Kohlenhydrate können in Form von Stärke akkumuliert und bei Dunkelheit remobilisiert werden (Geiger und Servaites, 1994; Sonnewald und Ebner, 1998). Zudem erfolgen in der Pflanze in Anpassung an den Energiebedarf katabolische Prozesse, wie z. B. die Glycolyse und der Zitratzyklus.

Dabei wird Glucose zu Wasser und Sauerstoff abgebaut, wobei die Energieäquivalente ATP und $\text{NADH}+\text{H}^+$ entstehen. Aufgrund dieser dynamischen Abläufe kann eine stetige Versorgung der Pflanzengewebe realisiert und Wachstum und Entwicklung gewährleistet werden (Geiger et al., 2000). Unterschiedliche Studien deuten darauf hin, dass die Kohlenhydratverfügbarkeit und der Kohlenstofftransport aus *Source*-Blättern in die *Sinks* einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von Adventivwurzeln haben (Okoro and Grace, 1976; Haissig, 1984; Tschaplinski and Blake, 1989; Friend et al., 1994). Saccharose stellt die Hauptform für den Zuckertransport in Pflanzen dar (Huber, 1983; Zrenner et al., 1996^a; Sheen et al., 1999). Saccharose ist auch die wesentliche Kohlenstoffquelle für die Entwicklung von *Sink*-Geweben und fördert dadurch die Bildung von Adventivwurzeln (siehe Kap. 1.3.2.4) (Farrar et al., 1995; Zrenner et al., 1996^a; Takahashi et al., 2003; Gibson, 2005; Ahkami et al., 2009).

1.3.3.2 Beeinflussung der Photosyntheseaktivität

Die für die AWB wichtige Verfügbarkeit und Verteilung von Kohlenhydraten hängt von der Photosyntheseaktivität der Stecklinge ab (Pellicier et al., 2000; Cross et al., 2006). Die Photosyntheserate wird von Umweltfaktoren, wie Licht und Temperatur stark beeinflusst. Eine zu geringe Lichtintensität reduziert die Photosyntheserate und damit die Produktion von Assimilaten in den Blättern. Dies hat zur Folge, dass auch der Transport von Kohlenstoffverbindungen zu den *Sinks* eingeschränkt ist und damit Wachstum und Entwicklung verzögert ablaufen (Nemali und van Iersel, 2004; Cross et al., 2006). Des Weiteren wird die Photosyntheserate aufgrund von zu hohen als auch zu geringen Umgebungstemperaturen herabgesetzt. Dieser Effekt wirkt sich negativ auf die Spaltung, die Verfügbarkeit und den Transport von Kohlenhydraten in der Pflanze aus (Farrar, 1988; Hikosaka et al., 2006). In der Dunkelheit wird die Respirationsrate aufgrund erhöhter Temperaturen gesteigert, so dass der Abbau von Kohlenstoffverbindung vermehrt stattfindet (Jiao und Grodzinski, 1996).

Zudem tragen auch die *Sink*-Gewebe selbst zur Regulation der Photosynthese bei (Cross et al., 2006). Als Stärke eines *Sink*-Gewebes wird die Fähigkeit des Assimilatimports bezeichnet. Diese Stärke bestimmt den Kohlenhydratfluss und folglich die Energieversorgung der Meristeme (Farrar, 1993). Damit ein Gleichgewicht zwischen *Source* und *Sink* aufrechterhalten bleibt, muss in den Blättern eine vergleichbare Menge an Kohlenhydraten

synthetisiert oder in Form von Stärke gespeichert werden wie im *Sink*-Gewebe gebraucht wird (Arp, 1991; Farrar, 1993; Farrar und Jones, 2000; Minchin et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine Kühlung von *Sink*-Gewebe die *Sink*-Stärke, also den Kohlenstoffbedarf, herabsetzt (Arp, 1991; Farrar, 1993; Reekie et al., 1997). Aufgrund einer geringeren Verbrauchsrate von Saccharose im *Sink* verglichen mit der Syntheserate im *Source*-Gewebe, kommt es zu einer Saccharoseanreicherung in den *Sink*-Zellen. Die allgemeine Auffassung ist, dass dieser Assimilatstau die Translokationsrate reduziert und letztendlich zu einer Akkumulation von Kohlenhydraten in den photosynthetisch aktiven Blättern führt (Arp, 1991; Stitt, 1991; Farrar, 1993). Die Zuckerformen Glucose und Saccharose selbst scheinen als Signalmoleküle zu fungieren, indem sie über Feedback-Hemmung die Photosyntheserate herunterregulieren und die Genexpression der Stärkebiosynthese sowie die Respiration induzieren (Stitt, 1991; Goldschmidt und Huber, 1992; Farrar, 1993; Coruzzi und Zhou, 2001; Rook und Bevan, 2003).

1.3.3.3 Regulatorische Enzyme im Kohlenhydratstoffwechsel

Die *Sink*-Regulation führt zu Veränderungen der Metabolitkonzentration und Aktivität von Schlüsselenzymen im Kohlenhydratmetabolismus (Krapp und Stitt, 1995; Zhou und Quebedeaux, 2003). Besonders die *Sink*-Stärke scheint erheblich von den Saccharose-spaltenden Enzymen Invertase und Saccharosesynthase (SUSY) abhängig zu sein. SUSY spaltet Saccharose reversibel unter Verbrauch von UDP in Fructose und UDP-Glucose, wohingegen Invertasen das Disaccharid irreversibel zu Glucose und Fructose hydrolysieren (Sturm, 1999; Pego et al., 2000; Koch, 2004). Somit entstehen beim Saccharoseabbau durch Invertasen doppelt so viele Hexosesubstrate, welche als Signalmoleküle agieren. Dadurch besitzen Invertasen eine hohe Kapazität spezifische Zuckersensoren zu stimulieren und haben folglich Einfluss auf die Expression verschiedener Gene (Sturm und Tang, 1999; Smeekens, 2000; Koch, 1996, 2000, 2004). Es zeigte sich, dass Glucose besonders in Geweben mit hoher Zellteilungsrate akkumuliert (Sturm, 1999; Gibson, 2005). Bei der Bildung neuer *Sink*-Strukturen konnte zu Beginn eine erhöhte Invertaseaktivität in den Vakuolen und danach in der Zellwand festgestellt werden (Andersen et al., 2002; Wächter et al., 2003). Es ist bekannt, dass Jasmonsäure, die während der Wundreaktion zu Beginn der AWB vermehrt in der Stecklingsbasis nachzuweisen ist, Gene induziert, die für die Zellwandinvertase codieren (Ahkami et al., 2009). Folglich steigt die Aktivität dieses Saccharose-abbauenden Enzyms an

und fördert die Etablierung von *Sink*-Geweben (Ahkami et al., 2009). Generell lässt sich daraus die Aussage treffen, dass Invertasen die Bildung von Entwicklungsprozessen in neuen *Sink*-Geweben einleiten (Sonnewald et al., 1997; Sturm und Tang, 1999; Koch und Zeng, 2002).

Pflanzliche Invertasen können hinsichtlich ihres pH-Optimums und ihrer Lokalisation in drei Isoformen eingeteilt werden: neutrale zytosolische Invertasen (i), saure vakuoläre Invertasen (ii) und saure zellwandgebundene apoplastische Invertasen (iii) (Sturm, 1999; Koch, 2004). Die verschiedenen Klassen der Saccharose-spaltenden Enzyme übernehmen innerhalb der Pflanze unterschiedliche physiologische Funktionen (Abb. 4).

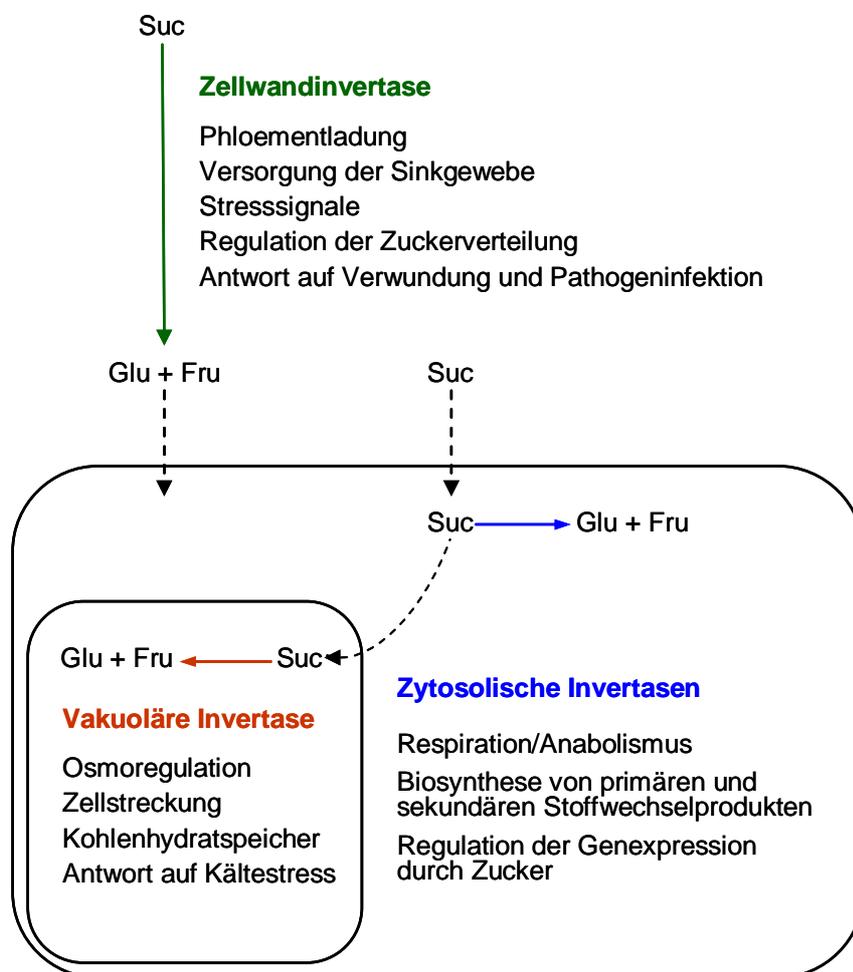


Abb. 4: Übersicht der pflanzlichen Invertase-Isoformen und ihrer wichtigsten Funktionen.

Saccharose (Suc) kann durch die Zellwandinvertase im Apoplast zu Glucose (Glu) und Fructose (Fru) abgebaut werden, welche dann in das Zytosol gelangen. Zytosolische Invertasen bauen Saccharose im Cytosol ab und vakuoläre Invertasen spalten Saccharose in den Vakuolen (verändert nach Sturm, 1999).

Die Aufgaben der zytosolischen Invertasen sind bisher noch recht unbekannt, jedoch sollen sie an respiratorischen sowie anabolischen Prozessen beteiligt sein und primäre bzw. sekundäre Stoffwechselprodukte synthetisieren (Sturm, 1999; Koch, 2004). Die sauren löslichen Invertasen sind in den Vakuolen der Zellen lokalisiert und tragen mit der Bereitstellung von osmotisch hoch aktiver Glucose zur Aufrechterhaltung des Zellurgors bei, welcher als treibende Kraft für die Zellstreckung wirkt (Sturm, 1999; Koch, 2004). Überdies regulieren diese Invertasen das Hexose / Saccharose-Verhältnis und generieren während der Entstehung von *Sink*-Gewebe glucosebasierte Signale, welche die Teilungsfähigkeit von Zellen dieser Gewebe vorantreiben (Sonnwald et al., 1991; Sturm und Tang, 1999; Andersen et al., 2002; Wächter et al., 2003). Die Aktivität der Zellwandinvertase steigt im weiteren Entwicklungsverlauf der *Sink*-Gewebe an. Die Zellwandinvertasen versorgen wachsende und sich entwickelnde *Sink*-Gewebe und regulieren die Phloementladung (Sturm, 1999; Koch, 2004).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aus aktuellen Untersuchungen von Ahkami et al. (2009) ist der zeitliche Ablauf der AWB in Petunienstecklingen gut bekannt. Allerdings wurde bei diesen Analysen nicht der Einfluss einer Dunkelbehandlung der Stecklinge berücksichtigt. In der Jungpflanzenproduktion ist eine kurzzeitige Dunkellagerung von Stecklingen bei niedrigen Temperaturen jedoch ein unumgänglicher Prozessschritt während des Transports zu Bewurzelungsstationen, der sich negativ auf die spätere Photosyntheseaktivität sowie Kohlenhydratreserven und folglich auf die Bewurzelungsfähigkeit der Stecklinge auswirken könnte. Eine gezielte Steuerung und Einflussnahme auf die Bewurzelungskapazität ist möglich, wenn der zeitliche Verlauf der AWB, aber auch die daraus resultierenden physiologischen Veränderungen hinreichend bekannt sind. Aufgrund des komplexen Entwicklungsprozesses der Rhizogenese konnten noch nicht alle Abläufe und Einflussfaktoren aufgeklärt werden. Veröffentlichungen zu histologischen Studien der Entwicklung von Adventivwurzeln in Stecklingen während einer Dunkelperiode existieren derzeit nicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es daher, den Einfluss einer temporären kalten Dunkelbehandlung auf die AWB und die damit verbundenen Veränderungen von biochemischen und zytologischen Prozessen in Stecklingen von *Petunia hybrida* 'Mitchell' zu

untersuchen. Dabei sollten Kenntnisse über das Bewurzelungsverhalten unter unterschiedlichen Umweltbedingungen während der Dunkel- und Lichtphase sowie den zeitlichen und morphologischen Ablauf der AWB, unter besonderer Betrachtung der Wechselwirkung mit der Kohlenhydratverfügbarkeit, gewonnen werden. Die Zusammenhänge zwischen der Dynamik der Kohlenhydratkonzentrationen und den Veränderungen bestimmter Enzymaktivitäten des Zuckermetabolismus sollten aufgeklärt werden.

Als erster Schritt sollten die Auswirkungen verschiedener Umweltfaktoren, wie z. B. Temperatur und Lichtintensität, auf die Bewurzelungsfähigkeit von Petunienstecklingen untersucht werden. Nach der Etablierung eines geeigneten Modellsystems galt es mittels histologischer Analysen, Erkenntnisse über morphologische Zustandsänderungen unter dem Einfluss einer kalten Dunkelbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu gewinnen. Die Auswirkungen auf den Kohlenhydratmetabolismus und die Aktivität spezifischer Schlüsselenzyme sollten mit analytisch-biochemischen Methoden ermittelt werden. Zudem sollten Messungen des CO₂-Gaswechsels von zuvor dunkel gelagerten Petunienstecklingen Aufschluss über eine eventuelle Anpassung der Photosyntheseaktivität während der Bewurzelung geben.

Die Untersuchungen an Petunienstecklingen sollten Aufschluss über den Verlauf der AWB unter dem Einfluss einer temporären kalten Dunkelbehandlung unter besonderer Berücksichtigung des Kohlenhydrathaushaltes geben und dazu beitragen, den Bewurzelungsprozess in der Jungpflanzenproduktion zu optimieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte und Apparaturen

Elementaranalyser Vario EL	Elementar Analysensysteme, Hanau
Kugelschwingmühle Retsch MM 301	Retsch, Haan
Mikroskop AxioImager A1	Carl Zeiss, Jena
Kamera AxioCam MRc5	Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten Reader Tecan Spectra	Tecan, Crailsheim
Mikrotom Leica RM 2155	Leica Instruments, Nussloch
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sigma 3K30 / Zent 3	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Tischzentrifuge VWR Galaxy 14D	VWR, Darmstadt
Kühlzentrifuge Biofuge 15R	HERAEUS, England
Vakuumpumpe Vacuubrand CVC 2	Vacuubrand, Wertheim
Speed Vac Savant SPD 111V	Savant, München
Schwebekörper-Durchflussmesser	WESTPHAL, Ottobrunn
Blattflächenmessgerät LI-3100 Areameter	Licor, Lincoln, USA
Rotor Speed Mill pulverisette 14	Fritsch, Idar-Oberstein
Ultra Microplate Reader EL 808	BIO-TEK, Bad Friedrichshall
Mikrotiterplatten Costar EIA / RIA	Corning Incorporated, Corning, USA

2.2 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht weiter spezifiziert, in analytischer Qualität von den Firmen *AppliChem* (Darmstadt, Deutschland), *Bio-Rad* (München, Deutschland), *J. T. Baker* (Deventer, Niederlanden), *Merck* (Darmstadt, Deutschland), *Morphisto®* (Frankfurt, Deutschland), *Roche* (Mannheim, Deutschland) und *Roth* (Karlsruhe, Deutschland) sowie *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.3 Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

Samen von *Petunia hybrida* 'Mitchell' (W115) (doppelt haploide Hybride aus *P. axillaris* und *P. hybrida* 'Rose of Heaven') wurden mit 70 % Ethanol, 10 % NaOCl (0,1 % SDS-Lösung) sterilisiert und dreimal mit Aqua dest. gereinigt. Die Keimung erfolgte unter sterilen Bedingungen in Petrischalen auf $\frac{1}{2}$ MS Medium (Murashige & Skoog, 1962) bei 25 °C (16 Stunden Licht) in einem Klimaschrank (Rubarth Apparate GmbH, Laatzen, Deutschland). Nach 14-tägiger Keimungszeit wurden die Sämlinge in Substrat (Torfbasis; Einheitserde Typ VM, Patzer, Sinntal-Jossa, Deutschland) in Anzuchtschalen (72er Multitrays) umgesetzt und im Gewächshaus platziert. Nach vier Wochen wurden die kleinen Petunienpflanzen in Töpfe (Durchmesser: 12 cm) umgesetzt, die gedüngtes Torfsubstrat (Einheitserde Typ ED-73 mit Optifer, Patzer, Deutschland) enthielten. Nach weiteren vier Wochen erfolgte eine erneute Umsetzung in größere Töpfe (Durchmesser: 16 cm) mit gedüngtem Torfsubstrat (Einheitserde Typ ED-73 mit Optifer).

Die Mutterpflanzen wurden einmal wöchentlich mit Hakaphos spezial (16 % N, 8 % P₂O₅, 22 % K₂O, 3 % MgO und Mikronährstoffe, COMPO GmbH Münster, Deutschland) flüssig gedüngt. Hierbei wurden folgende Nährstoffkonzentrationen im Substrat angestrebt und durch Substratanalysen im vierzehntägigen Rhythmus kontrolliert: 150 mg L⁻¹ Stickstoff (N); 100 mg L⁻¹ Phosphor (P); 300 mg L⁻¹ Kalium (K). Im Gewächshaus waren die Mutterpflanzen den natürlichen Lichtbedingungen ausgesetzt, die zur Zeit des jeweiligen Experimentes im Gewächshaus auftraten. Der Einsatz einer Schattierung erfolgte, wenn die Lichtintensität eine höhere PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) als 720 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400 – 700 nm) erreichte. Die Tageslänge wurde mittels einer Abdunkelung auf 10 Stunden begrenzt. Die Sollwerte für die Heizung / Lüftung von 20 / 22°C (Tag) bzw. 16 / 18 °C (Nacht) bewirkten eine mittlere Temperatur von 21,7 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 57,8 %.

Der Mutterpflanzenbestand umfasste 80 Pflanzen mit vier Wiederholungspartellen, welche aus je 20 Pflanzen aufgebaut und systematisch im Gewächshaus angeordnet waren (Abb. 5). Einmal pro Woche wurden die Austriebe an den Mutterpflanzen entfernt, wobei stets zwei Blätter inklusive Axillarknospen an den jungen Trieben belassen wurden. Dadurch wurde die Neubildung von Seitentrieben angeregt, so dass die Pflanzen eine buschig-gedrungene Gestalt annahmen. Aufgrund des regelmäßigen Rückschnittes und der auf 10 Stunden begrenzten

Tageslänge wurde die Blütenbildung unterbunden. Die Petunienpflanzen wurden ca. drei Monate nach der Keimungszeit für experimentelle Analysen genutzt. Die Erneuerung des Mutterpflanzenbestandes erfolgte ca. alle fünf Monate.

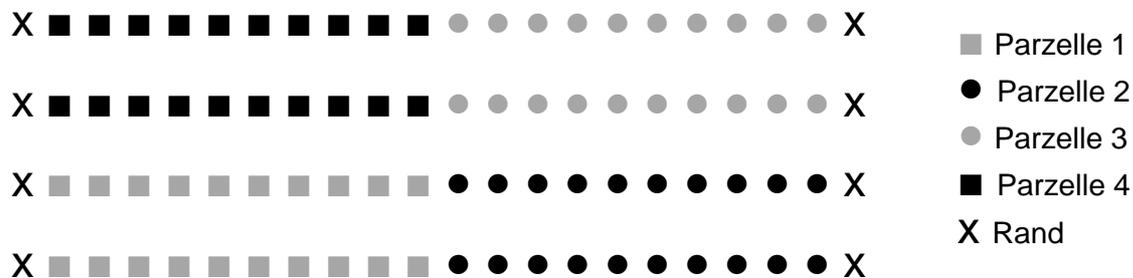


Abb. 5: Anordnung des Mutterpflanzenbestandes im Gewächshaus.

2.4 Versuchsbedingungen

Stecklinge gleicher Größe mit fünf bis sechs Blättern wurden vier Stunden nach Beginn der Lichtphase geerntet und nach dem Entfernen von den Mutterpflanzen in das Bewurzelungssubstrat Perlite Perligran A (Partikelgröße 0 – 6 mm, pH 7,0; Knauf Perlite GmbH Dortmund, Deutschland) in Bewurzelungsschalen (0,5 m x 0,32 m) gesteckt. Jede Schale wurde mit einer lichtdurchlässigen Plastikhaube abgedeckt, um ein stabiles Mikroklima und eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Die Stecklinge wurden dann einer 16 tägigen Lichtphase in einer Phytokammer (Yorck, Mannheim, Deutschland) ausgesetzt. Die Phytokammer war mit Leuchtstoffröhren des Typs Philips Master TLD 58W / 830 ausgestattet. Die Versuche zur Messung des Gaswechsels wurden in einer anderen Phytokammer (Yorck) am Standort Großbeeren durchgeführt. In der Phytokammer waren Leuchtstoffröhren des Typs Philips Agro SUN-T 400W angebracht. Die klimatischen Verhältnisse wurden den typischen Wachstumsbedingungen in der Jungpflanzenproduktion während der Wintersaison in Mitteleuropa angepasst. Die PPFD betrug $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei einer Temperatur von $22 \text{ }^\circ\text{C}$ über 10 Stunden. Nachts wurde eine Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Die Bewässerung der Stecklinge erfolgte einmal pro Tag mit Leitungswasser. Die chemische Zusammensetzung des Leitungswassers ist im Anhang aufgelistet (Tab. I).

Zur Dunkelbehandlung wurden Stecklinge direkt nach dem Abschneiden von den Mutterpflanzen in unperforierte Plastiktüten in Pappkartons verpackt und unter dunklen

Bedingungen bei 10 °C für sieben Tage in einem Klimaschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) gelagert. Anschließend wurden diese Stecklinge den oben erläuterten klimatischen Konditionen in Bewurzelungsschalen für neun Tage bei Licht ausgesetzt.

2.5 Probennahme von Stecklingsmaterial

Zu unterschiedlichen Terminen wurde ein halber Zentimeter der Stängelbasis mit einem Skalpell sauber abgetrennt, in ein Eppendorf Tube eingewogen (Feinwaage, Sartorius Göttingen, Deutschland) und anschließend in Flüssigstickstoff gefroren. Für die Blattproben wurden mit Hilfe eines Korkbohrers zwei Blattscheiben aus dem zweitältesten vollentwickelten Blatt gestanzt (1,0054 cm²) und ebenso verfahren wie mit den Stängelproben (Abb. 6). Die Proben wurden bei –80 °C für die Analysen aufbewahrt.



Abb. 6: Stecklingsbeprobung.

0,5 cm Stängelbasis und zwei Blattscheiben des zweitältesten Blattes wurden beprobt.

2.6 Wurzelbonitur von Stecklingen

Jeder durchgeführte Versuch wurde mit einer Wurzelbonitur von zehn Stecklingen pro Parzelle und Behandlung ($n = 40$) beendet. Die Bewurzelungsrate (BR) wurde aus der Anzahl der bewurzelten Stecklinge ($n_{\text{bewurzelt}}$) und der Anzahl der gesteckten Stecklinge (n_{gesteckt}) bestimmt (Formel 1).

$$BR(\%) = \frac{(100\% \cdot n_{bewurzelt})}{n_{gesteckt}} \quad (1)$$

Zur Bestimmung der Wurzelanzahl wurden die Wurzeln pro Steckling ausgezählt und der Mittelwert aller untersuchten Stecklinge gebildet. Des Weiteren erfolgte eine Einteilung der Wurzeln in Längensklassen ($i < 1$ cm, $i \geq 1$ cm, $i \geq 2$ cm, $i \geq 3$ cm, $i \geq 4$ cm, $i \geq 5$ cm) (Druege et al., 2007). Die Gesamtwurzellänge x wurde wie in Formel 2 dargestellt für jeden Steckling berechnet und anschließend für alle Stecklinge gemittelt, wobei x_i die Wurzelanzahl der jeweiligen Wurzellängensklasse (i) und l_i die für die jeweilige Klasse definierte mittlere Wurzellänge darstellt (0,5 cm; 1,5 cm; 2,5 cm; 3,5 cm; 4,5 cm; 5,5 cm) (Druege et al., 2007).

$$x(\text{cm}) = \sum_{i=1}^6 x_i \cdot l_i \quad (2)$$

2.7 Bestimmung der Trockenmasse, der Blattfläche und der Stängellänge

Ein Steckling wurde zur Ermittlung des Trockengewichtes in einem Alu-Schiffchen eingewogen und bei 80 ± 2 °C bis zur Massekonstanz getrocknet. Die Masse des Rückstandes wurde durch Differenzwägung ermittelt. Für die Gaswechsellmessungen wurde pro Behandlung und Probenahmetermin (t=0 d, t=7 d, t=14 d) die Trockenmasse von 4 Schalen mit je 16 Stecklingen bestimmt (n = 4). Alle anderen Ergebnisse zur Gesamttrockenmasse, der Blatt- und Stängelmasse wurden von 32 Stecklingen ermittelt (n = 32). Die Bestimmung der Wurzelrockenmasse erfolgte nach demselben Prinzip, jedoch wurde die durchschnittliche Wurzelrockenmasse von 8 Stecklingen pro Probe mit vier Wiederholungen ermittelt (n = 32).

Die Bestimmung der Blattfläche erfolgte zu Beginn des Versuches, nach sieben Tagen und am Ende des Versuches mit dem Blattflächenmessgerät LI-3100 Areameter (Licor, Lincoln, USA). Für jede Behandlung und jeden Probenahmetermin wurde die Blattfläche mit und ohne Stängelanteil von 4 Schalen mit je 16 Stecklingen (n = 4) bestimmt. Die Stängellänge von 32 Stecklingen pro Behandlung und Probenahmetermin (t=0 d, t=7 d, t=14 d) wurde mit einem Lineal ausgemessen.

2.8 Histologische Analysen

Proben (0,5 cm Stängelbasis) wurden in einer FAE-Lösung fixiert (100 mL bestehend aus: 5,4 mL Formalin (3 %), 65,6 mL Ethanol (96 %), 5 mL Eisessig und 24 mL Aqua dest.) (Gerlach, 1984). Die Proben wurden anschließend entsprechend den Angaben nach Morphisto® (Frankfurt, Deutschland) in Paraffin (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) eingebettet (Tab. 1).

Tab. 1: Methode der Probeneinbettung in Paraffin nach Morphisto®

Medium	Zeit	Vakuum	Temperatur
70 % Ethanol	24 Stunden	–	20 °C
80 % Ethanol	20 Minuten	Ja	20 °C
90 % Ethanol	20 Minuten	Ja	20 °C
96 % Ethanol	20 Minuten	Ja	20 °C
96 % Ethanol	20 Minuten	Ja	20 °C
Eosinfärbung (0,5 mg mL ⁻¹ Isopropanol)	3 Minuten	Ja	20 °C
100 % Isopropanol	20 Minuten	Ja	20 °C
100 % Isopropanol	20 Minuten	Ja	20 °C
100% Xylol-Ersatz	20 Minuten	Ja	20 °C
100 % Xylol-Ersatz	20 Minuten	Ja	20 °C
Xylol / Paraffin (1:1)	40 Minuten	Ja	55 °C
100 % Paraffin	90 Minuten	Ja	55 °C

Für jeden Termin und jede Behandlung wurden zehn Proben der Stängelbasis untersucht (n = 10). Längsschnitte von 10 µm wurden mit einem RM 2155 Microtom (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) geschnitten. Die Färbung erfolgte in FCA-Lösung nach Etzold (Neufuchsin-Chrysoidin-Astra blau: 100 mL dH₂O, 0,1 g Neufuchsin, 0,143 g Chrysoidin, 1,25 g Astra blau und 20 mL Eisessig) (Morphisto®, Frankfurt, Deutschland). Diese Methode färbt lignifizierte Zellwände, das Cytoplasma und die Zellkerne rot. Unlignifizierte Zellwände werden blau dargestellt. Anschließend wurden die Proben in Kunstharz Ultrakit (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) eingedeckelt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem

AxioImager A1 Mikroskop in Kombination mit einer AxioCam MRc5 Kamera (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Die Proben wurden hinsichtlich ihrer Entwicklungsstruktur in unterschiedliche Kategorien eingeordnet. Stadium 1 zeigte keine Anzeichen von Entwicklungsstrukturen der Adventivwurzelbildung (AWB). Erste neue meristematische Zellen kennzeichneten das zweite Stadium der Längsschnitte. Im dritten Stadium zeigte sich die Differenzierung von meristematischen Zellen zu Wurzelprimordien. Im letzten Stadium waren das Streckenwachstum und der Austritt der Wurzeln sichtbar.

2.9 Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

2.9.1 Prinzip der Methode

Die enzymatische Kohlenhydratbestimmung beruht auf der Messung des während der Reaktion von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton gebildeten $\text{NADH}+\text{H}^+$, welches ein Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm besitzt. Zuvor werden durch Zugabe von bestimmten Enzymen (Abb. 7), Glucose, Fructose, Saccharose und Stärke zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Die Konzentration des gebildeten $\text{NADH}+\text{H}^+$ ist äquivalent zur Zuckerkonzentration in der Probe.

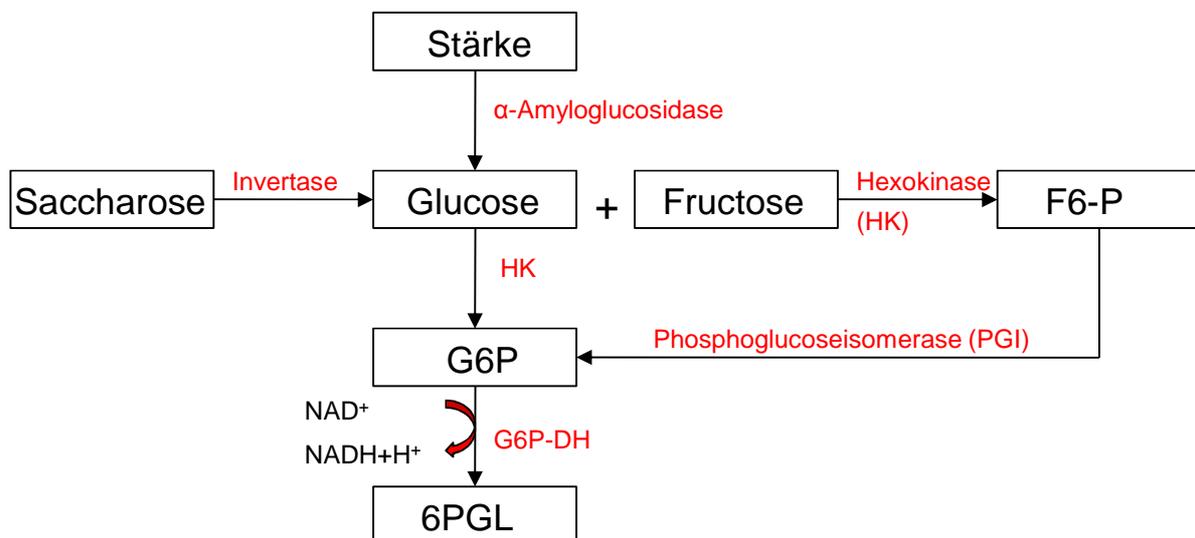


Abb. 7: Prinzip der enzymatischen Kohlenhydratbestimmung.

Saccharose wird durch das Enzym Invertase in Glucose und Fructose gespalten. Stärke kann mittels α -Amyloglucosidase in Glucose gespalten werden. Das Enzym Hexokinase (HK) phosphoryliert Fructose zu Fructose-6-Phosphat (F6-P). Glucose-6-Phosphat (G6P) entsteht einerseits durch die Phosphorylierung von Glucose und andererseits durch die Phosphoglucoseisomerase (PGI) katalysierte Reaktion von Fructose-6-Phosphat (F6-P). Bei der Umsetzung von Glucose-6-Phosphat (G6P) zu 6-Phosphogluconolacton (6PGL) durch das Enzym Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) wird Wasserstoff auf NAD^+ übertragen. Die Konzentration des gebildeten $\text{NADH}+\text{H}^+$ ist äquivalent zur Zuckerkonzentration in der Probe

2.9.2 Probenextraktion

Nach der Probenahme von je acht Stängel- und Blattproben ($n = 8$) pro Termin und Behandlung (siehe Kapitel 2.5) wurde das Ausgangsmaterial mit einer Kugelschwingmühle (Retsch, Haan, Deutschland) im gefrorenen Zustand und vorheriger Zugabe von 0,7 mL 80 %igem Ethanol vollständig homogenisiert (10 Min.; 30 s^{-1}). Danach wurden die Proben für 60 Min. bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für fünf Min. (14000 rpm, Kühlzentrifuge 3K30 / Zent 3 Sigma, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und in neue Eppendorf Tubes übertragen. Die verbliebenen Probenpellets wurden für die Stärkemessung benutzt. Die Eppendorf Tubes mit dem Probenüberstand wurden in einem Speed Vac-Gerät (Savant, München, Deutschland) bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ für 90 Min. vollständig evaporisiert. Anschließend wurde die getrocknete Probe in $250 \text{ } \mu\text{L}$ Aqua dest. resuspendiert.

Für die Messung der Stärkekonzentration wurden die Probenpellets drei Mal mit 80 %igem Ethanol gewaschen und durch Zugabe von $200 \text{ } \mu\text{L}$ $0,2 \text{ N}$ KOH ein Stärkeverdau über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Nach erneuter Zugabe von $200 \text{ } \mu\text{L}$ KOH wurden die Proben homogenisiert und bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 60 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation der Proben durch Zugabe von $70 \text{ } \mu\text{L}$ 1 N Essigsäure. Die Proben wurden eine Min. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert (14000 rpm, Kühlzentrifuge 3K30 / Zent 3 Sigma, Osterode, Deutschland). $50 \text{ } \mu\text{L}$ des Probenüberstandes wurden im Verhältnis 1:1 mit Reaktionspuffer (2 mg mL^{-1} Amyloglucosidase (7 mg^{-1} , Roche, Mannheim, Deutschland) in 50 mM NaAc, pH 5,2) gemischt und für fünf Stunden bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

2.9.3 Bestimmung der löslichen Zucker und Stärke

Die löslichen Zucker (Glucose, Fructose, sowie Saccharose) und Stärke wurden, wie in Hajirezaei et al. (2000) beschrieben, mit geringfügigen Änderungen enzymatisch bestimmt. Vor der Messung wurden die Proben für eine Min. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. 10 bis $20 \text{ } \mu\text{L}$ Probenvolumen wurden in Wells auf eine Mikrotiterplatte (Corning Inc., Corning, USA) mit 290 bis $280 \text{ } \mu\text{L}$ Reaktionspuffer II (100 mL Reaktionspuffer I (100 mM Imidazol-HCl, 5 mM MgCl_2 , pH 6,9), 150 mg NAD (MG: $663,43 \text{ g mol}^{-1}$, AppliChem Darmstadt, Deutschland), 60 mg ATP (MG: $605,2 \text{ g mol}^{-1}$, Roche)) pipettiert. Das Gesamtvolumen pro Mikrotiter-

plattenwell betrug 300 μL . Danach wurde 1 μL des Enzyms Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) (Roche) in einer 1:2 Verdünnung mit Reaktionspuffer I (100 mM Imidazol-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 6,9) zugegeben, die Mikrotiterplatte für 15 Min. bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 340 nm gemessen. Diese Prozedur erfolgte anschließend nacheinander mit den Enzymen Hexokinase (HK) (Roche) in einer 1:3 Verdünnung, Phosphoglucoseisomerase (PGI) (Roche) in einer 1:4 Verdünnung und Invertase (10 mg Invertase (Roche) in 100 μL Reaktionspuffer II).

Die Qualität der Messungen wurde durch Mitführen von Standardreihen der einzelnen Zucker überprüft. Die Kohlenhydratkonzentrationen berechneten sich aus der Extinktionsdifferenz ΔH nach der jeweiligen Enzymzugabe (Glucose: $E_{\text{G6P-DH}} - E_{\text{HK}}$, Fructose: $E_{\text{PGI}} - E_{\text{HK}}$, Saccharose: $E_{\text{Invertase}} - E_{\text{PGI}}$), multipliziert mit dem Well-Messvolumen V_M der Mikrotiterplatte und dem totalen Extraktvolumen V_{TE} . Dieses Produkt wurde durch den Extinktionskoeffizienten von NADH+H⁺ (340 nm; $E = 6,19$) E , das Probenextraktvolumen auf der Platte V_E und die Schichtdicke d sowie die Frischmasse (FM) geteilt (Formel 3). Zur Berechnung der Saccharosekonzentration wurde aufgrund der Disaccharidstruktur der Nenner (siehe Formel 3) zusätzlich mit 2 multipliziert.

$$c \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right) = \frac{\Delta H \cdot V_M (\mu\text{L}) \cdot V_{TE} (\mu\text{L})}{E \left(\frac{\mu\text{L}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right) \cdot V_E (\mu\text{L}) \cdot d (\text{cm}) \cdot FM (\text{g})} \quad (3)$$

Die Stärke wurde vollständig zu Glucose abgebaut und nach der Methode von Hajirezaei et al. (2000) bestimmt. Dabei wurde die Stärkekonzentration als Glucoseäquivalente in μmol pro Gramm Frischmasse berechnet, wobei hier im Vergleich zu den löslichen Zuckern zwei weitere Größen (Inkubationsvolumen (V_I) und das Aliquotvolumen (V_A) aus dem Stärkeverdau) eingeführt wurden (Formel 4).

$$c \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right) = \frac{\Delta H \cdot V_M (\mu\text{L}) \cdot V_{TE} (\mu\text{L}) \cdot V_I (\mu\text{L})}{E \left(\frac{\mu\text{L}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right) \cdot V_E (\mu\text{L}) \cdot V_A (\mu\text{L}) \cdot d (\text{cm}) \cdot FM (\text{g})} \quad (4)$$

Der Gesamtgehalt der nicht strukturellen Kohlenhydrate wurde als Summe von Glucose, Fructose und Saccharose sowie Stärke berechnet und das Hexose / Saccharose-Verhältnis bestimmt.

2.10 Bestimmung des Gesamtstickstoff- und Kohlenstoffgehaltes

Der Gesamtstickstoffgehalt und der Gesamtkohlenstoffgehalt in Petunienstecklingen wurden nach der DUMAS-Methode bestimmt (Ehrenberger, 1991). Vor der Messung wurden die Proben für 24 Stunden bei 60 °C getrocknet und danach mit einer Mühle (Rotor Speed Mill Fritsch, Idar-Oberstein, Deutschland) gemahlen. Eine Probe wurde aus 16 Stecklingen vereinigt. Es wurden je drei biologische Wiederholungen zweifach mit einem Elementaranalysator (Elementar Analysensysteme, Hanau, Deutschland) gemessen (n = 6). Mit diesem Gerät wurden die Proben (10 – 20 mg) nach dem DUMAS-Verfahren katalytisch in Sauerstoffatmosphäre bei 980 °C verbrannt und die entstehenden Verbrennungsgase analysiert. Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff werden in die Oxidationsprodukte Kohlenstoffdioxid, Wasser sowie Stickoxide (NO, NO₂) überführt. Als Trägergas dient Helium, welches die Oxide über ein Reduktionsrohr leitet. Bei 550 °C erfolgt die quantitative Reduktion zu Stickstoff und Kohlenstoff, deren Gehalt mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor analysiert wird.

2.11 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Gesamtproteinmenge wurde mit dem Bradford-Proteinassay (Bradford, 1976) von BIO-RAD (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt, um die Enzymaktivitätsmessungen in Blatt und Stängelbasis der Petunienproben auf den Gesamtproteingehalt zu normieren. Der Farbstoff Coomassie brilliant blue hat ein Absorptionsmaximum von 465 nm. Im sauren Milieu bindet dieser Farbstoff an Proteine, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm führt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist das Maß für die Proteinkonzentration in der gemessenen Probe bezogen auf einen BSA-Standard (BIO-RAD). Zehn µL des Probenextraktes (Kapitel 2.12.2) wurden mit 230 µL Aqua dest. in Mikrotiterplatten-Wells vorgelegt. Anschließend wurden 60 µL der Bio-Rad-Stammlösung (mit Ethanol, Phosphorsäure) zugegeben und für zehn Min. inkubiert. Die Absorption wurde

bei 595 nm gemessen. Man erhält ohne weitere Berechnung die Konzentration in μg Protein pro $10\ \mu\text{L}$ Probe. Die Umrechnung erfolgte in mg Protein bezogen auf das für die Homogenisierung der Proben eingesetzte Puffervolumen ($500\ \mu\text{L}$) (Kapitel 2.12.2).

2.12 Bestimmung der Aktivitäten von ausgewählten Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels

2.12.1 Prinzip der Methode

Die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf dem Prinzip der Ab- oder Zunahme der Konzentration von $\text{NADH}+\text{H}^+$. Durch Zugabe der jeweiligen Substrate, die durch die zu bestimmenden Enzyme umgesetzt werden, wird die Reaktion gestartet. $\text{NADH}+\text{H}^+$ besitzt ein Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Messung der Exktinktionsveränderung wird pro Zeit angegeben ($\Delta E / \text{min}$). Alle nachfolgenden Enzymaktivitäten wurden photometrisch mit einem Gesamtvolumen von $300\ \mu\text{L}$ bestimmt. Alle Messungen erfolgten im linearen Anstieg der Produktbildung.

2.12.2 Probenextraktion

Zu jedem Termin und für jede Behandlung wurden je sechs Proben der Stängelbasis und des Blattgewebes genommen ($n = 6$). Die Probenextraktion wurde nach der Methode von Zrenner et al. (1995) mit geringen Veränderungen durchgeführt. Die Proben (zweimal $0,5\ \text{cm}$ Stängelbasis, 2 Blattscheiben) wurden mit einer Kugelschwingmühle (Retsch, Haan, Deutschland) im gefrorenen Zustand zerkleinert und nach Zugabe von $500\ \mu\text{L}$ Puffer (1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 15 % Glycerin, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris, 5 mM Mercaptoethanol, 0,1 mM Pefablocphosphatase-Inhibitor, pH 6,8) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Min. bei $4\ ^\circ\text{C}$ zentrifugiert (14000 rpm, Kühlzentrifuge HERAEUS, England), der Überstand wurde abgezogen, in $20\ \mu\text{L}$ aliquotiert und bei $-80\ ^\circ\text{C}$ eingefroren. In den nachfolgenden Kapiteln sind die Schritte der Probenaufbereitung zur Messung der jeweiligen Enzymaktivitäten erläutert. Eine Übersicht der dafür verwendeten Pufferlösungen sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Übersicht der Pufferzusammensetzung zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivität	Puffer
Invertasen	Puffer I: 100 mM Imidazol-HCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 6,9 Puffer II: 100 mL Puffer I, 150 mg NAD
Glucokinase	100 mM Tris, 5,5 mM MgSO ₄ , 4 mM ATP und 0,8 mM NAD, pH 8,0
Phosphofruktokinase	75 mM Hepes, 15 mM MgCl ₂ , 5 mM Fructose-6-Phosphat, 0,1 mM NADH, pH 7,9
cytosolische FBPase	100 mM Imidazol, 5 mM MgCl ₂ , 0,25 mM NADP, pH 7,1
Glucose-6-P Dehydrogenase	100 mM Glycylglycin Puffer, 150 mM MgSO ₄ , 150 mM Glucose-6-Phosphat, 60 mM NADP, pH 8,0
Pyruvatkinase	50 mM TES, 10 mM MgCl ₂ , 40 mM KCl, 0,1 mM NADH, 2 mM DTT, 0,5 mM PEP, pH 7,9

2.12.3 Vakuoläre und cytosolische Invertasen

Die Aktivitätsmessungen der vakuolären und cytosolischen Invertasen wurde nach der Methode von Zrenner et al. (1996^b) durchgeführt. 20 µl der aufgetauten Probe wurden zur Messung der vakuolären Invertaseaktivität mit 30 µL Aqua dest., 20 µL 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,2) und 20 µL 0,5 M Saccharoselösung für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µL 1 M Tris-Puffer (pH 8,0). Die Proben wurden für fünf Min. bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Inkubation für die Bestimmung der cytosolischen Invertaseaktivität erfolgte mit 40 µL Aqua dest., 20 µL 50 mM Hepes (pH 7,5) und 20 µL 0,5 M Saccharoselösung für drei Stunden bei 37 °C. Die Proben wurden fünf Min. bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. 290 bis 280 µL Reaktionspuffer (Tab. 2) und 10 bis 20 µL Probenvolumen wurden

auf die Mikrotiterplatte (Corning Inc., Corning, USA) gebracht. Bei der Reaktion wird Saccharose von der Invertase in Glucose und Fructose gespalten. Die Enzyme Hexokinase und Phosphoglucoisomerase katalysieren die weitere Umwandlung zu Glucose-6-Phosphat. Als letzter Schritt wird das Endprodukt 6-Phosphogluconolacton gebildet, bei dem Wasserstoff auf das Co-Enzym NAD^+ übertragen wird. Die entstandene Menge $\text{NADH}+\text{H}^+$ wird bei 340 nm photometrisch bestimmt.

Die Enzymaktivität U wurde in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein berechnet (Formel 5). Dabei wurde die Extinktionsdifferenz aus der ermittelten Probe (ΔH) und dem Nullwert (ΔH_{NW}) mit dem Messvolumen V_M , dem totalen Extraktvolumen V_{TE} und dem Inkubationsvolumen V_I multipliziert und durch das Produkt aus dem $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Extinktionskoeffizienten E , der Schichtdicke d , der Inkubationszeit t_I , Probenextraktvolumen V_E und dem Probeninkubationsvolumen V_{PI} sowie dem Proteingehalt P der Probe geteilt. Die Multiplikation mit dem Faktor 1000 diente der Umrechnung der Enzymaktivität von μmol in nmol .

$$U \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right) = \left[\frac{(\Delta H - \Delta H_{NW}) \cdot V_M (\mu\text{L}) \cdot V_{TE} (\mu\text{L}) \cdot V_I (\mu\text{L})}{E \left(\frac{\mu\text{L}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right) \cdot d (\text{cm}) \cdot t_I (\text{min}) \cdot V_E (\mu\text{L}) \cdot V_{PI} (\mu\text{L}) \cdot P (\text{mg})} \right] \cdot 1000 \quad (5)$$

2.12.4 Glucokinase

Die Glucokinase gehört zu den Hexokinasen und katalysiert die Phosphorylierungsreaktion der Glucose zu Glucose-6-Phosphat. 30 bis 40 μL Probe wurden auf der Mikrotiterplatte mit 260 bis 270 μL Reaktionspuffer (siehe Tab. 2) und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL Glucose einer 60 mM Stammlösung gestartet. Die Messung der Extinktion von $\text{NADH}+\text{H}^+$ erfolgte bei 340 nm.

Die Enzymaktivität U wurde in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein berechnet (Formel 6). Es wurde die Extinktionsdifferenz aus der ermittelten Probe (ΔH) und dem Nullwert (ΔH_{NW}) mit dem Messvolumen V_M und dem totalen Extraktvolumen V_{TE} multipliziert und durch das Produkt

aus dem $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Extinktionskoeffizienten E , der Schichtdicke d , dem Faktor 60 und dem Probenextraktvolumen V_E sowie dem Proteingehalt P der Probe geteilt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte für die in den Kapiteln 2.12.5 bis 2.12.8 aufgelisteten Enzyme auf dem gleichen Weg.

$$U\left(\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}\right) = \left[\frac{(\Delta H - \Delta H_{NW}) \cdot V_M (\mu\text{L}) \cdot V_{TE} (\mu\text{L})}{E\left(\frac{\mu\text{L}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}\right) \cdot d(\text{cm}) \cdot 60(\text{min}) \cdot V_E (\mu\text{L}) \cdot P(\text{mg})} \right] \cdot 1000 \quad (6)$$

2.12.5 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

20 bis 40 μL Probe wurden mit 260 bis 280 μL Reaktionspuffer (Tab. 2) in Mikrotiterplattenwells gegeben. Die Zugabe von 20 μL Glucose-6-phosphat startete die Umwandlung zu 6-Phosphogluconolacton. Bei dieser Reaktion erfolgt die Übertragung von Wasserstoff auf NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$, dessen Extinktion bei 340 nm gemessen wurde. Die Berechnung erfolgte wie in Formel 6 dargestellt (Kapitel 2.12.4).

2.12.6 Phosphofruktokinase

Die Aktivität der Phosphofruktokinase wurde in Anlehnung an Wong and ap Rees (1971) durchgeführt. 15 μL Probe wurden mit 285 μL Puffer (siehe Tab. 2) in Mikrotiterplattenwells gemischt. Dazu wurden nacheinander je 1 μL der Enzyme Aldolase, Glycerol-3-phosphatdehydrogenase und Triosephosphatisomerase (1,0 U) gegeben. Die Reaktion wurde nach fünf Min. Vorinkubation bei Raumtemperatur mittels Zugabe von 20 μL 1 mM ATP-Lösung gestartet. Am Ende der Reaktionskette entsteht aus Dihydroxyacetonphosphat Glucose-3-Phosphat, wobei $\text{NADH}+\text{H}^+$ dehydrogeniert wird und die Extinktion bei 340 nm abnimmt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt wie in Formel 6 (Kapitel 2.12.4).

2.12.7 Cytosolische Fructose-1,6-bisphosphatase

Die Bestimmung der Aktivität der cytosolischen Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) wurde nach der Methode von Kelly et al. (1982) durchgeführt. 40 μL Probe, 260 μL Puffer (Tab. 2) und je 1 μL der Enzyme Glucose-6-phosphatdehydrogenase und Phosphoglucoseisomerase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) wurden nacheinander auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Durch die Zugabe von 20 μL 50 mM Fructose-1,6-bisphosphat (F1,6-BP) wurde die Reaktion gestartet. F1,6-BP wird mittels FBPase zu Fructose-6-Phosphat dephosphoryliert. Über das Zwischenprodukt Glucose-6-Phosphat erfolgt die Umwandlung in 6-Phosphogluconolacton. Dabei entsteht $\text{NADH}+\text{H}^+$, dessen Extinktion bei 340 nm gemessen wird. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte wie unter Kapitel 2.12.4 beschrieben.

2.12.8 Pyruvatkinase

Die Bestimmung der Pyruvatkinase (PK) erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ireland et al. (1980). 10 bis 30 μL der Probe wurden zu 270 bis 290 μL Puffer (Tab. 2) gegeben und mit 1 μL Laktatdehydrogenase (4 U) vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL 1 mM ADP-Lösung gestartet. Die PK katalysiert die Reaktion von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat unter der Bildung von ATP. Pyruvat wird in einem nächsten Schritt zu Lactat umgewandelt, wobei das Co-Enzym $\text{NADH}+\text{H}^+$ Wasserstoff abgibt und zu NAD^+ reagiert. Die abgesunkene Extinktion von $\text{NADH}+\text{H}^+$ wird bei 340 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte wie in Formel 6 dargestellt (Kapitel 2.12.4).

2.13 CO_2 -Gaswechsellmessungen

2.13.1 Messprinzip des CO_2 -Gaswechsels

Die Messung der CO_2 -Gaswechselraten von Petunienstecklingen erfolgte in einem offenen System. Dafür wurden in einer Klimakammer 20 Bewurzelungsschalen mit je 16 Stecklingen in zwei Reihen aufgebaut. Als Messküvetten dienten die mit einer lichtdurchlässigen Haube abgedeckten Schalen, so dass der Gaswechsel von max. 20 Küvetten pro Versuch aufgezeichnet werden konnte. Unter dieser Voraussetzung wurden die CO_2 -Gaswechselraten des gesamten Stecklings in seiner natürlichen Bewurzelungsumgebung über die komplette

Versuchszeit unter nicht invasiven Bedingungen detektiert. Kammerluft wurde über eine Pumpe angesaugt und den Schalen zugeführt (Abb. 8).

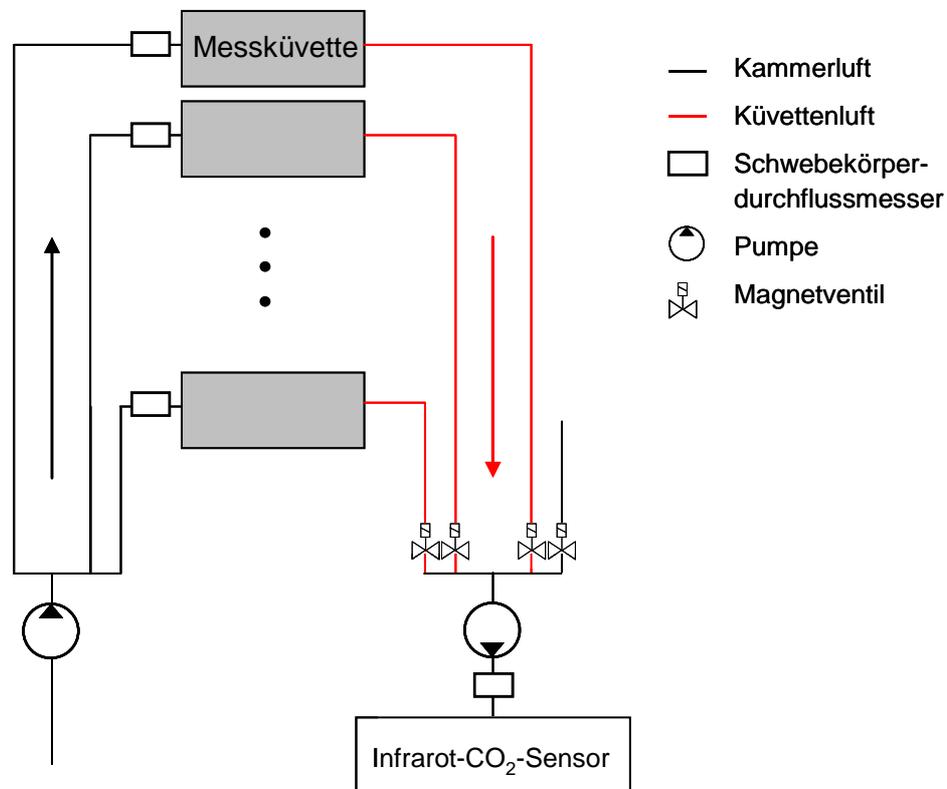


Abb. 8: Prinzip der Gaswechsellagerung.

Über eine Pumpe wurde Kammerluft angesaugt und über Schläuche zu den Messküvetten transportiert. Vorgeschaltete Schwebekörperdurchflussmesser regulierten eine Luftzufuhr von 190 L/h. Über eine zweite Pumpe wurde nun Luft aus den Messküvetten und der Kammer (Referenz) abgesaugt und über Magnetventile einem Infrarot-CO₂-Sensor zur Messung zugeführt. Die Durchflussmenge von 60 L/h wurde durch Schwebekörperdurchflussmesser geregelt.

Mit Hilfe eines vorgeschalteten Schwebekörperdurchflussmessers (WESTPHAL, Ottobrunn) wurde eine Luftdurchflussmenge von 190 L/h in die Messküvetten gepumpt. Der CO₂-Gehalt in der Kammer wurde so eingestellt, dass unter der Haube eine Konzentration von ca. 400 ppm erreicht wurde. Der Übergang von Haube und Bewurzelungsschale wurde mit Plastikfolie abgedichtet, um unkontrollierten Eintritt von Luft ausschließen zu können. Über eine zweite Pumpe wurde nun Luft aus den Bewurzelungsschalen bzw. der Kammer abgesaugt und über Magnetventile (SIRAI, Bussero, Italien) einem Infrarot-CO₂-Sensor (LICOR LI820, Lincoln, USA) zugeführt. Die Durchflussmenge (60 L/h) wurde auch hier per Schwebedurchflussmesser (WESTPHAL, Ottobrunn) geregelt (Abb. 8). Die CO₂-Konzentration einer Bewurzelungsschale wurde gemessen, nach einer Minute erfolgte die Messung der Kammerluft als Referenz. Ein Messzyklus aller Schalen mit dazwischen

geschalteter Referenzluftmessung betrug 40 Minuten und wurde 24 Stunden pro Tag bis zum Versuchsende aufgezeichnet. Eine abwechselnde Messung der Kammer- und Küvettenluft war notwendig, da die Bedingungen in der Klimakammer nicht über die gesamte Zeit konstant gehalten werden konnten (Durchführung von Arbeiten im Versuch, z. B. Bewässerung der Stecklinge), so dass die Kammerluftmessung als aktuelle Bezugsbasis diente. Die PPFD in der Klimakammer betrug $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ von 8:00 bis 18:00 Uhr. Die Temperatur wurde tagsüber auf $22 \text{ }^\circ\text{C}$, nachts auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Diese Standardbedingungen wurden für den Vergleich von kalt-dunkel behandelten und unbehandelten Stecklingen während der gesamten Versuchszeit eingehalten.

Für die Aufnahme von Optimums- und Sättigungskurven wurden die Standardbedingungen an den jeweiligen Versuchstagen variiert. Die lichtabhängigen CO_2 -Gaswechselraten (Lichtsättigungskurven) wurden mit vier unterschiedlichen PPFD's aufgenommen ($50, 100, 250$ und $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), wobei die Temperatur auf $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und die CO_2 -Konzentration auf ca. 400 ppm in den Messküvetten entsprechend der Standardbedingungen fixiert wurden. Nach Anpassung der gewünschten Lichtintensität wurde der Gaswechsel für 45 bis 90 Min. gemessen. Des Weiteren wurde die Nettphotosyntheserate in Abhängigkeit von fünf verschiedenen CO_2 -Konzentrationen aufgenommen ($300, 400, 500, 800, 1000$ und 1300 ppm). Zudem wurden zur Bestimmung der Nettphotosyntheserate und Dunkelatmung in Abhängigkeit von der Temperatur Programme mit unterschiedlichen Temperaturen (12 bis $32 \text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt.

2.13.2 Berechnungen

2.13.2.1 Netto- CO_2 -Gaswechsel

Die CO_2 -Nettogaswechselraten (GW_{neth}) der Messküvetten wurden aus der Differenz der CO_2 -Konzentrationen von Kammer- und Küvettenluft (ΔCO_2) und der Durchflußrate ($DR, 0,19 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) berechnet, wobei die Dichte von CO_2 ($\rho = 1980 \text{ g m}^{-3}$) der Umrechnung von Volumen auf Masse dient (Formel 7).

$$GW_{neth} \left[\frac{\text{g CO}_2}{\text{Schale} \cdot \text{h}} \right] = \Delta\text{CO}_2 \left[\frac{\text{m}^3}{\text{m}^3} \right] \cdot DR \left[\frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right] \cdot \rho_{\text{CO}_2} \left[\frac{\text{g}}{\text{m}^3} \right] \quad (7)$$

Die CO₂-Gaswechselraten wurden aus den Tagesmittelwerten von je acht Schalen kalkuliert. Im Ergebnisteil werden die Nettogaswechselraten in der dafür üblichen, auf die Blattfläche (*BF*) und molare Masse ($M_{CO_2} = 44 \text{ g mol}^{-1}$) bezogenen Einheit angegeben (GW_{net}) (Formel 8) oder auf einen Steckling bezogen (GW_{net2}) (Formel 9). Der Term (Formel 9) wurde mit dem Faktor 16^{-1} multipliziert, da in jeder Messküvette 16 Stecklinge bewurzelt.

$$GW_{net} \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right] = \frac{GW_{neth} \left[\frac{\text{g CO}_2}{\text{Schale} \cdot \text{h}} \right] \cdot 10^6}{BF \left[\frac{\text{m}^2}{\text{Schale}} \right] \cdot M_{CO_2} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot 3600 \left[\frac{\text{s}}{\text{h}} \right]} \quad (8)$$

$$GW_{net2} \left[\frac{\text{nmol CO}_2}{\text{Steckling} \cdot \text{s}} \right] = \frac{GW_{neth} \left[\frac{\text{g CO}_2}{\text{Schale} \cdot \text{h}} \right] \cdot 10^9}{16 \left[\frac{\text{Steckling}}{\text{Schale}} \right] \cdot M_{CO_2} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot 3600 \left[\frac{\text{s}}{\text{h}} \right]} \quad (9)$$

Bei Licht gemessene Nettogaswechselraten werden im Weiteren als Nettophotosyntheseraten (P_{net}) bezeichnet, während die negativen Werte der bei Dunkelheit ermittelten Gaswechselraten als Atmungsraten (D_A) angesehen werden.

Die Bruttphotosyntheserate (P_{gross}) wurde aus der Nettophotosyntheserate (P_{net}) und der unter sonst gleichen Bedingungen geschätzten Atmungsrate (D_A) abgeleitet (Formel 10).

$$P_{gross} \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right] = P_{net} \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right] + D_A \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right] \quad (10)$$

2.13.2.2 Berechnung der Bilanz

Um eine Bewertung der Assimilataausnutzung vornehmen zu können, wurde die in den Küvetten gemessene Nettokohlenstoffaufnahme (C_{net}) und die Menge an Kohlenstoffzuwachs aus den Pflanzentrockenmasseanalysen (C_{TM}) einander vergleichend gegenüber gestellt. Die über den Versuchszeitraum vom Steckling aufgenommene Kohlenstoffmenge C_{net} ergibt sich aus der Nettoaufnahme in den Lichtphasen abzüglich der Atmung in den Dunkelphasen, also

aus der Summe des Netto-CO₂-Gaswechsels, wobei n die Anzahl der 40 minütigen Messintervalle darstellt (Formel 11). Für die unbehandelten Stecklinge ergibt sich ein Zeitraum von 16 Tagen bzw. für den Vergleich mit kalt-dunkel behandelten Stecklingen von sieben Tagen. Die Anzahl der Stecklinge je Schale (16), der Quotient der Atom- bzw. molaren Masse von Kohlenstoff ($M_C = 12 \text{ g mol}^{-1}$) und CO₂ ($M_{CO_2} = 44 \text{ g mol}^{-1}$) sowie die Dauer eines Messzyklus von 40 Min. musste berücksichtigt werden.

$$C_{net} \left[\frac{gC}{\text{Steckling}} \right] = \sum_{i=1}^n GW_{neth_i} \left[\frac{g \text{ CO}_2}{\text{Schale} \cdot h} \right] \cdot \frac{40 \left[\frac{\text{min}}{\text{min}} \right]}{60 \left[\frac{\text{min}}{\text{min}} \right]} \cdot \frac{1}{16 \left[\frac{\text{Steckling}}{\text{Schale}} \right]} \cdot \frac{M_C \left[\frac{g}{\text{mol}} \right]}{M_{CO_2} \left[\frac{g}{\text{mol}} \right]} \quad (11)$$

Die Berechnung von C_{TM} ist in Formel 12 dargestellt. Das Produkt der Trockenmasse pro Steckling zum Startzeitpunkt t_1 (TM_{t1}) und dem Kohlenstoffgehalt zum Zeitpunkt t_1 pro Trockenmasse (C_{t1}) wurde von dem Produkt aus der Trockenmasse pro Steckling zum Endzeitpunkt t_2 (TM_{t2}) und dem Kohlenstoffgehalt zum Zeitpunkt t_2 pro Trockenmasse (C_{t2}) subtrahiert.

$$C_{TM} \left[\frac{gC}{\text{Steckling}} \right] = \left[TM_{t2} \left[\frac{gTM}{\text{Steckling}} \right] \cdot C_{t2} \left[\frac{gC}{gTM} \right] \right] - \left[TM_{t1} \left[\frac{gTM}{\text{Steckling}} \right] \cdot C_{t1} \left[\frac{gC}{gTM} \right] \right] \quad (12)$$

2.13.2.3 Carbon Use Efficiency (CUE)

Die Carbon Use Efficiency (CUE) ist definiert als Quotienten des im Trockenmassezuwachs gefundenen Kohlenstoffs (C_{TM}) und der Brutto-Kohlenstoff-Assimilation (C_{gross}) und ist dimensionslos (Formel 13). C_{gross} wird analog zu C_{net} (Formel 11) aus der Summe der Messzyklen der Bruttophotosynthese berechnet.

$$CUE \left[- \right] = \frac{C_{TM} \left[\frac{gC}{\text{Steckling}} \right]}{C_{gross} \left[\frac{gC}{\text{Steckling}} \right]} \quad (13)$$

2.13.2.4 Optimums- und Sättigungskurven der Netto-CO₂-Gaswechselraten

Die Temperaturoptimumskurven (Formel 14) sowie die CO₂- und Lichtsättigungskurven (Formel 15 und 16) der Nettogaswechselraten (GW_{net}) sind nach mathematischen Modellgleichungen durch Exponentialfunktionen mit den spezifischen Konstanten a_0 , a_1 und a_2 und den jeweiligen Variablen der gemessenen Temperatur (V_T), CO₂-Konzentration (V_{CO_2}) und Lichtintensität (V_{PPFD}) beschrieben. Für die Berechnung der Temperaturoptimumskurven wurde eine Dichte von CO₂ mit $\rho = 1980 \text{ g m}^{-3}$ angenommen. Die Anpassung der Dichte an erhöhte Temperaturen wurde für die Berechnungen nicht berücksichtigt.

$$GW_{net} \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2\text{s}} \right] = a_0 + a_1 \cdot V_T + a_2 \cdot V_T \cdot V_T \quad (14)$$

$$GW_{net} \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2\text{s}} \right] = a_0 [1 - \exp(a_1 + a_2 \cdot V_{CO_2})] \quad (15)$$

$$GW_{net} \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2\text{s}} \right] = a_0 [1 - \exp(a_1 + a_2 \cdot V_{PPFD})] \quad (16)$$

Die Parameter in den Formeln 14 bis 16 wurden aus den gemessenen Gaswechselraten mit quasilinearer Regression bzw. der Levenberg-Marquardt Iteration geschätzt. Dazu wurde die Software Statistica Version 6.1. (StatSoft, Inc, Tulsa, USA) genutzt.

Aus der Gleichung 16 können die maximale CO₂-Gaswechselrate (a_0) und der Lichtsättigungspunkt (LSP) abgeleitet werden (Formel 17).

$$LSP \left[\frac{\mu\text{mol CO}_2}{\text{m}^2\text{s}} \right] = \ln \left(\frac{0,1 \cdot a_0}{a_2} \right) \cdot \left(\frac{1}{a_1} \right) \quad (17)$$

2.14 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurde mit Statistika Version 6.1. (StatSoft, Inc, Tulsa, USA) und Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Die Auswertung wurde mittels ANOVA in Kombination mit dem Tukey HSD Test ausgewertet, wenn eine Normalverteilung innerhalb der Gruppen und eine Varianzhomogenität gegeben waren. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft, die Varianzhomogenität wurde mit dem Levene's Test durchgeführt. Wurden die Annahmen nicht erfüllt, so wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test oder dem Kruskal-Wallis-Test ein nicht parametrischer Mittelwertsvergleich angestellt und auf Signifikanz geprüft.

Die Homogenität der Varianzen von Wurzelanzahl und Gesamtwurzellänge wurde mit dem F-Test bestimmt ($n = 40$). Die Signifikanzen der einzelnen Wurzelraten wurde aus dem Mittelwert von zehn Stecklingen aus vier Wiederholungen ($n = 4$) geprüft. Das Datenset der histologischen Untersuchungen wurde mit $n = 10$ mittels Kontingenztafeln und dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanzen überprüft. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgelegt. Der F-Test für die Bestimmung der Varianzhomogenität von Wurzelanzahl und Gesamtwurzellänge wurde mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Bewurzelung von Petunienstecklingen

Zu Beginn dieser Arbeit erfolgten Bewurzelungsversuche an unbehandelten Petunienstecklingen, welche von den Mutterpflanzen abgeschnitten, direkt in Schalen mit Bewurzelungssubstrat gesteckt und einem Hell-Dunkel-Rhythmus (Tageslänge: 10 h; in der Folge als „Lichtphase“ bezeichnet) zur Bewurzelung ausgesetzt wurden (eingestellte Klimakammerparameter: Temperatur: 22 °C / 20 °C (Tag / Nacht); PPFD: 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Für die Einordnung des zeitlichen Ablaufs der Bewurzelung wurden Stecklinge für 16 Tage als auch für neun Tage der Lichtphase ausgesetzt und abschließend die Anzahl sichtbarer Wurzeln (Wurzelnanzahl), die Gesamtwurzellänge und die Bewurzelungsrate der Stecklinge bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass erste kleine Wurzelspitzen am achten Tag nach dem Stecken an der Stängelbasis sichtbar waren. Die abschließenden Bestimmungen der Wurzelnanzahl und der Gesamtwurzellänge pro Steckling sowie die Bewurzelungsrate zeigten, dass eine längere Bewurzelungsphase von 16 Tagen zu signifikant höheren Ergebnissen aller untersuchten Parameter führte (Abb. 9).

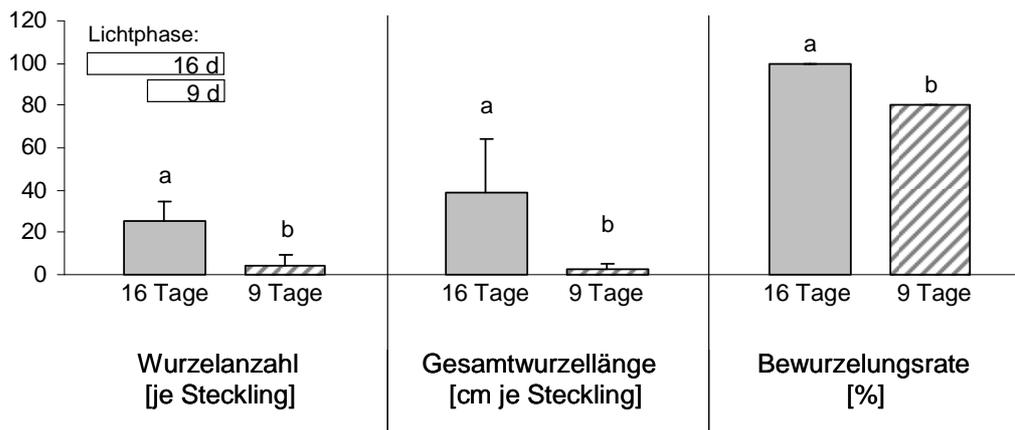


Abb. 9: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Bewurzelung.

Verglichen wurde die Inkubationszeit von 16 und 9 Tage auf die Bewurzelung von unbehandelten Petunienstecklingen; n = 40, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

3.1.1 Einfluss einer Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung

In der Jungpflanzenproduktion werden Stecklinge in Ländern mit hoher Sonneneinstrahlung von Mutterpflanzen geerntet und innerhalb weniger Tage unter dunklen und überwiegend kühlen Bedingungen zu Bewurzelungsstationen in andere Länder transportiert. Dementsprechend sollte getestet werden, ob eine kalte Dunkelbehandlung von Petunienstecklingen auf den Entwicklungsprozess der Adventivwurzeln einen Einfluss nimmt.

Anfänglich wurden Stecklinge unmittelbar nach der Ernte von den Mutterpflanzen für sieben Tage bei 10 °C dunkel gelagert. Dieser Zeitraum wurde mit Stunden nach dem Abschneiden (hours post excision: hpe) definiert. Nach Beendigung der Dunkelperiode wurden die Stecklinge in Schalen mit Bewurzelungssubstrat gesteckt und für neun Tage einer Lichtphase in einer Klimakammer ausgesetzt (Tageslänge: 10 h; Temperatur: 22 °C (Tag) / 20 °C (Nacht); PPFD: 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Phase in Stunden nach dem Stecken wird in den folgenden Kapiteln mit hpin (hours post insertion) abgekürzt. Zum Vergleich des Bewurzelungserfolgs dienten unbehandelte Stecklinge als Kontrolle. Sie wurden direkt nach dem Entfernen von den Mutterpflanzen gesteckt und für 16 Tage der Lichtphase ausgesetzt (Abb. 10). Für die Kontrollstecklinge entsprach der Zeitpunkt des Abschneidens von den Mutterpflanzen also dem Zeitpunkt des Steckens (hpe = hpin). Die Versuchsdauer wurde für beide Stecklingsvarianten auf insgesamt 16 Tage festgesetzt. Am Ende der Experimente wurden die Wurzelanzahl, die Gesamtwurzellänge und die Bewurzelungsrate der kalt-dunkel behandelten Stecklinge mit den Kontrollstecklingen verglichen.

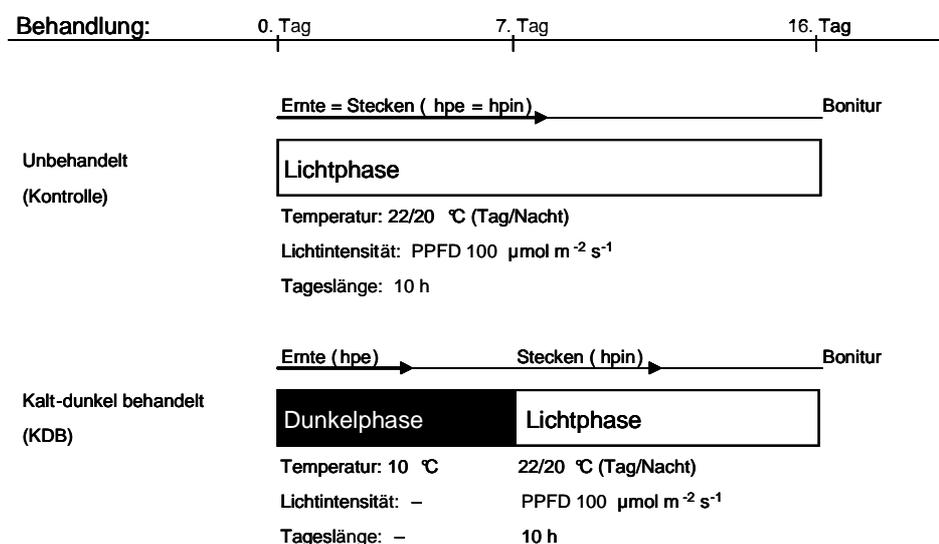


Abb. 10: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung mit unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen.

Die Wurzelanzahl als auch die Gesamtwurzellänge der kalt-dunkel behandelten Stecklinge wiesen keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle auf (Abb. 11). Die Bewurzelungsrate lag bei beiden Varianten bei 100 %. Obwohl die Länge der Lichtphase bei den kalt-dunkel behandelten Stecklingen fast um die Hälfte reduziert wurde, erfolgte eine mit der Kontrolle vergleichbare Bewurzelung. Erste sichtbare Wurzelspitzen an der Stängelbasis waren bei den kalt-dunkel behandelten Stecklingen am fünften Tag nach dem Stecken sichtbar.

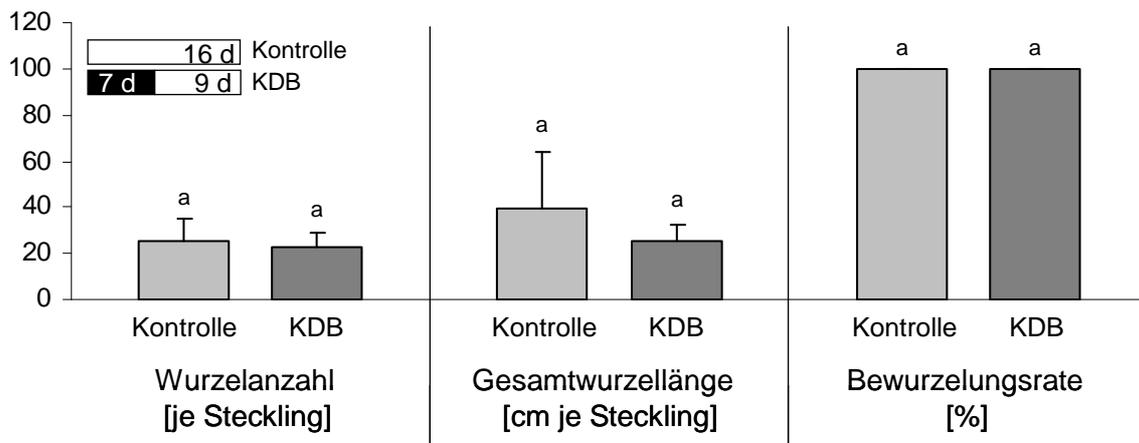


Abb. 11: Einfluss einer kurzzeitigen kalt-dunkel Behandlung auf die Bewurzelung.

Verglichen wurden kurzzeitig ($t = 7$ d) kalt-dunkel behandelte Stecklinge (KDB) mit anschließender Lichtphase ($t = 9$ d) und unbehandelte Stecklinge (Kontrolle) ($t = 16$ d); $n = 40$, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Mögliche Auswirkungen der Dunkelbehandlung auf die AWB wurden weiterhin geprüft, indem die Varianzhomogenität der Bewurzelungsparameter von kalt-dunkel behandelten Stecklingen im Vergleich zur Kontrolle bestimmt wurde. Für die Wurzelanzahl und die Gesamtwurzellänge der kalt-dunkel behandelten Stecklinge zeigten sich geringere Varianzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 12). Somit konnte eine höhere Homogenität der beiden Bewurzelungsparameter in der Gruppe der kalt-dunkel behandelten Stecklinge ermittelt werden.

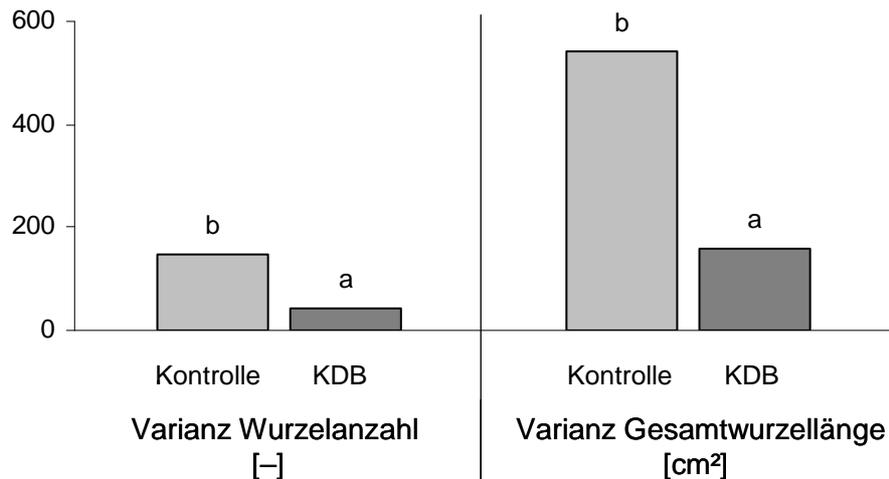


Abb. 12: Einfluss einer kurzzeitigen kalten Dunkelbehandlung (KDB) auf die Varianzhomogenität der Wurzelanzahl und der Gesamtwurzellänge.

Verglichen wurden unbehandelte Stecklinge (Kontrollen) und kalt-dunkel behandelte Stecklinge (KDB); $n = 40$, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikanten Unterschiede (F-Test, $p \leq 0,01$).

Darüber hinaus wurde in einem weiteren Versuch für kalt-dunkel behandelte Stecklinge und unbehandelte Kontrollen die Trockenmasse erfasst. Diese sollte zur genaueren Charakterisierung des Blatt-, Stängel- und Wurzelanteils der Stecklinge herangezogen werden. In Abb. 13 ist der Zuwachs der Gesamttrockenmasse und der Trockenmassen aus Blatt, Stängel sowie Wurzel vom Zeitpunkt der Ernte bis zum 16. Versuchstag von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen dargestellt. Die Gesamttrockenmasse der Kontrolle nahm innerhalb der 16 Versuchstage im Vergleich zu kalt-dunkel behandelten Stecklingen signifikant stärker zu. Zudem zeigte sich auch ein signifikant höherer Zuwachs der Blatt- und Stängeltrockenmasse der unbehandelten Stecklinge. Bei der Gegenüberstellung der sich gebildeten Wurzeltrockenmasse konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und kalt-dunkel behandelten Stecklingen festgestellt werden.

Die absoluten Werte der Trockenmasseuntersuchungen von kalt-dunkel behandelten Stecklingen zeigten, dass es bis zum Ende der Dunkelphase (168 hpe) zu keinen signifikanten Veränderungen der Gesamt-, Blatt- und Stängeltrockenmasse kam (Abb. I, Anhang). Bis zum Ende der Lichtphase stiegen die Trockenmassen der kalt-dunkel behandelten Stecklinge auf ein vergleichbares Niveau der Kontrollen zum Zeitpunkt 168 hpe an. In den ersten 168 hpe erfolgte ein signifikantes Längenwachstum des Stängels der Kontrolle, wohingegen die kalt-dunkel behandelten Stecklinge erst nach dem Beenden der Dunkelphase, ab 168 hpe, ein signifikantes Längenwachstum des Stängels aufwiesen (Abb. Id, Anhang). Die Länge der

kalt-dunkel behandelten Stecklinge zum Versuchsende erreichte ein vergleichbares Niveau wie die unbehandelten Kontrollen 168 hpe. Die gesamte Trockenmasse pro Steckling, die Blatttrockenmasse und die Stängel Trockenmasse sowie die Länge des Stängels der unbehandelten Stecklinge 384 hpe erreichten signifikant höhere Werte als die kalt-dunkel behandelten Stecklinge zum gleichen Zeitpunkt.

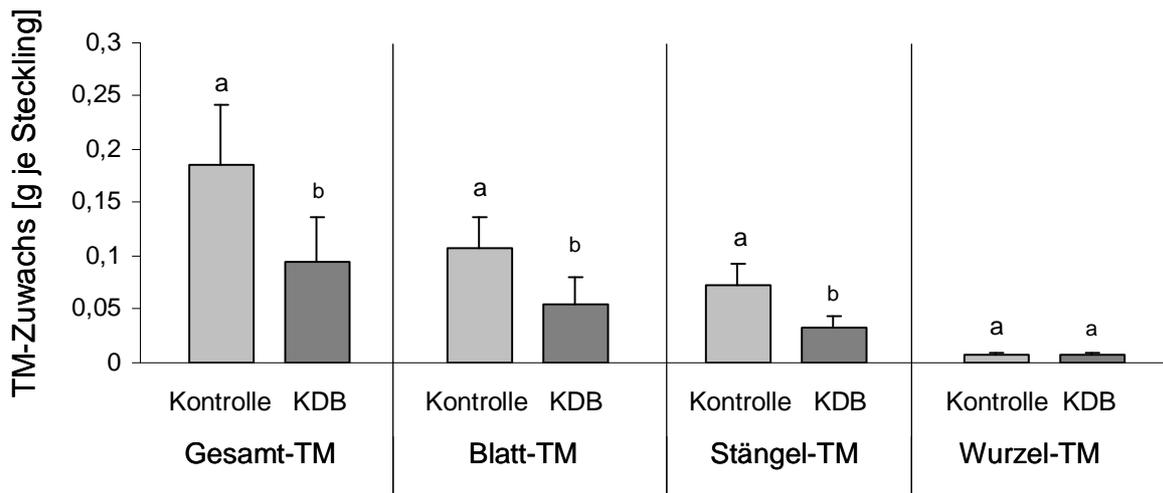


Abb. 13: Trockenmassezuwachs von unbehandelten (Kontrolle) und kalt-dunkel behandelten (KDB) Stecklingen ab Zeitpunkt des Schneiden bis zum 16. Versuchstag.

Verglichen wurde der Zuwachs von Gesamttrockenmasse (Gesamt-TM), Blatttrockenmasse (Blatt-TM) und Stängel Trockenmasse (Stängel-TM) sowie Wurzel Trockenmasse (Wurzel-TM); n = 32.

Für die Entwicklung und das Wachstum von Adventivwurzeln sollten in den folgenden Versuchen möglichst optimale Bedingungen geschaffen werden, indem die Steckdichte in den Bewurzelungsschalen variiert wurde (186 vs. 349 Stecklinge m^{-2}). Aufgrund einer reduzierten Steckdichte sollte eine Beschattung von Blättern weitestgehend vermieden und eine bestmögliche Lichtausnutzung durch den einzelnen Steckling gewährleistet werden.

Die unterschiedlichen Dichten beeinflussten bei unbehandelten Stecklingen die Bewurzelung nicht. Jedoch wurde eine gesteigerte Wurzelanzahl und Gesamtwurzellänge der kalt-dunkel behandelten Stecklinge gefunden, wenn diese mit einer niedrigeren Dichte (186 Stecklinge m^{-2}) in die Bewurzelungsschalen gesteckt wurden (Abb. 14).

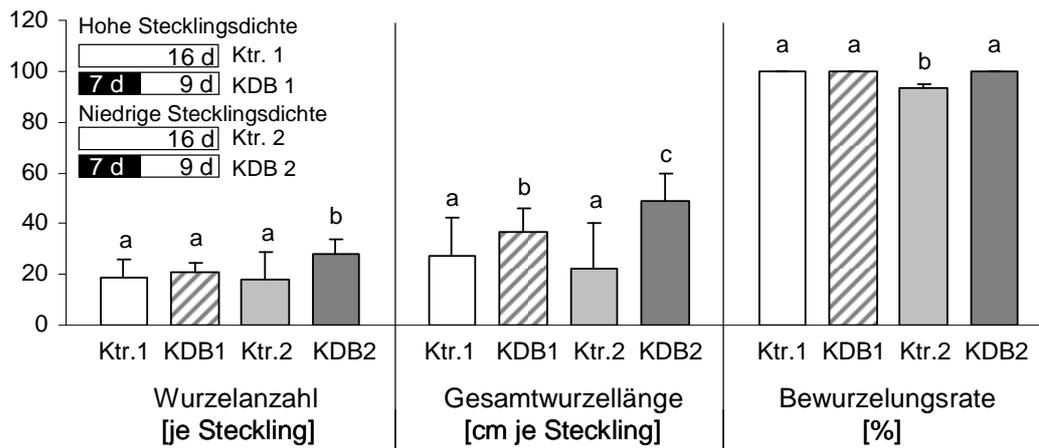


Abb. 14: Einfluss unterschiedlicher Stecklingsdichten während der Lichtphase von kalt-dunkel behandelten Stecklingen (KDB) und unbehandelten Kontrollen (Ktr.) auf die Bewurzelung.

Verglichen wurden unbehandelte Stecklinge hoher Dichte von 349 Stecklingen m^{-2} (Ktr.1) sowie niedriger Dichte von 186 Stecklingen m^{-2} (Ktr.2) mit kalt-dunkel Behandelten ($t = 7d$) mit anschließender Lichtphase ($t = 9d$) mit hoher Dichte von 349 Stecklingen m^{-2} (KDB 1) sowie niedriger Dichte von 186 Stecklingen m^{-2} (KDB 2); $n = 40$, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Um zu ermitteln, wie der Effekt der kalten Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung von der Länge der Behandlungsphase beeinflusst wird, erfolgte der Vergleich von sieben Tagen gegenüber 14 Tagen dunkel behandelten Stecklingen bei 10 °C. Zudem wurde die Periode der Lichtphase von behandelten Stecklingen verlängert. Aufgrund der starken Bewurzelung mit bereits gebildeten Lateralwurzeln der kalt-dunkel behandelten Stecklinge erfolgte die Durchführung der Bonitur in diesem Fall bereits nach 13 Tagen Belichtungsphase. Die Wurzelanzahl, die Gesamtwurzellänge sowie die Bewurzelungsrate waren in beiden Varianten der kalten Dunkelbehandlung gegenüber den jüngeren Stecklingen der Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 15). Ein verstärkter Bewurzelungseffekt durch die Anwendung einer längeren Dunkelperiode von 14 Tagen konnte für die Gesamtwurzellänge aufgezeigt werden, bei der Wurzelanzahl gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsarten der dunkel behandelten Stecklinge. Da die Anwendung einer verlängerten Dunkel- und Lichtperiode nicht zu einer bedeutsamen Erhöhung der Bewurzelung führte, wurde für weitere Untersuchungen die kurzzeitige Dunkelbehandlung von sieben Tagen in Kombination mit einer neuntägigen Lichtphase gewählt.

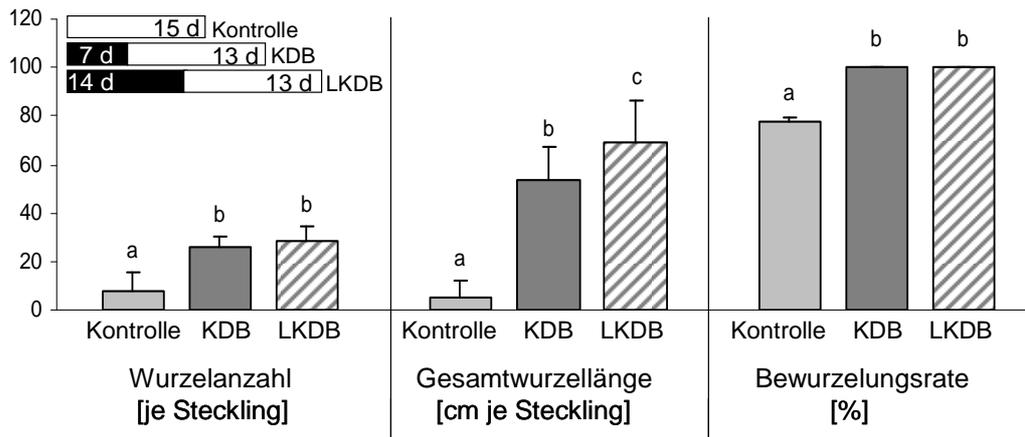


Abb. 15: Einfluss der Dauer einer kalten Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung.

Verglichen wurden unbehandelte Stecklinge (Kontrolle), die für 15 Tage der Lichtphase ausgesetzt waren mit sieben Tagen kalt-dunkel behandelten Stecklingen (KDB) mit sich anschließender 13 tägiger Lichtphase und lange kalt-dunkel behandelten Stecklingen ($t = 14d$; LKDB) mit sich anschließender 13 tägiger Lichtphase; $n = 40$, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

3.1.2 Einfluss unterschiedlicher Lichtintensitäten und Temperaturen auf den Bewurzelungseffekt einer Dunkelbehandlung

Zur weiteren Untersuchung des Effektes der Dunkellagerung sollte herausgefunden werden, in welcher Weise unterschiedliche Lichtintensitäten während der Bewurzelungsphase auf die Entwicklung der Adventivwurzeln Einfluss haben könnten. Behandelte Stecklinge wurden nach sieben Tagen in Dunkelheit je drei verschiedenen Lichtintensitäten von 100, 50 und $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für neun Tage ausgesetzt. Zum Vergleich dienten unbehandelte Stecklinge (Kontrolle), die mit hoher (PPFD: $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder niedriger Lichtintensität (PPFD: $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für 16 Tage bestrahlt wurden. Die Temperatureinstellungen von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (Nacht / Tag) wurden nicht verändert. Es zeigte sich, dass eine Halbierung der Lichtintensität keinen Einfluss auf die Wurzelbildung von unbehandelten Stecklingen hatte (Abb. 16). Wie in den vorherigen Ansätzen konnte auch hier eine verstärkte AWB bei einer vorherigen Dunkelbehandlung gegenüber den unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden, unabhängig von den eingesetzten Lichtintensitäten. Sogar eine Lichtintensität von nur $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ während der Bewurzelungsphase resultierte nach einer Dunkelphase in einer signifikant höheren Gesamtwurzellänge und Bewurzelungsrate gegenüber den unbehandelten Stecklingen. Der Vergleich aller dunkel behandelten Varianten führte zu nur geringfügigen Unterschieden des Bewurzelungsniveaus. Die Prüfung auf Varianzhomogenität

der Wurzelanzahl ergab signifikant geringere Werte aller kalt-dunkel behandelten Stecklinge gegenüber den Kontrollen (Daten nicht gezeigt; F-Test, $p \leq 0,01$).

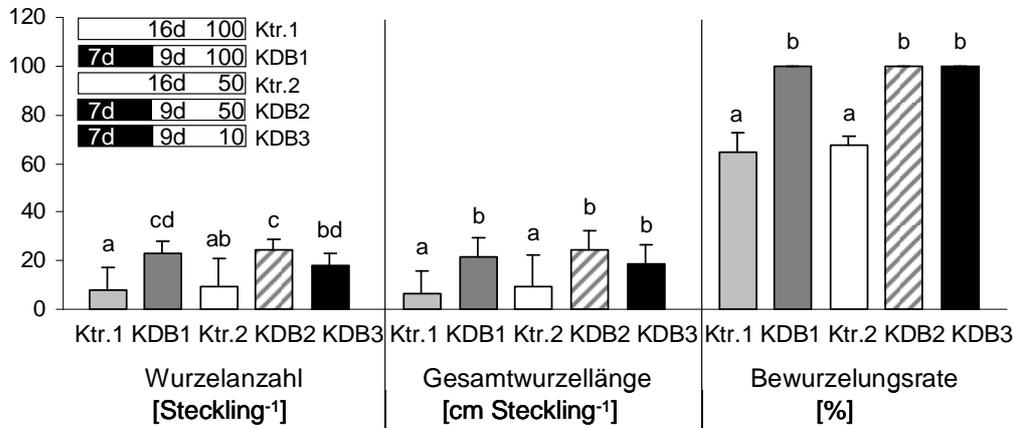


Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher Lichtintensitäten (PPFD: 100, 50, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) auf die Bewurzelungsintensität von unbehandelten Stecklingen (Ktr.) und kalt-dunkel behandelten Stecklingen (KDB).

Verglichen wurden unbehandelte Stecklinge hoher Lichtintensität (Ktr. 1; PPFD: 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sowie niedriger Lichtintensität (Ktr.2; PPFD: 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit kalt-dunkel behandelten Stecklingen hoher Lichtintensität (KDB1; PPFD: 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), niedriger Lichtintensität (KDB2; PPFD: 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und sehr niedriger Lichtintensität (KDB3; PPFD: 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); $n = 40$, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Die Entwicklungsprozesse der AWB werden auch durch die Umgebungstemperatur beeinflusst. Deshalb sollte festgestellt werden, inwieweit unterschiedliche Temperaturen während der Dunkelphase als auch in der Lichtphase die Bewurzelung der Petunienstecklinge verändern. Behandelte Stecklinge wurden entweder warm (20 °C) oder kalt (10 °C) für sieben Tage dunkel gelagert und anschließend für neun Tage bei 20 °C bzw. 10 °C der Lichtphase ausgesetzt. Zudem wurden unbehandelte Stecklinge bei 10 °C oder 20 °C für 16 Tage bewurzelt. Die Bonituren ergaben, dass eine warme Dunkelbehandlung ebenso wie eine kalte Dunkelbehandlung mit einer sich bei 20°C anschließenden Lichtphase zur besten Bewurzelung der Stecklinge führte (Abb. 17). Während sich diese beiden Stecklingsvarianten in der Wurzelanzahl, Gesamtwurzellänge und der Bewurzelungsrate nicht signifikant unterschieden, konnten phänotypische Veränderungen der Stecklinge festgestellt werden. So wiesen die warm-dunkel behandelten Stecklinge am Ende des Experimentes feine dünne Wurzeln und gelbe trockene Blätter auf. Der Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Wachstum der Adventivwurzeln konnte besonders durch die Anwendung der niedrigen Temperatur von 10 °C während der Lichtphase verdeutlicht werden. In unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen wurde die AWB durch die Anwendung der niedrigen

Temperatur während der Lichtphase gehemmt, jedoch bewurzelten unter diesen Bedingungen die warm-dunkel behandelten Stecklinge. Für die Wurzelanzahl und die Gesamtwurzellänge dieser Stecklinge konnten ähnliche Werte wie für die Kontrollen bei 20 °C bestimmt werden, die Bewurzelungsrate war sogar signifikant erhöht. Die Varianzen der Wurzelanzahl und Gesamtwurzellänge aller bewurzelten dunkel behandelten Stecklinge waren signifikant kleiner als die Varianz der unbehandelten Stecklinge (Daten nicht gezeigt; F-Test, $p \leq 0,01$). Die verschiedenen Dunkelbehandlungen resultierten in einer gleichermaßen höheren Homogenität des Bewurzelungsprozesses im Vergleich zu unbehandelten Stecklingen.

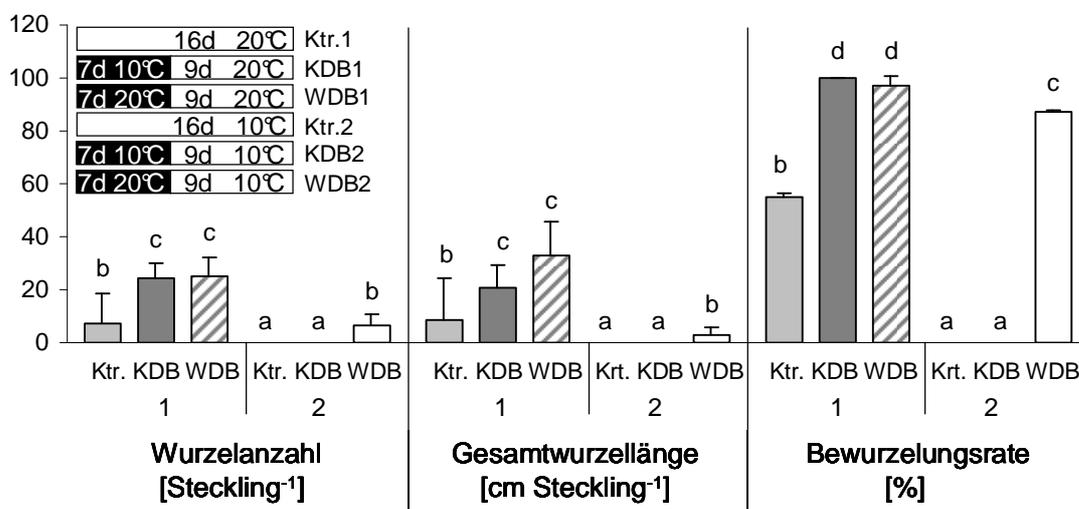


Abb. 17: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen während der Dunkel- und Lichtphase auf die Bewurzelung.

Verglichen wurden kalt-dunkel behandelte (KDB1) und warm-dunkel behandelte (WDB1) Stecklinge mit unbehandelten Stecklingen bei 20 °C während der Lichtphase (Ktr.1) mit kalt-dunkel behandelten (KDB2) und warm-dunkel behandelte (WDB2) Stecklinge mit Unbehandelten bei 10 °C während der Lichtphase (Ktr.2); $n = 40$, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Merkmals zeigen signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Mit Hilfe der durchgeführten Versuche wurde ein für die nachfolgenden Analysen und Untersuchungen geeignetes Standardsystem etabliert. In weiteren unabhängigen Experimenten konnten ähnliche Bewurzelungsergebnisse für kalt-dunkel behandelte Stecklinge im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen erzielt werden, welche die Robustheit der Methode zeigen. Variationen in der Bewurzelung der unbehandelten Stecklinge wurden dabei nicht berücksichtigt. Ein fördernder Effekt einer Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung und die Reduzierung der notwendigen Länge der Lichtphase (16 vs. neun Tage) konnte durch eine Verringerung der Steckdichte der Stecklinge in der Bewurzelungsschale gesichert werden. Eine Verlängerung der Dunkel- bzw. Lichtphase führte nur zu

geringfügigen Veränderungen, so dass ein Versuchszeitraum von 16 Tagen favorisiert wurde. Aufgrund des geringen Einflusses der Lichtintensität auf die Bewurzelung wurde die PPF auf $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ festgesetzt. Ausgehend von Qualitätseinbußen des Gesamtstecklings bei Anwendung einer hohen Temperatur ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) während der Dunkelbehandlung, wurde eine kalte Dunkelbehandlung von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ gewählt und mit $20 \text{ }^\circ\text{C}$ während der Lichtphase kombiniert. Damit wurden alle folgenden Versuche zur Analyse der morphologischen Veränderungen (Kap. 3.2), zum Kohlenhydratmetabolismus (Kap. 3.3) und Aktivität bestimmter Schlüsselenzyme des Kohlenhydrathaushaltes (Kap.3.4) sowie zum CO_2 -Gaswechsel (Kap. 3.5) wie in Abb. 10 (Kap. 3.1.1) durchgeführt.

3.2 Einfluss der kalten Dunkelbehandlung auf morphologische Veränderungen während der AWB in Petunienstecklingen

Für eine genauere Beschreibung zum Ablauf des Bewurzelungsvorgangs von Petunienstecklingen sollte nachfolgend der Beginn von morphologischen Veränderungen während der AWB bestimmt werden und der Einfluss einer kalten Dunkelbehandlungen von Stecklingen auf die Morphologie untersucht werden. Dazu wurde die AWB anhand von Semi-Dünnschnitten von der Stängelbasis der Stecklinge in vier unterschiedliche Entwicklungsstadien eingeteilt (Abb. 18). Eine Zuordnung zum ersten Stadium erfolgte, wenn keine Anzeichen einer zytologischen Veränderung erkennbar waren (Abb. 18a). Das zweite Stadium trat innerhalb der ersten fünf Tage auf. Hierbei waren erste neugebildete meristematische Zellen sichtbar (Abb. 18b). Im folgenden Verlauf konnte ein drittes Stadium mit sich entwickelten Wurzelprimordien, die die typischen „Dom“-Form zeigen, definiert werden (Abb. 18c-d). Das letzte analysierte Entwicklungsstadium (Stadium 4) zeichnete sich durch Längenwachstum von Zellen in den Wurzelprimordien aus. Die Wurzeln befanden sich hierbei kurz vor dem bzw. im Ausbrechen aus dem Stängelgewebe (Abb. 18e-f). Zum Vergleich der morphologischen Änderungen bei der AWB, wurden sowohl unbehandelte (Kap. 3.2.1) als auch kalt-dunkel behandelte Stecklinge (Kap. 3.2.2) analysiert. Die histologischen Analysen wurden vom Zeitpunkt der Ernte bis zum 10. Versuchstag alle 24 Stunden an je zehn Stecklingen durchgeführt.

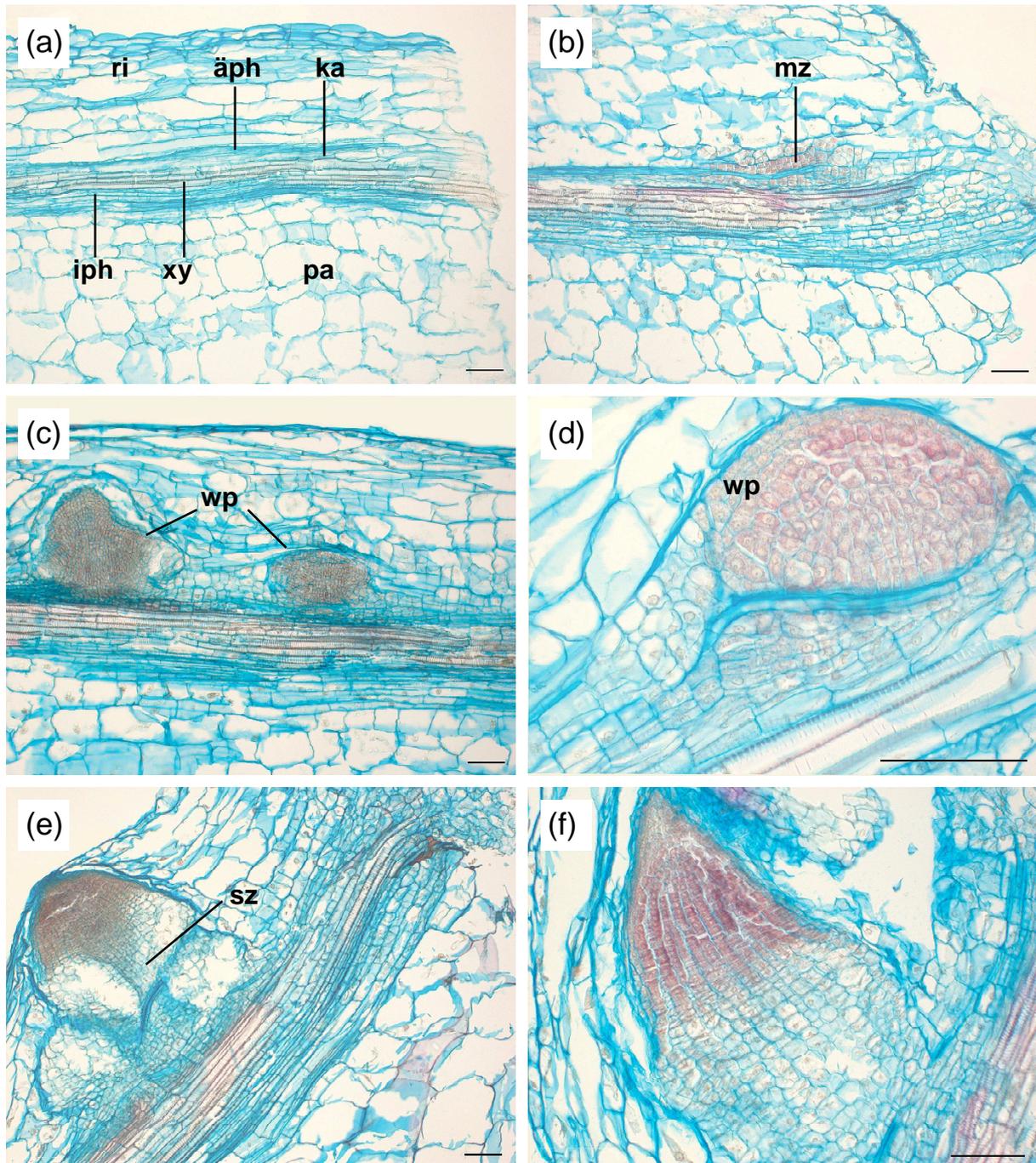


Abb. 18: Einteilung von charakteristischen Entwicklungsstadien der Adventivwurzelbildung in der Stängelbasis von Petunienstecklingen.

Alle Mikrographen zeigen Längsschnitte von 0–0,5 cm oberhalb der Schnittfläche. (a) Stadium 1 ohne sichtbare Anzeichen für die Initiation der Adventivwurzelbildung. Typische Stängelanatomie eines frisch geschnittenen Stecklings bestehend aus der Rinde (ri), dem äußeren Phloem (äph), Kambium (ka), dem Xylem (xy), dem inneren Phloem (iph) und Parenchym (pa). (b) Stadium 2 erste neugebildete meristematische Zellen (mz) (Zellen mit dichtem Zytoplasma und vergrößertem Zellkern). (c) Stadium 3 Differenzierung der meristematischen Zellen zu Wurzelprimordien (wp) mit typischer runder Dom-Form. (d) Vergrößerte Darstellung eines Wurzelprimordiums (wp) bestehend aus meristematischen Zellen. (e) Stadium 4 mit ersten Wurzeln mit Gefäßbündeln, umgeben von Streckungszellen (sz) kurz vor bzw. während des Ausbrechens aus dem Sprossgewebe. (f) Vergrößerte Darstellung einer einzelnen ersten Wurzel. Massstabsbalken in allen Teilbildern entsprechen 100 µm.

3.2.1 Morphologische Veränderungen während der AWB in unbehandelten Stecklingen

Morphologische Änderungen bedingt durch die Induktion der AWB konnten bis 24 Stunden nach der Stecklingsernte (hpe / hpin) nicht beobachtet werden (Stadium 1). Nach 48 hpe zeigten 40 % der untersuchten Stängelproben erste meristematische Zellen (verdichtetes Zytoplasma und vergrößerter Zellkern; Stadium 2). Nach 72 hpe wiesen alle untersuchten Proben meristematische Zellen in der Stängelbasis auf. Die zweite Stufe konnte kontinuierlich bis 144 hpe bei 100 % der Proben beobachtet werden. Danach wurde in einigen Proben die Weiterentwicklung in Wurzelprimordien mit der typischen Dom-Form festgestellt (Stadium 3). Der Zustand der Wurzelprimordienbildung konnte nach 168 hpe in allen zu untersuchenden Proben ermittelt werden, bevor nach 192 hpe vollentwickelte Wurzeln das Stängelgewebe durchbrachen (Stadium 4). Zudem zeigte sich, dass der Übergang in die höchste Entwicklungsstufe langsam erfolgte. Nach 240 hpe trat das vierte Stadium nur bei 40 % der untersuchten Proben auf (Abb. 19).

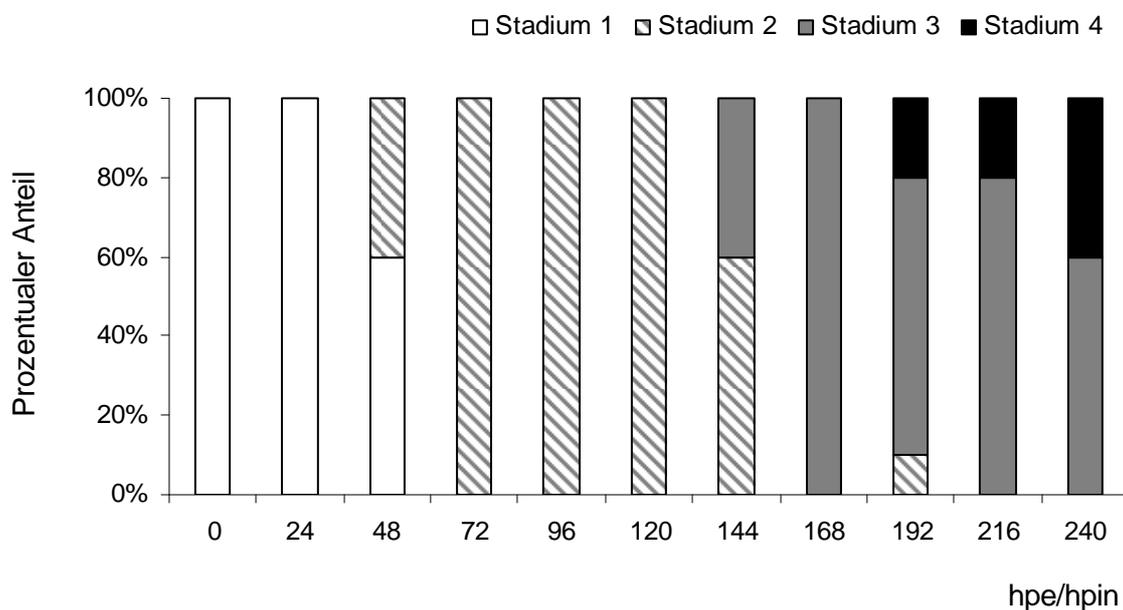


Abb. 19: Entwicklung früher Abläufe der Adventivwurzelbildung in der Stängelbasis von unbehandelten Petunienstecklingen.

Dargestellt sind die morphologischen Veränderungen der Stängelbasis (0–0,5 cm) im Zeitraum von 0–240 Stunden nach der Ernte (hpe / hpin); Stadium 1: keine Anzeichen für Adventivwurzelbildung; Stadium 2: erste meristematische Zellen; Stadium 3: Wurzelprimordien; Stadium 4: Längenwachstum und Erscheinen von Wurzeln (siehe Abb. 18); n = 10.

3.2.2 Morphologische Veränderungen während der AWB in kalt-dunkel behandelten Stecklingen

Die Analyse der kalt-dunkel behandelten Stecklinge zeigt, dass die AWB bereits während der Dunkelphase begann (Abb. 20). Nach 120 hpe waren erste meristematische Zellen in der Stängelbasis zu erkennen. Der prozentuale Anteil der Proben, die sich im zweiten Stadium befanden, erhöhte sich bis 168 hpe (0 hpin) kontinuierlich. Nach Beendigung der Dunkelphase erfolgte innerhalb von 24 Stunden der Wechsel aller untersuchten Proben in das zweite Stadium (192 hpe / 24hpin). Die Bildung von Adventivwurzeln wurde also während der Lichtphase deutlich beschleunigt. Zum Zeitpunkt 216 hpe / 48 hpin wurden bereits in 70 % der untersuchten Proben Wurzelprimordien (Stadium 3) gefunden. Erste vollentwickelte Wurzeln zeigten sich in den Schnitten von Stecklingen 240 hpe / 72 hpin.

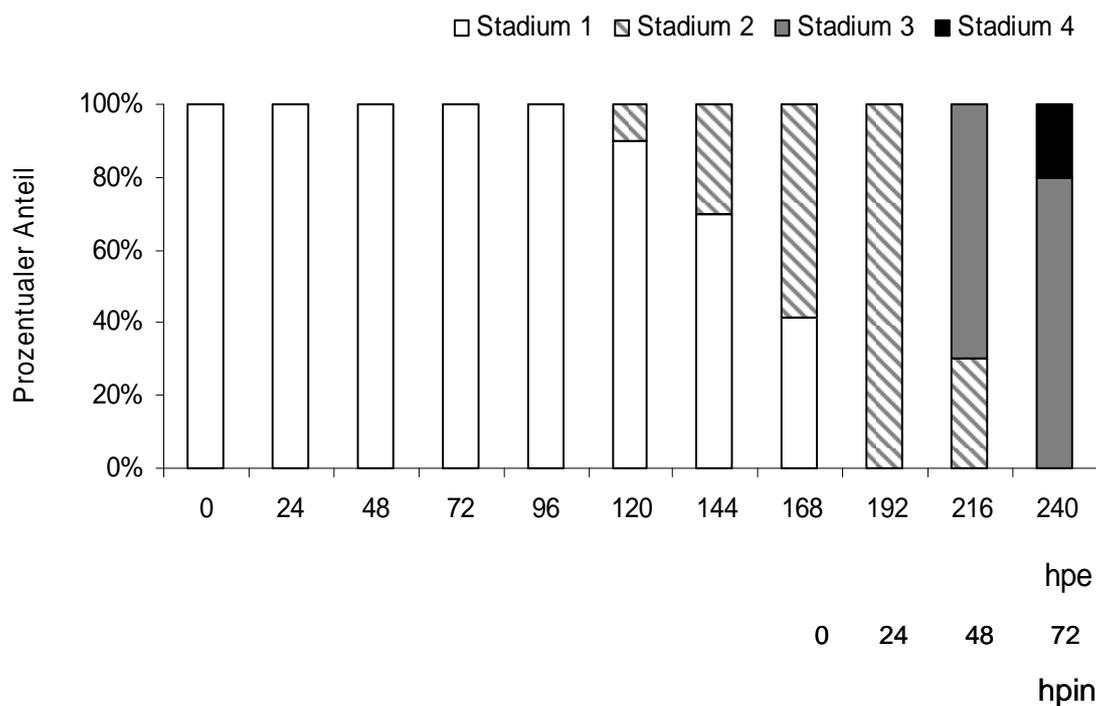


Abb. 20: Entwicklung früher Abläufe der Adventivwurzelbildung in der Stängelbasis (0–0,5 cm) von kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen.

Dargestellt sind die morphologischen Veränderungen der Stängelbasis (0–0,5 cm) im Zeitraum von 0–240 Stunden nach der Ernte (hpe); Stadium 1: keine Anzeichen für Adventivwurzelbildung; Stadium 2: erste meristematische Zellen; Stadium 3: Wurzelprimordien; Stadium 4: Längenwachstum und Erscheinen von Wurzeln (siehe Abb. 18); n = 10.

3.2.3 Vergleich morphologischer Veränderungen in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen

Eine Gegenüberstellung des zeitlichen Ablaufs der verschiedenen Entwicklungsstadien der Adventivwurzeln in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen (Abb. 19 und Abb. 20) verdeutlicht den Einfluss einer kalten Dunkelbehandlung auf die morphologischen Änderungen (Tab. 3).

Tab. 3: Gegenüberstellung des Entwicklungsverlaufs der Adventivwurzelbildung in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen.
Dargestellt ist der Zeitraum nach der Ernte (hpe) im Zusammenhang mit dem Signifikanzwert p; n = 10, Werte mit $p \leq 0,05$ sind signifikant unterschiedlich.

Zeit [hpe]	<u>höchste Entwicklungsstufe</u>		p-Wert
	unbehandelt	kalt-dunkel behandelt	
0	Stadium 1	Stadium 1	1,000
24	Stadium 1	Stadium 1	1,000
48	Stadium 2	Stadium 1	0,087
72	Stadium 2	Stadium 1	0,000
96	Stadium 2	Stadium 1	0,000
120	Stadium 2	Stadium 2	0,000
144	Stadium 3	Stadium 2	0,002
168	Stadium 3	Stadium 2	0,000
192	Stadium 4	Stadium 2	0,000
216	Stadium 4	Stadium 3	0,102
240	Stadium 4	Stadium 4	0,628

Innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Ernte konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, jedoch wurden im Zeitraum von 72–192 hpe festgestellt, dass in unbehandelten Stecklingen die AWB signifikant weiter vorangeschritten war. Zu den Probenahmeterminen 216 hpe und 240 hpe konnten keine signifikanten Unterschiede mehr in der Entwicklung der beiden Varianten nachgewiesen werden. Zudem wurde mit der histologischen Analyse gezeigt, dass ein Übergang in eine nächst höhere Entwicklungsphase in kalt-dunkel behandelten Stecklingen bei dem Eintritt in die Lichtphase (168 hpe / 0 hpin) deutlich schneller ablief als in den unbehandelten Stecklingen. Zum Abschluss der

Untersuchungen erfolgte eine Wurzelbonitur beider Stecklingsvarianten. Die Wurzelanzahl und die Bewurzelungsrate der kalt-dunkel behandelten Stecklinge waren signifikant höher verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

3.3 Einfluss der kalten Dunkelbehandlung auf Veränderungen des Kohlenhydratstatus während der AWB in Petunienstecklingen

Es ist bekannt, dass für die Vorgänge der Bildung und des Wachstums von Wurzeln viel Energie, hauptsächlich in Form von Kohlenhydraten benötigt wird (Haissig, 1984; Veierskov, 1988; Kevers et al., 1997). Dabei werden vor allem die Ausgangsmengen von Kohlenhydraten im Blatt und der Stängelbasis als wichtiger Faktor für die Entstehung von Adventivwurzeln angesehen (Kevers et al., 1997; Li und Leung, 2000). Daher war es von Interesse, welche Veränderungen des Kohlenhydrathaushaltes während der AWB in Petunienstecklingen auftreten und wie sich eine kalte Dunkelbehandlung auf den Kohlenhydratstatus auswirkt. Hierbei erfolgte die Durchführung in allen Versuchen wie in Abb. 10 beschrieben. Proben von Blatt und Stängelbasis wurden zu angegebenen Zeitpunkten genommen. Am letzten Versuchstag wurde eine Bonitur als experimentelle Validierung durchgeführt.

3.3.1 Kohlenhydratstatus in Blättern und Stängelbasis während der AWB in unbehandelten Stecklingen

Veränderungen der Mengen ausgewählter Kohlenhydrate wurden separat im Blatt und der Stängelbasis bestimmt (Abb. 21). Am Ende der Lichtphase (letzter Probenahmetermin: 168 hpe / hpin) waren die Level aller gemessenen Kohlenhydrate im Blatt sowie in der Stängelbasis gegenüber dem Ausgangsniveau erhöht. Der Gehalt an Glucose und Fructose zeigte einen fast identischen Verlauf im Blatt- und Stängelgewebe über den betrachteten Zeitraum der AWB. Während die Mengen an Monosacchariden ab 72 hpe / hpin im Blatt anstiegen und bis zum Ende weiter akkumulierten, konnte eine Erhöhung im Stängel erst ab 168 hpe / hpin detektiert werden. Der Gehalt an Saccharose dagegen erhöhte sich signifikant zunächst im Stängelgewebe ab 72 hpe / hpin und danach im Blatt (168 hpe / hpin). Der Stärkegehalt im Blatt veränderte sich 6 hpe / hpin signifikant und verminderte sich

24 hpe / hpin gegenüber den Ausgangswert. In der Stängelbasis variierte er innerhalb 72 hpe / hpin nur geringfügig. Erst ab 168 hpe / hpin konnte ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden.

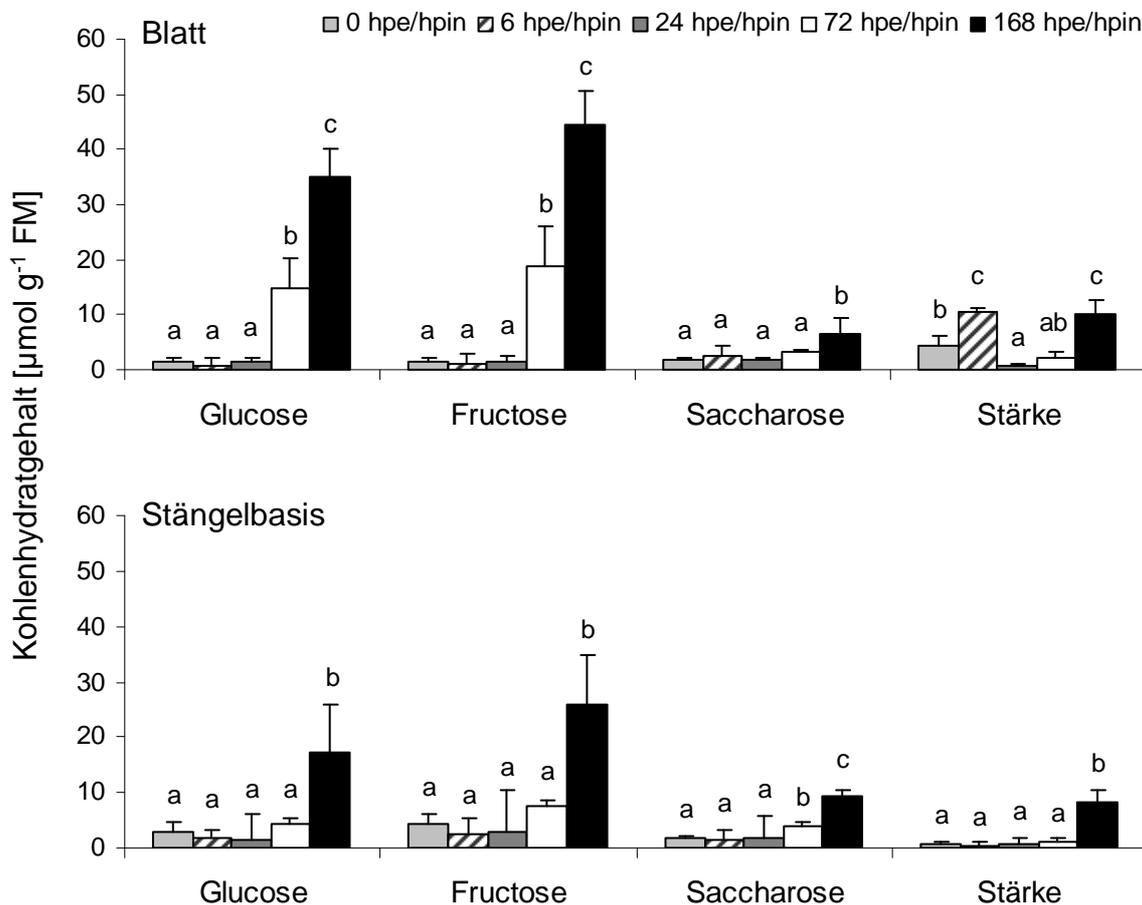


Abb. 21: Veränderungen des Kohlenhydratstatus im Blatt (oben) und der Stängelbasis (unten) von unbehandelten Stecklingen.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach der Ernte (hpe / hpin); n = 8; unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Werte für einen Zucker zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

3.3.2 Kohlenhydratstatus in Blättern und Stängelbasis während der AWB in kalt-dunkel behandelten Stecklingen

Während der kalten Dunkelbehandlung kam es zu einer deutlichen Abnahme der Kohlenhydratgehalte im Blattgewebe (Abb. 22). Der Saccharosegehalt verringerte sich bereits ab 24 hpe in der Dunkelphase. Die gemessenen Monosaccharide sanken 72 hpe signifikant und blieben bis zu 168 hpe auf diesem Niveau. Der Stärkegehalt verminderte sich ab 6 hpe,

reduzierte sich ab 24 hpe stark und blieb bis zum Ende der Messung auf diesem Niveau. In der Stängelbasis konnte während der Lagerung ebenfalls eine Abnahme aller gemessenen Zucker analysiert werden, jedoch nicht in dem hohen Maße wie es im Blatt zu verzeichnen war. Der Gehalt an Glucose und Fructose in der Stängelbasis sank signifikant 168 hpe um ca. die Hälfte des Ausgangswertes (Abb. 22). Saccharose und Stärke nahmen bereits ab 24 hpe ab. Im Gegensatz zum Saccharosegehalt, welcher ab 24 hpe bis zum Ende des Versuches auf einem ähnlichen Niveau blieb, minimierte sich der Stärkegehalt bis 168 hpe auf sehr niedrige Werte.

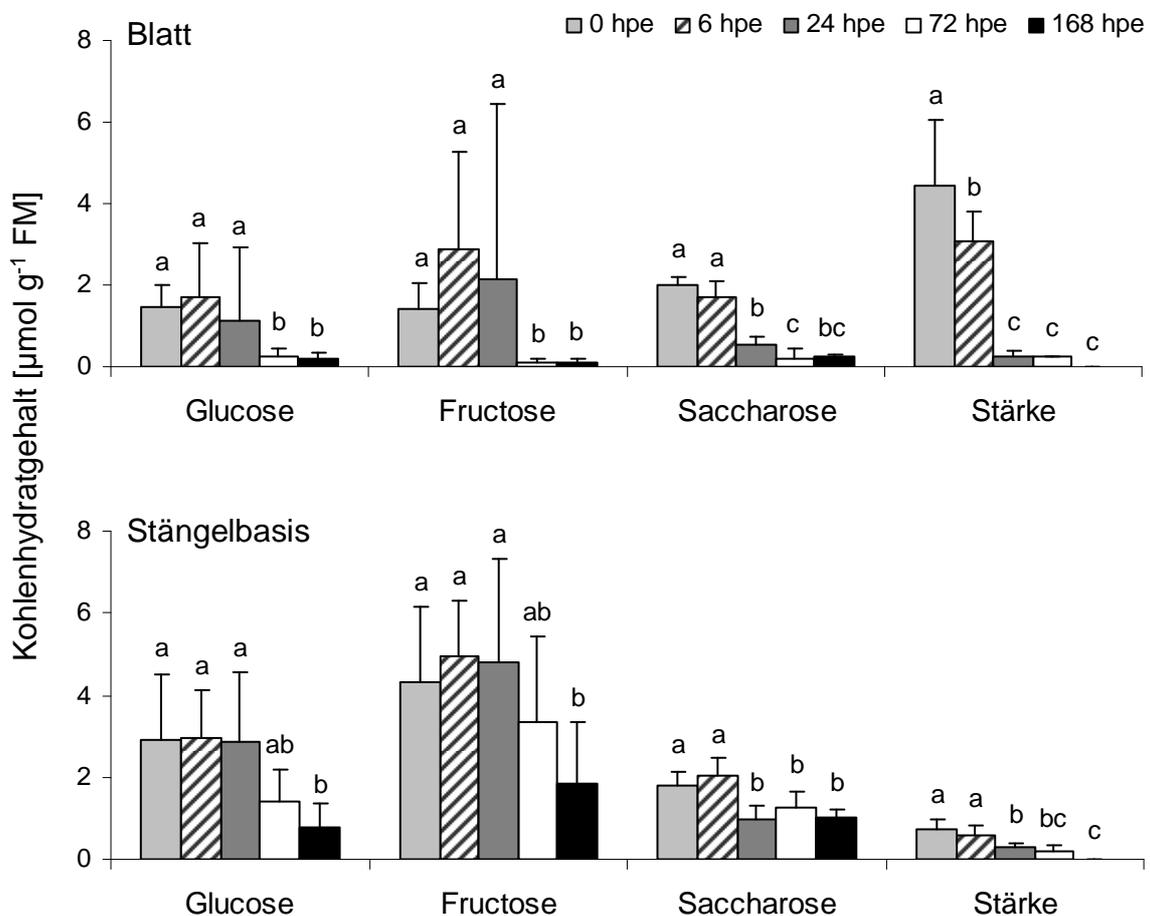


Abb. 22: Veränderungen des Kohlenhydratstatus im Blatt (oben) und der Stängelbasis (unten) von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Dunkelphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach der Ernte (hpe); n = 8; unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Werte für einen Zucker zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Nach Beendigung der kalten Dunkelbehandlung stiegen im Blatt und in der Stängelbasis während der Lichtphase erwartungsgemäß die Kohlenhydratgehalte an und akkumulierten zum Ende des Versuchs in beiden untersuchten Gewebeteilen (Abb. 23).

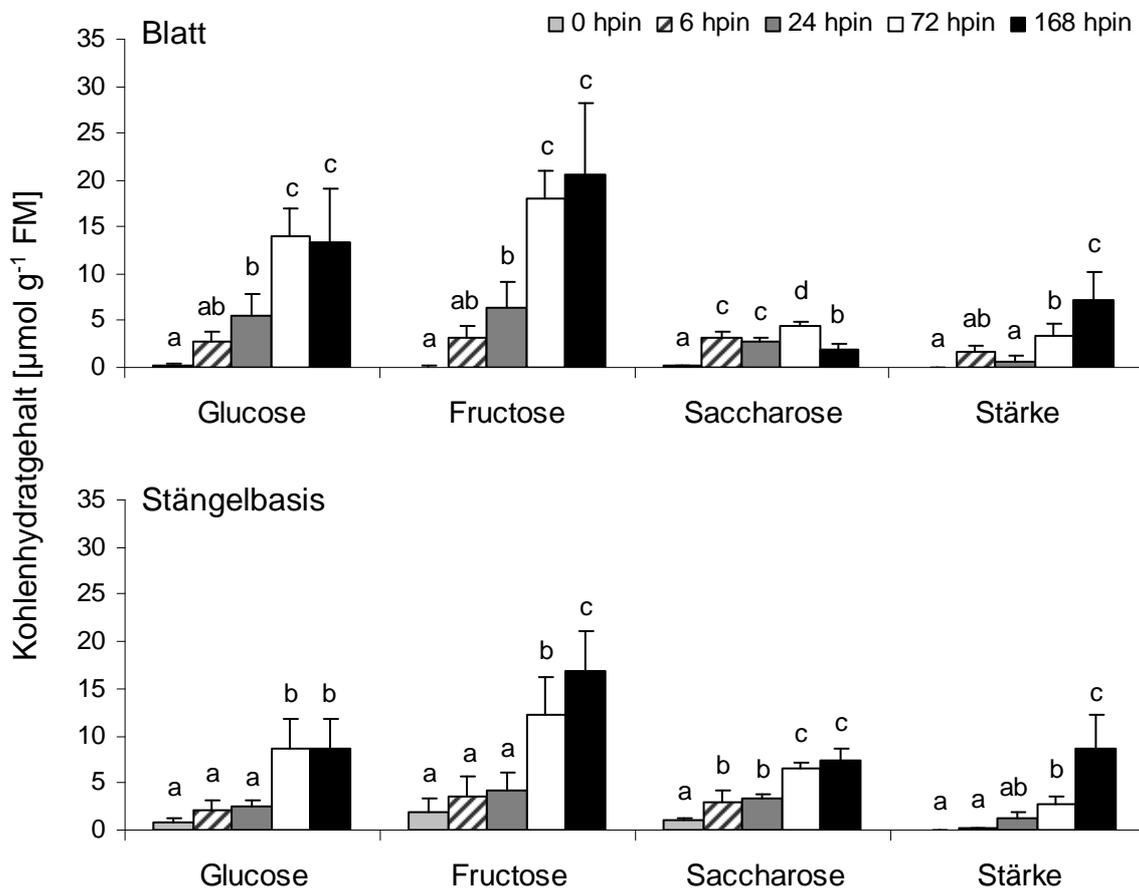


Abb. 23: Veränderungen des Kohlenhydratstatus im Blatt (oben) und der Stängelbasis (unten) von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach dem Stecken (hpin); n = 8; unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Werte für einen Zucker zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Ein erstmaliger signifikanter Anstieg der Zuckermengen konnte für Saccharose ab 6 hpin im Blatt und der Stängelbasis analysiert werden. Nach 72 hpin kam es zu einer weiteren Zunahme des Saccharosegehaltes, wobei sich im Blattgewebe gegen Versuchsende (168 hpin) der Gehalt wieder signifikant verminderte. Der höchste Anstieg war für die Monosaccharide Glucose und Fructose im Blatt und der Stängelbasis zu verzeichnen. Erste signifikante Veränderungen in der Erhöhung der beiden Zuckermengen konnten im Blattgewebe bereits ab 24 hpin festgestellt werden, wohingegen in der Stängelbasis ein Anstieg erst ab 72 hpin

gemessen werden konnte. Die Messungen der Stärkelevel resultieren in einem ähnlichen Verlauf in beiden untersuchten Pflanzengeweben. Eine signifikante Akkumulation trat ab 72 hpin ein.

3.3.3 Vergleich des Kohlenhydratstatus in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen während der Lichtphase

Der Vergleich von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen wurde anhand der analysierten Kohlenhydratmengen während der Lichtphase und einer durchgeführten Wurzelbonitur am letzten Versuchstag (16. Tag) angestellt. Dazu wurden Ergebnisse zum veränderten Kohlenhydratstatus aus den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 gegenübergestellt. Als gemeinsamer Ausgangspunkt für einen Vergleich wurde der Beginn der Photosyntheseaktivität und somit der Start der Synthese von Kohlenhydraten gewählt. Das entspricht in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen dem Zeitpunkt ab Stecken (hpin).

Der Gehalt aller gemessenen Kohlenhydrate war in beiden untersuchten Pflanzengeweben der kalt-dunkel behandelten Stecklinge zu Beginn der Lichtphase im Vergleich zu den unbehandelten Stecklingen signifikant erniedrigt. Der Gehalt von Glucose und Fructose war ab 6 hpin und 24 hpin in kalt-dunkel behandelten Stecklingen im Blatt signifikant höher als in unbehandelten Stecklingen (Abb. 24). Danach stiegen die Level in den unbehandelten Kontrollen an, wohingegen in den kalt-dunkel behandelten Stecklingen kaum noch Veränderungen festgestellt werden konnten. In der Stängelbasis zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Monosaccharidlevel beim Vergleich von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen, nur trat dieser erst ab 24 hpin ein. Des Weiteren konnte im Blatt ein Angleich des Saccharosegehaltes der kalt-dunkel behandelten Stecklinge auf das Niveau der Ausgangswerte der unbehandelten Stecklinge nach bereits 6 hpin festgestellt werden. Zu den Zeitpunkten 24 hpin und 72 hpin war der Gehalt von Saccharose im Blatt kalt-dunkel behandelter Stecklinge signifikant höher als in Unbehandelten. Die Mengen im Blatt der kalt-dunkel behandelten Stecklinge sanken danach jedoch ab, währenddessen sich im Blatt der unbehandelten Stecklinge nach 72 hpin ein konträres Bild darstellte. In der Stängelbasis konnte bereits ab 6 hpin ein signifikant höherer Saccharosegehalt in den kalt-dunkel behandelten Stecklingen gegenüber den unbehandelten Kontrollen ermittelt werden. Erst zum

Zeitpunkt 168 hpin stieg der Gehalt der Saccharose in unbehandelten Stecklingen stärker an als in kalt-dunkel behandelten Stecklingen. Zu Beginn der Lichtphase konnte ein signifikant höherer Gehalt von Stärke im Blatt- und Stängelgewebe in unbehandelten Stecklingen nachgewiesen werden. Ab 24 hpin verlief der Prozess der Akkumulierung von Stärke in beiden Stecklingsvarianten auf einem ähnlichen Niveau. In der Stängelbasis wurde Stärke in kalt-dunkel behandelten Stecklingen ab 24 hpin bis 72 hpin in einem höheren Maße akkumuliert als in unbehandelten Stecklingen, jedoch erreichte der Gehalt der Stärke in unbehandelten Stecklingen ab 168 hpin ein ähnliches Niveau wie in kalt-dunkel Behandelten.

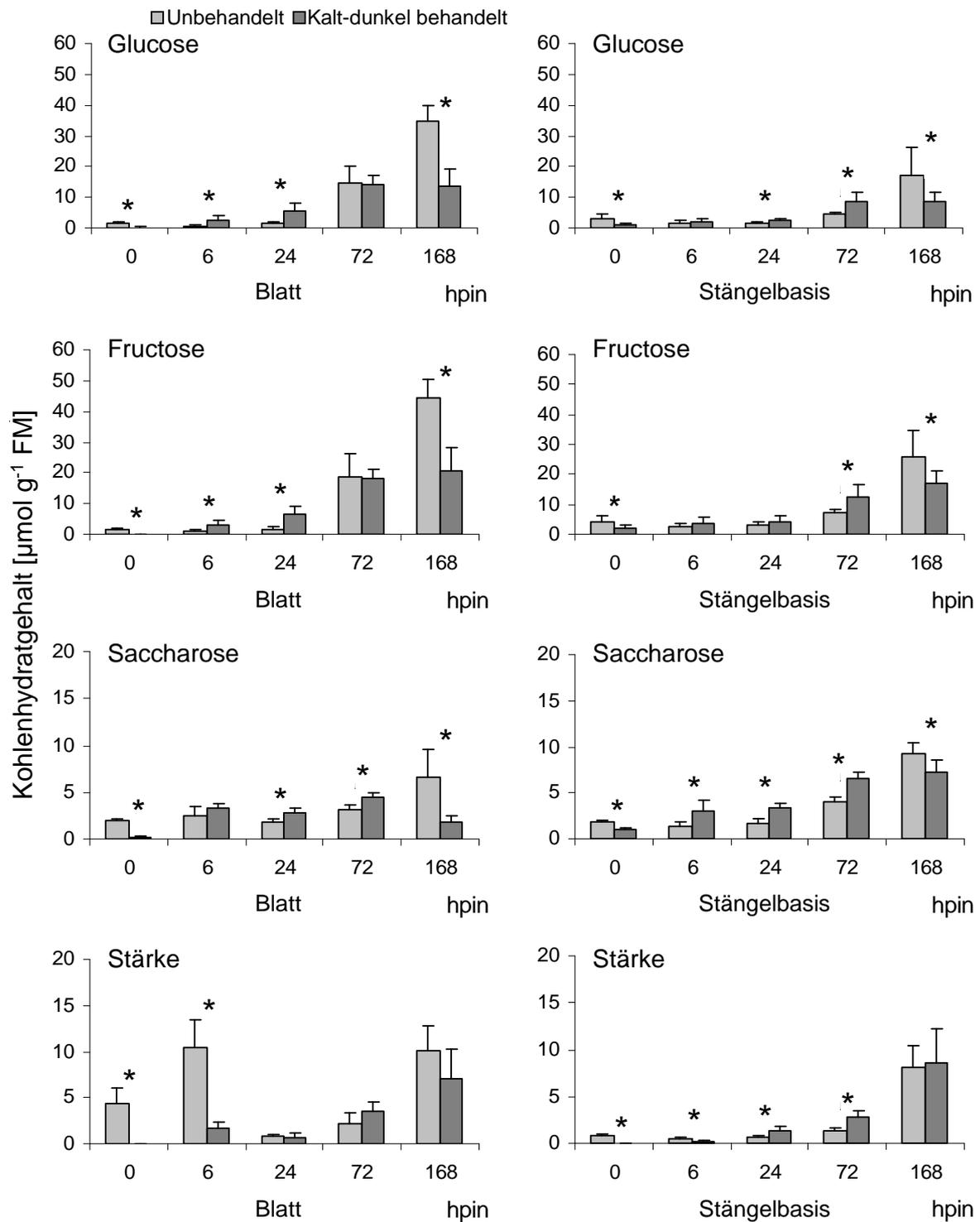


Abb. 24: Vergleich der Gehaltsänderungen von Glucose, Fructose, Saccharose und Stärke im Blatt (links) und der Stängelbasis (rechts) von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach dem Stecken (hpin); $n = 8$, Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum jeweiligen Zeitpunkt ($p \leq 0,05$).

Aus den gemessenen Kohlenhydratmengen konnte der Gehalt der Gesamtkohlenhydrate im Blatt und der Stängelbasis berechnet werden. Diese Daten sollten weitere Informationen über den Kohlenhydratstatus von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen in den beiden untersuchten Geweben liefern. Während der Lichtphase nahm der Gehalt der Gesamtkohlenhydrate im Blattgewebe und der Stängelbasis von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen signifikant zu (Tab. 4). In beiden Fällen waren die Ausgangs- und Endwerte der unbehandelten Stecklinge signifikant höher als die der Stecklinge, welche zuvor einer Dunkelbehandlung ausgesetzt waren. Die unbehandelten Stecklinge akkumulierten zum Zeitpunkt 168 hpin mehr Kohlenhydrate in der Stängelbasis. In der Zeitphase von 6 bis 72 hpin zeigte sich jedoch ein höherer Gesamtkohlenhydratgehalt in der Stängelbasis der kalt-dunkel behandelten Stecklinge. Eine vergleichbare Tendenz konnte auch im Blattgewebe nachgewiesen werden.

Tab. 4: Einfluss einer kalt-dunkel Behandlung von Stecklingen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt im Blattgewebe und der Stängelbasis während der Lichtphase (0–168 hpin).

Gesamtkohlenhydratgehalt ist die Summe aus Glucose, Fructose, Saccharose und Stärke; n = 8, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede; Sternchen zeigen signifikante Effekte einer kalten Dunkelbehandlung zum jeweiligen Zeitpunkt ($p \leq 0,05$).

Zeit [hpin]	<u>Gesamtkohlenhydratgehalt [$\mu\text{mol g}^{-1}$ FM]</u>			
	Blatt		Stängelbasis	
	unbehandelt	kalt-dunkel behandelt	unbehandelt	kalt-dunkel behandelt
0	9,36 ^A	0,52 ^{a*}	9,76 ^A	3,63 ^{a*}
6	14,79 ^A	10,80 ^{ab*}	6,03 ^A	8,84 ^{a*}
24	5,60 ^A	15,20 ^{b*}	6,87 ^A	11,36 ^{a*}
72	39,06 ^B	40,04 ^c	17,11 ^A	30,30 ^{b*}
168	96,05 ^C	43,02 ^{c*}	60,29 ^B	41,39 ^{c*}

Das Disaccharid Saccharose wird durch spezifische Invertasen in die Monosaccharide Glucose und Fructose gespalten. Der Gehalt der Hexosen (Glucose und Fructose) und die Saccharosemenge stehen dementsprechend in engen Zusammenhang. Dies lässt sich durch das Hexosen / Saccharose-Verhältnis gut veranschaulichen. Bei einem z. B. hohen Verhältnis lässt sich schlussfolgern, dass Saccharose bedingt durch eine erhöhte Invertaseaktivität vermehrt zu Glucose und Fructose abgebaut wird. Im Umkehrschluss bedeutet ein sehr

geringes Hexose / Saccharose-Verhältnis eine Akkumulierung von Saccharose infolge von eingeschränkter Invertaseaktivität.

Im Blattgewebe von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen kam es während der Lichtphase zu einem signifikanten Anstieg der Hexose / Saccharose-Rate. Die Blattproben der Stecklinge beider Varianten zeigten einen fast gleichen Ausgangs- und Endwert, jedoch waren in der Zeit von 6 bis 24 hpin die Hexose / Saccharose-Verhältnisse der kalt-dunkel behandelten Stecklinge signifikant höher als in den Unbehandelten (Tab. 5). Während der Lichtphase traten in der Stängelbasis der behandelten und unbehandelten Stecklinge keine signifikanten Veränderungen des Hexose / Saccharose-Verhältnisses auf. Eine kalt-dunkel Behandlung beeinflusste also die Hexose / Saccharose-Rate in der Stängelbasis nicht.

Tab. 5: Einfluss einer kalt-dunkel Behandlung von Stecklingen auf das Hexose / Saccharose-Verhältnis im Blatt und in der Sprossbasis während der Lichtphase (t = 0–168 hpin).

n = 8; unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede; Sternchen zeigen signifikante Effekte einer kalten Dunkelbehandlung zum jeweiligen Zeitpunkt ($p \leq 0,05$).

Zeit [hpin]	<u>Hexose/Saccharose-Verhältnis</u>			
	Blatt		Stängelbasis	
	unbehandelt	kalt-dunkel behandelt	unbehandelt	kalt-dunkel behandelt
0	1,49 ^A	1,47 ^a	4,32 ^A	2,91 ^a
6	0,79 ^A	1,88 ^{a*}	3,33 ^A	2,04 ^a
24	0,73 ^A	4,15 ^{a*}	2,77 ^A	1,99 ^a
72	10,67 ^B	7,28 ^{a*}	2,93 ^A	3,12 ^a
168	13,29 ^B	19,19 ^b	4,84 ^A	3,44 ^a

Kohlenhydrate stellen nicht nur die Energie für die AWB bereit, sondern repräsentieren auch den Pool der Kohlenstoff-Skelette und Metabolite, die für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze erforderlich sind. So werden Kohlenstoff-Skelette in Aminosäuren oder andere Verbindungen des N-Stoffwechsels umgewandelt und folglich C- und N-Metabolismus co-reguliert (Foyer et al., 1995). Die Bestimmung des Gesamtkohlenstoff- und Stickstoffgehaltes in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen wurde für den Gesamtsteckling durchgeführt um Änderungen während der AWB zu erkennen.

Der Gesamtstickstoffgehalt in unbehandelten Stecklingen nahm mit fortlaufender Versuchszeit signifikant ab (Abb. 21a). Eine besonders starke Reduzierung zeigte sich in den ersten sieben Tagen in der Lichtphase (168 hpe / hpin). Ein gegenteiliger, aber nicht so extremer Verlauf wurde für den Kohlenstoffgehalt in unbehandelten Stecklingen ermittelt (Abb. 21b). Die Dunkelbehandlung bewirkte einen signifikanten Anstieg des Stickstoffgehaltes in den gelagerten Stecklingen 168 hpe / 0 hpin. Bis zum Ende der Lichtphase 336 hpe / 168 hpin sank der Gehalt an Stickstoff, blieb jedoch auf einem signifikant höheren Niveau als in den unbehandelten Kontrollen zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 21a). Ein Anstieg des Gesamtkohlenstoffgehaltes in kalt-dunkel behandelten Stecklingen konnte erst während der Lichtphase festgestellt werden (Abb. 21b).

Basierend auf den Änderungen des C- und N-Metabolismus, kam es infolgedessen auch zu Modifikationen des C / N-Verhältnisses während der AWB (Abb. 21c). In unbehandelten Stecklingen erhöhte sich das C / N-Verhältnis graduell. Kalt-dunkel behandelte Stecklinge blieben während der Dunkelperiode unverändert, jedoch stieg das C / N-Verhältnis bis zum Ende der sich anschließenden Lichtperiode auf ein ähnliches Niveau wie bei den Unbehandelten 168 hpe / hpin.

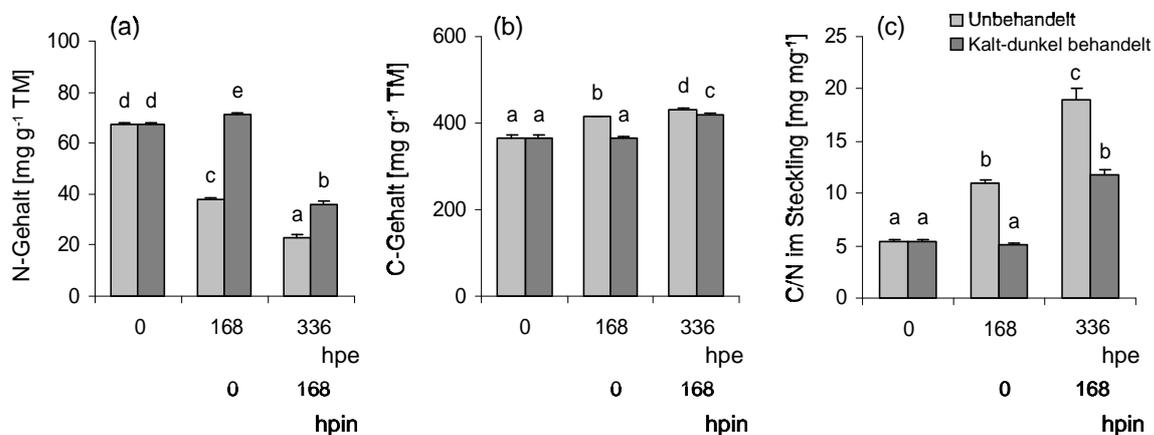


Abb. 25: Veränderungen des Stickstoffgehaltes (a), des Kohlenstoffgehaltes (b) und des C / N-Verhältnisses (c) während der Adventivwurzelbildung in unbehandelten (hpe = hpin) und kalt-dunkel behandelten Stecklingen (hpe ≠ hpin).

n = 6; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05).

Es konnte gezeigt werden, dass die Kohlenhydratgehalte während der Dunkelphase absinken, besonders stark war dieser Vorgang im Blattgewebe zu beobachten. Der Gehalt von Saccharose und Stärke verringerte sich von den gemessenen Kohlenhydraten als erstes in beiden Geweben. Bei der Gegenüberstellung während der Lichtphase konnten zu Beginn

signifikant geringere Kohlenhydratmengen in kalt-dunkel behandelten Stecklingen im Vergleich zu Unbehandelten festgestellt werden. Dieser Unterschied konnte jedoch 6 hpin nicht mehr nachgewiesen werden. Auffällig dabei war, dass der Saccharosegehalt in der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen bereits 6 hpin bis 72 hpin signifikant höher als in unbehandelten Stecklingen war. Die Untersuchungen zum Gesamtkohlenstoff- und Gesamtkohlenhydratgehalt sowie dem Hexose / Saccharose-Verhältnis resultierten in signifikant höheren Werten der kalt-dunkel behandelten Stecklingen in der Phase zwischen 6 bis 24 hpin. Die kalte Dunkelperiode bewirkte ein weniger starkes Absinken des Stickstoffgehaltes im gesamten Steckling bis zum Ende des Versuchs.

3.4 Aktivitätsbestimmung von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrat- haushaltes während der AWB in Petunienstecklingen

Um die im Kapitel 3.3 dargestellten Ergebnisse zum Kohlenhydrathaushalt detaillierter charakterisieren zu können, wurden die Aktivitäten ausgewählter Enzymen des Kohlenhydratmetabolismus in der Stängelbasis und im Blattgewebe von Petunienstecklingen bestimmt. Analysiert wurden die vakuoläre und cytosolische Invertase, die Glucokinase, Pyruvatkinase sowie die FBPase. Die Messung von Phosphofruktokinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase konnten aufgrund zu geringer Aktivitäten im Blattgewebe nur in der Stängelbasis bestimmt werden. Die zu katalysierenden Reaktionen und die Einordnung des Wirkungsortes der in diesem Kapitel untersuchten Enzyme sind in Abb. 26 dargestellt.

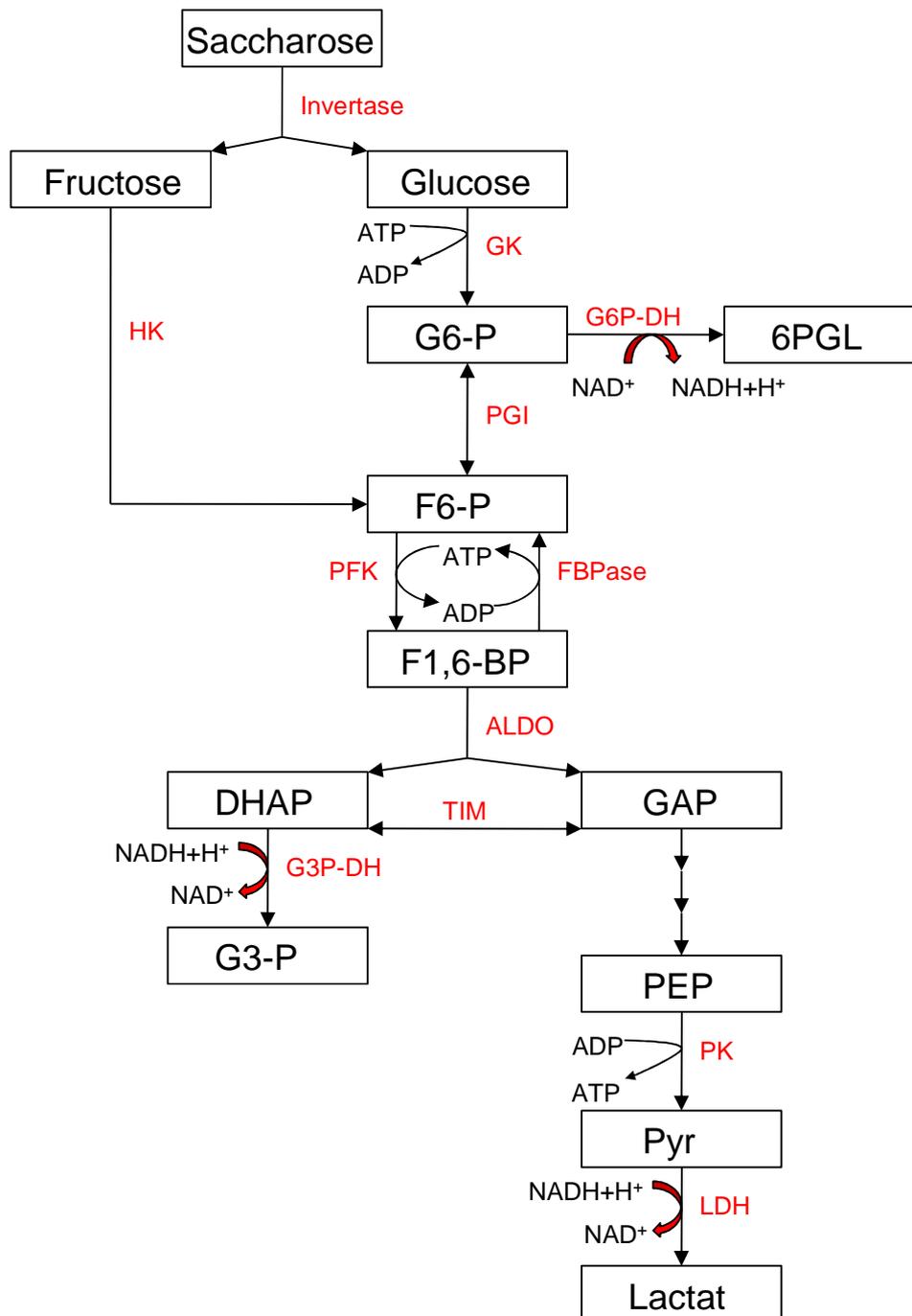


Abb. 26: Reaktionsschema ausgewählter Schlüsselenzyme des Kohlenhydratmetabolismus.

Invertasen katalysieren die Umwandlung von Saccharose zu Glucose und Fructose. Glucose kann durch das Enzym Glucokinase (GK) und unter Verbrauch von ATP zu Glucose-6-Phosphat (G6-P) phosphoryliert werden. G6-P wird über zwei Wege weiter verstoffwechselt. Zum Einen durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) zu 6-Phosphogluconolacton (6PGL) und Übertragung von Wasserstoff auf NAD^+ , zum Anderen kann eine reversible Umwandlung zu Fructose-6-Phosphat (F6-P) durch das Enzym Phosphoglucoseisomerase (PGI) erfolgen. Fructose wird direkt über eine Hexokinase (HK) zu F6-P phosphoryliert. Die Phosphofruktokinase (PFK) katalysiert die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion im ersten Teil des Glucoseabbaus: F6-P wird zu Fructose-1,6-bisphosphat (F1,6-BP) umgewandelt. Das antagonistische Enzym ist die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). Aldolase (Aldo) spaltet F1,6-BP in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP). DHAP wird über Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (G3P-DH) zu Glycerin-3-Phosphat (G3-P) oder über die Triosephosphatisomerase (TIM) zu GAP umgewandelt. Über verschiedene Teilschritte entsteht aus GAP Phosphoenolpyruvat (PEP), welches mit Hilfe des Enzyms Pyruvatkinase (PK) zu Pyruvat (Pyr) katalysiert wird. Die Lactatdehydrogenase (LDH) wandelt Pyruvat (Pyr) in Lactat um.

3.4.1 Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes in unbehandelten Stecklingen

Um eine Einordnung der möglichen, durch die kalte Dunkelbehandlung verursachten Veränderungen vornehmen zu können, wurde zunächst die Aktivität der ausgewählten Enzyme zu den in Abb. 27 gezeigten Zeiten der AWB in unbehandelten Stecklingen bestimmt.

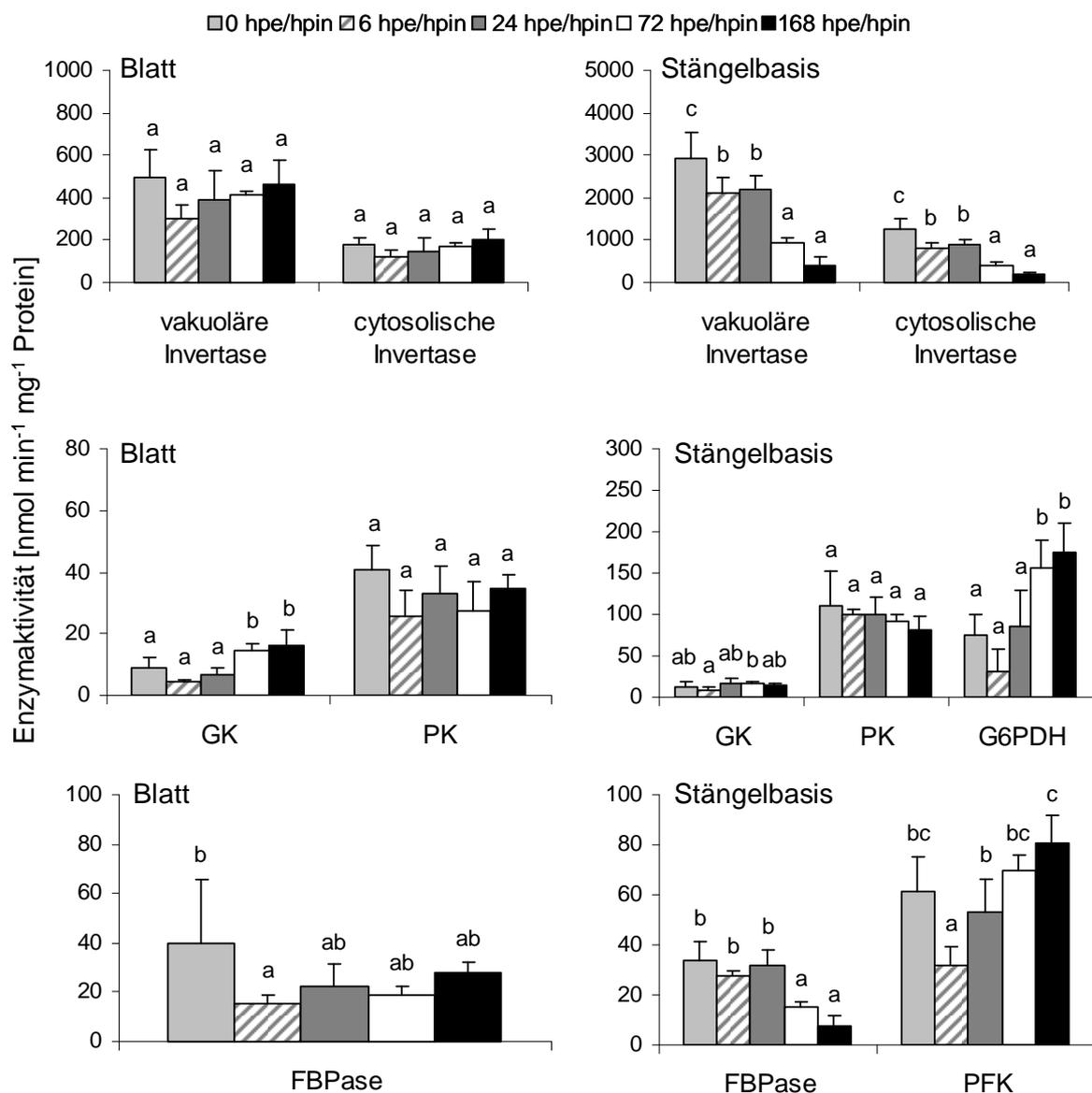


Abb. 27: Enzymaktivitäten von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase (GK) und Pyruvatkinase (PK) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH), FBPase und Phosphofruktokinase (PFK) im Blatt (links) und der Stängelbasis (rechts) von unbehandelten Stecklingen während der Lichtphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach der Ernte (hpe / hpin); n = 6, unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Werte für ein Enzym zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Die Aktivitäten der Invertasen und Pyruvatkinase im Blattgewebe veränderten sich während des untersuchten Zeitraums der AWB nicht (Abb. 27). Dagegen zeigte die Aktivität der FBPase bei 6 hpe / hpin eine signifikante Erniedrigung und die der Glucokinase ab 72 hpe / hpin einen Anstieg. Während sich diese Aktivitäten im Blattgewebe jedoch nur geringfügig bis nicht veränderten, variierten sie in der Stängelbasis erheblich. Die Aktivität der vakuolären und cytosolischen Invertasen sank ab 6 hpe / hpin kontinuierlich bis zum Zeitpunkt 168 hpe / hpin, wobei die Aktivität der vakuolären Invertase stets höher als die der cytosolischen Invertase war. Die Aktivität der Glucokinase wies nur leichte Schwankungen auf, die der Pyruvatkinase blieb unverändert. Glucose-6-Phosphatdehydrogenase veränderte sich bis 24 hpe / hpin nicht. Ab 72 hpe / hpin erhöhte sich die Aktivität des Enzyms und blieb bis 168 hpe / hpin auf einem ähnlichen Niveau. Die Aktivitäten der beiden Enzyme FBPase und Phosphofruktokinase zeigten einen konträren Verlauf. Während die FBPase-Aktivität ab 72 hpe / hpin absank, erhöhte sich die Aktivität der PFK bis zum Ende der Messungen.

3.4.2 Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes in kalt-dunkel behandelten Stecklingen

Nachdem in den vorherigen Kapiteln ein Einfluss einer kalten Dunkelbehandlung auf alle bis dahin untersuchten Parameter während der AWB festgestellt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob auch die Aktivitäten der ausgewählten Enzyme des Kohlenhydrathaushaltes davon beeinträchtigt sind (Abb. 28). Eine kalte Dunkelbehandlung von Stecklingen führte im Blatt bei der Mehrzahl der Enzyme zu einer Verringerung der Aktivitäten. Nach geringen Schwankungen in der Anfangsphase verminderte sich die Enzymaktivität beider Invertasen, der Glucokinase sowie der Pyruvatkinase am Ende der Dunkelperiode signifikant. Eine reduzierte Aktivität der FBPase konnte bereits ab 6 hpe festgestellt werden und veränderte sich bis zum Ende der kalten Dunkelbehandlung nicht mehr. In der Stängelbasis blieben die Enzymaktivitäten von cytosolischer Invertase, Glucokinase, Pyruvatkinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase sowie FBPase von der kalten Dunkelbehandlung relativ unbeeinflusst. Die Phosphofruktokinase zeigte eine kurzfristige Erniedrigung in der Aktivität 6 hpe, stieg dann aber wieder auf die Ausgangsaktivität an.

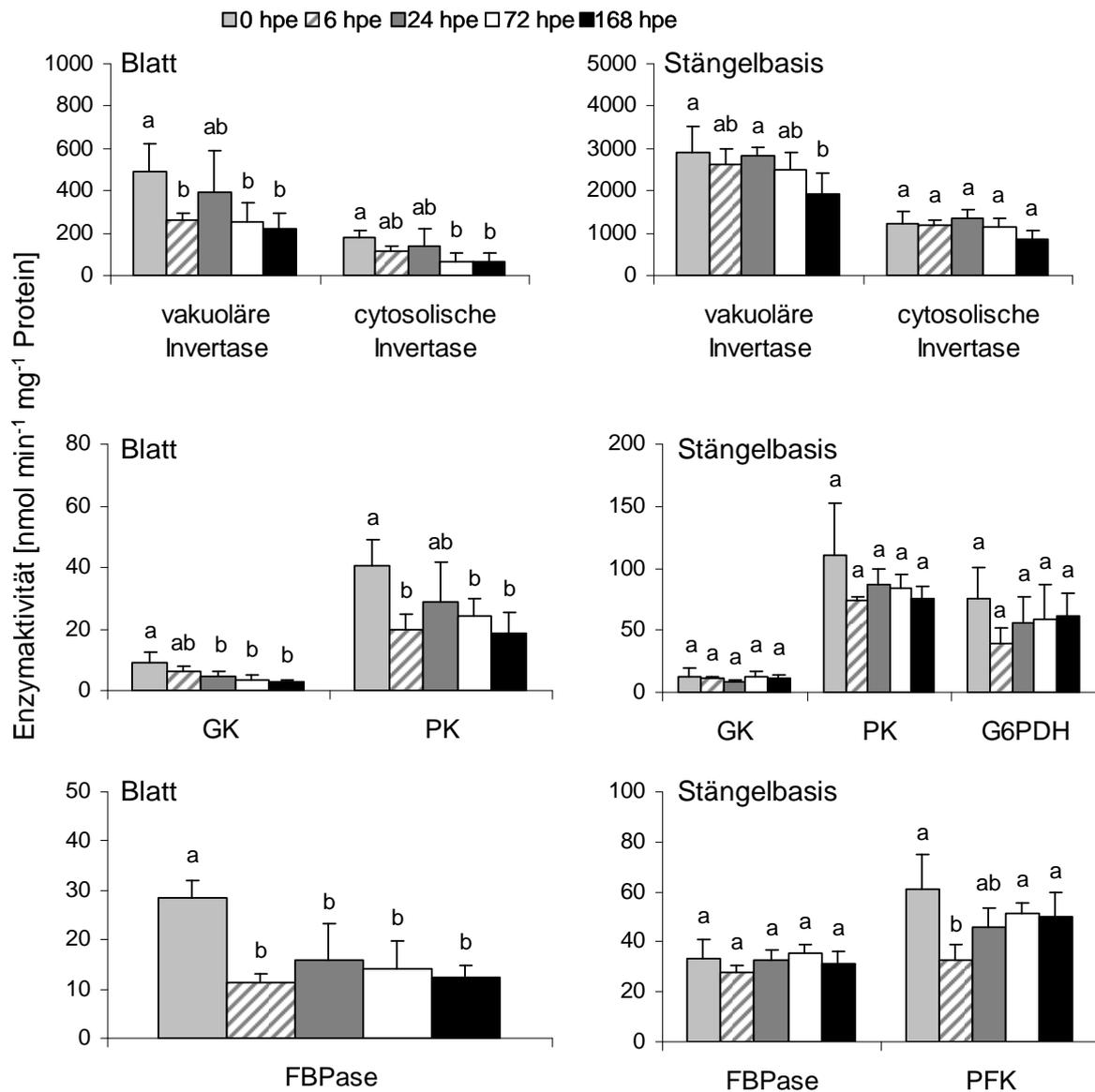


Abb. 28: Enzymaktivitäten von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase (GK) und Pyruvatkinase (PK) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH), FBPase und Phosphofruktokinase (PFK) im Blatt (links) und der Stängelbasis (rechts) von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Dunkelphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach der Ernte (hpe); n = 6, unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Werte für ein Enzym zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Deutlichere Veränderungen der Enzymaktivitäten in Blatt- und Stängelgewebe konnten während der sich anschließenden Lichtphase bestimmt werden (Abb. 29). Die Aktivitäten der Invertasen stiegen ab 72 hpin im Blatt, zum Zeitpunkt 168 hpin reduzierte sich die Aktivität in der Stängelbasis signifikant. Die Aktivität der Pyruvatkinase im Blatt und der Stängelbasis sowie die FBPase-Aktivität im Blattgewebe veränderten sich im Verlauf der Bewurzelung nicht signifikant. In der Stängelbasis jedoch kam es ab 72 hpin zu einem Abfall der FBPase-

Aktivität. Das antagonistisch wirkende Enzym Phosphofruktokinase erhöhte dementsprechend die Aktivität ab 72 hpin. Die Aktivität der Glucokinase erhöhte sich ab 24 hpin im Blatt und erst gegen Ende der Lichtperiode in der Stängelbasis. Auch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Aktivität stieg erst ab 72 hpin an.

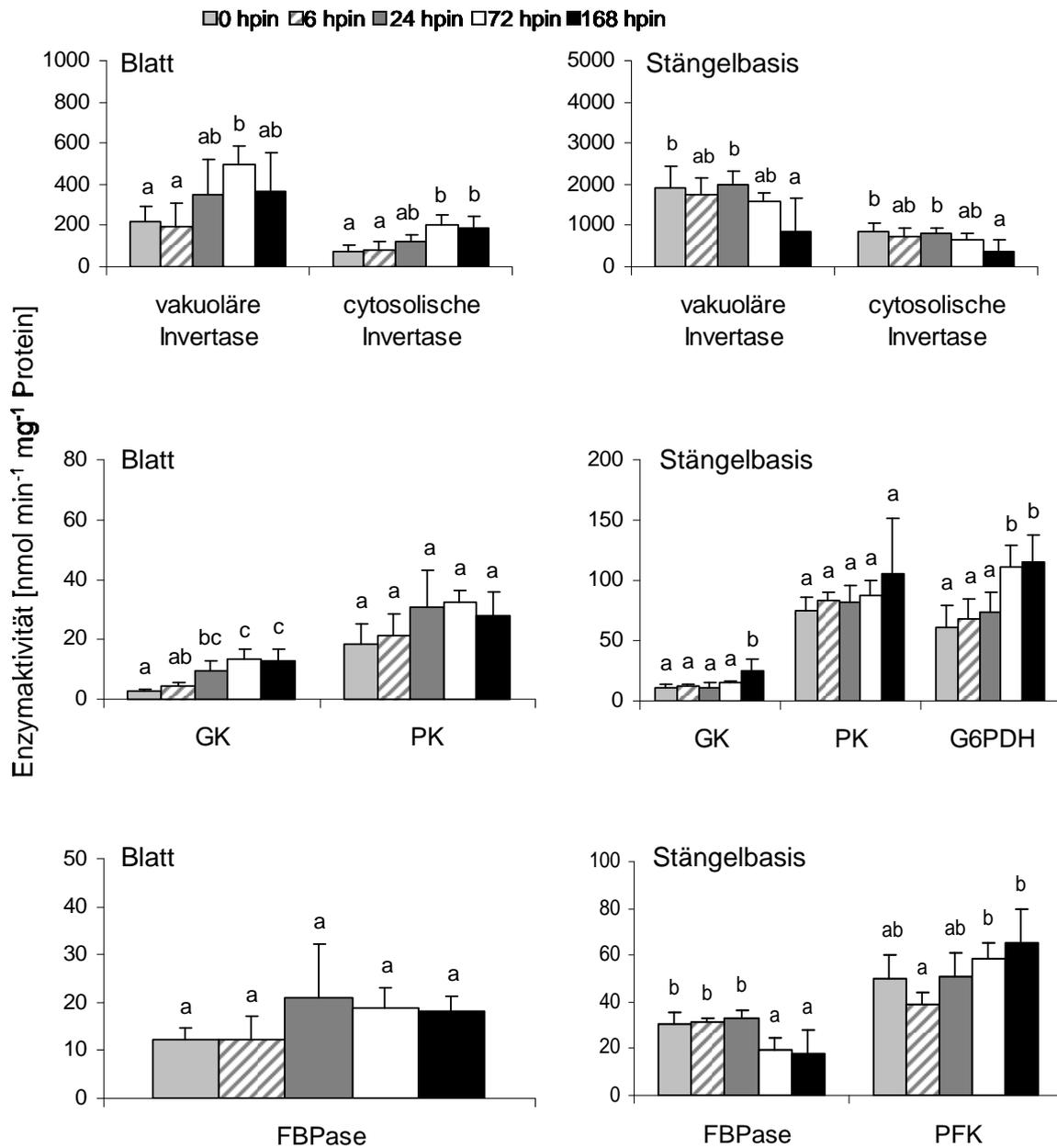


Abb. 29: Enzymaktivitäten von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase (GK) und Pyruvatkinase (PK) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH), FBPase und Phosphofruktokinase (PFK) im Blatt (links) und der Stängelbasis (rechts) von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach dem Stecken (hpin); n = 6, unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Werte für ein Enzym zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

3.4.3 Vergleich von Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrathaushaltes in unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen während der Lichtphase

Die Enzymaktivitäten in unbehandelten (Abb. 27) und kalt-dunkel behandelten (Abb. 29) Stecklingen wurden während der Lichtphase miteinander verglichen. Zu Beginn waren alle Enzymaktivitäten der unbehandelten Stecklinge im Blattgewebe signifikant höher als in kalt-dunkel behandelten Stecklingen (Abb. 30 und Abb. 31). Ab 6 hpin konnte dieser Unterschied bis zum Ende des Versuches nicht mehr nachgewiesen werden. Ausgenommen davon konnte eine erneut höhere Aktivität der FBPase zum Zeitpunkt 168 hpin in unbehandelten Stecklingen im Vergleich zu kalt-dunkel behandelten Stecklingen festgestellt werden (Abb. 31). In der Stängelbasis konnten für die Aktivität der Glucokinase bei der Gegenüberstellung von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden (Abb. 30). Die Aktivität der Pyruvatkinase in unbehandelten Stecklingen war kurzfristig (6 hpin) erhöht. Das Enzym FBPase in kalt-dunkel behandelten Stecklingen zeigte eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Stecklingen zum Zeitpunkt 6 hpin (Abb. 31). Auch die Aktivität der Phosphofruktokinase war nur 72 hpin in unbehandelten Stecklingen signifikant höher als in kalt-dunkel behandelten Stecklingen.

Umfangreichere Unterschiede der beiden Stecklingsvarianten konnten für Invertasen und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in der Stängelbasis analysiert werden (Abb. 30 und Abb. 31). Die Ausgangsaktivität der Invertasen war in der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen zu Beginn der Lichtphase signifikant niedriger als in unbehandelten Stecklingen. Sie erreichte in behandelten Stecklingen ab 6 hpin ein mit unbehandelten Stecklingen vergleichbares Niveau und war zum Zeitpunkt 72 hpin signifikant höher als in der unbehandelten Kontrolle. Betrachtet man die Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, so konnten Unterschiede zwischen unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen 6 hpin und 72 hpin sowie 168 hpin bestimmt werden. In der frühen Phase der Lichtanwendung war die Aktivität in kalt-dunkel behandelten Stecklingen signifikant höher als in Unbehandelten, zu den beiden späteren Zeitpunkten jedoch niedriger.

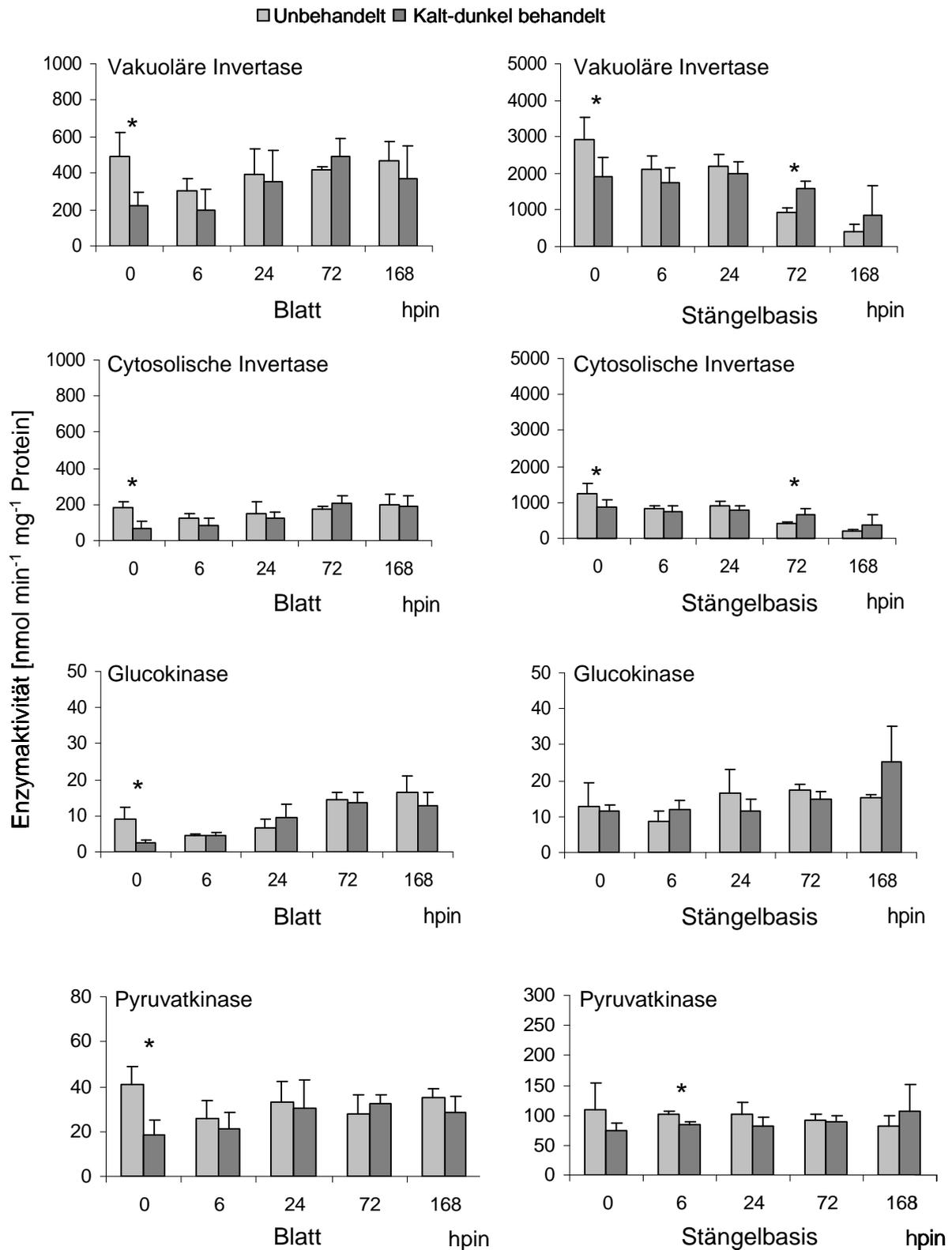


Abb. 30: Vergleich der Aktivitätsänderungen von vakuolärer und cytosolischer Invertase, Glucokinase und Pyruvatkinase im Blatt (links) und der Stängelbasis (rechts) von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach dem Stecken (hpin); n = 6, Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum jeweiligen Zeitpunkt ($p \leq 0,05$).

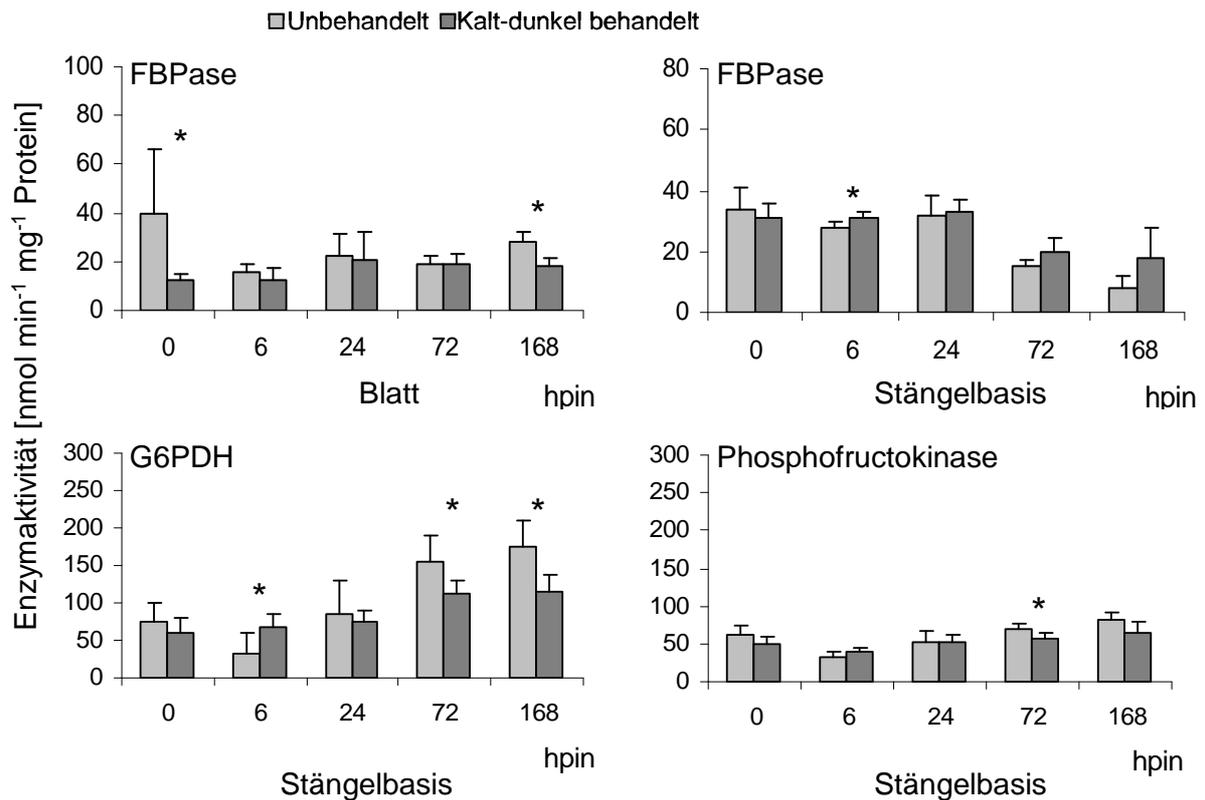


Abb. 31: Vergleich der Aktivitätsänderungen von FBPase im Blatt (oben links) und der Stängelbasis (oben rechts) sowie Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) in der Stängelbasis (unten links) und Phosphofruktokinase in der Stängelbasis (unten rechts) von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase.

Dargestellt ist der Zeitraum von 0–168 Stunden nach dem Stecken (hpin); n = 6, Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum jeweiligen Zeitpunkt ($p \leq 0,05$).

Während der Dunkelphase nahmen vor allem die Aktivitäten der vakuolären und cytosolischen Invertasen im Blatt und der Stängelbasis ab. Signifikante Abnahmen der Enzymaktivitäten von Glucokinase und Pyruvatkinase waren nur im Blattgewebe nachzuweisen. Die Aktivität der anderen untersuchten Enzyme veränderte sich nicht signifikant während der Dunkelperiode. Beim Vergleich der unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklinge während der Lichtphase zeigten sich nur zu Beginn höhere Enzymaktivitäten im Blattgewebe von unbehandelten Stecklingen. In der Stängelbasis konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der Invertasen in der späteren Phase der AWB (72 hpin) in kalt-dunkel behandelten Stecklingen signifikant höher als in Unbehandelten war. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Aktivität von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase zu Beginn der Lichtphase in kalt-dunkel behandelten Stecklingen höher als in unbehandelten Stecklingen war, jedoch zeigte sich in der späteren Phase der AWB ein umgekehrtes Bild.

3.5 CO₂-Gaswechsel von Petunienstecklingen

Am Anfang der Untersuchungen zum Netto-CO₂-Gaswechsel stand die Frage, in welchem Maße Petunienstecklinge Photosynthese betreiben und ob diese in einem geeigneten Versuchsaufbau für den Gesamtsteckling erfassbar ist. Dabei war es wichtig, eine kontinuierliche Datenerfassung zu erhalten ohne die Umgebungsatmosphäre durch den Messvorgang zu verändern. Zudem sollte gezeigt werden, inwieweit gemessene Unterschiede in der Metabolitanalyse zwischen unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen eventuell auf den CO₂-Gaswechsel zurückzuführen sind.

3.5.1 CO₂-Gaswechsel von unbehandelten Stecklingen

Als erster Schritt wurde der Gaswechsel von unbehandelten Stecklingen ermittelt. Die Wachstumsbedingungen in der Klimakammer wurden den Untersuchungen aus vorherigen Kapiteln angepasst. Die Temperatur wurde auf 20 °C (Nacht) bzw. 22 °C (Tag) eingestellt und die Lichtintensität auf 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über 10 Stunden pro Tag festgelegt. In Abb. 32 sind die Nettphotosyntheseraten und die Dunkelatmung pro Steckling im Zeitraum von 24 bis 336 hpin dargestellt. Um für spätere Analysen einen Vergleich von unterschiedlich behandelten Stecklingen anzustellen, wurden die CO₂-Gaswechselraten auch auf die Blattfläche bezogen. Es konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Nettphotosyntheseraten und die Dunkelatmung der Stecklinge während des Messzeitraums relativ konstant blieben. Eine eventuell zu erwartende Anstiegsphase der Nettphotosyntheserate zu Beginn der Messungen konnte nicht festgestellt werden.

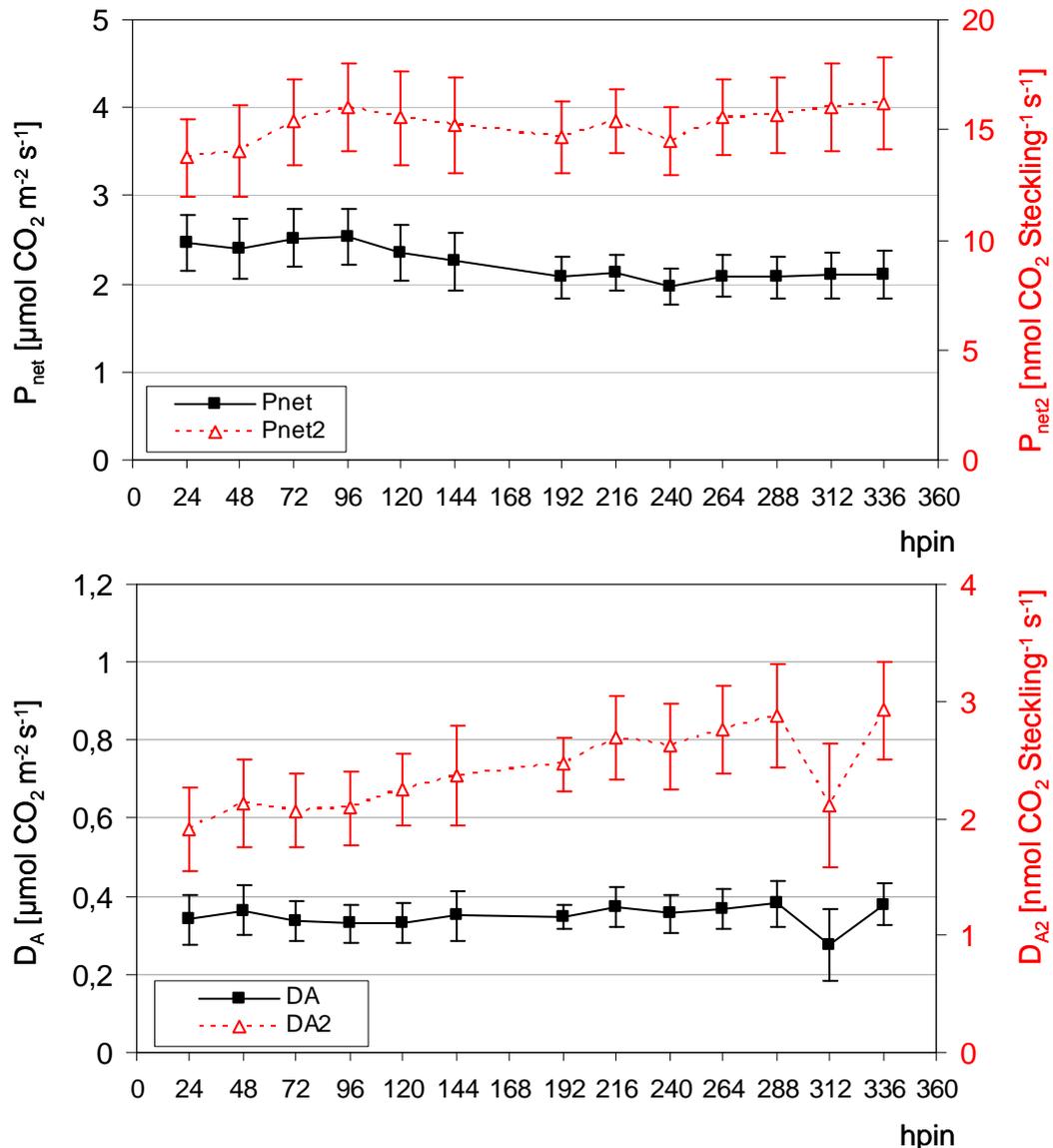


Abb. 32: Verlauf der Tagesmittelwerte der Nettophotosyntheserate (oben), bezogen auf die Blattfläche (P_{net}) oder pro Steckling (P_{net2}) und der Dunkelatmung (unten), bezogen auf die Blattfläche (D_A) oder pro Steckling (D_{A2}).

Dargestellt ist der Zeitraum von 24 bis 336 Stunden nach dem Stecken (hpin) von unbehandelten Stecklingen; $n = 8$.

Eine Bewertung der Assimilataausnutzung und des Netto-Kohlenstoff-Gewinns aus dem Gaswechsel konnte mit Hilfe einer Bilanzrechnung vorgenommen werden. Hierfür wurde die Versuchszeit in der frühen Phase bis zum siebenten Tag, in der späten Phase (7.–14. Tag) und über den gesamten Zeitraum betrachtet (Tab. 6). In den ersten sieben Tagen war die Menge des assimilierten Kohlenstoffs aus der Nettophotosynthese signifikant höher als die Menge an Kohlenstoff, die über die Trockenmassedifferenz gefunden wurde. In der zweiten Hälfte des Versuchs konnten keine signifikanten Unterschiede für die Bilanz nachgewiesen werden. Die CUE stieg jedoch gegenüber dem ersten Versuchszeitraum signifikant an. Betrachtet man die

gesamte Versuchsperiode von 14 Tagen, so ist festzustellen, dass die Bilanz nicht ausgeglichen war.

Tab. 6: Vergleich des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO₂-Aufnahme (C_{net}) und aus der Pflanzentrockenmasse (C_{TM}) pro Steckling sowie der Carbon Use Efficiency (CUE) von unbehandelten Petunienstecklingen in verschiedenen Zeitintervallen.

n = 4, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede, Sternchen zeigen signifikante Unterschiede beim Vergleich C_{net} und C_{TM} innerhalb eines Zeitraumes (p ≤ 0,05).

Zeit [Tage]	C _{net} [gC je Steckling]	C _{TM} [gC je Steckling]	CUE [-]
0–7	0,040 ^{a*}	0,036 ^a	0,72 ^a
7–14	0,049 ^b	0,050 ^b	0,78 ^c
0–14	0,089 ^{c*}	0,086 ^c	0,76 ^b

Nachdem herausgefunden werden konnte, in welchem Maße Petunienstecklinge unter Standardbedingungen im etablierten Versuchssystem photosynthetisch aktiv sind, sollte gezeigt werden, welche Auswirkungen veränderte Umweltfaktoren wie die Lichtintensität, Temperatur und CO₂-Konzentration der Umgebungsluft auf den Gaswechsel und damit auch auf die Bewurzelung der Stecklinge ausüben. Zu diesem Zweck wurden Licht- und CO₂-Sättigungskurven sowie Temperaturoptimumskurven der CO₂-Gaswechselraten aufgenommen (Abb. 33). Zur Darstellung dieser Beziehungen wurden die in Kapitel 2.13.2.4 beschriebenen Gleichungen verwendet. Die Darstellung der Nettphotosyntheseraten von unbehandelten Stecklingen in Abhängigkeit der eingestrahlten Lichtintensität wies eine Sättigungskurve auf (Abb. 33a). Mit zunehmender Lichtintensität stieg die Nettphotosyntheserate der Stecklinge. Der Bereich des steilen Anstieges lag bei einer PPFD von 50 bis ungefähr 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In den durchgeführten Versuchen der vorherigen Kapitel wurde eine Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angewandt. Die erzielte Nettphotosyntheseaktivität der Stecklinge befand sich somit im unteren Bereich der möglichen Kapazität. Jedoch muss beachtet werden, dass hohe Lichtintensitäten nur für einen kurzen Zeitraum von max. 60 Min. angewendet wurden, um die noch unbewurzelten Stecklinge nicht einem Trockenstress auszusetzen. Außerdem wurde die maximale Photosynthesekapazität mit 8,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Die Lichtintensität, welche bei 90 % der maximalen CO₂-Gaswechselrate erreicht wird, ist als LSP definiert (Schulze, 1970). Der LSP wurde mit 358 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ berechnet.

Des Weiteren wurden CO_2 -Sättigungskurven aufgenommen, wobei die Faktoren Licht (PPFD: $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und Temperatur (T: 22°C) konstant blieben. Die verwendeten CO_2 -Konzentrationen von bis zu 1300 ppm konnten nur den Bereich der Steigung, nicht aber den der Sättigung erreichen (Abb. 33b). Es wurde deutlich, dass mit erhöhter CO_2 -Konzentration die Nettophotosyntheserate der Petunienstecklinge ansteigt. Durch die Bestimmung der Nettophotosyntheserate in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lichtintensitäten in Kombination mit verschiedenen CO_2 -Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass der Faktor Licht den Gaswechsel stärker beeinflusst als die CO_2 -Konzentration (Abb. II, Anhang).

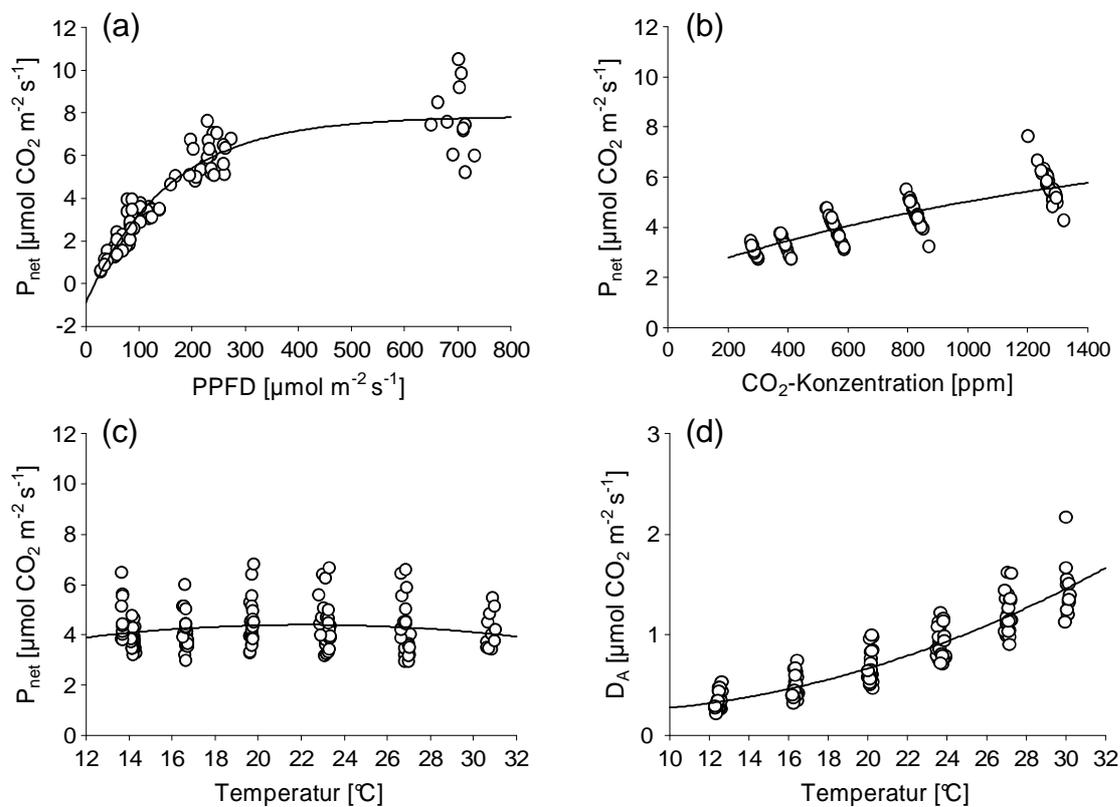


Abb. 33: Netto- CO_2 -Gaswechselraten in Abhängigkeit von der eingestrahltten Lichtintensität (a), der CO_2 -Konzentration (b) sowie der Temperatur im Licht (c) und im Dunkeln (d)

Als Nächstes wurde durch schrittweise Veränderung der Temperatur bei konstanter CO_2 -Zufuhr (400 ppm) bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ die Nettophotosyntheserate bzw. bei Dunkelheit die Atmung aufgenommen. Der Temperatureinfluss auf die Nettophotosyntheserate war im untersuchten Bereich von 12 bis 32°C äußerst gering (Abb. 33c). Die Analysen zur Dunkelatmung in Abhängigkeit von der Temperatur zeigten dagegen eine deutlich gesteigerte Atmung wenn die Temperatur erhöht wurde (Abb. 33d). Für beide Merkmale muss jedoch auch hier berücksichtigt werden, dass extrem hohe und niedrige

Temperaturen nur temporär Einsatz fanden, da andernfalls die Bewurzelung zu stark beeinflusst worden wäre.

3.5.2 Einfluss der Lichtintensität auf den CO₂-Gaswechsel von unbehandelten Stecklingen

Für weitere Untersuchungen zum Netto-Gaswechsel von Petunienstecklingen sollte der Einfluss auf die CO₂-Gaswechselraten unter Einwirkung einer langfristig differenzierten Lichtintensität getestet werden. Aus diesem Grund wurden Stecklinge mit einer Lichtintensität von 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 14 Tage bestrahlt und mit Stecklingen verglichen, welche mittels einer Netzabdeckung nur 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt waren. Die Temperatur wurde auf 20 / 22 °C (Nacht / Tag) und die Tageslänge mit 10 Stunden festgelegt. Die CO₂-Konzentration in der Kammer wurde so eingestellt, dass die Konzentration unter den Hauben der Bewurzelungsschalen ca. 400 ppm erreichte.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass eine dauerhaft höhere Bestrahlung der Stecklinge zu einer signifikant höheren Nettophotosyntheserate und Dunkelatmung pro Steckling führt (Abb. 34). Auch die CO₂-Gaswechselraten der stärker bestrahlten Stecklinge, bezogen auf die Blattfläche, waren im Vergleich zu den mit einer geringeren Lichtintensität behandelten Stecklingen signifikant erhöht. Die Anwendung einer ca. zweifach höheren Lichtintensität bewirkte eine um etwa das Doppelte gesteigerte Nettophotosyntheserate sowie Dunkelatmung der Stecklinge.

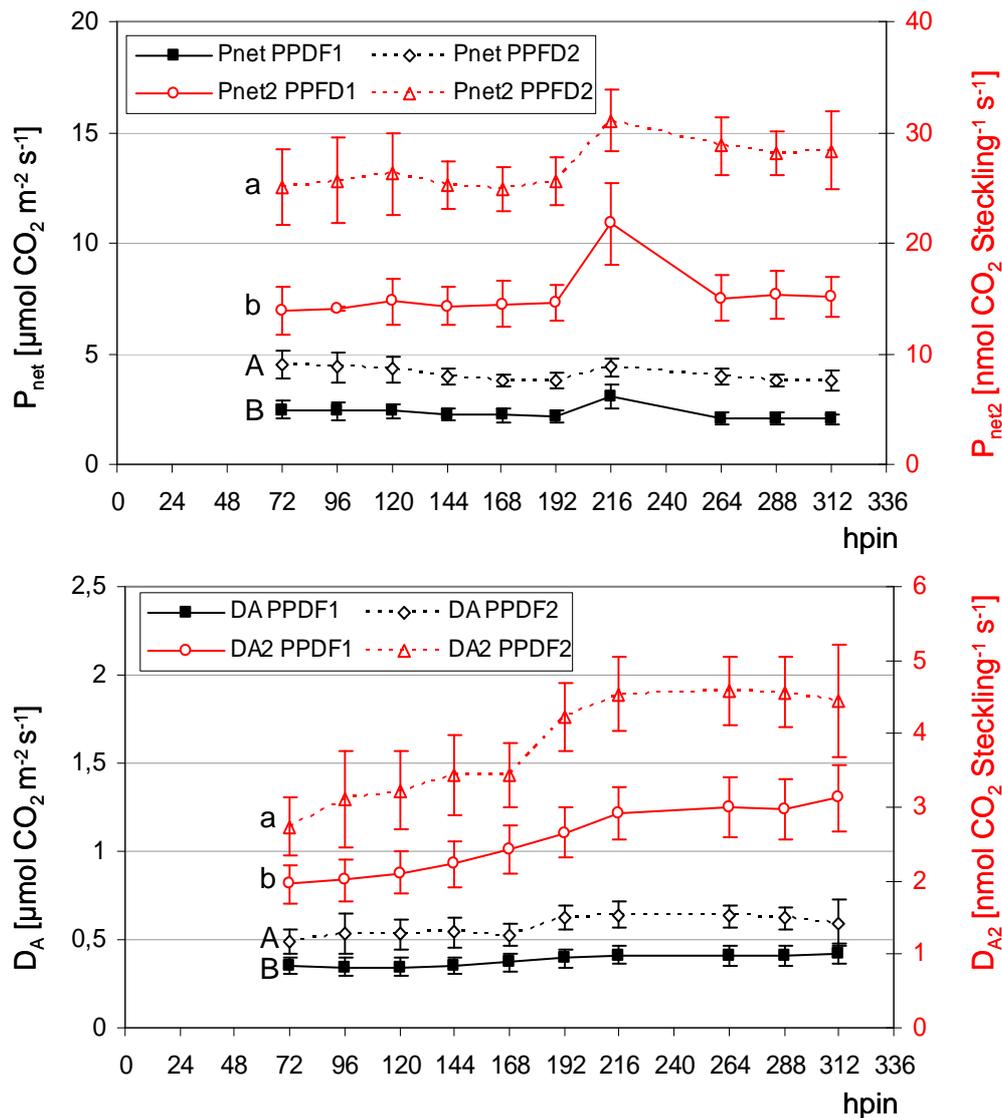


Abb. 34: Verlauf der Tagesmittelwerte der Nettophotosyntheseraten (oben), bezogen auf die Blattfläche (P_{net}) oder pro Steckling (P_{net2}) und der Dunkelatmung (unten), bezogen auf die Blattfläche (D_A) oder pro Steckling (D_{A2}).

Dargestellt ist der Zeitraum von 72 bis 312 Stunden nach dem Stecken (hpin) von Stecklingen, die mit unterschiedlichen Lichtintensitäten (PPFD1: 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; PPFD2: 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) behandelt wurden; $n = 8$, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zu jedem Zeitpunkt ($p < 0.05$).

Mit Hilfe einer Bilanzierung der CO_2 -Gaswechselraten und der Berechnung der CUE-Werte konnten Aussagen über den Netto-Kohlenstoff-Gewinn getroffen werden (Tab. 7). Stecklinge, die mit einer höheren Lichtintensität bestrahlt wurden, assimilierten signifikant höhere Mengen an Kohlenstoff im Vergleich zu den geringer bestrahlten Stecklingen. Dies zeigte sich auch in einem größeren Trockenmassezuwachs der stärker bestrahlten Stecklinge bis zum Ende des Versuchs. Auffällig war, dass die assimilierte Kohlenstoffmenge aus der

Nettophotosynthese in Stecklingen, die einer höheren Lichtintensität ausgesetzt waren, signifikant höher war als die assimilierte Kohlenstoffmenge aus der Pflanzentrockenmasse.

Tab. 7: Vergleich des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO₂-Aufnahme (C_{net}) und aus der Pflanzentrockenmasse (C_{TM}) pro Steckling, der Carbon Use Efficiency (CUE) sowie der Zunahme der Blattfläche (ΔBF) und Trockenmasse (ΔTM) pro Steckling von Stecklingen, die mit unterschiedlichen Lichtintensitäten (PPFD₁: 80 μmol m⁻² s⁻¹; PPFD₂: 150 μmol m⁻² s⁻¹) behandelt wurden.

n = 4, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede, Sternchen zeigen signifikante Unterschiede beim Vergleich C_{net} und C_{TM} innerhalb der gleichen Behandlung (p≤0,05).

PPFD [μmol m ⁻² s ⁻¹]	C _{net} [gC je Steckling]	C _{TM} [gC je Steckling]	CUE [-]	ΔBF [cm ² je Steckling]	ΔTM [g je Steckling]
80	0,073 ^a	0,072 ^a	0,85 ^a	20,37 ^a	0,16 ^a
150	0,106 ^{b*}	0,094 ^b	0,70 ^b	21,17 ^a	0,20 ^b

Um zu prüfen, inwiefern sich Stecklinge in ihrer Nettophotosyntheseleistung an die unterschiedlichen Lichtbedingungen angepasst haben, wurde für beide Stecklingsvarianten eine Lichtsättigungskurve aufgenommen und miteinander verglichen (Abb. 35). Bei einer niedrigen Lichteinstrahlung bis ca. 120 μmol m⁻² s⁻¹ wiesen beide Stecklingsvarianten eine ähnliche Nettophotosyntheserate auf. Dagegen konnten bei höheren Lichtintensitäten (über 200 μmol m⁻² s⁻¹) Unterschiede festgestellt werden. Die Stecklinge, die einer Lichtintensität von 150 μmol m⁻² s⁻¹ (PPFD₂) ausgesetzt waren, zeigten signifikant höhere Nettophotosyntheseraten als die mit durchgehend Niedriglicht behandelten Stecklinge (PPFD₁). Aus den Lichtabhängigkeitskurven der CO₂-Gaswechselraten konnte die maximale Photosyntheseaktivität abgeleitet werden. Die maximale Photosynthesekapazität der PPFD₁ behandelten Stecklinge war mit 7,13 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ geringer als die der PPFD₂ behandelten Stecklinge mit 9,08 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹.

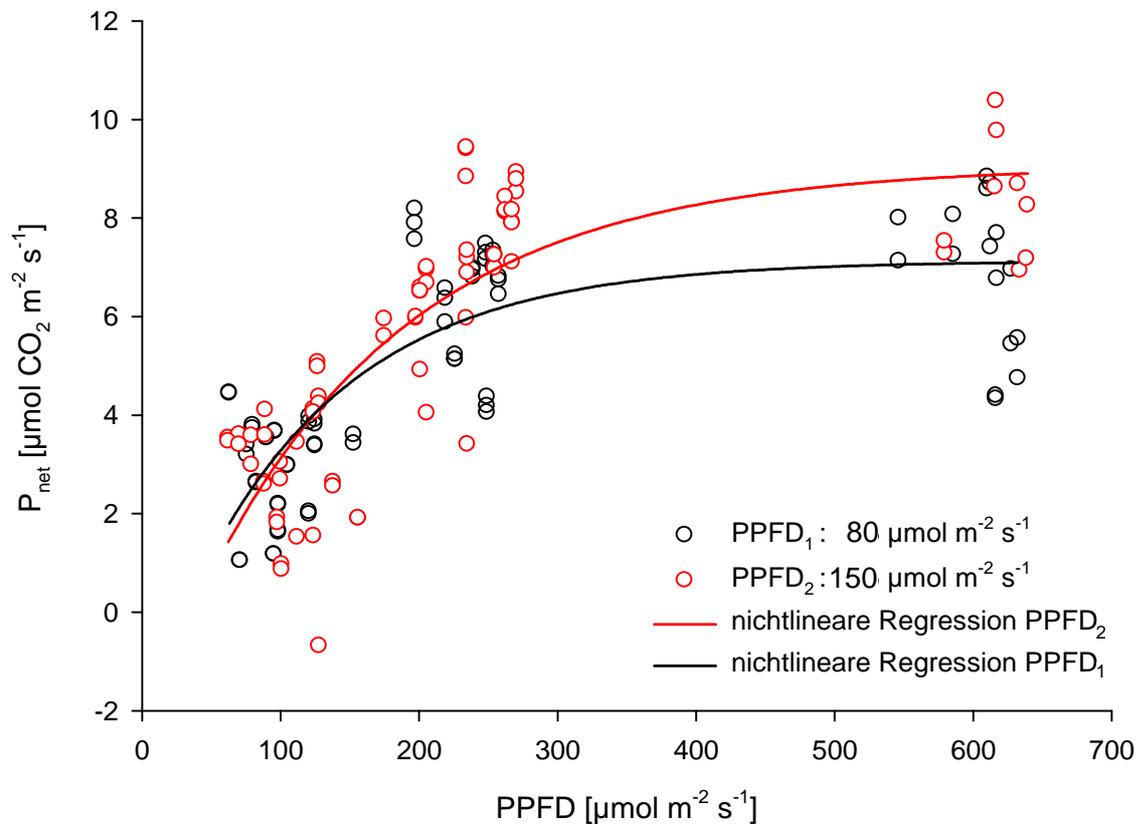


Abb. 35: Lichtsättigungskurven von Stecklingen, die mit zwei unterschiedlichen Lichtintensitäten behandelt wurden (PPFD₁: $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; PPFD₂: $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.5.3 CO₂-Gaswechsel von kalt-dunkel behandelten Stecklingen während der Lichtphase

Aufbauend auf den bisher gewonnenen Ergebnissen zum Netto-Gaswechsel von Petunienstecklingen, sollten nun die Auswirkungen der kalten Dunkelbehandlung von Stecklingen auf die CO₂-Gaswechselraten analysiert werden. Die erhaltenen Informationen zur Nettphotosyntheserate sowie zur Dunkelatmung könnten eventuelle Rückschlüsse auf die Unterschiede zwischen unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen in der Betrachtung der Kohlenhydrate zulassen. In einem weiteren Experiment wurden die Nettogaswechselraten von kalt-dunkel behandelten und unbehandelten Stecklingen in der Lichtphase miteinander verglichen (Abb. 36).

Die Gegenüberstellung der Nettphotosyntheseraten pro Steckling von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Auch die

Dunkelatmung pro Steckling verlief während des Zeitraums auf einem ähnlichen Niveau. Um die CO_2 -Gaswechselraten der unterschiedlich behandelten Stecklinge besser miteinander vergleichen zu können erfolgte eine Datenkorrektur der Bezugsgröße auf die Blattfläche. Weder für die Nettophotosyntheserate, noch für die Dunkelatemung bezogen auf die Blattfläche konnte ein signifikanter Einfluss einer kalt-dunkel Behandlung ermittelt werden.

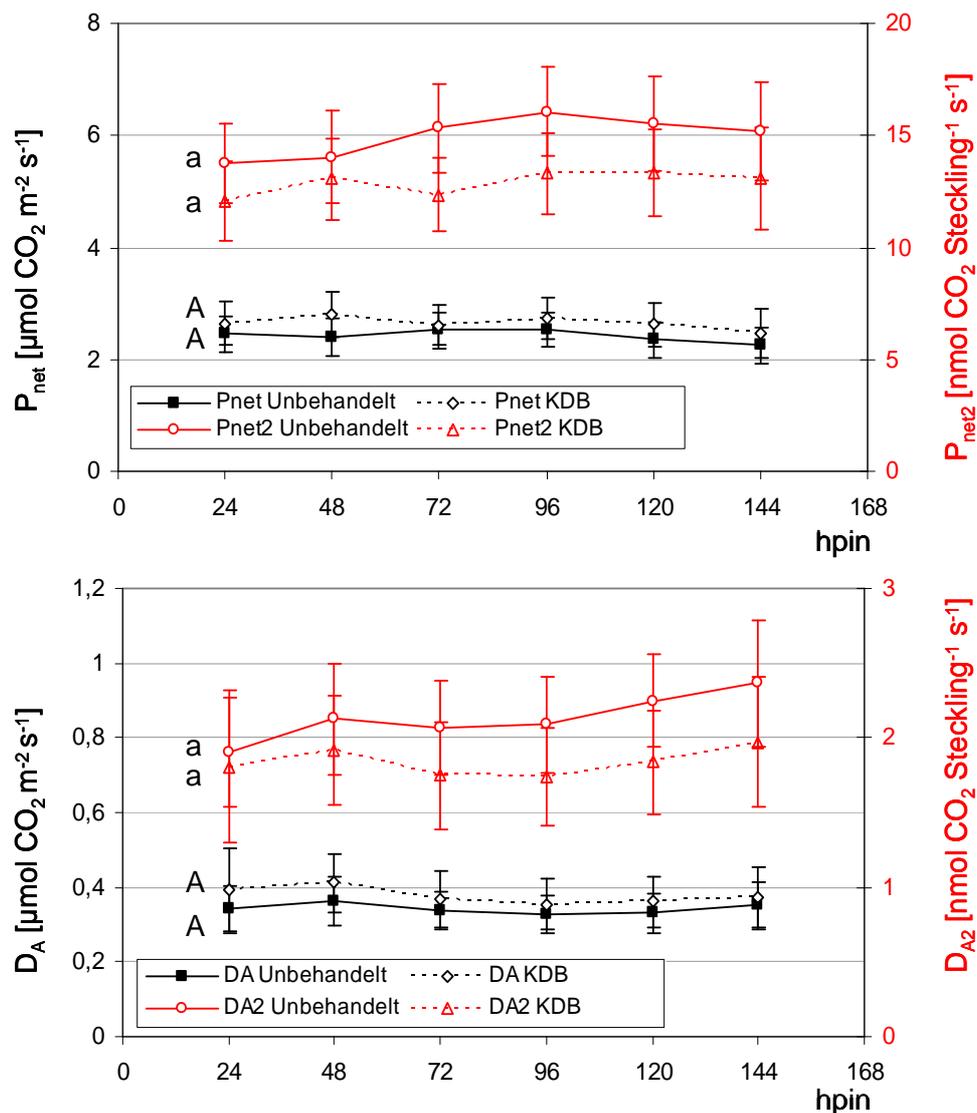


Abb. 36: Verlauf der Tagesmittelwerte der Nettophotosyntheseraten (oben), bezogen auf die Blattfläche (P_{net}) oder pro Steckling (P_{net2}) und der Dunkelatemung (unten), bezogen auf die Blattfläche (D_A) oder pro Steckling (D_{A2}).

Dargestellt ist der Zeitraum von 24 bis 144 Stunden nach dem Stecken (hpin) von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten (KDB) Stecklingen; $n = 8$., unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zu jedem Zeitpunkt ($p \leq 0,05$).

Abschließend wurde der Netto-Kohlenstoff-Gewinn aus dem Gaswechsel, die CUE und die Kohlenstoffbilanz der unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklinge während des

Zeitraums von 0 bis 168 hpin während der Lichtphase miteinander verglichen (Tab. 8). Wie bereits in Kapitel 3.5.1 erwähnt, konnte in unbehandelten Stecklingen die über die Nettphotosynthese gebildete Menge an Kohlenstoff in der Trockenmasse nicht wiedergefunden werden. Beim Vergleich der assimilierten Kohlenstoffmenge aus der Nettphotosynthese und der Trockenmasse von kalt-dunkel behandelten Stecklingen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Rate der Nettphotosynthese und der Dunkelatmung beider Stecklingsvarianten unterschied sich während dieser Versuchsphase nicht signifikant. Dies spiegelt auch die berechnete Menge an assimilierten Kohlenstoff aus der Nettphotosynthese wieder, allerdings zeigt sich beim Vergleich der Kohlenstoffmenge aus der Trockenmasse von kalt-dunkel behandelten Stecklingen ein signifikant höherer Wert als in den Kontrollen. Des Weiteren waren die CUE und der Zuwachs an Trockenmasse in kalt-dunkel behandelten Stecklingen signifikant höherer als in den Kontrollen.

Tab. 8: Vergleich des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO₂-Aufnahme (C_{net}) und aus der Pflanzentrockenmasse (C_{TM}) pro Steckling, der Carbon Use Efficiency (CUE) sowie der Zunahme der Blattfläche (ΔBF) und Trockenmasse (ΔTM) pro Steckling 0–168 hpin von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten (KDB) Stecklingen.

n = 4, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede, Sternchen zeigen signifikante Unterschiede beim Vergleich C_{net} und C_{TM} innerhalb der gleichen Behandlung (p≤0,05).

Behandlung	C_{net} [gC je Steckling]	C_{TM} [gC je Steckling]	CUE [-]	ΔBF [cm ² je Steckling]	ΔTM [g je Steckling]
unbehandelt	0,040 ^{a*}	0,036 ^a	0,72 ^a	10,29 ^a	0,07 ^a
KDB	0,042 ^a	0,042 ^b	0,80 ^b	8,26 ^a	0,11 ^b

Es konnte demonstriert werden, dass eine kalte Dunkelbehandlung den CO₂-Gaswechsel von Petunienstecklingen nicht signifikant verändert. Dies spiegelte sich auch in einer vergleichbaren Menge an assimilierten Kohlenstoff aus der Nettphotosynthese in beiden Stecklingsvarianten wider. Jedoch konnte für kalt-dunkel behandelte Stecklinge ein signifikant höherer Trockenmassezuwachs und CUE im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

4.1 Veränderungen des zeitlichen Verlaufs der AWB

Eine erfolgreiche vegetative Vermehrung von Stecklingen ist abhängig von der Bildung von Adventivwurzeln. Das Potential genügend Adventivwurzeln zu bilden, bestimmt maßgeblich die Qualität und das Wachstum der Stecklinge, da über das Wurzelsystem die Nährstoff- und Wasseraufnahme realisiert wird (Benjamin und Wren, 1978). Exogene Faktoren, wie die Lichtintensität, Photoperiode, Temperatur und Feuchtigkeit sowie der Gesundheitszustand der Donorpflanzen können eine große Rolle für den Bewurzelungserfolg der Stecklinge spielen (von Hentig und Knösel, 1986; Hartmann et al., 1990). Eine weitere Einflussgröße, die bisher in der Literatur des Öfteren mit einer Einschränkung auf die AWB beschrieben wurde, ist eine kurzzeitige Dunkelbehandlung unbewurzelter Stecklinge. Während des Transports von Zierpflanzenstecklingen zu Bewurzelungsstationen ist eine Lagerung in Dunkelheit ein unumgänglicher Produktionsschritt. Um eine hohe Qualität und damit die Fähigkeit zur Bildung von Adventivwurzeln zu gewährleisten, ist es notwendig die Effekte verschiedener Umweltfaktoren auf den Bewurzelungsvorgang zu kennen und folglich die Transportbedingungen optimieren zu können. Zudem ist es von großer Bedeutung, den durch eine Dunkelbehandlung veränderten Ablauf morphologischer Ereignisse in der AWB zu erkennen. Obwohl sich Forscher mit dem Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die AWB beschäftigt haben, sind umfassende Untersuchungen unter Berücksichtigung einer Dunkelbehandlung von Stecklingen über Umweltfaktoren und morphologische Ereignisse während einer Dunkelbehandlung in Zierpflanzenstecklingen in der Literatur kaum vertreten (Hansen und Eriksen, 1974; Fisher und Hansen, 1977, Eliasson, 1978; Hansen et al., 1978; Druége et al., 2004; Mutui et al., 2005; Rapaka et al., 2005).

4.1.1 Eine kalte Dunkelbehandlung induziert eine beschleunigte Bewurzelung während der Lichtphase

Der Einfluss einer temporären Dunkelbehandlung auf die Bewurzelung von Petunienstecklingen wurde unter Anwendung veränderten Umweltfaktoren untersucht (Dauer der Dunkel- und Lichtphase, Lichtintensität, Temperatur). Der Vergleich mit unbehandelten Kontrollen bei einer identischen Versuchszeit von 16 Tagen, aber einer deutlich reduzierten Lichtphase der kalt-dunkel behandelten Stecklinge auf 9 Tage, führte zu einem ähnlichen

Bewurzelungsniveau. Erste sichtbare Wurzeln außerhalb der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen waren bereits am fünften Tag in der Lichtphase zu erkennen, bei den Kontrollen drei Tage später. Der stimulierende Einfluss einer kalten Dunkelbehandlung auf die Bildung von Adventivwurzeln in Petunienstecklingen konnte noch stärker verdeutlicht werden, indem die Länge der Lichtphase der kalt-dunkel behandelten Stecklinge auf die der Kontrollen angepasst wurde, wobei sich nach 13 Tagen in der Lichtphase bereits erste Lateralwurzeln entwickelten.

Eine fördernde Beeinflussung der Kältebehandlung konnte bereits für Nelke (Garrido et al., 1996 und 1998) und Chrysantheme (Druege et al., 2000) nachgewiesen werden, wobei die erzielten Ergebnisse nicht zu solch starken Effekten wie in Petunie führten. Eine Dunkelbehandlung von Pelargonienstecklingen beeinträchtigt sowohl bei niedrigen (4 °C) als auch bei höheren (21 °C) Temperaturen die AWB negativ und induziert als typische Nachernteeigenschaft dieser Pflanzenart eine Blattseneszenz (Serek et al., 1998; Druege et al., 2004; Rapaka et al., 2005; Mutui et al., 2005).

Garrido et al. (1998) verglichen den Einfluss unterschiedlich langer Kälteperioden (2 bis 12 Wochen) bei 4 °C und einer geringen Lichtintensität (16 W m^{-2}) auf die Bewurzelung von Nelkenstecklingen. Eine Verlängerung der Kälteperioden von zwei auf vier bis sechs Wochen förderte die AWB. Bei einer noch längeren Kälteanwendung verschlechterte sich der Bewurzelungszustand jedoch (Garrido et al., 1998). Die Bewurzelung von Petunienstecklingen wurde durch eine Verlängerung der kalten Dunkelphase von sieben auf 14 Tage nur geringfügig beeinflusst. Diese variierenden Beobachtungen könnten auf die verschiedenen Kombinationen der Faktoren von Dunkelheit und niedrigen Temperaturen zurückzuführen sein. Zudem ist bekannt, dass das Lagerungspotential und die Toleranz für Kühle von der Pflanzenart aber auch vom Genotyp abhängig ist (Pellicer et al., 2000; Hu et al., 2006). Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Experiment die Stecklinge einer warmen Dunkelbehandlung unterzogen. Die Dunkelbehandlung bei 20 °C führte zu einer vergleichbaren Bewurzelung wie bei 10 °C, so dass vermutet werden kann, dass der Effekt der beschleunigten Bewurzelung in erster Linie durch die Dunkelheit verursacht wird. Dennoch zeigten sich phänotypische Veränderungen der Stecklinge (feine dünne Wurzeln, gelbe Blätter). Es ist anzunehmen, dass erhöhte Temperaturen während der Dunkelphase zu einer gesteigerten Respirationsrate und folglich einem Mehrverbrauch an Kohlenstoff und Wasser führen (Amthor, 1989). Ähnliche Blattveränderungen der Stecklinge nach einer Dunkel-

behandlung konnten auch in Studien an Pelargonienstecklingen demonstriert werden (Mutui et al., 2005). Die Blattschäden der warm-dunkel behandelten Stecklinge lassen vermuten, dass es zum Abbau von Chlorophyll und zu Schädigungen des Photosyntheseapparates gekommen ist, wodurch die Leistung der Assimilatsynthese in der Lichtphase eingeschränkt wurde und zu einer verminderten Wurzelqualität der Stecklinge führte. Eine Dunkelbehandlung in Kombination mit niedrigen Temperaturen scheint sich demnach besonders effektiv auf die AWB auszuwirken.

4.1.2 Eine kalte Dunkelbehandlung stabilisiert die Bewurzelungsfähigkeit und reduziert donorpflanzenabhängige Schwankungen der AWB

Die Photosynthese ist eine lichtabhängige Reaktion, die der Synthese und der Bereitstellung von Assimilaten dient und somit für die Pflanze ein lebensnotwendiger Prozess ist. Da besonders in der späteren Phase der AWB verstärkt Kohlenhydrate für das Wachstum und die Verlängerung der Wurzeln zur Verfügung gestellt werden müssen, könnte die Anwendung einer reduzierten Lichtintensität zu einer eingeschränkten Bewurzelung der Stecklinge führen, die sich vermutlich primär negativ auf die Gesamtwurzellänge und die Bewurzelungsrate auswirkt.

Im Gegensatz zu den Erwartungen führte eine geringere Lichtintensität zu keinem signifikanten Unterschied in der AWB. Weder die Kontrollen, noch die kalt-dunkel behandelten Stecklinge zeigten eine schlechtere Bewurzelung aufgrund der veränderten Bestrahlungsstärke. Untersuchungen mit kalt gelagerten Pelargonienstecklingen führten zu einer verbesserten AWB, wenn die Lichtintensität in der sich anschließenden Bewurzelungsphase erhöht wurde (Rapaka et al., 2005). Eine Anwendung von unterschiedlichen Lichtintensitäten bei Erbsensämlingen führte nur dann zu Veränderungen in der Bewurzelung, wenn bereits die Donorpflanzen unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt waren (Hansen et al., 1978). Eine höhere Bestrahlungsstärke der Donorpflanzen resultierte in einer reduzierten Bildung von Adventivwurzeln (Hansen et al., 1978). Dieser negative Zusammenhang konnte auch für Dahlie, nicht jedoch für Chrysantheme nachgewiesen werden (Biran und Halevy, 1973; Fisher und Hansen, 1977). Generell bestätigen die erzielten Ergebnisse an Petunienstecklingen, dass der spätere Bewurzelungserfolg weniger durch die angewendete Lichtintensität während der Stecklingsbewurzelung, sondern vielmehr durch die Bestrahlungsstärke der Donorpflanzen beeinflusst wird. Die für den Versuch verwendeten

Stecklinge wurden von Pflanzen geerntet, die unter gleichen Bedingungen in einem Gewächshaus herangezogen wurden. Dennoch ist auch denkbar, dass eine Anwendung von noch höheren Lichtintensitäten während der Bewurzelung einen stimulierenden Effekt auf die AWB haben könnte. Solche Experimente wurden jedoch nicht durchgeführt, da bereits eine PPFd von $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erst nach ca. einer Woche nach dem Stecken der Stecklinge angewendet werden konnte um Trockenstress zu vermeiden.

Das Bewurzelungspotential eines Stecklings kann maßgeblich durch den Gesundheitszustand und den der Donorpflanzen ausgesetzten Umweltbedingungen (Temperatur, Lichtintensität) beeinflusst werden. Dies verdeutlichen auch die Abweichungen der analysierten Bewurzelungsparameter der unbehandelten Kontrollen in den Experimenten. Um relativ konstante Wachstumsbedingungen der Donorpflanzen zu gewährleisten, wurden die Temperatur und die Lichtintensität im Gewächshaus mit Hilfe von Lüftungs- und Schattierungseinrichtungen vorgenommen. Druge et al. (2004) beobachteten bei ungelagerten Pelargonienstecklingen, dass sich Schwankungen in der Stickstoffdüngung der Donorpflanzen auch auf die Bildung von Adventivwurzeln der Stecklinge übertragen. Obwohl eine optimierte Stickstoffversorgung der Petunienmutterpflanzen angestrebt und diese mit Hilfe regelmäßiger Bodensubstratanalysen kontrolliert wurde, können Veränderungen und Unterschiede innerhalb der Pflanzen in Wechselwirkung mit Umweltfaktoren nicht ausgeschlossen werden. Der Gebrauch unterschiedlicher Samenchargen für die Anzucht der Mutterpflanzen könnte zudem auch die AWB beeinflussen (Hansen et al., 1978). Es hat den Anschein, dass eine kalte Dunkelbehandlung von Petunienstecklingen die von den Donorpflanzen hervorgerufenen Schwankungen in der AWB reduziert und die Bewurzelungsfähigkeit stabilisiert. Dies zeigte sich in weniger ausgeprägten Abweichungen der Bewurzelungsparameter der kalt-dunkel behandelten Stecklinge. Die Annahme konnte mit einer signifikant geringeren Varianz der Wurzelanzahl und Gesamtwurzellänge innerhalb einzelner kalt-dunkel behandelter Stecklinge gegenüber den Kontrollen konkretisiert werden.

Hinweise einer Temperaturabhängigkeit der AWB konnten gezeigt werden, indem die Umgebungsluft in der Klimakammer während der Lichtphase auf $10 \text{ }^\circ\text{C}$ reduziert wurde und die Petunienstecklinge unabhängig von einer vorherigen kalten Dunkelbehandlung nicht bewurzelten. Kombinierte man jedoch eine kühle Lichtphase mit einer warmen Dunkelperiode ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), so bewurzelten diese Stecklinge auf einem vergleichbaren Niveau wie die unbehandelten Kontrollen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Das Bewurzelungsverhalten der Stecklinge weist

darauf hin, dass die AWB bereits während der Dunkelbehandlung induziert wird und vor dem Ausbruch der ersten Wurzeln aus der Stängelbasis ein Wärmeimpuls erforderlich sein könnte. Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen in der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen zeigten bereits 120 hpe erste meristematische Zellen. Dieses Entwicklungsstadium erreichten bis zum Ende der Dunkelphase alle Petunienstecklinge. Es ist anzunehmen, dass aufgrund einer erhöhten Temperatur während der Dunkelbehandlung metabolische Vorgänge beschleunigt ablaufen und folglich auch der Prozess der AWB begünstigt wird, so dass z. B. die Aktivität von bestimmten in den Wurzelbildungsprozess involvierter Enzyme durch die höhere Temperatur kurzzeitig erhöht wird. Bei einer kalten Dunkelbehandlung wäre solch eine Regulation von Enzymaktivitäten durch den verzögerten Ablauf der AWB erst während der Lichtphase denkbar. Offensichtlich ist die Induktion und der Ausbruch von Adventivwurzeln auch bei kühleren Temperaturen möglich, jedoch kann vermutet werden, dass während des Wachstums der Wurzelstrukturen ein Wärmestimulus erfolgt.

4.1.3 Während der kalten Dunkelbehandlung wird die AWB initiiert und der Phasenverlauf verzögert

Die reduzierte Bewurzelungszeit während der Lichtphase von kalt-dunkel behandelten Stecklingen ist auf Veränderungen von morphologischen Ereignissen, die bereits während der Dunkelphase stattfinden, zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass ab 120 hpe erste meristematische Zellen in der Stängelbasis gebildet wurden. Im Gegensatz dazu waren in unbehandelten Stecklingen 48 hpe erste meristematische Zellen sichtbar, 24 Stunden früher als in einer Studie an unbehandelten Petunienstecklingen von Ahkami et al. (2009) gezeigt wurde. Vergleicht man das Auftreten der ersten morphologisch veränderten Strukturen in kalt-dunkel behandelten Stecklingen mit den unbehandelten Kontrollen, so lässt sich schlussfolgern, dass die Induktions- und Initiationsphase der AWB unter dem Einfluss einer kalten Dunkelbehandlung verzögert ablaufen. Es ist bekannt, dass geringe Temperaturen den Metabolismus der Pflanzen herabsetzen, z. B. sind Enzyme in ihrer Aktivität eingeschränkt und beeinflussen somit eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen (Rudnicki et al., 1991). Zu Beginn der AWB sind vor allem Phytohormone wie Jasmonsäure und Auxin, involviert, die z. B. Gene von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels induzieren können oder selbst über Zuckermoleküle in ihrem Transport und ihrer Biosynthese reguliert werden (Léon und Sheen,

2003; Takahashi et al., 2003; Gibson, 2004; Roitsch und González, 2004; Schaarschmidt et al., 2006; Wasternack, 2007). Der Auxintransport erfolgt hauptsächlich aus oberen Pflanzenteilen in die Stängelbasis und wird durch höhere Temperaturen begünstigt (Morris, 1979). Diese Translokation wurde auch mit einem Co-Transport von Saccharose beschrieben (Baker, 2000). Aufgrund der gehemmten Photosynthese bei Dunkelheit und der damit verbundenen kontinuierlichen Abnahme der Assimilatreserven in den *Source*-Geweben, könnte der Auxintransport nicht nur durch niedrige Temperaturen, sondern auch durch eine verminderter Translokationsrate von Saccharose in die Stecklingsbasis eingeschränkt sein. Diese Prozesse laufen offenbar verzögert in der kalten Dunkelperiode ab. Während innerhalb von 24 Stunden nach dem ersten Erscheinen von meristematischen Zellen alle untersuchten unbehandelten Stecklinge dieses Entwicklungsstadium erreichten, benötigten die kalt-dunkel behandelten Stecklinge die dreifache Zeit.

4.1.4 Eine kalte Dunkelbehandlung induziert die Etablierung eines Sinks während der Dunkelphase und beschleunigt den Phasenverlauf in der Lichtperiode

Ahkami et al. (2009) definierten für Petunienstecklinge den Abschnitt bis zum Erscheinen der ersten meristematischen Zellen, welcher mit einer Vielzahl von biochemischen Reaktionen einhergeht als die *Sink-establishment* und die *Recovery Phase*. Die erste Phase wird durch die Wundreaktion eingeleitet, welche die Etablierung eines *Sinks* initiiert. Saccharose wird aus den Blättern in die Stängelbasis transportiert und im Apoplast mit Hilfe der Zellwandinvertase in Hexosen gespalten, die Energie für die Wundheilung und metabolische Vorgänge bereitstellen (Sonnewald und Ebner, 1998; Ahkami et al., 2009). Die Aktivität der Zellwandinvertase könnte dabei über eine wundspezifische Erhöhung der Jasmonsäurelevel reguliert werden (Roitsch und González, 2004; Schaarschmidt et al., 2006; Wasternack, 2007). Für Petunienstecklinge könnte es bedeuten, dass bereits in der Dunkelphase ein *Sink* etabliert wurde, der in der weiteren Bewurzelung in der Lichtphase entscheidend die Transportrate von Kohlenhydraten aus den *Source*-Blättern in die Stängelbasis steuern könnte. Vergleicht man den Zuwachs der Wurzeltrockenmassen sowie das Längenwachstum des Stängels von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen, so zeigt sich, dass die behandelten Stecklinge ein geringeres Längenwachstum aber einen höheren Zuwachs an Wurzeltrockenmasse aufwiesen.

Sink-Gewebe sind nicht nur photosynthetisch inaktive, sondern auch photosynthetisch eingeschränkte Pflanzenteile wie z. B. junge Blätter. In der Wachstumsphase des Stecklings konkurrieren dementsprechend mehrere *Sinks* untereinander, wobei durch die *Sink*-Stärke, also die Fähigkeit des Assimilatimports, ein hierarchisches System aufgebaut wird (Sonnewald und Ebner, 1998). Da die Bildung eines *Sinks* in der Stängelbasis bereits während der Dunkelphase etabliert wurde, könnte die Translokation von Assimilaten in der sich anschließenden Lichtphase bevorzugt in diese Richtung erfolgt sein und die AWB in der Wurzelzone fördern. Damit wäre erklärbar, dass der morphologische Entwicklungsrückstand in der Stängelbasis der kalt-dunkel behandelten Stecklinge bis 192 hpe nachgewiesen werden konnte, sich allerdings ab 216 hpe keine signifikanten Unterschiede mehr in den Wachstumsstadien zwischen den behandelten Stecklingen und den Kontrollen zeigten. Die zu Versuchsende durchgeführte Bonitur ergab sogar eine bessere Bewurzelung der kalt-dunkel behandelten Stecklinge. Die Determination der Wurzelanzahl findet in der Induktionsphase der AWB statt (Hartmann et al., 1990). Wie viele Wurzeln in der Stängelbasis des Stecklings angelegt werden erfolgt also während der Dunkelphase. Es konnte gezeigt werden, dass die in der Dunkelperiode verzögerten morphologischen Ereignisse während der Lichtphase beschleunigt ablaufen und der Entwicklungszustand der unbehandelten Kontrollen zu Versuchsende sogar überholt wurde.

4.2 Veränderungen des Energiestoffwechsels während der AWB

Obwohl bisher angenommen wurde, dass vor allem Phytohormone die Bildung von Adventivwurzeln kontrollieren, wurden in den letzten Jahren auch vermehrt den Kohlenhydraten eine mögliche Rolle zugeschrieben. Kohlenhydrate dienen hauptsächlich der Bereitstellung von Kohlenstoff-Skeletten und Energie in der späteren Phase der AWB, jedoch kann eine regulatorische Funktion in der Expression von Genen und als Signalmolekül in der frühen Phase der AWB nicht ausgeschlossen werden (Koch, 1996; Jang et al., 1997; Takahashi et al., 2003; Gibson, 2005). Besonders Saccharose und Saccharose-abbauenden Enzyme scheinen bei der Etablierung neuer *Sink*-Gewebe und der Dedifferenzierung von Zellen wichtig zu sein (Farrar et al., 1995; Sonnewald et al., 1997; Sturm und Tang, 1999; Koch und Zeng, 2002; Calamar und De Klerk, 2002; Ahkami et al., 2009). Um die Nährstoffbereitstellung und damit das Wachstum der *Sink*-Gewebe zu garantieren, werden Photoassimilate, hauptsächlich in Form von Saccharose, aus den *Source*-Blättern importiert

(Benjamin und Wren, 1978; Haissig, 1982; Sonnewald und Ebneht, 1998; Rook und Bevan, 2003). Dabei wird offenbar die Translokationsrate und demzufolge die Verfügbarkeit von energiereichen Kohlenstoffverbindungen für Wachstum und Entwicklung über die *Sink*-Stärke reguliert (Farrar, 1993; Pammenter et al., 1993; Paul und Foyer, 2001). Das trifft auch auf die AWB zu, die über die Kohlenhydratverfügbarkeit beeinflussbar ist. So wurden erhöhte Kohlenhydratlevel in der Stängelbasis durch die Zugabe von Saccharose oder Glucose in das Wachstumsmedium herbeigeführt und resultierten in einer stärkeren Bewurzelung (Li und Leung, 2000; Calamar und De Klerk, 2002; Takahashi et al., 2003; Custódio et al., 2004; Gollagunta et al., 2004; Zarattieri et al., 2009). Nachdem mit den vorliegenden Analysen gezeigt werden konnte, dass eine kalte Dunkelbehandlung zu Verschiebungen des zeitlichen Ablaufs der AWB und Ausbildung eines *Sink*-Gewebes in der Stängelbasis in Petunienstecklingen führte, war zu hinterfragen, ob diese Ereignisse im Zusammenhang mit Veränderungen des Kohlenhydrathaushaltes stehen.

4.2.1 Eine kalte Dunkelbehandlung führt zu einer Verarmung der Kohlenhydrate während der Dunkelphase

Erwartungsgemäß führte eine kalte Dunkelbehandlung der Stecklinge zu einer Abnahme der Kohlenhydratgehalte in den Blättern und der Stängelbasis. Dieser Effekt wurde bereits in Studien mit Chrysantheme und Pelargonie beobachtet (Druege et al., 2000 und 2004; Rapaka et al., 2005 und 2008). Die Kohlenhydratverarmung war in den *Source*-Teilen der Petunienstecklings besonders stark ausgeprägt, was zu der Annahme führt, dass die dem Steckling noch zur Verfügung stehenden Kohlenhydrate vermehrt in die Stängelbasis transportiert wurden. Ein vergleichbarer Effekt konnte auch bei einer Dunkelbehandlung von Pelargonienstecklingen beobachtet werden (Rapaka et al., 2005) Bedingt durch die Hemmung der lichtabhängigen Photosynthese konnten keine Assimilate in den Blättern mehr gebildet.

Damit die Pflanzengewebe weiterhin stetig mit Energie versorgt und das Wachstum und die Entwicklung gewährleistet werden können, wird vermehrt Stärke remobilisiert (Ho, 1978; Geiger und Servaites, 1994; Sonnewald und Ebneht, 1998; Gibon et al., 2004). Dies zeigte sich in Petunienstecklingen im Absinken des Stärkelevels in den Blättern bereits ab 24 hpe. Die temporäre Anpassung der Kohlenstoffverfügbarkeit in den *Source*-Gewebe konnte bis

72 hpe für Glucose und Fructose gezeigt werden. Gleichzeitig nahmen die Aktivitäten der glucoseabbauenden Enzyme, wie Glucokinase und Pyruvatkinase ab.

Saccharose ist neben Stärke ein Hauptprodukt der Photosynthese und stellt eine wichtige Kohlenstoffquelle dar (Huber, 1983; Pammeter et al., 1993). Die Kohlenstoffverteilung und Versorgung von *Sink*-Gewebe wird im Wesentlichen über Saccharose realisiert (Farrar et al., 1995; Sonnewald und Ebner, 1998). In den Blättern von Petunienstecklingen sank der Gehalt des Disaccharids ab 24 hpe in der Dunkelphase, obwohl die Aktivitäten der vakuolären und cytosolischen Invertasen ab 72 hpe abnahmen und somit der Abbau von Saccharose zu Glucose und Fructose reduziert wurde. Ahkami et al. (2009) berichteten, dass Saccharose bereits kurze Zeit nach dem Abschneiden des Petunienstecklings von der Donorpflanze aus den Blättern in die Stängelbasis transportiert und dort mit Hilfe einer Zellwandinvertase in Hexosen gespalten wird und somit entscheidend zur Etablierung eines *Sinks* beiträgt. Der durch die Wundreaktion transiente Anstieg der endogenen Jasmonatlevel führt zur Expression spezifischer Gene. Diese codieren für verschiedene Enzyme, darunter auch die Zellwandinvertase (Roitsch und González, 2004; Schaarschmidt et al., 2006). Die Bildung neuer *Sink*-Strukturen wird demnach durch die Expression von Genen und die Aktivität von Saccharoseabbauenden Enzymen eingeleitet (Sonnewald et al., 1997; Sturm und Tang, 1999).

Sink-Gewebe sind durch besonders hohe Zellteilungsrate gekennzeichnet. Vorgänge wie Differenzierungen und Wachstum von Zellen verbrauchen viel Energie, so dass der Assimilatimport in Form von Saccharose gesichert sein muss (Farrar et al., 1995). Betrachtet man den Zeitpunkt 120 hpe, bei dem erste meristematische Zellen in der Stängelbasis von kalt-dunkel behandelten Stecklingen auftraten, so kann vermutet werden, dass diesem morphologischen Ereignis auch andere kohlenstoffverbrauchende Stoffwechselfvorgänge vorausgegangen sind (z. B. eine erhöhte RNA-Synthese), die eine gesteigerte Translokationsrate von Saccharose aus den Blättern in die Stängelbasis bedingen und somit der Gehalt in den Blättern noch schneller reduziert wurde. Angesichts einer begrenzten Verfügbarkeit an löslichen Zuckern für die Bereitstellung von Energie zur Bildung von Adventivwurzeln, wurden die aus Saccharose gebildeten Hexosen offenbar direkt für metabolische Reaktionen verwertet und nicht in Form von Stärke gespeichert (Veierskov, 1988). Dies spiegelt sich auch in den unverändert aktiven Enzymen des Glucosekatabolismus und Pentosephosphatweges wieder. Die Aktivität der Saccharoseabbauenden Enzyme reduzierte sich erst 168 hpe, so dass Hexosen nachgeliefert werden konnten.

Die morphologischen Veränderungen und die Etablierung eines *Sinks* während der Dunkelphase unterstützen die Auffassung, dass der Kohlenstoff-Pool des Stecklings nach dem Schneiden ausreichend Energie und Kohlenhydrate für die frühe Phase der AWB zur Verfügung stellen konnte, jedoch nicht in großem Übermaß zum Anlegen von Stärke speichern. Ahkami et al. (2009) äußerten, dass diese frühen Ereignisse weniger von Kohlenhydraten abhängig sind, obwohl eine regulatorische Funktion der Zucker in der AWB nicht auszuschließen ist. Die Autoren sind der Auffassung, dass Kohlenhydrate in Petunienstecklingen stärker an dem Wachstum und weniger an der Initiation von Wurzeln beteiligt sind (Ahkami et al., 2009). Die beobachteten Veränderungen des Kohlenhydratstatus in Petunienstecklingen während einer kalten Dunkelbehandlung lassen vermuten, dass Kohlenhydrate auch zu Beginn der AWB notwendig sind. Diese Annahme bestätigen auch Versuche mit Apfel, Eukalyptus und Kiefer (Calamar und De Klerk, 2002; Da Rocha Corrêa et al., 2005; Zarattieri et al., 2009). Calamar et al. (2002) beobachteten den Effekt einer exogenen Zufuhr von Saccharose auf die AWB von Apfelstecklingen in Abhängigkeit der Entwicklungsphasen. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Zugabe von Saccharose innerhalb der ersten 48 Stunden die AWB besonders fördert und sich dies hauptsächlich in einer erhöhten Wurzelanzahl widerspiegelte (Calamar und De Klerk, 2002). In Eukalyptus und Kiefer wurde die AWB insbesondere stimuliert, wenn Glucose in der frühen Phase und Saccharose in der Wurzelwachstumsphase zugegeben wurde (Da Rocha Corrêa et al., 2005; Zarattieri et al., 2009). Die Autoren vermuten eine wichtige Funktion der Kohlenhydrate bei dem Vorgang der Dedifferenzierung von Zellen und der Induktion von meristematischen Wurzelinitalen (Calamar und De Klerk, 2002; Da Rocha Corrêa et al., 2005; Zarattieri et al., 2009). Bis jetzt ist jedoch die exakte Funktion von Kohlenhydraten in Relation zu verschiedenen Entwicklungsstadien noch unbekannt und kann nicht eindeutig differenziert werden.

Während sich in den Blättern die Kohlenhydratverfügbarkeit im Verlauf der Dunkelbehandlung stark reduzierte, blieb in der Stängelbasis trotz fehlender Assimilatsynthese der Kohlenstoff-Pool relativ konstant. Somit könnte über den Transport von Kohlenhydraten aus den *Source*-Gewebe die Zufuhr von ausreichend Energie in die Wurzelzone garantiert werden (Haissig, 1982 und 1986; Veierskov, 1988). Auch ein möglicher Co-Transport von Auxin wäre so gesichert und könnte zu einer Akkumulation des Phytohormons in der Stängelbasis unterstützend beitragen.

4.2.2 Eine kalte Dunkelbehandlung steigert die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten in der Lichtphase

Blätter sind unter Lichteinstrahlung photosynthetisch aktive Pflanzenteile, die Assimilate produzieren, so dass folglich der Kohlenstoff-Pool und die Kohlenhydratverfügbarkeit des Stecklings vergrößert werden.

In der Lichtphase akkumulierten alle Zucker in den Blättern und der Stängelbasis von Petunienstecklingen kontinuierlich, unabhängig davon, ob die Stecklinge zuvor einer kalten Dunkelbehandlung ausgesetzt wurden. Ein Ansteigen der Kohlenhydratlevel während des Bewurzelungsvorgangs unter Lichteinstrahlung konnte z. B. bereits für Stecklinge von Kiefer, Pelargonie sowie Petunie nachgewiesen werden (Haissig, 1984; Rapaka et al., 2005 und 2008; Ahkami et al., 2009). Der Gehalt von Glucose und Fructose stieg, im Vergleich zu den anderen gemessenen Zuckern, in beiden untersuchten Geweben am stärksten an, wobei die Zunahme in der Stängelbasis mit einer zeitlichen Verzögerung zu beobachten war. Analysen zu Veränderungen des Kohlenhydratstatus während der AWB demonstrierten, dass die Akkumulation von Zuckern in den oberen Pflanzenteilen beginnt und sich in Richtung Sprossbasis ausbreitet (Veierskov, 1982; Haissig, 1982 und 1984). Der Anstieg der Hexosen sowie eine gesteigerte Aktivität der Glucokinase in den Blättern von kalt-dunkel behandelten Petunienstecklingen begann ab 24 hpin und war ab 72 hpin in der Stängelbasis nachweisbar, jedoch ohne eine signifikante Erhöhung der Glucokinaseaktivität. In den unbehandelten Kontrollen fand dieser Vorgang im Blattgewebe ab 72 hpin und in der Stängelbasis 168 hpin verzögert statt. Die hier erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass durch eine kalte Dunkelbehandlung die Kohlenhydrate vermutlich schneller in den Blättern zur Verfügung stehen und der Transport in die Stängelbasis gefördert wird. Die Annahme, einer stimulierten Translokationsrate von Saccharose in den kalt-dunkel behandelten Stecklingen, basiert auf dem unmittelbaren Anstieg des Disaccharids nach dem Stecken in den Blättern und vor allem in der Stängelbasis bereits 6 hpin. Die Aktivität der Invertasen in den Blättern von kalt-dunkel behandelten Stecklingen stieg ab 72 hpin an, so dass sich bis zu diesem Zeitpunkt der Gehalt an Saccharose erhöhte und für den Transport in die Stängelbasis zur Verfügung stand. In der Stecklingsbasis konnte jedoch keine erhöhte Aktivität der Saccharose abbauenden Enzyme nachgewiesen werden. Beim direkten Vergleich der vakuolären und cytosolischen Invertasen von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen konnten festgestellt werden, dass ab 72 hpin die Aktivitäten der Saccharose abbauenden Enzyme in der Stängelbasis in den

behandelten Stecklingen signifikant höher waren und demzufolge die Bereitstellung von Energie in Form von Hexosen in der Zone der Rhizogenese umfangreicher erfolgte als in der Stecklingsbasis der Kontrollen.

Erhöhte Kohlenhydratlevel in dem Wurzelbildungsbereich korrelieren positiv mit dem Wachstum und der Entwicklung von Adventivwurzeln (Haissig, 1982 und 1989; Hartmann et al., 1990; Li und Leung, 2000; Gibson, 2005). Erst zum Zeitpunkt der letzten Probenahme (168 hpin) war der Gehalt an Saccharose in den Blättern und der Sprossbasis von unbehandelten Stecklingen signifikant höher als in kalt-dunkel behandelten Stecklingen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die sich bereits gebildeten Wurzeln an der Stängelbasis von behandelten Stecklinge 168 hpin bei der Beprobung von dem Sprosstück entfernt und nicht analysiert wurden, so dass vermutet werden kann, dass auch zu diesem Zeitpunkt der Gehalt an Kohlenhydraten in den kalt-dunkel behandelten Stecklingen höher als in den Kontrollen war. Die signifikant stärkere Akkumulation von Saccharose im Blattgewebe der Kontrollen könnte durch eine verminderte Transportrate in den Wurzel-*Sink* verursacht worden sein. Wenn die Importrate von Kohlenhydraten in ein *Sink*-Gewebe höher als der Verbrauch ist, so wird dieses Ungleichgewicht kurzzeitig mit einer verstärkten Anreicherung von Saccharose in den *Source*-Blättern ausbalanciert (Arp, 1991; Stitt, 1991; Farrar, 1993; Pammenter et al., 1993). Eine genauere Aussage lässt sich jedoch aufgrund der nicht analysierten Wurzelproben nicht treffen.

Des Weiteren wurde sowohl in den Blättern als auch in der Stängelbasis ein beachtlicher Teil der produzierten Assimilate in Stärke umgewandelt. Dabei war auffällig, dass eine Einlagerung von Kohlenhydraten in Form von Stärke in der Wurzelzone von kalt-dunkel behandelten Stecklingen früher erfolgte als in den unbehandelten Kontrollen (72 hpin vs. 168 hpin). Die Akkumulation von Kohlenhydraten als Stärke erfolgt hauptsächlich wenn überschüssig synthetisierte Assimilate gespeichert und in Dunkelphasen eine stetige Energieversorgung des Stecklings, insbesondere der *Sinks* gewährleistet werden soll (Geiger und Servaites, 1994; Gibon et al., 2004). Das frühere Anlegen eines Kohlenhydratspeichers deutet auf eine begünstigte Kohlenstoffversorgung der kalt-dunkel behandelten Stecklinge hin. Li und Leung (2000) demonstrierten an *Pinus radiata*, dass die Applikation von Saccharose in das Wachstumsmedium zu einer endogenen Anreicherung des Disaccharids aber auch von Stärke in der Wurzelregion der Hypokotylstecklinge führt und die Wurzelbildung fördert. Der Verlauf der Wurzelinitiation bis hin zur Bildung der Primordien in der

Stängelbasis war durch einen erhöhten Stärkelevel gekennzeichnet, welcher aber in der weiteren AWB wieder absank (Li und Leung, 2000). Die Anreicherung von Stärke in der Zone der Rhizogenese in der frühen Phase der AWB könnte somit als biochemischer Marker dienen (Li und Leung, 2000). Aufgrund des späteren Anstiegs von Stärke in den Petunienstecklingen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche kann vermutet werden, dass Stärke nicht in die Wurzelinitiation involviert ist. Ahkami et al. (2009) stellten einen ähnlichen Verlauf der Stärkelevel in unbehandelten Petunienstecklingen fest und schlossen ebenfalls eine Funktion von Stärke an der Wurzelinitiation aus.

Zu Beginn der Lichtphase unterschieden sich die beiden Stecklingsvarianten in ihren Entwicklungsstadien. In den kalt-dunkel behandelten Stecklingen wurden bereits während der Dunkelperiode meristematische Zellen angelegt und ein *Sink* in der Wurzelregion etabliert. Die unbehandelten Kontrollen befanden sich beim Eintritt in die Lichtphase noch am Anfang der AWB. Der Steckling reagierte auf das Abschneiden von der Donorpflanze mit einer Wundreaktion und es entwickelten sich erst 48 hpin meristematische Zellen. Die Aktivität von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, das Schlüsselenzym des Pentose-Phosphatweges, stieg in der Stängelbasis beider Stecklingsvarianten ab 72 hpin an. Der direkte Vergleich der Enzymaktivitäten zeigte eine signifikant höhere Aktivität 6 hpin in kalt-dunkel behandelten Stecklingen und ab 72 hpin in den unbehandelten Kontrollen. Weiterhin konnte ab 72 hpin in beiden Stecklingsvarianten ein Anstieg der Aktivität von Phosphofruktokinase und gleichzeitig eine Abnahme des antagonistisch wirkenden Enzyms FBPase festgestellt werden. Die Aktivitätsveränderungen dieser Enzyme lassen vermuten, dass neben dem Glucosekatabolismus auch die Glycolyse und Nucleotidbiosynthese gleichzeitig ablaufen (Ahkami et al., 2009). Dennoch konnte die Annahme nicht bestätigt werden, dass die Enzymaktivitäten in den kalt-dunkel behandelten Stecklinge, bedingt durch einen veränderten Kohlenhydratstatus, verstärkt von denen der Kontrollen abweichen.

4.3 Veränderungen der Photosyntheseaktivität während der AWB

Es ist bekannt, dass an die verschiedenen Phasen des Bewurzelungsprozesses unterschiedliche Ansprüche an den Phytohormonhaushalt geknüpft sind und sich auch der Einfluss und Gehalt von Kohlenhydraten im Verlauf der Entwicklung verändern (Kevers et al., 1997; De Klerk et al., 1999; Ahn und Lee, 2003). So wird vermutet, dass Kohlenhydrate zu Beginn der AWB

vor allem eine regulatorische Funktion besitzen und als Signalmoleküle agieren (Coruzzi und Zhou, 2001; Ellis et al., 2002; Léon und Sheen, 2003). Der Biomassezuwachs in Form von Wurzelwachstum und Differenzierung benötigt eine hohe Zufuhr von Energie und Kohlenhydraten, die offensichtlich durch Kohlenhydrate realisiert wird (Haissig, 1982 und 1986; Veierskov, 1988; Davis, 1988; Jang et al., 1997; Kevers et al., 1997; Takahashi et al., 2003). Basierend auf dieser Annahme sind die Bedürfnisse der Kohlenhydratversorgung- und Verfügbarkeit in kalt-dunkel und unbehandelten Petunienstecklingen in der Lichtphase divers und werden scheinbar über die *Sink*-Stärke reguliert. Da in den kalt-dunkel behandelten Stecklingen ein Wurzel-*Sink* bereits angelegt wurde, konnte folglich auch schon eine *Sink*-Hierarchie definiert werden. In das stärkste *Sink*-Gewebe, also der Ort mit dem höchsten Verbrauch an Kohlenhydraten, werden vermehrt Assimilate aus den Blättern importiert und fördern in der Stängelbasis die Entwicklung der Adventivwurzeln (Haissig, 1984 und 1989; Veierskov, 1988; Sonnewald und Ebner, 1998). Aus diesen Befunden leitet sich die Frage ab, ob die erhöhte Verfügbarkeit der Kohlenhydrate während der Lichtphase als eine Folge des in der Dunkelperiode etablierten *Sinks* des sich neuentwickelten Wurzelsystems zu definieren ist und die Kohlenhydratverarmung während der Dunkelbehandlung zu einer Stimulation der Photosyntheseaktivität in den *Source*-Geweben während der Lichtphase führte.

4.3.1 Eine kalte Dunkelbehandlung beeinflusst die Nettphotosyntheserate und die Dunkelatmung in der Lichtphase nicht

Mittlerweile belegt eine Vielzahl von Studien, dass die Expression einiger Gene, die an physiologischen Vorgängen, wie der Atmung, dem Stickstoffmetabolismus oder der Synthese und dem Abbau von Stärke und Saccharose involviert sind, durch Zuckermoleküle reguliert wird (Koch, 1996; Jang et al., 1997; Sheen et al., 1999; Koch et al., 2000). Die *Up*- und *Down*-Regulation einiger hundert Gene durch Glucose und Saccharose konnten in *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Price et al., 2004). Es herrscht die allgemeine Auffassung, dass Pflanzen über den Kohlenhydratstatus die Aktivität der Photosynthese kontrollieren und somit ihren Bedarf an Assimilaten ausbalancieren (Jang und Sheen, 1994; Coruzzi und Zhou, 2001; Rook und Bevan, 2003). Dabei wird angenommen, dass die Akkumulation von Kohlenhydraten eine Feedback-Hemmung der Photosynthese und eine Feedforward-Expression von Genen der Stärkesynthese implizieren (Sheen, 1990; Farrar, 1993; Jang und

Sheen, 1994). Diese Vorgänge sollen bei einem reduzierten Level an Kohlenhydraten antagonistisch ablaufen (Farrar, 1993; Koch, 1996, Rook und Bevan, 2003).

Eine Kohlenhydratverarmung aber auch der bereits etablierte *Sink* in den Petunienstecklingen während der kalten Dunkelbehandlung, könnte also zu einer Aktivierung von Genen der Photosynthese geführt haben. Beim Vergleich der täglichen durchschnittlichen Nettphotosyntheseraten von kalt-dunkel behandelten und unbehandelten Stecklingen im Zeitraum von 0–168 hpin konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Eine verstärkte Dunkelatmung der unbehandelten Kontrollen in Kombination mit einer nicht signifikant unterschiedlichen Nettphotosyntheserate konnte ebenfalls nicht belegt werden. Bei Betrachtung der Daten des Gaswechsels, kann nicht darauf geschlossen werden, dass eine Verarmung der Kohlenhydrate während der Dunkelbehandlung, einen eindeutigen Einfluss auf die Photosyntheseaktivität in der sich anschließenden Lichtphase ausübt.

Andere Publikationen demonstrieren hauptsächlich den Einfluss von akkumulierter Stärke auf die Abnahme der Photosyntheserate, indem die *Sink*-Stärke der Pflanzen reduziert wird. Dieser Effekt konnte für Weizen, Erdnuss, Pinus, Kartoffel, Apfel und Zitrone nachgewiesen werden (Azcon-Bieto, 1983; Bagnall et al., 1988; Myers et al., 1999; Basu et al., 1999; Zhou und Quebedeaux, 2003; Iglesias et al., 2002). Dennoch wurde von anderen Forschern bei Versuchen mit Chrysantheme, Gerste und Rose kein Einfluss eines überhöhten oder mangelhaften Kohlenhydratgehalts in den Blättern auf die Photosyntheserate festgestellt werden (Cockshull, 1982; Minchin et al., 2002; Matloobi et al., 2008). Sie begründen diese Ergebnisse damit, dass die Kohlenhydratflüsse eventuell in den Pflanzen zu alternativen *Sinks* umgeleitet werden (Cockshull, 1982; Minchin et al., 2002; Matloobi et al., 2008). Im Fall der Gaswechselfmessungen von Petunienstecklingen wäre es denkbar, dass die Photosyntheseaktivität in den Kontrollen ebenfalls über die relativ geringen Kohlenhydratlevel zu Beginn der Lichtphase reguliert wurde und die Verteilung der Kohlenhydrate nicht nur in die Stängelbasis, sondern auch in konkurrierende *Sinks* erfolgte. In den kalt-dunkel behandelten Stecklingen war mit dem Beginn der Lichtphase eine *Sink*-Hierarchie festgelegt, da sich bereits während der Dunkelbehandlung in der Stängelbasis ein *Sink* etablieren konnte. Hartmann et al. (1990) postulierten, dass Assimilate bevorzugt im Bereich der Rhizogenese akkumuliert werden, wenn die Respirationsrate der Pflanze und die Umgebungstemperaturen niedrig sind. Höhere Temperaturen fördern jedoch das Sprosswachstum, so dass in der frühen Phase der AWB mehrere *Sinks* mit einer ähnlichen Stärke um den Assimilatimport

konkurrieren (Hartmann et al., 1990; Sonnewald und Ebneith, 1998). Die unbehandelten Kontrollen zeigten eine signifikante Zunahme der Stängellänge, wohingegen das Sprosswachstum der kalt-dunkel behandelten Stecklinge erst in der Lichtphase, nicht jedoch während der Lagerung anstieg.

Bei einer Bilanzrechnung des Gaswechsels wird die Menge des assimilierten Kohlenstoffs aus der Netto-CO₂-Aufnahme der Menge an Kohlenstoff aus der Pflanzentrockenmasse gegenüber gestellt und sollte ausgeglichen sein. Es konnte festgestellt werden, dass sich die über die Nettphotosynthese aufgenommene Kohlenstoffmenge von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen nicht signifikant voneinander unterschied. Die in der Trockenmasse wiedergefundene Menge an fixierten Kohlenstoff variierte jedoch. Während die Bilanz, also die assimilierte Menge an Kohlenstoff aus der Netto-CO₂-Aufnahme und der Trockenmasse in behandelten Stecklinge übereinstimmte, wurde in den Kontrollen signifikant mehr Kohlenstoff über die Photosynthese assimiliert als über den Trockenmassezuwachs wiederzufinden war. Als eine mögliche Ursache für das Missverhältnis in den Kontrollstecklingen könnte ein Verlust von Kohlenhydraten in Form von Ausscheidungen über die Stängelbasis genannt werden. Daraus ergab sich auch eine höhere CUE für die behandelten Stecklinge. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer vergleichbaren Photosyntheseaktivität der Stecklinge auch eine ähnliche Menge an Kohlenstoff assimiliert wurde, diese jedoch von den kalt-dunkel behandelten Stecklingen effektiver zum Aufbau von Biomasse, vor allem für die AWB genutzt werden konnte. Dies spiegelte sich auch in einem signifikant höheren Trockenmassezuwachs in diesem Versuchszeitraum wider.

Die alleinige Betrachtung der Bilanz des Gaswechsels der unbehandelten Stecklinge über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen zeigte, dass in der zweiten Versuchshälfte (7.–14. Tag) keine signifikanten Unterschiede zwischen dem assimilierten Kohlenstoff aus der Netto-CO₂-Aufnahme und der Pflanzentrockenmasse auftraten und sich die CUE gegenüber den ersten sieben Versuchstagen signifikant erhöhte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stecklinge offenbar einige Stunden nach dem Abschneiden von der Donorpflanze eine gewisse Menge des assimilierten Kohlenstoffs über Exsudate verlieren.

Ob es sich hierbei um einen generellen, mit dem Abschneiden einhergehenden Vorgang handelt, oder möglicherweise die unterschiedlichen morphologischen Entwicklungsstadien der AWB der kalt-dunkel behandelten Stecklinge und der Kontrollen in der Stängelbasis

einen Einfluss auf die Ausnutzung des Kohlenstoffs und eventuelle Verluste in Form von Ausscheidungen ausüben kann anhand der Ergebnislage nicht festgestellt werden. Zukünftige Untersuchungen der Exsudate könnten Aufschluss über den Zeitraum der Ausscheidungen und den Umfang der Kohlenhydratverluste geben.

4.3.2 Einfluss der Lichtintensität auf die Photosyntheseaktivität

Ein positiver Einfluss einer höheren Lichtintensität auf die Photosyntheseleistung wurde bereits in vielen Studien demonstriert und ist hinlänglich bekannt (Ueda et al., 2000; Miller et al., 2001; Kim et al., 2004). Die Anwendung unterschiedlicher Lichtintensitäten während der Bewurzelung von Petunienstecklingen wirkte sich auf die Nettophotosyntheserate und die Dunkelatmung aus. Eine ca. doppelt höhere Bestrahlungsstärke führte auch zu einer fast doppelt so hohen Nettophotosynthese der Stecklinge. Zudem zeigten Lichtresponse-Kurven eine bessere Ausnutzung höherer Lichtintensitäten wenn die Stecklinge während der Bewurzelung einer größeren PPF_D ausgesetzt waren. Dies spiegelte sich auch in der maximalen Photosynthesekapazität wider (7,13 vs. 9,08 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Nettophotosynthese, sondern auch die Dunkelatmung verstärkt wird. Aufgrund der signifikant höheren Kohlenstoffassimilation der mit einer stärkeren Lichtintensität behandelten Stecklinge während der Lichtphase, steht wahrscheinlich in der Dunkelperiode mehr Kohlenstoff für die Atmung zur Verfügung (McCree, 1970; Baker et al., 1972; Azcon-Bieto und Osmond, 1983; Amthor, 1989;). Baker et al. (1972) führte Messungen der Dunkelatmung in Baumwollfasern durch und konnte eine positive Korrelation zwischen erhöhten Respirationsraten in der Nacht und hohen Lichtintensitäten am Tag nachweisen.

Den größten Einfluss auf die Dunkelatmung hat jedoch die Temperatur (Amthor, 1989). Anhand von Temperaturkurven der Petunienstecklinge konnte verdeutlicht werden, dass eine Erhöhung der Temperatur auch zu einer verstärkten Dunkelatmung führte. Der Einfluss der Temperatur auf die Nettophotosyntheserate war weniger stark ausgeprägt als der Einfluss der CO_2 -Konzentration. Photosynthesemessungen in Blattküvetten an Rosen und Tomaten waren unter Berücksichtigung der Temperatur, der Lichtintensität und des Pflanzenalters mit den hier erhaltenen Ergebnissen in etwa vergleichbar (Venema et al., 1999; Ueda et al., 2000; Hu et al., 2006). Die erhaltenen Daten zum Gaswechsel von Petunienstecklingen könnten zur Optimierung der Bewurzelungsbedingungen in der Stecklingsvermehrung beitragen. Es wäre

denkbar, dass eine erhöhte Photosyntheserate effektiver über die CO₂-Begasung und weniger durch eine erhöhte Temperatur erfolgt, obwohl dieses Verfahren oft mit einem finanziellen Mehraufwand verbunden ist.

4.4 Veränderungen des Stickstoffgehaltes während der AWB

Eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen stellt einen Schlüsselfaktor bei der Wurzelmorphogenese dar (Blazich, 1988; Hartmann et al., 1990; Assis, 2001; Schwambach et al., 2005). Auf einer adäquaten Stickstoffversorgung basieren eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen, wie beispielsweise die Synthese von Aminosäuren, Proteinen, Nucleinsäuren und Nucleotiden, die mit dem Prozess der AWB assoziiert sind (Haissig, 1974; Kromer und Gamian, 2000; Schwambach et al., 2005).

Im Verlauf des Bewurzelungsvorgangs bei Petunie nahm der Gesamtstickstoffgehalt in kalt-dunkel und unbehandelten Stecklingen in der Lichtphase ab. Dieser Verlauf ist vornehmlich darin zu begründen, dass während der Bewurzelungsversuche keine ausreichende Stickstoffversorgung erfolgte. Bereits nach sieben Tagen konnte eine starke Reduzierung von 67,3 auf 37,7 mg N/g TM in den Kontrollen festgestellt werden. Der Gehalt sank bis zum 14. Versuchstag weiter auf 22,8 mg N/g TM ab. Der signifikante Rückgang des Stickstoffgehaltes in beiden Stecklingsvarianten verdeutlicht, dass die gute Ausgangsversorgung im Verlauf der Bewurzelung abnimmt. Bergmann (1993) gibt eine gute Stickstoffversorgung in gerade vollentwickelten Blättern von Petunien mit 20 bis 46 mg N/g TM an. Vergleiche mit weiteren Literaturdaten von Zierpflanzen, wie Nelke (32 bis 52 mg N/g TM, Plank, 1989; Reuter und Robinson, 1997), Chrysantheme (35-65 mg N/g TM, Plank, 1989; Bergmann, 1993; Reuter und Robinson, 1997), Pelargonie (25 bis 32 mg N/g TM, Bergmann, 1993) oder Poinsettie (40 bis 60 mg /g TM, Plank, 1989; Bergmann, 1993; Reuter und Robinson, 1997; Campbell, 2000) sowie anderen Solanaceaeen wie Tomate und Tabak (40 bis 55 mg N/g TM, Plank, 1989; Bergmann, 1993; Campbell, 2000) unterstützen die Annahme, dass sich die Petunienstecklinge am Ende der Bewurzelungsversuche in einem Stickstoffdefizit befanden.

Während Blazich (1988) davon ausgeht, dass Stickstoff bei der Wurzelinduktion eine entscheidende Rolle spielt, demonstrierten Schwambach et al. (2005) in einer Studie mit Eukalyptusstecklingen, dass die Zugabe von Stickstoff in Form von NO₃⁻ oder einer

Kombination aus NO_3^- und NH_4^+ zum Wachstumsmedium zu einer Erhöhung der Anzahl und des Längenwachstums von Wurzeln beiträgt. Sie schlossen daraus, dass Stickstoff sowohl in der Initiation der AWB, aber auch in der späteren Phase des Bewurzelungsprozesse eine wichtige Rolle einnimmt (Schwambach et al., 2005). Nach dem Abschneiden von den Donorpflanzen konnte in den Petunienstecklingen eine gute Stickstoffversorgung festgestellt werden, die für kalt-dunkel behandelte Stecklinge bis zu Beginn der Lichtphase anhielt. Eine Limitierung durch eine ungenügende Stickstoffversorgung ist daher während der Wurzelinduktion auszuschließen, jedoch für die Phase des Wurzelwachstums und der Expression möglich. Aufgrund der geringeren Stickstoffgehalte in den Kontrollen im Vergleich zu kalt-dunkel behandelten Stecklingen am Ende des Versuchs, könnte somit ein limitierender Effekt den Bewurzelungsvorgang in den unbehandelten Stecklingen stärker als in den kalt-dunkel behandelten Stecklingen beeinflusst haben. In der kommerziellen Stecklingsbewurzelung werden sogenannte „controlled slow-release“ Makro- und Mikroelemente in die Vermehrungsmedien appliziert, die wirksam werden, sobald erste Wurzelspitzen aus der Stängelbasis ausbrechen (Hartmann et al., 1990). Diese Anwendungstechnik weist darauf hin, dass die Entwicklung und das Wachstum der Wurzeln durch ergänzende Nährstoffe gefördert werden (Johnson und Hamilton, 1977; Hartmann et al., 1990).

Der Einfluss von Stickstoff auf die AWB wird oft im Zusammenhang mit Prozessen der Assimilation, Verteilung und Verfügbarkeit von Kohlenstoff betrachtet (Wong, 1979; Hartmann et al., 1990; Arp, 1991; Druege, 2009). Es ist gut dokumentiert, dass der Stickstoff- und Kohlenstoff-Metabolismus eng miteinander verknüpft sind und die Photosynthese regulieren (Swank et al., 1982; Foyer et al., 1995; Paul und Foyer, 2001). Die Interaktion beider Stoffwechselwege zeigt sich im C / N-Sensing, bei dem z. B. beim Auftreten eines erniedrigten Stickstoffgehaltes und einer Akkumulation von Kohlenstoff-Skeletten, Gene über Zuckermoleküle exprimiert werden, die in die Stickstoffassimilation und Stärkebiosynthese involviert sind und photosynthetische Gene inaktiviert werden (Cheng et al., 1992; Lejay et al., 1999; Coruzzi und Zhou, 2001). Des Weiteren werden Reduktionsäquivalente (NADH, Ferredoxin), ATP und Kohlenstoff-Skelette, die für die Umwandlung von Nitrat und Ammonium in stickstoffhaltige Verbindungen (Aminosäuren, Nucleotide, Nucleinsäuren, Enzyme) nötig sind, über die Photosynthese erzeugt oder in nichtphotosynthetisch aktiven Geweben über den Abbau von Kohlenstoff gebildet (Stitt und Krapp, 1999; Paul und Foyer, 2001; Krapp et al., 2005). Aufgrund dieser Abhängigkeiten wird angenommen, dass ein reduzierter Gehalt an Stickstoff die Aktivität und das Wachstum von *Sinks* sowie die

Translokationsrate von Kohlenhydraten aus den *Source*-Geweben herabsetzt, so dass die Kohlenhydrate in Form von Stärke in den Blättern akkumulieren. Chen und Cheng (2003) konnten diesen Vorgang in Weinpflanzen demonstrieren und schlussfolgerten eine mögliche Feedbackhemmung der Photosyntheseaktivität. Den Effekt einer gedrosselten Photosyntheseaktivität postulierten auch andere Autoren (Arp, 1991; Geiger et al., 2000). Den umgekehrten Einfluss eines erhöhten Stickstoffgehaltes mit einem fördernden Effekt auf die AWB wurde für Chrysanthem- und Poinsettienstecklinge festgestellt (Druege et al., 2000; Zerche und Druege, 2009).

Inwiefern der reduzierte Stickstoffgehalt in den Petunienstecklingen die AWB beeinflusst haben könnte, lässt sich anhand der Ergebnisse nicht feststellen. Ob die ausgeprägte Kohlenhydratakkumulation in den Blättern der unbehandelten Kontrollen ab 168 hpin in Zusammenhang mit dem abgesunkenen Stickstoffgehalt im Gesamtsteckling gebracht werden kann, bleibt unbeantwortet. Aufgrund der bereits aufgeführten möglichen Effekte von Stickstoff auf die AWB, könnte es von Nutzen sein, Experimente durchzuführen, bei denen die Stecklinge ausreichend mit Stickstoff versorgt werden, um relativ konstante und ausreichende endogene Stickstofflevel zu gewährleisten. Dadurch könnten die wissenschaftlichen Arbeiten stärker mit der praktischen Jungpflanzenproduktion verknüpft werden.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Obwohl die AWB bereits seit einigen Jahrzehnten Gegenstand der Forschung ist, bleiben bis heute viele Aspekte dieses komplexen Prozesses noch immer unklar. Während der Einfluss und die differenten Anforderungen der Phytohormone, besonders Auxine, während des Bewurzelungsvorgangs relativ detailliert beschrieben werden können, wird die Funktion der Kohlenhydrate als Energielieferanten, Signalmoleküle und Regulatoren bestimmter Gene noch immer kontrovers diskutiert. Inwiefern Translokationsraten und die Photosyntheseaktivität über *Sink*-Stärken reguliert werden ist noch nicht vollständig verstanden (Rook und Bevan, 2003). Die Kohlenhydrate nehmen im Metabolismus der Pflanze eine zentrale Stellung ein, interagieren mit einer Vielzahl anderer Stoffwechselwege und sind in Lichtresponse- und Phytohormonpathways involviert. Welche Reaktionen und Regulationswege im Detail miteinander verbunden sind wird noch Aufklärung benötigen (Coruzzi und Zhou, 2001; Ellis et al., 2002; Léon und Sheen, 2003; Rook und Bevan, 2003). Das

Zusammenspiel mit weiteren Faktoren, wie z. B. der Lichtintensität und Temperatur sowie des Gesundheitsstatus von Donorpflanzen, zeigt die Vielfältigkeit und Komplexität des Bewurzelungsvorgangs auf.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Festlegung einer *Sink*-Hierarchie und damit die *Sink*-Stärke in Stecklingen die AWB limitieren. Eine verbesserte Kohlenhydratverfügbarkeit konnte nicht mit einer erhöhten Nettophotosynthese begründet werden, so dass Unterschiede in der Bewurzelungsfähigkeit scheinbar über die Kohlenstoffflüsse und die Verteilung in der Pflanze reguliert werden. Um detaillierte Angaben zur Verteilung von Kohlenhydraten und Kohlenstoffflüssen im Steckling zu erhalten, könnten Analysen unter dem Einsatz von radiomarkierten Kohlenstoff durchgeführt werden. Eine zeitliche Phasenverschiebung der AWB in kalt-dunkel behandelten Stecklingen gegenüber den Kontrollen konnte bereits anhand von Untersuchungen zu morphologischen Ereignissen in der Stängelbasis festgestellt werden. Basierend auf Microarray-Arbeiten über Petunie, könnte durch eine gezielte Auswahl von Anzeigergenen, die speziell in einer der drei von Ahkami et al. (2009) definierten Phasen der AWB induziert werden, eine präzise Aussage über die Veränderungen von physiologischen Prozessen, beispielsweise der Transport von Kohlenhydraten oder die Akkumulation von Auxin, getroffen werden (persönliche Mitteilung P. Franken). Die gesammelten Daten der vorliegenden Arbeit zum Gaswechsel und dem fördernden Effekt einer temporären kalten Dunkelbehandlung von Petunienstecklingen könnte für die Optimierung der Wachstums- und Transportbedingungen in der Stecklingsvermehrung Anwendung finden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vegetative Vermehrung von Zierpflanzenstecklingen beruht auf der Bildung von Adventivwurzeln und ermöglicht in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl von gleichartigen Pflanzen (Klone) zu produzieren. Die Adventivwurzelbildung (AWB) stellt somit einen entscheidenden Schlüsselprozess in der erfolgreichen vegetativen Vermehrung von Pflanzen dar. In den letzten Jahren konnte sich die Petunie als eine der beliebtesten Beet- und Balkonpflanzen auf dem Absatzmarkt etablieren und wird zudem in der Forschung zur Aufklärung des Vorgangs der AWB als Modellorganismus genutzt. Ausgangsorte der Petunienpflanzenproduktion sind Regionen mit hoher Lichteinstrahlung, wie Mittel- und Südamerika. Die Stecklinge werden geerntet und zu Bewurzelungsstationen in andere Länder mit hohen Absatzmärkten überführt. Der Transport erfolgt bei Temperaturen zwischen 4–12 °C im Dunkeln. Dieser unumgängliche Produktionsschritt kann jedoch zu Qualitätsverringeringen und einer unzureichenden AWB der Stecklinge führen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Beitrag zum zeitlichen Verlauf und physiologischen Veränderungen der AWB in Petunienstecklingen geleistet werden. Von besonderem Interesse war dabei die Frage nach dem Einfluss einer temporären kalten Dunkelbehandlung von Petunienstecklingen auf die Bewurzelungsfähigkeit sowie biochemische und zytologische Prozesse unter besonderer Berücksichtigung des Kohlenhydrathaushaltes.

Die Stecklinge wurden entweder direkt für 16 Tage in Bewurzelungsschalen in einer Klimakammer bewurzelt (Tag: 10 h Licht, PPFD: $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 22 °C, Nacht: 14 h bei 20 °C) oder für sieben Tage bei 10 °C in Plastiktüten im Dunkeln gelagert (Dunkelphase) und anschließend für neun Tage in Bewurzelungsschalen in der Klimakammer bewurzelt (Lichtphase, Bedingungen wie oben). Es konnte gezeigt werden, dass eine kalte Dunkelbehandlung die Bewurzelung beschleunigt und synchronisiert. Kalt-dunkel behandelte Stecklinge wiesen nach einer nur neuntägigen Lichtphase ein ähnliches Bewurzelungsniveau wie die Kontrollen nach 16 Tagen auf. Schwankungen in der Wurzelanzahl und der Gesamtwurzellänge bei kalt-dunkel behandelten Stecklingen traten in einem signifikant geringeren Maße auf als bei den Kontrollen.

Während der Dunkelphase wurden bereits erste meristematische Zellen in der Stängelbasis gebildet. Diese morphologischen Veränderungen weisen auf eine Initiation der AWB und

Etablierung eines Wurzel-*Sinks* hin. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen wurde der Phasenverlauf der AWB in der Dunkelperiode verzögert. Des Weiteren führte die kalte Dunkelbehandlung besonders im Blattgewebe zu einer Verarmung von Glucose, Fructose und Saccharose sowie Stärke. Damit verbunden sank die Enzymaktivität der FBPase, Glucokinase und Invertasen in den Blättern ab.

In der Lichtphase nahm das Längenwachstum beider Stecklingsvarianten zu. Die Kohlenhydrate akkumulierten in kalt-dunkel behandelten Stecklingen und den Kontrollen. Der Kohlenhydratanstieg erfolgte zuerst in den Blättern und breitete sich verzögert in der Stängelbasis aus. Dabei wurde ein schnellerer und signifikant höherer Anstieg innerhalb der ersten 72 h der Lichtphase von kalt-dunkel behandelten Stecklingen beobachtet. Der Vergleich der Enzymaktivitäten beider Stecklingsvarianten zeigte nur geringfügige Unterschiede. Der Übergang in die Lichtphase führte zu einer Beschleunigung im Ablauf der Entwicklungsphasen der AWB in kalt-dunkel behandelten Stecklingen. Die erhöhte Verfügbarkeit von Kohlenhydraten in kalt-dunkel behandelten Stecklingen konnte nicht auf eine Stimulation der Photosyntheseaktivität infolge des sich bereits in der Dunkelphase etablierten Wurzel-*Sinks* und der Kohlenhydratverarmung zurückgeführt werden. Ein signifikanter Einfluss der kalten Dunkelbehandlung auf die Nettophotosynthese und die Dunkelatmung wurde nicht festgestellt. Vermutlich werden Kohlenhydratflüsse in den Kontrollstecklingen verstärkt zu alternativen *Sinks* umgeleitet. In kalt-dunkel behandelten Stecklingen könnte es aufgrund der frühen Etablierung des Wurzel-*Sinks* bereits zu einer Hierarchiefestlegung gekommen sein, so dass Kohlenhydrate bevorzugt in die Region der Rhizogenese transportiert wurden. Um genauere Aussagen über die Verfügbarkeit und Verteilung von Kohlenhydraten in den Stecklingen treffen zu können, wären Analysen mit radioaktivmarkiertem Kohlenstoff denkbar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahkami, A. H., Lischewski, S., Haensch, K.-T., Porfirova, S., Hofmann, J., Rolletschek, H., Melzer, M., Franken, P., Hause, B., Druge, U., and Hajirezaei, M. R. (2009): Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist* **181**: 613–625.
- Ahn, J. H., Lee, J. S. (2003): Sugar acts as a regulatory signal on the wound-inducible expression of SbHRGP3::GUS in transgenic plants. *Plant Cell Reports* **22**: 286–293.
- Allen, D. J., and Ort, D. R. (2001): Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* **6**: 36–42.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. and Ullrich, C. I. (2006): Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* **97**: 883–893.
- Amthor, J. S. (1989): *Respiration and Crop Productivity*. Springer-Verlag New York.
- Andersen, M. N., Asch, F., Wu, Y., Jensen, C. R., Naested, H., Mogensen, V. O., Koch, K. E. (2002): Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant Physiology* **130**: 591–604.
- Arp, W. J. (1991): Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell and Environment* **14**: 869–875.
- Arteca, R.N., Arteca, J.M., Wang, T-W., Schlagnhauser, C. D. (1996): Physiological, biochemical, and molecular changes in Pelargonium cuttings subjected to short-term storage conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**: 1063–1068.
- Assis, T. F. (2001): Evolution of technology for cloning Eucalyptus in large scale. In: *Developing the Eucalypt of the Future*. IUFRO International Symposium, Valdivia, Chile. CD-ROM communication.
- Azcon-Bieto, J. (1983): Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology* **73**: 681–686.
- Azcon-Bieto, J., Osmond, C. B. (1983): Relationship between photosynthesis and respiration. The effect of carbohydrate status on the rate of CO₂ production by respiration in darkened and illuminated wheat leaves. *Plant Physiology* **71**: 574–581.
- Bagnall, D. J., King, R. W., Farquhar, G. D. (1988): Temperature-dependent feedback inhibition of photosynthesis in peanut. *Planta* **175**: 348–354.
- Bangerth, F. (1994): Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment and relationship to apical dominance. *Planta* **194**: 439–442.
- Baker, D. (2000): Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Regulation* **32**: 157–160.
- Baker, D. N., Hesketh, J. D., and Duncan, W. G. (1972): Simulation of growth and yield in cotton: I. Gross photosynthesis, respiration, and growth. *Crop Science* **12**: 431–435.
- Bärtels, A. (1996): *Gehölzvermehrung*. Ulmer Verlag Stuttgart.
- Basu, R. N., Ghosh, B., and Sen, P. K. (1968): Naturally occurring rooting factors in mango (*Mangifera indica* L.). *Indian Agriculturist* **12**: 194–196.
- Basu, P. S., Ashoo Sharma, Garg, I. D., Sukumaran, N. P. (1999): Tuber sink modifies photosynthetic response in potato under water stress. *Environmental and Experimental Botany* **42**: 25–39.
- Benjamin, L. R. and Wren, M. J. (1978): Root development and source-sink relations in Carrot, *Daucus carota* L.. *Journal of Experimental Botany* **29**: 425–433.
- Bergmann, W. (1993): *Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen*. Gustav Fischer Verlag Jena, Germany.
- Berthon, J. Y., Maldiney, R., Sotta, B., Gaspar, Th., and Boyer, N. (1989): Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* in vitro. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **184**: 405–412.
- Binns, A. N. (1994): Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **94**: 173–196.

- Biran, I., and Halevy, A. H.** (1973): Endogenous levels of growth regulators and their relationship to the rooting of *Dahlia* cuttings. *Plant Physiology* **28**: 244–247.
- Blakesley, D., Weston, G. D. and Elliot, M. C.** (1991^a): Endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid during the rooting of *Cotinus coggygria* cuttings taken at different times of the year. *Journal of Plant Growth Regulation* **10**: 1–12.
- Blakesley, D., Weston, G. D. and Hall, J. F.** (1991^b): The role of endogenous auxin in root initiation Part I: Evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Journal of Plant Growth Regulation* **10**: 341–353.
- Blazich, F. A.** (1988): Mineral nutrition and adventitious rooting. In: Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. (Eds.): Adventitious root formation in cuttings, 61–69. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Bollmark, M., Eliasson, L.** (1986): Effects of exogenous cytokinins on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* **68**: 662–666.
- Bollmark, M., Kubat, B., Eliasson, L.** (1988): Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. *Journal of Plant Physiology* **132**: 262–265.
- Bouillenne, R., and Went, F.** (1933): Recherches expérimentales sur la néoformation des racines dans les plantules et les boutures des plantes supérieures. *Annales du Jardin botanique de Buitenzorg* **43**: 25–202.
- Bouillenne, R., and Bouillenne-Walrand, M.** (1947): Détermination des facteurs de la rhizogénèse. *Bulletin Académie Royale de Science de Belgique* **33**: 790–806.
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–54.
- Calamar, A. and De Klerk, G.-J.** (2002): Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant, Cell Tissue and Organ Culture* **70**: 207–212.
- Campbell, C. R.** (2000): Reference sufficiency ranges for plant analysis in the southern region of the United States. North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services Agronomic Division. <http://www.ncagr.gov/agronomi/saesd/scsb394.pdf> Stand: 27. Februar 2010.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. and Bennett, M. J.** (2003): Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**: 165–171.
- Chandler, C.** (1959): The propagation of *Larix* from soft-wood cuttings. *Contributions from the Boyce Thompson Institute* **20**: 231–238.
- Chang, W. C. and Chan, S. J.** (1976): Cytochemical studies on the changes of nuclear histones and RNA synthesis activity of adventitious root initials in mung bean hypocotyl cuttings. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **17**: 192–202.
- Chen, L. S., Cheng, L. L.** (2003): Carbon assimilation and carbohydrate metabolism of ‘Concord’ grape (*Vitis labrusca* L.) leaves in response to nitrogen supply. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 754–760.
- Cheng, C. L., Acedo, G. N., Cristinsin, M., Conkling, M. A.** (1992): Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **89**: 1861–1864.
- Christianson, M. L. and Warnick, D. A.** (1983): Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Developmental Biology* **95**: 288–293.
- Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A., and Klee, H. J.** (1999): Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology* **121**: 53–59.
- Cockshull, K. E.** (1982): Disbudding and its effect on dry matter distribution in *Chrysanthemum morifolium*. *Journal of Horticultural Science* **57**: 205–207.
- Coleman, W. K., Huxter, T., J., Reid, D. M., Thorpe, T. A.** (1980): Ethylene as an endogenous inhibitor of root regeneration in tomato leaf disc cultures *in vitro*. *Plant Physiology* **48**: 519–525.
- Collet, G. F.** (1985): Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Revue Suisse Vitic. Arboric., Hortic.* **212**: 273–280.
- Conover, C. A.** (1976): Postharvest handling of rooted and unrooted cuttings of tropical ornamentals. *HortScience* **11**: 127–128.
- Coruzzi, G. M., Zhou, L.** (2001): Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging ‘matrix effects’. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 247–253.

- Cross, J. M., von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., and Stitt, M.** (2006): Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**: 1574–1588.
- Custódio, L., Martins-Loução, M. A., and Romano, A.** (2004): Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree. *Biologia Plantarum* **48**: 469–472.
- Da Rocha Corrêa, L., Paim, D. C., Schwambach, J., and Fett-Neto, A. G.** (2005): Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regulation* **45**: 63–73.
- Davis, T.D.** (1988): Photosynthesis during adventitious root formation. In: Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. (Eds.): Adventitious root formation in cuttings, 79–87. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Davis, T. D., und Haissig, B. E.** (1994): Biology of adventitious rooting. Plenum Press, New York.
- Davies, F. T., Davis, T. D. and Kester, D. E.** (1994): Commercial importance of adventitious rooting to horticulture. In: Davis, T. D. and Haissig, B. E. (Eds.): Biology of Adventitious Root Formation, 53–59. Plenum Press, New York.
- Davies, P. J.** (1995): The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: Davies, P. J. (Eds.): Plant Hormone, 1–12. Kluwer Academic Press, London.
- De Klerk, G.-J., Ter Brugge, J., Smulders, R., Benschop, M.** (1990): Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. *Acta Horticulturae* **280**: 29–36.
- De Klerk, G. J., Keppel, M., Ter Brugge, J., Meekes, H.** (1995): Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *Journal of Experimental Botany* **46**: 965–972.
- De Klerk, G.-J., Brugge, J. T., Marinova, S.** (1997): Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthalene acetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus*, Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **49**: 9–44.
- De Klerk, G.-J., Van der Krieken, W., De Jong, J. C.** (1999): The Formation of Adventitious Roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **35**: 189–199.
- Dole, J.M. and Wilkins, H. F.** (2004): Petunia. In: Yarnell, D., Yehle, K., Dalberg, L., Carnis, M. (Eds.): Floriculture: Principles and Species, 744–748. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- Druege, U.** (2009): Involvement of carbohydrates in survival and adventitious root formation of cuttings within the scope of global horticulture. In: Niemi, K. (Eds.): Adventitious Root Formation of Forest Trees and Horticultural Plants – From Genes to Applications, 187–208. Research Signpost, Kerala, India.
- Druege, U., Zerche, S., Kadner, R., Ernst, M.** (2000): Relation between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of chrysanthemum cuttings as affected by pre-harvest nitrogen supply and cold-storage. *Annals of Botany* **85**: 687–701.
- Druege, U., Zerche, S., and Kadner, R.** (2004): Nitrogen-and storage-affected carbohydrate partitioning in high-light-adapted *Pelargonium* cuttings in relation to survival and adventitious root formation under low light. *Annals of Botany* **94**: 831–842.
- Druege, U., Baltruschat, H., Franken, P.** (2007): Piriformospora indica promotes adventitious root formation in cuttings. *Scientia Horticulturae* **112**:422–426.
- Eckhardt, N. A.** (2001): New insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell* **13**: 1–3.
- Ehrenberger, F.** (1991): Quantitative organische Elementaranalyse. Weinheim: VCH.
- Eklöf, S., Åstot, C., Blackwell, J., Moritz, T., Olsson, O., Sandberg, G.** (1996): Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin over-production. *Physiologia Plantarum* **98**: 333–344.
- Eliasson, L.** (1978): Effect of nutrients and light on growth and root formation in *Pisum sativum* cuttings. *Plant Physiology* **43**: 13–18.
- Ellis, C., Turner, J. G., Devoto, A.** (2002): Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Molecular Biology* **50**: 971–980.
- Epstein, E. and Wiesman, Z.** (1987): Improved vegetative propagation of olive cultivars with IBA-alanine. *Olea* **18**: 35–38.
- Epstein, E., Muszkat, L. and Cohen, J. D.** (1988): Identification of indole-3-butyric acid (IBA) in leaves of cypress and maize by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). *Alon Hanotea* **42**: 917–919.

- Eriksen, E. N.** (1974): Root formation in pea cuttings. III. The influence of cytokinin at different developmental stages. *Physiologia Plantarum* **30**: 163–167.
- Eriksen, E. N., and Mohammed, S.** (1974): Root formation in pea cuttings. II. The influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. *Plant Physiology* **30**: 152–162.
- Estelle, M.** (2001): Plant hormones: Transporters on the move. *Nature* **413**: 374–375.
- Farrar, J. F.** (1988): Temperature and the partitioning and translocation of carbon. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **42**: 203–235.
- Farrar, J. F.** (1993): Sink strength: What is it and how do we measure it? A summary. *Plant, Cell & Environment* **16**: 1045–1046
- Farrar, J. F., Minchin, P. E. H., and Thorpe, M. R.** (1995): Carbon import into barley roots: effect of sugars and relation to cell expansion. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1859–1865.
- Farrar, J. F. and Jones, D. L.** (2000): The control of carbon acquisition by roots. *New Phytologist* **147**: 43–53.
- Favre, J. M.** (1970): Influences de facteurs internes sur la cinétique d'enracinement de la Vigne cultivée *in vitro*. *Revue générale de Botanique* **77**: 519–522.
- Favre, J. M.** (1973): Effects corrélatifs de facteurs internes et externes sur la rhizogenèse d'un clone de vigne (*Vitis riparia x Vitis rupestris*) cultivé *in vitro*. *Revue générale de Botanique* **80**: 279–361.
- Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Goulart, L. W. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R., Ferreira, A. G.** (2001): Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* **21**: 457–464.
- Fisher, P., Hansen, J.** (1977): Rooting of *Chrysanthemum* cuttings. Influence of irradiance during stock plant growth and of decapitation and disbudding of cuttings. *Scientia Horticulturae* **7**: 171–178.
- Ford, Y.-Y., Bonham, E. C., Cameron, R. W. F., Blake, P. S., Judd, H. L. und Harrison-Murray, R. S.** (2002): Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy- and a difficult-to-root plant. *Journal of Plant Growth Regulation* **36**: 149–159.
- Foyer, C. H., Valadier, M. H., Ferrario, S.** (1995): Co-regulation of nitrogen and carbon assimilation in leaves. In: Smirnoff, N. (Eds.): *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and acclimation*, 17–33. BIOS Scientific Publishers.
- Friend, A.L., Coleman, M.D., Isebrands, J.G.** (1994): Carbon allocation to root and shoot system of woody plants. In: Davis, T.D., Haissig, B.E. (Eds.): *Biology of adventitious root formation*, 245–273. Plenum Press, New York.
- Garrido, G., Cano, E. A., Arnao, M. B., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J.** (1996): Influence of cold storage period and auxin treatment on the subsequent rooting of carnation cuttings. *Scientia Horticulturae* **65**: 73–84.
- Garrido, G., Cano, E. A., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J.** (1998): Formation and growth of roots in carnation cuttings: influence of cold storage period and auxin treatment. *Scientia Horticulturae* **74**: 219–231.
- Garrido, G., Guerrero, J. R., Cano, E. A., Acosta, M. and Sánchez-Bravo, J.** (2002): Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum* **114**: 303–312.
- Gaspar, Th., and Hofinger, M.** (1988): Auxin metabolism during adventitious rooting. In: Haissig, B. E. and Sankhla, N., (Eds.): *Adventitious root formation in cuttings*, 117–131. Dioscorides Press, Portland.
- Gaspar, Th., Moncousin, Ch., and Greppin, T.** (1990): The place and role of exogenous and endogenous auxin in adventitious root formation. In: Millet, B. and Greppin, H. (Eds.): *Intra- and Intercellular Communications in Plants. Reception, Transmission, Storage and Expression of Messages*, 125–139. INRA, Paris.
- Gaspar, Th., Kevers, C., Hausman, J. F., Berthon, J. Y., and Ripetti, V.** (1992): Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie* **12**: 757–765.
- Gatineau, F., Fouché, J. G., Kevers, C., Hausman, J. F., and Gaspar, T.** (1997): Quantitative variations of indolyl compounds including IAA, IAA-aspartate and serotonin in walnut microcuttings during root induction. *Plant Biology* **39**: 131–137.
- Geiger, D. R., Servaites, J. C.** (1994): Diurnal regulation of photosynthetic C metabolism in C3 plants. *Annual Review of Plant Biology* **45**: 235–256.

- Geiger, D.T., Servaites, J.C., Fuchs, M.A.** (2000): Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 571–582.
- Geneve, R. L., Heuser, C. W.** (1983): The relationship between ethephon and auxin on adventitious root initiation in cuttings of *Vigna radiata* (L.) R. Wilcz. *Journal of the American Society Horticultural Science* **108**: 330–333.
- Geneve, R. L., Hackett, W. P., and Swanson, B. T.** (1988): Adventitious root initiation in de-bladed petioles from the juvenile and mature phases of English Ivy. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**: 630–636.
- Geneve, R. L.** (1991): Patterns of adventitious root formation in English Ivy. *Journal of Plant Growth Regulation* **10**: 215–220.
- Gerats, T. and Vandenbussche, M.** (2005): A model system for comparative research: Petunia. *Trends in Plant Science* **10**:251–256.
- Gerlach, D.** (1984): Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Gibon, Y., Bläsing, O. E., Palacios, N., Pankovic, D., Hendriks, J. H. M., Fisahn, J., Höhne, M., Günter, M., Stitt, M.** (2004): Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilisation, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant Journal* **39**: 847–862.
- Gibson, S.I.** (2000). Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* **124**: 1532–1539.
- Gibson, S. I.** (2004): Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* **55**: 253–264.
- Gibson, S. I.** (2005): Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 93–102.
- Goldschmidt, E. E., Huber, S. C.** (1992): Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* **99**: 1443–1448.
- Gollagunta, V., Adelberg, J. W., Rieck, J., and Rajapakse, N.** (2004): Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**: 125–131.
- Haissig, B. E.** (1972): Meristematic activity during adventitious root primordium development, Influences of endogenous auxin and applied gibberellic acid. *Plant Physiology*. **49**: 886–891.
- Haissig, B. E.** (1974): Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *New Zealand Journal of Forestry Science* **4**: 324–337.
- Haissig, B. E.** (1982): Activity of some glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes during the development of adventitious roots. *Plant Physiology* **55**: 261–272.
- Haissig, B.E.** (1984): Carbohydrate accumulation and partitioning in *Pinus banksiana* seedling and seedling cuttings. *Physiologia Plantarum* **61**: 13–19.
- Haissig, B. E.** (1986): Metabolic processes in adventitious rooting. In: Jackson, M. B. (Eds.): *New Root Formation in Plants and Cuttings*, 141–189. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht.
- Haissig, B. E.** (1989): Carbohydrate relations during propagation of cuttings from sexually mature *Pinus banksiana* trees. *Tree Physiology* **5**: 319–328.
- Hajirezaei, M.-R., Takahata, Y., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., and Sonnewald, U.** (2000): Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *Journal of Experimental Botany* **51**: 439–445.
- Hand, P.** (1994): Biochemical and molecular markers of cellular competence for adventitious rooting. In: Davis, T. D. and Haissig, B. E. (Eds.): *Biology of Adventitious Root Formation*, 111–121. Plenum Press, New York.
- Hansen, J., Eriksen, E. N.** (1974): Root formation of pea cuttings in relation to the irradiance of the stock plants. *Plant Physiology* **32**: 170–173.
- Hansen, J., Strömquist, L.-H., Ericsson, A.** (1978): Influence of the irradiance on carbohydrate content and rooting of cuttings of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Physiology* **61**: 975–979.
- Hansen, C. E., Meins Jr., F. and Aebi, R.** (1987): Hormonal regulation of zeatin riboside accumulation by cultured tobacco cells. *Planta* **172**: 520–525.

- Hansen, J.** (1988): Influence of gibberellins on adventitious root formation. In: Davis, T. D., Haissig, B. E., and Sankhla, N., (Eds.): Adventitious root formation in cuttings, 162–173. Dioscorides Press, Portland.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, Jr., F. D.** (1990): Plant Propagation – Principles and Practices. Prentice-Hall, Englewood Cliffs New Jersey.
- Heß, D.** (1993): Pflanzenphysiologie – Molekulare und biochemische Grundlagen von Stoffwechsel und Entwicklung der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- Hicks, G.** (1987): Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. *Canadian Journal of Botany* **65**: 145–152.
- Hikosaka, K., Ishikawa, K., Borjigidai, A., Muller, O., and Onoda, Y.** (2006): Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of Experimental Botany* **57**: 291–302.
- Hitchcock, A. E., Zimmerman, P. W.** (1940): Effects obtained with mixtures of root-inducing and other substances. *Contributions from the Boyce Thompson Institute* **11**: 155–159.
- Ho, L. C.** (1978): The regulation of carbon transport and the carbon balance of mature tomato leaves. *Annals of Botany* **42**: 155–164.
- Hunziker, A. T.** (1979) South American Solanaceae: a synoptic survey. In: Hawkes, J. G., Lester, R. N., and Skelding, A. D. (Eds.): The biology and taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, London.
- Hu, W. H., Zhou, Y. H., Du, Y. S., Xia, X. J., Yu, J. Q.** (2006): Differential response of photosynthesis in greenhouse- and field-ecotypes of tomato to long-term chilling under low light. *Journal of Plant Physiology* **163**: 1238–1246.
- Huber, S.C.** (1983): Relation between photosynthetic starch formation and dry-weight partitioning between the shoot and root. *Canadian Journal of Botany* **61**: 2709–2716.
- Iglesias, D. J., Lliso, I., Tadeo, F. R., and Talon, M.** (2002): Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* **116**: 563–572.
- Ireland, R. J., Deluca, V., Dennis, D. T.** (1980): Characterization and kinetics of isoenzymes of pyruvate-kinase from developing castor bean endosperm. *Plant Physiology* **65**: 1188–1193.
- Jang, J.-C., and Sheen, J.** (1994): Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**: 1665–1679.
- Jang, J.-C., Léon, P., Zhou, L., and Sheen, J.** (1997): Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* **9**: 5–19.
- Jarvis, B. C.** (1986): Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: Jackson, M. B. (Eds.): New Root Formation in Plant and Cuttings, 191–222. Martinus-Nijhoff, Kluwer Academic Publisher Group, Dordrecht.
- Jasik, J. and De Klerk, G.-J.** (1997): Anatomical and ultrastructural examination of adventitious root formation in stem slices of apple. *Biologia Plantarum* **39**: 79–90.
- Jiao, J., and Grodzinski, B.** (1996): The effect of leaf temperature and photorespiratory conditions on export of sugars during steady-state photosynthesis in *Salvia splendens*. *Plant Physiology* **111**: 169–178.
- Johnson, C. R., and Hamilton, D. F.** (1977): Effects of media and controlled-release fertilizers on rooting and leaf nutrient composition of *Juniperus conferta* and *Lingustrum japonicum* cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **102**: 320–322.
- Joyce, D. C., Meara, S. A., Hetherington, S. E., Jones, P.** (2000): Effects of cold storage on cut *Grevillea* ‘Sylvia’ inflorescences. *Postharvest Biology and Technology* **18**: 49–56.
- Kelly, J., Zimmerman, G., Latzko, E.** (1982): Fructose-bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods in Enzymology* **90**: 371–378.
- Kende, H. and Zeevaart, J. A.** (1997): The five „classical“ plant hormones. *The Plant Cell* **9**: 1197–1210.
- Kevers, C, Hausman, J. F., Faivre-Rampant, O., Evers, D., Gaspar, Th.** (1997): Hormonal control of adventitious rooting: Progress and questions. *Angewandte Botanik* **71**: 71–79.
- Kim, S.-H., Shackle, K. A., Lieth, J. H.** (2004): Bending alters water balance and reduces photosynthesis of rose shoots. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**: 896–901.
- Koch, K.E.** (1996): Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 509–540.

- Koch KE, Zeng Y, Wu Y, Avigne WT.** (2000): Multiple paths of sugar sensing and a sugar/ oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of Experimental Botany* **51**: 417–427.
- Koch, K. E., Zeng, Y.** (2002): Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**: 474–483.
- Koch, K.** (2004): Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 235–246.
- Koukourikou-Petridou, M. A. and Bangerth, F.** (1997): Effect of changing the endogenous concentration of auxins and cytokinins and the production of ethylene in pea stem cuttings on adventitious root formation. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 101–108.
- Krapp, A. and Stitt, M.** (1995): An Evaluation of Direct and Indirect Mechanisms for the Sink-Regulation of Photosynthesis in Spinach – Changes in Gas Exchange, Carbohydrates, Metabolites, Enzyme Activities and Steady-State Transcript Levels after Cold-Girdling Source Leaves. *Planta* **195**: 313–323.
- Krapp, A., Saliba-Colombani, V., Daniel-Vedele, F.** (2005): Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. *Photosynthesis Research* **83**: 251–263.
- Kromer, K., and Gamian, A.** (2000): Analysis of soluble carbohydrates, proteins and lipids in shoots of M 7 apple rootstock cultured *in vitro* during regeneration of adventitious roots. *Journal of Plant Physiology* **156**: 775–782.
- Kull, U.** (1993): Grundriß der Allgemeinen Botanik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York.
- Lee, L. S., Chen, Y. M. and Lin, C. Y.** (1978): Studies on the formation of adventitious root initials in mung bean seedling hypocotyl. *Taiwania* **23**: 115–122.
- Léon, P., Sheen, J.** (2003): Sugar hormone connections. *Trends in Plant Science* **8**: 110–116.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A.** (1999): Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* **18**: 509–519.
- Letham, D. S.** (1994): Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinins. In: Mok, D. W. S., Mok, M. C. (Eds.): Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press.
- Li, C. J., Guevara, E., Herrera, J. and Bangerth, F.** (1995): Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. *Plant Physiology* **94**: 465–469.
- Li, M., and Leung, D. W. M.** (2000): Starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Pinus radiata*. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 423–428.
- Li, S. W., Xue, L. G., Xu, S. J., Feng, H. Y., An, L. Z.** (2007): Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regulation* **52**: 173–180.
- Li, S. W., Xue, L. G., Xu, S. J., Feng, H. Y., An, L. Z.** (2009): Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 63–71.
- Litauszky, R. A.** (1999): Untersuchungen zur Wirkungsintensität einer Rejuvenilisierung nach der In-vitro- Vermehrung ausgewählter Gehölzspezies am Merkmal der Adventivwurzelbildung. Diss., Humboldt-Universität Berlin.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G.** (2001^a): Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**: 465–474.
- Ljung, K., Ostin, A., Lioussanne, L. and Sandberg, G.** (2001^b): Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiology* **125**: 464–475.
- Lopez, R. G., Runkle, E. S.** (2008): Low-temperature storage influences morphological and physiological characteristics of nonrooted cuttings of New Guinea impatiens (*Impatiens hawkeri*). *Postharvest Biology and Technology* **50**: 95–102.
- Lovell, P. H., and White, J.** (1986): Anatomical changes during adventitious root formation. In: Jackson, M. B. (Eds.): New root formation in plants and cuttings. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Ludwig-Müller, J.** (2000): Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**: 219–230.
- Lyndon, R. F.** (1990): Plant Development: the Cellular Basis. Unwin Hyman, London.

- Maldiney, R., Pelese, F., Pilate, G., Sotta, B., Sossountzov, L., and Miginiac, E.** (1986): Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid, zeatin and zeatin-riboside during the course of adventitious root formation in cuttings of Craigella and Craigella lateral suppressor tomatoes. *Plant Physiology* **68**: 426–430.
- Martellet Fogaça, C. and Fett-Neto, A. G.** (2005): Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Journal of Plant Growth Regulation* **45**: 1–10.
- Matloobi, M., Baille, A., González-Real, M. M., Gutiérrez Colomer, R. P.** (2008): Effects of sink removal on leaf photosynthetic attributes of rose flower shoots (*Rosa hybrida* L., cv. Dallas). *Scientia Horticulturae* **118**: 321–327.
- McCree, K. J.** (1970): An equation for the rate of respiration of white clover plants grown under controlled conditions. In: Setlik, I. (Eds.): Prediction and measurement of photosynthetic productivity, 221–229. Proc. IBP/PP Tech. Mtg., Trebon, Czechoslovakia. Pudoc. Wageningen, The Netherlands.
- Microsoft Excel** (2003): Microsoft Office Excel für Windows NP 2003. www.microsoft.com.
- Miller, A. M., van Iersel, M. W., and Armitage, A. M.** (2001): Whole-plant carbon dioxide exchange responses of *Angelonia angustifolia* to temperature and irradiance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**: 606–610.
- Minchin, P. E. H., Thorpe, M. R., Farrar, J. F., and Koroleva, O. A.** (2002): Source-sink coupling in young barley plants and control of phloem loading. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1671–1676.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. and Kakimoto, T.** (2004): Expression of cytokinin biosynthetic *isopentenyltransferase genes* in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. *The Plant Journal* **37**: 128–38.
- Myers, D. A., Thomas, R. B., and DeLucia, E. H.** (1999): Photosynthetic responses of loblolly pine (*Pinus taeda*) needles to experimental reduction in sink demand. *Tree Physiology* **19**: 235–242.
- Moncousin, C., Favre, J. M., and Gaspar, T.** (1988): Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious rooting in vine cuttings. In: Kutacek, M., Bandurski, R. S., and Krekule, J. (Eds.): Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants, 331–337. Academia Praha.
- Moncousin, C.** (1991): Rooting of *in vitro* cuttings. In: Bajaj, Y. P. S., (Eds.): Biotechnology in Agriculture and Forestry (17) – High Tech and Micropropagation I, 231–261. Springer Verlag, Berlin.
- Moore, T. C.** (1989): Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, London, Paris, Tokyo, Hong Kong.
- Morris, D.** (1979): The effect of temperature on the velocity of exogenous auxin transport in intact chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Planta* **146**: 603–605.
- Mudge, K. W., Swanson, B. T.** (1978): Effect of ethephon, indole butyric acid, and treatment solution pH on rooting and on ethylene levels within mung bean cuttings. *Plant Physiology* **61**: 271–273.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Mutui, T. M., Mibus, H., Serek, M.** (2005): Effects of thidiazuron, ethylene, abscisic acid and dark storage on leaf yellowing and rooting of Pelargonium cuttings. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **80**: 543–550.
- Müller, A., Weiler, E. W.** (2000): Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 855–863.
- Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S., Kevers, C.** (2008): Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 518–525.
- Nemali, K. S., van Iersel, M. W.** (2004): Light effects on wax begonia: Photosynthesis, growth respiration, maintenance respiration, and carbon use efficiency. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**: 416–424.
- Nordström, A.-C., and Eliasson, L.** (1984): Regulation of root formation by auxin-ethylene interaction in pea stem cuttings. *Plant Physiology* **61**: 298–302.
- Nordström, A.-C., Eliasson, L.** (1991): Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspatic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology* **82**: 599–605.

- Nordström, A.-C., Jacobs, F. A., and Eliasson, L.** (1991): Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology* **96**: 856–861.
- Normanly, J., Cohen, J. D., Fink, G. R.** (1993): *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **90**: 10355–10359.
- Normanly, J.** (1997): Auxin metabolism. *Plant Physiology* **100**: 431–442.
- Okoro, O.O., Grace, J.** (1976): The physiology of rooting *Populus* cuttings. I. Carbohydrates and photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **36**: 133–138.
- Oud, J. S. N., Schneiders, H., Kool, A. J., and van Grinsven, M. Q. J. M.** (1995): Breeding of transgenic orange *Petunia hybrida* varieties. *Euphytica* **84**: 175–181.
- Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P., and Sandberg, G.** (1998): Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**: 285–296.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C., Lamattina, L.** (2004): Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology* **135**: 279–286.
- Pammenter, N. W., Loreto, F., and Sharkey, T. D.** (1993): End product feedback effects on photosynthetic electron transport. *Photosynthesis Research* **35**: 5–14.
- Paton, F., Schwabe, W.W.** (1987): Storage of cuttings of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Journal of Horticultural Science* **62**: 79–87.
- Paul, M. J., and Foyer, C. H.** (2001): Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1383–1400.
- Pego, J. V., Kortstee, A. J., Huijser, C., Smeekens, S. C. M.** (2000): Photosynthesis, sugar and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* **51**: 407–416.
- Pellicer, V., Guehl, J.-M., Daudet, F.-A., Cazet, M., Riviere, L. M., and Maillard, P.** (2000): Carbon and nitrogen mobilization in *Larix x eurolepis* leafy stem cuttings assessed by dual ¹³C and ¹⁵N labeling: relationships with rooting. *Tree Physiology* **20**: 807–814.
- Plank, C. O.** (1989): Plant Analysis Handbook for Georgia. Athens (GA): University of Georgia Cooperative Extension Service.
- Pollmann, S.** (2002): Untersuchungen zur tryptophanabhängigen Indol-3-essigsäure-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. Diss. Ruhr-Universität Bochum.
- Porceddu A., Reale L., Lanfaloni L., Moretti C., Sorbolini S., Tedeschini E., Ferranti F., Pezzotti M.** (1999): Cloning and expression analysis of a *Petunia hybrida* flower specific mitotic-like cyclin. *FEBS Letters* **462**: 211–215.
- Price, J., Laxmi, A., St. Martin, S. K., Jang, J.-C.** (2004): Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2128–2150.
- Purer, O., Mayak, S.** (1989): *Pelargonium* cuttings—effect of growth regulators. *Acta Horticulturae* **261**: 347–354.
- Rajapakse, N. C., Kelly, J. W.** (1995): Cultivar differences with respect to storage potential and carbohydrate status of rooted chrysanthemum cuttings. *Acta Horticulturae* **405**: 427–434.
- Ranjit, M. Kester, D. E. and Polito, V. S.** (1988): Micropropagation of chery rootstocks: III. Correlations between anatomical and physiological parameters and root initiation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**: 155–159.
- Rapaka, V. K., Faust, J. E., Dole, J. M., Runkle, E. S.** (2007): Diurnal carbohydrate dynamics affect postharvest ethylene responsiveness in portulaca (*Portulaca grandiflora* ‘Yubi Deep Rose’) unrooted cuttings. *Postharvest Biology and Technology* **44**: 293–299.
- Rapaka, V. K., Faust, J. E., Dole, J. M., Runkle, E. S.** (2008): Endogenous carbohydrate status affects postharvest ethylene sensitivity in relation to leaf senescence and adventitious root formation in *Pelargonium* cuttings. *Postharvest Biology and Technology* **48**: 272–282.
- Reekie, J. Y. C., Hicklenton, P. R., and Reekie, E. G.** (1997): The interactive effects of carbon dioxide enrichment and daylength on growth and development in *Petunia hybrida*. *Annals of Botany* **80**: 57–64.
- Reuter, D. J. and Robinson, J. B.** (1997): Plant Analysis, an Interpretation Manual. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

- Ripetti, V., Kevers, C., and Gaspar, Th. (1994): Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Advances in Horticultural Science* **8**: 29–32.
- Robbins, J. A., Kays, S. J., Dirr, M. A. (1983): Enhanced rooting of wounded mung bean cuttings by wounding and ethephon. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **108**: 325–329.
- Robbins, J. A., Reid, M. S., Paul, J. L., Rost, T. L. (1985): The effect of ethylene on adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation* **4**: 147–157.
- Rodrigues-Pousada, R., Van Caeneghem, W., Chauvaux, N., Van Onckelen, H., Van Montagu, M. and Van Der Straeten, D. (1999): Hormonal cross-talk regulates the *Arabidopsis thaliana* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 in a developmental and tissue-dependent manner. *Physiologia Plantarum* **105**: 312–320.
- Roitsch T., González M. C. (2004): Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**: 606–613.
- Rook, F., and Bevan, M. W. (2003): Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *Journal of Experimental Botany* **54** (382): 495–501.
- Roy, B. N., Basu, R. N., Bose, T. K. (1972): Interaction of auxins with growth-retarding, -inhibiting and ethylene-producing chemicals in rooting of cuttings. *Plant and Cell Physiology* **13**: 1123–1127.
- Rudnicki, R. M., Nowak, J., Goszczynska, D. M. (1991): Cold storage and transportation conditions for cut flowers cuttings and potted plants. *Acta Horticulturae* **298**: 225–231.
- Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Uragami, A., Tokuda, S. (2004): Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. *Scientia Horticulturae* **101**: 349–357.
- Schaarschmidt S., Roitsch T., Hause B. (2006): Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4015–4023.
- Schilmiller, A. L., Howe, G. A. (2005): Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369–377.
- Schulze, E. D. (1970): Der CO₂-Gaswechsel der Buche (*Fagus sylvatica* L.) in Abhängigkeit von den Klimafaktoren im Freiland. *Flora* **159**: 177–232.
- Schwambach, J., Fadanelli, C. and Fett-Neto, A. G. (2005): Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* **25**: 487–494.
- Serek, M., Prabucki, A., Sisler, E. C., Andersen, A. S. (1998): Inhibitors of ethylene action affect final quality and rooting of cuttings before and after storage. *HortScience* **33**: 153–155.
- Sheen, J. (1990): Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**: 1027–1038.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.-C. (1999): Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 410–418.
- Shibuya K., Barry K. G., Ciardi J. A., Loucas H. M., Underwood B. A., Nourizadeh S., Ecker J. R., Klee H. J., Clark D. G. (2004): The central role of PHEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. *Plant Physiology* **136**: 2900–2912.
- Smeekens, S. (2000): Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 49–81.
- Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M. and Willmitzer, L. (1991): Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole, or apoplast: A powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *The Plant Journal* **1**: 95–106.
- Sonnewald, U., Hajirezaei, M.-R., Kossmann, J., Heyer, A., Trethewey, R. N., Willmitzer, L. (1997): Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology* **15**: 794–797.
- Sonnewald, U. und Ebneith, M. (1998): Ansätze zur Beeinflussung der photosynthetischen Saccharosebiosynthese. *Vorträge zur Pflanzenzüchtung*. **41**: 21–32.
- Sorin C., Negroni L., Balliau T., Corti H., Jacquemot M. P., Davanture M., Sandberg G., Zivy M., Bellini C. (2006): Proteomic analysis of different mutant genotypes of *Arabidopsis* led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development. *Plant Physiology* **140**: 349–364.

- Spethmann, W.** (1982): Stecklingsvermehrung von Laubbaumarten. *Deutscher Gartenbau* **2**: 42–48.
- StatSoft, Inc.** (2001): STATISTICA für Windows [Software-System für Datenanalyse] Version 6. www.statsoft.com.
- Stitt, M.** (1991): Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell & Environment* **14**: 741–762.
- Stitt, M., Krapp, A.** (1999): The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. *Plant, Cell & Environment* **22**: 583–622.
- Sturm, A.** (1999): Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* **121**: 1–7.
- Sturm, A. and Tang, G.-Q.** (1999): The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* **4**: 401–407.
- Swank, J. C., Below, F. E., Lambert, R. J., and Hageman, R. H.** (1982): Interaction of carbon and nitrogen metabolism in the productivity of maize. *Plant Physiology* **70**: 1185–1190.
- Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M., Suzuki, H.** (2003): Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Research* **116**: 83–91.
- Trewavas, A. J. and Cleland, R. E.** (1983): Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances. *Trends in Biochemical Sciences* **8**: 349–357.
- Tschaplinski, T.J., Blake, T.J.** (1989): Correlation between early root production, carbohydrate metabolism, and subsequent biomass production in hybrid poplar. *Canadian Journal of Botany* **67**: 2168–2174.
- Ueda, Y., Nishihara, S., Tomita, H., Oda, Y.** (2000): Photosynthetic response of Japanese rose species *Rosa bracteata* and *Rosa rugosa* to temperature and light. *Scientia Horticulturae* **84**: 365–371.
- USDA, United States Department of Agriculture** (2008): Floriculture crops 2007 summary. Sp Cr 6–1 (08): 9–29.
- Van der Krieken, W. M., Kodde, J., Visser, M. H. M., Tsardakas, D., Blaakmeer, A., De Groot, K., Leegstra, L.** (1997): Increased induction of adventitious rooting by slow release auxins and elicitors. In: Altman, A., Waisel, Y. (Eds.): *Biology of root formation and development*, 95–105. New York and London, Plenum Publishing Corp.
- Veierskov, B., Skytt Andersen, A., and Nymann Eriksen, E.** (1982): Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisum sativum*. I. Carbohydrate and nitrogen content in pea plants and cuttings grown at two different irradiances. *Physiologia Plantarum* **55**: 167–173.
- Veierskov, B.** (1988): Relations between carbohydrates and adventitious root formation. In: Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. (Eds.), *Adventitious root formation in cuttings*, 70–78. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Venema, J. H., Posthumus, F., and van Hasselt, P. R.** (1999): Impact of suboptimal temperature on growth, photosynthesis, leaf pigments and carbohydrates of domestic and high-altitude wild *Lycopersicon* species. *Journal of Plant Physiology* **155**: 711–718.
- von Hentig, W.-U. and Knösel, K.** (1986): Storage of poinsettia cuttings. *Acta Horticulturae* **181**: 313–322.
- Wächter, R., Langhans, M., Aloni, R., Götz, S., Weilmünster, A., Koops, A., Temguia, L., Mistrik, I., Pavlovkin, J., Rascher, U., Schwalm, K., Koch, K. E., and Ullrich, C. I.** (2003): Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **133**: 1024–1037.
- Wang, Y.-T.** (1987): Effect of temperature, duration, and light during simulated shipping on quality and rooting of croton cuttings. *HortScience* **22**: 1301–1302.
- Wasternack, C.** (2007): Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**: 681–697.
- Wilson, P. J.** (1994): The concept of a limiting rooting morphogen in woody stem cuttings. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **69**: 591–600.
- Wong, S. C.** (1979): Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. I. Interactions of nitrogen and photosynthetic capacity in C₃ and C₄ plants. *Oecologia* **44**: 68–74.
- Wong, W.-J. L., ap Rees, T.** (1971): Carbohydrate oxidation in stele and cortex isolated from roots of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **252**: 296–304.

- Wright, A. D., Sampson, M. B., Neuffer, G. M., Michalczuk, L., Slovin, J. P., Cohen, J. D.** (1991): Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange pericarp*, a tryptophan auxotroph. *Science* **254**: 998–1000.
- Xu, J., Xuan, W., Huang, B. K., Zhou, Y. H., Ling, T. F., Xu, S., Sheng, W. B.** (2006): Carbon monoxide-induced ARF of hypocotyl cutting from mung bean seedling. *Chinese Science Bulletin* **51**: 668–674.
- Zavattieri, A., Lima, M., Sobral, V., Oliveira, P., and Costa, A.** (2009): Effects of carbon source, carbon concentration and culture conditions on in vitro rooting of *Pinus pinea* L. microshoots. *Acta Horticulturae* **812**: 173–180.
- Zerche, S. and Druege, U.** (2009): Nitrogen content determines adventitious rooting in *Euphorbia pulcherrima* under adequate light independently of pre-rooting carbohydrate depletion of cuttings. *Scientia Horticulturae* **121**: 340–347.
- Zhou, R. and Quebedeaux, B.** (2003): Changes in photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature apple leaves in response to whole plant source-sink manipulation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 113–119.
- Zimmerman, P. W., Hitchcock, A. E.** (1933): Initiation and stimulation of adventitious roots caused by unsaturated hydrocarbon gases. *Contributions from the Boyce Thompson Institute* **5**: 351–369.
- Zimmerman, W., Wilcoxon, F.** (1935): Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contributions from the Boyce Thompson Institute* **7**: 209–217.
- ZMP, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle** (2006): Top Ten Listen für den deutschen Zierpflanzenmarkt 2006. http://www.g-net.de/download/daten_faken/Top10_Grafiken2006.pdf, Stand: 26. November 2009.
- ZMP, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle** (2009): Die wichtigsten Pflanzen im grünen Einzelhandel. In: Magazin für den Garten- und Landschaftsbau **04/2009**: 12–13.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., and Sonnewald, U.** (1995): Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal* **7**: 97–107.
- Zrenner, R., Krause, K.-P., Apel, P., and Sonnewald, U.** (1996^a): Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *The Plant Journal* **9** (5): 671–681.
- Zrenner, R., Schüler, K., Sonnewald, U.** (1996^b): Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* **198**: 246–252.

7 ANHANG

Tab. I: Gegenüberstellung der chemische Zusammensetzung des zum Gießen genutzten Leitungswassers am Standort Erfurt und Großbeeren.

Parameter	Wasser Erfurt	Wasser Großbeeren
pH-Wert	8,4	7,4
elektrische Leitfähigkeit [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	230,0	890,0
Karbonat-Härte [$^{\circ}\text{dH}$]	4,0	13,0
Gesamthärte [$^{\circ}\text{dH}$]	4,0	22,0
Nitrat-N [mg L^{-1}]	0,9	<0,5
Ammonium-N [mg L^{-1}]	<0,02	<0,02
P_{gesamt} [mg L^{-1}]	<0,01	0,01
Kalium [mg L^{-1}]	3,0	1,5
Kalzium [mg L^{-1}]	16,0	115,0
Magnesium [mg L^{-1}]	1,1	8,6
Eisen [mg L^{-1}]	0,04	<0,02
Kupfer [mg L^{-1}]	0,011	0,26
Mangan [mg L^{-1}]	<0,01	<0,01
Zink [mg L^{-1}]	0,014	0,136
Sulfat [mg L^{-1}]	16,0	150,0
Chlorid [mg L^{-1}]	17,0	66,0
Natrium [mg L^{-1}]	16,0	36,0

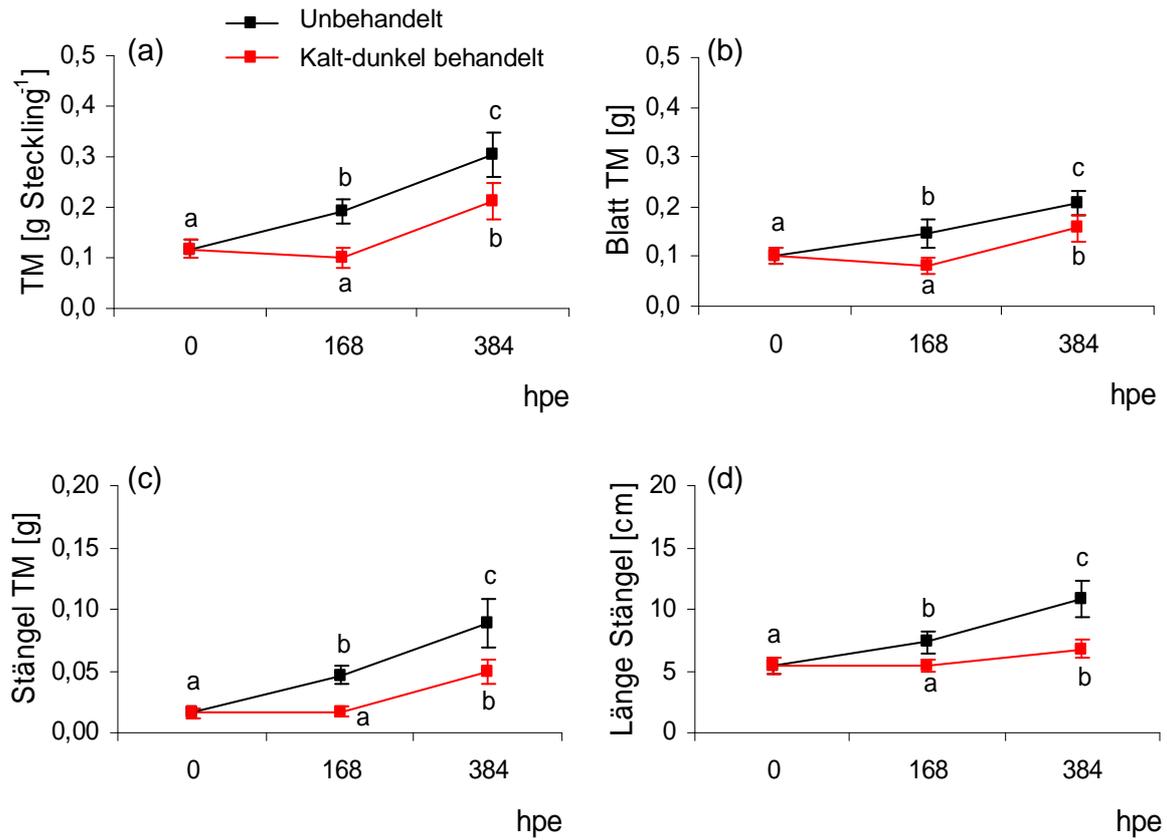


Abb. I: Veränderung der Gesamttrockenmasse (a), der Blatttrockenmasse (b) und Stängeltrockenmasse (c) sowie der Stängellänge (d) von unbehandelten und kalt-dunkel behandelten Stecklingen.

Unbehandelte Stecklinge wurden direkt nach der Ernte für 16 Tage der Lichtphase ausgesetzt (0–384 hpe), kalt-dunkel behandelte Stecklinge wurden nach der Ernte (0 hpe) für sieben Tage dunkel gelagert (0–168 hpe) und anschließend für neun Tage der Lichtphase ausgesetzt (168–384 hpe); n=32.

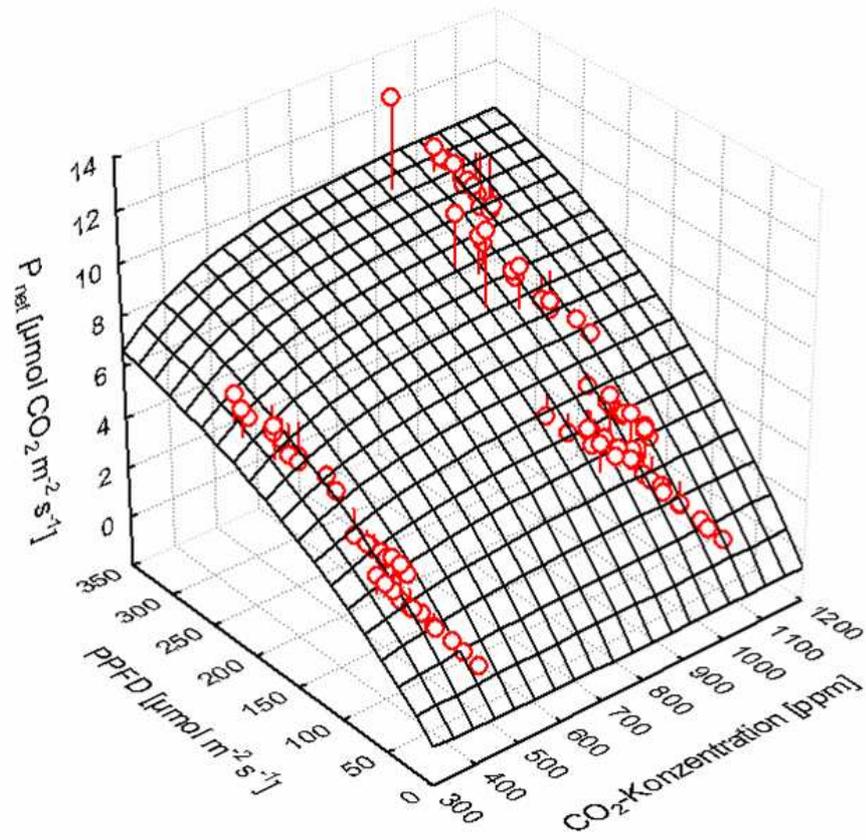


Abb. II: Nettophotosynthese (P_{net}) in Abhängigkeit von der eingestrahnten Lichtintensität (PPFD) in Kombination mit der CO_2 -Konzentration.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau angefertigt. Von Juli 2006 bis November 2008 erfolgten die Analysen am Standort Erfurt / Kühnhausen. Ab November 2008 wurden weitere Experimente und die Fertigstellung der Dissertation im Institutsteil in Großbeeren durchgeführt.

Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten Themas bei **Dr. Uwe Drüge**.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Gutachtern für die Übernahme der Gutachten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter **PD Dr. Dr. Bettina Hause** für die fachliche Kompetenz und Hilfestellung, die kritische Durchsicht des Manuskriptes sowie den Beistand während der Fertigstellung der Doktorarbeit.

PD Dr. Philipp Franken danke ich recht herzlich für die sehr gute Betreuung und unkomplizierte Aufnahme in die Arbeitsgruppe in Großbeeren.

Es ist mir ein besonderes Bedürfnis **Professor Dr. Eckhard George** für seinen Einsatz, seine fachliche aber auch menschliche Unterstützung sowie seine Entscheidungen zu danken, die mir Mut und Kraft gegeben haben.

Weiterhin möchte ich ganz herzlich **Dr. Hans-Peter Kläring** für die Hilfe und fachliche Beratung bei der Planung und Durchführung der Gaswechselformen danken.

Ebenso gilt mein Dank:

- **PD Dr. Annette Hohe** für ihre fachliche und menschliche Unterstützung
- **Bärbel Broszies** für die technische Assistenz bei der Durchführung der Kohlenhydratanalysen und für die Versorgung mit Nervennahrung sowie **Sabine Czekalla** für die Pflege meiner Pflanzen und die mühevollen Arbeit der Wurzelbonituren
- **Katja Krüger** für die Anleitung und Hilfestellung bei den histologischen Analysen
- **Ingo Hauschild** für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Gaswechselformen
- **Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei** und der **AG Molekulare Pflanzenernährung** des IPK Gatersleben
- **Dr. Siegfried Zerche** und **Katrin Schultz** für die Pflanzendüngung und Bestimmung der Bodenanalysen und Frau **Kerstin Schmidt** für die Stickstoffanalysen

Sowie allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des IGZ.

Ich möchte mich sehr herzlich bei **Soukayna, Leif, Gawan** und allen anderen „Students of Großbeeren“ für die tolle Zeit bedanken.

Mein größter Dank jedoch gilt **meiner Familie**, die mir aufopferungsvoll alle nötigen Freiheiten einräumten und mit ihrer Geduld und Rücksichtnahme während der intensiven Beschäftigung mit meiner Arbeit zum Gelingen der Dissertation viel beitrugen.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Erfurt, den 29. März 2010

Yvonne Klopotek

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen:

- **Klopotek, Y.**, Haensch, K.-T., Hajirezaei, M.-R., Hause, B., Druege, U. (2010). Dark exposure of petunia cuttings strongly improves adventitious root formation and enhances carbohydrate availability during rooting in the light. *J Plant Physiol* 167 (7): 547–554.
- Druege, U., Hänsch, K.-T., **Klopotek, Y.**, Franken, P, Lischewski, S., Hause, B., Ahkami, A.-H., Hajirezaei, M.-R. (2008). Der Wurzelbildung auf der Spur: ein integrierter Forschungsansatz zur Förderung der Jungpflanzenproduktion. *ForschungsReport* (1): 21–25.
- **Klopotek, Y.**, Otto, K., Böhm, V. (2005). Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 53 (14): 5640-5646.

Tagungsteilnahmen (Auszug):

Vorträge:

- 10th World Petunia Days – Cartagena, Spanien (28.–31.03.2009)
Klopotek, Y., Haensch, K.-T., Hajirezaei, M.-R., Hause, B., Druege, U. (2009): How does dark exposition of petunia cuttings influence adventitious root formation?

Poster:

- 1st Symposium on Horticulture in Europe – Wien, Österreich (17.–20.02.2008)
Klopotek, Y., Haensch, K.-T., Hajirezaei, M.-R., Hause, B., Zerche, S., Druege, U. (2008): Biochemical and histological analysis of nitrogen-mediated root formation in *Petunia* cuttings
- 5th International Symposium on Adventitious Root Formation – Alcalá de Hénare-Madrid, Spanien (16. –20.06.2008)
Klopotek, Y., Haensch, K.-T., Hajirezaei, M.-R., Hause, B., Zerche, S., Druege, U. (2008): Cytological events and carbohydrate levels during adventitious root formation in petunia cuttings in response to pre-rooting dark exposition

Erfurt, 29. März 2010

Yvonne Klopotek