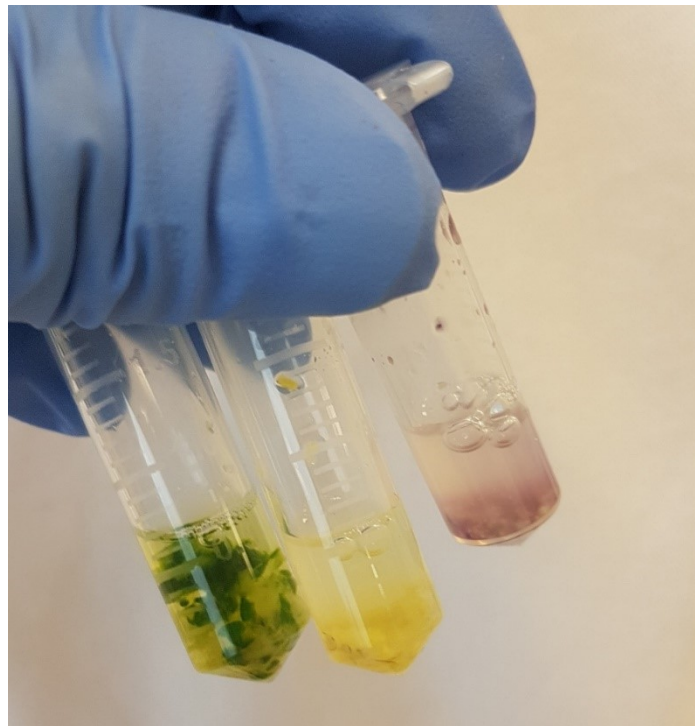


Umweltstress auf Proteinebene



Abschlussbericht der Kooperationsphase 2019/20

Durchgeführt am Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt (FTU)
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
unter Betreuung von Dr. Julia Ehlermann, Kerstin Schönthaler, Tanja Kuhn

Sania Schmitt
Neugrabenstraße 11
76185 Karlsruhe
schmitsa@hector-seminar.de

Ina Schmoch
Hohe Eich 28
76297 Stutensee
schmocin@hector-seminar.de

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	3
1. Einleitung	4
2. Material und Methoden.....	5
2.1 Vorversuche.....	5
2.2 Versuchsansätze.....	5
2.2.1 Umweltfaktor Wasser.....	6
2.2.2 Umweltfaktor Salz.....	6
2.2.3 Umweltfaktor „Standort“	7
2.3 Probenaufbereitung.....	7
2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	8
2.4.1 Gießen der Gele	10
2.4.2 Montage der Gelapparatur	11
2.4.3 Auftragen von Proben und Marker	11
2.5 Färben der Gele	12
3. Ergebnisse und Diskussion	13
3.1 Ausgewählte Pflanzen.....	13
3.2 Innerartliche Variation	14
3.3 Zeitliche Entwicklung.....	15
3.4 Umweltfaktor Wasser	16
3.5 Umweltfaktor Salz	18
3.6 Umweltfaktor „Standort“	20
3.7 Fehlerdiskussion	21
4. Fazit und Ausblick	22
5. Danksagung	23
6. Quellen.....	24
7. Anhang.....	25
7.1 Abkürzungsverzeichnis	25
7.2 Chemikalienverzeichnis.....	26
7.3 Anleitung Versuchsansätze	27
7.4 Weitere Dokumentation der Gele	28
8. Selbstständigkeitserklärung.....	32

Abstract

Climate change is a widely discussed topic in the whole world. Scientists are trying to find out more about its effects on different parts of the biosphere. But they do not only examine the implications that climate change has on the environment, further on they try to find out the repercussions that result for us, the human species. Apart from extreme weather events such as floods, heat waves and hurricanes the focus is on one of our most basic needs – food. Probable consequences are increasing food insecurity and linked to this, rising food prices, but also a reduction in food production. Setting the quantity of our food in the future aside, it would also be interesting to have a closer look at how the climate possibly influences food quality.

One such factor that plays into the quality of food are proteins as they are very important for plants. For example, they take on a significant role in photosynthesis and in the inter- and intracellular transport of nutrients. The diverse functions of proteins can be traced back to their different compositions of amino acids. This also affects the charge and mass of the proteins, which makes them easy to distinguish. A common method to do this is gel electrophoresis.

The research done in this project concentrates on the protein content and composition of different plants and to what capacity they change while growing and under different conditions. Therefore, four different plants, alfalfa, cress, mung bean and radish were chosen. They were put under stress by watering less, adding salt to the water or changing the location. To compare these to a normal sprout, one plant of each kind grew under suggested suitable conditions. To examine whether the stress put on the plants can be detected on the molecular level, gel electrophoresis was used. Our results are a first attempt to answer the question, how environmental stress influences the content and compound of proteins in certain plants.

1. Einleitung

Der Klimawandel und dessen Folgen entwickeln sich zu einer globalen Bedrohung. Es kommt vermehrt zu Extremwetterereignissen, wie zum Beispiel Orkanen und Überschwemmungen, Gletscher und Polkappen schmelzen ab und Lebensräume verändern sich oder gehen vollständig verloren. Auch die Pflanzenwelt wird durch den Klimawandel beeinflusst. Hitze und Dürreperioden lassen Pflanzen vielerorts vertrocknen und nährstoffarme Böden verhindern eine ausreichende Versorgung mit notwendigen Mineralien. Während Auswirkungen wie diese bereits hinreichend bekannt sind, ist noch weitgehend unklar, welche Auswirkungen Umweltstress auf molekularer Ebene, beispielsweise bei Proteinen, hat.

Wie für alle Lebewesen, sind Proteine auch für Pflanzen von großer Bedeutung. Als Enzyme katalysieren sie Stoffwechselprozesse, z. B. bei der Fotosynthese und Zellatmung, übernehmen Transport- oder Speicherfunktionen oder sind als Strukturproteine wichtiger Bestandteil in Organismen. Die vielfältigen Funktionen von Proteinen lassen sich auf ihre Struktur zurückführen, für die die jeweilige Zusammensetzung an Aminosäuren entscheidend ist. Je nach Anzahl und Art der Aminosäuren unterscheiden sich die Proteine in ihrer Ladung und Masse, wodurch sie sich leicht unterscheiden lassen.

Eine weit verbreitete Methode dafür ist die Gelelektrophorese, bei der Moleküle, z. B. Proteine auf ein Gel aufgetragen und im elektrischen Feld getrennt werden. Die Ergebnisse zeigen ein Proteinmuster, das spezifisch für jede Probe ist – den Protein-Fingerprint.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde untersucht, ob und ggf. wie sich das Proteinmuster verschiedener Pflanzen im Laufe der Entwicklung und unter verschiedenen Umwelteinflüssen verändert.

2. Material und Methoden

2.1 Vorversuche

Zu Beginn der Untersuchung wurden verschiedene Pflanzen ausgesät und gezogen. Ziel war es, geeignete Pflanzen zu finden, die nach der Gelelektrophorese gut auswertbare Proteinmuster zeigen und schnell wachsen, so dass sie zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht und mehrere Versuchsreihen durchgeführt werden können. Zudem musste eine für die Gelelektrophorese geeignete Probenmenge bestimmt werden.

Untersucht wurden Lupine¹ (*Lupinus hartwegii*), Basilikum² (*Ocimum basilicum*), Alfalfa³ (*Medicago sativa*), Kresse⁴ (*Lepidium sativum*), Radies⁵ (*Raphanus sativus sango*) und Mungbohnen⁶ (*Vigna radiata*). Aufgrund des schnelleren Wachstums und der einfacheren Anbaubedingungen (s. 3.1) wurden in den Folgeversuchen Alfalfa, Kresse, Radies und Mungbohnen vergleichend untersucht.

Als Auftragungsmenge für die Gelelektrophorese wurde ein Probenvolumen von 20 µl gewählt. Für die Untersuchung von tierischen Proteinen in Fleischproben hat sich eine Auftragungsmenge von 10 µl als sinnvoll erwiesen. Da man in Pflanzen eine deutlich geringere Menge an Proteinen vermutet hat, wurde das doppelte Volumen aufgetragen.

2.2 Versuchsansätze

Die Pflanzen wurden aus Samen angezogen. Dazu wurden verschiedene Keimbecher gemäß Anleitung vorbereitet und eingesetzt (Abb. 1 – 3; vgl. Anhang 7.3, Tab. 2).



Abb. 1 Mungbohnen



Abb. 2 Radies



Abb. 3 Kresse

Jeweils ein Espressolöffel Alfalfa-Samen wurde für 6 Stunden in Leitungswasser gequollen und danach in einen Keimbecher gegeben. Für die Mungbohnen wurden je 18 Samen direkt in die Keimbecher gegeben. Bei der Kresse wurde ein gestrichener

¹ Hersteller: Kiepenkerl; Lupine Mischung

² Hersteller: Sperli; BIO-Basilikum, Typ „Genoveser“

³ Hersteller: Sonnentor; Alfalfa, bio

⁴ Hersteller: Sperli; Kresse Keimsprossen

⁵ Hersteller: Sperli; Grünsprossen, Radies, Rot, Keim pads

⁶ Hersteller: Sperli; Mungbohnen Keimsprossen

Teelöffel Samen auf etwas Watte gelegt. Auf den Keimbechern von Alfalfa, Mungbohnen und Radies waren Deckel, die je nach Pflanze teils zugeschraubt waren oder lose auflagen (s. 7.3 Tab. 2). Die Becher wurden an einem hellen Standort aufgestellt. Dabei wurden die Pflanzen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, durch die Umweltstress erzeugt werden sollte (s. 7.3 Tab. 3).

Alle Pflanzen wurden morgens und abends mit kaltem bis lauwarmem Wasser gegossen. Die zugeführte Wassermenge orientierte sich an den Angaben des Herstellers und war von der Art und den gewählten Umweltbedingungen abhängig (s. 2.3.1).

Die Kontrollpflanzen von Alfalfa und Mungbohnen wurden beim Gießen gespült. Dazu wurde der Becher einmal gefüllt (100 ml) und das Wasser konnte ablaufen. Um eine gewisse Restfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurde, wenn das Wasser weitestgehend abgelaufen war, bei den Mungbohnen, ein Becher untergestellt, in dem sich Restwasser sammeln konnte. Bei Alfalfa wurden die Keimbecher auf den Kopf gedreht, sodass etwas Restwasser im Becher blieb. Die Kresse wurde mit einem Teelöffel, Radies mit 2 Esslöffeln Wasser gegossen. Auch bei Radies wurde ein Becher für die Restfeuchtigkeit untergestellt.

Ein Probenzyklus ging 10 Tage; es wurden insgesamt drei Zyklen durchgeführt, wobei für die Untersuchungen ausschließlich Proben des dritten Zyklus eingesetzt wurden.

2.2.1 Umweltfaktor Wasser

In einem Ansatz pro Pflanze wurde weniger Wasser gegossen. Alfalfa und Radies erhielten noch einen Teelöffel, Mungbohnen noch zwei Teelöffel Wasser bekommen und Kresse zehn Tropfen Wasser. Die Vergleichsproben (Kontrolle) wurden wie oben beschrieben behandelt.

2.2.2 Umweltfaktor Salz

Neben den Auswirkungen einer reduzierten Wasserzufuhr wurden die Auswirkungen eines erhöhten Salzgehalts im Gießwasser untersucht. Statt normalem Leitungswasser wurde zu Beginn 1%ige Kochsalzlösung gegossen. Die Menge des Wassers sowie die Art des Gießens entsprachen der Kontrolle (s. 2.3).

Um zu untersuchen, ob bereits wenig Salzzufuhr während Quellung bzw. Keimung (Alfalfa) einen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung in der weiteren Entwicklung hat, wurde nur beim ersten und zweiten Gießen Salzwasser verwendet. Ab dem dritten Gießen wurde Leitungswasser verwendet (vgl. Kontrolle).

2.2.3 Umweltfaktor „Standort“

Die Pflanzen wurden an insgesamt vier verschiedenen Standorten angezogen, die sich in den Faktoren Temperatur und Licht unterschieden. Die Wasserzufuhr entsprach der Kontrolle.

Ziel dieser Untersuchung war zunächst zu prüfen, ob sich verschiedene Standorte mit unterschiedlichen Faktoren überhaupt auf die Proteinzusammensetzung auswirken. Um Aussagen über den Einfluss einzelner Faktoren treffen zu können, wäre es in weiteren Untersuchungen erforderlich, diese einzeln zu variieren.

Tab. 1 Standortbedingungen

	Temperatur	Licht	Pflanzen
Standort 1	Raumtemperatur (20 – 24 °C)	Fenster Richtung Westen, ca. 3 m entfernt	Alfalfa
Standort 2	Über der Heizung	Fenster Richtung Westen, direkt am Fenster	Alfalfa
Standort 3	Raumtemperatur (20 – 24 °C)	Fenster Richtung Süden, direkt am Fenster	Mungbohnen, Kresse, Radies
Standort 4	Bad (25 – 28 °C)	Fenster Richtung Westen, ca. 3 m entfernt	Mungbohnen, Kresse, Radies

2.3 Probenaufbereitung

Die Proben wurden an den entsprechenden Tagen abends vor dem Gießen vollständig entnommen, mit Schere, Messer und Mörser möglichst fein zerkleinert (Abb. 4, 5) und jeweils eine ca. linsengroße Menge in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C eingefroren. Dort wurden sie bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung gelagert.

Zur weiteren Aufbereitung wurde zunächst zu allen Proben 0,5 ml Aufschlusspuffer⁷ hinzugegeben, welcher die für die Denaturierung der Proteine zuständige SDS-Lösung enthielt. Es folgte die Zugabe von je 100 µl DTT-Lösung zu jeder Probe (Abb. 6).

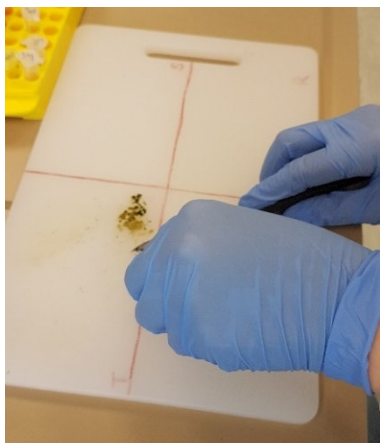


Abb. 4 Proben zerschneiden



Abb. 5 Proben mörsern

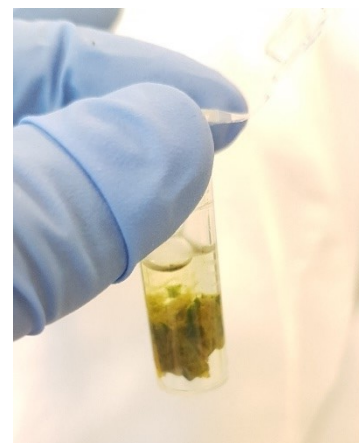


Abb. 6 Proben mit Aufschlusspuffer und DTT

⁷ siehe 7.2 Chemikalienverzeichnis, auch für weitere Chemikalien

Die in der Lösung enthaltene Substanz Dithiothreitol (DTT) ist ein Reduktionsmittel, welches Disulfidbrücken auflöst und die Moleküle denaturiert. So wurde verhindert, dass das Laufverhalten in der Gelelektrophorese durch von Disulfidbrücken stabilisierten Strukturen der Proteine beeinflusst wird.

Die Proben wurden mithilfe des Vortexers durchmischt und für zehn Minuten im Schüttelheizblock (Abb. 7) bei 95 °C inkubiert. Durch die hohe Temperatur wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen und die Proteine wurden denaturiert. Die Proben wurden drei Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert (Abb. 8). 100 µl des flüssigen Überstands wurden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, je 7,5 µl BPB-Färbelösung⁹ zugefügt (Abb. 9) und die Proben nochmals gevortext.



Abb. 7 Schüttelheizblock



Abb. 8 Zentrifuge



Abb. 9 Proben mit BPB-Färbelösung

2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, bei der geladene Probenmoleküle auf ein Gel aufgetragen und im elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden.

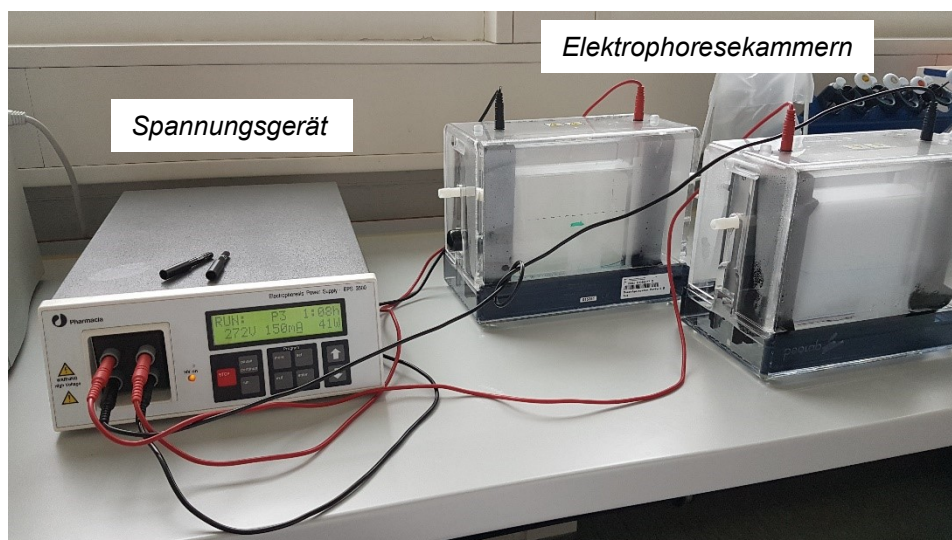


Abb. 10 Aufbau SDS-PAGE

Die Proteine wandern vom Minus- zum Plus-Pol (Anode). Die kleinen Poren des Gels stellen für die aufgetragenen Moleküle einen Laufwiderstand dar, der umso höher ist, je größer ein Protein ist. Die großen Proteine laufen so langsamer durch das Gel als kleinere Proteine.

Native Proteine haben kein konstantes Verhältnis von Ladung und Masse. Um die Molare Masse einzelner Proteine bestimmen zu können, werden die Ladungsunterschiede zunächst durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) beseitigt. Das anionische Tensid bindet an die vorhandenen Aminosäuren und überzieht das Molekül gleichmäßig mit negativen Ladungen. Dadurch kommt es zu einer gegenseitigen Abstoßung, welche, kombiniert mit der Hitzedenaturierung, eine Linearisierung der zuvor gefalteten Proteine zur Folge hat (Abb. 11). Dies macht es möglich, dass die negativ geladenen Moleküle zur Anode wandern und im Gel nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt werden.

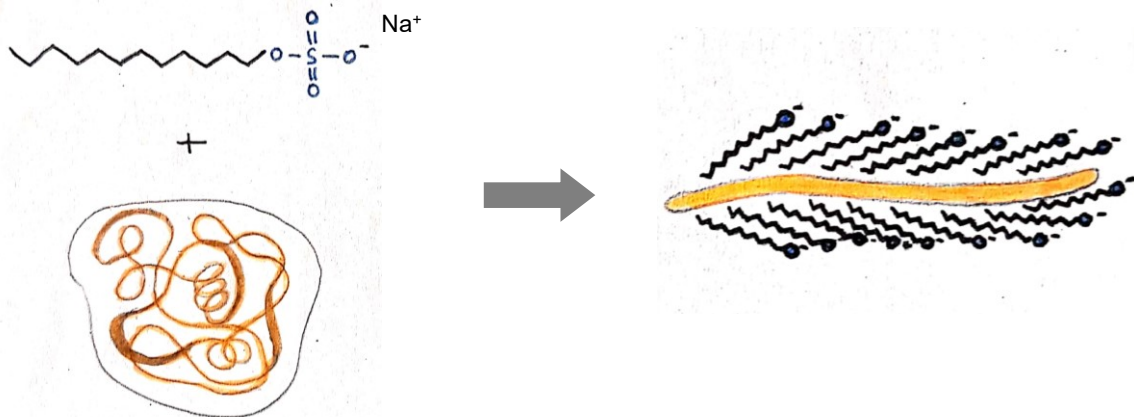


Abb. 11 Denaturierung eines Proteins mit SDS

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese mit einem Sammel- und einem Trenngel (Abb. 12). Die denaturierten Proben wandern zunächst durch das Sammelgel, das dazu dient, alle Proben an den gleichen Startpunkt zu bringen. Im Laufpuffer befinden sich Elektrolyten, in denen Glycinat- und Chloridionen enthalten sind. Im Sammelgel wandern die kleineren, negativ geladenen Chloridionen vor den Proteinen, während die etwas größeren Glycinationen, die beim neutralen pH-Wert des Sammelgels in Zwitterionenform vorliegen, gebremst werden und den negativ geladenen Proteinen folgen. Treffen die Proteine nun auf das vergleichsweise basische Trenngel, werden die Glycinationen bei dem erhöhten pH-Wert an der Aminogruppe deprotoniert und liegen vorwiegend anionisch vor. Dadurch überholt Glycinat die Proteine, sodass nun Chlorid- und Glycinationen vor den Proteinen wandern. Dies hat einen Stapelungseffekt an der Grenze des Sammelgels zum Trenngel zur Folge, wodurch die Proteine besser getrennt werden und die Banden nach der Färbung schmalere und schärfere sind.

2.4.1 Gießen der Gele

Die eingesetzten Gele bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel (Abb. 12). Die Bestandteile der Gele sind zum größten Teil identisch: beide enthalten Acrylamid und Bisacrylamid, die als Gelbinder und Quervernetzer fungieren, sowie VE-Wasser und einen Sammel- bzw. Trenngelpuffer, die sich aus einer TrisBase und SDS-Lösung zusammensetzen. Durch Zugabe des Katalysators TEMED und des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) wird die radikalische Polymerisation gestartet, bei der sich die Acrylamid-Moleküle zu einem dreidimensionalen Gitternetzwerk verbinden. Der Unterschied der beiden Gele liegt in den Porengrößen und Ionenstärken, sowie den pH-Werten der verwendeten Puffer. Beim Trennpuffer ist der pH-Wert höher (pH 8,8). Die Gele werden in einen Hohlraum zwischen zwei Glasplatten gegossen, die in einen

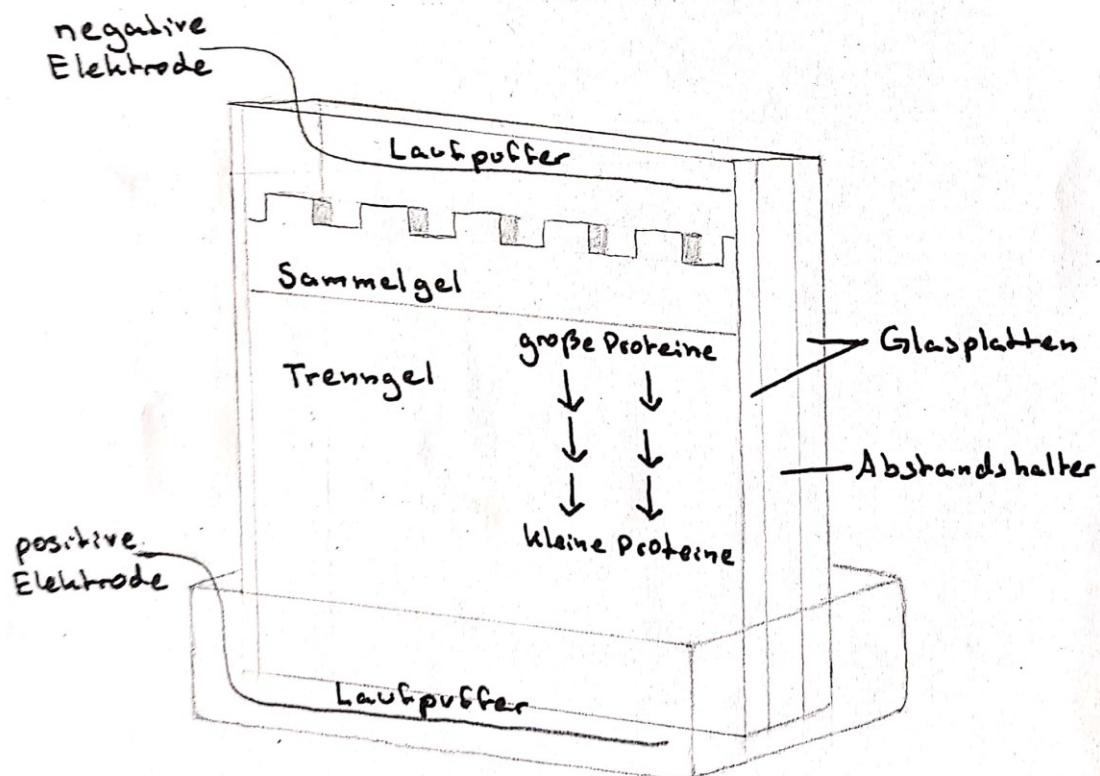


Abb. 12 Sammel- und Trenngel

Gelrahmen eingesetzt und von einem Gießstand abgedichtet wurden. In das noch flüssige Gel wird ein Probenkamm eingesteckt. Dieser wird nach der Polymerisation vorsichtig entfernt und in die entstandenen Taschen können die Proteinproben pipettiert werden (Abb. 14).

2.4.2 Montage der Gelapparatur

Die aus Glasplatten und dem dazwischenliegenden Gel bestehende Gelkassette wird in den Elektrodenstand eingesetzt und im Klammerrahmen befestigt (Abb. 13). Dieser kommt in den Pufferbehälter, der mit dem Laufpuffer, einer Tris/Glycin/SDS-Fertiglösung gefüllt wird. Die Apparatur wird mit dem Deckel verschlossen und an die Spannungsquelle angeschlossen (vgl. Abb. 10).

Abb. 13 Gelapparatur Zusammenbau (<https://www.biochemie.uni-freiburg.de/en/nat-w/protein-fa.htm>)

2.4.3 Auftragen von Proben und Marker

Je 20 µl der aufbereiteten Proben werden auf das Gel aufgebracht (Abb. 14). Da das Laufverhalten der aufgetragenen Proben jeweils von der Zeit, Spannung und der Struktur des Gels abhängig ist, lädt man einen Größenmarker (Abb. 15) mit Proteinen bekannter Größe auf das Gel. Die molaren Massen der Proben können nur mit dem Marker des jeweiligen Gels bestimmt werden, weil dieser von denselben Faktoren abhängig ist wie die Proteinproben. Sind die Massen der Proteine eines Gels bestimmt, können sie mit Proben anderer Gele verglichen werden. Die Proben wurden bei 80 mA (Sammegel) bzw. 100 mA (Trenngel) und einer Laufzeit von 2 Stunden getrennt.

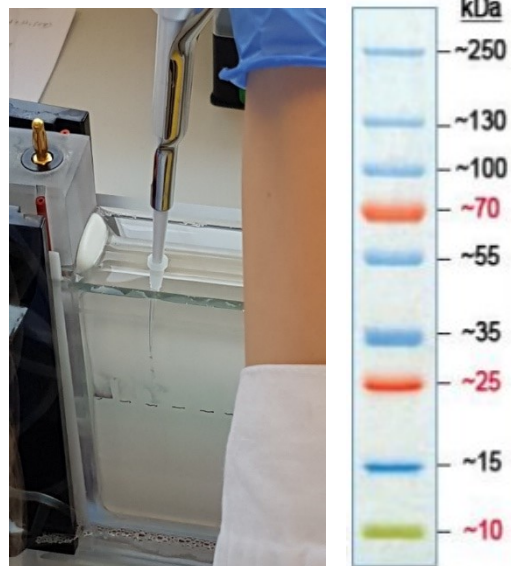


Abb. 14 Auftragen der Proben Abb. 15 Marker

2.5 Färben der Gele

Um die Proteinbanden auf dem Gel nach der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, werden diese mit Coomassie eingefärbt. Dazu wird das Gel ca. 20 Minuten in Coomassie-Lösung gelegt (Abb. 17). Das blau eingefärbte Gel wird danach in VE-Wasser gekocht (Abb. 18) und der Farbstoff wird ausgewaschen. Das Wasser sollte ungefähr alle fünf Minuten ausgetauscht werden. Dabei wird nur das Gel entfärbt, jedoch nicht die Proteine. Es entsteht ein blaues Bandenmuster, der Marker bleibt ebenfalls gut sichtbar.



Abb. 16 Gel vor Färbung

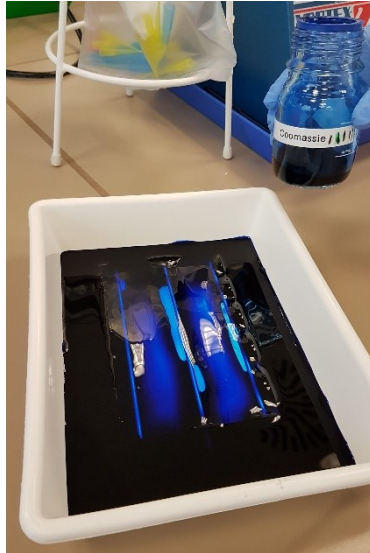


Abb. 17 Gel in Coomassie-Lösung

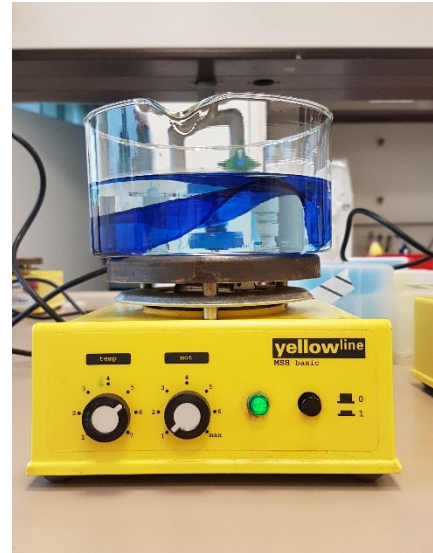


Abb. 18 Kochen in VE-Wasser

Die Färbung beruht darauf, dass sich der in Methanol gelöste Farbstoff⁸ an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren anlagert und fest an die Proteine bindet. Die in der Coomassie-Lösung ebenfalls enthaltene Essigsäure fixiert die Proteine im Gel, sodass sich diese während dem Ein- und Entfärben nicht im Gel verteilen.

Im Anschluss wurden die Gele fotografiert und mit dem GelStick „Touch“ der Firma Intas⁹ dokumentiert.

⁸ Brilliant Blue R250

⁹ <https://www.intas.de/geldokumentation/69-gel-stick-touch> (entnommen am 08.08.2020)

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ausgewählte Pflanzen

Entscheidend für die Auswahl der Pflanzenarten war neben gut erkennbaren Proteinbanden die erforderliche Zeit für Keimung und Wachstum, sodass Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht und mehrere Versuchsreihen durchgeführt werden können.

Bei allen Pflanzen waren bei den aufgetragenen Probenvolumen gut erkennbare Proteinbanden sichtbar. Deshalb war die Wachstumsgeschwindigkeit das entscheidende Kriterium.

Während bei Alfalfa, Kresse, Mungbohnen und Radies die Samen schnell gekeimt und gewachsen sind (Abb. 19), war das Wachstum bei Basilikum und Lupine deutlich langsamer (Abb. 20, 21). Zudem war der Anbau aufwändiger als bei den anderen Pflanzenarten.

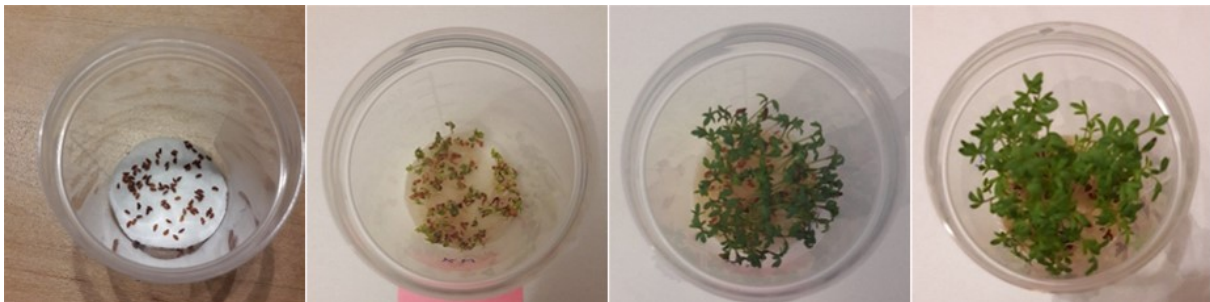


Abb. 19 Kresse nach 0, 3, 5 und 10 Tagen



Abb. 20 Vorversuche Lupine nach 5 Wochen



Abb. 21 Vorversuche Basilikum nach 5 Wochen

Daher wurden für die folgenden Versuche Alfalfa, Kresse, Mungbohnen und Radies ausgewählt. Bereits nach wenigen Tagen waren die Pflanzen mehrere Zentimeter gewachsen und es gab genug Probenmaterial, welches im Labor untersucht werden konnte (Abb.).



Abb. 22 Mungbohnen, Radies und Kresse bei unterschiedlichen Bedingungen (von links nach rechts: anderer Standort, weniger Wasser, Normal, Salz); nach 10 Tagen

3.2 Innerartliche Variation

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse nur auf die veränderten Umweltbedingungen und nicht auf bereits bestehende Unterschiede im verwendeten Saatgut zurückzuführen waren, wurden zunächst Proteinfingerprints einzelner Pflanzen verglichen. Da alle Samen einer Art jeweils aus einer Packung kamen, lag die Vermutung nahe, dass alle Pflanzen genetisch identisch sind und sich die Proteinmuster entsprechen.

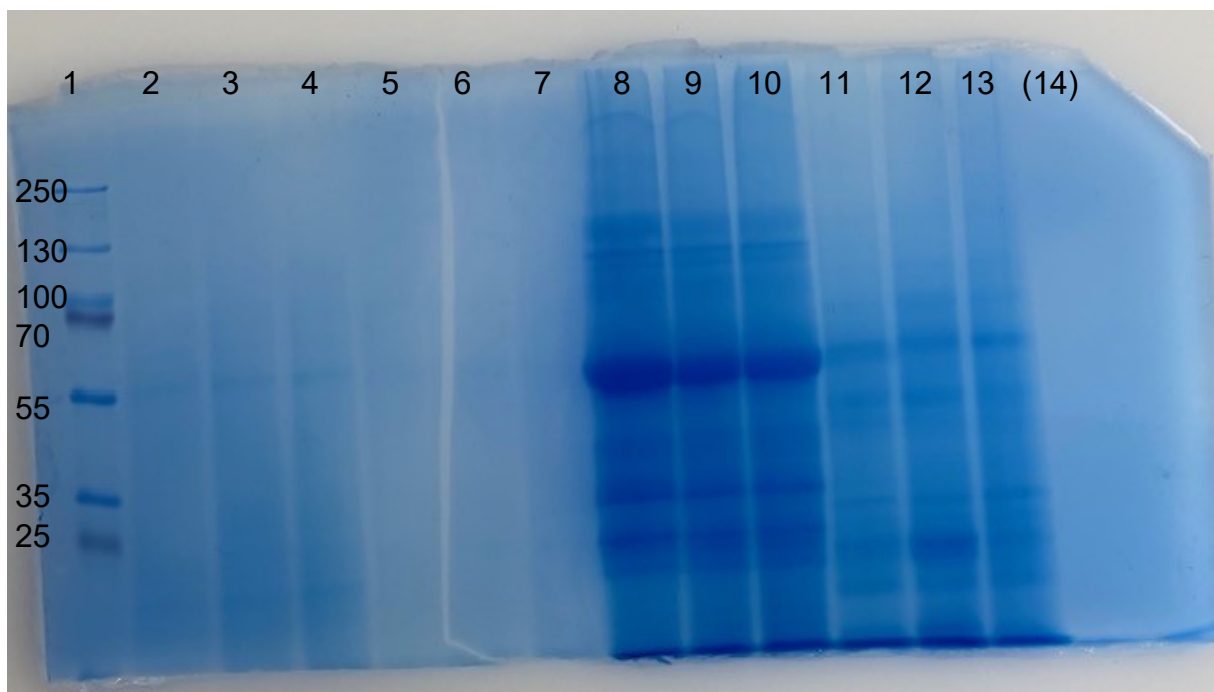


Abb. 23 Gel 1 Innerartliche Variation: Marker (Spur 1), Alfalfa (Spur 2-4), Kresse (Spur 5-7), Mungbohnen (Spur 8-10), Radies (Spur 11-13), nach 5 Tagen

Im Experiment zeigt sich, dass die Bandenmuster, die zu je einer Pflanze gehören, wie erwartet identisch sind (Abb. 23). Die unterschiedliche Intensität der Banden lässt darauf schließen, dass der Proteingehalt zwischen den untersuchten Pflanzenarten

stark variiert. Da die Banden bei den Alfalfa- und Kresse-Proben (Spur 2-7) wesentlich schwächer sind, ist ihr Proteingehalt geringer als bei den verhältnismäßig intensiven Banden der Mungbohne (Spur 8-10). Die Radies-Proben sind vergleichsweise mittelmäßig gefärbt (Spur 11-13), was auf einen mittleren Proteingehalt hindeutet.

Neben diesen Unterschieden zeigen die untersuchten Arten vergleichbare Proteinmuster, was auf eine ähnliche Ausstattung an Proteinen in der Entwicklung der Keimlinge hindeutet. Eine auffällige Gemeinsamkeit aller Proben ist eine besonders dicke Bande bei ca. 55 kDa, was auf Tubuline hindeutet. Tubuline sind in Mikrotubuli enthalten, welche einen Bestandteil des Cytoskeletts eukaryotischer Zellen bilden und deshalb von jeder Pflanze benötigt werden.

Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Proben einer Art vermutlich Klone sind, denn die Samen weisen bei gleicher Behandlung eine vergleichbare Proteinzusammensetzung auf. Verschiedene Pflanzenarten enthielten trotz unterschiedlicher Proteinmuster teils ähnliche Proteine. Aussagen zum Proteingehalt können aufgrund der unterschiedlichen Menge des eingesetzten Pflanzenmaterials nicht getroffen werden. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass Unterschiede zwischen verschiedenen Arten bestehen.

3.3 Zeitliche Entwicklung

Im Folgeexperiment wurde untersucht, wie sich der Protein-Fingerprint der Pflanzen über einen Zeitraum von zehn Tagen verändert. Die Ausgangshypothese war, dass der Proteingehalt mit der Zeit sinkt, da die Pflanzen mit dem Wachstum mehr Wasser enthalten, in einer gleich großen Probe dann also weniger Proteine zu finden sein müssten. Eine andere Überlegung wäre, dass die Pflanze zu Beginn, wenn sie sich noch stärker entwickeln muss, eine Vielzahl verschiedener Proteine in größerer Menge produziert als zu einem späteren Entwicklungsstadium.

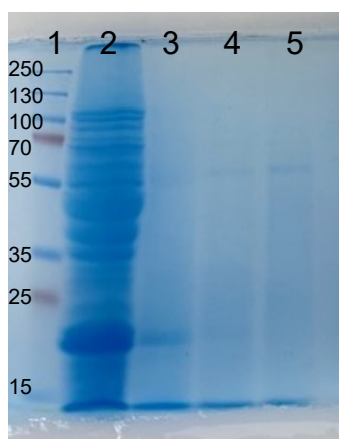


Abb. 24 Gel 8 Zeitlicher Verlauf: Marker (Spur 1), Alfalfa nach 0, 3, 5, 10 Tagen (Spur 2-5)

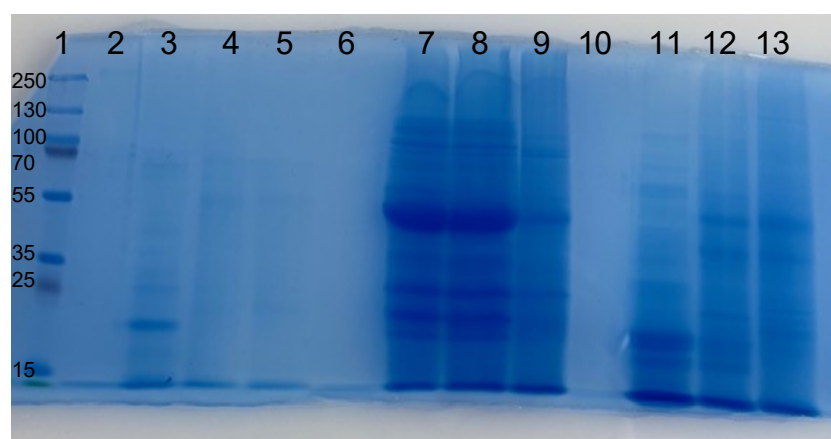


Abb. 25 Gel 2 Zeitlicher Verlauf: Marker (Spur 1), Kresse (Spur 2-5), Mungbohnen (Spur 6-9), Radies (Spur 10-13) nach 0, 3, 5, 10 Tagen

Ein deutlicher Unterschied ist bei Alfalfa zwischen der Nullprobe¹⁰ und den Proben von Tag 3, 5 und 10 (Abb. 24). Die Banden der Nullprobe sind wesentlich stärker als die anderen und es sind viele verschiedene Proteine vorhanden. Auffällig ist eine Bande zwischen 15 und 25 kDa, welche sowohl bei Alfalfa als auch bei den Kresse-, Mungbohnen- und Radies-Proben von Tag 3 zu sehen ist.

Bei den Nullproben der anderen drei Pflanzen sind keine Proteinbanden zu erkennen (Abb. 25 Spur 2, 6, 10), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass das Probenmaterial nicht ausreichend zerkleinert wurde und deshalb zu wenig Proteine in den aufbereiteten Proben gelöst waren. Die Bandenmuster der Kresse-Proben sind mit fortschreitender Entwicklungszeit schwächer (Abb. 25 Spur 3-5), ähnlich wie bei Alfalfa. Bei der Mungbohne lässt sich eine ähnliche Entwicklung beobachten, allerdings erst ab Tag 10 (Abb. 25 Spur 9), wo auch die Banden bei 55 kDa wesentlich schwächer sind als bei Tag 3 und 5. Dies könnte darauf hindeuten, dass nach Tag 5 der Anteil der Tubuline erheblich sinkt. Die Veränderung der Proteinzusammensetzung von Radies (Abb. 25 Spur 11-13) weist Gemeinsamkeiten mit der von Alfalfa und Kresse auf, insofern, dass hier ebenfalls die Proben von Tag 5 und 10 nur wenig differieren.

So ist die Vielfalt der Proteine und vermutlich auch der Proteingehalt im Samen deutlich größer als während der weiteren Entwicklung, in deren Verlauf eine weitere Abnahme zu beobachten ist. Dies könnte wie beschrieben auf den höheren Wasseranteil und den damit verbundenen geringeren Proteinanteil in der Probe zurückzuführen sein. Auch die Überlegung, dass die Pflanze zu Beginn der Keimung einen höheren Bedarf an Proteinen hat, könnte eine Erklärung für die abnehmende Menge und Vielfalt der Proteine sein.

Die Vermutung, dass der Proteingehalt im Keimprozess noch weiter abnimmt, wird durch die Beobachtungen bestärkt, wobei zwischen den Proben von Tag 5 und 10 bereits kaum noch Unterschiede erkennbar sind.

Durch die fehlenden Nullproben sowie die geringe Zahl der Versuche ist es nicht möglich, eine eindeutige Aussage bezüglich der Ausgangshypothese zu treffen. Hier wären weitere Experimente erforderlich.

3.4 Umweltfaktor Wasser

Der Fokus der Arbeit lag darauf, zu untersuchen, wie verschiedene Umweltfaktoren die Proteinzusammensetzung in Pflanzen beeinflussen. Einer dieser Faktoren war die Zufuhr von Wasser, welche im Experiment reduziert wurde. Diese Proben wurden mit den Kontrollproben verglichen.

Wie bereits bei der Untersuchung der zeitlichen Entwicklung beschrieben (s. 3.3), wurde vermutet, dass die Bandenstärke vor allem mit dem Wasseranteil in den Proben zusammenhängt. Da weniger Wasser gegossen wurde, ist möglicherweise weniger

¹⁰ Probe vor Keimung (0 Tage)

Wasser in den Zellen und somit die Proteinkonzentration höher als bei der Kontrolle, welcher mehr Wasser zugeführt wurde.

Phänotypisch konnte bei Alfalfa, Mungbohnen und Radies kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Die Kresse mit weniger Wasser war deutlich langsamer gewachsen als die Kontrolle und die Farbe war dunkler (Abb. 26).

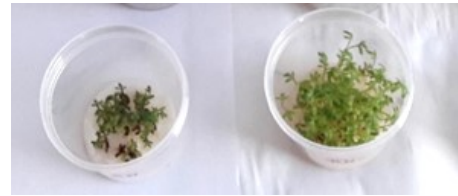


Abb. 26 Kresse wenig Wasser und Kontrolle nach 10 Tagen

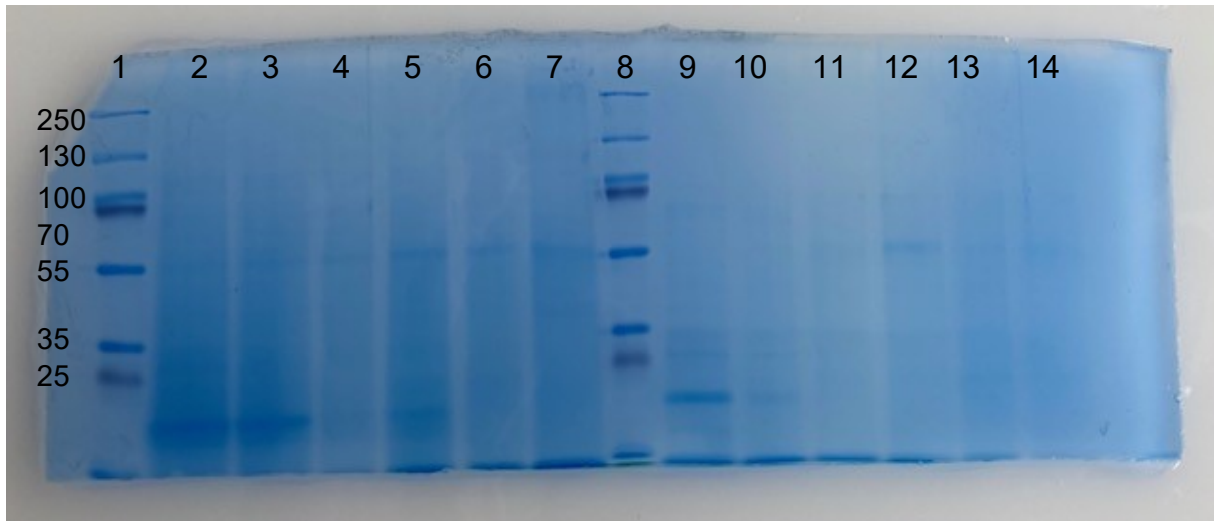


Abb. 27 Gel 3 Umweltfaktor Wasser: Marker (Spur 1, 8), Alfalfa (Kontrolle: Spur 2, 4, 6; reduzierte Menge: Spur 3, 5, 7), Kresse (Kontrolle: Spur 9, 11, 13; reduzierte Menge: Spur 10, 12, 14) nach 3, 5, 10 Tagen

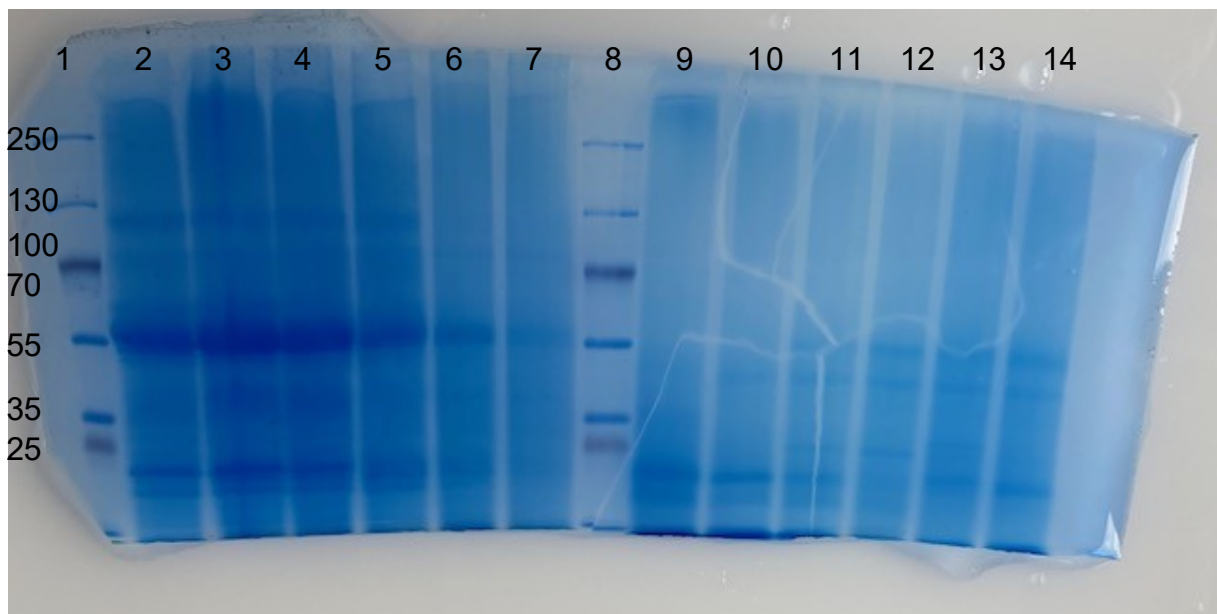


Abb. 28 Gel 4 Umweltfaktor Wasser: Marker (Spur 1, 8), Mungbohnen (Kontrolle: Spur 2, 4, 6; reduzierte Menge: Spur 3, 5, 7), Radies (Kontrolle: Spur 9, 11, 13; reduzierte Menge: Spur 10, 12, 14), nach 3, 5, 10 Tagen

Allgemein sind wenige, minimale Unterschiede zu erkennen. Die Alfalfa-Proben von Tag 3 (Abb. 27 Spur 2, 3) decken sich beinahe, während bei den Proben der anderen Tage (Abb. 27 Spur 4-7) die Intensität der Banden bei geringerer Wasserzufuhr höher ist.

Bei den Mungbohnen von Tag 3 ist dies ebenfalls zu beobachten (Abb. 28 Spur 2, 3). Einen gegenteiligen Effekt kann man bei den Proben von Tag 5 und 10 erkennen (Abb. 28 Spur 4-7). Hier ist die Bandenstärke bei weniger Wasserzufuhr niedriger, wenn auch unwesentlich.

Dies ist auch der Fall bei den Kresse-Proben von Tag 3 (Abb. 27 Spur 9, 10). Bei den anderen Kresse-Proben sind die Banden sehr schwach, sodass ein Vergleich schwierig ist. Wenige Banden sind jedoch sowohl bei der Kontrolle als auch der Probe mit geringerer Wasserzufuhr zu erkennen. An Tag 5 (Abb. 27 Spur 11, 12) ist eine Veränderung wie bei Alfalfa zu sehen, die Proben von Tag 10 (Abb. 27 Spur 13, 14) sind identisch. Ein Zusammenhang ist nicht erkennbar.

Die Proben von Radies (Abb. 28 Spur 9-14) unterschieden sich trotz unterschiedlicher Wasserzufuhr nicht.

Bei allen Pflanzen hatte eine geringerer Wasserzufuhr unterschiedliche Auswirkungen auf die Proteinzusammensetzung; eine allgemeine Aussage, wie eine reduzierte Wassermenge die Proteinausstattung der Pflanzen beeinflusst, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

3.5 Umweltfaktor Salz

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob und inwiefern die Zufuhr von Salz Einfluss auf die Proteinzusammensetzung hat. Die Erwartung war, dass die erhöhte Salzkonzentration die Pflanzen unter Stress setzt und sich negativ auf die Proteinbiosynthese auswirkt, sodass weniger Proteine gebildet werden.

Auf phänotypischer Ebene war bei Alfalfa, Kresse und Radies keine Veränderung zu erkennen. Anders bei den Mungbohnen, bei denen die Stängel und Blätter bei höherer Salzzufuhr sehr viel kleiner waren (Abb. 29).



Abb. 29 Mungbohnen Salz und Kontrolle nach 10 Tagen

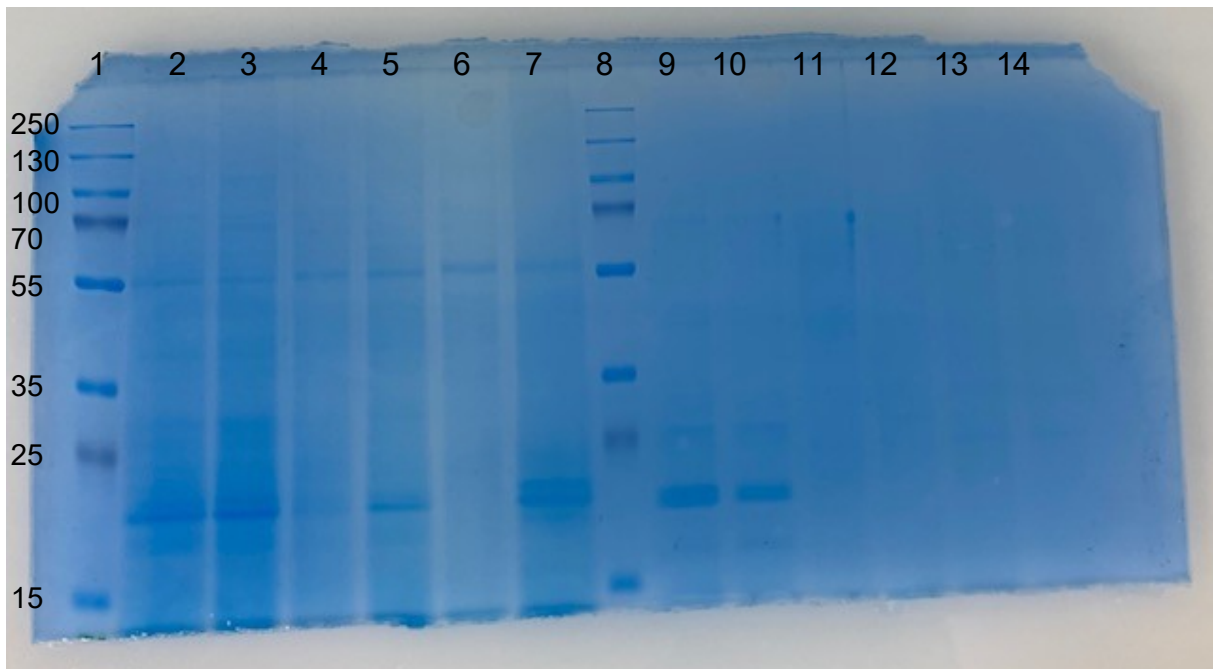


Abb. 30 Gel 5 Umweltfaktor Salz: Marker (Spur 1, 8), Alfalfa Alfalfa (Kontrolle: Spur 2, 4, 6; Salzzugabe: Spur 3, 5, 7), Kresse (Kontrolle: Spur 9, 11, 13; Salzzugabe: Spur 10, 12, 14), nach 0, 3, 5, 10 Tagen

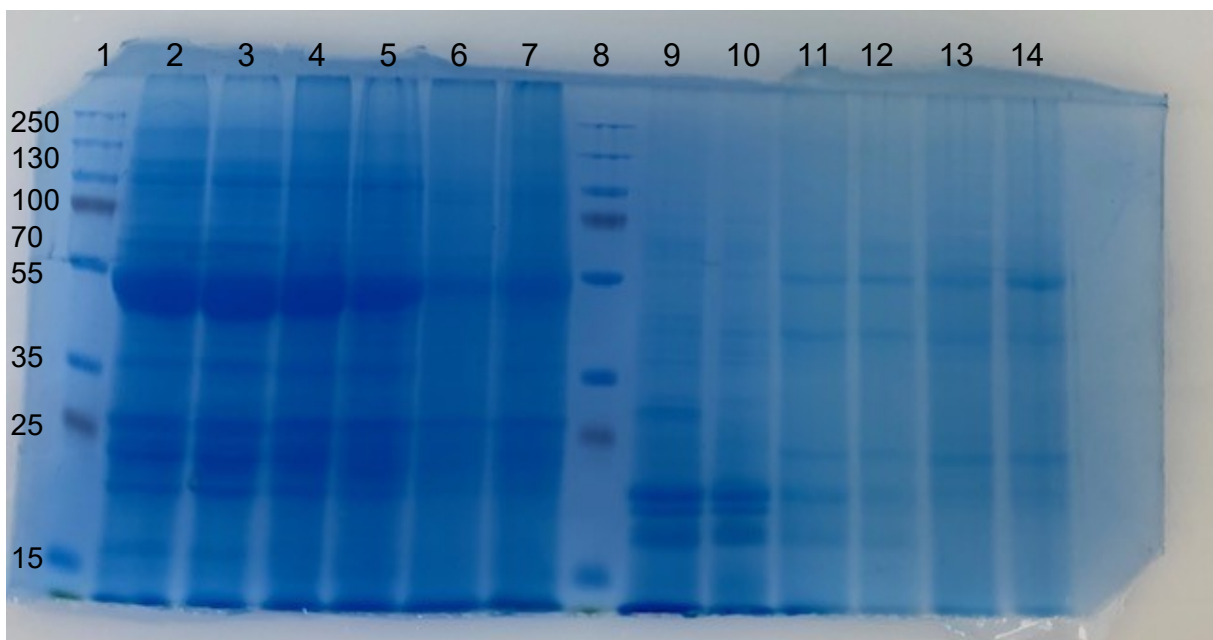


Abb. 31 Gel 6 Umweltfaktor Salz: Marker (Spur 1, 8), Mungbohnen (Kontrolle: Spur 2, 4, 6; Salzzugabe: Spur 3, 5, 7), Radies (Kontrolle: Spur 9, 11, 13; Salzzugabe: Spur 10, 12, 14), nach 0, 3, 5, 10 Tagen

Bei Alfalfa ist nur bei den Proben von Tag 5 und 10 (Abb. 30 Spur 4-7) ein Unterschied zu beobachten; der Protein-Fingerprint von Tag 3 (Abb. 30 Spur 2, 3) ist trotz unterschiedlicher Salzzufuhr nahezu gleich. An Tag 5 und 10 ist der Proteingehalt bei höherem Salzgehalt sogar entgegen der Vermutung höher; auch ist eine andere Proteinzusammensetzung festzustellen als bei der Kontrolle.

Obwohl schon ab dem zweiten Tag normales Leitungswasser gegossen wurde, konnten noch acht Tage später Unterschiede im Protein-Fingerprint festgestellt werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Pflanze durch das Salz mehr Mineralien zugeführt wurden, welche die Bildung von Proteinen begünstigte.

Außerdem ist eine Parallele zu den Proben mit weniger Wasser zu erkennen, welche auch ab Tag 5 einen höheren Proteingehalt aufweisen als die Kontrolle. Eventuell wurde aufgrund des erhöhten Salzgehalts im Gießwasser weniger Wasser von der Pflanze aufgenommen (Osmose), was dann die gleiche Wirkung erzeugte wie eine geringere Wasserzufuhr.

Die Proteingehalte der anderen Pflanzen unterscheiden sich allerdings nicht, was im Falle der Mungbohnen aufgrund des phänotypischen Unterschieds überraschend ist. Bei den Kresse-Proben sind die Proteinbanden generell wenig ausgeprägt (Abb. 31 Spur 9-14).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse können demnach keine Aussagen über die Auswirkungen einer erhöhten Salzzufuhr getroffen werden.

3.6 Umweltfaktor „Standort“

Abschließend wurde getestet, wie ein anderer Standort mit höherer Temperatur und unterschiedlichen Lichtverhältnissen bei jeweils ausreichender Wasserversorgung den Protein-Fingerprint der Pflanzen beeinflusst. Die Hypothese war, dass die Wärme sich fördernd auf die Proteinsynthese und die Entwicklung der Pflanzen auswirkt.

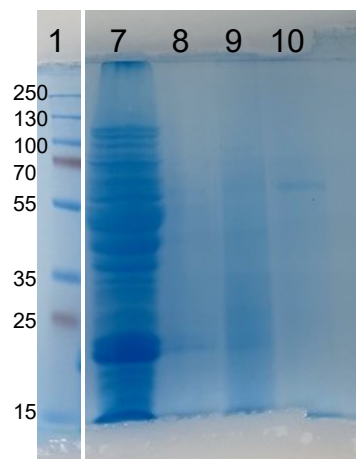


Abb. 32 Gel 8 Umweltfaktor „Standort“: Marker (Spur 1), Alfalfa nach 0, 3, 5, 10 Tagen (Spur 7-10)

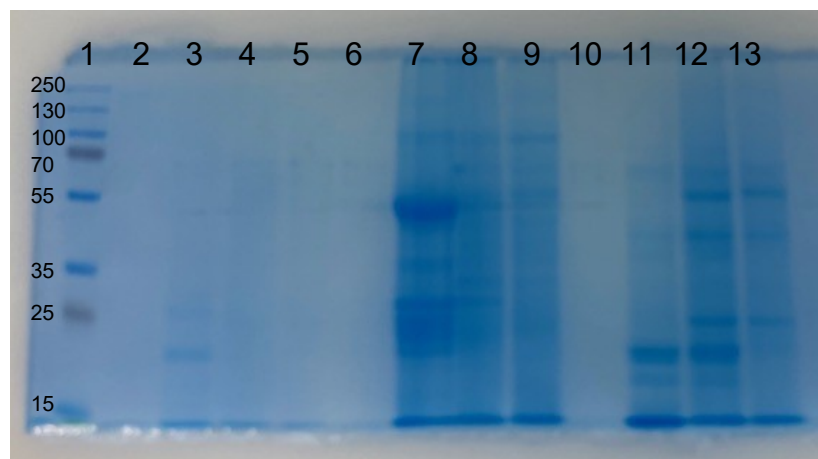


Abb. 33 Gel 7 Umweltfaktor „Standort“: Marker (Spur 1), Kresse (Spur 2-5), Mungbohnen (Spur 6-9), Radies (Spur 10-13), nach 0, 3, 5, 10 Tagen

Tatsächlich wurde diese Annahme auf phänotypischer Ebene bestätigt, mit Ausnahme von Alfalfa. Das Wachstum von Kresse, Mungbohnen und Radies war wesentlich stärker, wenn sie an Standort 4 (Bad) standen.

Beim Proteingehalt verhält es sich dagegen umgekehrt. Die Banden der Proben an Standort 2 bzw. 4 sind deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 32, 33), einige Banden sind nicht zu erkennen.

3.7 Fehlerdiskussion

In den vorgestellten Versuchen wurde pro Pflanze, Zeitpunkt und Bedingung nur eine Probe untersucht. Aufgrund der geringen Stichprobengröße sind demnach keine repräsentativen Aussagen über das Verhalten der Pflanzen möglich. Die gewonnenen Ergebnisse können daher nur erste Hinweise auf mögliche Zusammenhänge liefern.

Die größte Fehlerquelle waren sicherlich die variierenden Bedingungen, unter denen die Pflanzen gewachsen sind. Zwar befanden sich die Pflanzen einer Art, mit Ausnahme der Proben zur Standortuntersuchung, immer am selben Standort (1 bzw. 3), jedoch ist es trotzdem möglich, dass sich im Laufe des Wachstums verschiedene Faktoren wie z. B. Lichteinfall, Temperatur und Luftfeuchtigkeit verändert haben, welche Einfluss auf die Proteine in den Pflanzen gehabt haben könnten. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurden daher immer nur die Proben einer Versuchsreihe (mit Kontrollprobe zum Vergleich) miteinander verglichen wurden.

Für verlässliche Aussagen müssen weitere Untersuchungen folgen, wobei jeweils nur ein zu untersuchender Faktor variiert werden sollte. Dies würde den Einsatz von Klimakammern erforderlich machen, in denen Temperatur, Licht und Feuchtigkeit eingestellt werden können.

Eine weitere bedeutende Fehlerquelle stellt die Menge der untersuchten Proben dar. Da die Proben nicht eingewogen, sondern nur deren ungefähres Volumen abgeschätzt wurde, sind Unterschiede bei der Probenmenge nicht auszuschließen, was zu Unterschieden im Proteingehalt geführt haben kann. Hier wäre es im Weiteren wichtig, dass gleiche Mengen verwendet werden.

Quantitative Aussagen zu Proteingehalt sind zudem anhand der gewählten Methode nicht verlässlich möglich. Hierfür bieten sich andere Methoden an, wie z. B. fotometrische Bestimmungen. die Biuret-Probe¹¹ oder die Proteinbestimmung nach Bradford¹².

Zu erwähnen ist auch die unterschiedliche Einfrierzeit der Proben, die aber mit Blick auf andere Untersuchungen zur Proteinanalyse vernachlässigbar scheint.

¹¹ <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/biuret-reaktion/9021> (entnommen am 08.08.2020)

¹² <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteinbestimmung/54131> (entnommen am 08.08.20)

4. Fazit und Ausblick

Eine Veränderung der Umweltbedingungen scheint Auswirkungen auf den Protein-Fingerprint der untersuchten Pflanzen zu haben. Allerdings waren die beobachteten Unterschiede sehr gering und könnten ihre Ursache z. B. auch in einer unterschiedlichen Probenmenge haben. Da sich der Proteingehalt von Pflanzen, wie aus den Versuchen hervorgeht, durch veränderte Umweltbedingungen beeinflusst wird, ist es sinnvoll, diese sowohl qualitativ als auch quantitativ weiter zu untersuchen.

Dabei wäre es z. B. interessant, zu untersuchen, welchen Einfluss es auf die Proteine hat, wenn man die Salzkonzentration weiter erhöht oder über den gesamten Zeitraum Salz zuführt. Um in weiteren Versuchen Trockenstress zu simulieren, wie er auch in Dürreperioden auftritt, könnte die Wasserzufuhr noch weiter verringert werden. Mit Blick auf die zunehmende Erderwärmung wären insbesondere Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur interessant, sind ohne Klimakammer jedoch kaum realisierbar. Diese wären für alle weiteren Versuchsansätze hilfreich, um kontrollierte Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Das in der Arbeit beschriebene Modell kann als Ausgangspunkt ein Folgeprojekt dienen. Da die Proteinbanden bei Kresse oftmals nur schlecht zu erkennen waren, ist es nicht zu empfehlen, diese Pflanze bei weiteren Versuchen zu verwenden. Stattdessen könnte man mit Weizen oder Soja experimentieren, wobei insbesondere Soja als Proteinlieferant eine hohe Relevanz hat.

Über die Grundlagenforschung hinaus ist zu untersuchen, ob die Ergebnisse auf reale Systeme übertragen werden können. Durch sich ändernde Klimaeinflüsse wird Umweltstress z. B. durch Hitze, Trockenheit oder Versalzung zu einem zunehmenden Problem. Diese Folgen auf Proteinebene zu untersuchen ist nicht nur ein interessantes Thema auf dem Gebiet der Grundlagenforschung, sondern kann darüber hinaus wichtige Hinweise für die Folgen auf die Ernährung des Menschen liefern. Die erlangten Erkenntnisse könnten daraufhin dazu beitragen, geeignete Methoden zu entwickeln, um die Herausforderungen der Nahrungssicherung bewältigen zu können.

5. Danksagung

Wir möchten uns bei allen bedanken, die unsere Arbeit am Projekt unterstützt haben.

In erster Linie gilt unser Dank Dr. Julia Ehlermann, Tanja Kuhn und Kerstin Schönthaler vom Schülerlabor des Fortbildungszentrum Technik und Umwelt (FTU) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), die uns dieses Projekt ermöglicht haben. Für die tatkräftige Unterstützung, besonders als wir unsere Arbeit im Labor aufgrund der Corona-Pandemie nicht fortführen konnten, möchten wir uns herzlich bedanken.

Bei Dr. Hans-Werner und Josephine Hector bedanken wir uns für die langjährige Förderung im Hector-Seminar und die zahlreichen Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten, die wir dadurch erhalten haben.

Schlussendlich danken wir allen Kursleitern, die uns über die Jahre begleitet haben und mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Anke Richert.

6. Quellen

Praktikumsskript des Schülerlabors „Molekularbiologie“ am FTU, KIT (Version 2013-10-23)

Laborjournal KIT Schülerlabor Molekularbiologie

<https://www.chemie.de/lexikon/Coomassie-Gel.html> (entnommen am: 03.07.2020)

<https://de.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE> (entnommen am: 09.07.2020)

<https://www.intas.de/geldokumentation/69-gel-stick-touch> (entnommen am: 12.07.2020)

https://boku.ac.at/fileadmin/data/H03000/H77000/LVA/772112_FA/Elektrophoresebeispiel_2009.pdf (entnommen am: 09.07.2020)

<https://www.biochemie.uni-freiburg.de/en/nat-w/protein-fa.htm> (entnommen am: 09.07.2020)

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A

APS *Ammoniumpersulfat*

B

BPB *Bromphenolblau*

D

DTT *Dithiothreitol*

K

kDa *Kilodalton*

S

SDS *sodium dodecyl sulfate*

T

TEMED *Tetramethylethylendiamin*

V

VE-Wasser *vollentsalztes Wasser*

7.2 Chemikalienverzeichnis

Aufschlusspuffer	120 mM TrisBase (30 mL 1M Tris-HCl pH 6,8) 5 % Glycerin (12,5 ml) 3,3 % SDS (82,5 ml 10%ige SDS-Lösung) Auf 100 ml mit VE-Wasser auffüllen.
300 mM DTT (Dithiothreitol)	1,16 g DTT Auf 25 ml mit Bradfordpuffer (Phosphatpuffer) auffüllen, 600 µl Aliquots abfüllen.
BPB-Färbelösung	Ca. 20 mg Bromphenolblau in 50 ml VE-Wasser lösen.
10 % APS (Ammoniumperoxidsulfat)	1 g Ammoniumperoxidsulfat in 10 ml VE-Wasser lösen und in 500 µl Aliquots abfüllen.
Trenngelpuffer Tris HCl pH 8,8	90,85 g TrisBase 0,8 % SDS (20 ml 10%ige SDS-Lösung) Auf 250 ml mit VE-Wasser auffüllen, mit HCl conc. pH 8,8 einstellen
Sammelgelpuffer Tris HCl pH 6,8	9,5 g TrisBase 0,8 % SDS (20 ml 10%ige SDS-Lösung) Auf 250 ml mit VE-Wasser auffüllen, mit HCl conc. pH 6,8 einstellen (ca. 10 ml)
10x Laufpuffer	1 % SDS (100 ml 10%ige SDS-Lösung) 250 mM Tris (30,3 g TrisBase) 2 M Glycin (144,1 g Glycin) Auf 1000 ml mit VE-Wasser auffüllen und pH prüfen (soll: pH 8,4 – 8,6)
Coomassie-Lösung	0,25 % Brilliant Blue R250 (1,25 g) 45 % Methanol (225 ml) 10 % Essigsäure (50 ml 96%ige Essigsäure) Auf 500 ml mit VE-Wasser auffüllen

7.3 Anleitung Versuchsansätze

Tab. 2 Untersuchungsgefäße

Pflanzenart	Präparation Becher	Unterlage	Deckel
Alfalfa	Löcher im Boden, steht direkt auf Küchentuch	-	fest zugeschraubt, bleibt bis zum Ende auf dem Becher
Kresse	keine Präparation	Watte	-
Mungbohnen	Löcher im Boden, steht in weiterem Becher	-	locker aufgelegt, bis zum Ende, bei Bedarf gegen eine Plastiktüte austauschen
Radies	Löcher im Boden, steht in weiterem Becher	Keimpads	locker aufgelegt, bei Erreichen des Deckels diesen abnehmen

Tab. 3 Versuchsbedingungen

Pflanzenart	Bedingung	Wassermenge (2x täglich)	Standort
Alfalfa	normal	100 ml durchlaufen lassen	1
	Salzgehalt erhöht (10 g/l) beim 1. und 2. Mal Gießen, danach Leitungswasser		
	weniger Wasser	1 TL	
	anderer Standort	100 ml durchlaufen lassen	2
Kresse	normal	1 TL	3
	Salzgehalt erhöht (10 g/l)		
	weniger Wasser	10 Tropfen	
	anderer Standort	1 TL	4
Mungbohnen	normal	100 ml durchlaufen lassen	3
	Salzgehalt erhöht (10 g/l)		
	weniger Wasser	2 TL	
	anderer Standort	100 ml durchlaufen lassen	4
Radies	normal	2 EL	3
	Salzgehalt erhöht (10 g/l)		
	weniger Wasser	1 TL	
	anderer Standort	2 EL	4

7.4 Weitere Dokumentation der Gele

Tab. 4 Plan aufgetragenen Proben auf dem Gel

	Spur 1	Spur 2	Spur 3	Spur 4	Spur 5	Spur 6	Spur 7	Spur 8	Spur 9	Spur 10	Spur 11	Spur 12	Spur 13	Spur 14
1	m	AN5	AN5(a)	AN5(b)	KN5	KN5(a)	KN5(b)	MN5	MN5(a)	MN5(b)	RN5	RN5(a)	RN5(b)	
2	m	K/0	KN3	KN5	KN10	M/0	MN3	MN5	MN10	R/0	RN3	RN5	RN10	
3	m	AN3	AW3	AN5	AW5	AN10	AW10	m	KN3	KW3	KN5	KW5	KN10	KW10
4	m	MN3	MW3	MN5	MW5	MN10	MW10	m	RN3	RW3	RN5	RW5	RN10	RW10
5	m	AN3	AS3	AN5	AS5	AN10	AS10	m	KN3	KS3	KN5	KS5	KN10	KS10
6	m	MN3	MS3	MN5	MS5	MN10	MS10	m	RN3	RS3	RN5	RS5	RN10	RS10
7	m	K/0	KT3	KT5	KT10	M/0	MT3	MT5	MT10	R/0	RT3	RT5	RT10	
8	m	AN0	AN3	AN5	AN10		AT0	AT3	AT5	AT10				

Probe: m = Marker; A = Alfalfa; K = Kresse; M = Mungbohnen; R = Radies
 Faktor: N = normal (Kontrolle); W = weniger Wasser; S = Salz; T = anderer Standort
 Zeitpunkt: 0 = Probe vor Keimung; 3/5/10 = Probe nach 3/5/10 Tagen
 (a)/(b) = jeweils andere Probe unter selben Bedingungen

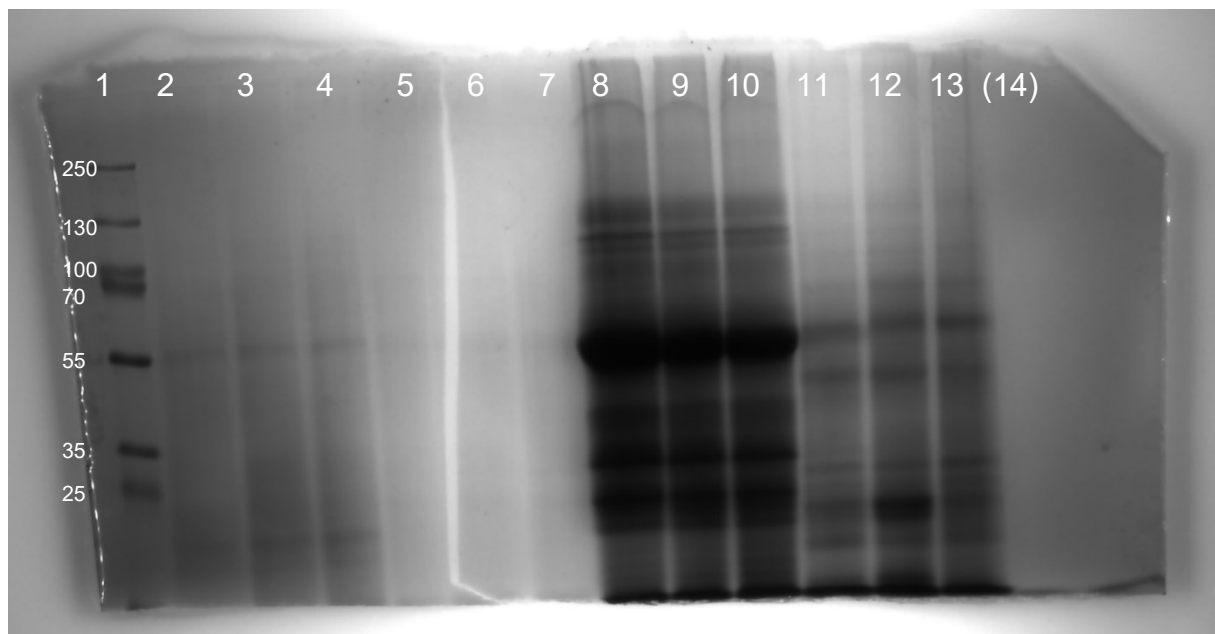


Abb. 34 Gel 1 schwarz-weiß Innerartliche Variation Alfalfa, Kresse, Mungbohnen, Radies (nach 5 Tagen)

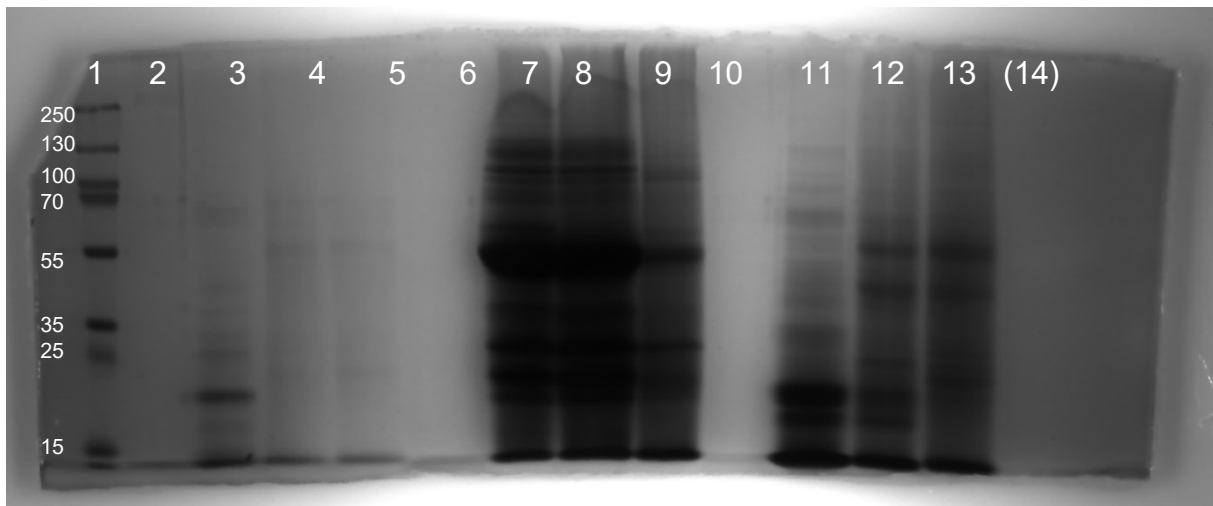


Abb. 35 Gel 2 schwarz-weiß Zeitliche Variation Kresse, Mungbohnen, Radies (nach 0, 3, 5, 10 Tagen)

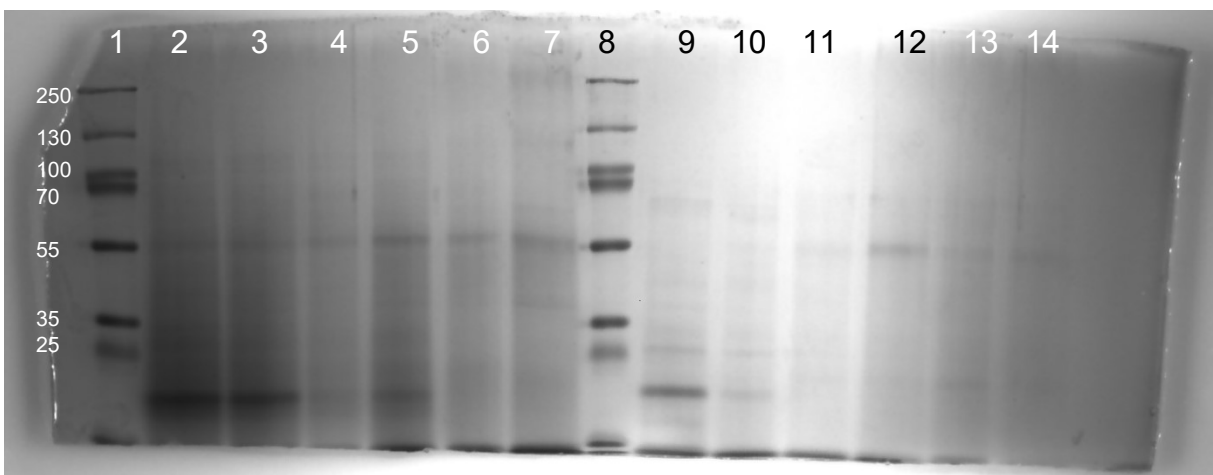


Abb. 36 Gel 3 schwarz-weiß Umweltfaktor Wasser Alfalfa, Kresse (Kontrolle/reduziert nach 3, 5, 10 Tagen)

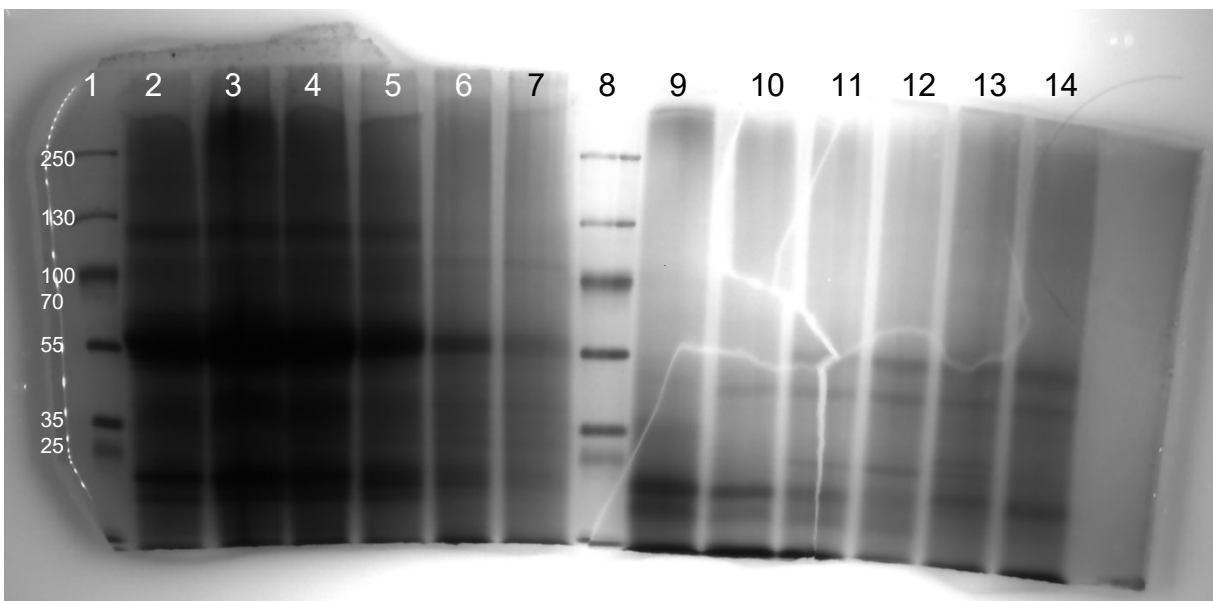


Abb. 37 Gel 4 schwarz-weiß Umweltfaktor Wasser Mungbohnen, Radies (Kontrolle/reduziert nach 3, 5, 10 Tagen)

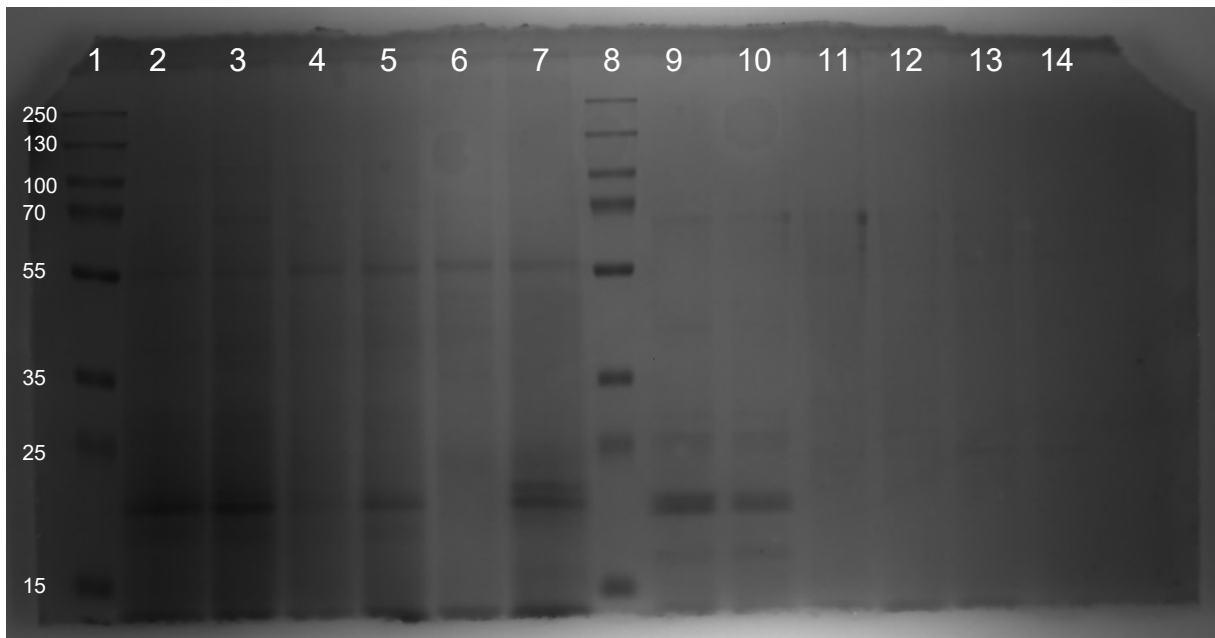


Abb. 38 Gel 5 schwarz-weiß Umweltfaktor Salz Alfalfa, Kresse (Kontrolle/Salz nach 0, 3, 5, 10 Tagen)

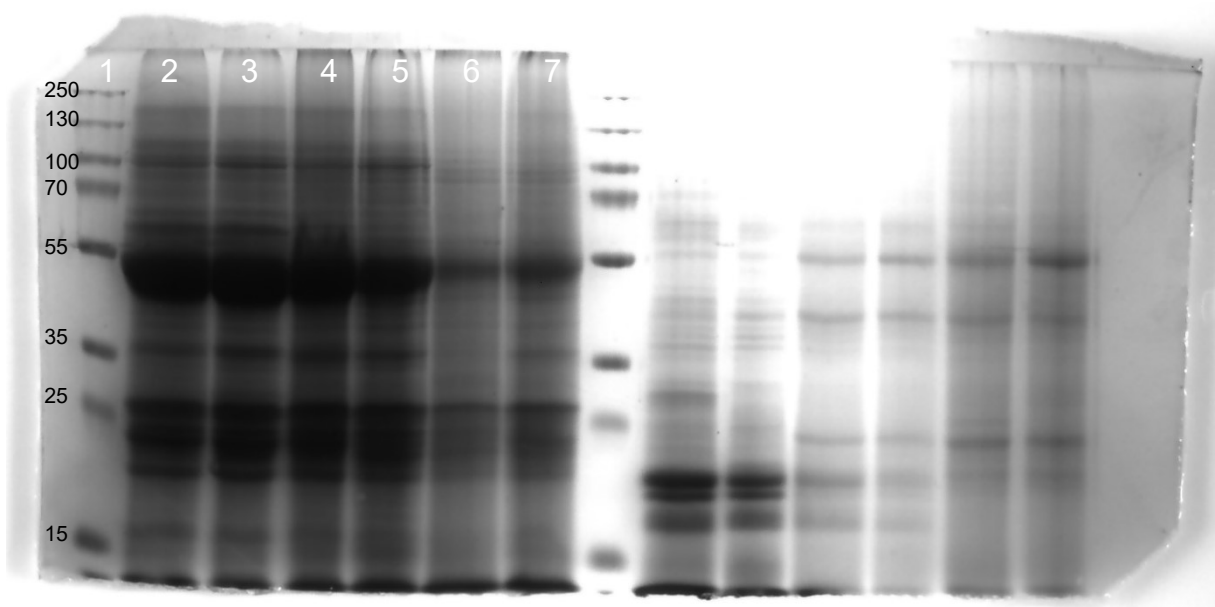


Abb. 39 Gel 6 schwarz-weiß (Belichtung a) Umweltfaktor Salz Mungbohnen, (Radies) (Kontrolle/Salz nach 0, 3, 5, 10 Tagen)

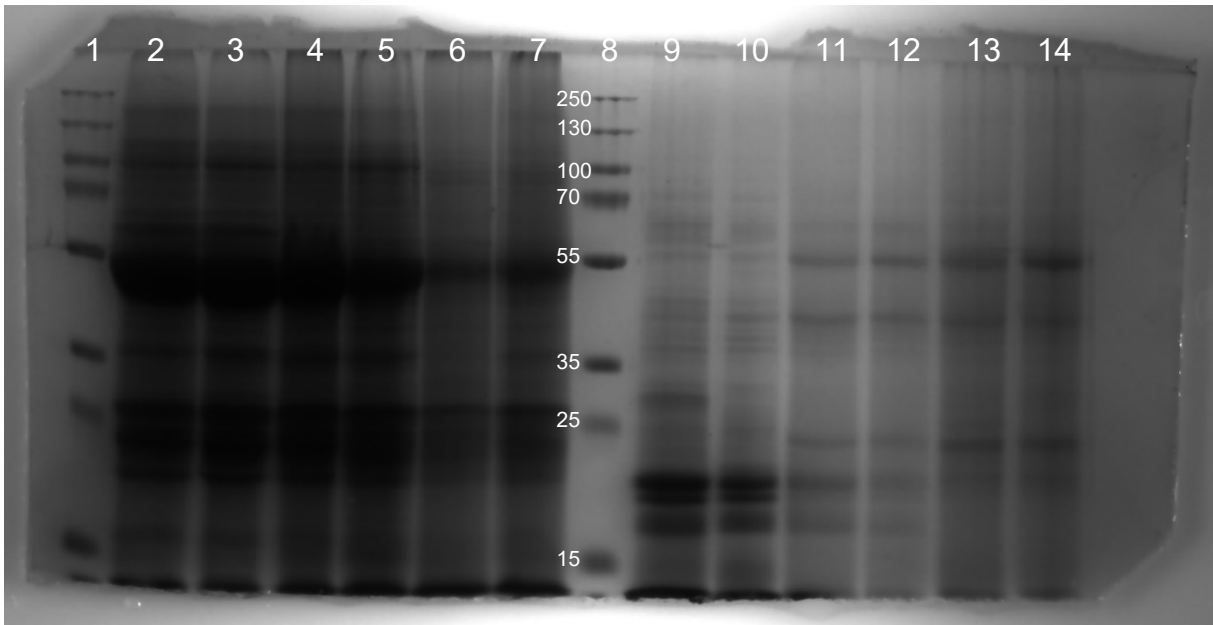


Abb. 40 Gel 6 schwarz-weiß (Belichtung b) Umweltfaktor Salz (Mungbohnen,) Radies (Kontrolle/Salz nach 0, 3, 5, 10 Tagen)

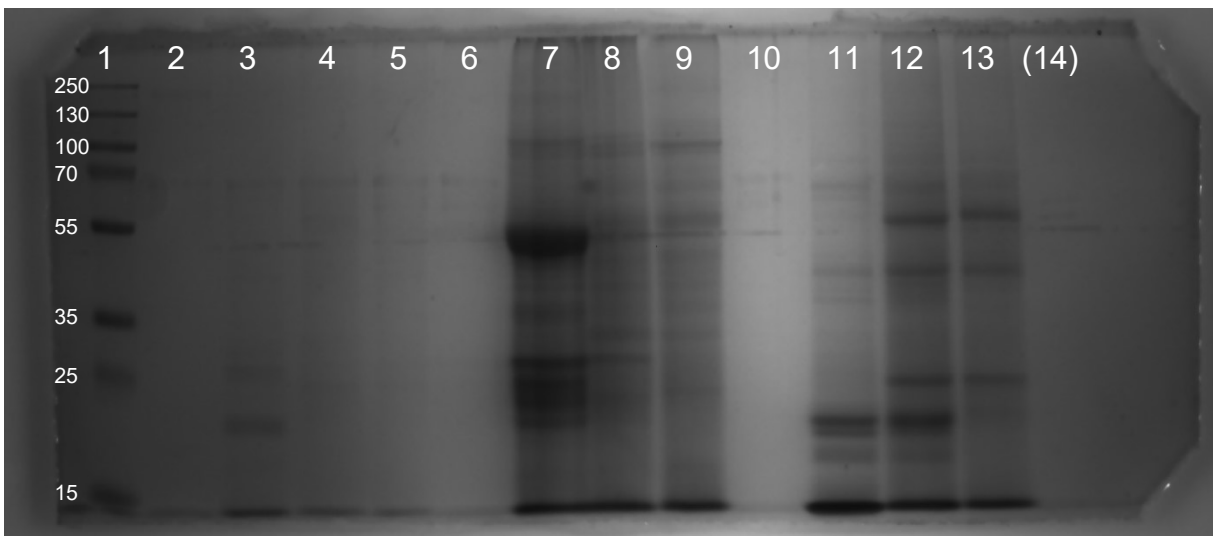


Abb. 41 Gel 7 schwarz-weiß Umweltfaktor „Standort“ Kresse, Mungbohnen, Radies (nach 0, 3, 5, 10 Tagen)

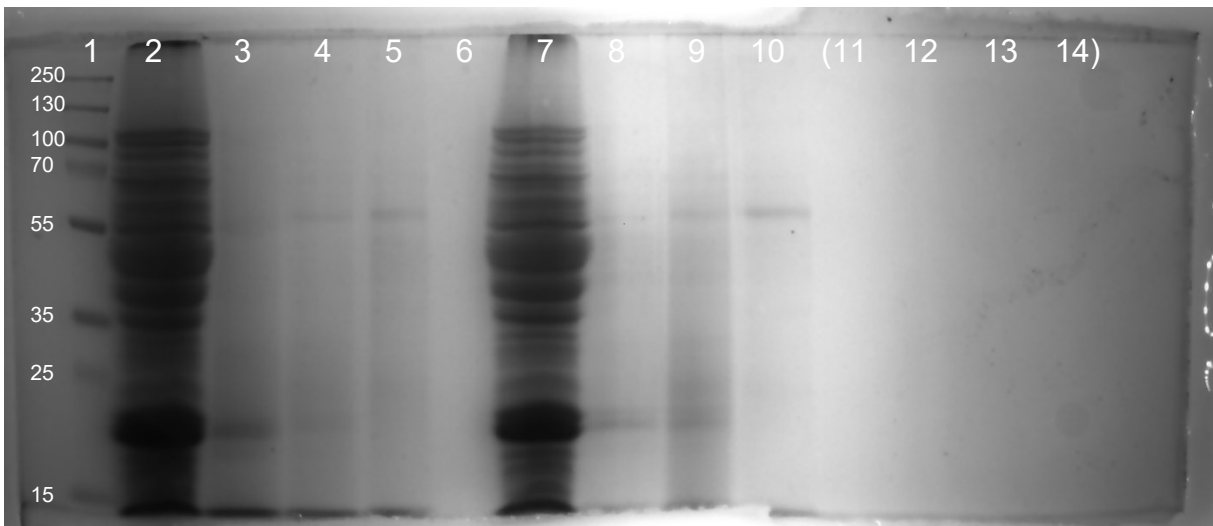


Abb. 42 Gel 8 schwarz-weiß Zeitliche Variation Alfalfa, Umweltfaktor „Standort“ Alfalfa (nach 0, 3, 5, 10 Tagen)

8. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass wir diese Arbeit unter der Beratung durch Dr. Julia Ehlermann, Tanja Kuhn, Kerstin Schönthaler und Anke Richert selbstständig verfasst haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden, sowie Zitate kenntlich gemacht wurden.

Karlsruhe, den

.....

Sania Schmitt

.....

Ina Schmoch