

Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

# **Entwicklung Aluminium-toleranter Sojabohnen: Analyse verschiedener Züchtungsstrategien**

Werner Schenkel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.sc.techn. (ETH Zürich) Urs Schmidhalter

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Dr.rer.nat.habil. Gerhard Wenzel

2. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Dr.rer.nat.habil. Gert Forkmann

Die Dissertation wurde am 27.12.2000 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.05.2001 angenommen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wenzel möchte ich mich dafür bedanken ,daß er mir die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas und zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation gegeben hat. Insbesondere aber dafür, daß er zu **jeder** Zeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand und immer wieder großes Vertrauen in mich gelegt hat.

Herrn Prof. Dr. Forkmann danke ich für seine Bereitschaft, das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Ich danke folgenden Kollegen :

- Herrn Dr. Carlos R. Spehar (CPAC/EMBRAPA) für die freundliche Überlassung von Saatgut, die Unterstützung bei der Erstellung von Kreuzungspopulationen, den offenen Informationsaustausch und nicht zuletzt die freundschaftliche Aufnahme in seinem Haus.
- Herrn Dr. Darman M. Arsyad (BALITKABI/RILET) für freundliche Überlassung von Saatgut und die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung und Betreuung der Feldversuche.
- Herrn Dipl.-Ing. Bruno Kleinsteuber (TÜV Rheinland) für die gute Zusammenarbeit in allen Fragen des Projektmanagements und seinen persönlichen Einsatz.
- Frau Gabi Büschking und Herr Christian Kornbauer für die zuverlässige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.
- Frau Dr. Frei, Herrn Dr. Maidl und Herrn Dr. Sticksel, für ihr Interesse an meiner Arbeit, die Bereitschaft zur Diskussion und den gelegentlichen Ansporn.
- Frau "Ella" Fadliah Salim, Hr. Dr. Budhi Priyanto und Herrn Joko Praytno (alle BPPT) für die Unterstützung bei "Expeditionen" ins indonesische Hinterland.
- Herrn Dr. Ingo Rath für den kurzen Dienstweg.

Für die persönliche Unterstützung danke ich:

- Allen Freunden und Kollegen im Labor, Büro und Feld.
- meinem Freund Ingo... geteiltes Leid ist halbes Leid!

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre Unterstützung und Ihr Verständnis.

Vor allem aber danke ich Heike, für Ihre Geduld, Ihr Vertrauen und die zwei wunderbarsten Kinder dieser Welt.

Meinen Kindern.....für Ihre Liebe.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Sojabohnenanbau in Indonesien	1
1.2	Problematik saurer Mineralböden	3
1.3	Ziele dieser Arbeit	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Berechnung von Ionengleichgewichten	8
2.2	Pflanzenmaterial	9
2.3	Kulturversuche	10
2.3.1	Sandkultur	10
2.3.2	Filterkultur	12
2.3.3	Lösungskultur	13
2.3.4	Feldversuche	15
2.4	Saatgutgewinnung	17
2.5	Rhizosphärenanalysen	21
2.6	Gelfärbemethode	22
2.7	Molekulargenetische Methoden	23
2.7.1	Isolierung genomischer Soja-DNA	23
2.7.2	RFLP-Analyse	24
2.7.3	AFLP-Analyse	24
2.7.4	RAPD-Analyse	28
2.8	Datanalyse	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Diversitätsanalysen	33
3.1.1	Analyse molekularer Marker	33
3.1.2	Multidimensionale Skalierung	36
3.1.3	Hierarchische Clusteranalysen	38
3.1.4	Merkmalskorrelation	46
3.2	Modellierung von Ionengleichgewichten	48
3.3	Kulturversuche	52
3.3.1	Säure-Streß Versuche	52
3.3.2	Aluminium-Streß Versuche	56
3.3.3	Wurzelausscheidungen	77
3.4	Entwicklung und Untersuchung spaltender Populationen	86
3.4.1	Die Population 'Doko RC x Wilis'	87

---

3.4.2	Die Population 'Wilis x B3578'	90
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
4.1	Auswirkung der Aluminiumchemie auf die experimentelle Untersuchung der Al-Toleranz	93
4.1.1	Chemie von Al-Ionen in Lösung	93
4.2	Strategien zur Selektion auf Al-Toleranz	96
4.2.1	Kulturmethode	96
4.2.2	Einfluß des Pflanzenmaterials und der Kulturmethode	98
4.3	Physiologische Grundlagen der Al-Toxizität	102
4.3.1	Zellteilung oder Zellstreckung	102
4.3.2	Symplast oder Apoplast	103
4.3.3	Symplastische Phytotoxizität	103
4.3.4	Apoplastische Phytotoxizität	104
4.3.5	Wechselwirkung mit der Plasmamembran	105
4.4	Mögliche Toleranzmechanismen	106
4.4.1	Ursachen der unterschiedlichen Reaktion auf verschiedene Kulturmethode	108
4.5	Die Entgiftung der Rhizosphäre	111
4.5.1	Ausscheidung organischer Säuren	112
4.6	Diversitätsanalyse	115
4.7	Genetik der Al-Toleranz	118
4.8	Ausblicke zur Entwicklung toleranter Genotypen	121
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>143</b>
7.1	Abbildungs Verzeichnis	143
7.2	Tabellen Verzeichnis	146

# 1 Einleitung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des bilateralen deutsch-indonesisch Forschungsprojektes "BTIG Phase IV", gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung", angefertigt. Ziel des Gesamtprojektes war die Förderung biotechnologischer Forschung und Entwicklung in Deutschland und Indonesien. Die Arbeit an Sojabohnen wurde auf Anregung der indonesischen Projektpartner begonnen. Dieses Teilprojekt (BMFB Nr. 441-108001-36) sollte zur Lösung von Problemen beim Sojaanbau auf sauren Mineralböden beitragen.

## 1.1 Sojabohnenanbau in Indonesien

Indonesien hat in den Jahren 1990-1998 durchschnittlich 1.56 Mt Sojabohnen produziert und stand damit in der Rangfolge der größten Sojaproduzenten der Welt auf Platz acht (FAO, 2000). Im gleichen Zeitraum war das Land jedoch auf den Import von 0.64 Mt Sojabohnen angewiesen, um seinen Bedarf zu decken. Dies entspricht einer Importquote von 29 % und einem Finanzaufwand von ca. 188 Mio. US\$. Der Bedarf an Soja kann nicht gedeckt werden, obwohl ausreichend Landfläche zur Verfügung steht. Der Grund für den Mangel ist daher in der geringen Produktivität des Sojaanbaus zu suchen. Die Erträge lagen in den Jahren 1990-1998 bei durchschnittlich nur 1.2 t/ha, während der Ertrag in den USA bei 2.5 t/ha und in Brasilien bei 2.1 t/ha lag. Indonesien liegt damit in der Rangfolge nach Hektarerträgen, weltweit auf Rang 53. Die geringen Erträge werden durch sozioökonomische, pflanzenbauliche und pflanzenzüchterische Probleme verursacht (SUMARNO UND ADISARWANTO, 1996).

In Indonesien werden in der Landwirtschaft grundsätzlich zwei Anbausysteme unterschieden. Naßreisfelder mit Anstaubewässerung stehen trockenen Böden mit Regenversorgung gegenüber. Soja wird in beiden Systemen auf einem geringen Ertragsniveau produziert.

Die Ursachen für die geringen Erträge im Naßreisystem sind vorwiegend sozioökonomischer Natur. In diesem Anbausystem spielt Reis die absolut dominierende Rolle. Soja wird hier als Sekundär- oder Zwischenfrucht nach zwei Reisernten betrachtet und nur während der Trockenzeit angebaut, solange kein Reisanbau möglich ist (ADISARWANTO UND SUNARLIM, 1996). Eine hohe Produktivität von Soja spielt eine untergeordnete Rolle. Dementsprechend gering ist der Aufwand an Arbeit und Pflanzenschutz, welcher in den Sojaanbau investiert wird. Die Nährstoffversorgung auf diesen Böden ist im allgemeinen gut und würde höhere Erträge ermöglichen. Problematisch ist teilweise die Verschlammungsgefahr im Keimlingsstadium, sowie tiefe Rißbildung bei Trockenheit, welche zu Wurzelschäden führen kann. Dieses Produktionssystem für Soja dominiert auf der dicht besiedelten und intensiv

landwirtschaftlich genutzten Hauptinsel Java. Hier werden 56 % der indonesischen Sojaproduktion erwirtschaftet (s. Tabelle 1). Das Entwicklungspotential ist jedoch begrenzt, da eine Verdrängung des Reisanbaus zugunsten von Soja nicht angestrebt wird.

**Tabelle 1: Anteile saurer Böden (pH < 5.5) an der nutzbaren Landfläche in den Indonesischen Provinzen nach RADJAGUKGUK (1983) DARMAN (1996).**

<i>Provinz</i>	<i>Nutzbare Landfläche in 1000 ha</i>	<i>Saure Böden in 1000 ha</i>	<i>Anteil saurer Böden in %</i>	<i>Anteil an Sojaproduktion in %</i>
Java und Madura	13219	3100	24	56
Sumatera	47363	20713	44	26
Kalimantan	54000	15465	29	1
Sulawesi	19094	3937	21	7
Maluku und Irian Jaya	49675	11799	24	1
Nusatenggara	7593	563	7	9
Indonesien gesamt:	190944	55597	29	100

Im sogenannten "upland" Anbausystem, also Feldern ohne Anstaubewässerung, sind die geringen Sojaerträge umwelt- und produktionstechnisch bedingt. Unter dieser Bewirtschaftungsmethode sind die Böden weit weniger anthropogen beeinflusst als die Naßreis-Böden. Große Flächen, insbesondere außerhalb der Hauptinsel Java, werden erst seit wenigen Jahren bis Jahrzehnten landwirtschaftlich genutzt. Diese Böden sind meist stark ausgewaschen und weisen pH-Werte zwischen pH 4 und pH 5.5 auf. In Tabelle 1 sind die Flächen und Anteile saurer Böden, sowie die Sojaproduktion in verschiedenen indonesischen Provinzen dargestellt. Insgesamt wird der Anteil saurer Böden in Indonesien auf knapp 30 % geschätzt. Die Sojaproduktion erfolgt neben Java hauptsächlich auf Sumatera. Mittelfristig bietet Sumatera das größte Potential zur Erhöhung der Sojaproduktion, da die anderen großen Provinzen Kalimantan (Insel Borneo) und Irian Jaya (Insel Neu Guinea) kaum entwickelt und noch weitgehend von Regenwald bedeckt sind. In Sumatera ist jedoch 44 % der nutzbaren Landfläche von

sauren Mineralböden bedeckt, wodurch das Ertragspotential für Sojabohnen massiv beeinträchtigt wird.

Diese Betrachtungen zeigen, daß der Sojaanbau auf sauren Mineralböden in Indonesien, insbesondere auf Sumatera, ein zentrales Problem bei der Erhöhung der Sojaproduktion darstellt. Die Optimierung des Sojaanbaus auf diesen Böden stellt damit eine entscheidende Hürde für die Selbstversorgung Indonesiens mit Sojabohnen dar.

## 1.2 Problematik saurer Mineralböden

Die Problematik saurer Mineralböden ist nicht auf Indonesien beschränkt. Es wird geschätzt, daß etwa 30 % der nicht von Eis bedeckten Landoberfläche der Erde von sauren Böden bedeckt ist (VON UEXKÜLL UND MUTERT, 1995). Die Verbreitung saurer Böden konzentriert sich auf zwei große geographische Regionen in den gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre und in einem breiten Gürtel der Tropen. Die nördlichen Gebiete werden fast ausschließlich forstwirtschaftlich genutzt. In den Tropen werden die Regenwälder und Savannen, welche ursprünglich die sauren Böden bedeckten, zunehmend durch eine landwirtschaftliche Nutzung verdrängt.

Die Unfruchtbarkeit saurer Böden wird durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst. Der niedrige pH-Wert stellt bereits einen Streßfaktor dar. Wichtiger ist jedoch, daß sich die Verfügbarkeit vieler Ionen bei sinkendem pH-Wert ändert (WILKINSON, 1994). Als wichtigster Faktor der Phytotoxizität saurer Böden gilt der erhöhte Gehalt an Aluminium (Al) in der Bodenlösung (KOCHIAN, 1995, und darin enthaltene Zitate). In mineralischer Form gebunden, liegt Al in praktisch jedem Boden vor, ist jedoch nicht toxisch für Pflanzen. Erst mit sinkendem pH-Wert geht Al in Lösung und wird damit verfügbar und potentiell phytotoxisch (RITCHIE, 1995). Neben Al kann es auch zu einem toxischen Überangebot von Mangan- und Eisenionen kommen. Im Gegensatz dazu, herrscht in solchen, stark verwitterten Mineralböden häufig ein Mangel an den mobilen Basen Calcium, Magnesium und Kalium sowie Molybdän (SPEHAR, 1994b). Meist ist auch ein massiver Phosphatmangel zu beobachten. Die geringen Mengen an Phosphat werden zudem von Eisen- und Aluminiumionen gebunden und sind damit nicht mehr pflanzenverfügbar.

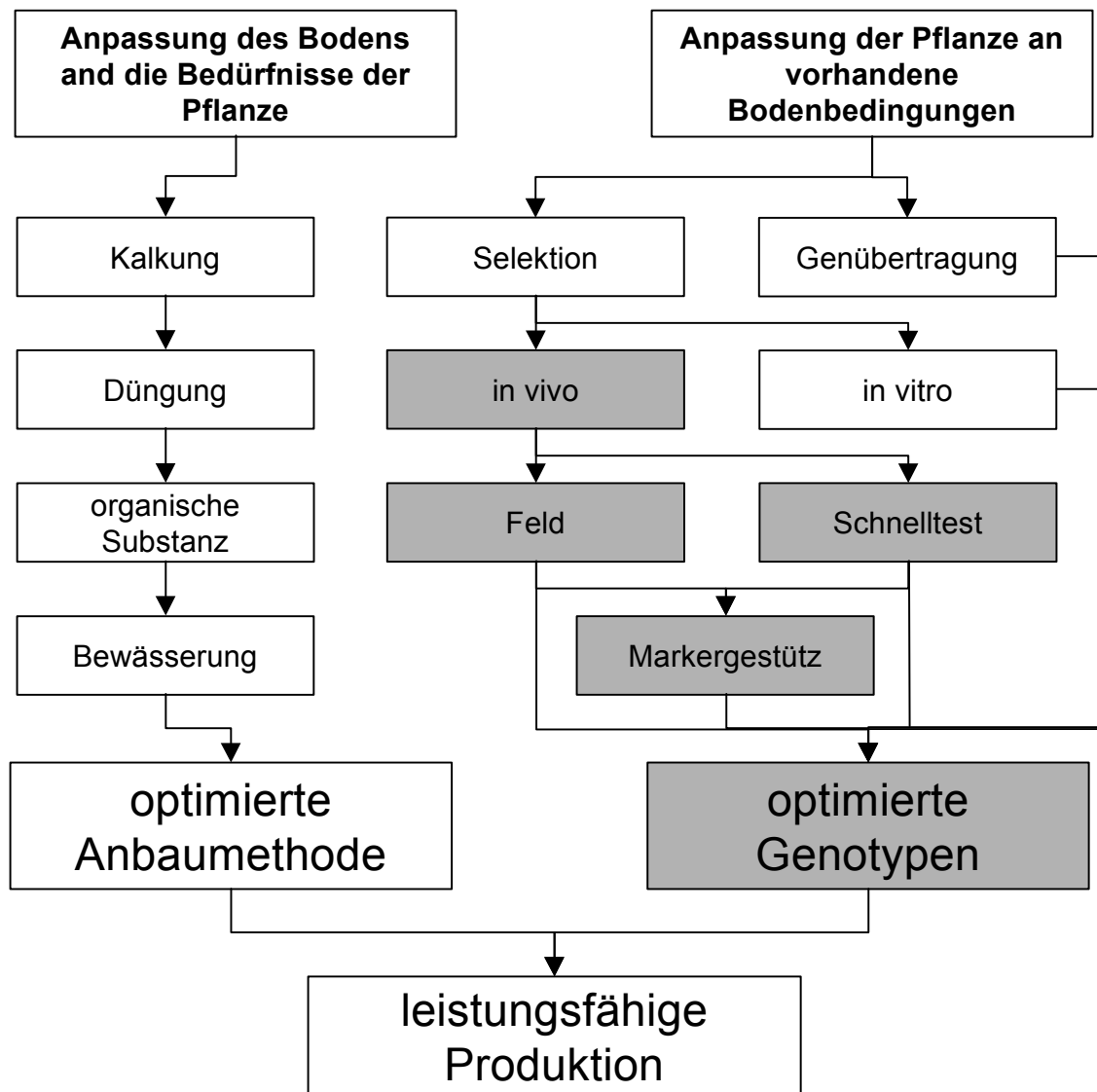
Zur Erhöhung der Produktivität saurer Böden stehen grundsätzlich zwei Strategien zur Verfügung (s. Abbildung 1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Es kann entweder der Boden an die Bedürfnisse der Kulturpflanzen angepaßt werden, oder es können Pflanzen entwickelt werden, welche die vorhandenen Bodenbedingungen tolerieren.

Die wichtigste und effektivste Maßnahme zur Bodenverbesserung ist meist die Applikation von Kalk. Damit wird der pH-Wert des Bodens angehoben und zugleich eine Versorgung mit Calcium (z.T. Magnesium) sicher gestellt. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes über pH 5-5,5, wird die Verfügbarkeit von toxischen Aluminium- und



Manganionen stark reduziert. Alleine durch diese Maßnahme lassen sich je nach Boden und Fruchtart die Erträge z.T. vervielfachen (FOY, 1992; RADJAGUKGUK, 1983).

Der Nachteil der Kalkung besteht darin, daß die Mobilität von Kalk sehr gering ist und daher die Wirkung auf die Bearbeitungstiefe beschränkt bleibt. Dies reicht jedoch häufig nicht aus, da die Pflanzen tiefere Bodenschichten, insbesondere bei Al-Toxizität, nicht durchwurzeln können. Damit stehen Nährstoffe und Wasser tieferer Schichten nicht zur Verfügung, was bereits bei kurzen Trockenperioden zu Wasserstreß führen kann. Als Ergänzung oder Alternative zu Kalk kann auch Gips (Calciumsulfat) eingesetzt werden, da dieser eine höhere Mobilität aufweist und so auch tiefere Schichten erreicht (SUMNER, 1993). Gips hat jedoch nur eine geringe pH-Wirkung und reduziert Al-Toxizität daher nur durch eine Verschiebung des Al:Ca -Verhältnisses.



**Abbildung 1: Lösungsansätze für den Anbau von Soja auf sauren Böden. Die Aufgabenbereiche dieser Arbeit sind grau hervorgehoben**

Wenn die Al-Toxizität erfolgreich behoben wurde, tritt meist die sehr geringe Phosphatverfügbarkeit als ertraglimitierender Faktor in den Vordergrund. Um hohe Erträge zu erzielen, muß in diesen Böden daher eine "Phosphat-Aufbaudüngung" erfolgen (EDWARDS, 1991). Wegen der hohen P-Fixierung im Boden, sind teilweise mehrere hundert Kilogramm  $P_2O_5$  pro Hektar nötig, um ein ertragswirksames Phosphatniveau zu erreichen (MAIDL, 1996). Zur Stabilisierung des Bodens und Erhöhung der Kationenaustauschkapazität sollte durch geeignete Managementmaßnahmen die organische Substanz im Boden stabilisiert und möglichst erhöht werden.

Obwohl die genannten Maßnahmen zur Bodenverbesserung effektiv und zum Teil unverzichtbar sind, können sie alleine die Problematik saurer Böden nicht lösen. Insbesondere in der kleinstrukturierten Landwirtschaft Indonesiens stehen Investitionen, Kenntnisse und Mechanisierung für ein optimales Management saurer Böden meist nicht zur Verfügung (SUMARNO UND ADISARWANTO, 1996). Die nötigen Mengen an Kalk und Phosphat sind von der weit überwiegenden Mehrheit indonesischer Farmen nicht finanzierbar. Selbst wenn Kalk zur Verfügung gestellt wird, mangelt es an den Kenntnissen für einen effektiven Einsatz und der Mechanisierung für die Einarbeitung. Wegen flacher Einarbeitung von Hand und schlechter Bodendurchmischung, sind die Erfolge der Kalkung oft gering. Im Gegensatz zu Kalk steht Phosphat den meisten indonesischen Farmen zur Verfügung und wird auch genutzt. Die nötige Aufbaudüngung kann jedoch, wegen der geringen Aufwandmengen, viele Jahre in Anspruch nehmen.

Vor diesem Hintergrund bietet sich die züchterische Anpassung der Pflanzen an den Boden als erfolgversprechende Strategie zur Überwindung der Probleme saurer Böden an. Al-Toxizität als wichtigster ertraglimitierende Faktor (KOCHIAN, 1995), ist einer züchterischen Bearbeitung zugänglich. Auch Böden mit hohem Gehalt an freiem Aluminium weisen Pflanzenbewuchs auf. Es gibt also eine Reihe von Pflanzenarten, die hohe Al-Gehalte in der Bodenlösung tolerieren. Schon sehr früh wurde bei Weizen, Gerste und Sojabohne auch eine sortenspezifische Ausprägung der Al-Toleranz in saurem Boden beobachtet (ARMIGER ET AL., 1968; FOY ET AL., 1965). Daraus konnte geschlossen werden, daß Al-Toleranz eine genetisch bedingte Eigenschaft ist und Al-tolerante Genotypen entwickelt werden können.

### 1.3 Ziele dieser Arbeit

Für die Entwicklung Al-toleranter Sojasorten sind verschiedene Strategien denkbar (s. Abbildung 1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Einerseits können Al-tolerante Genotypen selektiert werden, oder Toleranzgene auf biotechnologischem Weg übertragen werden. Die Selektion kann theoretisch *in vivo* oder *in vitro* erfolgen. Bei der *in vitro* Kultur sollen auf Basis der somaklonalen Variation Al-tolerante Zelllinien selektiert werden. Die Selektion an ganzen Pflanzen kann entweder direkt im Feld, auf sauren Böden, oder durch verschiedene Schnelltests im Gewächshaus oder Labor durchgeführt werden. Nach einer Korrelation von

Phänotyp und Genotyp, kann die Selektion möglicherweise durch die Entwicklung molekularer Marker für Al-Toleranz effektiver gestaltet werden.

Diese Strategien sollen zur Entwicklung Al-toleranter Sojasorten führen, welche unter optimierten Anbaubedingungen eine leistungsfähige Sojaproduktion auf sauren Mineralböden Indonesiens ermöglichen.

Das eingangs erwähnte bilaterale Forschungsprojekt hatte das Ziel Al-tolerante Sojasorten für den Anbau auf sauren Mineralböden Indonesiens zu entwickeln. Hierzu sollten vorwiegend die Möglichkeiten biotechnologischer Methoden genutzt werden. Verschiedene Projektteile beschäftigten sich mit der *in vitro*-Selektion (RATH, 2000) und Regeneration Al-toleranter Sojazelllinien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener Züchtungsstrategien zur Entwicklung Al-toleranter Sojasorten. Der Schwerpunkt wurde dabei auf eine gezielte Kreuzungszüchtung mit anschließender *in vivo*- und markergestützter Selektion gelegt.

Für eine effektive Kreuzungszüchtung sind zwei entscheidende Voraussetzungen nötig. Erstens, muß eine ausreichende genetische Variabilität im Bezug auf die gewünschte Eigenschaft vorhanden sein, oder durch die Nutzung geeigneter Genressourcen geschaffen werden. Als zweite Voraussetzung, muß die einfache und genaue Erfassung des Phänotyps möglich sein, um den gesuchten Genotypen effektiv selektieren zu können. In dieser Arbeit sollen grundlegende Informationen über beide Voraussetzungen, im Bezug auf die Entwicklung Al-toleranter Sojasorten in Indonesien, gewonnen werden.

Durch eine Analyse der genetischen Diversität, werden Informationen über die Variabilität innerhalb eines indonesischen Sortenspektrums und in Bezug zu internationalen Sojasorten gewonnen. Die Korrelation der Ergebnisse der Diversitätsanalyse mit phänotypischen Daten, ermöglicht die Identifikation von Genpools mit erhöhter Al-Toleranz. Diese können als Quellen für die Einkreuzung von Al-Toleranzgenen in den indonesischen Genpool dienen. Weiterhin dient die Diversitätsanalyse der Vorbereitung einer Markerentwicklung. Die Ergebnisse erlauben die Auswahl von Kreuzungseltern für spaltende Populationen mit einem hohen Polymorphiegrad für die genutzten genetischen Marker. Hierdurch wird eine spätere genetische Kartierung der Eigenschaft wesentlich erleichtert.

In einer Reihe von Kulturversuchen sollten verschiedene Methoden für eine phänotypische Charakterisierung der Al-Toleranz untersucht werden und ihre Eignung zur Selektion Al-toleranter Genotypen geprüft werden. Als Referenz für die Beurteilung von Gewächshaustests, sollten Feldversuche vor Ort dienen. Diese Tests dienen auch der Identifikation von Sojasorten, welche für die Züchtung Al-toleranter Sorten in Indonesien genutzt werden können. Zur Vorbereitung einer Kopplung genetischer Marker, sollten Kreuzungseltern mit möglichst unterschiedlicher Al-Toleranz identifiziert werden, um Populationen mit deutlich spaltenden phänotypischen Merkmalen entwickeln zu können. Weiterhin wurde geprüft, ob verschiedene Testmethoden Einblicke in die physiologischen Grundlagen der Al-Toleranz ermöglichen.

Hierdurch sollte die Eigenschaft "Al-Toleranz" nach Möglichkeit in verschiedene Teilaspekte aufgespalten werden, um die Korrelation einzelner Loci zu erleichtern.

Um den Weg für eine markergestützte Selektion zu öffnen, sollten Kreuzungspopulationen entwickelt werden, welche die Korrelation phänotypischer Merkmale mit molekularen Markern ermöglicht. Aufbauend auf die Ergebnisse der Diversitätsanalyse und der Erfassung der Al-Toleranz im untersuchten Sortenspektrum sollten Populationen entwickelt werden, welche hohe Variabilität in Bezug auf die Toleranz gegenüber hohen Al-Konzentrationen im Kulturmedium aufweisen. Mit Hilfe dieser Population sollten Informationen über den Vererbungsmodus der Al-Toleranz in Soja gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Berechnung von Ionengleichgewichten

Die Berechnung von Ionengleichgewichten in verdünnten Lösungen wurde mit den Programmen MINTEQA2 / PRODEFA2 durchgeführt (ALLISON ET AL., 1991). MINTEQA2 ist ein Modell, welches der Berechnung chemischer Gleichgewichte zwischen gelösten, adsorbierten, festen und gasförmigen Phasen unter vorgegebenen Umweltbedingungen dient. Das Programm PRODEFA2 ermöglicht das Erstellen der von MINTEQA2 benötigten Eingabedateien. Beide Programme greifen auf eine umfangreiche Bank zuverlässiger thermodynamischer Daten zu. Zusätzliche thermodynamische Daten für die Reaktionen zwischen Aluminium und Citrat / Malat wurden von NORDSTROM UND MAY (1996), GERKE (1997); und JACKSON (1982) übernommen.

**Tabelle 2: Gleichgewichtskonstanten verschiedener Aluminiumionenspezies in verdünnter wässriger Lösung**

<i>Reaktion</i>	<i>log K</i>
$\text{Al}^{3+} + \text{OH}^- \Rightarrow \text{AlOH}^{2+}$	5.0
$\text{Al}^{3+} + 2 \text{OH}^- \Rightarrow \text{Al}(\text{OH})_2^+$	10.1
$\text{Al}^{3+} + 3 \text{OH}^- \Rightarrow \text{Al}(\text{OH})_3$	16.8
$\text{Al}^{3+} + 4 \text{OH}^- \Rightarrow \text{Al}(\text{OH})_4^-$	23.0
$\text{Al}^{3+} + \text{SO}_4^{2-} \Rightarrow \text{Al}(\text{SO}_4)^+$	3.5
$\text{Al}^{3+} + 2 \text{SO}_4^{2-} \Rightarrow \text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$	5.0
$\text{Al}^{3+} + \text{Citrat}^{3-} \Rightarrow \text{AlCitrat}$	8.8
$\text{Al}^{3+} + 2 \text{Citrat}^{3-} \Rightarrow \text{AlCitrat}_2^{3-}$	13.0
$\text{Al}^{3+} + \text{Hcitrat}^{2-} \Rightarrow \text{AlHCitrat}^+$	6.6
$\text{Al}^{3+} + \text{H}_2\text{Citrat}^- \Rightarrow \text{AlH}_2\text{Citrat}^+$	2.9
$\text{Al}^{3+} + \text{Citrat}^{3-} + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{AlOHCitrat}^- + \text{H}^+$	4.6
$\text{Al}^{3+} + 2 \text{Citrat}^{3-} + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{AlOH}(\text{Citrat}_2)^{4-} + \text{H}^+$	8.8
$\text{Al}^{3+} + 2 \text{Citrat}^{3-} \Rightarrow \text{Al}(\text{Citrat})_2^{3-}$	13.0
$\text{Al}^{3+} + \text{Malat}^{2-} \Rightarrow \text{AlMalat}^+$	5.3
$\text{Al}^{3+} + 2 \text{Malat}^{2-} \Rightarrow \text{AlMalat}_2^-$	9.3

Die, in die Datenbank aufgenommenen Gleichgewichtskonstanten sind in Tabelle 2 dargestellt. Für alle Modellrechnungen wurden Gleichgewichtsbedingungen vorausgesetzt und von einem fixierten pH-Wert ausgegangen, sowie eine Präzipitation von Feststoffen ausgeschlossen. Diese vereinfachenden Annahmen können für Nährlösungen, nicht aber für reale Böden gerechtfertigt werden.

## 2.2 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Untersuchung wurden 48 Genbankakzessionen, Sorten und Zuchtlinien der Sojabohne aus verschiedenen Anbauländern analysiert (s Tabelle 3). Die Auswahl erfolgte im Hinblick auf die Erzielung einer möglichst hohen genetischen Diversität, sowie auf Informationen über die Al-Toleranz der entsprechenden Sorte. Es wurden 4 europäische Sorten in die Kollektion aufgenommen. 10 indonesische Sorten sowie 3 Zuchtlinien wurden auf Wunsch indonesischer Partnerinstitute untersucht und von diesen zur Verfügung gestellt. Für einige dieser Sorten lagen bereits Informationen über den Anbau auf sauren Böden vor. Eine, in Indonesien weit verbreitete Sorte 'Wilis' wurde aus zwei verschiedenen Quellen bezogen. Die Genotypen erhielten in dieser Arbeit die Bezeichnung 'Wilis' und 'Wilis2'. Weitere 7 brasilianische Sorten wurden von Dr. Spehar (Cerrados Agrarforschungs Zentrum CPAC EMBRAPA; Planaltina Brasilien) zur Verfügung gestellt. Von der Genbank am „Internationalen Institut für tropische Landwirtschaft“ (IITA) in Nigeria konnten 5 Linien als Repräsentanten des afrikanischen Genpools bezogen werden.

Einen großen Anteil an der Genotypenkollektion mit 11 Sorten erhielten US-amerikanische Sorten, da in den USA, geschichtlich gesehen, die meiste Züchtungsarbeit geleistet wurde. Diese Sorten wurden in Untersuchungen von SAPRA ET AL. (1982), HORST UND KLOTZ (1990) sowie CAMPBELL UND CARTER (1990) bereits auf ihre Al-Toleranz hin untersucht. Neben den US-amerikanischen Sorten konnte von der Genbank des USDA (United States Department of Agriculture) weitere 5 Linien bezogen werden, welche in der Literatur Erwähnung fanden (BIANCHI-HALL ET AL., 1998; CAMPBELL UND CARTER, 1990; HORST UND KLOTZ, 1990). Saatgut aus den verschiedenen Quellen wies starke Unterschiede in der Saatgutqualität, in Hinblick auf Keimfähigkeit und Keimkraft auf. Diese Tatsache hatte einen deutlichen Einfluß auf die Versuchsdurchführung und Auswertung.

**Tabelle 3: Liste der untersuchten Sorten**

<i>Genbank (USDA)</i>	<i>Europa</i>	<i>Indonesien</i>	<i>USA</i>	<i>Brasilien</i>	<i>Nigeria (IITA)</i>
PI159322	Kalmit	Tampomas	Jogun	Cristalina	Samsoy 2
PI416937	Dorado	Malabar	Norchief	IAC-9	M-351
PI417021	Jutro	Tambora	Hawkeye	Savanna	TGX-536-02D
PI381674	Labrador	Kerinci	Perry	Doko RC	TGX-1448-2E
PI81042	Major	Wilis	Kent	IAC-17	TGX-923-2E
	Picador	Wilis2	Maple Arrow		
	Goldor	Lumut	Gasoy-17		
		Genjah jepang	Forrest		
		Sindoro	Essex		
		Slamet	Missoy		
		No. 3577	Biloxi		
		No. 3578			
		No. 3911			

## 2.3 Kulturversuche

### 2.3.1 Sandkultur

Für Langzeitstudien zur Aluminium- und pH-Toleranz sollten verschiedene Genotypen in einem bodenähnlichem Substrat kultiviert werden. Um die chemischen Bedingungen im Wurzelbereich kontrollieren zu können, wurde reiner Quarzsand als chemisch inertes Substrat gewählt. Zur Nährstoffversorgung und zur Simulierung der Streßfaktoren wurde das Substrat mit entsprechenden Nährlösungen getränkt. Die Versuchsvarianten für zwei Versuche sind in Tabelle 4 dargestellt. In den pH-Versuchen war die Al-Konzentration konstant bei 0  $\mu$ M Al, während in den Al-Versuchen der pH-Wert konstant pH 4.3 war. Der Quarzsand hatte eine Körnung von 0,3 -1 mm, was ein leichtes Auspülen der Wurzel am Versuchsende erlaubt. Der Sand wurde durch mehrfaches Spülen mit 0,5 % HCl und anschließendem Spülen mit demineralisiertem Wasser (= VE-Wasser) vorbereitet. Als Pflanzgefäße dienten 4 l Polyethylentöpfe, wobei jeweils 98 Töpfe im Abstand von 5 cm auf einem Tisch plaziert wurden. Mit einer Tröpfchenbewässerungsanlage konnten alle Töpfe eines Tisches mit Nährlösung aus einem 200 l Vorratsfaß versorgt werden. Die Anlage wurde automatisch so

gesteuert, daß die Töpfe dreimal täglich mit mindestens doppeltem Volumen ihrer Wasserkapazität durchspült wurden. Die, aus den Töpfen ablaufende Lösung wurde aufgefangen und in die Vorratsfässer zurückgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden die Töpfe kontinuierlich mit den entsprechenden Nährlösungen durchspült. Dabei wurde 3-4 mal täglich der pH-Wert auf den Sollwert korrigiert, bis der Wert über mindestens 3 Messperioden konstant blieb. Anschließend wurde die Nährlösung erneuert und der Versuch gestartet. Während des Versuchs wurde der pH-Wert der Nährlösungen zweimal täglich gemessen und, wenn nötig, mit HCl korrigiert. Eine Erhöhung des pH-Wertes war nie nötig. Zweimal pro Woche wurden die Lösungen in den Vorratsbehältern erneuert.

Die Keimung der Sojabohnen wurde direkt im Sandsubstrat durchgeführt. Je Topf wurden 4 Bohnen eines Genotyps ausgelegt und nach ca. 1 Woche die beiden kleineren mit Wurzeln entfernt.

Die Versuchsanlage erfolgte als unregelmäßiges Lateinisches Rechteck mit 14 Sorten in 7 Wiederholungen (Töpfen). Die Anordnung wurde in allen Versuchsvarianten in gleicher Form wiederholt. Die Versuchsvarianten können aus Tabelle 4 entnommen werden. Es wurden die 'BR-40', 'BR86-9508', 'Cristalina', 'Doko RC', 'IAC 17', 'Jutro', 'Kador', 'Kalmit', 'Kerinci', 'Malabar', 'Savanna', 'Tambora', 'Tampomas', 'Wilis' getestet. Die Sorten 'Savanna', 'Jutro' und 'Kador' wurden von der Versuchsauswertung ausgeschlossen, da sie eine zu geringe Keimfähigkeit bzw. schwache Keimlingsvitalität zeigten.

**Tabelle 4: Varianten der Sandkulturversuche**

<i>Versuche</i>	<i>Varianten 1</i>	<i>Varianten 2</i>	<i>Varianten 3</i>	<i>Varianten 4</i>	<i>Varianten 5</i>
pH-Versuch	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0	pH 3,0
Al- Versuch	0 µM Al	200 µM Al	600 µM Al	1000 µM Al	1400 µM Al

### Datenerhebung

Die Kulturdauer der Sandkulturversuche betrug 33 Tage. Die Trennung in oberirdische und unterirdische Biomasse erfolgte unmittelbar an der Substratoberfläche. Die Wurzeln wurden aus den Töpfen ausgespült, vollständig von Quarzsand befreit und nach Trocknung bei 80 °C über 48 Stunden die Spross- und Wurzelrockenmasse je Topf bestimmt. Als Maß für die Toleranz wurden die Messgrößen auf den Mittelwert der jeweiligen Sorte in der Nullvariante (pH 7, bzw. 0 µM Al) bezogen. Die Beurteilung des Säureeffektes erfolgte bei den pH-Versuchen über alle Sorten gemittelt.



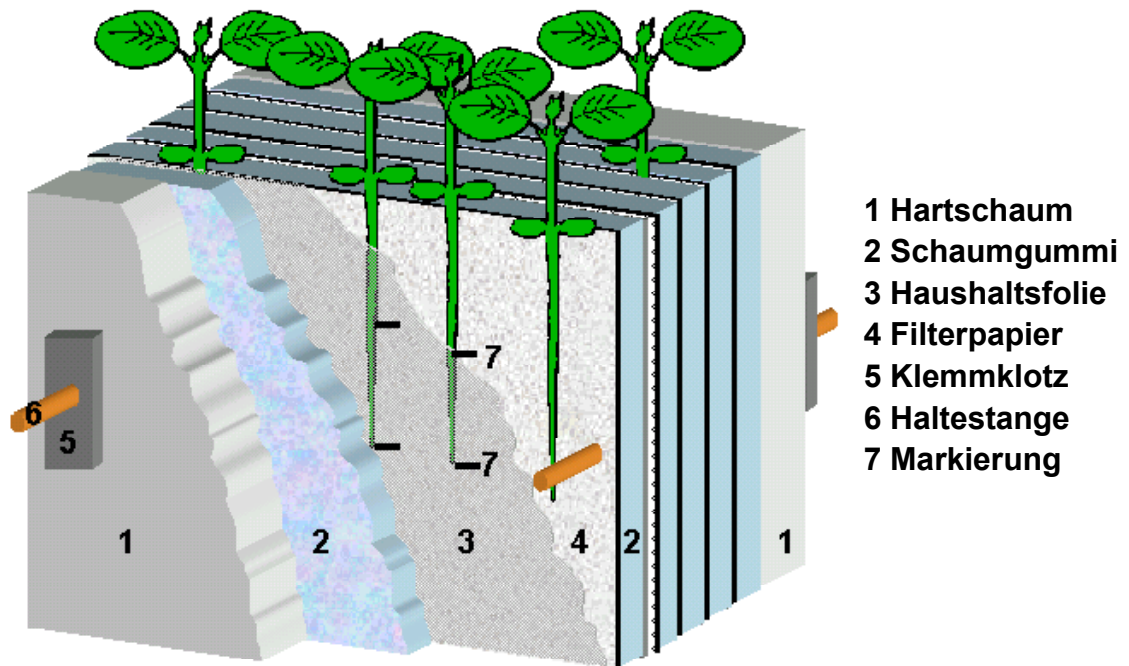
## Nährlösung

Die Nährlösung bestand aus 500  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ , 500  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 250  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{NaMoO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , gelöst in VE-Wasser. Vor der Zugabe von Aluminiumchlorid mußte der pH-Wert auf pH 4.8 abgesenkt werden, um eine Präzipitation von Aluminiumhydroxiden zu verhindern.

### 2.3.2 Filterkultur

Um das Wurzelwachstum in einem festen Medium verfolgen zu können ohne dabei Manipulationen an der Wurzel vornehmen zu müssen, wurde eine Apparatur entwickelt, welche die Kultur und Beobachtung vieler Keimlingswurzeln erlaubt. Die gleiche Anordnung konnte auch zum Ankeimen von Sojabohnen für andere Versuche genutzt werden.

Die Keimapparatur besteht aus einem Stapel von Schaumgummimatten mit den Maßen 20 x 35 x 1 cm welcher durch Hartschaumplatten an beiden Enden und Haltestangen zusammen gehalten wird (s. Abbildung 2). Auf diese Weise können die Schaumgummimatten in vertikaler Position gehalten und ein leichter Druck auf den Stapel ausgeübt werden. Zum Ankeimen von Sojabohnen werden jeweils zwischen zwei Lagen Schaumgummi zwei Filterpapiere mit den Maßen 20 x 30 cm positioniert. Die Bohnen werden von oben in ca. 2 cm Tiefe zwischen die Filterpapiere geschoben. Daraufhin wird der ganze Stapel in eine Wanne gestellt, welche ca. 2 cm hoch mit Lösung befüllt wird. Durch die Filterpapiere ist eine konstante Wasserversorgung sichergestellt, während die Sauerstoffversorgung durch die Schaumgummimatten, welche zwar offenporig sind aber kein Wasser aufsaugen, gewährleistet wird. Im Gegensatz zur Keimung auf horizontalen Filterpapieren, entwickeln sich in dieser Keimapparatur gerade gewachsene Wurzeln. Mit diesem Aufbau können Sojabohnen unter reproduzierbaren Bedingungen mehrere Tage kultiviert werden. Auf einer Grundfläche von ca. 35 x 35 cm können bis zu 300 Keimlinge kultiviert werden.



**Abbildung 2: Apparatur zur Kultivierung von Keimlingen auf vertikalen Filterpapieren.**

Zur Simulation verschiedener Bodenparameter werden die Filter mit Nährlösungen entsprechender Zusammensetzung getränkt. Die Inkubation der Filter in Nährlösung vor Versuchsbeginn betrug drei Tage. Dabei wurde die Lösung täglich gewechselt, um eventuelle Bindungsstellen für Ionen in den Filtern abzusättigen.

Während der Versuchsphase wurde einer der Filter durch eine Haushaltsfolie ersetzt. Trotz dieser Maßnahme ist eine ausreichende Wasser und Sauerstoffversorgung für normales Wachstum gewährleistet. Der Stapel kann vorsichtig umgeschichtet werden und dabei die Wurzeln jeder Lage beobachtet und markiert werden. Die jeweilige Position der Wurzelspitzen wurde mit einem wasserfesten Folienstift auf der Haushaltsfolie markiert. Auf diese Weise konnte das Wurzelwachstum über mehrere Tage exakt verfolgt und dokumentiert werden, ohne dabei Manipulationen an Wurzeln vornehmen zu müssen. Zur leichteren Handhabung und Dokumentation wurden die Folien vor der Auswertung auf Papier kopiert. Die Markierung der Wurzelspitze erfolgte im Abstand von 24 h über drei Tage.

### 2.3.3 Lösungskultur

Lösungskulturversuche wurden in schwarzen Polyethyleneimern durchgeführt. Die Eimer waren mit Hartschaumplatten abgedeckt, in welche 34 Löcher mit 1 cm Durchmesser gebohrt waren. Die Luftversorgung jedes Eimers erfolgte individuell über einen Ausströmerstein. Sojabohnen wurden in Filterpapieren vorgekeimt, bis die Keimlinge ein Wurzellänge von 3-5 cm aufwiesen und anschließend das Hypokotyl der Keimling mit Schaumgummi umwickelt und je ein Keimling in die Löcher plaziert.

Zu Versuchsbeginn wurden die Hauptwurzeln der Keimlinge 1 cm hinter der Wurzelspitze mit einem Faserschreiber markiert. Tests hatten gezeigt, daß die Markierung ausreichend wasserfest war und die Wurzel ungehindert weiterwachsen, wenn sie nicht mechanisch beschädigt wurden. Durch diese Methode konnte der Zuwachs genauer ermittelt werden als bei einer Messung der Gesamtwurzel ab dem Hypokotyl. Darüber hinaus beschränkte sich die Messung auf die Elongationszone, welche von Aluminium primär geschädigt wird.

Der Zuwachs der Hauptwurzel wurde mit einem Lineal bestimmt. Während der Messung mußte die Wurzeln regelmäßig mit Wasser übersprüht werden, um Schäden durch Austrocknung zu verhindern. Die Messungen erfolgten über 3 Tage im Abstand von 24 h.

Wegen der Versuchsgröße war es nicht möglich einen Messzeitraum von exakt 24 h einzuhalten. Abweichungen von 1-1.5 h können, bei einem maximalen Wurzelwachstum bis zu 2.5 mm/h, die Messwerte der Wurzellänge deutlich beeinflussen. Daher wurde für die Versuchsauswertung, bei allen Filter- und Lösungskulturversuchen, der Parameter Wurzelwachstum (mm/h) anstelle der Wurzellänge (mm) herangezogen.

Um den Einfluß der Keimlingsvitalität zu minimieren, wurde das Wurzelwachstum unter Al-Streß auf das Wachstum der jeweiligen Sorte ohne Al bezogen. Da bei den Säurestreßversuchen in Filter- und Lösungskultur auf ein pH 7.0 Variante verzichtet wurde, mußte in diesem Fall das absolute Wurzelwachstum betrachtet werden.

### **Lösungen für Filter- und Lösungskultur**

Die Nährlösung für Filter- und Lösungskulturversuche bestand aus 50 mM  $\text{KNO}_3$ , 25 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$  gelöst in VE-Wasser. Bei der Zusammensetzung der Nährlösung konnte auf alle Mikronährstoffe verzichtet werden. Diese Maßnahme läßt sich dadurch rechtfertigen, daß der maximale Versuchszeitraum 3 Tage betrug und die Nährstoffversorgung noch durch die Kotyledonen unterstützt wurde.

Für Al-haltige Versuchsvarianten wurde der pH-Wert der Lösung zuerst auf pH 4.8 abgesenkt, dann eine entsprechende Menge Al-Stammlösung zugegeben und der pH-Wert auf 4,3 eingestellt. Die Messung und Korrektur des pH-Werts erfolgte zweimal täglich. Bei der Filterkultur erfolgte die Messung in der überschüssigen Lösung in den Wannen. Es traten nie Abweichungen von mehr als 0,2 pH-Einheiten auf. Die vereinzelte Überprüfung des pH-Wertes der Filter mit Indikatorpapier zeigte ebenfalls keine deutliche Abweichungen. Die Versuchsvarianten der Filter- und Lösungskulturversuche sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Varianten der Lösungs- und Filterversuche**

Versuche	Varianten 1	Varianten 2	Varianten 3	Varianten 4
pH-Versuch Filter/Lösung	pH 4,6	pH 4,3	pH 4,0	
Al-Versuch Lösung	0 $\mu\text{M}$ Al	5 $\mu\text{M}$ Al	20 $\mu\text{M}$ Al	80 $\mu\text{M}$ Al
Al-Versuch 1. Filter	0 $\mu\text{M}$ Al	500 $\mu\text{M}$ Al	1000 $\mu\text{M}$ Al	1500 $\mu\text{M}$ Al
Al-Versuch 2. Filter	0 $\mu\text{M}$ Al	750 $\mu\text{M}$ Al		

### 2.3.4 Feldversuche

Um die Kurzzeitversuche mit den realen Bedingungen im Feldanbau auf saurem Boden vergleichen zu können, wurden Feldversuche in Indonesien angelegt. Die beiden Versuchsstandorte Sitiung (Sitiung Experimental Farm) und Lampung (Tamanbogo Experimental Farm) mit sauren Böden liegen in Zentral- bzw. Südsumatra (s. Abbildung 3). Als Referenz mit neutralem Boden diente der Standort Malang (Jambede Experimental Farm) in Westjava.



**Abbildung 3: Lage der Standorte der Feldversuche Sitiung, Lampung und Malang in Indonesien**

Boden und Klimadaten der Standorte sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Versuchsanlage erfolgte als randomisierte Blockanlage mit 4 Wiederholungen. Die Parzellen hatten eine Fläche von 2 m x 3.5 m. Die Pflanzweite war 40 cm x 15 cm mit je zwei bis drei Körnern pro Saatloch. Die Aussaat erfolgt von Hand mit einem Stock, es muß also von einer ungleichmässigen Tiefenablage ausgegangen werden. Die Düngung wurde ortsüblich mit 50 kg Harnstoff, 75 kg Superphosphat (36% P) und 60 kg KCl zu Versuchsbeginn durchgeführt. Die Unkrautkontrolle erfolgte durch zweimaliges Hacken per Hand. Die Insektenkontrolle sollte nach Bedarf mit den Insektiziden "Decis", "Matador" und "Thiodan" durchgeführt werden.

**Tabelle 6: Boden und Klimadaten der Versuchsstandorte Malang, Lampung und Sitiung.**

	<i>Malang</i>	<i>Lampung</i>	<i>Sitiung</i>
Textur:			
Sand %	16	51	44
Schluff %	28	13	11
Ton %	56	36	45
<b>Bodenchemie:</b>			
pH <sub>(H<sub>2</sub>O)</sub>	6.8	3.9	4.2
pH <sub>(KCl)</sub>	5.7	3.6	3.8
C %	1.9	1.04	1.35
N %	0.52	0.11	0.12
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (ppm)(Bray 1)	26.8	84.2	35.6
Ca (me/100 g)	6.49	0.52	1.33
Mg (me/100 g)	3.43	0.17	0.52
K (me/100 g)	0.96	0.08	0.09
CEC (me/100 g)	12.95	4.84	6.38
Basensättigung %	84	16	28
Al (me/100 g)	0.00	1.28	0.98

	<i>Malang</i>	<i>Lampung</i>	<i>Sitiung</i>
<b>Klima:</b>			
Niederschlag/Jahr mm	2030	2280	2620
Durchschnitts- temperatur °C	27	26	27
Durchschnitts- luftfeuchte %	84	86	79

## 2.4 Saatgutgewinnung

Zur Saatgutvermehrung und Entwicklung von Inzuchtpopulationen wurden Sojapflanzen in Töpfen im Gewächshaus kultiviert. Je 4 l Rechtecktopf wurden bis zu 3 Pflanzen kultiviert. Die Wasserversorgung erfolgte über eine automatische Sprühanlage. Durch den Sprühnebel, welcher sich von oben auf die Pflanzen legte, wurde effektiv einem Befall von Spinnmilben vorgebeugt. Falls nötig wurde eine Bekämpfung von Spinnmilben erfolgreich mit der Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* durchgeführt. Sonstige Krankheiten oder Schädlinge waren nie bekämpfungswürdig. Während der Blütezeit wurde die Beregnung von oben eingestellt.

Insbesondere die tropischen Sorten verhalten sich sensitiv gegenüber der Tageslänge. Als Kurztagspflanzen zeigten diese Sorten bei Tageslängen über 12 h ein starkes vegetatives Wachstum, ohne Blütenansatz. Durch Abdecken der Pflanzen mit lichtdichten Folien, wurde die Tageslänge auf 11 h reduziert, wodurch der Blütenansatz induziert werden konnte. Bei dieser Methode besteht das Problem, daß unter der Abdeckung eine sehr hohe Luftfeuchte und Temperatur entstehen. Hierdurch kommt es leicht zu Befall mit unspezifischen Fäulniseregen. Als beste Kulturmethode hat sich, die Ausnutzung natürlicher Tageslängen bewährt. Hierzu muß die Aussaat Ende Juli bis Anfang August erfolgen. Die Pflanzen haben dann die Möglichkeit die Jugendentwicklung unter guten Lichtverhältnissen während der Sommermonate zu durchlaufen. Ende September herrschen natürliche Kurztagsbedingungen, die Pflanzen setzen Blüten an und können die relativ guten frühherbstlichen Lichtbedingungen zur Hülsenfüllung nutzen. Zur Abreife während der Wintermonate muß dann starke künstliche Beleuchtung gewährt werden, um eine Etiolierung der Pflanzen und ungünstige Samenreife zu verhindern. Mit dieser Kulturmethode können über 200 Körner je Pflanze geerntet werden.

Selbst unter dieser Kulturmethode ist die künstliche Hybridisierung im Gewächshaus extrem schwierig. Sobald die Umweltbedingungen nicht vollständig den Anforderungen der Pflanzen genügen, findet die Selbstbefruchtung bereits in der geschlossenen Knospe

statt. Die Blütenknospen haben in diesem Stadium eine Größe von nur etwa 3x2x2 mm. Häufig entfalten sich die Petalen nicht und es setzt direkt die Hülsenbildung ein. Bei schlechter Pflanzenbeobachtung kann so der Blütenansatz unbemerkt bleiben, bis bereits Hülsen erkennbar werden. Mit etwas Übung können jedoch die Knospen rechtzeitig erkannt und vor der Selbstbefruchtung erfolgreich emaskuliert werden (FEHR, 1980). Selbst in diesem Fall ist die Hybridisierung problematisch, da der Pollen in den Knospen offensichtlich nur sehr kurze Zeit befruchtungsfähig ist. Trotz umfangreicher Versuche konnten nur vereinzelt F1-Hybriden im Gewächshaus erzeugt werden. Die Kreuzung der Eltern 'Doko RC' und 'Wilis' für die unten dargestellte Population wurde während eines Gastaufenthaltes am Cerrado Agrarforschungszentrum (CPAC) des EMRAPA in Planaltina Brasilien, unter geeigneten Klimabedingungen durchgeführt. Die zweite untersuchte Population 'Wilis x B3578' wurde in Indonesien von Projektpartnern unter optimalen Wachstumsbedingungen erstellt.

### **Vegetative Vermehrung**

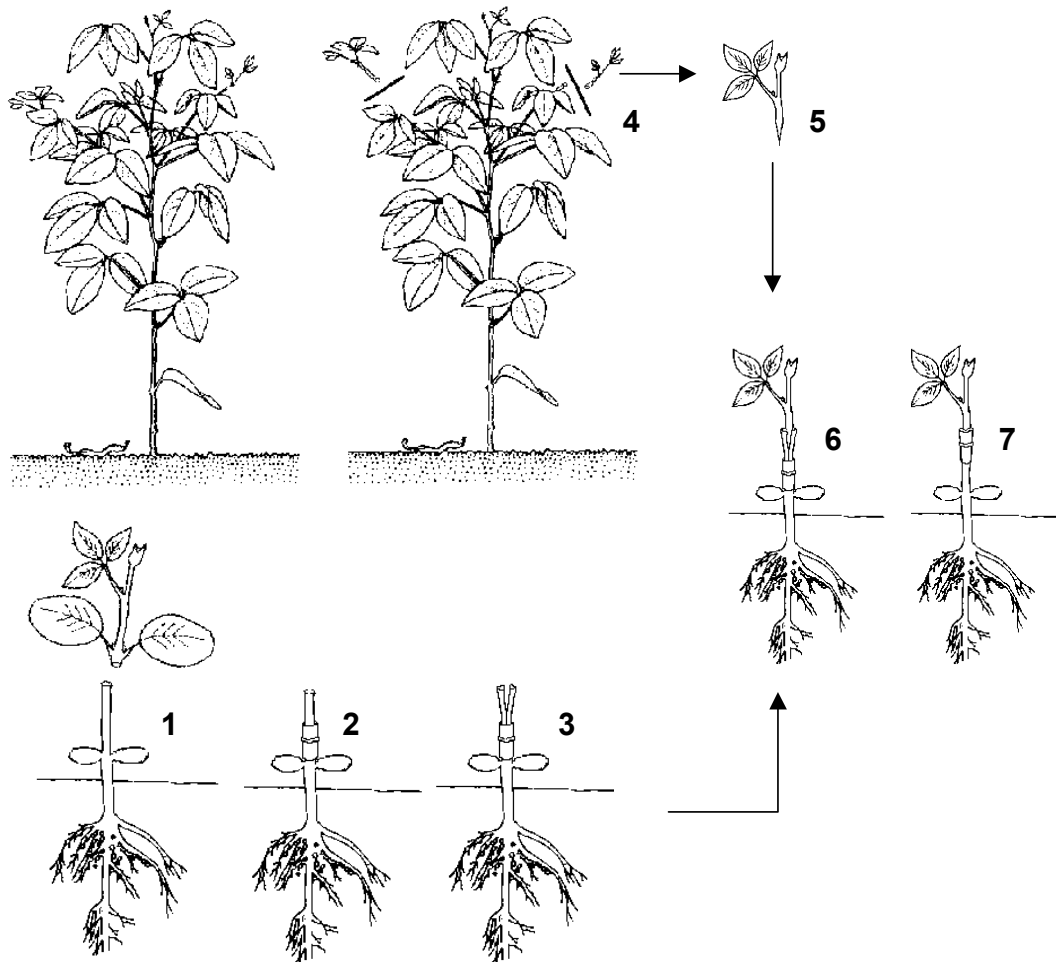
Selbst unter geeigneten Klimabedingungen ist die Kreuzung von Soja meist nicht sehr effektiv. So konnte von ca. 15 hybridisierten Blüten der Kreuzung 'Doko RC x Wilis' nur drei Samen geerntet werden, wovon sich zwei als Selbstungen erwiesen. Da für weiterführende Untersuchungen eine Populationsgröße von mindestens 300 Linien angestrebt wurde, mußte die einzige vorhandene F1-Pflanze vegetativ vermehrt werden.

Die Methode der Pfropfung erwies sich dabei als sicherer und effektiver als eine Stecklingsvermehrung (SPEHAR, 1990). In Abbildung 4 sind die einzelnen Schritte der Pfropfung dargestellt.

Die Pfropfunterlagen werden ca. 2-3 Wochen vor dem Pfropftermin ausgesät. Die Keimlinge sollten das erste geteilte Blatt voll entfaltet haben, bevor sie als Unterlage genutzt werden. Der Stengel ist in diesem Stadium kräftig entwickelt (ca. 2,5 mm Ø), beginnt aber noch nicht zu verholzen. Großkörniges Saatgut liefert meist kräftigere Keimlinge mit dickeren Stengeln. Zur Fixierung der Pfropfung werden Kunststoffbandagen benutzt. Dazu wird ein Trinkhalm der Länge nach aufgeschnitten und anschließend in ca. 10 mm lange Stücke geschnitten. Die Abschnitte werden eingerollt und in einen Gummiring mit ca. 2.5-3.5 mm Innendurchmesser gesteckt.

Alle beschriebenen Schnitte werden mit neuen Rasierklingen ziehend ausgeführt, um die Verletzung des Stengelgewebes zu minimieren. Die Pfropfunterlage wird immer zuerst vorbereitet, da sie über das Wurzelsystem mit Wasser versorgt wird. Zuerst wird der Sproß direkt unterhalb des Primärblattpaares waagrecht abgeschnitten (s. Nr. 1 Abbildung 4). Die Kotyledonen bleiben erhalten, da sich die Pfropfungen besser entwickeln, wenn die Keimblätter weiter zur Ernährung und Assimilation beitragen können. Über den Sproßstumpf wird eine der vorbereiteten Bandagen geschoben (s. Nr. 2 Abbildung 4). Anschließend wird der Stengel durch einen zentralen senkrechten Schnitt ca. 10 mm tief gespalten (s. Nr. 3 Abbildung 4). Der entstehende Spalt sollte nie längere Zeit offen stehen, um das Austrocknen der Wundränder zu

verhindern. Erst nach dieser Vorbereitung der Unterlage werden die Sproßspitzen geschnitten. Die Sproßspitzen werden mit einem senkrechten Schnitt unmittelbar über einem Nodium von der Mutterpflanze getrennt (s. Nr. 4 Abbildung 4). Das verbleibende Internodium muß eine Länge von mindestens 2 cm aufweisen.



**Abbildung 4: Pfropfung von Sojabohnen**

An der Sproßspitze sollte ein kleines aber bereits entfaltetes Blatt verbleiben damit sich die Pfropfung ohne starke Verzögerung weiter entwickelt. Hier gilt es, ein Mittelmaß zwischen der Maximierung der Assimilationsfläche und der Minimierung der Transpirationsfläche zu finden. Das Internodium wird nun etwa 10 mm lang keilförmig zugeschnitten (s. Nr. 5 Abbildung 4). Hierzu wird der Stängel flach auf eine Hartschaumunterlage gelegt, die Rasierklinge senkrecht zur Unterlage in der gewünschten Position angesetzt und ein einseitiger Keil geschnitten. Dann wird der Stängel um 180° gedreht und die zweite Seite des Keils geschnitten. So ist ein gezielter Schnitt möglich, ohne daß das Gewebe gequetscht wird. Die Wundflächen werden nur von der Klinge berührt. Der entstandene Keil wird nun in den Spalt der Unterlage geschoben (s. Nr. 6



Abbildung 4). Es ist darauf zu achten, daß möglichst alle Wundränder bündig aufeinander liegen. Ist dies wegen unterschiedlicher Dicke der Stengel nicht möglich, sollten wenigstens die Ränder auf einer Seite übereinstimmen.

Zur Fixierung der Pfropfung wird die zuvor angebrachte Kunststoffbandage von unten über die Schnittstelle geschoben (s. Nr. 7 Abbildung 4). Das Ziel ist, die Stengelteile fest zusammen zu pressen ohne sie dabei zu quetschen.

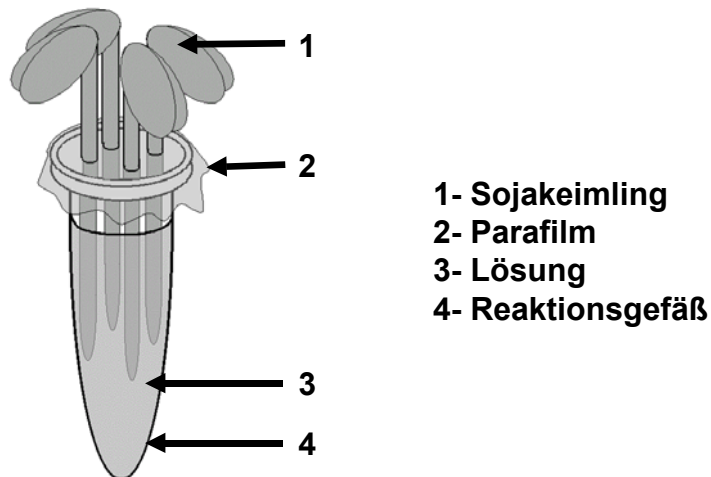
Die frisch gepfropften Pflanzen müssen ca. 4-5 Tage mit transparenten Kunststofftüten abgedeckt werden, bevor sie schrittweise an normale Klimabedingungen gewöhnt werden können. Nach dieser Methode durchgeführte Pfropfungen waren zu 100 % erfolgreich. Die Pflanzen zeigten ein vitales Wachstum und waren nach etwa 3 Wochen kaum von nicht gepfropften Pflanzen zu unterscheiden.

Durch die beschriebene Methode wurden von der vorhandenen F1-Pflanze der Kreuzung 'Doko RC x Wilis' 12 Klone produziert. Durch die Kultivierung unter Langtagsbedingungen, wurde allen Pflanzen ein üppiges vegetatives Wachstum ermöglicht, bevor durch Kurztagsbedingungen die Blüte induziert wurde. Auf diese Weise konnte eine F2-Population von über 3400 Individuen erzeugt werden.

## 2.5 Rhizosphärenanalysen

### Rhizosphärenlösung

Zur Identifikation von Al-komplexierenden Wurzelasscheidungen sollte Lösung aus der Rhizosphäre der Wurzelspitzen gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils fünf Wurzelspitzen in einem 500 µl Reaktionsgefäß kultiviert.



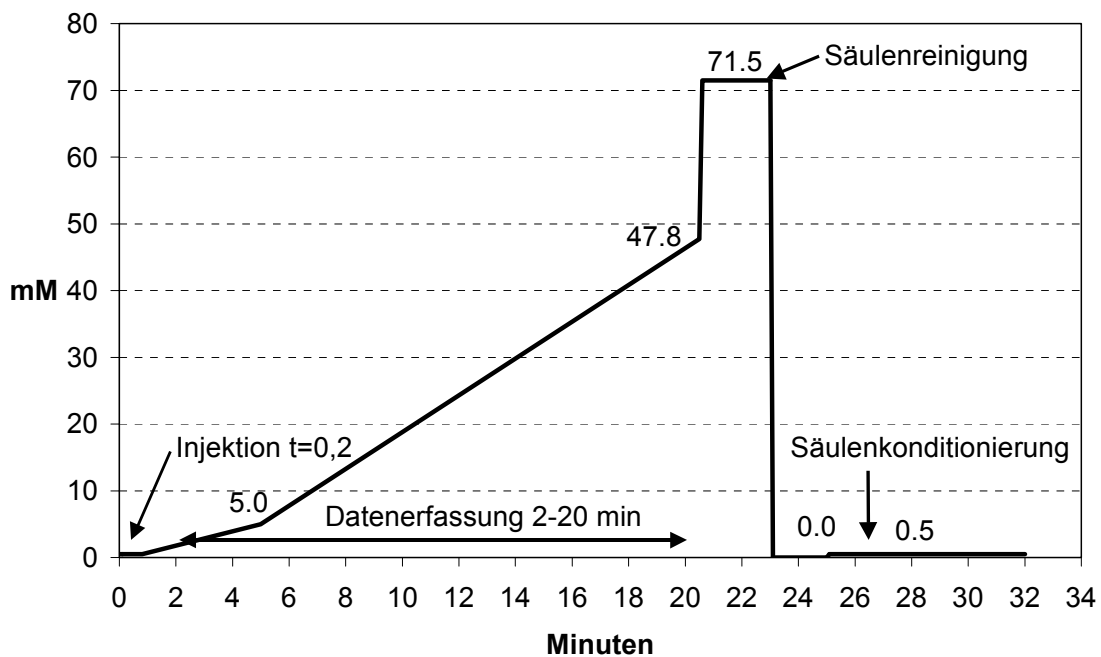
**Abbildung 5: Kulturmethode zur Gewinnung von Rhizosphärenlösung**

Die Vorkeimung der Sojabohnen erfolgte zwischen vertikalen Filtern bis sie eine Wurzellänge von 3-5 cm aufwies. Die Reaktionsgefäße wurden mit 300 µl Lösung mit 500 µM  $\text{AlCl}_3$  bzw. 500 µM  $\text{CaCl}_2$  und einem pH-Wert von 4,3 befüllt und mit einer Lage Parafilm verschlossen. Zu Beginn des Versuchs wurde der Parafilm mit einer Stecknadel durchstochen. Nach gründlichem Spülen in VE-Wasser, konnten die Wurzeln vorsichtig durch die Löcher geschoben werden, bis sie ca. 1 cm tief in die Lösung eintauchten. Dabei weiteten die Wurzelspitzen die Löcher auf das nötige Maß auf und dichteten gleichzeitig das Gefäß gegenüber dem Außenmilieu ab (s. Abbildung 5). Wurzeln von Sojakeimlingen sind stabil genug diese Prozedur unbeschadet zu überstehen und zeigten in  $\text{CaCl}_2$  Lösung ungehindertes Wachstum. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 5 h wurden die Wurzeln vorsichtig entfernt und das Gefäß mit einem sauberen Deckel verschlossen. Während der Inkubationszeit blieb das Lösungsvolumen im Gefäß weitgehend erhalten, da die Keimlinge noch nicht aufgelaufen waren und daher über die Wurzel kaum Wasser aufnahmen.

Auf eine Durchführung des Versuchs unter sterilen Bedingungen wurde bewußt verzichtet, da nur kurze Versuchszeiträume geplant waren und keine Nährlösung zum Einsatz kam. Darüber hinaus sollte eine Methode entwickelt werden, welche eine unkomplizierte Handhabung umfangreicher Tests ermöglicht. Bis zur Analyse wurden die Lösungen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## HPLC Analyse

Die Analyse der Rhizosphärenlösungen erfolgte mit einem "Dionex 4506i" Hochdruck-Flüssigchromatographie Gerät mit einer "Ion Pac (10-32) AS 11" Säule mit 4 mm Durchmesser. Als Laufmittel diente Wasser und als Eluent wurde NaOH eingesetzt. Der Verlauf der NaOH Konzentration während der Analyse ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** Eluenten Konzentration während der HPLC-Analyse

Die Rhizosphärenlösungen wurden direkt, ohne vorherige Reinigung oder Konzentration injiziert. Als Detektoren dienten ein Leitfähigkeitsdetektor und ein UV-Detektor, welcher die Absorption bei einer Wellenlänge von 205 nm ermittelte. Der Einsatz von zwei Detektoren dient der Absicherung der Ionenidentität. Wenn die Konzentrationsberechnungen beider Detektoren übereinstimmt, kann davon ausgegangen werden, daß der Peak durch das zur Kalibration verwendete Ion verursacht wird.

## 2.6 Gelfärbemethode

Zur Identifikation von Ort und Ausdehnung komplexbildender Wurzelabscheidungen, sollten diese direkt sichtbar gemacht werden. Hierbei sollten nicht die Wurzeln selbst gefärbt werden (vgl. POLLE ET AL., 1978) sondern das umgebende Substrat, in welchem die Beeinflussung der Rhizosphäre stattfindet. Als Substrat wurde Agarosegel gewählt, da es pflanzenverträglich und leicht zu handhaben ist. Darüber hinaus weist Agarosegel ausreichende optische Eigenschaften auf.

Zur Herstellung der Gele wurde 1,0 % (w/v) Agarose durch Erhitzen in VE-Wasser gelöst. Die heiße Agaroselösung wurde zwischen zwei Glasplatten, welche in einem Abstand von 1,0 mm fixiert waren abgekühlt. Eine der Glasplatten war zuvor dünn mit Agarose beschichtet und getrocknet worden. Das neue Gel haftete daher vollständig auf dieser Glasplatte, so konnte die andere entfernt werden ohne das Gel zu zerstören. Eine Inkubation für mindestens 72 h in einer 1 mM  $\text{AlCl}_3$  Lösung bei pH 4,3 dient dazu, den pH-Wert und die Al-Konzentration im Gel einzustellen. Diese Prozedur ist notwendig, da Agarose in einer Al-Lösung bei pH 4.3 nicht erstarrt.

Sojabohnen wurden in der oben beschriebenen Keimapparatur angekeimt bis die Wurzeln eine Länge von etwa 8 cm hatten. Für die Versuche mußten gesunde, gerade Wurzeln ausgewählt werden.

Nach der Vorkultur wurde einer der Filter entfernt, und ein Gel so unter die Wurzel gelegt, daß die Spitze etwas in der Mitte des Gels zu liegen kam. Dieser Aufbau ist mit Frischhaltefolie abgedeckt, durch Schaumstoffmatten fixiert und in eine vertikale Position gebracht worden. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 2-16 h wurden die Wurzeln entfernt, die Gele aus der Halterung genommen und bis zur Weiterverarbeitung vor Austrocknung geschützt.

Vor dem Färben mußten die Gele kurz mit VE-Wasser gespült werden, um lose anhaftende Al-Lösung zu entfernen. Dann wurden die Gele bei Raumtemperatur für 5 min in einer Färbelösung aus 2 g/l Hematoxylin und 0,2 g/l  $\text{NaIO}_3$  (GILL ET AL., 1974) unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend für 3 min in VE-Wasser gespült. Nach weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Dokumentation der Farbreaktion mit einem Herolab Videosystem. Der Farbstoff Hematoxylin hat die Eigenschaft in den ersten Minuten der Farbreaktion nur mit freiem  $\text{Al}^{3+}$  zu reagieren. Da andere Ionenformen und komplex gebundenes Al nur zeitlich verzögert zu einem violetten Farbstoff umgesetzt werden, ist die Bindung von freiem  $\text{Al}^{3+}$  durch Wurzel-ausscheidungen als Aufhellung gegenüber dem umgebenden Gel erkennbar.

## 2.7 Molekulargenetische Methoden

### 2.7.1 Isolierung genomischer Soja-DNA

Die Sorten wurden mindestens 14 Tage vor der DNA Isolation im Gewächshaus angekeimt. Im Normalfall erfolgte die Keimung in Komposterde bei einer Saattiefe von mindestens 1 cm. Sorten mit schwacher Keimkraft wurden zwischen Filterpapier vorgekeimt und nach einer Woche in Töpfe gepflanzt. Sobald ausreichend Blattmaterial vorhanden war, konnte je Sorte ca. 4 g frisch expandierte Blattdiedern gezupft und kurzfristig bei 0 °C gelagert werden.

Die Isolation der genomischen Soja-DNA folgte weitgehend der CTAB-Methode nach SAGHAI-MAROOF ET AL. (1984) mit Abwandlungen durch KEIM ET AL. (1988). Hierbei wurde das Blattgewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und fein gemörsert, um

die Zellstruktur zu zerstören. Das Pulver wurde in tieferforenem Zustand in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml Falconröhrchen) überführt, welches 20 ml eines 1,25 x CTAB Puffer enthielt. Das Pulver mußte sofort mit einer Vortexapparatur in dem vorgewärmten Puffer suspendiert und bei 60 °C für 60 min inkubiert werden. Dabei wird die DNA durch Bildung eines CTAB-DNA-Komplexes gelöst und zugleich stabilisiert. Es folgte ein Extraktionsschritt mit 20 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), durch 10 minütiges Schütteln in einem Überkopfschüttler. Durch Zentrifugation für 30 Minuten bei mindestens 3500 g und 15 °C konnte die organische Phase mit denaturierten Proteinen und sonstigen Zellbestandteilen von der leichteren wässrigen Phase abgetrennt werden. Die in der Oberphase gelöste DNA wurde nun unter Vermeidung von Scherkräften ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt. Die enzymatischen Spaltung der noch enthaltenen RNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl Rnase A (10 mg/ml) und Inkubation der Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Chloroformextraktion wiederholt, und die wässrige Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2/3 Volumen -20 °C kaltem Isopropanol konnte die DNA als watteartige, fädige Substanz aus der Lösung gefällt werden. Mit Hilfe eines sterilen Glashakens wurde der DNA Klumpen in ein neues Gefäß mit 10 ml 80 % Ethanol und 15 mM Amoniumacetat überführt und mindestens 20 Minuten inkubiert. Die DNA wurde jetzt in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, überschüssiges Ethanol abpipetiert und das restliche Ethanol in einem Vakuumkonzentrator abgedampft. Die Rücklösung der DNA erfolgte in 300-700 µl TE-Puffer.

Nach vollständiger Lösung der DNA wurde jeweils ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe dieser Testgele konnte sowohl die Qualität, als auch die Quantität der DNA durch Vergleich mit einem *Lambda/Hind III* DNA-Standard geschätzt werden. Die mit dieser Methode gewonnene DNA-Mengen betrug zwischen 0,1 mg und 0,5 mg. Die DNA hatte eine ausreichende Reinheit, um in RFLP, AFLP und RAPD Analysen eingesetzt zu werden.

### 2.7.2 RFLP-Analyse

Die RFLP (= Restriktions- Fragment- Längen- Polymorphismus) Analyse mit den Schritten, Restriktionsverdau, Gelelektrophorese, Southerntransfer, Sondenisolation, Markierung und Hybridisierung, erfolgte in allen Schritten wie von HATZ (1997) beschrieben. Die Sonden-DNA wurde als Plasmid in *E. coli* -Stämmen von der Firma "Biogenetic Services Inc." bezogen. Die RFLP-Sonden wurden von KEIM ET AL. (1990) entwickelt und kartiert. Die benutzten Sonden sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Auswahl der Sonden und zugehörigen Restriktionsenzyme erfolgte anhand der "Soybase" Datenbank (SHOEMAKER ET AL., 2000).

### 2.7.3 AFLP-Analyse

Die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Methode wurde mit dem Ziel entwickelt, die Verlässlichkeit der RFLP Technik mit der Leistungsfähigkeit PCR

basierter Methoden zu verbinden. Die Methode basiert auf der selektiven PCR-Amplifikation von Restriktionsfragmenten eines Kompletterverdaus genomischer DNA (ZABEAU UND VOS, 1992).

Die Durchführung der AFLP-Technik folgte weitgehend der von VOS ET AL. (1995) beschriebenen Methode. Die AFLP-Methode erfordert die Durchführung von drei getrennten Reaktionschritten und die anschließende Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente. Die Markierung der Fragmente erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Detektion wurde mit einem DNA-Sequenzierautomaten (ABI 377 Prism; Perkin Elmer) durchgeführt.

Im ersten Schritt wird die genomische DNA geschnitten und zugleich werden Oligonukleotide an die Schnittstellen ligiert. Diese Oligonukleotide werden als Adaptern bezeichnet und dienen später der Anlagerung der PCR-Primer. Im zweiten Schritt erfolgt eine PCR-Amplifikation mit selektiver Vermehrung von DNA-Fragmenten mit einem spezifischen Nukleotid neben der Schnittstelle. Das Produkt dieser PCR-Reaktion dient im dritten Schritt als Vorlage zur selektiven Vermehrung von Fragmenten mit jeweils zwei zusätzlichen spezifischen Nukleotiden neben der Schnittstelle. Die Sequenzen der Primer, Adaptern und Schnittstellen sind in Tabelle 7. dargestellt.

**Tabelle 7: Sequenz der Schnittstellen, Adaptern und Primer**

<i>Enzym</i>	<i>Schnittstelle</i>	<i>Adapter</i>	<i>Primer</i>
<b>Mse I</b>	TAA-3' 5'-T T-5' 3'-AAT	TACTCAGGACTCAT GAGTCCTGAGTAG CAG	NN-C AAT GAGTCCTGAGTAG
<b>Eco RI</b>	AATTC-3' 5'-G G-5' 3'-CTTAA	AATTGGTACGCAGTC CCATGCGTCAG ATGCTC	NN-A CTTAA CCATGCGTCAG

### **Restriktion und Ligation**

Bei dieser Reaktion wird die genomische DNA des Testorganismus für die folgenden PCR-Reaktionen vorbereitet, um eine effektive Amplifikation spezifischer Fragmente zu ermöglichen. Zuerst wird die DNA mit Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Bei dieser Untersuchung wurden die Enzyme Eco RI und Mse I eingesetzt. Durch das häufig schneidende Enzym Mse I entstehen Fragmentgrößen, welche effektiv amplifiziert werden und sich gut in Polyacrylamid-Gelen auftrennen lassen. Durch den zusätzlichen Einsatz von Eco RI, einem selten schneidenden Enzym, entstehen < 10 % Eco RI-Mse I geschnittene Fragment sowie sehr wenige Eco RI-Eco RI Fragmente.

Da DNA-Fragmente unbekannter Sequenz vermehrt werden sollen, müssen Adaptoren bekannter Sequenz an die Fragmente ligiert werden. Die Ligation kann im gleichen Reaktionsgemisch wie die Restriktion erfolgen, da die Sequenz der Adaptoren von der Erkennungssequenz der Enzyme abweicht und somit eine erneute Restriktion ausgeschlossen ist. Dagegen werden Ligationen von Fragmenten untereinander bei dieser Reaktion erneut geschnitten. Adaptor-Adaptor Ligationen sind dadurch verhindert, daß diese nicht phosphoryliert sind.

Als Ausgangssubstanz dienten 500 ng DNA in 5,5 µl TE-Puffer. Dies wurde mit einem Gemisch aus 0,1 µl T4 DNA Ligase-Puffer, 0,1 µl NaCl (0,5 M), 0,05 µl BSA (1mg/ml), 0,25 µl Eco RI (5 U), 0,25 µl Mse I (1 U), 0,126 µl T4 DNA Ligase (1 U), 0,124 µl bist. H<sub>2</sub>O sowie 1,0 µl T4 DNA Ligase-Puffer, 1,0 µl NaCl (0,5 M), 0,5 µl BSA (1mg/ml), 1,0 µl Mse I Adaptoren (AFLP-Ligation and Preselektive Amplifikation Modul, Perkin Elmer) und 1,0 µl Eco RI Adaptoren (AFLP-Ligation and Preselektive Amplifikation Modul, Perkin Elmer) gemischt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Das mit 189 µl TE-Puffer auf ein Endvolumen von 200 µl verdünnte Reaktionsprodukt stellte die Ausgangslösung für den nächsten Reaktionsschritt dar.

### **Vorselektive Amplifikation**

Ziel einer vorselektiven Amplifikation ist es, durch eine PCR-Reaktion, selektiv DNA-Fragmente zu vermehren und diese gegenüber allen übrigen Fragmenten anzureichern. Die hierfür eingesetzten Primer entsprechen der in Tabelle 7 dargestellten Sequenz nach dem Trennstrich. Eine Selektion amplifizierter Restriktionsfragmente erfolgt nach zwei Prinzipien. Es werden nur Fragmente mit zwei unterschiedlichen Schnittstellen (Eco RI und Mse I) vermehrt und darüberhinaus werden Fragmente mit jeweils einer zusätzlichen spezifischen Base (Cytidin bei Mse I und Adenosin bei Eco RI) neben der Schnittstelle selektiv vermehrt.

In einem Reaktionsgemisch aus 4,0 µl Restriktion-Ligation Produkt, 12,1 µl bist. H<sub>2</sub>O, 2,0 µl 10 x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µl Taq-Polymerase (0,5 U), 0,8 µl dNTP-Mix (5mM) sowie 1,0 µl Eco RI und Mse I Preselektiv-Primer (AFLP-Ligation and Preselektive Amplifikation Module, Perkin Elmer) wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Perkin-Elmer PE-9600 Thermocycler mit den in Tabelle 8 dargestellten Reaktionsbedingungen.

**Tabelle 8: Programm für vorselektive PCR-Amplifikation**

<i>Schritt 1</i>		<i>Schritt 2</i>		<i>Schritt 3</i>		<i>Anzahl der Zyklen</i>
Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	
95 °C	2 min					1
94 °C	1 sek	56 °C	30 sek	72 °C	2 min	20
60 °C	30 min					1

Jeweils 10 µl Produkt aus dieser Reaktion wurde auf 200 µl mit TE-Puffer verdünnt. Dies stellte das Ausgangsprodukt für die abschließende AFLP-Reaktion dar.

### **Selektive Amplifikation und Markierung**

Im letzten Schritt wird die Zahl amplifizierter Fragmente auf etwa 50-100 reduziert, um diese anschließend in der Elektrophorese getrennt auflösen zu können. Dies wird durch den Einsatz von verschiedenen Primern mit jeweils zwei zusätzlichen selektiven Nukleotiden neben der Schnittstelle erreicht. In Tabelle 7 sind diese Nukleotide durch „NN“ dargestellt. Nach diesem Prinzip können jeweils 16 Primer mit verschiedenen selektiven Basen hergestellt werden. Durch die Kombination von jeweils zwei Primern in der PCR-Reaktion, können daher bis zu 256 verschiedene Fragmentgruppen selektiv amplifiziert werden. Die Eco RI Primer sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, so daß jeweils ein Strang der PCR-Produkte detektiert werden kann.

Als Ausgangsmaterial für selektive Amplifikation dienten 3 µl des Produktes der vorselektiven PCR-Reaktion. 3,0 µl der Ausgangs-DNA, 12,1 µl bist. H<sub>2</sub>O, 2,0 µl 10 x PCR-Puffer mit MgCl, 0,1 µl Taq-Polymerase (0,5 U), 0,8 µl dNTP-Mix (5mM) sowie 1,0 µl Eco RI- (1 µM) und 1,0 µl Mse I-Primer (5 µM) (AFLP Selektive Amplifikation Start-Up Module, Perkin Elmer) wurden gemischt und einer PCR-Reaktion unterzogen. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 9 zu ersehen.



**Tabelle 9: Programm für selektive PCR-Amplifikation und Fragment Markierung.**

<i>Schritt 1</i>		<i>Schritt 2</i>		<i>Schritt 3</i>		<i>Anzahl der Zyklen</i>
Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	
95 °C	2 min					1
94 °C	1 sek	65→56 °C	30 sek	72 °C	2 min	9
94 °C	1 sek	56 °C	30 sek	72 °C	2 min	22
60 °C	30 min					1

### Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Fragmente erfolgte in einem denaturierenden 5 % Polyacrylamid-Gel. Mit einem ABI 377 Prism Sequenziergerät wurde ein 36 cm langes Gel einer vertikalen Elektrophorese in TBE-Puffer unterzogen. Die Elektrophorese wurde bei 2500 V für 4 Stunden bei 50 °C durchgeführt. Jede Spur wurde mit einem Gemisch aus drei Proben und einem internen Längenstandard beladen. Durch die Markierung mit unterschiedlichen Farbstoffen können die Proben und der Längenstandard einzeln detektiert werden. Die aufgetrennten Fragmente werden vom Sequenziergerät mit einem CCD-Sensor detektiert und die Daten elektronisch gespeichert.

### Auswertung

Im Datenanalyseprogramm Genescann können die erzeugten Elektropherogramme bezüglich der Intensität der Spuren nivelliert werden. Durch den in jeder Spur mitlaufenden Längenstandard kann die Größe der Fragmente auf ein Basenpaar genau bestimmt werden. Auf diese Weise sind die Daten einer automatischen Analyse zugänglich, da vom Analyseprogramm Genpotyper Banden individuell erkannt und zwischen den Spuren verglichen werden können. Die vom Programm vorgeschlagenen Polymorphismen wurden anhand der Elektropherogramme überprüft. Aufgrund der hohen Anzahl von Banden sind bei der AFLP-Analyse Banden verschiedener Größe nicht als Allele eines Locus erkennbar. Daher wird primär jede Bande als ein Locus aufgefaßt. Somit sind an jedem Locus nur ein Allel und das Nullallel möglich. Diese Informationen konnten EDV-gestützt in eine binäre Martix umgesetzt werden, welche die Grundlage für alle weiteren Berechnungen darstellte.

### 2.7.4 RAPD-Analyse

Die RAPD-Reaktion (= **R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) wurde in 20 µl Reaktionsvolumen in einem Hybaid Omnigene Thermocycler durchgeführt. Das

Reaktionsgemisch bestand aus, 4,0  $\mu\text{l}$  der Ausgangs-DNA, 11,04  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ , 2,0  $\mu\text{l}$  10 x PCR-Puffer mit  $\text{MgCl}_2$ , 0,16  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ), 0,8  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10  $\mu\text{M}$ ) und 2  $\mu\text{l}$  Primer (2  $\mu\text{M}$ ). Die Reagenzien wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Reaktionsprogramm ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Programm für PCR-Amplifikation von RAPD Fragmenten.**

<i>Schritt 1</i>		<i>Schritt 2</i>		<i>Schritt 3</i>		<i>Anzahl der Zyklen</i>
Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	
95 °C	3 min					1
94 °C	10 sek	36 °C	20 sek	72 °C	30 sec	40
72 °C	15 min					1
30 °C	30 min					1

Die Reaktionsprodukte wurden in 1%-Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem CCD-Kamera-System (Herolab, Wiesloch) dokumentiert. Als Längensstandard diente eine Hind III Verdau des Lambda Phagen. Auf den ausgedruckten Bilddaten wurden polymorphe Bandenmuster visuell ausgewertet und in eine binäre Matrix übertragen. Jede Fragmentgröße lieferte ein Allel und das Nullallel.

## 2.8 Datenanalyse

### Distanzberechnung

Für die Berechnung genetischer Distanzen aus binären Datensätzen stehen verschiedene Formeln zur Verfügung. Diese Formeln basieren auf Kontingenztafeln, in welchen die Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen zwei Objekten zusammengefaßt werden (s. Tabelle 11). Dabei stellen  $N_{00}$  die Anzahl der in beiden Sorten fehlenden Banden,  $N_{01}$  die Anzahl der in Sorte A fehlenden und in Sorte B vorhandenen Banden,  $N_{10}$  die Anzahl der in Sorte A vorhandenen und in Sorte B fehlenden Banden und  $N_{11}$  die Anzahl der in beiden Sorten vorhandenen Banden dar. Die Berechnung der Distanzkoeffizienten basiert auf diesen vier Häufigkeiten.

**Tabelle 11: Kontingenztafel**

		<i>Beobachtung bei Sorte B</i>	
		0	1
Beobachtung bei Sorte A	0	$N_{00}$	$N_{01}$
	1	$N_{10}$	$N_{11}$

Soll die Distanz zwischen mehreren Objekten berechnet werden, ist es vorteilhaft je eine Kontingenzmatrix für die Häufigkeiten  $N_{00}$  bis  $N_{11}$  zu erzeugen (s. Abbildung 7). Die Matrizen können mit der gewählten Distanzformel zur Distanzmatrix verrechnet werden. In dieser Arbeit wurde der Distanzkoeffizient nach DICE (1945) als Distanzmaß gewählt. Wie in Formel 1 zu erkennen ist, wird bei der Berechnung dieses Distanzkoeffizienten die Anzahl der in beiden Sorten fehlenden Banden  $N_{00}$  nicht einbezogen. Damit wird berücksichtigt, daß ein Bandenmuster, welches in zwei Sorten fehlt, keine Aussagekraft über die Ähnlichkeit der Sorten hat. Dies wird leicht verständlich durch die Vorstellung, daß für jedes Objektpaar beliebig viele Eigenschaften denkbar sind, welche beide nicht haben. Durch den Ausschluß der negativen Übereinstimmungen verschiebt sich das Verhältnis zwischen Übereinstimmungen und Unterschieden in Richtung der Unterschiede. Um dies auszugleichen, werden positive Übereinstimmungen doppelt gewichtet.

**Formel 1: Distanzkoeffizient nach DICE (1945)**

$$D = 1 - 2 N_{11} / (2N_{11} + N_{01} + N_{10})$$

Bei dieser Berechnungsmethode darf keiner Bande eines Markers der Wert "0" zugewiesen werden. Daher muß bei kodominanten Markern jedes Allel als eigene Datenreihe behandelt werden (s. 2.7.2).

Alle Analysen wurden mit SPSS (SPSS, 1999; SPSS, 2000) durchgeführt. Da dieses Programm bei der menügesteuerten Distanzberechnung fehlende Werte nicht verarbeiten kann, mußten die Distanzkoeffizienten über Matrixbefehle errechnet werden.

Die Distanzmatrix dient als Basis für die Clusteranalyse und Multidimensionale-Skalierung (= MDS) (s. Abbildung 7). Beiden Methoden machen die Informationen der Distanzmatrix einer Interpretation zugänglich und ergänzen sich dabei gegenseitig.

Die Distanzen von  $N$  Objekten einer Distanzmatrix können nur in einem  $(N-1)$ -dimensionalen Raum fehlerfrei dargestellt werden. Für die übersichtliche grafische Darstellung der Distanzmatrix muß daher eine Dimensionsreduktion durch

eine MDS erfolgen. Als Ergebnis dieser Analyse können die Genotypen in zwei-dimensionalen Streudiagrammen dargestellt werden. Diese Karten ermöglichen eine visuelle Beurteilung der Beziehungen und Gruppierung der Sorten. Das Auge ist hervorragend geeignet, Strukturen und Gruppen zu identifizieren, wenn die Daten entsprechend aufbereitet sind. Dabei gewonnene Informationen können bei der Interpretation der Clusteranalyse genutzt werden. Umgekehrt können Ergebnisse der Clusteranalyse genutzt werden, um die Beurteilung der Streudiagramme zu erleichtern, indem die Punkte entsprechend der Clusterzugehörigkeit kodiert werden (s. Abbildung 11).

Die Ergebnisse einer hierarchischen Clusteranalyse können in zwei Grafiken dargestellt werden. Das Dendrogramm zeigt eine Übersicht über die Reihenfolge der Clusterfusionen, sowie die Gruppierung der Sorten in den jeweiligen Fusionsebenen. Die genetische Distanz zwischen zwei Sorten kann aus einem Dendrogramm nicht abgeleitet werden. Das Fusionsebenen-Diagramm liefert Informationen über die Distanzkoeffizienten der Clusterfusion, sowie die Differenz zwischen den Distanzkoeffizienten zweier aufeinander folgenden Clusterfusionen. Daraus können Rückschlüsse über die Clusterstabilität, und damit Eignung bestimmter Partitionen gezogen werden. Die Information des Fusionsebenen-Diagramms ist im allgemeinen bereits im Dandrogramm enthalten, wird hier jedoch weniger deutlich.

In dieser Arbeit wurden Clusteranalysen nach den Fusionierungsmethoden von Ward und UPGMA (= unweighted pair group method with arithmetic average) durchgeführt (BACKHAUS ET AL., 1996).

Für eine abschließende Beurteilung struktureller Beziehungen zwischen Sorten und Gruppen können noch externe Informationen herangezogen werden, welche nicht in der Distanzberechnung genutzt wurden.

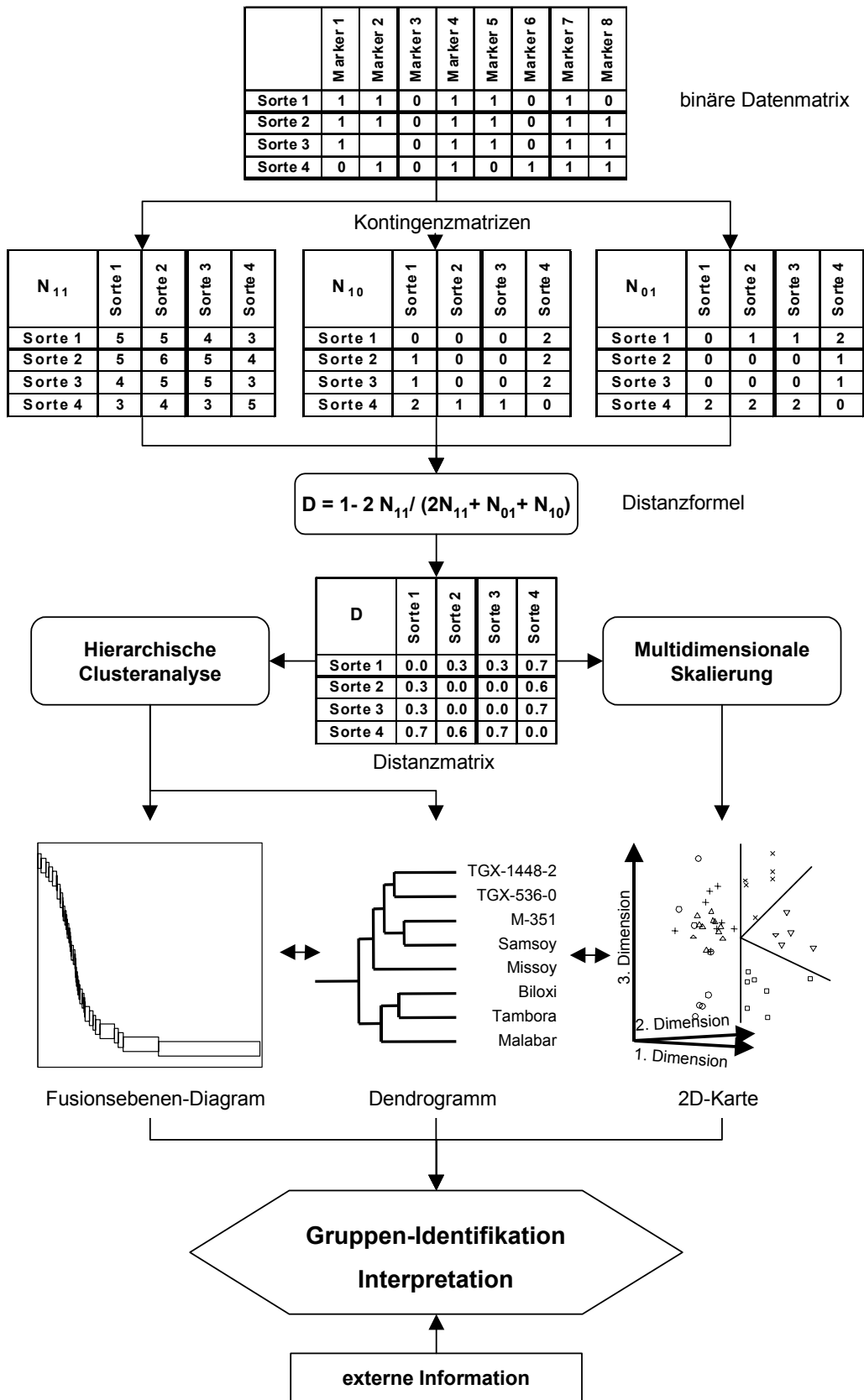


Abbildung 7: Schema einer Diversitätsanalyse mit molekulargenetischen Markern

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Diversitätsanalysen

Für eine genetische Kartierung und Korrelation der Al-Toleranz zu molekularen Markern, muß eine spaltende Population entwickelt werden. Zur gezielten Wahl der Kreuzungseltern, ist die Schätzung genetischer Distanzen innerhalb des untersuchten Sortenspektrums sehr hilfreich. Neben der Auswahl von Eltern mit möglichst stark kontrastierenden Phänotypen, ist die Verfügbarkeit einer ausreichenden Zahl von polymorphen Markern entscheidend für den Erfolg eines Kartierungsversuchs.

Mit Hilfe der geschätzten genetischen Distanzen können die Genotypen zu verschiedenen Verwandtschaftsgruppen oder "Genpools" zugeordnet werden. Durch Selektion toleranter Eltern aus verschiedenen Gruppen, kann in der Züchtung die Wahrscheinlichkeit für die Kombination verschiedener Toleranzmechanismen erhöht werden. Weiterhin besteht die Chance, Gruppen von Genotypen zu identifizieren, in welchen bestimmte Toleranzeigenschaften gehäuft vorkommen. Diese könnten wertvolles Ausgangsmaterial für die weitere Züchtung liefern.

Stammbaumdaten für das untersuchte Sortenspektrum stehen nur in geringem Umfang zu Verfügung. Außerdem sind diese oft nicht zuverlässig. Die Charakterisierung der Sorten mit molekularen Markern bietet eine gute Möglichkeit, trotz fehlender Stammbaumdaten, die Diversität der Genotypen zu untersuchen. Molekulare Marker bieten den Vorteil, genetische Distanzen ohne Beeinflussung der Umwelt direkt auf der Ebene des Genoms zu bestimmen. Dies ist besonders wichtig, wenn Sorten mit völlig unterschiedlichen Klimaansprüchen untersucht werden. Hier würde selbst die Erhebung phänotypischer Daten, unter einheitlichen Umweltbedingungen, stark verzerrte Ergebnisse liefern. Die Ergebnisse der Diversitätsanalyse mit molekularen Markern, können direkt zur Selektion geeigneter Marker für eine Kartierung genutzt werden.

#### 3.1.1 Analyse molekularer Marker

Bei der molekularen Analyse von 45 Sojagenotypen wurden AFLP, RAPD, und RFLP Marker genutzt. Es wurden 16 AFLP-Primer Kombinationen, 13 RAPD Primer und 13 RFLP Sonden eingesetzt. In Tabelle 12 sind die Marker und die jeweils erzielte Anzahl an polymorphen Fragmenten dargestellt.

Aufgrund der hohen Anzahl polymorpher Fragmente je Primerkombination, ist die AFLP-Technik, im Hinblick auf die Gesamtzahl polymorpher Fragmente stark dominierend.

Tabelle 12: Benutzte molekulare Marker und Anzahl polymorpher Fragmente

<i>AFLP</i>			<i>RAPD</i>		<i>RFLP</i>	
selektive Basen		polymorphe Fragmente	Primer	polymorphe Fragmente	Sonde	polymorphe Fragmente
Eco RI	Mse I					
AGG	CTT	8	R180/5	2	A199	7
AGT	CTT	14	R270/1	2	A023	3
AAC	CTT	25	R270/3	3	A374	2
AAG	CTT	28	R271/0	1	A102	2
AAT	CTT	31	R280/1	2	A378	5
AGT	CCT	18	R280/2	2	A112	2
AAC	CCT	12	R280/3	1	B166	2
AGC	CTC	18	R280/4	2	B039	2
AGG	CTC	21	R380/1	2	K002	2
ACT	CCA	11	R380/3	1	K069	2
AAC	CCA	23	R460/4	1	K300	3
AAA	CCA	13	R480/5	1	K003	2
AGA	CCA	22	R180/9	2	K411	2
AAT	CGC	6				
ACC	CGC	2				
AGG	CGC	13				
Min.:		2	Min.:	1	Min.:	2
Max.:		31	Max.:	3	Max.:	7
Mittel:		16.6	Mittel:	1.7	Mittel:	2.8
Gesamt:		265	Gesamt:	22	Gesamt:	36

Die eingesetzten RAPD-Primer ließen im Mittel nur die Auswertung von 1.7 polymorphen Fragmenten zu. Dieser Wert liegt deutlich unter den erfahrungsgemäß mit dieser Methode erzielbaren Werten. Durch eine Optimierung des Laborprotokolls sollte es möglich sein, zumindest die doppelte Mengen an Polymorphismen auszuwerten. In dieser Untersuchung wurde aber Wert darauf gelegt, nur absolut

zweifelsfreie Fragmente zu bewerten, da beim Vergleich der Sorten keine Referenz in Form von Kreuzungseltern vorliegt.

Im Gegensatz zur RAPD-Technik scheinen die RFLP-Sonden ungewöhnlich viele polymorphe Fragmente zu erzeugen. Dies liegt jedoch an der hier gewählten Methode der Auswertung (s.2.7.2), welche jedes Allel getrennt bewertet.

Insgesamt wurden 323 polymorphe Fragmente in die Berechnung der genetischen Distanzen einbezogen. Bei einer Genomgröße der Sojabohne von ca. 3400 cM (KEIM ET AL., 1997) entspricht das einer mittleren Markerdistanz von weniger als 10.5 cM. Man kann also davon ausgehen, daß das Genom gut abgedeckt wurde. Auch das Verhältnis von 45 zu charakterisierenden Sorten zu 323 Variablen, läßt sehr verlässliche Ergebnisse erwarten.

### 3.1.1.1 Berechnung genetischer Distanzen

Die polymorphen Bandenmuster wurden in eine Binärmatrix übertragen, welche zur Berechnung der genetischen Distanzen zwischen allen Sorten genutzt wurde. Die resultierende Distanzmatrix ist in Tabelle 30 dargestellt.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der Distanzmatrix**

	<i>Distanzkoeffizient</i>	<i>Sortenkombination</i>
Mittelwert	0.297	
Maximum	0.407	Norchief - B3911
Minimum	0.020	Perry - Kent

Wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, liegt die durchschnittliche genetische Distanz zwischen allen Sorten bei 0.297. Dieser Wert ist spezifisch für diese Untersuchung und abhängig von der Zahl der untersuchten Objekte und Variablen. Er sollte daher nur als Vergleichswert innerhalb dieser Distanzmatrix dienen. Die maximale Distanz tritt zwischen 'Norchief' und 'B3911', einer nordamerikanischen Sorte bzw. indonesischen Genbanklinie auf. Der Distanzkoeffizient von 0.407 entspricht 136 Unterschieden bei 323 Beobachtungen. Die geringste Distanz liegt zwischen den zwei nordamerikanischen Sorten 'Perry' und 'Kent', welche sich nur in 8 Bandenmustern unterscheiden. Dieser Wert liegt deutlich unter dem, der Genotypen 'Wilis' und 'Wilis2'. Obwohl diese beiden Genotypen unter dem gleichen Sortennamen im Umlauf sind, unterscheiden sie sich in 29 Mustern und weisen einen Distanzkoeffizienten von 0.097 auf. Dies ist ein typisches Beispiel dafür, daß Informationen über Sorten, und damit Stammbäumen, nicht immer zuverlässig sind. Dies gilt besonders für Material, welches nicht aus Genbanken entnommen wird.



### 3.1.2 Multidimensionale Skalierung

Für eine übersichtliche grafische Darstellung der Distanzen, in Form von zweidimensionalen Streudiagrammen muß eine Dimensionsreduktion durchgeführt werden. Dies kann durch eine Faktoranalyse, oder eine Multidimensionale-Skalierung (MDS) erfolgen.

Die Faktoranalyse geht von der Annahme aus, daß mehrere Variablen durch einen gemeinsamen Faktor bedingt sind. Bei der Analyse von molekularen Markern, in zufälligen Populationen, wird jedoch davon ausgegangen, daß die Marker unabhängig spalten. Selbst wenn Korrelationen zwischen Markern auftreten, ist es wenig sinnvoll diese zu Faktoren zusammenzufassen, da diese, ohne weitere Informationen keiner Interpretation zugänglich sind. Darüber hinaus benötigt die Faktoranalyse metrische oder ordinale Variablen für die Berechnung. In der ursprünglichen Datenmatrix liegen aber binär nominale Daten vor, welche nicht direkt verrechnet werden können. Eine Berechnung basierend auf einer abgeleiteten Distanzmatrix ist zwar möglich, aber mit dem Grundgedanken einer Faktoranalyse nicht vereinbar.

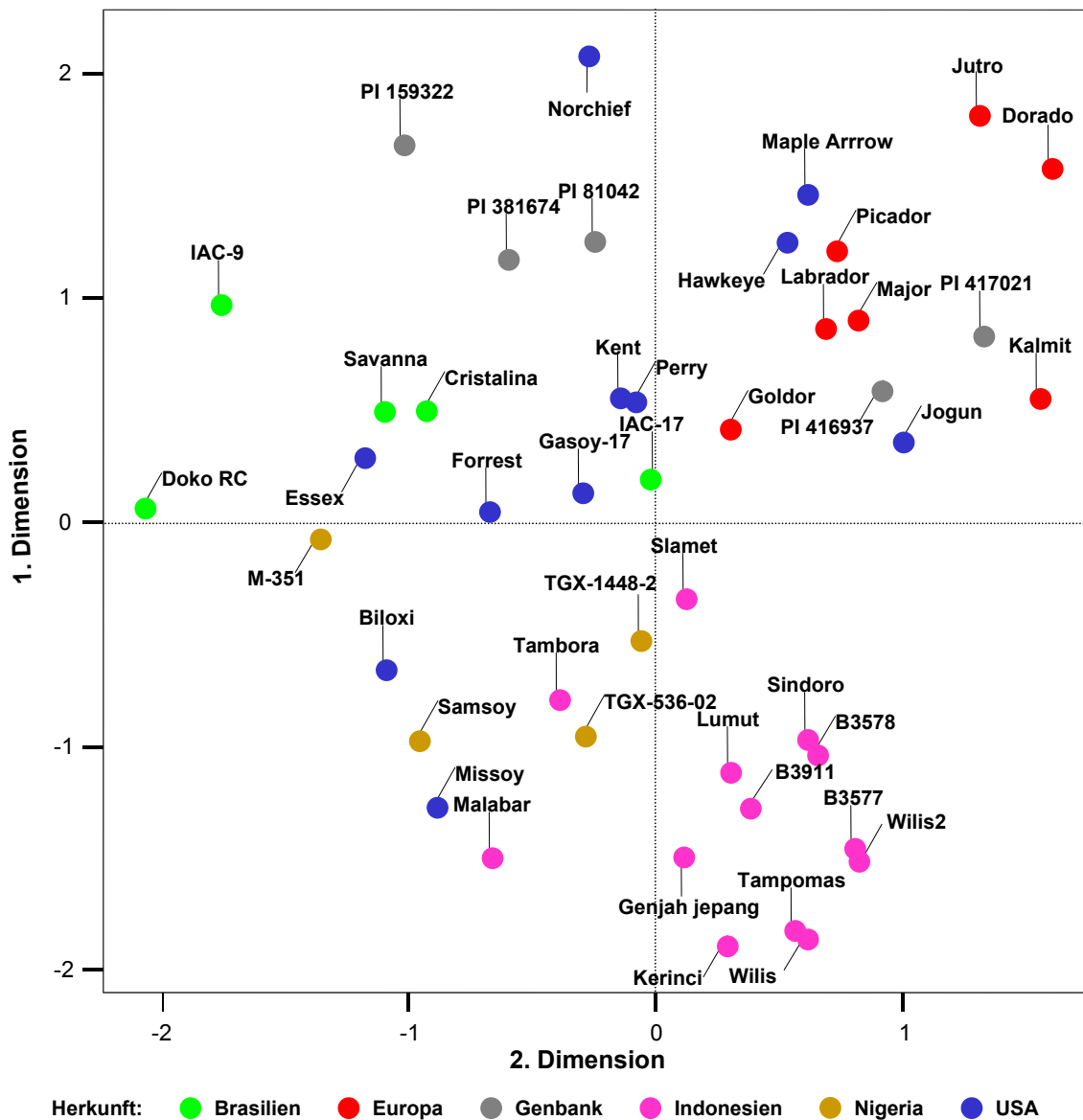
Aus diesen Gründen wurde die Methode der Multidimensionalen-Skalierung an Stelle einer Faktoranalyse angewandt. Diese Methode reduziert die Anzahl der Dimensionen mit dem Ziel, die ursprünglichen Distanzen der Sorten möglichst fehlerfrei darzustellen. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muß jedoch bedacht werden, daß es bei jeder Art von Projektion zwangsläufig zu Verzerrungen kommt. Die Distanz zweier Sorten kann also nicht mit Sicherheit aus Abbildung 8 abgelesen werden. Ein gutes Beispiel hierfür liefern die beiden Genotypen 'Norchief' und 'B3911'. Obwohl sie die größte genetische Distanz aufweisen (s. Tabelle 13), liegen einige Sorten in der zweidimensionalen Karte weiter von 'Norchief' entfernt als 'B3911'.

**Tabelle 14: Streß-Werte und Fehlerquadrate bei Skalierung und 2-4 Dimensionen**

<i>Dimensionen</i>	2	3	4
Streß	0.24	0.16	0.13
RSQ	0.70	0.80	0.84

Die Güte der Darstellung kann anhand des Streß-Wertes und der Summe der quadratischen Abweichung (= RSQ) abgeschätzt werden (s. Tabelle 14). Ein Streß-Wert über 0.2 wird als geringe, ein Wert unter 0.2 als ausreichende Anpassungsgüte betrachtet (BACKHAUS ET AL., 1996). Der RSQ-Wert kann direkt als Anteil der Gesamtvarianz interpretiert werden, welcher durch die vorgegebenen Dimensionen wiedergegeben wird. Tabelle 14 zeigt eine geringe Anpassung und 70 % erklärte Varianz in der zweidimensionalen Lösung. Die drei- und vierdimensionalen Lösungen bieten eine ausreichende Anpassung und erklären 80 bzw. 84 % der Varianz. In der weiteren

Darstellung und Interpretation der Ergebnisse wird die dreidimensionale Lösung gewählt, da gegenüber der zweidimensionalen Lösung, eine deutliche Verbesserung der Anpassung erreicht wird. Die geringe Verbesserung der Beurteilungsmaße in der vierdimensionalen Lösung, rechtfertigen nicht die Nachteile in Darstellung und räumlichem Verständnis eines vierdimensionalen Raums.



**Abbildung 8: Position der Sorten in den ersten beiden Dimensionen einer dreidimensionalen Skalierung der genetischen Distanzen.**

In Abbildung 8 ist die Position der Sorten in den ersten beiden Dimensionen der dreidimensionalen Lösung dargestellt. In dieser Darstellung ist erkennbar, daß die Sortenverteilung einen Bezug zur jeweiligen Herkunft aufweist. Sorten, welche negative Werte in der 1. Dimension aufweisen, stammen, mit Ausnahme der Sorten 'Biloxi' und

'Missoy', aus Indonesien oder Nigeria. Im Quadranten mit negativen Werten in der 1. Dimension und positiven Werten in der 2. Dimension sind ausschließlich indonesische Sorten zu finden. In der oberen Hälfte der Darstellung sind Sorten aus Brasilien, Europa und den USA, sowie Genbankakzessionen zu finden. Die weitere Aufteilung dieser Gruppen ist weniger deutlich als im Fall der indonesischen Gruppe. Dennoch trennt die 2. Dimension zumindest die brasilianischen Sorten 'Savanna', 'Doko RC', 'IAC 17', 'IAC 9' und 'Cristalina' mit negativen Werten von den europäischen Sorten 'Kalmit', 'Dorado', 'Jutro', 'Goldor', 'Labrador' und 'Picador' mit positiven Werten. Die US-amerikanischen Sorten und Genbankakzessionen sind zwischen den beiden letztgenannten Gruppen mit einer stärkeren Verteilung zu finden.

### 3.1.3 Hierarchische Clusteranalysen

Um die in 3.1.2, aufgrund visueller Einteilung der Sortengruppen, vermutete Beziehung zwischen genetischer Ähnlichkeit und Herkunft der Sorten genauer analysieren zu können, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Da eine klare Entscheidung für eine bestimmte Clustermethode problematisch ist, wurde neben der am häufigsten verwendeten "Average-Linkage"- (= UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic average) auch die "Minimalvarianz"-Methode nach Ward durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist im Rahmen einer explorativen Datenanalyse sinnvoll, da beide Methoden unterschiedliche Gruppierungstendenzen haben.

#### 3.1.3.1 Average-Linkage Methode

Die Clusterbildung mit der Average-Linkage Methode hat die Tendenz, Gruppen deutlich verschiedener Größe zu bilden und vereinzelt Punkte spät einzugliedern. Diese Tatsache kann dazu genutzt werden, isoliert liegende Punkte zu identifizieren. Andererseits führt die Bildung inhomogener Clustergrößen zu schwer interpretierbaren Gruppen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse einer hierarchischen Clustergruppierung im Dendrogramm, muß streng genommen, jede Lösungsebene isoliert betrachtet werden. Nur Gruppen, welche durch einen vertikalen Schnitt durch das Dendrogramm von einander getrennt werden, dürfen miteinander verglichen werden. In Abbildung 9 sind zwei dieser Lösungsebenen mit 4 bzw. 10 resultierenden Clustern dargestellt.

Bei der Clusteranalyse wird von der Annahme ausgegangen, daß die untersuchten Sorten bestimmten Gruppen mit ähnlichen Eigenschaften, oder naher Verwandtschaft angehören. Ziel der Clusteranalyse ist die Identifikation der zugrundeliegenden Gruppen. Daher stellt sich nach einer hierarchischen Clusterlösung das Problem, welche Fusionsebene die zugrundeliegenden Gruppen wiedergibt. Ein Hinweis auf eine "natürliche" Gruppierung ist die Stabilität der Cluster. Ist ein starker Anstieg des Distanzkoeffizienten von einer Fusionsebene zur nächsten zu beobachten, kann davon ausgegangen werden, daß diese Lösung Cluster von besonderer Stabilität liefert.

In Abbildung 9 ist dieses Stabilitätskriterium im Fusionsebenen-Diagramm im oberen Bereich der Grafik dargestellt. Stabilitätsplateaus sind hier als breite Balken erkennbar, insbesondere wenn diese von kürzeren Balken eingerahmt sind. Ein typisches Beispiel ist die Fusionsebene mit 28 resultierenden Clustern. Hier wird ein besonders breiter Balken von deutlich kürzeren eingerahmt, bzw. die Differenz der Distanzkoeffizienten zweier Fusionsebenen (= Breite der Balken) erreicht ein lokales Maximum. Obwohl eine 28 Cluster-Partition bei nur 45 Objekten grundsätzlich keine sinnvolle Interpretationsmöglichkeit erwarten läßt, soll kurz auf diese Lösung eingegangen werden.

Die Mehrzahl der Cluster bei dieser Lösung enthalten nur 1-3 Sorten und sind somit als Gruppen nicht interpretierbar. Es verbleibt nur ein großer Cluster, welcher ausschließlich von Sorten indonesischer Herkunft gebildet wird. Offensichtlich weist diese Gruppe eine wesentlich geringere genetische Diversität auf, als alle übrigen Sorten. Diese Sortengruppe setzt sich auch in Abbildung 8 rechts unten deutlich von den übrigen Sorten ab.

Bei Cluster-Partitionen mit wenigen Clustern, sind kaum deutliche Stabilitätsplateaus zu erkennen. Lösungen mit 4 bzw. 10 Clustern weisen leicht erhöhte Stabilität auf und sollen im weiteren kurz erläutert werden. In der 4 Cluster-Partition werden zwei große Gruppen gebildet, sowie zwei Sorten isoliert. Wie bereits erwähnt, werden bei der Gruppierung nach dem Average-Linkage Verfahren isolierte Objekte sehr spät eingegliedert und sind daher leicht identifizierbar. Die Sorten 'IAC-9' und 'Dorado' unterscheiden sich offensichtlich relativ stark von allen übrigen Gruppen und können daher als Ausreißer betrachtet werden. Beide Sorten sind in Abbildung 8 am Rande des gesamten Spektrums zu finden. Die beiden großen Cluster sind durch deutlich unterschiedliche Verteilung der Sortenherkünfte gekennzeichnet. Während im unteren Cluster alle Sorten aus Nigeria und Indonesien vereint sind, ist der überwiegende Teil der europäischen, brasilianischen und US-amerikanischen Sorten, sowie die Genbankakzessionen im oberen Cluster vertreten. Diese zwei Gruppen spiegeln direkt die Trennung an der Nullachse der 1. Dimension in Abbildung 8 wieder. Die Gruppen der 10 Cluster-Partition sind in Abbildung 9 durch graue Schattierung hervorgehoben. Bei dieser Lösung werden zusätzlich die Sorten 'Malabar' und 'Missoy' isoliert, und kommen damit als Außenseiter in Frage. Von den Sorten US-amerikanischer Herkunft, weist neben der Sorte 'Missoy', nur die Sorte 'Biloxi' einen negativen Wert in der 1. Dimension der multidimensionalen Skalierung auf (s. Abbildung 8). Neben drei weiteren kleinen Gruppen sind drei große Cluster erkennbar. Der unterste wird ausschließlich von nigerianischen und indonesischen Sorten gebildet. Die im oberen Bereich liegenden Cluster bestehen aus europäischen und US-amerikanischen, bzw. brasilianischen und US-amerikanischen Genotypen.

Insgesamt bietet die Average-Linkage Methode in diesem Fall eine wenig befriedigende Gruppenbildung, da entweder die Stabilität der Cluster gering ist, oder zu viele Cluster gebildet werden. Ein weiteres Problem dieser Clustermethode liegt darin begründet, daß in der 15., 30. und 37. Fusionierungsebene kein Zuwachs des Distanzkoeffizienten

auftritt. Dies bedeutet, daß in diesen Ebenen zwei verschiedene Clusterfusionen gleichzeitig erfolgen müßten. Da dies in der hierarchischen Clusteranalyse nicht vorgesehen ist, kann es hier zu Zufallsentscheidungen kommen, welche das weitere Verfahren beeinflussen und somit in Frage stellen. Deshalb wird eine weitere Clusteranalyse nach der Minimal-Varianz Methode durchgeführt, um homogene Gruppen zu identifizieren. Der besondere Wert des oben dargestellten Verfahrens liegt jedoch in der Identifikation von Objekten, welche sich nur schwer in andere Gruppen eingliedern lassen. Dies ist mit der Isolierung der Sorten 'IAC-9', 'Dorado', 'Missoy' und 'Malabar' eindeutig gelungen. Weitere Genotypen, welche einer vorsichtigen Interpretation bedürfen sind 'Doko RC' 'Biloxi', 'Tambora', 'PI159322' und 'PI381674'.

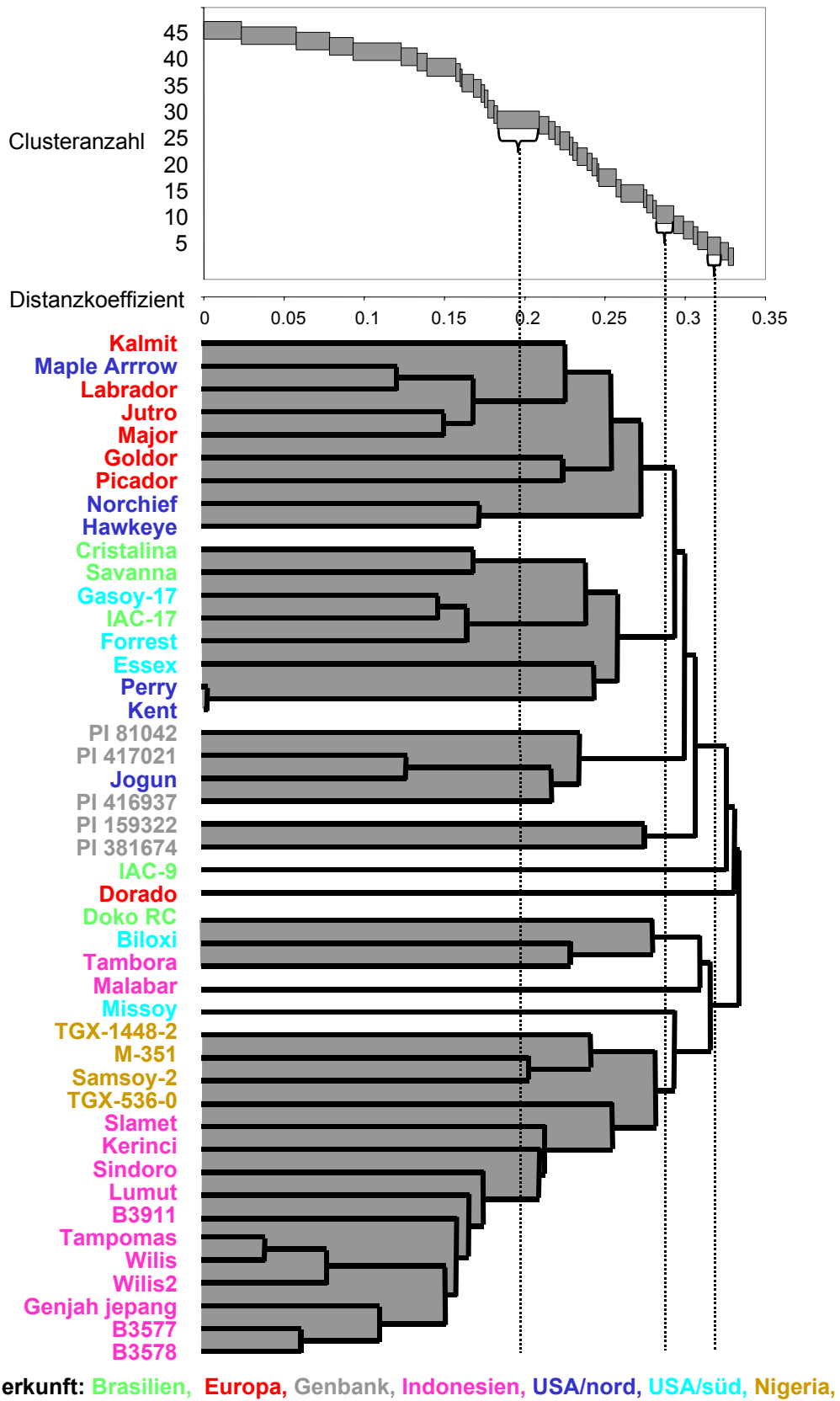


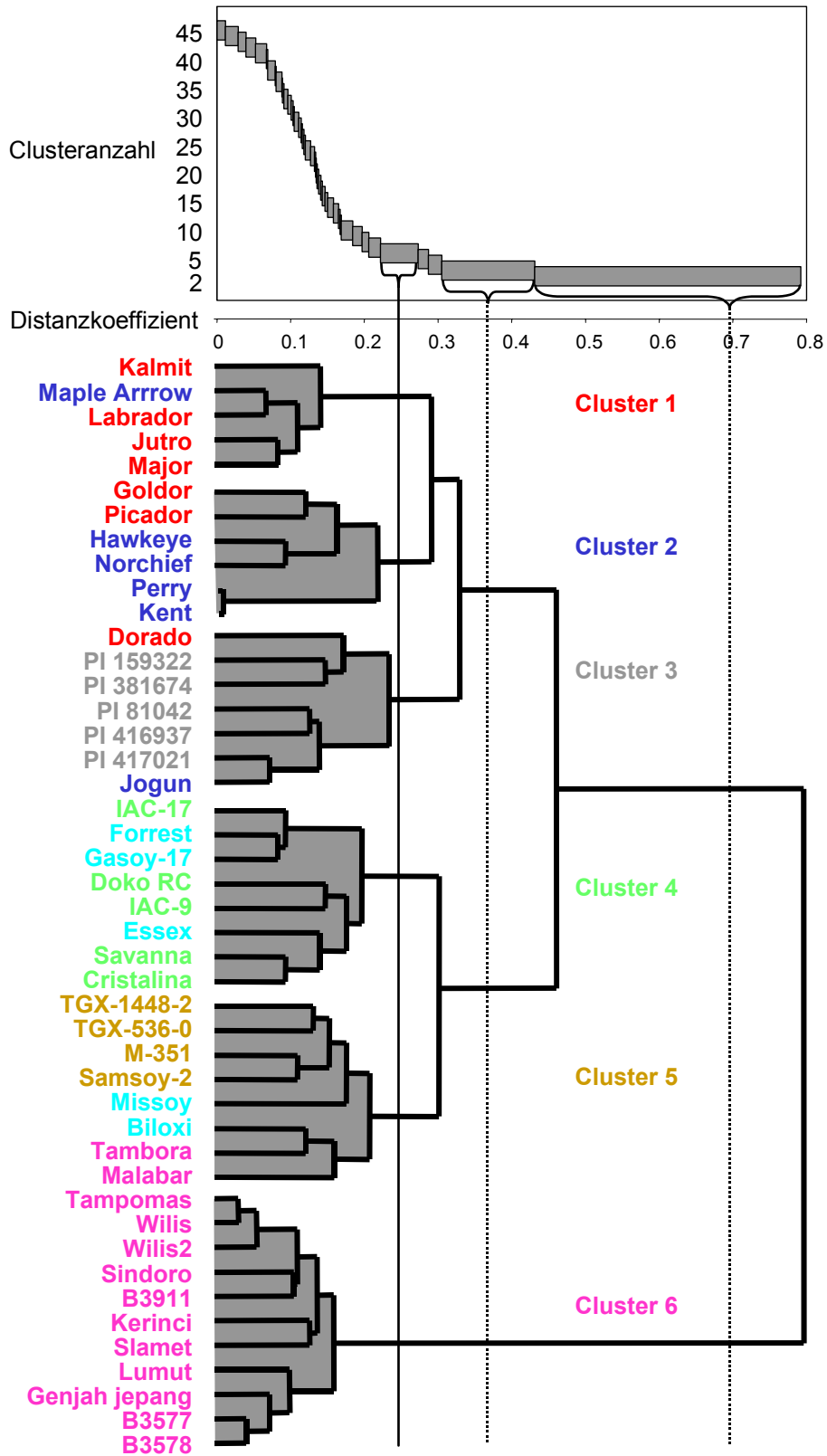
Abbildung 9: Fusionsebenen-Diagramm und Dendrogramm der Average Linkage Gruppierungsmethode

### 3.1.3.2 Minimal-Varianz Methode

Wie bereits erwähnt, hat diese Methode zur Clusterbildung die Tendenz, Gruppen einheitlicher Größe zu bilden und dabei auch Außenseiter einzubinden. Gelegentlich wird daher vorgeschlagen, mögliche Außenseiter von einer Analyse mit dieser Methode auszuschließen. Dies wurde hier nicht durchgeführt, da für bessere Vergleichbarkeit, Wert auf eine einheitliche Datengrundlage gelegt wurde. Wie im Balkendiagramm im oberen Bereich der Abbildung 10 zu erkennen ist, nimmt der Distanzkoeffizient bei den letzten beiden Fusionsebenen stark zu, und weist damit auf Lösungsmöglichkeiten hin. Beide Fusionsschritte stellen jedoch keine lokalen Stabilitätsmaxima dar und sind daher keine optimalen Lösungen. Als wesentlich elegantere Lösung zeigt sich dagegen die 6 Cluster-Partition mit einem deutlich erkennbaren Stabilitätsplateau. Außerdem enthalten alle Gruppen genügend Sorten für eine sinnvolle Interpretation. Daher wird im folgenden diese Partition näher betrachtet.

Die resultierenden Cluster enthalten zwischen 4 und 11 Sorten. Der Größte wird ausschließlich von indonesischen Sorten gebildet. Diese Gruppe bleibt bis zum letzten Fusionsschritt unverändert erhalten, was darauf hinweist, daß sie sich von den übrigen Sorten deutlich unterscheidet und eine hohe Stabilität aufweist. In Abbildung 8 nimmt diese Gruppe alleine den unteren rechten Quadranten ein.

Alle weiteren Cluster werden von Genotypen verschiedener Herkunft gebildet. Dennoch ist eine Ordnung der Sorten nach Herkunft erkennbar. Alle brasilianischen Sorten sind in Cluster 4, alle nigerianischen Sorten in Cluster 5 zu finden. Alle Genbankakzessionen sind ebenfalls in einem Cluster vereinigt, welcher von diesen dominiert wird. Eine stärkere Aufspaltung zeigen die europäischen und US-amerikanischen Sorten. Die europäischen Sorten sind in den Clustern 1, 2 und 3 zu finden, wobei Cluster 1 dominiert wird. Die Sorte 'Dorado', welche sich in einer Gruppe mit den Genbankakzessionen befindet, wurde bereits in 3.1.3.1 als Außenseiter identifiziert. Ihre Gruppierung muß daher als unsicher betrachtet werden. US-amerikanische Sorten sind in fünf verschiedenen Clustern zu finden und weisen damit die größte Variabilität auf. Die US-amerikanischen Sorten können jedoch anhand der Reifegruppe in zwei Herkünfte getrennt werden. Die Sorten mit einer Reifegruppe von IV oder darunter, bilden die Herkunft der "nördlichen USA", die spätreifen Sorten mit Reifegruppen über IV bilden die Herkunft der "südlichen USA". Nach dieser Trennung ist auch die Verteilung der amerikanischen Sorten besser interpretierbar. Sorten aus den nördlichen USA befinden sich überwiegend in Cluster 2. Die Sorte 'Maple Arrow' wurde zu Cluster 1, die Sorte 'Jogun' in Cluster 3 gruppiert. Drei Sorten aus den südlichen USA bilden gemeinsam mit den brasilianischen Genotypen den Cluster 4. Die Sorten 'Missoy' und 'Biloxi' wurden zu Cluster 5 gruppiert, welcher von nigerianischen Genotypen dominiert wird. Zusätzlich enthält dieser zwei indonesische Sorten. Alle vier nicht nigerianischen Sorten in diesem Cluster, wurden in der Average-Linkage Methode als mögliche Außenseiter identifiziert, daher ist ihre Gruppenzuordnung etwas unsicher.

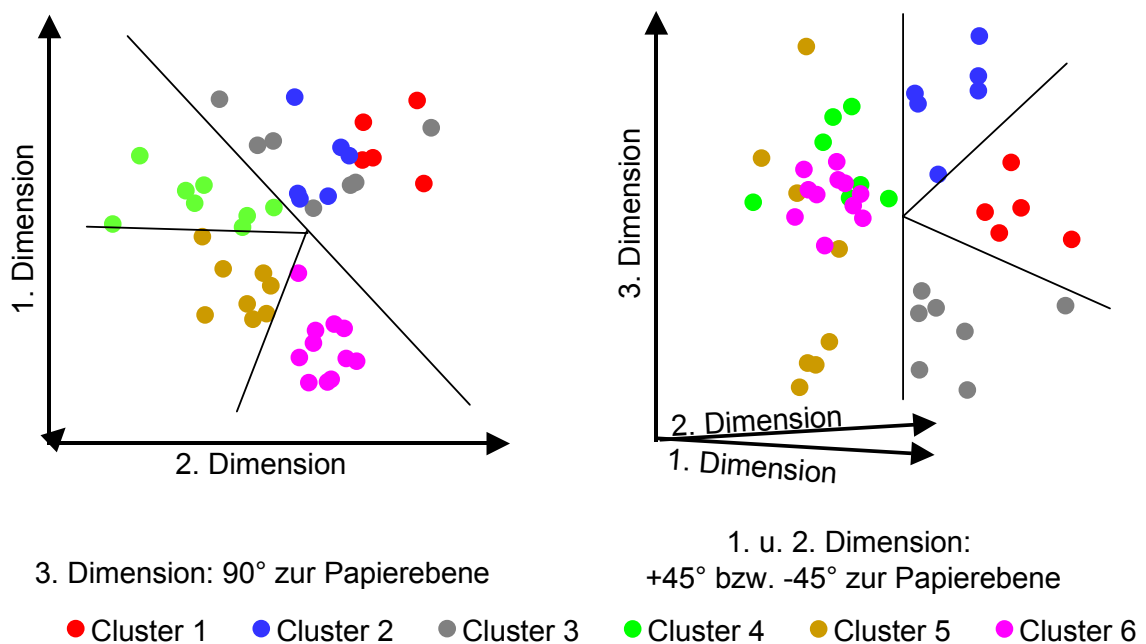


Herkunft: **Brasilien**, **Europa**, Genbank, **Indonesien**, **USA/nord**, **USA/süd**, **Nigeria**,

Abbildung 10: Fusionsebenen-Diagramm und Dendrogramm der Minimal-Varianz Gruppierungsmethode



Obwohl die Dendrogramme aus beiden Clusteranalyse-Methoden auf den ersten Blick sehr unterschiedlich erscheinen, sind Gruppierungen weitgehend übereinstimmend. Der oberste Cluster in Abbildung 9 korrespondiert direkt mit den Clustern 1 und 2 in Abbildung 10. Den einzigen Unterschied bilden die beiden Sorten 'Perry' und 'Kent', welche in Abbildung 9 im zweiten Cluster von oben zu finden sind. Dieser unterscheidet sich wiederum nur in den erwähnten Sorten von Cluster 4 der Minimal-Varianz Methode. In beiden Clustermethoden wird eine sehr stabile und homogene Gruppe indonesischer Sorten gebildet. In der 10 Cluster-Partition in Abbildung 9 ist diese Gruppe bereits mit nigerianischen Sorten zu einer Gruppe vereint. Die nigerianischen Sorten scheinen also in der Zuordnung weniger stabil zu sein. Während sie nach der Average-Linkage Methode mit den indonsischen Genotypen vereint sind, tendieren sie nach dem Minimal-Varianz Verfahren eher zu den südamerikanischen Sorten. Die Betrachtung von Abbildung 8 zeigt, daß beide Lösungen sinnvoll sind, da diese Sorten etwa zwischen den indonesischen und den brasilianischen Sortengruppen zu finden sind. Die Genbanknummern von Cluster 3 sind in der Average-Linkage Methode in zwei Cluster aufgeteilt, aber immer noch erstaunlich homogen.



**Abbildung 11: Darstellung der 6 Cluster-Partition der Minimal-Varianz Methode im dreidimensionalen Raum der multidimensionalen Skalierung**

Die Güte einer Clusterlösung kann leicht beurteilt werden, indem die Clusterzugehörigkeit in einer multidimensionalen Karte dargestellt wird. In Abbildung 11 ist die Verteilung der Sorten im dreidimensionalen Raum der Skalierung aus 3.1.2 dargestellt. Die Sorten wurden entsprechend ihrer Clusterzugehörigkeit markiert. Im linken Teil der Grafik ist die senkrechte Projektion auf die ersten beiden Dimensionen dargestellt (entspricht Abbildung 8). Eine diagonale Linie, welche in der 3. Dimension eine Ebene senkrecht

zur Papierebene aufspannt, trennt die ersten drei Cluster von den Clustern 4, 5 und 6. Diese drei Cluster können durch zwei weitere Flächen von einander isoliert werden. Die Cluster 1-3 können in den ersten beiden Dimensionen nicht von einander getrennt werden. Der Wert der 3. Dimension wird im rechten Teil der Grafik deutlich. Hier ist eine 45° Projektion der Dimensionen eins und zwei dargestellt. Diese Projektion läßt sich leicht vorstellen, indem man in Gedanken, die linke Grafik zuerst um 45° um den Ursprung dreht, und anschließend um 90° nach hinten kippt. Die zuerst eingeführte Trennebene kann wiederum als Linie dargestellt werden, da sie senkrecht zur Papierebene steht. Jetzt lassen sich die Cluster 1-3 leicht durch zwei weitere Linien (Flächen) von einander trennen. Die Cluster 4-6 überlagern sich in dieser Projektion. Die 3. Dimension ist also nötig, um die Cluster vollständig differenzieren zu können. Mit einer Ebene und vier Flächen, welche sich alle etwa im Nullpunkt der drei Dimensionen berühren, können die Cluster fehlerfrei getrennt werden.

Bis auf Cluster 5, zeigen alle Cluster in den drei Dimensionen relativ geringe Streuung, bilden also homogene Gruppen. Für Cluster 5 gilt dies jedoch nur für die ersten beiden Dimensionen. In der 3. Dimension ist eine sehr starke Streuung zu erkennen. Daher weist Cluster 5 auch die größten durchschnittlichen Distanzen innerhalb der Gruppe auf (s. Tabelle 15). Die geringsten Distanzen innerhalb der Gruppe zeigt sich bei Cluster 1. Kaum größer ist die mittlere genetische Distanz innerhalb des indonsischen Clusters 6, obwohl er mehr als doppelt so viele Genotypen enthält wie Cluster 1. Die Cluster 3 und 6 unterscheiden sich am deutlichsten mit einer durchschnittlichen Distanz von 0.343.

**Tabelle 15: Mittlere genetische Distanzen innerhalb und zwischen den Clustern**

<i>Cluster</i>	1	2	3	4	5	6
1	0.128					
2	0.274	0.166				
3	0.297	0.312	0.212			
4	0.318	0.298	0.313	0.197		
5	0.339	0.326	0.328	0.308	0.223	
6	0.342	0.330	0.343	0.324	0.289	0.149

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit der 6 Cluster-Partition der Minimal-Varianz Methode mit hoher Sicherheit eine sehr gute, bis optimale Gruppierung gefunden wurde, welche die Datenstruktur der genetischen Distanzen gut wiedergibt.

### 3.1.4 Merkmalskorrelation

Nachdem eine erfolgreiche Gruppierung der Genotypen durchgeführt wurde, soll im folgenden der Versuch unternommen werden, Sortenmerkmale zu identifizieren, welche zu den verschiedenen Clustern korrelieren. Bereits die Betrachtung der Ergebnisse der multidimensionalen Skalierung, legte die Vermutung nahe, daß die Herkunft ein Hauptfaktor in der genetischen Struktur der Sorten ist. Diese Vermutung wurde von der Clusteranalyse bestärkt. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden die Korrelationen zwischen der Gruppenzuordnung nach Herkunft bzw. Cluster errechnet. Zuvor wurde die Gruppierung nach der Herkunft, entsprechend der Informationen der Clusteranalyse, angepaßt. Die Trennung der US-amerikanischen Sortengruppe in eine frühreife und eine spätreife Gruppe wurde bereits erwähnt. Die spätreife Gruppe aus den südlichen USA wurde jetzt mit den brasilianischen Sorten in einen vermuteten Genpool "tropisches Amerika" vereinigt. Die Korrelationen der so gebildeten Herkunftsgruppen zu den identifizierten Clustern, sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Korrelation zwischen den Clustern und den jeweils vermuteten zugrundeliegenden Herkünften ist in allen Fällen hoch signifikant und eindeutig.

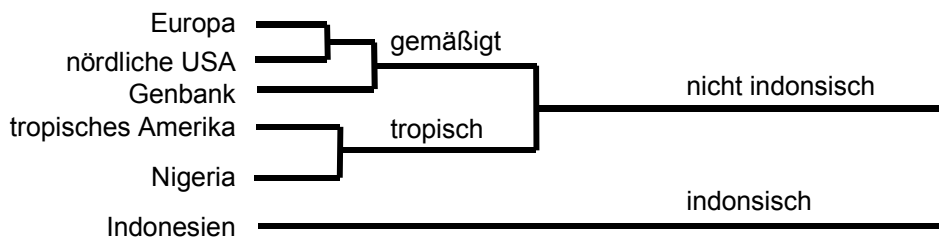
Die Ursache für die, aus den Markerdaten abgeleitete, Clustergruppierung wurde damit zweifelsfrei identifiziert.

**Tabelle 16: Korrelation zwischen Clustern und Herkunftsgruppen.**

	<i>Europa</i>	<i>USA nord</i>	<i>Genbank</i>	<i>tropisches Amerika</i>	<i>Nigeria</i>	<i>Indonesien</i>
Cluster 1	0.63**	0.07	-0.13	-0.19	-0.11	-0.23
Cluster 2	0.19	0.62**	-0.14	-0.21	-0.12	-0.25
Cluster 3	-0.02	0.01	0.82**	-0.23	-0.13	-0.27
Cluster 4	-0.2	-0.18	-0.16	0.87**	-0.15	-0.3
Cluster 5	-0.2	-0.18	-0.16	0.03	0.67**	-0.04
Cluster 6	-0.24	-0.22	-0.2	-0.3	-0.18	0.89**

Neben der Zuordnung der Sorten zu bestimmten Genpools, entsprechend ihrer Clusterzugehörigkeit in der 6 Cluster-Partition, können auch weitere Clusterlösungen sinnvoll interpretiert werden. In Abbildung 12 ist ein reduziertes Dendrogramm der Ward-Methode dargestellt. In der 2 Cluster-Partition werden die Sorten klar in einen indonesischen und einen nicht indonesischen Genpool getrennt. Der nächste Schritt spaltet den nicht indonesischen Genpool offensichtlich in eine Gruppe von Sorten aus tropischem Klima und eine Gruppe mit Sorten aus gemäßigttem Klima. Die "tropische" Gruppe enthält den nigerianischen und den tropisch-amerikanischen Genpool. Der

"gemäßigte" Cluster enthält die Genpools aus Europa, dem nördlichen Amerika, und die Genbanknummern. Drei der Genbankakzessionen gehören jedoch den Reifegruppen V bzw. VI an und passen daher nicht zur erwähnten Interpretation der Cluster. Die Aufspaltung der Genotypen in zwei Gruppen unterschiedlicher Klimaanpassung entspricht der ersten Trennebene in Abbildung 11. In der räumlichen Darstellung kann also eine Anordnung der Sorten nach Klimaanpassung gefunden werden. Hier scheint eine phänotypische Eigenschaft der Sorten für die Verteilung verantwortlich zu sein. Eine gemeinsame Zuchtgeschichte liegt vermutlich nicht vor, da sich der indonesische Genpool deutlich vom tropisch-amerikanischen Genpool unterscheidet.



**Abbildung 12: Dendrogramm der Gruppen und Clustereigenschaften**

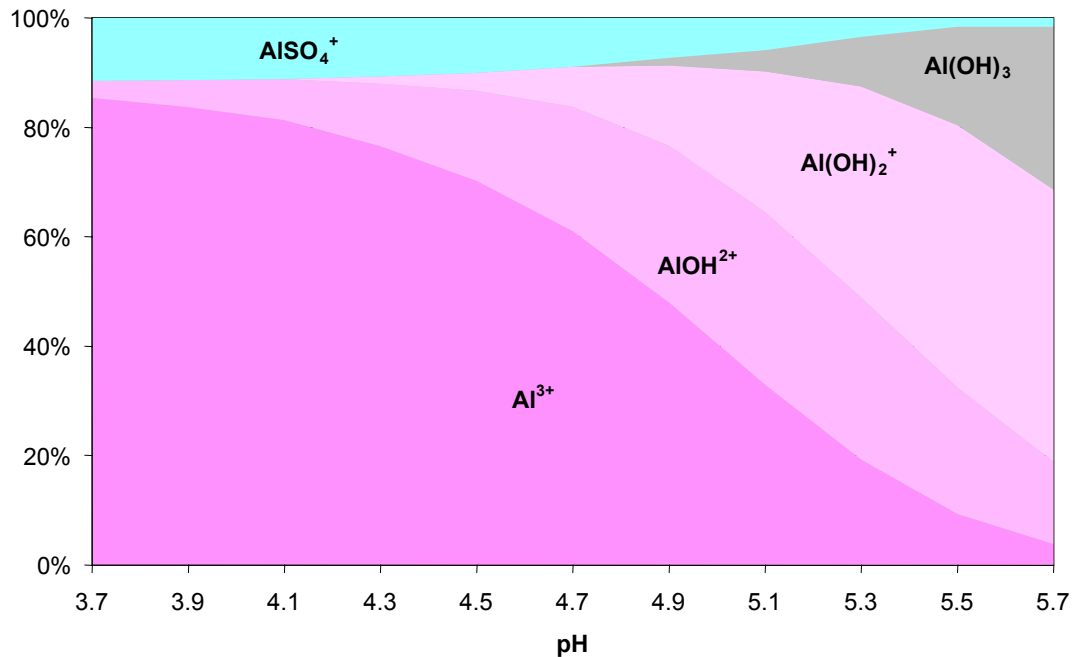
Eine Gruppierung entsprechend weiterer phänotypischer Eigenschaften, wie Blütenfarbe, Wuchstyp oder Al-Toleranz, konnte nicht identifiziert werden. Dies ist auch nicht zu erwarten, da zufällig gewählte molekulare Marker eingesetzt wurden. Selbst wenn einige dieser Marker mit einer bestimmten Eigenschaft korreliert wären, würde diese Information von den übrigen, gleich gewichteten Markern überdeckt. Es können also nur stark multigene Eigenschaften, welche große Bereiche des Genoms betreffen, die Gruppenbildung in dieser Analyse beeinflussen.

## 3.2 Modellierung von Ionengleichgewichten

Aluminium bildet in wässrigen Lösungen eine Vielzahl unterschiedlicher anorganischer und organischer Komplexe. Aluminium-Hydroxy-Komplexe entstehen durch schrittweise Hydrolyse des  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  Ions welches üblicherweise vereinfachend als  $\text{Al}^{3+}$  dargestellt wird. Die Toxizität der gebildeten Ionenspezies gegenüber Pflanzenwurzeln ist sehr unterschiedlich (NOBLE ET AL., 1988; PAVAN ET AL., 1982). Da eine direkte oder indirekte Messung einzelner Ionenspezies ohne Eingriff in das Lösungssystem sehr problematisch ist (BLOOM UND ERICH, 1996), wurden die Verteilung der Al-Ionenspezies durch Modellierung mit dem Computerprogramm MINTEQA2 (ALLISON ET AL., 1991) geschätzt.

Von entscheidender Bedeutung für die Toxizität von gelöstem Aluminium ist der pH-Wert. Daher wurde zunächst die Verteilung verschiedener Al-Ionenspezies in Abhängigkeit vom pH-Wert berechnet. Die Ionenkonzentrationen in der Modellrechnung entsprachen der vereinfachten Nährlösung, welche für die Sand- und Filterversuche genutzt wurde (s. 2.3). Die Gleichgewichtsverhältnisse wurden für Al-Konzentrationen im Bereich von 20-400  $\mu\text{M}$  berechnet. Dabei zeigten sich nur geringfügige Unterschiede in den Anteilen der Ionenspezies in Abhängigkeit von der Gesamt Al-Konzentration. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Verteilung bei 400  $\mu\text{M}$  Al. Der starke Einfluß des pH-Werts zeigt sich dagegen deutlich. Im weiteren wird besonders auf  $\text{Al}^{3+}$  eingegangen, da davon ausgegangen wird, daß dieses Ion hauptverantwortlich für toxische Reaktionen ist (s. 4.1.1).

Bei pH-Werten von 3.7 und darunter bildet sich ein Gleichgewicht zwischen freiem  $\text{Al}^{3+}$  und dem  $\text{AlSO}_4^+$  Komplex aus, welches unter den gewählten Bedingungen bei etwa 8:1 liegt. Dieses Verhältnis ändert sich je nach Al bzw.  $\text{SO}_4^-$  Konzentration, wobei bei sinkenden  $\text{SO}_4^-$  Konzentrationen Aluminium zunehmend als  $\text{Al}_3^+$  vorliegt. Mit steigenden pH-Werten wird  $\text{Al}_3^+$  zunehmend durch Al-Hydroxy-Komplexe ersetzt. Während  $\text{AlOH}^{2+}$  schon unter pH 4.0 zu einem geringen Anteil vorkommt und bei pH 5.1 einen maximalen Anteil von ca. 30% erreicht, erscheint  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  bei einem pH von etwa 4.3 erstmals in der Lösung und nimmt bei pH 5.7 nahezu 50 % des gelösten Aluminium ein. Bei dieser Modellrechnung wurde nur die gelöste Form des  $\text{Al}(\text{OH})_3$  Komplexes einbezogen, die Präzipitation zu Gibbsit wurde in diesem Modell ausgeschlossen, um das System zu vereinfachen. Der neutrale  $\text{Al}(\text{OH})_3$  Komplex entsteht bei pH Werten über 4.7 und nimmt bis pH 5.7 stetig zu. Es ist zu erwarten, daß  $\text{Al}(\text{OH})_3$  aufgrund geringer Löslichkeit über pH 5.0 ausfällt. Da die Präzipitation aber ausgeschlossen wurde ist das Modell in diesem Bereich nicht mehr verlässlich. Der Aluminium-Sulfat Komplex ist besonders im sauren Bereich stabil und wird bei höheren pH-Werten von den Hydroxy-Komplexen verdrängt.

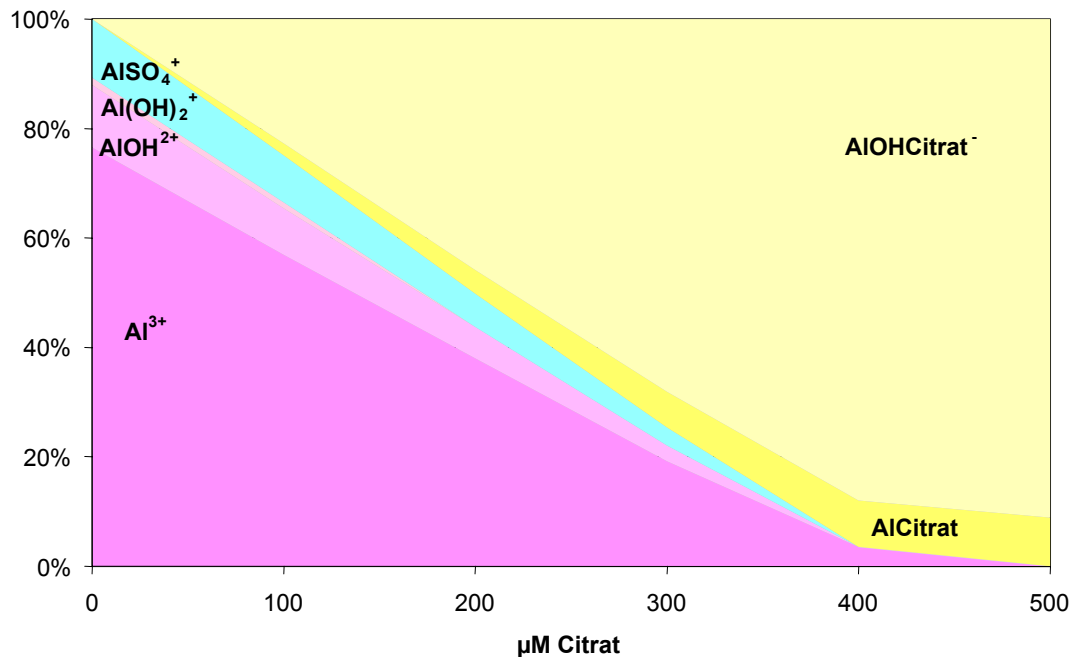


**Abbildung 13: Anteile unterschiedlicher Aluminiumionenspezies am gelösten Aluminium bei verschiedenen pH-Werten**

Im Bereich von pH 4.5 bis etwa 5.3 ist die stärkste Abnahme des  $\text{Al}^{3+}$ -Ions zu beobachten. Dies bedeutet, daß in diesem Bereich eine geringfügige Änderung des pH-Wertes eine deutliche Änderung der Verfügbarkeit des  $\text{Al}^{3+}$ -Ions bewirkt und sich damit die Toxizität der Lösung ändert. Aus diesem Grund wurde dieser pH-Bereich bei Versuchen zur Al-Toxizität nicht gewählt um instabile Versuchsergebnisse durch leichte pH-Schwankungen zu vermeiden. Unter pH 4.5 flacht die  $\text{Al}^{3+}$ -Kurve deutlich ab und das System reagiert weniger empfindlich auf pH-Schwankungen. Desweiteren ergibt sich aus Abbildung 13, daß bei der Herstellung von Nährlösungen, pH-Werte von über 4.8 zu vermeiden sind, um die Präzipitation von Gibbsit ( $\text{Al(OH)}_3$ ) auszuschließen. Die Lösung muß also vor Zugabe von Aluminium auf einen pH-Wert von 4.8 eingestellt werden. Eine tiefere Absenkung des pH-Wertes ist ebenfalls zu vermeiden, da der pH-Wert bei Zugabe von  $\text{AlCl}_3$  unter den Zielwert absinken kann. Wenn in diesem Fall der pH-Wert mit NaOH angehoben werden muß, besteht die Gefahr, daß durch ungleichmäßige Vermischung verschiedene Al-Hydroxy-Polymere (z.B.  $\text{Al}_{13}$ ) gebildet werden können (BERTSCH UND PARKER, 1996). Über die toxische Wirkung dieser Al-Hydroxy-Polymere, sowie deren Lösungsverhalten besteht noch weitgehende Unklarheit (s. 4.1.1). Die Toxizität einer Al-Lösung wird also unter Umständen nicht nur durch ihre Zusammensetzung bestimmt, sondern auch durch die Art wie sie hergestellt wird.

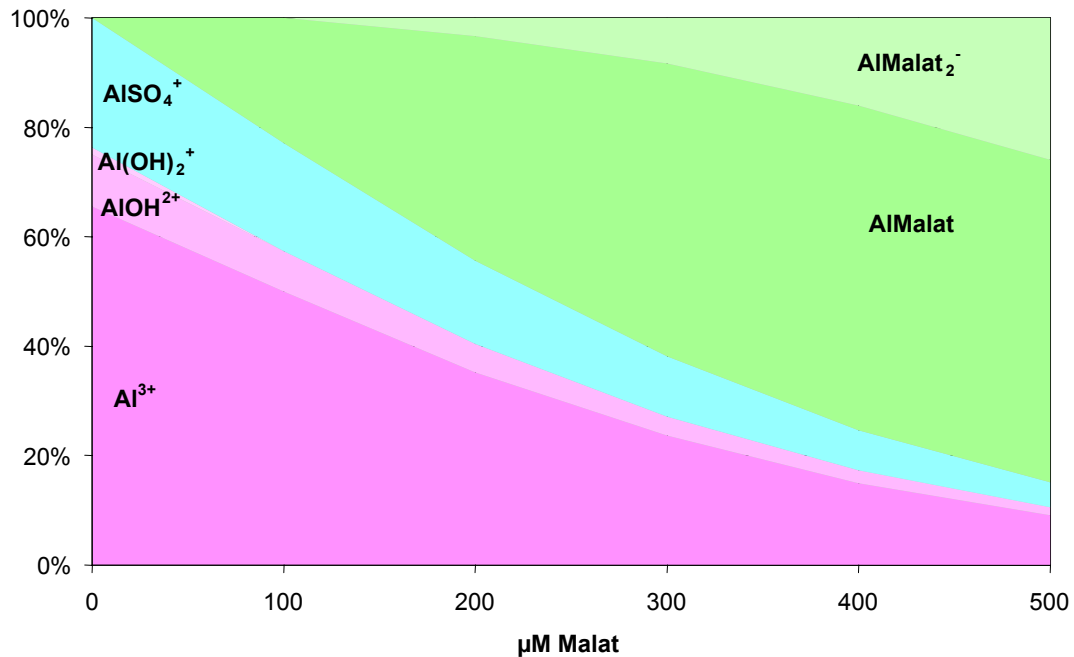
Neben anorganischen Ionen bildet  $\text{Al}^{3+}$  auch mit organischen Molekülen, wie niedermolekularen organischen Säuren, Hydroxy-Phenolen, und Huminstoffen, Komplexe. In organisch komplexierter Form ist Aluminium deutlich weniger toxisch (SUHAYDA UND HAUG, 1986). Aufgrund der Ergebnisse aus 3.3.3.2 wurden weitere Modellrechnungen

unter Einbeziehung der Ionen Citrat<sup>3-</sup> und Malat<sup>2-</sup> durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Rechnung sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 14: Prozentuale Verteilung unterschiedlicher Aluminiumionenspezies, bei verschiedenen Citrat-Konzentrationen in einer 400 µM Aluminium Lösung**

In Abbildung 14 ist zu erkennen, daß mit zunehmender Citratkonzentration Al<sup>3+</sup> bis 400 µM Citrat linear abnimmt, AlOHCitrat<sup>-</sup> und AlCitrat dagegen linear zunimmt. Dies beruht auf einer nahezu vollständigen Komplexierung von Citrat, solange ausreichend Aluminium verfügbar ist. Citrat bildet also sehr starke Komplexe mit Al<sup>3+</sup> und verdrängt Aluminium aus den OH<sup>-</sup> und SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Komplexen. Unter den gewählten Bedingungen dominiert der AlOHCitrat Komplex gegenüber dem AlCitrat Komplex.



**Abbildung 15: Prozentuale Verteilung unterschiedlicher Aluminiumionenspezies, bei verschiedenen Malat-Konzentrationen in einer 400 µM Aluminiumlösung**

Im Vergleich zu Citrat bildet Malat schwächere Komplexe mit Aluminium aus. Dies wird in der nicht linearen Beziehung zwischen Konzentration und Anteil an Malat-Komplexen deutlich (s. Abbildung 15). Im Gegensatz zu Citrat kommt Malat bei Anwesenheit von  $\text{Al}^{3+}$  auch als freies Ion in der Lösung vor. Daher ist zu erwarten, daß Malat eine geringere Effizienz bei der Entgiftung von Aluminium in sauren Lösungen aufweist. Bei einem äquimolaren Verhältnis von Malat und Aluminium liegen noch etwa 15 % des Al als  $\text{Al}^{3+}$  vor, während unter gleichen Voraussetzung bei Citrat nur etwa 3 %  $\text{Al}^{3+}$  vorliegen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sowohl Citrat als auch Malat freies  $\text{Al}^{3+}$  komplexieren und dadurch in der Lage sind Aluminium in sauren Lösungen zu entgiften, wenn sie in ähnlich hohen Konzentrationen wie Aluminium vorliegen.



### 3.3 Kulturversuche

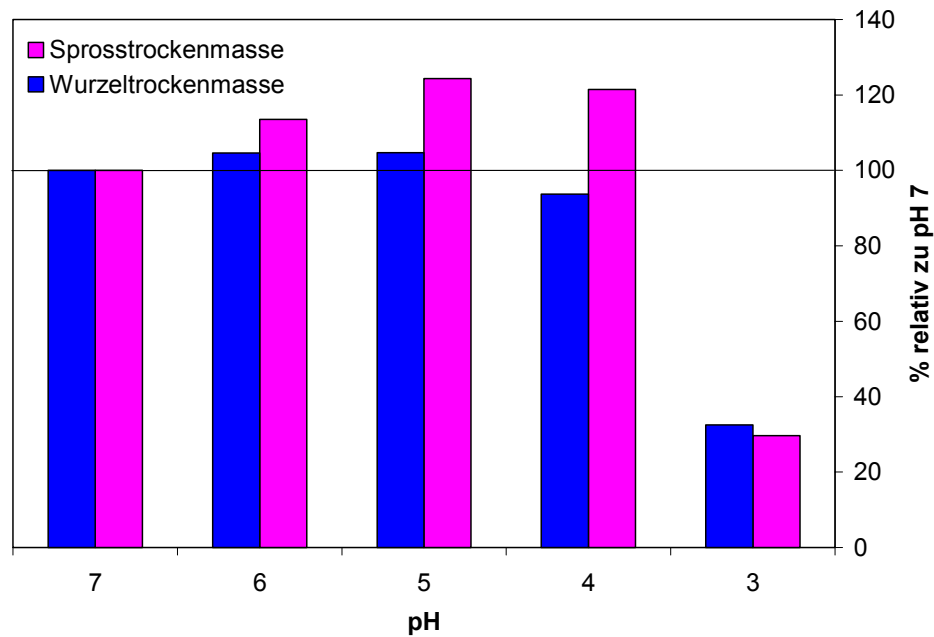
Für die Analyse sortenspezifischer Reaktionen gegenüber Streßbedingungen, wurden die brasilianischen Sorten 'BR 40, BR86-9508, Cristalina, Doko RC' und 'IAC 17', die indonesischen Sorten 'Kerinci, Malabar, Sindoro, Slamet, Tambora, Tampomas und Wilis' die nigerianischen Linien 'M 351, TGX-1448-2, TGX-536-02, TGX-923-2E', sowie die europäische Sorte 'Kalmit' ausgewählt. Ziel der Versuche war es, eine Methode zu entwickeln, welche einen schnellen und sicheren Test auf Al-Toleranz ermöglicht. Dabei sollten zugleich Sorten mit deutlich unterschiedlicher Reaktion gegenüber Al-Streß identifiziert werden, um diese für die Entwicklung von Inzuchtpopulationen für eine Kartierung von Toleranzgenen zu nutzen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob bei verschiedenen Genotypen unterschiedliche Toleranzstrategien auftreten. Gene, welche unterschiedlichen Toleranzstrategien zugrunde liegen, könnten züchterisch akkumuliert werden, um einen Genotypen mit hervorragender Al-Toleranz zu entwickeln. Um die genannten Ziele zu verwirklichen, mußten verschiedene Kulturmethoden eingesetzt werden, um sowohl sorten- als auch kulturspezifische Reaktionen identifizieren, und in Beziehung setzen zu können.

#### 3.3.1 Säure-Streß Versuche

Wie die Ergebnisse aus 3.2 zeigen, ist die Applikation von Al-Streß nur bei sauren pH-Werten möglich. Um die Einflüsse Al- und pH-Streß getrennt beurteilen zu können, wurden Kulturversuche mit niedrigen pH-Werten, aber ohne Al durchgeführt. Das Ziel der Versuche war, einen pH-Bereich zu ermitteln, bei welchem sich Säureschäden und Al-Toxizität möglichst wenig überlagern.

##### 3.3.1.1 Sandkultur

Die relative Trockenmasse von Wurzel und Sproß ist in Abbildung 16 über alle Sorten gemittelt dargestellt. Die Wurzeltrockenmasse unterscheidet sich in den Varianten pH 7, pH 6 und pH 5 nicht signifikant. In der Variante pH 4 ist das Wurzelwachstum geringfügig, aber signifikant geringer. Bei pH 3 wird eine massive Einschränkung des Wurzelwachstums sichtbar. Die, gegenüber der pH 7-Variante erhöhte Sproßtrockenmasse in den Varianten mit pH 4-6 kann statistisch abgesichert werden. Ein Maximum tritt bei pH 5 mit 124 % auf. Besonders deutlich wird hier der Übergang von pH 4 mit 121 % auf pH 3 mit 30 %. Ein pH-Wert im Bereich zwischen 5 und 6 dürfte nach diesen Ergebnissen optimales Wachstum ermöglichen. Der pH-Wert von 4 stellt einen Grenzbereich dar. Während die Sproßentwicklung offenbar noch normal ist, wird das Wurzelwachstum hier bereits geringfügig eingeschränkt. Unterhalb von pH 4 ist das Wachstum von Wurzel und Sproß deutlich eingeschränkt, was auf eine Säureunverträglichkeit schließen läßt.

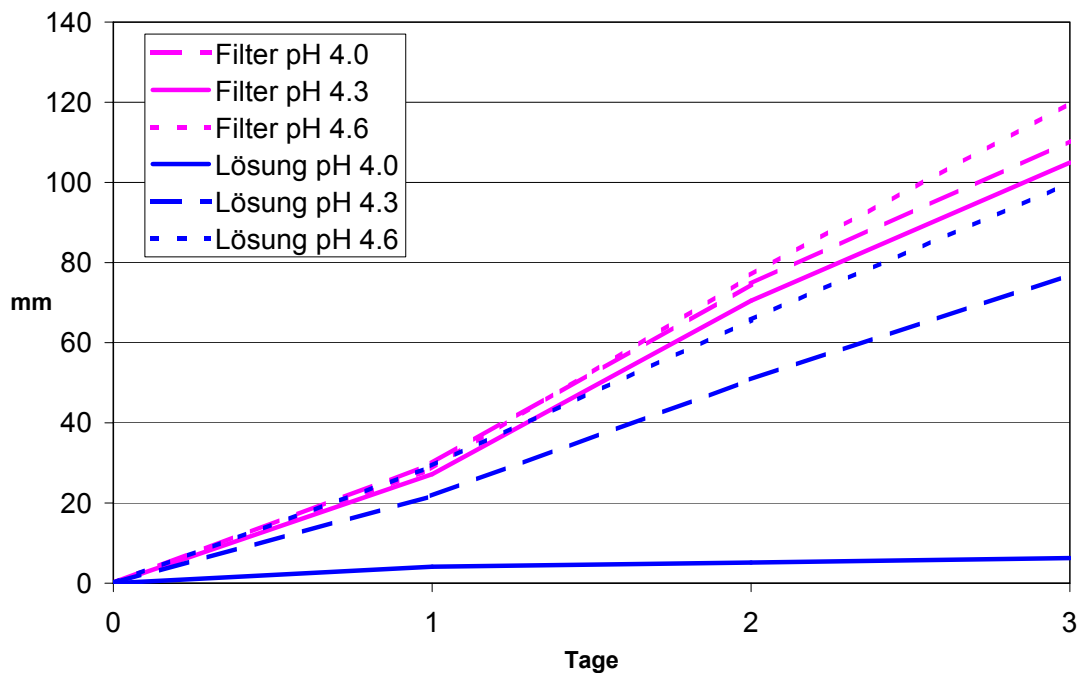


**Abbildung 16: Mittlere relative Trockenmasse von Sproß und Wurzel bei verschiedenen pH-Werten**

### 3.3.1.2 Filter und Lösungskultur

Bei einem Lösungsversuch mit den pH-Varianten 3.5, 4.0, und 4.5 zeigte sich, daß bei einem pH-Wert von 3.5 das Wurzelgewebe innerhalb von 24 h bis etwa 3 cm hinter der Wurzelspitze zerstört wurde. Bei pH 4.0 war das Wurzelwachstum völlig unterbunden, das Gewebe aber noch intakt, d.h. nach Transfer in einen höheren pH-Wert wieder wachstumsfähig. Das Wachstum bei pH 4.5 war mit über 1.5 mm/h nach 3 Tagen nahezu ungestört.

Zur genaueren Differenzierung des pH-abhängigen Wurzelwachstums im Bereich zwischen pH 4 und pH 5, wurde eine weitere Versuchsreihe mit den pH-Varianten pH 4.0, 4.3 und 4.6 in Lösungs- und Filterkultur durchgeführt. In Abbildung 17 ist die, über Sorten gemittelte, absolute Wurzellänge während des Versuchs dargestellt.

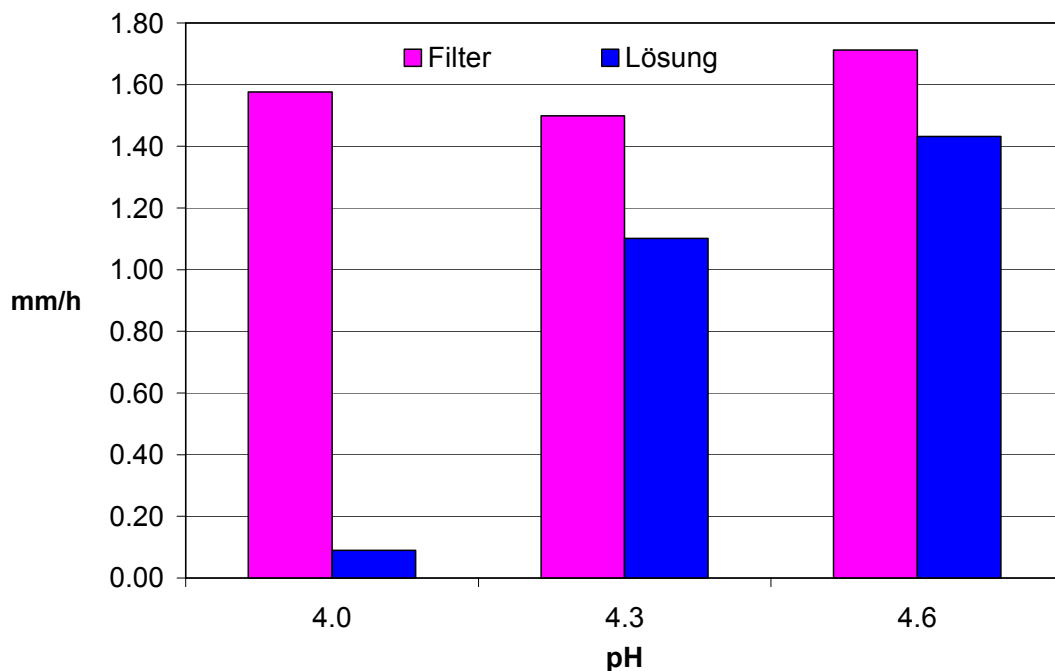


**Abbildung 17: Durchschnittlicher zeitlicher Verlauf der Wurzellänge bei verschiedenen pH-Werten und Kulturmethoden.**

Bei der Betrachtung der Filterkultur fällt auf, daß die Wurzellänge in allen pH-Stufen größer ist, als in der Lösungskultur. Die Differenzierung des Wurzelwachstums bei verschiedenen pH-Werten ist nur schwach ausgeprägt. Bei allen Sorten war die Wurzellänge nach 3 Tagen in der pH 4.6 Variante am längsten, gefolgt von der pH 4.0 und der pH 4.3 Variante. Bei einem mittleren Wachstum von 1.58 mm/h über 3 Tage in der pH 4.0 Variante kann davon ausgegangen werden, daß keine nennenswerte Beeinträchtigung des Wurzelwachstums durch den niedrigen pH-Wert hervorgerufen wurde. Von den 17 untersuchten Sorten war nur bei einer Sorte ein signifikanter Unterschied zwischen der pH 4.0 und der pH 4.6 Variante nachweisbar. Auch diese Sorte ('Malabar') zeigte mit 1.64 mm/h in der niedrigsten pH-Variante ein annähernd normales Wurzelwachstum.

Die Reaktion des Wurzelwachstums auf sauren pH stellt sich in Lösungskultur völlig anders dar. Hier ist eine Differenzierung zwischen den Versuchsvarianten deutlich erkennbar. Bei einem pH-Wert von 4.0 in der Nährlösung, wurde das Wurzelwachstum bei allen Sorten nahezu vollständig blockiert. Bis zur ersten Meßung, nach einem Tag, konnte noch geringes Wurzelwachstum beobachtet werden, zwischen der ersten und dritten Meßung war jedoch kein Wurzelwachstum mehr möglich. Das maximale Wurzelwachstum realisierte in dieser Variante die Sorte 'Sindoro' mit 0.13 mm/h, was die stark schädigende Wirkung unterstreicht. Auch ein pH-Wert von 4.3 schränkt das Wurzelwachstum in Lösungskultur offensichtlich ein. Über alle Sorten gemittelt, wurden in dieser Versuchsvariante eine Wurzellänge von 77 % der pH 4.6 Variante erreicht. Zwischen 16 der 17 Sorten konnte kein gesicherter Unterschied im relativen

Wurzelwachstum nachgewiesen werden. Das maximale Wachstum zeigte die Sorte 'TGX-923-2E' mit 93 % gegenüber 61.4 % der schwächsten Sorte BR 40.



**Abbildung 18: Wurzelwachstum nach 3 Tagen in Abhängigkeit von pH-Wert und Kulturmethode.**

Die varianzanalytische Betrachtung des Wurzelwachstums in mm/h nach drei Tagen in Abhängigkeit der Faktoren "Sorte", "pH-Wert" und "Kulturmethode", zeigte einen signifikanten Einfluß aller drei Hauptwirkungen, sowie der Wechselwirkungen "Sorte x Kulturmethode" und "pH-Wert x Kulturmethode". Das heißt, daß die Sorten unterschiedlich auf verschiedene Kulturmethode reagieren. Daß die Wirkung des pH-Wertes von der Kulturmethode abhängt, wird in Abbildung 18 erkennbar. Während in Filterkultur bei einem pH-Wert von 4.0 ein annähernd normales Wachstum zu beobachten ist, bewirkt der gleiche pH-Wert in Lösungskultur eine vollständige Blockierung des Wurzelwachstums. Die Wechselwirkung "Sorte x pH-Wert" hat ein Signifikanzniveau von "0.067" und damit, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, keinen Einfluß auf das Wurzelwachstum. Es kann also kein sortenspezifischer Unterschied in der Reaktion gegenüber dem pH-Wert nachgewiesen werden. Eine dreifache Wechselwirkung der Versuchsfaktoren, hat ebenfalls keinen nachweisbaren Einfluß auf das Wurzelwachstum.

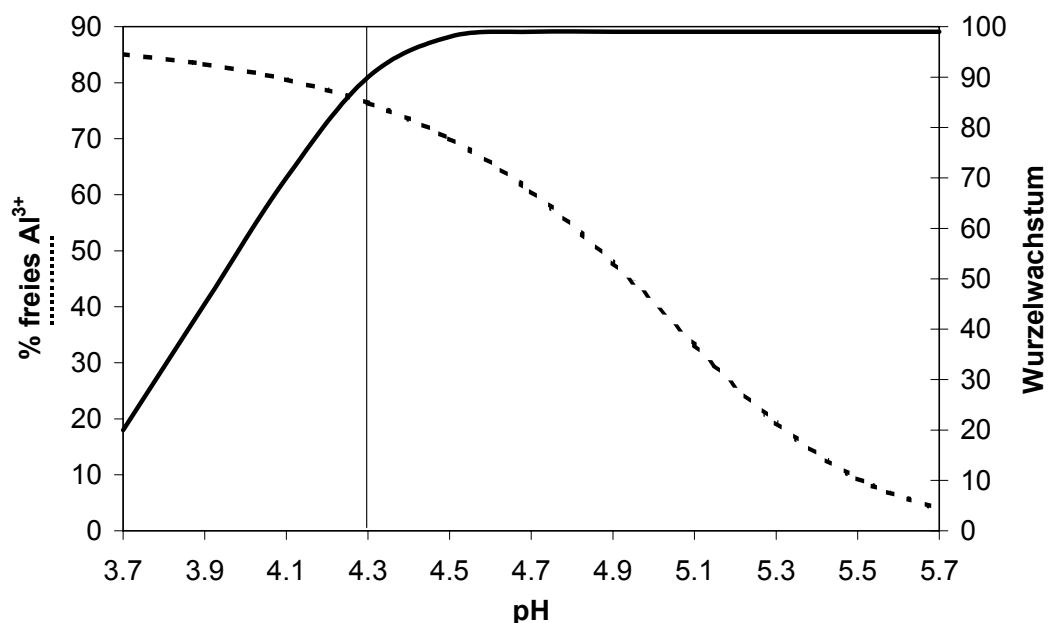
Insgesamt zeigen die Versuche zum pH-abhängigen Wurzelwachstum, daß ein pH-Wert von 4 offensichtlich den Grenzbereich der Säuretoleranz von Sojawurzeln darstellt. Von pH-Werten um pH 4.0 und darunter, kann eine starke Schädigung des Wurzelwachstums ausgelöst werden. Demgegenüber scheinen pH-Werte über 4 nicht zu

nennenswerten Einschränkungen im Wurzelwachstum zu führen, da selbst in Lösungskultur ein mittleres Wachstum von über 1.1 mm/h bei pH 4.3 erreicht wurde.

Für die Durchführung der Versuche zur Al-Toleranz bedeuten obige Ergebnisse, daß pH-Werte um und unter pH 4 nicht geeignet sind, da hier Al-Toxizität von Säureschäden überlagert werden kann.

### 3.3.2 Aluminium-Streß Versuche

Bei der Durchführung von Versuchen zur Aluminiumtoleranz stellt sich das Problem, daß Aluminiumtoxizität nicht unabhängig vom pH-Wert ausgelöst werden kann. Damit Al als toxisches  $\text{Al}^{3+}$ -Ion in der Lösung vorliegt, müssen pH-Werte unter 5 vorliegen (s. Abbildung 13). Der Einfluß des pH-Wertes auf das Wurzelwachstum soll aber in diesen Versuchen möglichst ausgeschlossen werden, um eine isolierte Untersuchung der Al-Toxizität zu ermöglichen. Da Wurzeln unabhängig von Al auch auf den pH-Wert reagieren, besteht das Problem, die beiden pH abhängigen Systeme "Al-Ionengleichgewicht" und "Wurzelwachstum" so zu kombinieren, daß das Wurzelwachstum möglichst ausschließlich von Al-Toxizität beeinflusst wird.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der pH-abhängigen Systeme Al-Ionengleichgewicht und Wurzelwachstum**

In Abbildung 19 sind die Zusammenhänge zwischen pH-Wert und  $\text{Al}^{3+}$ -Verfügbarkeit, sowie pH-Wert und Wurzelwachstum schematisch wiedergegeben. Wie in Abbildung 13 dargestellt, muß ein pH-Wert unter 4.5 gewählt werden, damit  $\text{Al}^{3+}$  sicher

in hohem Prozentsatz verfügbar ist. Andererseits muß ein pH-Wert von deutlich über pH 4.0 gewählt werden, um einen starken Einfluß des pH-Wertes auszuschließen.

Diesen Überlegungen folgend, wurde für die folgenden Versuche zur Al-Toleranz ein pH-Wert von 4.3 gewählt.

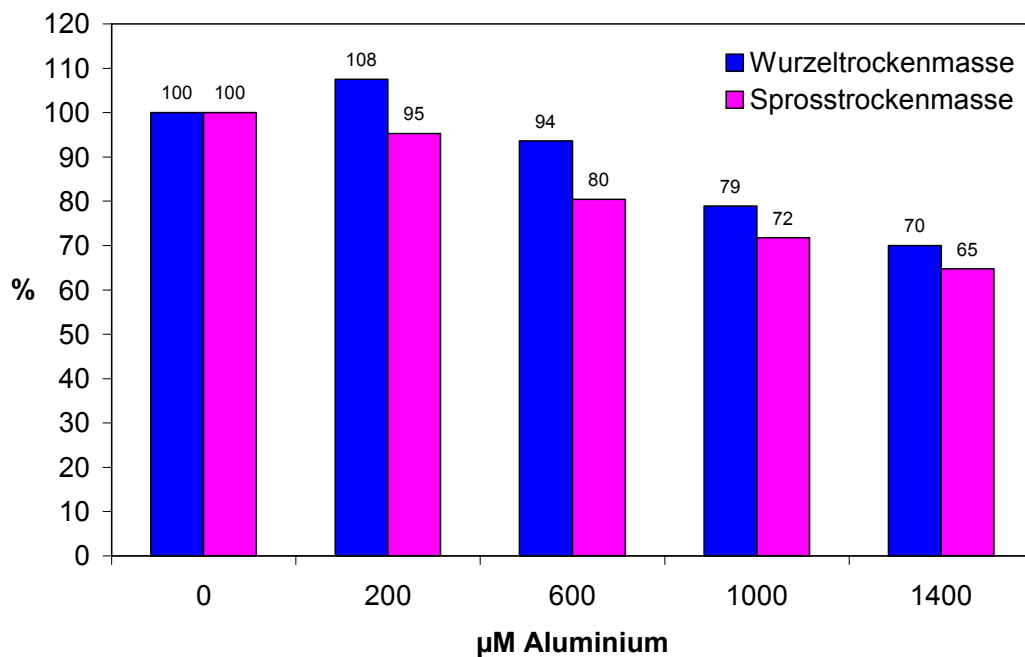
### 3.3.2.1 Sandkultur

In diesem Versuch wurden die in 3.3 erwähnten Sorten mit Ausnahme der afrikanischen Linien 'M-351', 'TGX-1448-2', 'TGX-536-02' und 'TGX-923-2E', sowie die indonesischen Sorten 'Sindoro' und 'Slamet', welche zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung standen, eingesetzt.

Durch die regelmäßige Kontrolle und Korrektur, konnte der pH-Wert in allen Versuchsvarianten über den gesamten Zeitraum in engen Grenzen gehalten werden. In Tabelle 17 ist dargestellt, daß in allen Versuchsvarianten die pH-Werte im Bereich von 4.2-4.3 schwankten. Die Minimalwerte liegen, abgesehen von der 0 µM Al-Variante, ebenfalls noch im akzeptablen Bereich oberhalb von 4.0. Bei den maximalen Werten liegt nur die 200 µM Al-Variante außerhalb des Zielbereichs. Die einmalige Unter- bzw. Überschreitung des Zielbereichs dürften die Versuchsergebnisse nicht beeinflußt haben, da diese Werte innerhalb eines Tages korrigiert wurden. Die Werte zeigen die Problematik der richtigen Wahl des pH-Wertes und einer ausreichenden Kontrolle. Sowohl die Minima mit ca. 4,05, als auch die Maxima mit ca. 4.5 liegen an den Grenzen des, oben identifizierten, akzeptablen Bereichs. Daraus ist zu schließen, daß pH 4.3 als Zielwert optimal gewählt wurde, da bei der Wahl eines anderen Wertes, bei gleicher Schwankungsbreite, die Grenzen regelmäßig überschritten worden wären.

**Tabelle 17. Mittelwerte und Schwankungsbreite des pH-Wertes während des Versuchsverlaufs.**

<i>Variante</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standard- abweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
0 µM Al	4.27	0.10	3.99	4.45
200 µM Al	4.30	0.15	4.06	5.05
600 µM Al	4.25	0.09	4.09	4.51
1000 µM Al	4.23	0.07	4.08	4.38
1400 µM Al	4.22	0.07	4.05	4.34



**Abbildung 20: Relative Trockenmassen von Wurzel und Sproß gemittelt über Sorten**

In Abbildung 20 sind die Trockenmassen von Wurzel und Sproß über Sorten gemittelt dargestellt. Die relative Wurzeltrockenmasse liegt in der 200 µM Al-Variante leicht über der 0 µM Al-Variante. Diese Tatsache überrascht, da Al auch in geringen Mengen nicht als Nährelement genutzt wird. Diese Variante unterscheidet sich aber, wie auch die 600 µM Al Variante, nicht signifikant von der streßfreien Variante und könnte daher als Versuchsfehler betrachtet werden. Das geringste Wurzelwachstum ist mit 70 % in der 1400 µM Al-Variante zu beobachten. Die Sproßtrockenmasse ist bereits in der niedrigsten Streßvariante leicht, aber nicht signifikant reduziert. Bei der 600 µM Al-Variante ist die Reduktion auf 80 % bereits statistisch gesichert. Die Reduktion der Sproßtrockenmasse auf 65 % in der stärksten Streßvariante, ist etwas stärker, als bei der Wurzeltrockenmasse. Da in den Versuchsvarianten mit 200 µM und 600 µM Al offensichtlich nur ein geringer Streß auf die Pflanzen einwirkte, waren diese Varianten für eine Analyse der Al-Toleranz nicht nutzbar. Für die weiteren Analysen zur sortenspezifischen Al-Toleranz, wurden Daten der 1400 µM Al-Variante genutzt, da hier die Differenzierung zwischen den Sorten etwas stärker war, als in der 1000 µM Al Variante.

**Tabelle 18: Relative Wurzeltrockenmasse der Sorten in der 1400  $\mu$ M Al Variante, Ränge und multipler Mittelwertsvergleich**

Sorte	relatives Wurzelwachstum	Rang	Homogene Untergruppen	
BR86-9508	84.7	1	a	
Tambora	81.1	2	a	
IAC 17	81.0	3	a	
BR 40	80.2	4	a	
Kerinci	79.2	5	a	
Tampomas	73.4	6	a	
Doko RC	73.2	7	a	
Cristalina	73.1	8	a	
Wilis	67.1	9	a	b
Kalmit	49.1	10		b c
Malabar	33.7	11		c

Die beiden Sorten 'Kalmit' und 'Malabar' zeigen ein deutlich geringeres relatives Wurzelwachstum und unterscheiden sich signifikant von den Sorten von Rang 1-8. Zwischen den Sorten, welche in ihrer Leistung zwischen den Sorten 'Wilis' mit 67.1 % und 'BR86-9508' mit 84.7 % liegen, kann kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Es hat sich gezeigt, daß die Saatgutqualität einen deutlichen Einfluß auf die Keimlingsentwicklung hat. Selbst nach Selektion der beiden vitaleren Keimlinge aus jedem Topf, zeigte sich bei einigen Sorten eine stark unterschiedliche Entwicklung der verbliebenen Keimlinge, was innerhalb einer Sorte nicht auf unterschiedliche, genetisch bedingte Al-Toleranz zurückgeführt werden kann. Dieser starke Einfluß der Keimlingsvitalität erklärt die hohe Varianz innerhalb der Sorten, welche eine bessere statistische Differenzierung der Sorten nicht zuläßt.



**Tabelle 19: Relative Sproßtrockenmasse nach Kultur 1400 $\mu$ M Al haltigem Sand, sowie Rangordnung und multipler Mittelwertsvergleich.**

Sorte	<i>relatives Wurzelwachstum</i>	<i>Rang</i>	<i>homogene Untergruppen</i>		
IAC 17	83.3	1	a		
BR 40	77.4	2	a	b	
Doko RC	75.4	3	a	b	
Tambora	75.3	4	a	b	
BR86-9508	74.5	5	a	b	
Tampomas	68.9	6	a	b	
Cristalina	68.5	7	a	b	
Wilis	62.3	8	a	b	c
Kerinci	57.5	9		b	c
Kalmit	46.0	10			c
Malabar	41.8	11			c

Tabelle 19 zeigt, daß die Sorte 'BR86-9508', welche das höchste relative Wurzelwachstum aufwies, beim Meßparameter "relative Sproßtrockenmasse" nur an fünfter Stelle steht. Die Sorte 'IAC 17' ist dagegen von Rang 3, nach der relativen Wurzelmasse auf Rang 1 in Tabelle 19 nach vorne gerückt. Es wird deutlich, daß Wurzel- und Sproßentwicklung nicht vollständig korreliert sind. Trotzdem zeigen sich Ähnlichkeiten zwischen beiden Meßparametern. Die Sorten 'IAC 17', 'BR 40', 'BR86-9508', und 'Tambora' liegen nach beiden Beurteilungskriterien in der besseren Hälfte. Die Sorten 'Kalmit' und 'Malabar' sind auch bei der Sproßentwicklung signifikant schlechter, als die Sorten von Rang 1-7. Eine entscheidende Verschiebung ist bei der Sorte 'Kerinci' festzustellen. Während sie nach der relativen Wurzelmasse nicht nachweislich schlechter als die beste Sorte ist, kann bei der Sproßmasse ein signifikanter Unterschied zur besten Sorte abgesichert werden. In diesem Versuch wies keine Sorte eine überlegene Al-Toleranz auf. Die Sorten 'Kalmit' und 'Malabar' zeigen jedoch eine klar unterdurchschnittliche Leistung bei Al-Streß und können in diesem Versuch als Al-sensitiv identifiziert werden.

### 3.3.2.2 Filter- und Lösungskultur

Zur Identifikation von Al-Toleranz in Kurzzeitversuchen, wurden verschiedene Sojasorten parallel in Filter- und Lösungskultur getestet. Die Versuche sollten auf wenige Tage beschränkt bleiben, um den Aufwand gegenüber den Sandversuchen

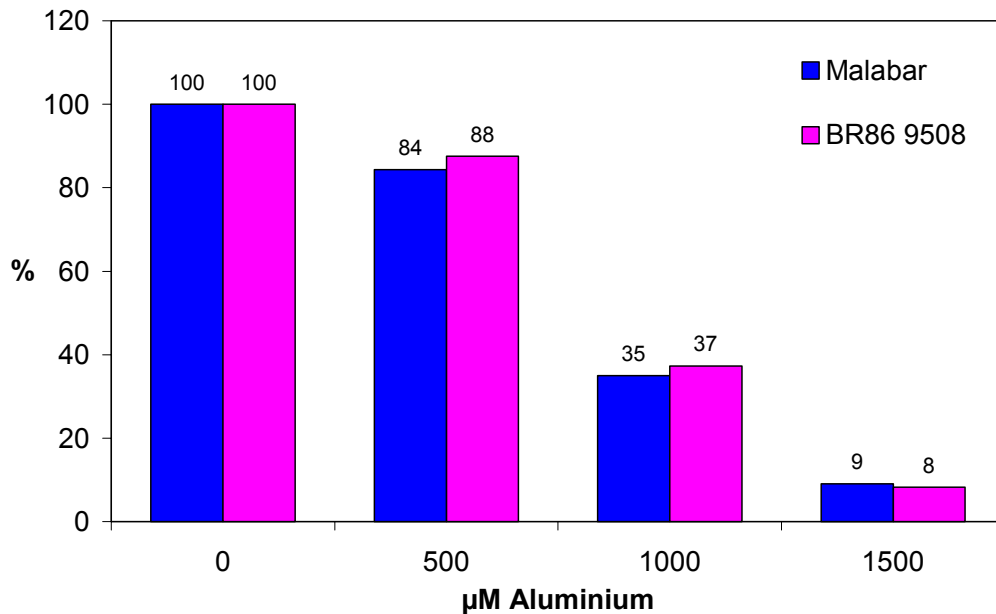
deutlich zu reduzieren. Wegen der Beschränkung der Versuchszeit auf wenige Tage ist es möglich, vereinfachte Nährlösungen ohne Phosphat und Mikronährstoffe einzusetzen. Durch den Ausschluß von Phosphat aus der Nährlösung wird die Präzipitation von Al verhindert und somit das System vereinfacht. Die Nährstoffversorgung wird zu Beginn der Keimlingsentwicklung durch die Kotyledonen gesichert, so daß ein Phosphatmangel unwahrscheinlich ist. Zu welchem Zeitpunkt die Phosphatversorgung über die Wurzel wichtig wird, kann jedoch nicht genau definiert werden. In einem Alter von etwa 8-10 Tagen bilden die Pflanzen Primärblätter und Seitenwurzeln, es kann daher von einem erhöhten Nährstoffbedarf ausgegangen werden. Versuche mit vereinfachten Nährlösungen sollten zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen sein, um einen Einfluß von Phosphat- oder anderen Nährstoffmangel mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Aus technischen Gründen wurde eine maximale Versuchsdauer von 3 Tage gewählt. Ausgehend von einem normalen Wurzelwachstum von ca. 2 mm/h und einer Keimlingslänge von 50 mm zu Beginn des Versuchs, verbleiben ca. 150 mm bzw. 75 h bis die Wurzeln am unteren Ende aus der Kulturapparatur wachsen. Darüber hinaus beginnt bei einer Wurzellänge von ca. 15-20 cm die Entwicklung von Seitenwurzeln, welche die Messung der Wurzellänge in Lösungskultur deutlich erschwert.

Die beiden Kulturmethode werden gemeinsam dargestellt, da sie unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Die Keimlinge für beide Kulturvarianten wurden gemeinsam angekeimt und beide Kulturversuche waren gleichen Umweltbedingungen im Gewächshaus ausgesetzt. Darüber hinaus wurde bei beiden Kulturmethode direkt die Wurzellänge bestimmt und daraus der Meßparameter relatives Wurzelwachstum bestimmt.

### **Filtervorversuch**

In einem Vorversuch sollte eine Al-Konzentration ermittelt werden, welche in Filterkultur das Wachstum auf 50 %-70 % reduziert, also eine ähnliche Streßwirkung wie in Sandkultur hervorruft. Da Kapazitätsgrenzen eine Untersuchung aller Sorten in mehreren Al-Konzentrationsstufen nicht erlaubten, wurde dieser Versuch auf zwei Sorten beschränkt. Um trotzdem unterschiedliche Sortenreaktionen abzudecken, wurden die Sorten 'Malabar' und 'BR86-9508' eingesetzt, welche nach relativer Wurzelmasse in Sandkultur, Extreme darstellen.



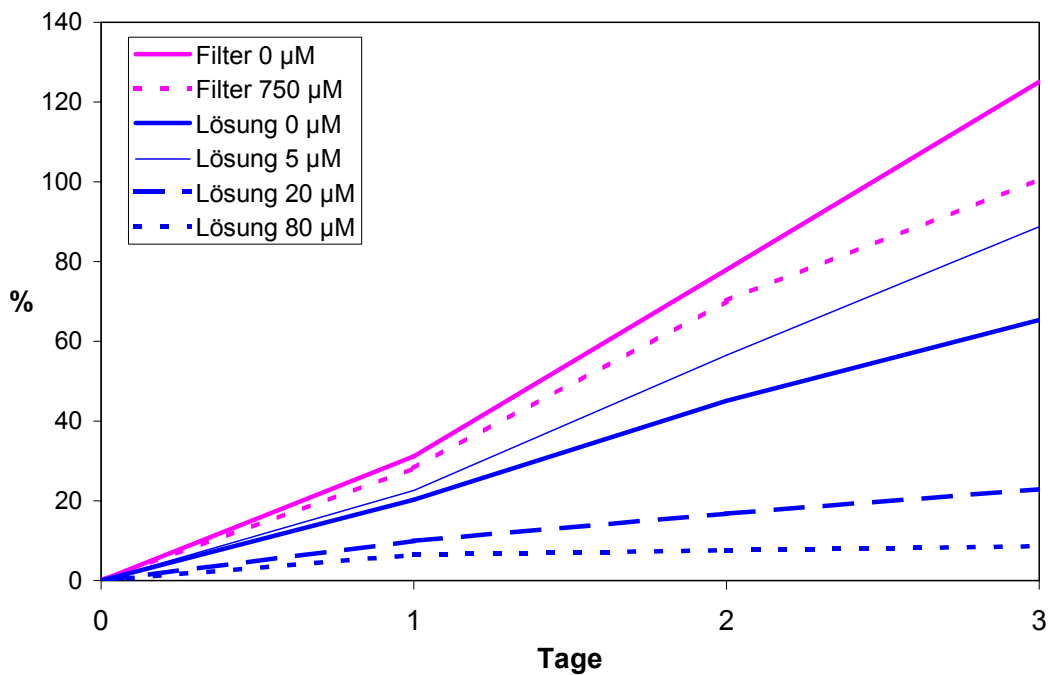
**Abbildung 21: Mittleres relatives Wurzelwachstum der Sorten 'Malabar' und 'BR86-9508' in Filterkultur.**

Die Unterschiede zwischen den Sorten sind in diesem Versuch nicht so ausgeprägt, wie in Sandkultur. Signifikante Unterschiede sind in der 500 µM Al und 1000 µM Al-Stufe identifizierbar. Während die Wachstumseinschränkung von 0 µM Al auf 500 µM Al nur etwas über 10 % beträgt, ist die Reduktion bei weiterer Erhöhung der Al-Konzentration auf 1000 µM Al sehr stark. Bei einer Konzentration von 1500 µM kommt das Wurzelwachstum nahezu vollständig zum Erliegen. Eine, der Sandkultur bei 1400 µM Al vergleichbare Streßwirkung tritt also bereits bei etwa der halben Al-Konzentration auf. Da keine der Varianten die angestrebte Wachstumsreduktion auf 50 %-70 % zeigte, wurde für weitere Versuche eine Konzentration 750 µM Al eingesetzt.

### **Lösungs- und Filterkultur Parallelversuche**

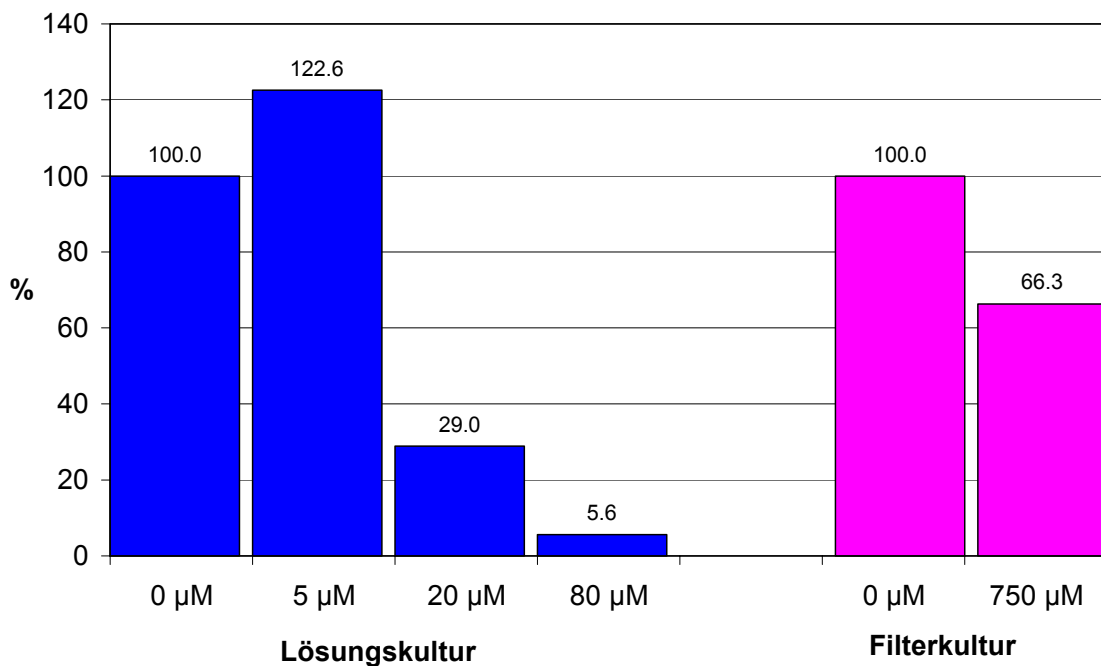
Beim Vergleich des absoluten Wurzelwachstums über 3 Tage fällt auf, daß, wie bei den Versuchen in 3.3.1.2, das Wurzelwachstum in Filterkultur höher war als in Lösungskultur (s Abbildung 22).

Es kann also angenommen werden, daß Sojawurzeln grundsätzlich in Filterkultur ein vitaleres Wachstum zeigen, als in Lösungskultur. Die Differenzierung der einzelnen Varianten ist nach einem Tag noch schwach ausgeprägt, wird jedoch nach zwei und drei Tagen deutlich sichtbar. Insbesondere die Unterschiede zwischen der 0 µM und 750 µM Variante in Filterkultur werden erst bei der dritten Messung deutlich. Daher wird im folgenden das Wurzelwachstum nach drei Tagen genauer betrachtet.



**Abbildung 22: Mittlere Wurzellänge bei verschiedenen Kulturmethoden und Al-Konzentrationen**

In Abbildung 23 ist das relative Wurzelwachstum nach 3 Tagen, bezogen auf die jeweilige Kulturvariante, ohne Al dargestellt. Bei Lösungskultur fällt auf, daß das Wachstum in der 0 µM Al Variante vom Wachstum in der 5 µM Al Variante übertroffen wird. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant und daher wohl nicht auf Meßfehler zurückzuführen. Dieses erhöhte Wurzelwachstum in der geringsten Al-Stufe ist vergleichbar mit der erhöhten mittleren Wurzelmasse bei 200 µM Al in Sandkultur, und läßt daher auch diese Werte in neuem Licht erscheinen. Beim Übergang von 5 µM Al auf 20 µM Al ist eine starke Reduktion des Wurzelwachstums von 123 % auf 29 % zu beobachten. Eine weitere Erhöhung der Al-Konzentration auf 80 µM läßt nur 6 % Wurzelwachstum zu. In Abbildung 22 ist zu erkennen, daß das Wurzelwachstum bei 80 µM Al im ersten Meßzeitraum realisiert wird und anschließend völlig zum Erliegen kommt. Da bei dieser Konzentration das Wurzelwachstum vollständig gehemmt wird, kann keine sinnvolle Sortendifferenzierung erwartet werden. Ebenso kann die 5 µM Variante nicht zur Differenzierung von Al-Toleranz genutzt werden, da bei dieser Konzentration offensichtlich keine Al-Toxizität ausgelöst wird. Die weiteren Betrachtungen der Lösungskultur beschränken sich daher auf die 20 µM Variante, obwohl hier ein deutlich stärkerer Al-Streß ausgelöst wird, als in Filterkultur bei 750 µM und Sandkultur bei 1400 µM.



**Abbildung 23: Vergleich des relativen Wurzelwachstums zwischen Kulturmethoden und Konzentrationen nach 3 Tage**

In Filterkultur wurden bei 750 µM Al, über alle Sorten gemittelt, 66 % des Wurzelwachstums der 0 µM Variante erreicht. Die Kulturmethode hat offensichtlich, wie in den pH-Versuchen, einen starken Einfluß auf das Wurzelwachstum und die Reaktion gegenüber dem Streßfaktor. Daher werden die weiteren Auswertungen zu sortenspezifischen Reaktionen getrennt nach Kulturmethoden durchgeführt.

### Sortenvergleich in Lösungskultur

In Tabelle 20 sind die Sorten, geordnet nach relativem Wurzelwachstum nach drei Tagen, in Lösungskultur dargestellt. Die Spannweite reicht von 77.7 % der Sorte 'BR86-9508' bis 21.3 % der Sorte 'IAC 17'. 'BR86-9508' zeigte bereits in Sandkultur das höchste relative Wurzelwachstum unter Streßbedingungen. Diese Sorte ist die einzige, bei welcher kein signifikanter Unterschied zwischen der 0 µM und 20 µM Al-Variante nachgewiesen werden kann. Demgegenüber überrascht die schlechte Leistung der Sorte 'IAC 17', da sie nach dem Meßparameter relative Sproßtrockenmasse in Sandkultur, die beste Leistung zeigte. Ein multipler Mittelwertsvergleich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\nabla = 5\%$ , identifiziert 4 homogene Untergruppen, innerhalb welcher keine Unterschiede zwischen den Sorten nachgewiesen werden können. Die Sorte 'BR86-9508' ist hierbei der alleinige Vertreter der Gruppe "a" und unterscheidet sich somit von allen anderen Genotypen. Wie an der Untergruppe "d" zu erkennen ist, unterscheiden sich nur die drei besten Genotypen 'BR86-9508', 'Kalmit' und 'Doko RC'

signifikant von der schlechtesten Sorte 'IAC 17'. Die relativ schlechte Sortendifferenzierung ist auf hohe Variabilität innerhalb der Sorten zurückzuführen.

**Tabelle 20: Relatives Wurzelwachstum bei 20  $\mu$ M Aluminium in Lösungskultur nach 3 Tagen sowie homogene Untergruppen nach Tukey's Test**

Sorte	relatives Wurzelwachstum	Rang	homogene Untergruppen
BR86-9508	77.7	1	a
Kalmit	53.6	2	b
Doko RC	45.6	3	b c
TGX-1448-2	40.7	4	b c d
Malabar	36.0	5	b c d
BR 40	35.0	6	b c d
TGX-536-02	33.7	7	b c d
Kerinci	33.6	8	b c d
Tambora	33.5	9	b c d
Tampomas	31.9	10	c d
Sindoro	29.2	11	c d
Cristalina	26.0	12	c d
M-351	23.7	13	d
TGX-923-2E	23.3	14	d
Wilis	23.1	15	d
Slamet	21.8	16	d
IAC 17	21.3	17	d

$\nabla = 5\%$

### Sortenvergleich in Filterkultur

In Tabelle 21 ist das relative Wurzelwachstum der Sorten unter Streßbedingungen in Filterkultur dargestellt. Die Sorten zeigen eine sehr breite Spannweite im relativen Wurzelwachstum zwischen 62.6 % bei der Sorte 'TGX-923-2E' und 110.0 % bei der Sorte 'M351'. Bei den Sorten von Rang 1-5 ist kein signifikanter Unterschied zur 0  $\mu$ M Variante nachweisbar. Eine Stimulierung des Wurzelwachstums durch Al ist also auch bei der Sorte 'M351' nicht zu erwarten. Die übrigen Sorten zeigen ein

nachweislich reduziertes Wurzelwachstum. Bei Vergleich der Sorten innerhalb der Streßvariante, identifiziert ein multipler Mittelwertsvergleich 7 homogene Untergruppen, innerhalb welcher sich die Sorten nicht unterscheiden. Dieser Meßparameter liefert damit die stärkste Sortendifferenzierung aller untersuchten Meßparameter und Kulturmethoden. Alle Genotypen der homogenen Untergruppe "a" zeigen ein nachweislich höheres relatives Wurzelwachstum als die Genotypen der Untergruppe "g".

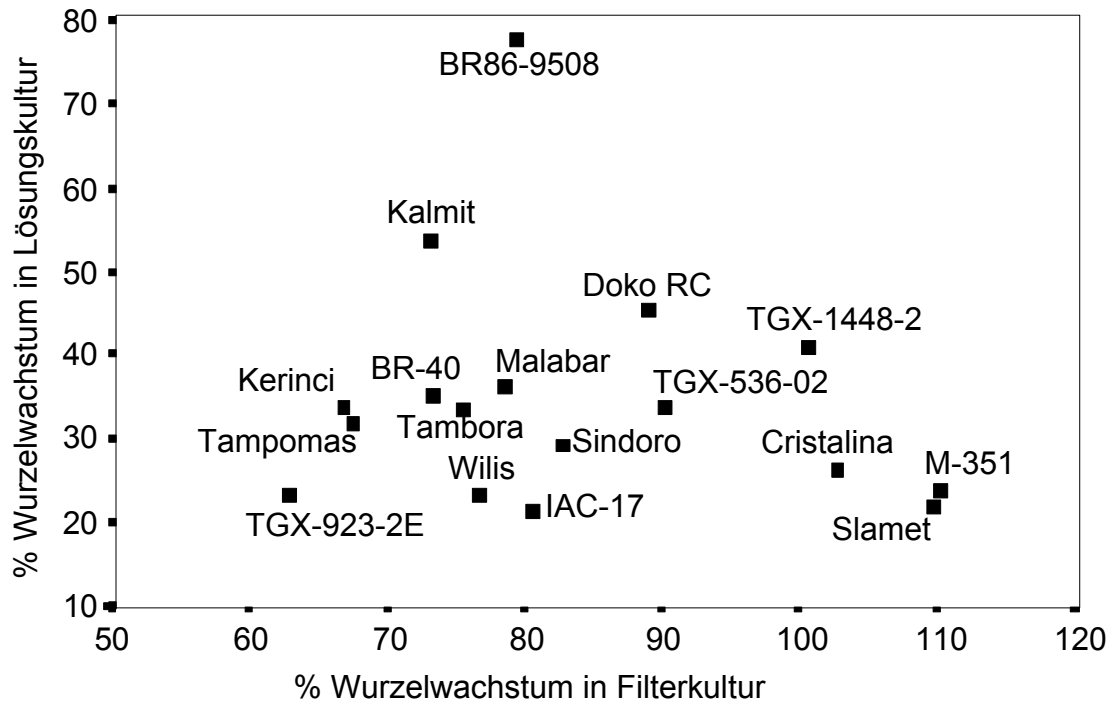
**Tabelle 21: Relatives Wurzelwachstum bei 750 µM Aluminium in Filterkultur nach 3 Tagen, sowie homogene Untergruppen nach multipltem Mittelwertsvergleich.**

<i>Sorte</i>	<i>Relatives Wurzelwachstum</i>	<i>Rang</i>	<i>Homogene Untergruppen</i>
M 351	110.0	1	a
Slamet	109.4	2	a b
Cristalina	102.6	3	a b c
TGX-1448-2	100.3	4	a b c d
TGX-536-02	90.0	5	b c d e
Doko RC	88.8	6	c d e
Sindoro	82.4	7	d e f
IAC-17	80.2	8	e f g
BR86-9508	79.1	9	e f g
Malabar	78.3	10	e f g
Wilis	76.3	11	e f g
Tambora	75.1	12	e f g
BR 40	73.0	13	e f g
Kalmit	72.9	14	e f g
Tampomas	67.1	15	f g
Kerinci	66.6	16	f g
TGX-923-2E	62.6	17	g

∇ = 5 %

Obwohl für Filterkultur- und Lösungskulturversuche sehr ähnliche Ausgangsbedingungen vorlagen und die gleichen Meßparameter bestimmt wurden, besteht keine erkennbare Beziehung zwischen dem relativen Wachstum der Sorten unter

Streßbedingungen (s. Abbildung 24). Die Sorte 'TGX-923-2E' zeigt in beiden Kulturmethoden eine sehr schwache Leistung. Demgegenüber wechseln die anderen Sorten scheinbar willkürlich ihre Rangposition. Ein extremes Beispiele sind die Sorten 'Slamet' und 'M 351', welche das höchste relative Wachstum in Filterkultur, aber nur ein sehr geringes Wachstum in Lösungskultur zeigen. Die Sorte 'BR86-9508' fällt durch ihr weit überdurchschnittliches relatives Wurzelwachstum in Lösungskultur auf, während sie in Filterkultur nur durchschnittliche Toleranz zeigt.



**Abbildung 24: Vergleich des relativen Wurzelwachstums der Sorten in Filter- und Lösungskultur unter Streßbedingungen**

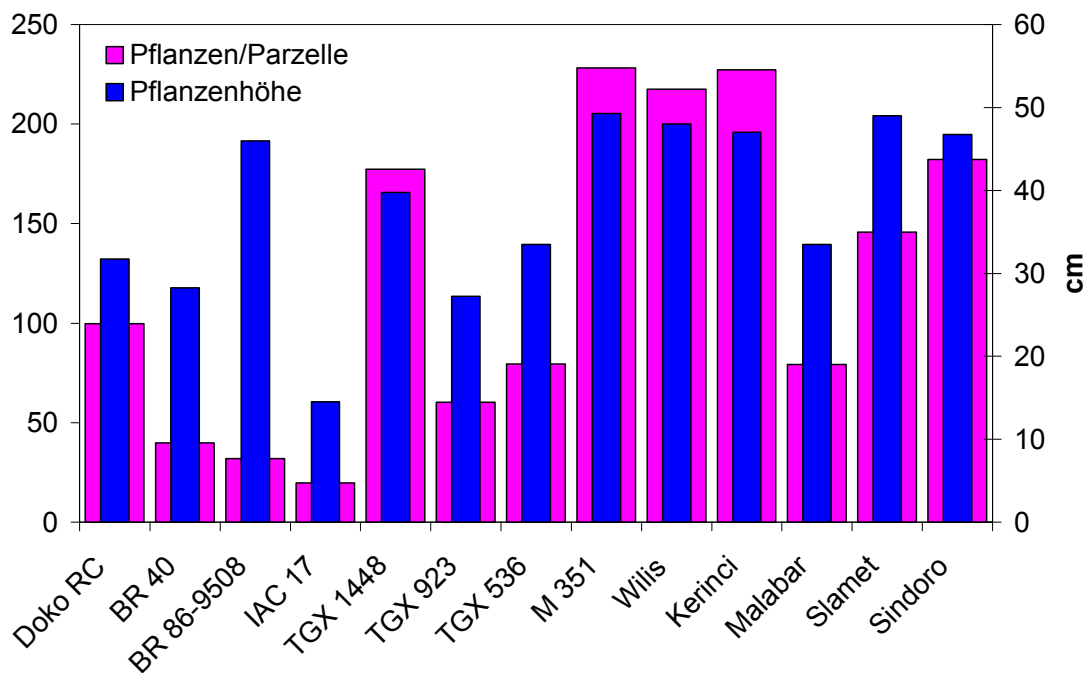
### 3.3.2.3 Feldversuche

#### Beschreibung der Pflanzenentwicklung

Bei einer Besichtigung der Versuchsfelder in Malang und Lampung, wurde eine deutlich unterschiedliche Entwicklung der Sorten beobachtet. Die indonesischen Sorten zeigten allgemein einen besseren Feldaufgang und eine vitalere Entwicklung. Es war eine klare Abstufung nach der Herkunft erkennbar. Von den eingeführten Sorten zeigten die afrikanischen die beste Anpassung an Klima und Anbaumethode, gefolgt von den brasilianischen Sorten. Die einzige europäische Sorte 'Kalmit', sowie die brasilianische Sorte 'Cristalina' waren nicht kultivierbar. Die Sorten 'IAC 17', 'BR86-9508' und 'BR 40' wiesen, aufgrund schlechten Feldaufgangs, eine sehr geringe Bestandesdichte auf



(s. Abbildung 25). Die Sorte 'IAC 17' konnte mit 14.5 cm Pflanzenhöhe am Standort Malang nur ein extrem geringes vegetatives Wachstum erzielen. Auch die Sorten 'Doko RC' und 'BR 40' erreichten nur Höhen von ca. 30 cm. Dies ist auf eine schlechte Anpassung an Klima und Anbaubedingungen zurückzuführen, aber auch auf grundsätzlich unterschiedliche Pflanzentypen. Die brasilianischen Sorten zeigen auch unter optimalen Bedingungen eine geringere Pflanzenhöhe und Verzweigung, gehen früh in das generative Wachstum über und haben große Bohnen. Demgegenüber zeichnen sich indonesischen Sorten durch üppiges vegetatives Wachstum mit hohen Pflanzen und starker Verzweigung, sowie relativ kleinen Bohnen aus. Diese Unterschiede dürften auf Selektion unter verschiedenen Anbaubedingungen zurückzuführen sein. Während kleine Pflanzen mit wenig Verzweigung gut für den Mähdrusch geeignet sind, werden in Indonesien große Pflanzen bevorzugt, da die gesamte Pflanze von Hand geerntet wird. Weiterhin kann in Brasilien, dank maschineller Aussaat ein gleichmäßiger Feldaufgang und Standraum erzielt werden, so daß eine Kompensation ungleichmäßiger Bestände durch üppige Verzweigung nicht in dem Maße benötigt wird, wie in Indonesien, wo die Aussaat in der Regel per Hand erfolgt. Der beobachtete unterschiedliche Feldaufgang zwischen indonesischen und brasilianischen Sorten, kann dadurch erklärt werden, daß großkörniges Saatgut empfindlicher auf ungeeignete Lagerung reagiert, als feinkörniges (pers. Mitt. Dr. Darman).



**Abbildung 25: Mittlere Pflanzenhöhe und Bestand am Standort Malang**

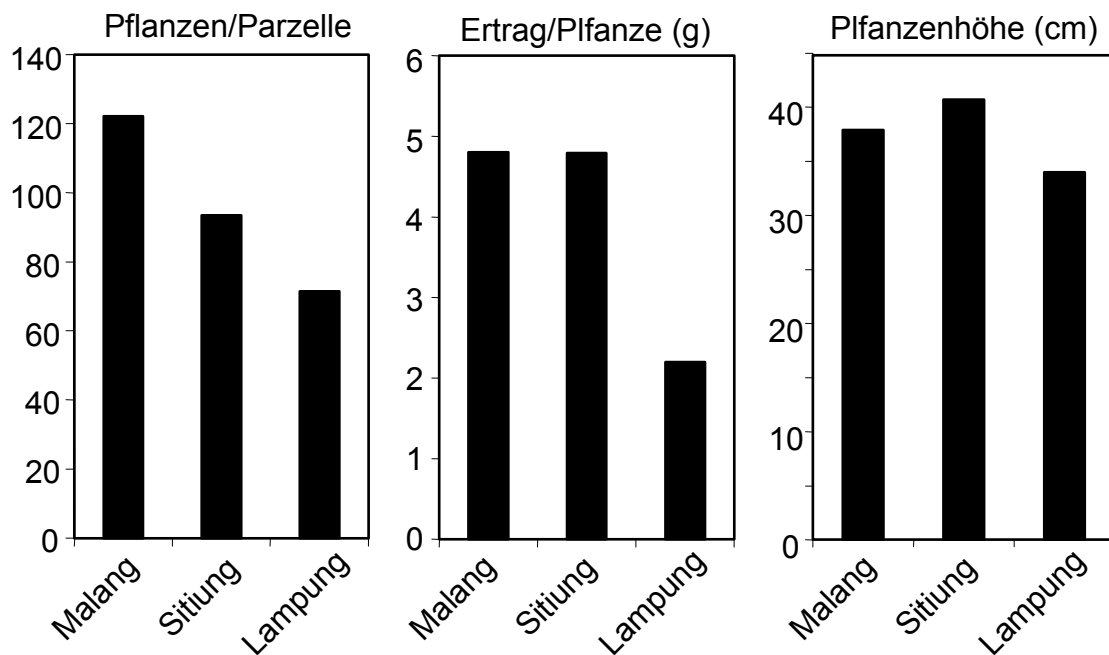
Die beiden afrikanischen Sorten 'TGX-1448-2' und 'M 351' wiesen als einzige Importsorten ein Wachstum auf, welches mit dem einheimischer Sorten vergleichbar war. Daher wurden auch nur diese beiden Sorten von den Kollegen vor Ort als kulturwürdig

eingestuft. Die beiden Sorten 'Tambora' und 'Tampomas' konnten nicht in die Auswertung aufgenommen werden, da sie nach unzureichender Beizung, durch einen Befall mit "Bohnenfliege" im Keimlingsstadium zu über 90 % zerstört wurden.

Aufgrund der extrem unterschiedlichen Pflanzenzahl je Parzelle, (s. Abbildung 25) kann keine sinnvolle Auswertung der Parzellenerträge erfolgen. Daher dient im folgenden der Parameter "Ertrag je Pflanze" als Maß für die generative Leistung einer Sorte. Auch dieser Parameter wird durch die Bestandesdichte beeinflusst, dürfte aber für die Identifikation der Wirkung des sauren Bodens auf die Pflanzenentwicklung am besten geeignet sein. Als Maß für das vegetative Wachstum wird die Pflanzenhöhe erfaßt. Da die absolute Leistungsfähigkeit der Sorten sehr unterschiedlich ist, ist ein Vergleich zwischen Sorten nach absoluten Werten nicht sinnvoll zur Analyse der Al-Toleranz. Daher werden alle Werte zum Mittelwert der jeweiligen Sorte am Standort Malang in Bezug gesetzt und, wie bei den Gewächshausversuchen, Relativwerte betrachtet.

### **Standortvergleich**

Beim Vergleich der Pflanzenentwicklung an den Versuchsstandorten fällt auf, daß der Standort Malang den beiden Standorten Sitiung und Lampung nicht deutlich überlegen ist. Die größten Unterschiede sind bei der Bestandesdichte zu beobachten, hier liegen die beiden Standorte mit saurem Boden signifikant unter dem Referenzstandort Malang (s. Abbildung 26). Der mittlere Ertrag je Pflanze und die Pflanzenhöhe unterscheiden sich nicht zwischen den Standorten Sitiung und Malang. Dies ist möglicherweise durch das, im Vergleich zum Standort Lampung, relativ hohe Ca/Al Verhältnis (s. Tabelle 6) zu erklären. Am Standort Lampung liegt der Ertrag je Pflanze signifikant niedriger, als am Referenzstandort. Die mittlere Pflanzenhöhe ist in Lampung niedriger, als in Sitiung, unterscheidet sich aber nicht statistisch gesichert vom Referenzstandort. Die geringen Unterschiede zwischen den Streßstandorten und dem Referenzstandort sind auf eine unterdurchschnittliche Bestandesentwicklung auf der Versuchsfläche in Malang zurückzuführen. Die Bestandesentwicklung aller Sorten war in der hier vorgestellten Saison am Standort Malang unter dem Mittel mehrerer Anbaujahre. Dies war Folge von Bodenverschlammung während der Keimlingsentwicklung, gefolgt von einer zweiwöchigen Trockenperiode (pers. Mitt. Dr. Darman). Daher sollte nicht geschlossen werden, daß die Versuchsflächen in Lampung und Sitiung ungeeignet sind, den Einfluß saurer Böden zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen vielmehr, daß die Pflanzenentwicklung im Feld von vielen Streßfaktoren beeinflusst wird und erst mehrjährige Versuche es erlauben, die Wirkung bestimmter Umwelteinflüsse sicher zu identifizieren.



**Abbildung 26: Vergleich der Pflanzenentwicklung an den Versuchsstandorten Malang, Sitiung und Lampung.**

### Sortenvergleich

Im folgenden werden die Parameter Ertrag/Pflanze und Pflanzenhöhe betrachtet, um die Leistung der Sorten an den Standorten Sitiung und Lampung zu untersuchen.

Am Versuchsstandort Lampung zeigt die Sorte 'IAC 17' mit jeweils etwa 170 % die höchste Leistung in beiden Meßparametern (s. Tabelle 22). Dies ist jedoch darauf zurückzuführen, daß diese Sorte am Referenzstandort eine extrem schlechte Entwicklung zeigte, und sollte daher nicht zu dem Schluß verleiten, die Sorte würde eine sehr hohe Al-Toleranz besitzen. In absoluten Werten ist 'IAC 17' auf allen Versuchsflächen den übrigen Sorten weit unterlegen. Die Ausnahmestellung dieser Sorte schlägt sich auch darin nieder, daß sie sich signifikant von allen übrigen Sorten unterscheidet.

Trotz der hohen Spannweite des Ertragsparameters von 28.0 % bis 91.4 %, identifiziert ein multipler Mittelwertsvergleich nach Tukey in diesem Bereich nur zwei homogene Untergruppen. 'BR 40' ist damit nachweislich besser als die Sorten von Rang 10-13. Etwas stärker ist die Differenzierung nach dem Parameter Pflanzenhöhe. Hier werden vier homogene Untergruppen identifiziert. Zwischen dem Einzelpflanzenenertrag und der Pflanzenhöhe der Sorten, ist keine Beziehung erkennbar. Nach dem Ertragsparameter liegen die brasilianischen Sorten 'BR 40', 'BR86-9508' und 'Doko RC' in der oberen Hälfte der Rangfolge, dagegen nach der Pflanzenhöhe in der unteren Hälfte. Ein umgekehrtes Verhalten zeigen die indonesischen Sorten 'Slamet' und 'Sindoro'. Die beiden afrikanischen Sorten 'M 351' und 'TGX-1448-2', welche eine gute absolute

Pflanzenentwicklung erzielten, zeigen nach den relativen Meßparametern nur durchschnittliche Leistungen.

**Tabelle 22: Ertrag je Pflanze und Pflanzenhöhe am Versuchsstandort Lampung relativ zum Standort Malang.**

Sorte	Ertrag/ Pflanze %	Rang	Sorte	Pflanzen- höhe %	Rang
IAC 17	174.7 a	1	IAC 17	170.7 a	1
BR 40	91.4 b	2	Sindoro	111.2 b	2
BR86-9508	60.9 bc	3	TGX-923-2E	109.2 bc	3
Kerinci	56.2 bc	4	Slamet	98.5 bcd	4
Doko RC	55.8 bc	5	M 351	90.4 bcd	5
TGX-923-2E	55.7 bc	6	Kerinci	86.7 bcde	6
M 351	54.3 bc	7	Malabar	85.1 bcde	7
Malabar	51.4 bc	8	Doko RC	85.0 bcde	8
TGX-1448-2	43.5 bc	9	TGX-536-02	82.1 cde	9
Wilis	36.0 c	10	BR 40	81.4 cde	10
Slamet	32.3 c	11	TGX-1448-2	81.1 cde	11
Sindoro	30.0 c	12	Wilis	75.5 de	12
TGX-536-02	28.0 c	13	BR86-9508	59.4 e	13

(∇ = 5 % Buchstaben kennzeichnen homogene Untergruppen)

Auch am Standort Sitiung realisiert die Linie 'IAC 17' Leistungen von weit über 100 % in beiden Parametern, wird aber im Ertrag noch von der Linie 'BR86-9508' übertroffen (s. Tabelle 23). Diese Sorte unterscheidet sich signifikant von allen übrigen Sorten. Mit einem mittleren Ertrag von 8,7 g pro Pflanze, erzielt sie auch den absoluten Spitzenwert am Standort Sitiung. Eine Steigerung von etwa 2 g auf 8 g pro Pflanze kann, bei einem Durchschnitt von etwa 4 g je Pflanze über alle Sorten und Standorte, als realistischer Wert betrachtet werden. Hervorzuheben ist die Tatsache, daß 'BR86-9508' nach dem Parameter "relative Pflanzenhöhe" den letzten Rang einnimmt. Es besteht jedoch keine signifikante Abweichung vom Referenzstandort.

Die drei afrikanischen Linien 'TGX-923-2E', 'TGX-536-02' und 'M 351' sowie die brasilianischen Genotypen 'IAC 17', 'BR 40' und 'Doko RC' erzielen höhere Einzelpflanzenenerträge als am Referenzstandort. Demgegenüber erreichen die Sorten 'Slamet'

und 'Sindoro' nur etwa 50 % ihrer Leistung. Im Mittelwertsvergleich werden drei homogene Untergruppen identifiziert. Neben den bereits erwähnten Sorten 'BR86 9508' und 'IAC 17' unterscheidet sich nur die Sorte 'BR 40' von der schlechtesten Sorte. Die Pflanzenhöhe differiert bei den meisten Sorten nur geringfügig von den Versuchsfeldern in Malang. Ein Mittelwertsvergleich identifiziert drei homogene Untergruppen, welche sich nicht überlappen, da die Ersten beiden ausschließlich von den Sorten 'IAC 17' und 'TGX-923-2E' gebildet werden. Auf die Sonderstellung der Sorte 'IAC 17' wurde bereits eingegangen. Auch an diesem Versuchsstandort ist keine Beziehung zwischen dem relativen Ertrag und der relativen Pflanzenhöhe erkennbar.

**Tabelle 23: Ertrag je Pflanze und Pflanzenhöhe am Versuchsstandort Sitiung relativ zum Standort Malang. Ränge auf Spannweite 1-17 skaliert.**

Sorte	Ertrag pro Pflanze %	Rang	Sorte	Pflanzenhöhe %	Rang
BR86-9508	409.7 a	1	IAC 17	234.5 a	1
IAC 17	233.2 b	2	TGX-923-2E	140.4 b	2
BR 40	179.9 bc	3	Kerinci	109.0 c	3
TGX-923-2E	156.6 bcd	4	TGX-1448-2	107.5 c	4
Doko RC	147.1 bcd	5	TGX-536-02	104.5 c	5
M 351	118.5 cd	6	M 351	101.0 c	6
TGX-536-02	111.7 cd	7	Doko RC	100.0 c	7
Kerinci	83.5 cd	8	Slamet	99.5 c	8
Wilis	72.6 cd	9	Sindoro	99.5 c	9
TGX-1448-2	68.7 cd	10	BR 40	99.1 c	10
Slamet	49.3 cd	11	Wilis	92.2 c	11
Sindoro	47.3 d	12	BR86-9508	87.5 c	12

( $\nabla = 5$ , % Buchstaben kennzeichnen homogene Untergruppen)

### 3.3.2.4 Vergleich der Kulturmethode

#### Vergleich der Al-Konzentrationen in Kulturmethode

Vergleicht man die, in den verschiedenen Kulturmethode eingesetzten Al-Konzentrationen, ist festzustellen, daß extreme Unterschiede bestehen. In Filterkultur wird nur die halbe Al-Konzentration benötigt, um einen der Sandkultur vergleichbaren Al-Streß auszulösen. Noch extremer fällt der Vergleich zur Lösungskultur aus. Hier erfolgt eine stärkere Schädigung des Wurzelsystems als in Filter- und Sandkultur, obwohl bei diesen Kulturmethode eine siebenunddreißig- bzw. siebenzigfache Al-Konzentration eingesetzt wurde.

#### Sortenvergleich über Methode hinweg

Um Sorten über verschiedene Kultur- und Meßmethode hinweg vergleichen zu können, werden die Sorten, entsprechend ihrer relativen Leistung, unter Streßbedingungen sortiert und anschließend Rangwerte vergeben. Die beste Sorte erhält dabei den Rang "1" die schlechteste Sorte den Rang "17". Sind weniger als 17 Sorten in der Rangordnung, werden die vergebenen Ränge auf den Bereich von 1-17 umskaliert. Daraus ergeben sich für die Verrechnung nicht ganzzahlige Rangwerte, welche jedoch in Tabelle 24 gerundet dargestellt sind. Dies ist notwendig, um die Ränge aller Versuche ohne Verzerrung verrechnen zu können. Wegen dieser fehlenden Werte wurde zur Zusammenfassung der Versuche der durchschnittliche Rangwert für die Sorten errechnet, anstelle der üblichen Rangsumme. Die Sorte 'IAC 17' hat den niedrigsten durchschnittlichen Rang und damit über alle Analysenmethode die höchste Leistungsfähigkeit unter Streßbedingungen. Diese Aussage muß jedoch relativiert werden, da die Sorte ihre führende Stellung vor allem den besten Rängen in den Feldversuchen verdankt. Die Sonderstellung dieser Sorte wurde bereits oben erläutert. In Lösungskultur belegt 'IAC 17' den letzten Platz. Auch in Filterkultur ist ihre Toleranz unterdurchschnittlich. Die nächstbesten Sorten sind 'Doko RC' und 'BR86-9508', mit einem mittleren Rang von 7.1. Die beiden Sorten unterscheiden sich dadurch, daß 'Doko RC' ausgeglichene Leistungen zeigt als 'BR86-9508', welche bei drei Meßparametern den ersten Rang und zugleich bei zwei Meßparametern den letzten Rang einnimmt. Auf diesen Kontrast wurden bereits bei der Darstellung der Feldversuche eingegangen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine eindeutige Klassifizierung der Sorten in "Al-tolerant" und "Al-sensitiv" nicht möglich ist. Es liegen bei allen Meßparametern nur graduelle Unterschiede zwischen den Sorten vor. Darüber hinaus verhalten sich die Sorten in Abhängigkeit von der Kulturmethode sehr unterschiedlich. Bei einigen Genotypen sind jedoch klare Tendenzen erkennbar. Die Sorte 'Wilis' kann als Al-sensitiv betrachtet werden, da sie in allen untersuchten Parametern deutliche Leistungseinbußen unter Streßbedingungen zeigt. 'IAC 17' scheint auf den ersten Blick das Al-tolerante Gegenstück zu 'Wilis' zu sein. Allerdings wurde bereits auf die

problematischen Ergebnisse dieser Sorte in den Feldversuchen hingewiesen, eine klare Zuordnung sollte daher unterbleiben. Als Al-tolerant können die Sorten 'Doko RC', 'BR86-9508' gelten. Diese Aussage ist jedoch weniger klar als bei 'Wilis', da beide Sorten in manchen Bewertungen auch höhere Ränge belegen.

Bei der Betrachtung von Sortengruppen lassen sich klare Aussagen machen. Die vier besten Sorten stammen aus Brasilien, nur 'Cristalina' liegt auf einem mittleren Rang. Fünf von sechs indonesischen Genotypen liegen auf den sechs schlechtesten Rängen, nur unterbrochen von der europäischen Sorte 'Kalmit'. Die Sorte 'Kalmit' liefert in Sand- und Filterkultur sehr schlechte Leistungen, ist dagegen die zweitbeste Sorte in Lösungskultur. Die Linien afrikanischer Herkunft liegen alle auf mittleren Rängen. Im brasilianischen Genpool ist offensichtlich eine höhere Al-Toleranz vorhanden, als im afrikanischen Genpool. Im indonesische Genpool scheint dagegen nur eine geringe Al-Toleranz vertreten zu sein.

**Tabelle 24: Ränge der Sorten bei verschiedenen Kulturmethode und Meßparametern**

<i>Kultur- methode</i>	<i>Feld Sitiung</i>		<i>Feld Lampung</i>		<i>Sand</i>		<i>Lösung</i>	<i>Filter</i>	<b>Durchschnitt</b>
	Höhe	Ertrag/Pflanze	Höhe	Ertrag/Pflanze	Wurzelmasse	Sproßmasse	Wurzelwachstum	Wurzelwachstum	
IAC-17	1	2	1	1	4	1	17	8	<b>4.5</b>
Doko RC	10	7	10	6	11	4	3	6	<b>7.1</b>
BR86-9508	17	1	17	4	1	7	1	9	<b>7.1</b>
Tambora					3	6	9	12	<b>7.4</b>
BR-40	14	4	13	2	6	3	6	13	<b>7.6</b>
M-351	8	8	6	9			13	1	<b>7.6</b>
TGX-923-2E	2	5	4	8			14	17	<b>8.4</b>
TGX-1448-2	5	14	14	12			4	4	<b>8.9</b>
Kerinci	4	11	8	5	7	14	8	16	<b>9.1</b>
Cristalina					12	11	12	3	<b>9.5</b>
TGX-536-02	7	10	12	17			7	5	<b>9.5</b>
Slamet	11	16	5	14			16	2	<b>10.7</b>
Tampomas					9	9	10	15	<b>10.8</b>
Sindoro	13	17	2	16			11	7	<b>10.9</b>
Malabar			9	10	17	17	5	10	<b>11.4</b>
Kalmit					15	15	2	14	<b>11.7</b>
Wilis	16	13	16	13	14	12	15	11	<b>13.6</b>

### Methodenvergleich über Sorten hinweg

Um Beziehungen zwischen den Kulturmethode zu identifizieren, wurden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (PRECHT, 1987) berechnet.



Insgesamt wurden fünf signifikante Korrelationen identifiziert (s. Tabelle 25). Die Reihung der Sorten nach dem relativen Wurzelwachstum in Filterkultur korreliert zu keinem anderen Meßparameter. Die Bewertung der Genotypen durch den Lösungskulturversuch zeigt ebenfalls keine nennenswerte Korrelation, außer einer signifikant negativen Korrelation zur Pflanzenhöhe in Lampung. Die Ränge, entsprechend der beiden Meßparameter in Sandkultur korrelieren untereinander. Diese Korrelation ist jedoch nicht so hoch, wie bei den direkt abhängigen Systemen Sproß- und Wurzelentwicklung zu erwarten wäre. Daß diese Beziehung nicht sehr eng ist, zeigt sich bereits daran, daß in Sandkultur bei 200 µM Al das Sproßwachstum leicht eingeschränkt ist, während das Wurzelwachstum noch über 100 % liegt (s. Abbildung 20). Statistisch abgesicherte Rangkorrelation bestehen auch zwischen der Wurzelmasse in Sandkultur und den Ertragsparametern beider Feldversuche. In beiden Feldversuchen ist keine Korrelation zwischen den beiden Parametern Pflanzenhöhe und Ertrag pro Pflanze zu beobachten. Die abgesicherte Korrelation zwischen der Rangfolge nach dem Ertragsparameter in beiden Feldversuchen deutet auf ähnliche Bedingungen an beiden Standorten hin. Auch die Bewertung nach der Pflanzenhöhe korreliert zwischen beiden Feldversuchen, kann aber nicht statistisch abgesichert werden.

**Tabelle 25: Korrelation der Rangfolgen in verschiedenen Kulturmethode und Meßparameter nach 'Spearman's' Rangkorrelation**

Kultur- methode	Meßparameter	Feld Sitiung		Feld Lampung		Sand		Lösung
		Höhe	Ertrag/ Pflanze	Höhe	Ertrag/ Pflanze	Wurzel- masse	Sproß- masse	Wurzel- wachstum
Feld Sitiung	Ertrag/Pflanze	0.07						
Feld Lampung	Höhe	0.57	-0.13					
	Ertrag/Pflanze	0.15	0.80**	0.00				
Sand	Wurzelmasse	-0.03	0.94**	-0.11	0.86*			
	Sproßmasse	0.31	0.60	0.07	0.75	0.72*		
Lösung	Wurzelwachstum	-0.33	0.22	-0.64*	0.14	-0.03	-0.22	
Filter	Wurzelwachstum	-0.03	-0.38	0.07	-0.45	-0.01	0.33	-0.15

(\* , \*\* signifikant bei  $\nabla = 5\%$  bzw.  $1\%$ )

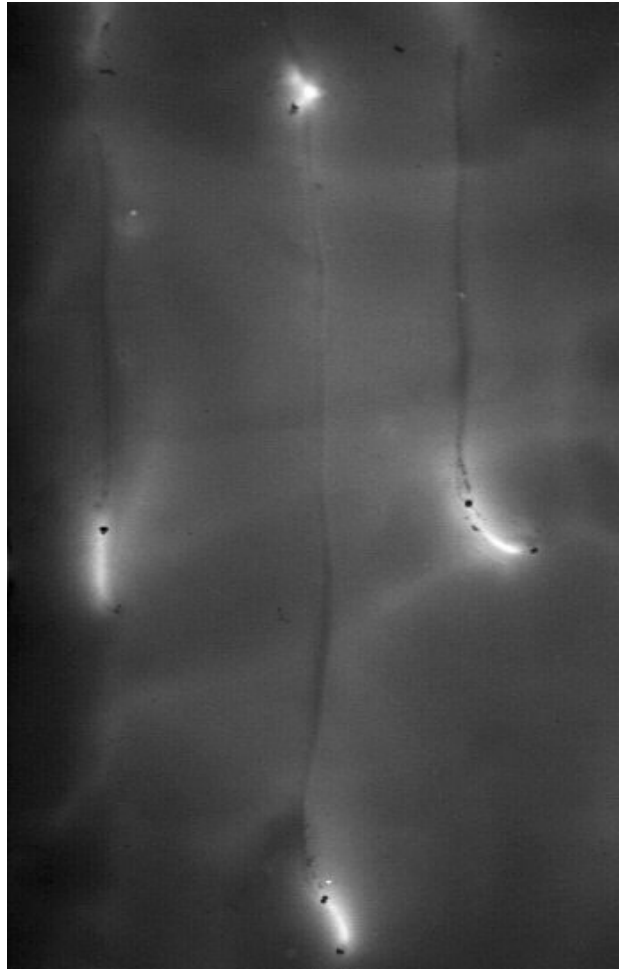
Die enge Beziehung zwischen Sandkultur und den Feldversuchen zeigt, daß diese Kulturmethode die realen Anbaubedingungen besser widerspiegelt, als die Kurzzeitversuche. Dies ist vermutlich auf das bodenähnliche Substrat, den langen Beobachtungszeitraum, sowie die Erfassung der "Biomasse" Parameter zurückzuführen. Die fehlende Korrelation zwischen den Kurzzeitversuchen und den Langzeitversuchen deutet darauf hin, daß die Meßbedingungen sich zu stark von realen Anbaubedingungen unterscheiden, um eine direkte Übertragung der Ergebnisse zu erlauben. Auch die beiden Kurzzeitversuche korrelieren untereinander nicht, obwohl die gleichen Meßparameter und Meßzeiten angewendet wurden. Daraus muß geschlossen werden, daß sich die Kulturbedingungen grundsätzlich unterscheiden.

Wird der Parameter "Ertrag pro Pflanze" als Ertragsparameter aufgefaßt, ist von den Gewächshausversuchen die Sandkultur am besten geeignet, auf erhöhte Produktivität zu selektieren.

### 3.3.3 Wurzelausscheidungen

#### 3.3.3.1 Gelfärbemethode

Die Ergebnisse der Kulturversuche deuten auf die Entgiftung von Al in der Rhizosphäre hin, da damit die extreme Wechselwirkung zwischen Al-Konzentration und Kulturmethode erklärbar sind (s.4.4.1). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Methode entwickelt, welche freies  $Al^{3+}$  in der Umgebung der Wurzel sichtbar macht (s. 2.6). Auf diese Weise wird eine Enggiftungsreaktion durch die Abnahme von freiem  $Al^{3+}$  erkennbar. In Abbildung 27 ist die Aufnahme eines Gels dargestellt, auf welchem drei Sojawurzeln für 16 Stunden kultiviert wurden. Die Intensität der Farbreaktion korreliert direkt mit der Konzentration von toxischem  $Al^{3+}$ , das heißt in den dunklen Bereichen des Gels liegt ein hoher  $Al^{3+}$ -Gehalt vor. Es sind starke Aufhellungen im Bereich der Wurzelspitzen aller drei Wurzeln erkennbar. Die Lage der Wurzelspitzen wurden jeweils zu Beginn und Ende des Versuchs auf der Glasplatte markiert. Die Markierungen sind als dunkle Punkte im Bereich der Aufhellungszone erkennbar. Die Wurzeln sind während des Versuchs ca. 10-12 mm gewachsen und die Entgiftungszone erstreckt sich über etwa die gleiche Länge. Dies läßt den Schluß zu, daß nur unmittelbar an der Wurzelspitze eine Veränderung der Rhizosphäre erfolgt. Eine weitere Zone mit reduziertem  $Al^{3+}$ -Gehalt ist im oberen Bereich der mittleren Wurzel erkennbar. An dieser Stelle wurden die ersten Seitenwurzeln gebildet. Auffällig ist, daß in älteren Wurzelbereichen offensichtlich keine Entgiftung der Rhizosphäre stattfindet. Daß die Lage der älteren Wurzelbereiche durch eine dunkle Linie erkennbar ist, deutet auf eine Akkumulation von Al an der Wurzeloberfläche hin. Diese Beobachtung könnte aber auch dadurch zu erklären sein, daß das Gel unter der Wurzel eingedrückt und dehydriert wird.

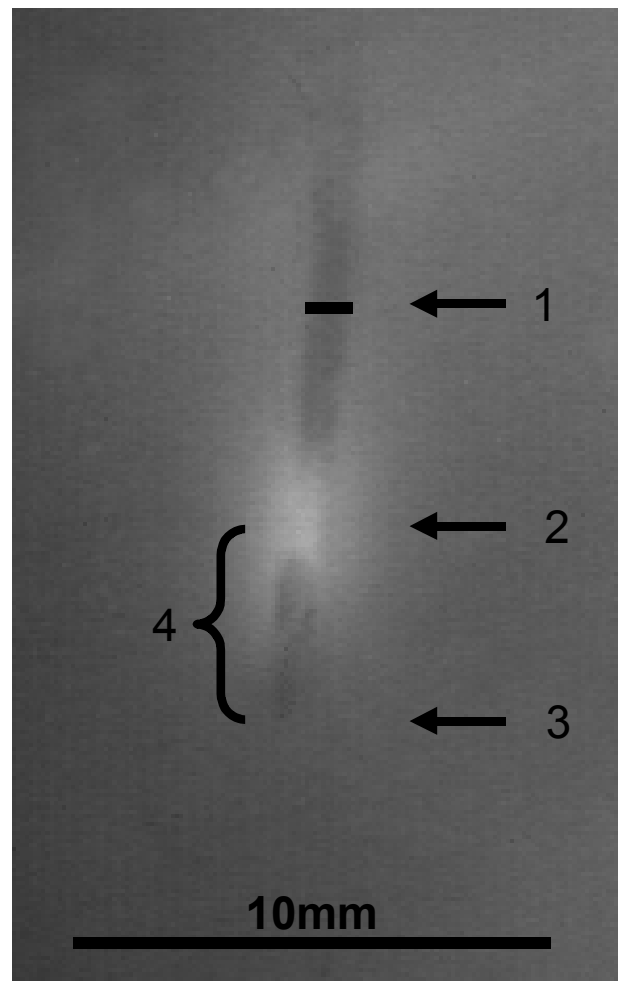


**Abbildung 27: Hematoxylin gefärbtes Agarosegel nach 16-stündiger Kultur von Sojawurzeln.**

Die ungleichmäßige Hintergrundfärbung des Gels ist durch schwankende Agarosekonzentrationen, und damit unterschiedliche Al-Aufnahme während der Inkubation in Al-Lösung zu erklären. An der rechten Wurzel ist ein typischer Effekt bei der Kultur auf Al-toxischem Gel zu erkennen. Die Wurzeln krümmen sich grundsätzlich in Richtung des Gels, da die Wurzelseite, welche dem Gel aufliegt, im Wachstum gehemmt wird, während die andere Seite normal weiter wächst. Zu Beginn dieser Versuche wurden Agarosegele mit geringerer Konzentration benutzt. Dies führte dazu, daß die Wurzeln in die Gele wuchsen, und sie dabei beschädigten. Bei höherer Agarosekonzentration kann die Wurzelspitze nicht in das Gel eindringen und weicht daher zur Seite aus.

Bei einigen Gelen wurde der pH-Wert im unbeeinflussten Gel und in der Umgebung der Wurzelspitze durch Auflegen von Indikatorpapier überprüft. In wurzelfernen Gelbereichen blieb der pH-Wert von 4.3 weitgehend erhalten. In einigen Fällen wurden leichte Veränderungen des pH-Wertes an der Wurzelspitze beobachtet, sowohl in Richtung höherer als auch niedrigerer Werte. Da keine pH-Werte über 4.8 beobachtet wurden, ist nicht davon auszugehen, daß eine Anhebung des pH-Wertes zur

Reduzierung der  $\text{Al}^{3+}$ -Konzentration geführt hat. Die beobachtete Rhizosphärenentgiftung dürfte also auf die Ausscheidung von komplexbildenden Stoffen zurückzuführen sein.



**Abbildung 28: Nahaufnahme des Bereichs der Wurzelspitze eines Hematoxylin gefärbten Agarosegels nach 2 Stunden Inkubationszeit. 1-Wurzeldurchmesser; 2-Exudationszentrum; 3-Wurzelspitze; 4-Abstand Wurzelspitze-Exudationszentrum.**

Zur genaueren Lokalisierung des Wurzelbereichs, an welchem eine Ausscheidung von Al-komplexierenden Stoffen erfolgt, wurde die Zeit verkürzt, in welcher die Wurzel auf dem Gel inkubiert wurde. Durch einen kürzeren Kontakt wird die "Bewegungsunschärfe" reduziert, dafür läßt der Kontrast stark nach. Eine mindestens zweistündige Exposition der Wurzel wird benötigt, damit die Aufhellung durch Wurzel-ausscheidungen deutlich erkennbar ist. In dieser Zeit wächst die Wurzel unter den angegebenen Bedingungen knapp 2 mm. In Abbildung 28 ist der Bereich der Wurzelspitze eines Gels nach zweistündiger Inkubation dargestellt. Die Wurzel hatte einen Durchmesser von etwa einem Millimeter. Das Zentrum der stärksten Aufhellung liegt ca. 4 mm hinter der Wurzelspitze und die axiale Ausdehnung der Entgiftung beträgt

etwa 4-6 mm. Ausgehend von einem Zuwachs von 2 mm dehnt sich also die Exudationszone nur über einen Bereich von 2-3 mm im Abstand von 2-3 mm hinter der Wurzelspitze aus.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob dieses Exudationsmuster geeignet sein kann, die Wurzel effektiv vor einer Al Vergiftung zu schützen, obwohl die unmittelbare Wurzelspitze nicht geschützt zu sein scheint. Abbildung 29 zeigt zwei Wurzeln aus Sandkultur, wobei die obere in Al-freiem und die untere in 1400  $\mu\text{M}$  Al-haltigem Medium kultiviert wurde. Die Wurzel aus der Al-Streßvariante zeigt eindeutige Toxizitätssymptome, wie gestauchtes Wachstum, Verdickung, Verkrümmung, rissige Rhizodermis, und brüchiges Gewebe. Es ist jedoch auch erkennbar, daß die ersten 1-2 mm der Wurzel sich nahezu nicht von der ungeschädigten Wurzel unterscheiden. Offensichtlich wird die Wurzel (entgegen allgemeiner Überzeugung) an der unmittelbaren Spitze nicht geschädigt. Daher ist ein Schutz durch Exudation in diesem Bereich auch nicht nötig. Ähnlich verhält es sich mit den älteren Bereichen der Wurzel. Hier besteht Einigkeit darüber, daß diese Bereiche von Al nicht geschädigt werden. Also ist ein Schutz durch Komplexierung auch hier nicht nötig.



**Abbildung 29: Wurzelspitzen von Wurzel mit bzw. ohne Aluminium Streß**

Der Ort der Ausscheidung entgiftender Substanzen stimmt also genau mit dem Ort der Schädigung der Wurzel überein. In diesem Zusammenhang muß nochmals auf die Ausscheidungen im Bereich der Bildung von Seitenwurzeln hingewiesen werden. Auch hier werden empfindliche Bereiche neuer Wurzeln geschützt. Abbildung 27 läßt leider keine Aussage darüber zu, ob die Ausscheidungen in diesem Bereich nur von neu gebildeten Wurzeln stammen, oder ob auch die älteren Wurzelbereiche wieder Stoffe ausscheiden, wenn junge Wurzeln gebildet werden.

### 3.3.3.2 Wurzelausscheidungen

Nachdem die Entgiftung von Al in der Rhizosphäre durch die oben beschriebene Methode nachgewiesen wurde, sollten die ausgeschiedenen Stoffe identifiziert und quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde, durch Inkubation von mehreren Wurzeln in einem engen Gefäß, Lösung aus der unmittelbaren Nähe der Wurzelspitzen gewonnen (s. 2.5). Die Ausscheidung organischer Säuren wurde bereits in Zusammenhang mit Al-Toxizität beschrieben (DELHAIZE ET AL., 1993b). Daher wurde mittels HPLC die Konzentration niedermolekularer Anionen in den Rhizosphärenlösungen bestimmt. In Abbildung 30 sind beispielhaft durch einen Leitfähigkeitsdetektor indentifizierte Anionen in einer Rhizosphärenlösung ohne Al-Streß dargestellt. Der hohe Chlorid-Gipfel stammt aus der Zugaben von  $\text{CaCl}_2$  zur Testlösung. Weiterhin sind minimale Mengen von Malat, Oxalat und Phosphat identifizierbar. Der Citrat-Gipfel ist bereits deutlich erkennbar. Der mit "6" markierte Gipfel repräsentiert einen nicht identifizierten Stoff.

Abbildung 31 zeigt die detektierten Ionen in der Rhizosphärenlösung, wenn die Wurzeln einem Al-Streß ausgesetzt werden. Hierbei fallen sofort die sehr hohen Werte für die Stoffe Malat und Citrat auf. Daneben ist noch eine leicht verstärkte Ausscheidung von Oxalat und Phosphat zu beobachten. Oxalat bildet wie Malat und Citrat starke Komplexe mit Al und wäre daher geeignet, zu einer Al-Entgiftung beizutragen. Nach den vorliegenden Ergebnissen spielt Oxalat aber keine entscheidende Rolle. Auch der Al-Phosphat Komplex ist unter den vorgegebenen Bedingungen sehr stabil. Eine gezielte Ausscheidung von Phosphat zur Al-Entgiftung ist aber aus theoretischen Überlegungen unwahrscheinlich, da insbesondere auf sauren Böden eine limitierte Phosphatversorgung zu erwarten ist. Demgegenüber können organische Säuren in fast unbegrenzter Menge neu synthetisiert werden. Auch der unidentifizierte Stoff "6" zeigt eine etwas höheren Gipfel und erhielt in Abbildung 31 die Nummer "11".

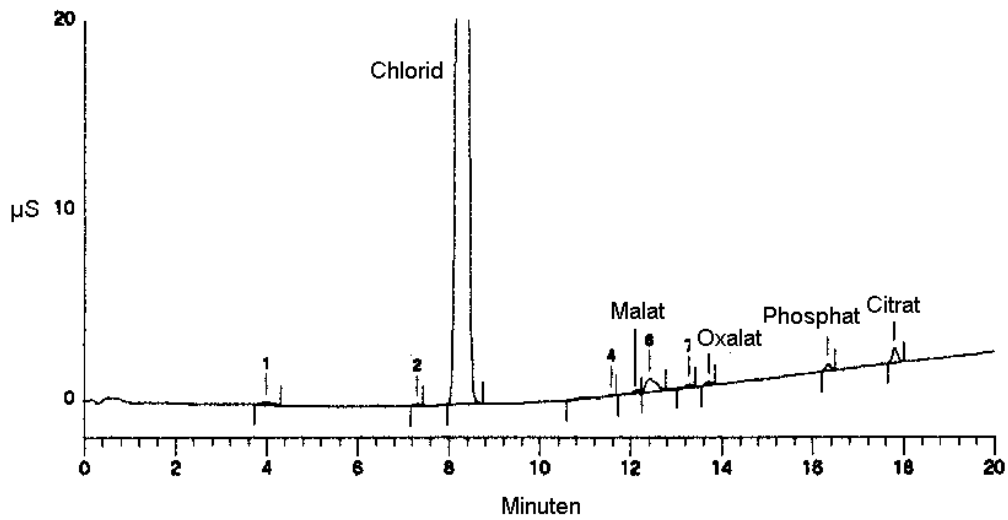


Abbildung 30: HPLC Detektion organischer Säuren in Rhizosphärenlösung mit  $500\mu\text{M CaCl}_2$

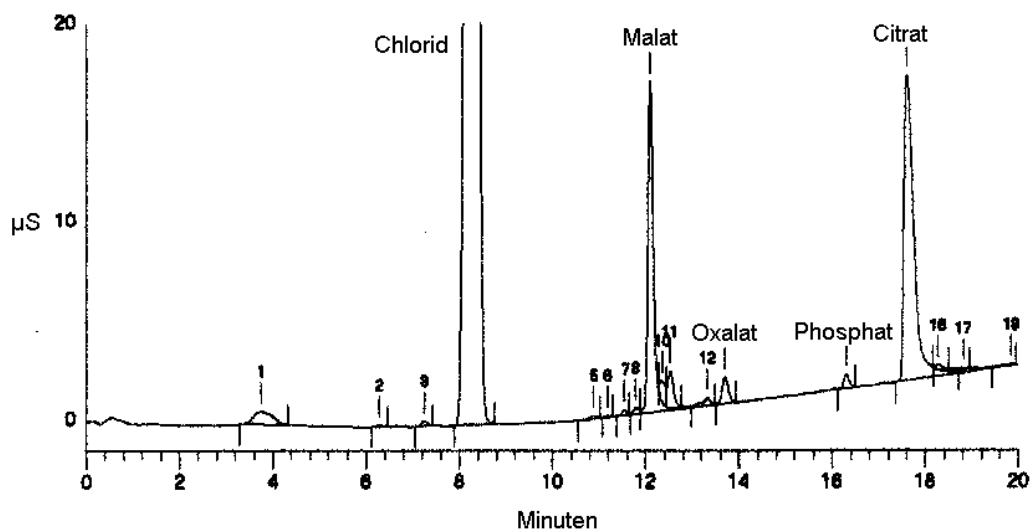
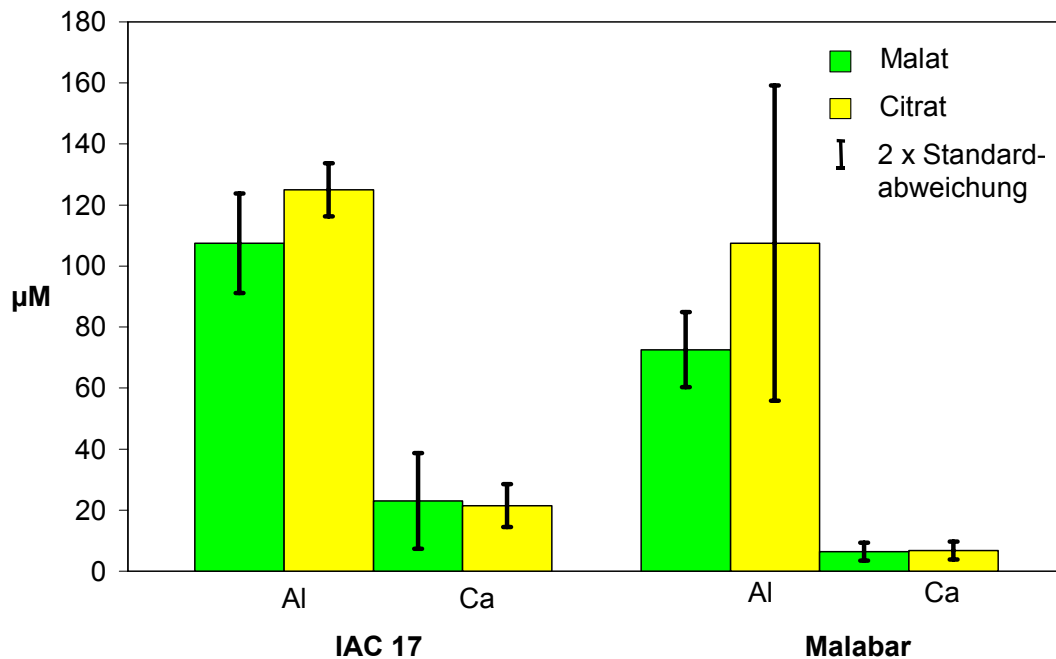


Abbildung 31: HPLC Detektion organischer Säuren in Rhizosphärenlösung mit  $500\mu\text{M AlCl}_3$

Die Abbildungen und weitere Messungen zeigen jedoch deutlich, daß Al-Streß hauptsächlich die Ausscheidung von Malat und Citrat an der Wurzelspitze auslöst.



**Abbildung 32: Malat- und Citrat-Ausscheidung von Wurzelspitzen der Sorten IAC 17 und Malabar**

Die Messung der Wurzelaustritte der Sorten 'IAC 17' und 'Malabar' wurde in vier Wiederholungen in der Al-Variante und zwei Wiederholungen in der Kontrollvariante durchgeführt. Von beiden Sorten wird in der Streßvariante nachweislich mehr Citrat und Malat ausgeschieden. Die absolute Menge der Wurzelaustritte beider Sorten unterscheiden sich, mit Ausnahme der Malatmenge in der Al-Variante, nicht signifikant. 'IAC 17' exudiert bei Al-Streß signifikant mehr Malat, als die Sorte 'Malabar'. Der Efflux von Malat und Citrat steigt unter Al-Streß bei der Sorte 'IAC 17' auf den 6 fachen bzw. bei der Sorte Malabar auf den zehnfachen Wert der Ca-Variante an. Das Verhältnis von Citrat zu Malat liegt bei 'IAC 17' bei 1,2 : 1, während 'Malabar' ein Verhältnis von 1,5 : 1 aufweist. Die beiden zuletzt genannten Tatsachen können als Hinweise auf sortenspezifische Unterschiede im Exudationsverhalten gewertet werden.



**Tabelle 26: Ausscheidungsraten organischer Säuren bezogen auf eine Wurzelspitze.**

	<i>Lösung</i>	<i>Malat nmol/h</i>	<i>Citrat nmol/h</i>
IAC 17	500 $\mu$ M AlCl <sub>3</sub>	1.1*	1.3
	500 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub>	0.2	0.2
Malabar	500 $\mu$ M AlCl <sub>3</sub>	0.7*	1.1
	500 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub>	0.1	0.1

(\* , signifikant bei  $\nabla = 5 \%$ )

Um abzuschätzen, ob die gemessenen Exudationen ausreichen können, um Al<sup>3+</sup> effektiv zu entgiften, wurden mögliche Konzentrationen der organischen Säuren in der Rhizosphäre errechnet. Hierzu wurden zuerst die gemessenen Konzentrationen in den Probengefäßen in eine mittlere Ausscheidungsrate (nmol/h) je Wurzel umgerechnet (s. Tabelle 26). Als Basis der Berechnung des Rhizosphärenvolumens diente eine Wurzel mit 1 mm Durchmesser. Die Ausdehnung der hypothetischen Rhizosphäre wurde mit 10 mm in axialer und 0.1 mm in radialer Dimension angenommen. Der Wurzeldurchmesser von 1 mm entspricht etwa dem Durchmesser der Wurzeln, an welchen obige Messungen durchgeführt wurden. Die axiale Ausdehnung von 10 mm wurde gewählt, da dies der Länge entspricht mit welcher die Wurzeln bei der Messung in die Lösung eintauchten. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Gelfärbemethode, daß sich der Wurzelbereich, in welchem Exudation stattfindet, nur über wenige Millimeter hinter der Spitze erstreckt (s. Abbildung 28). Zum Schutz der Wurzel vor toxischem Aluminium reicht es theoretisch aus, wenn nur die unmittelbare Wurzeloberfläche entgiftet wird. Die Schichtdicke von 0.1 mm repräsentiert in dieser Schätzung die erweiterte Wurzeloberfläche. Die Konzentration von Malat und Citrat in dieser hypothetische Rhizosphäre, sind aus Tabelle 27 zu entnehmen.

**Tabelle 27: Konzentration von Malat und Citrat nach einer Stunde Efflux in eine hypothetische Rhizosphäre**

	<i>Lösung</i>	<i>Malat <math>\mu</math>M</i>	<i>Citrat <math>\mu</math>M</i>
IAC-17	500 $\mu$ M AlCl <sub>3</sub>	311	362
Malabar	500 $\mu$ M AlCl <sub>3</sub>	210	311

Werden die Malat- und Citratkonzentrationen gemeinsam betrachtet, sind in der hypothetischen Rhizosphärenkonzentrationen in der Größenordnung der Al-Konzentration zu erwarten. Bei diesen Konzentrationen liegen nur noch 1.1 % bzw. 6.0 % des Aluminiums als freies Al<sup>3+</sup> vor (s. Tabelle 28). Da Sojawurzeln in diesem Stadium bei ungehindertem Wachstum ca. 2-2.5 mm je Stunde wachsen, muß

theoretisch auch nur dieser Rhizosphärenbereich, anstelle der angenommenen 10 mm, entgiftet werden. Die durchgeführte Schätzung der Konzentrationen ist daher eher konservativ.

**Tabelle 28: Verteilung der Ionenspezies in einer hypothetischen Rhizosphärenlösung.**

<i>Al-Spezies</i>	<i>IAC-17</i>	<i>Malabar</i>
$Al^{3+}$	1.1 %	6.0 %
$AlOH^{2+}$		1.1 %
$AlCitrat$	27.1 %	24.4 %
$AlOHCitrat^-$	41.1 %	37.0 %
$AlMalat^+$	16.9 %	25.5 %
$AlMalat_2^-$	13.5 %	5.7 %

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Menge der Exudationen in einer Größenordnung liegen, die eine weitgehende Entgiftung toxischer Al-Ionen ermöglicht. Dieser Schluß deckt sich mit der Beobachtung, daß das Wurzelwachstum im Konzentrationsbereich von 500  $\mu$ M nur geringfügig reduziert ist, wenn die Wurzel in der Lage ist, die Rhizosphäre zu beeinflussen.

### 3.4 Entwicklung und Untersuchung spaltender Populationen

Für eine markergestützte Kartierung von Toleranzgenen, müssen zuerst spaltende Populationen erstellt werden. Damit eine Kartierung Erfolg hat, sollten die Kreuzungseltern gezielt ausgewählt werden. Die erste wichtige Voraussetzung ist, daß sich die Eltern möglichst deutlich in der untersuchten Eigenschaft unterscheiden. Weiterhin muß eine ausreichende Anzahl polymorpher Marker innerhalb der Kreuzungspopulation verfügbar sein, um eine genetische Karte im Abstand von maximal 20-30 cM abzusättigen. Die Zahl polymorpher Marker innerhalb der Kreuzungspopulation kann durch die Wahl von Kreuzungseltern mit einer hohen genetischen Distanz erhöht werden. Wenn auf eine genetische Karte verzichtet werden kann, und lediglich ein Marker gesucht wird, welcher mit der untersuchten Eigenschaft korreliert ist, kann auch der umgekehrte Weg gegangen werden. Durch die Auswahl genetisch nahestehender Kreuzungseltern besteht die Möglichkeit, daß diese in weiten Genombereichen identisch sind, sich jedoch im Bereich des gesuchten Toleranzgen unterscheiden. Durch diese Strategie wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß einer der verfügbaren polymorphen Marker mit der gesuchten Eigenschaft in Beziehung steht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Populationen entwickelt und näher untersucht. Eine F<sub>2</sub> Population der Kreuzung 'Doko RC' x 'Wilis' sowie eine F<sub>3</sub>-Population der Kreuzung 'Wilis' x 'B3578'.

Die erste der beiden Kreuzungen wurde erstellt, weil die beiden Sorten in den oben dargestellten Kulturversuchen deutlich unterschiedliche Reaktionen gegenüber Al-Streß zeigten (s. 3.3.2.4). Außerdem weisen die Sorten 'Doko RC' und 'Wilis' eine hohe genetische Distanz von 0.358 auf. Dies entspricht 114 polymorphen Markern. Hieraus kann abgeleitet werden, daß sich bei einer zufälligen Verteilung der Marker auf dem etwa 3400 cM (KEIM ET AL., 1997) großen Genom der Sojabohne, mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% ein Marker im Abstand von 35.5 cM zum gesuchten Genlocus befindet. Dieser Wert liegt für eine sichere Abdeckung des Genoms zu hoch. Durch die hohe Effizienz der AFLP-Technik, ist es aber kein Problem die Markerdichte schnell zu erhöhen. Die Sorte 'Wilis' wurde auch deswegen als Kreuzungspartner gewählt, weil sie die indonesische Sorte mit der weitesten Verbreitung ist (SUMARNO UND ADISARWANTO, 1996).

Die Eltern der zweite Kreuzung weisen im Feldversuch eine unterschiedliche Toleranz gegenüber Al-Streßstandorten auf (pers. Mitt. Darman M. Arsyad). Die genetische Distanz der Eltern ist mit einem Distanzkoeffizienten von 0.149 bzw. 46 polymorphen Banden relativ gering. Wilis wurde auch hier als Elter eingesetzt, um eine Verbindung zu der dichten Karte aus der ersten Population zu ermöglichen. Diese Population wurde auch genutzt, weil eine höhere Generation zu Verfügung stand, wodurch Meßwiederholungen möglich wurden.

Ein Vergleich der beiden Populationen sollte Analysen ermöglichen, ob die Al-Toleranz in 'Doko RC' und Feldtoleranz in 'B3578' möglicherweise auf unterschiedlichen Strategien und damit genetischen Grundlagen basieren.

### 3.4.1 Die Population 'Doko RC x Wilis'

In der Kreuzungspopulation 'Doko RC x Wilis' stand die zweite Filialgeneration zur Verfügung. Da in dieser Generation jedes Individuum einen einmaligen Genotyp darstellt, mußte das Wurzelwachstum mit und ohne Al-Streß an einem einzigen Keimling bestimmt werden. Die Keimlinge wurden zuerst in Al-freier Lösungskultur kultiviert und der Zuwachs nach 48 h bestimmt. Anschließend wurde Al zur Lösung gegeben und der Zuwachs nach weiteren 48 h unter Streßbedingungen erneut gemessen. Die Wurzelzuwächse sind in Abbildung 33 dargestellt. Die Relation dieser beiden Werte ergab als relatives Wurzelwachstum eine Maßzahl für die Al-Toleranz. Gegenüber den oben dargestellten Versuchen hat diese Methode den Vorteil, daß die Streßreaktion eines Individuums mit sich selbst in Beziehung gesetzt werden kann. Hierdurch kann der Einfluß unterschiedlicher Keimkraft verschiedener Individuen einer Sorte ausgeschlossen und dadurch ein großer Teil der Umweltvarianz eliminiert werden. Dieser Vorteil kann jedoch nicht den Mangel an Meßwiederholungen ausgleichen. Daß auch bei dieser Meßmethode eine starke Umweltvarianz zu beobachten ist, zeigt Abbildung 33. Obwohl bei den Elternsorten 'Doko RC' und 'Wilis' von homozygoten Genotypen ausgegangen werden muß, ist eine deutliche Streuung der Werte einzelner Individuen zu erkennen. Dies belegt klar, daß die tatsächliche Al-Toleranz eines Genotyps nicht an einem einzelnen Individuum bestimmt werden kann. Daher wird im weiteren auch nicht auf die Al-Toleranz einzelner F2 Individuen eingegangen.

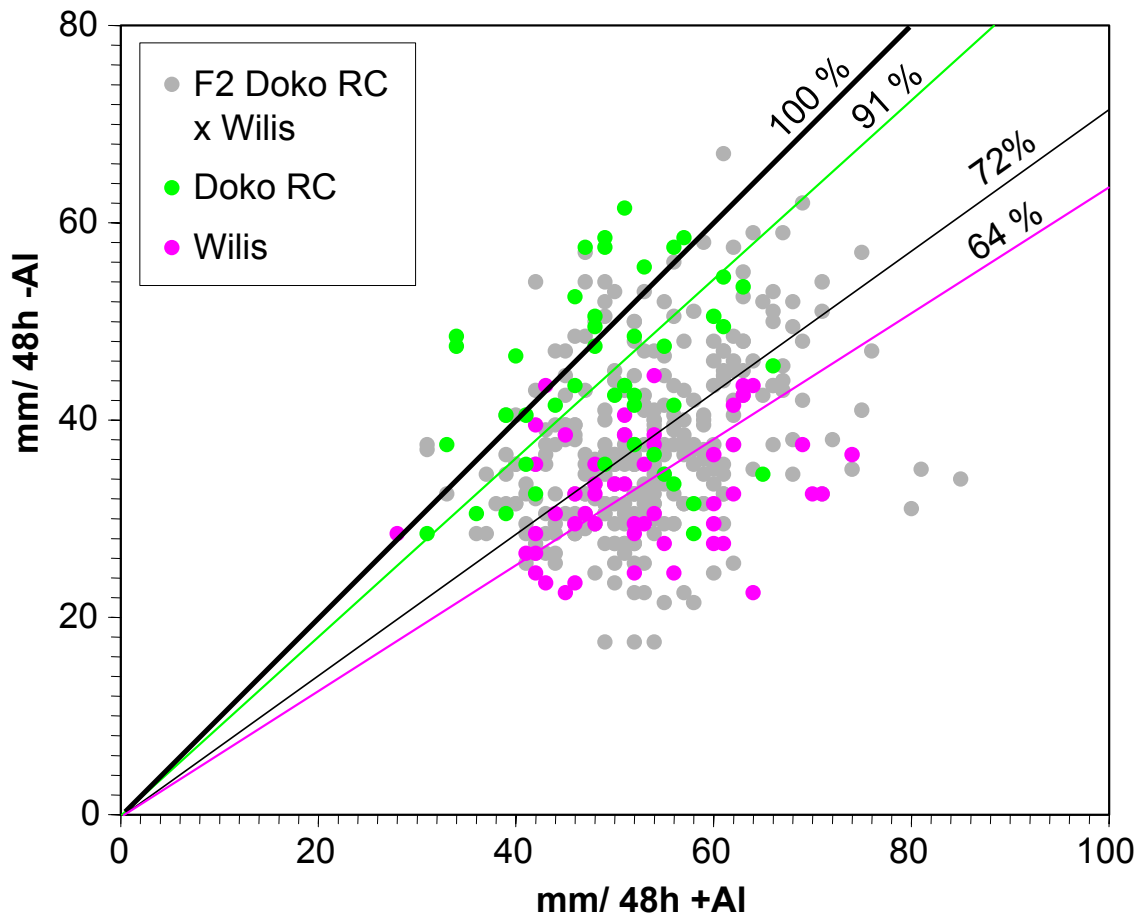
**Tabelle 29: Relative Wurzellänge von Eltern und F2 Nachkommen der Population 'Doko RC x Wilis'.**

	<i>Mittelwert relativer Wurzellänge</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl</i>
Doko RC	90.7 %	21.9	48
F2 Doko RC x Wilis	72.0 %	16.3	294
Wilis	64.0 %	14.4	53

In Tabelle 29 sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Anzahl der gemessenen Individuen der beiden Elternsorten und der Nachkommenschaftspopulation dargestellt. Die mittleren relativen Wurzellängen der drei Gruppen unterscheiden sich deutlich und können statistisch abgesichert werden. Die Sorte 'Doko RC' zeigt mit 91 % relativem Wachstum nur eine geringe Beeinträchtigung, während 'Wilis' mit 64 % Wachstum bereits deutlich geschädigt ist. Der Mittelwert der Nachkommenschaftspopulation liegt

mit 72 % erwartungsgemäß zwischen dem der Eltern, jedoch mit einer deutlichen Tendenz zu geringerer AI-Toleranz. Durch einen Kolmogorov-Smirnov-Test konnte bei den Elternlinien keine Abweichung der Meßwerte von der Normalverteilung nachgewiesen werden. Die Verteilung der Nachkommen weicht bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\nabla = 10\%$  signifikant von der Normalverteilung ab (Signifikanzniveau = 0,051).

Hieraus kann geschlossen werden, daß neben einer additiv genetischen Varianz auch eine dominant genetische Varianzkomponente auftritt. Bei der Betrachtung der Varianzen überrascht jedoch, daß die Standardabweichung der F2-Population nicht größer ist als die der Eltern. Es wäre zu erwarten, daß sich zur umweltbedingten Variabilität die genetische Variabilität addiert, was zu einer deutlich höheren Standardabweichung in der spaltenden F2-Population führen müßte. Daß dies nicht zu beobachten ist, liegt vermutlich daran, daß die Umweltvarianz wesentlich größer ist, als die genetische Varianz und diese nahezu vollständig überdeckt. Da die Umweltvarianz nicht unbedingt für alle drei Gruppen gleich sein muß, ist auch eine unterschiedliche Verteilung der Varianzen bei Eltern und Nachkommen denkbar. Bei der F2 Population könnte, aufgrund gleichmäßig guter Saatgutqualität, eine geringe Umweltvarianz vorliegen und daher vornehmlich genetische Varianz beobachtet werden. Dagegen wird bei den Elternlinien, wegen geringerer Saatgutqualität überwiegend umweltbedingte Variabilität beobachtet.



**Abbildung 33: Wurzelwachstum der Elternlinien und F2-Nachkommen in 48 Stunden mit bzw. ohne Al-Streß.**

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, tritt praktisch keine Transgression auf. Lediglich in Richtung geringerer Toleranz finden sich einige F2-Individuen, welche unterhalb der Spannweite des schlechteren Elters 'Wilis' liegen. Darüber hinaus finden sich noch eine Reihe von F2-Individuen, welche am absoluten Wurzelwachstum gemessen, besser als beide Eltern sind. Dies könnte jedoch auch auf höhere Keimlingsvitalität wegen besserer Saatgutqualität oder restlicher Heterosis zurückzuführen sein. Wird das relative Wurzelwachstum betrachtet, dargestellt durch Geraden durch den Ursprung, so übertrifft keiner der 294 F2-Individuen die besten 'Doko RC' Individuen. Alle wichtigen positiven Al-Toleranzgene sind also im Genotypen 'Doko RC' vereinigt. Die Sorte 'Wilis' scheint keinen Beitrag zu einer erhöhten Al-Toleranz leisten zu können. Diese Tatsache kann sich bei einer weiteren molekulargenetischen Analyse der Eigenschaft als sehr nützlich erweisen. Obwohl Al-Toleranz offensichtlich quantitativ vererbt wird, kann nach den vorliegenden Ergebnissen ein monogene Vererbung, welche von einer sehr starken Umweltvarianz überlagert wird, nicht ausgeschlossen werden. Bei einem einzigen Gen, welches im dominanten Allel ein Wurzelwachstum von 64 % erlaubt und im rezessiven Allel 91 %, wäre in einer spaltenden Nachkommenschaft ein durchschnittliches Wachstum von ca. 71 % zu erwarten. Die bisherigen Ergebnisse reichen

jedoch keinesfalls aus, um aussagekräftige Informationen über die Anzahl beteiligter Genloci, sowie deren Wirkung zu erhalten.

### 3.4.2 Die Population 'Wilis x B3578'

In der Kreuzungspopulation 'Wilis x B3578' stand eine F3-Generation mit 222 Linien zur Verfügung. Da in den F3-Familien ausreichend Saatgut zur Verfügung stand, konnten bei dieser Population je Linie bei 5 Keimlingen das Wurzelwachstum unter Streßbedingungen und unter streßfreien Bedingungen bestimmt werden. In Abbildung 34 sind die gemittelten Wurzellängen nach 3 Tagen mit bzw. ohne AI-Streß dargestellt. Die beiden Elternlinien sind in diesem Fall nur durch einen Punkt dargestellt, da auch für sie gemittelte Werte genutzt wurden. Die Sorte 'B3578' erzielt eine mittlere relative Wurzellänge von 81 % unter Streßbedingungen. 'Wilis' erzielt nur eine relative Wurzellänge von 55 %, während der Mittelwert aller F3-Familien mit 64 % zwischen den Werten beider Eltern liegt. Wie in der oben beschriebenen Population liegt das relative Wachstum der Kreuzungspopulation deutlich unter dem Mittel der beiden Eltern. AI-Toleranz scheint also rezessiv vererbt zu werden.

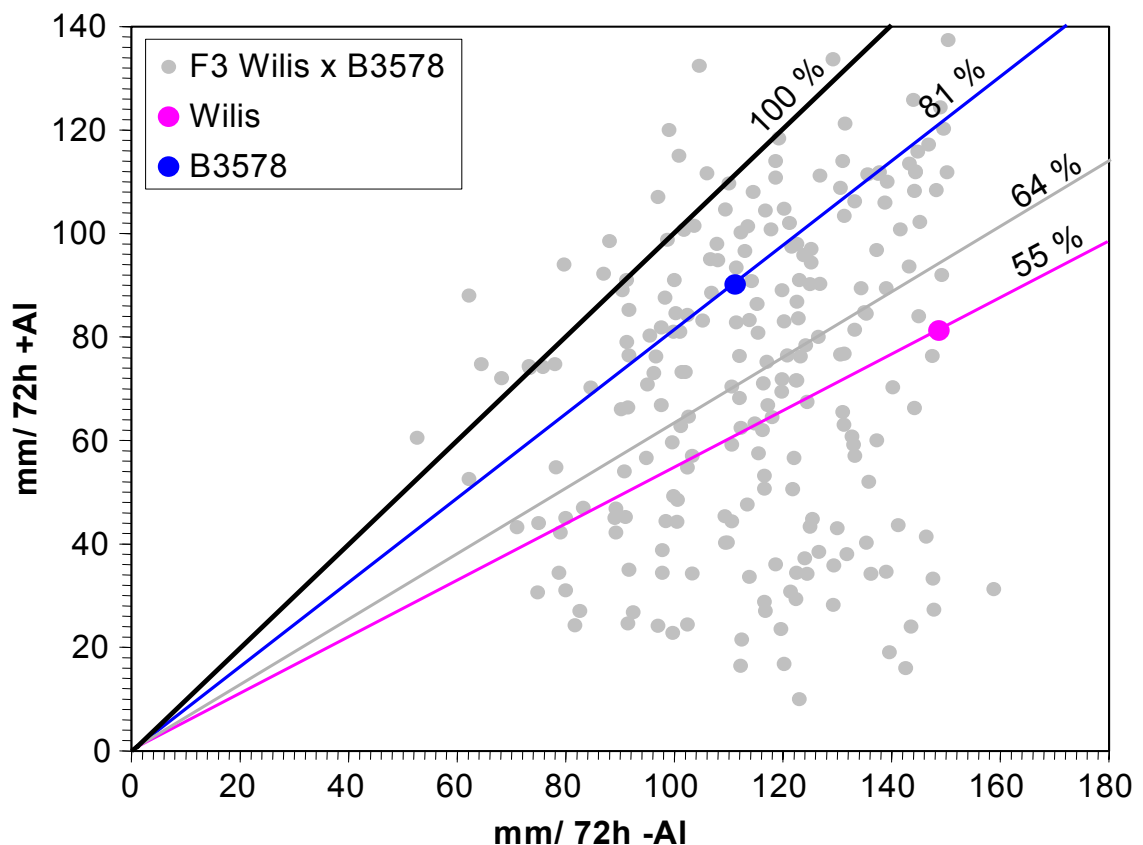
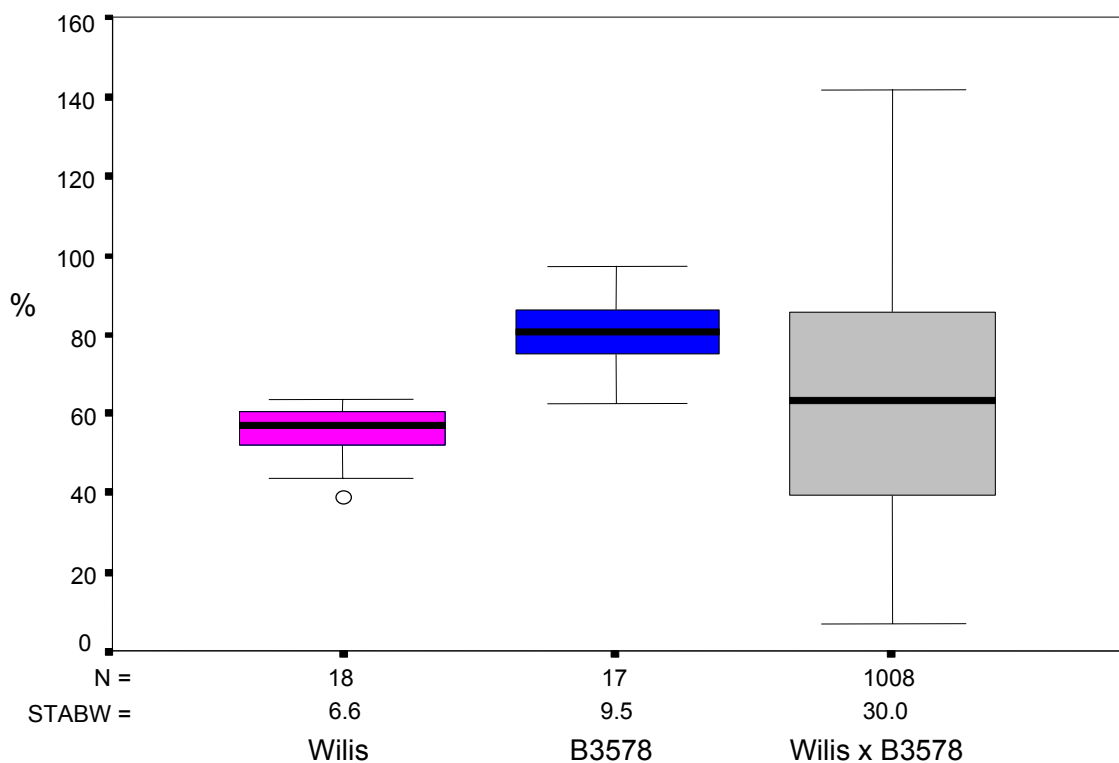


Abbildung 34: Wurzelwachstum der Elternlinien und F3-Familien nach 72 h mit bzw. ohne AI-Streß

Da die Varianz der Eltern in Abbildung 34 nicht abgeschätzt werden kann, wurde die Verteilung des relativen Wurzelwachstums der Individuen der Elternlinien und der

Nachkommenschaft in Abbildung 35 als Boxplot dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, daß im Gegensatz zu Population 'Doko RC x Wilis', die Variabilität der Kreuzungspopulation größer als die der Eltern ist. Es kann auch eine Transgression in beide Richtungen beobachtet werden. Positive wie negative Allele sind offensichtlich in beiden Eltern vorhanden. Trotz der geringen genetischen Distanz der Eltern (s. 3.1) scheint es möglich, daß aus dieser Kreuzung Linien hervorgehen, welche beide Eltern in der Al-Toleranz übertreffen. In einer Analyse der Eigenschaft mit molekularen Markern ist diese Verteilung positiver und negativer Allele nicht wünschenswert.

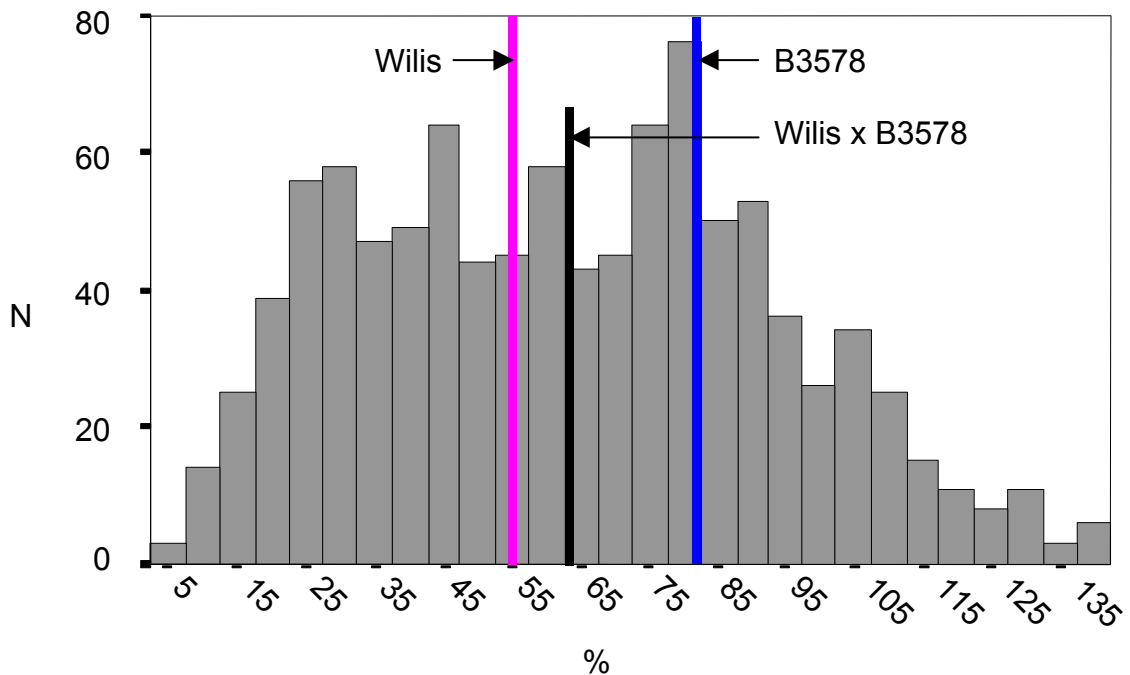


**Abbildung 35: Boxplot der relativen Wurzellänge von Individuen der Kreuzungseltern und Nachkommenschaften.**

In Abbildung 34 ist erkennbar, daß die grauen Punkte der F3-Familien keine homogene Punktwolke bilden. Eine Gruppe von F3-Familien erzielt unter Al-Streß nur einen Wurzelzuwachs von ca. 40 mm in 72 h, obwohl sie ohne Al-Streß ein normales Wurzelwachstum von ca. 120 mm in 72 h erreichten. Diese Gruppe bildet im Histogramm in Abbildung 36 einen Gipfel bei etwa 30 % relativem Wurzelwachstum, wodurch sich der Eindruck einer zweigipfeligen Verteilung ergibt. Durch einen Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung kann bei einem Signifikanzniveau von  $\nabla = 5\%$  eine Abweichung von der Normalverteilung nachgewiesen werden. Sollte tatsächlich eine zweigipfelige Verteilung zugrunde liegen, wäre dies ein Hinweis auf die Wirkung eines Major-Gens. Dieses könnte durch weitere Gene modifiziert, sowie durch Umwelteffekte überlagert werden und so eine weitgehend quantitative



Eigenschaft bedingen. Gegen diese These spricht jedoch, daß die Al-Toleranz der oben erwähnten Gruppe von Nachkommenschaftslinien deutlich unter der des schlechteren Elters ('Wilis') liegt. Wäre ein dominantes Allel eines Major-Gens für Al-Sensitivität in der Sorte 'Wilis' vorhanden, müßte der Mittelwert der Nachkommen mit diesem Allel mit der Al-Toleranz der Sorte 'Wilis' etwa übereinstimmen. Da jedoch eine Gruppe mit weiter verminderter Al-Toleranz vorhanden ist, muß auch die Sorte 'Wilis' mindestens ein Gen mit positiver Wirkung auf die Al-Toleranz besitzen.



**Abbildung 36: Histogramm der relativen Wurzellänge in der F3 Nachkommenschaft sowie Mittelwert der Eltern und Nachkommen und ideale Normalverteilung.**

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Population 'Doko RC x Wilis' wegen höherer genetischer Distanz und besserer phänotypischer Differenzierung vermutlich besser geeignet ist Marker für Al-Toleranzgene zu identifizieren.

Offensichtlich handelt es sich bei der Al-Toleranz um ein quantitativ vererbtes Merkmal. Die Ergebnisse geben jedoch Hinweise darauf, daß möglicherweise nur wenige Gene beteiligt sind, deren Wirkungen aber durch eine sehr große Umweltvarianz überlagert werden. Die genetische Varianzkomponente kann nur durch umfangreiche Meßwiederholungen mit homozygoten Linien sicher identifiziert werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Auswirkung der Aluminiumchemie auf die experimentelle Untersuchung der Al-Toleranz

#### 4.1.1 Chemie von Al-Ionen in Lösung

Obwohl Aluminium, mit 8% Gewichtsanteil, das häufigste Metall in der Erdkruste ist (GUTTMAN UND HENGGE, 1990), spielt es in der Regel keine spezifische Rolle im Stoffwechsel der Pflanze. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (JANSEN ET AL., 2000; WANATABE ET AL., 1998) vermeiden Pflanzen die Aufnahme dieses Elements. Im allgemeinen verursacht Aluminium keine Vergiftungserscheinungen, da es im Boden in Form von Oxiden, Silicaten, Sulfaten oder Phosphaten gebunden ist. Mit sinkendem pH-Wert steigt der Anteil an austauschbaren und gelösten Aluminiumionen (RITCHIE, 1995). Mit dem Übergang von Al-Ionen in Lösung werden diese verfügbar und damit potenziell phytotoxisch. Ein Problem bei der Beurteilung der Phytotoxizität von Aluminium besteht darin, daß Al auch in Lösung in einer Vielzahl verschiedener Ionen vorkommt (BERTSCH UND PARKER, 1996; NORDSTROM UND MAY, 1996). Die Verteilung der Ionenspezies hängt stark vom pH-Wert der Lösung, von der Konzentration anderer Ionen und möglicher Komplexbildner in der Lösung ab. Die verschiedenen Ionenspezies weisen deutlich unterschiedliche Toxizität auf. Daher sind Informationen über die Verteilung verschiedener Al-Ionen entscheidend für Planung, Durchführung und Beurteilung von Versuchen zur Al-Toxizität. Es ist nahezu unmöglich, die Konzentration der Al-Ionen ohne Beeinflussung des Lösungsgleichgewichtes zu bestimmen und die Ionen messtechnisch zu differenzieren (NOBLE ET AL., 1988). Mit allen photometrischen Messmethoden wird nur zwischen "mono-" und "polynuklearen" Al-Spezies unterschieden. Tatsächlich wird hier lediglich zwischen schnell bzw. langsam reagierenden Ionenformen differenziert (ALVA ET AL., 1989; BARNES, 1975; SEIP ET AL., 1984). Es ist jedoch zu bedenken, daß die Differenzierung nach Reaktionszeit, mehr oder weniger willkürlich erfolgt. Außerdem sind die meisten Ionenformen in beiden Fraktionen vertreten, wenn auch in stark unterschiedlichen Anteilen.

Die Verteilung und Konzentrationen der einzelnen Al-Ionenspezies in einer Lösung können durch Modellierung abgeschätzt werden. Hierzu muß die Gesamtkonzentration von Al, sowie die Gleichgewichtskonstanten aller möglicher Reaktionen bekannt sein. Die Gleichgewichtskonstanten können dabei in isolierten Systemen bestimmt werden (NORDSTROM UND MAY, 1996). Diese Modellierungen weisen meist Vereinfachungen auf, was dazu führt, daß die Ergebnisse mehr oder weniger stark von der Realität abweichen. In dieser Untersuchung wurden beispielsweise Ionenaustauschvorgänge, Präzipitation, und polynukleare Al-Spezies nicht berücksichtigt. Zudem gehen alle

Modellrechnungen davon aus, daß sich die Lösung im Gleichgewicht befindet. Die Einstellung des Gleichgewichts kann aber für einige Al-Spezies längere Zeit dauern (BERTRAM ET AL., 1996). In realen Bodenlösungen dürften die Verhältnisse daher deutlich von den Modellen abweichen. Unter geeigneten Bedingungen, wie etwa in Lösungskultur, stimmen berechnete und gemessene Konzentrationen jedoch gut überein (STEVENS ET AL., 1997).

Selbst mit Informationen über Konzentration und Verhältnis der Ionenspezies, ist es schwierig, die Toxizität eindeutig vorherzusagen, da die Bedeutung verschiedener Al-Komplexe umstritten ist. Die Versuche, diese Frage zu klären, wurden durch die Koexistenz mehrerer Ionenformen und die Abhängigkeit von pH-Wert und Lösungszusammensetzung behindert (KOCHIAN, 1995).

Viele lösliche Komplexe wie  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ ,  $\text{AlSO}_4^+$ ,  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$  und solche mit organischen Molekülen, scheinen nicht toxisch zu sein (ALVA ET AL., 1991; DIATLOFF ET AL., 1998; KINRAIDE, 1991; KINRAIDE, 1997). HUE ET AL. (1986) bezog jedoch  $\text{AlSO}_4^+$  in eine Summe toxischer Al-Ionen mit ein. Für  $\text{AlF}^{2+}$  und  $\text{AlF}_2^+$  konnte die Toxizität bei Tomate, Weizen und Hafer gezeigt werden (KINRAIDE, 1997; STEVENS ET AL., 1997). Diese Ionen dürften aber unter natürlichen Bedingungen keine wichtige Rolle spielen.

Im Zentrum der Diskussion stehen die Hydroxymonomere  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  und  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  (KINRAIDE UND PARKER, 1989). KINRAIDE (1997) schloß die Toxizität dieser Ionenspezies für Weizen aus. Auch CAMERON ET AL. (1986) und PAVAN ET AL. (1982) kamen zu dem Schluß, daß  $\text{Al}^{3+}$  hauptverantwortlich für die Al-Toxizität ist. NOBLE ET AL. (1988) fanden dagegen eine bessere Korrelation der Toxizität zur Summe von  $\text{Al}^{3+}$  und den Hydroxymonomeren. Andere Untersuchungen weisen darauf hin, daß  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  und  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ , nicht aber  $\text{Al}^{3+}$ , toxisch für Sojabohne und andere Pflanzenspezies ist (ALVA ET AL., 1986; BLAMEY ET AL., 1983; KINRAIDE UND PARKER, 1990). Diese Beobachtung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß  $\text{Al}^{3+}$  die Toxizität von  $\text{H}^+$  reduzieren kann, weshalb die Interpretation teilweise von den Autoren selbst angezweifelt wurde (KINRAIDE UND PARKER, 1990). Auch die Bildung, meist nicht berücksichtigter, polynuklearer Aluminiumspezies (z.B.  $\text{Al}_{13}$ ) kann dazu führen, daß die toxische Wirkung fälschlicherweise den mononuklearen Hydroxyaluminium-Spezies zugerechnet wird (KINRAIDE, 1991; KINRAIDE, 1993).

Die Bedeutung polynuklearer Aluminiumspezies ist ihrerseits umstritten. Es wurden eine Vielzahl möglicher polynuklearer Strukturen mit zwei bis 54 Al Atomen vorgeschlagen, aber nur für wenige konnten direkte Hinweise gefunden werden (BERTSCH UND PARKER, 1996). Mittels  $^{27}\text{Al}$  NMR (Kernmagnetische Resonanzspektroskopie) konnte die Existenz von  $\text{Al}_{13}$  ( $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{+7}$ ) unter Laborbedingungen eindeutig nachgewiesen und  $\text{Al}_{13}$  als dominantes polymeres Al-Ion in Lösung identifiziert werden (KLOPROGGE ET AL., 1993; THOMPSON ET AL., 1987). Je nach Methode der Mischung von Al- bzw. Basen- enthaltender Stammlösungen werden unterschiedliche Mengen an  $\text{Al}_{13}$  gebildet (PARKER UND BERTSCH, 1992). Die Relevanz dieses Ions unter natürlichen Bedingungen wird in verschiedenen Übersichtsartikeln

konträr beurteilt. Während FURRER (1993)  $Al_{13}$  als weitverbreitetes Ion mit wichtiger Rolle in natürlichen Systemen betrachte, wird dies von HEM UND ROBERSON (1990) und BERTSCH UND PARKER (1996) stark in Frage gestellt. Diese Skepsis wird vor allem damit begründet, daß bisher erst einmal  $Al_{13}$  in natürlichen Bodenlösungen nachgewiesen werden konnte (HUNTER UND ROSS, 1991). Darüber hinaus konnten diese Ergebnisse in nachfolgenden  $^{27}Al$  NMR Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Aus den oben dargestellten Erkenntnissen wird deutlich, daß auch die Beurteilung der Toxizität des  $Al_{13}$ -Ions schwierig ist. Während BLAMEY ET AL. (1983) zeigten, daß polymere Al-Spezies keine toxische Wirkung aufweisen, schlossen PARKER ET AL. (1989), daß unter bestimmten Lösungsbedingungen,  $Al_{13}$  bei Weizen und Sojabohne eine bis zu fünf mal höhere Toxizität aufweist als  $Al^{3+}$ . Auch WAGATSUMA UND KANEKO (1987) unterstützen die These, daß polymeres Al eine höhere Toxizität aufweist als  $Al^{3+}$ . Allerdings untermauern sie ihre Behauptung damit, daß die Toxizität bei steigendem pH-Wert im Bereich von 4-5 zunimmt, einer Beobachtung, die der allgemeinen Auffassung entgegensteht. Bei Weizen wurden Sorten identifiziert, welche tolerant gegenüber  $Al^{3+}$  nicht aber gegenüber  $Al_{13}$  waren. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren auf grundsätzlich unterschiedliche Toxizitätsmechanismen der verschiedenen Ionenspezies.

Nahezu allen Arbeiten zum Thema der Toxizität verschiedener Al-Ionenspezies ist jedoch gemeinsam, daß das  $Al^{3+}$ -Ion als dominierende Ursache für Al-Toxizität akzeptiert wird. Daher wurde in dieser Arbeit die Konzentration von  $Al^{3+}$  als Bezugsgröße zur Beurteilung der Al-Toxizität verschiedener Lösungen gewählt. Um diese Betrachtungsweise zur rechtfertigen, wurde darauf geachtet, die Bildung polymerer Al-Spezies zu verhindern. Der pH-Wert in Al-haltigen Lösungen wurde nie durch Zugabe von alkalischen Lösungen eingestellt. Vor der Zugabe einer Al-Stammlösung muß der pH-Wert so weit abgesenkt wurden, daß Al sicher gelöst bleibt (vgl. DELHAIZE ET AL., 1993a). Andererseits darf der pH-Wert keinesfalls unter den Zielwert absinken, da er aus den genannten Gründen nicht mit Basen angehoben werden darf.

Aus den Ergebnissen von 3.2 wurde abgeleitet, daß für Al-Streß-Versuche ein pH-Wert von 4.3 gut geeignet ist. Dieser Wert liegt im Bereich der in der Literatur genannten Werte (GRAUER UND HORST, 1990; HETHERINGTON ET AL., 1988; HORST UND KLOTZ, 1990). Die, in der Modellrechnung, starke Reduktion freier  $Al_3^+$ -Ion bei einer Erhöhung des pH-Wertes über 4.3, wurde auch von NOBLE UND HARDING (1989) bei der Messung monomerer Al-Spezies gefunden. Die Modellrechnung 3.2 zeigt, wie wichtig der pH-Wert bei der Beurteilung von Ergebnissen verschiedener Lösungsversuche zur Al-Toleranz ist. Besondere Vorsicht ist geboten, wenn Al-Toleranz bei pH-Werten über 5.0 interpretiert wird (CAMARGO, 1984), da in diesem Bereich kaum toxische Al-Ionen zu erwarten sind.

Insgesamt wird deutlich, daß die exakte Quantifizierung des toxischen Stoffs in Versuchen zur Al-Toleranz zu Problemen führt. Ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Autoren und Untersuchungsmethoden ist daher sehr schwierig.

## 4.2 Strategien zur Selektion auf Al-Toleranz

Da die toxische Wirkung von Aluminium offensichtlich sehr stark von den Umweltbedingungen abhängt, stellt sich die Frage, welche Versuchsbedingungen am besten geeignet sind, Al-tolerante Pflanzen zu selektieren.

Von Feldversuchen, über Topfkultur und kurzfristigen Wurzellängentests, bis zur Gewebekultur, wurden eine Vielzahl von Strategien genutzt, um die Reaktion von Pflanzen gegenüber saurem Boden zu untersuchen. Die Eignung jeder Methode, mit ihren typischen Vor- und Nachteilen, hängt vom Ziel der jeweiligen Untersuchung ab. Die genannte Reihe ist gekennzeichnet von einer zunehmenden Abstraktion der realen Verhältnisse. Dies erlaubt eine bessere Differenzierung einzelner Aspekte der Sensitivität gegenüber sauren Böden, bis hin zu detaillierten physiologischen Reaktionen in der Gewebekultur (RATH, 2000). Dem gegenüber steht die steigende Entfernung von natürlichen Anbaubedingungen. Unter Berücksichtigung der Komplexität des Systems Pflanze-Boden unter sauren Bedingungen, ist es schwierig und oft riskant, Ergebnisse über die Bedingungen des jeweiligen Experiments hinaus zu interpretieren (BLAMEY, 1995).

### 4.2.1 Kulturmethoden

Eine abschließende Beurteilung der Toleranz gegenüber sauren Bodenbedingungen kann nur im Feldversuch erfolgen. Auch zur Identifikation anbauwürdiger Genotypen ist die Selektion vor Ort sicherlich am besten geeignet. Die Selektion im Feld weist aber auch deutliche Nachteile auf. Wegen der starken Variabilität der Umweltbedingungen, müssen viele Wiederholungen über mehrere Anbaujahre analysiert werden, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Diese Notwendigkeit wird bei den in 3.3.2.3 dargestellten Feldversuchen deutlich. Hier wurden die Ergebnisse am Standort Malang möglicherweise stärker von der Wasserversorgung beeinflusst, als von den Bodenbedingungen. Für eine abschließende Beurteilung der Toleranz der hier untersuchten Genotypen, müssen daher weitere Ergebnisse abgewartet werden. Durch mehrjährige Wiederholungen kann der Anteil der umweltbedingten Varianz abgeschätzt werden und damit der genetisch bedingte Varianzanteil identifiziert werden.

Selbst wenn der genetische Anteil der Eigenschaft "Toleranz gegenüber saurem Boden" abgeschätzt werden kann, ergeben sich weitere Probleme. Während in vielen sauren Mineralböden Al- und Mn-Toxizität ein Problem darstellen, ist auch Nährstoffmangel weit verbreitet (FOY, 1992). Insbesondere die Verfügbarkeit von Ca, Mo, P und N limitiert häufig das Pflanzenwachstum (SPEHAR, 1994a). Weiterhin sind Wechselwirkungen zwischen Al-Toleranz und Wasser-Streß gut dokumentiert (GOLDMAN ET AL., 1989a; GOLDMAN ET AL., 1989b). Im Feldversuch können Ursachen für die reduzierte Leistungsfähigkeit der Pflanzen kaum getrennt werden. Es wird also immer ein Komplex aus einer Vielzahl von Faktoren betrachtet. Da die einzelnen Faktoren der

Eigenschaft "Säuretoleranz" wiederum multigen veranlagt sein können, sinkt die Selektionsschärfe gegenüber allen Einzelfaktoren und Genen stark ab. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, daß an verschiedenen Standorten unterschiedliche Faktoren, wie Al-Toxizität, Mn-Toxizität (z.B. Standort Siting), Phosphatmangel, Calciummangel etc. dominieren. Hierdurch würden unterschiedliche Aspekte einer komplexen Eigenschaft erfasst werden. Insgesamt führt dies zu einem sehr langsamen und unsicheren Zuchtfortschritt (GOLDMAN ET AL., 1989b).

Eine Aufspaltung der verschiedenen Streßfaktoren durch geeignete Wahl der Testmethoden, ermöglicht eine schärfere Selektion auf bestimmte entscheidende Faktoren und verspricht damit einen schnelleren Zuchtfortschritt. Eine Korrelation von molekularen Markern zur Eigenschaft "Säuretoleranz" hat, bei vertretbarem Aufwand, nur Aussicht auf Erfolg, wenn die Eigenschaft in die zugrundeliegenden Einzelfaktoren aufgegliedert werden kann. Für diese Aufgabe sind Feldversuche aus den genannten Gründen schlecht geeignet. Es müssen daher Methoden genutzt werden, welche eine bessere Kontrolle der Umweltbedingungen, insbesondere im Bereich der Wurzel erlauben.

Topfversuche mit saurem Boden ermöglichen eine bessere Kontrolle von Klima und Boden (NOBLE ET AL., 1984). Darüber hinaus wird ein wesentlich einfacherer Zugriff auf die Wurzelmasse der Pflanze ermöglicht (FOY ET AL., 1993, ARMIGER ET AL., 1968). Da die Wurzel der primäre Ort der Al-Toxizität ist, ermöglichen Wurzelmessungen eine genauere Bestimmung der Symptome, als Messungen an der oberirdischen Biomasse. Prinzipiell besteht bei der Kultur im Boden aber weiterhin das Problem, daß verschiedene Streßfaktoren schlecht differenziert werden können, da die Zusammensetzung der Bodenlösung nur unzureichend kontrolliert werden kann.

Um Al-Toxizität als Teilaspekt der Problematik saurer Böden genauer zu untersuchen, ist es notwendig, eine möglichst vollständige Kontrolle der chemischen Zusammensetzung des Wachstumssubstrates zu erreichen. Dies kann nur erreicht werden, wenn statt natürlicher Böden, künstliche Substrate als Kulturmedium genutzt werden. Am weitesten verbreitet ist dabei die Kultur in Nährlösung. In dieser Arbeit wurden, neben der reinen Nährlösung, auch Quarzsand und Filterpapier als feste Substrate zusammen mit definierten Nährlösungen eingesetzt. Das Ziel dieser Versuche war es, eine möglichst einfache und verlässliche Methode zur Bestimmung der Al-Toleranz verschiedener Genotypen zu entwickeln. Dies sollte erreicht werden, indem in den Versuchen die Faktoren Zeit und Kulturmedium variiert wurden.

Die Sandkultur erlaubte eine längerfristige Kultur in einem bodenähnlichem Substrat. Der Nachteil dieser Kulturmethode ist, daß wurzelbezogene Messparameter nur einmal am Ende des Versuchszeitraumes erhoben werden können. Die Kultur in Nährlösung und auf Filterpapieren erlaubte dagegen die regelmäßige Erhebung von Daten, ohne das Wurzelwachstum nennenswert zu stören. Der Nachteil dieser beiden Kulturmethoden besteht in der Tatsache, daß der Beobachtungszeitraum auf wenige Tage beschränkt bleiben muß.

### 4.2.2 Einfluß des Pflanzenmaterials und der Kulturmethode

Der Vergleich der Ergebnisse aller Kulturmethoden (s. Tabelle 24) zeigt, daß die Beziehung zwischen den einzelnen Methoden sehr schwach ist. Insbesondere zwischen den Kurzzeitversuchen und den Langzeitversuchen besteht offensichtlich keine Korrelation (s. Tabelle 25). Die mangelnde Korrelation kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits können die unterschiedlichen Reaktionen in den Kulturmethoden selbst bedingt sein. Andererseits kann sich die Al-Toleranz im Jugendstadium von der reifer Pflanzen unterscheiden.

Über eine physiologisch begründet Keimlingstoleranz kann nur spekuliert werden, da keine Untersuchungen von Pflanzenmaterial unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit den gleichen Analysemethoden verfügbar sind. HANSON UND KAMPRATH (1979) schlossen aus einem Vergleich von Lösungsversuchen mit Topfversuchen, daß zumindest ein Teil der, im Keimlingsstadium expremierten Al-Toleranz, spezifisch für dieses Entwicklungsstadium ist. Eine ausgeprägte Alters- oder Jugendtoleranz im Feld wurde bisher nicht beobachtet. Im allgemeinen zeigen sensitive Pflanzen auf saurem Boden in allen Entwicklungsstufen eine reduzierte Vitalität. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen Genotyp und Keimlingstoleranz wird über die Korngröße vermittelt. In Untersuchungen von DEVINE ET AL. (1979) wurde eine positive Korrelation von Korngröße und Al-Toleranz im Keimlingsstadium erkennbar. Dies läßt sich durch eine bessere Nährstoff- und Energieversorgung erklären. HANSON UND KAMPRATH (1979) wiesen darauf hin, daß eine höhere Wurzeldicke und Wachstumsgeschwindigkeit einen positiven Einfluß auf die Al-Toleranz im Keimlingsstadium haben. Auch bei den Versuchen dieser Arbeit wurde die überragende Bedeutung der Keimlingsvitalität beobachtet. Da Saatgut von sehr unterschiedlicher Herkunft benutzt werden mußte, war die Keimlingsvitalität sehr variabel. Dies hat die Versuchsergebnisse vermutlich stark beeinflusst. SPEHAR (pers. Mitteilung) stellte die Forderung auf, für Keimlingstests sollte grundsätzlich nur Saatgut genutzt werden, welches unter einheitlichen Bedingungen produziert wurde. Diese Forderung dürfte jedoch von den wenigsten, in der Literatur beschriebenen Untersuchungen erfüllt worden sein. Bei den meisten Untersuchungen wird nur der Hinweis gegeben, daß die Keimlinge vor den Versuchen selektiert wurden (BAIER ET AL., 1995; CAMPBELL UND CARTER, 1990; HANSON UND KAMPRATH, 1979; KASIM UND WASSOM, 1990), was als Hinweis auf den Einfluß der Vitalität gewertet werden kann. HANSON UND KAMPRATH (1979) berücksichtigten dieses Problem und fanden eine sehr geringe Wechselwirkung mit der Saatgutherkunft. Allerdings wurde diese Aussage ausdrücklich auf qualitativ hochwertiges Saatgut beschränkt. Um den Einfluß unterschiedlicher Saatgutqualität auf die Ergebnisse zu minimieren, wurde in dieser Arbeit das Wurzelachstum unter Al-Streß, immer zum Wachstum ohne Streß in Beziehung gesetzt. Auch BIANCHI-HALL ET AL. (1998) wiesen in diesem Zusammenhang auf den Vorteil der relativen Betrachtungsweise hin.

Die zweite mögliche Begründung für die schlechte Korrelation der Kulturmethoden liegt in den Methoden selbst begründet. Da Schnelltests auf Al-Toleranz meist als

Ersatz oder Ergänzung zu Feldtests entwickelt wurden, stehen eine Reihe von Untersuchungen zum Vergleich von Lösungskultur und Feldversuchen zur Verfügung. Die Schlußfolgerungen aus diesen Versuchen gehen dabei weit auseinander. BAIER ET AL. (1995) fanden bei 43 Weizensorten Korrelationskoeffizienten von über 80 % für die Merkmale Feldbonitur und Wurzellänge in Lösungskultur mit 20-150  $\mu\text{M}$  Al bei pH 4.0. Die Problematik der Beurteilung verschiedener Versuche wird an diesem Beispiel besonders deutlich. Konzentration und pH-Wert lagen in einem üblichen Bereich, doch die Herstellung der Nährlösung muß skeptisch betrachtet werden. Die Autoren beschreiben, daß der pH-Wert mit HCl auf 4.0 eingestellt, Al zugegeben, und anschließend der pH-Wert erneut mit KOH auf pH-4.0 eingestellt wurde. Nach eigener Erfahrung sinkt bei dieser Vorgehensweise der pH-Wert auf bis zu pH 3.5 ab. Zur Anhebung des pH-Wertes auf 4.0 muß daher eine erhebliche Menge KOH zugegeben werden. Die Zugabe einer starken Base, wie KOH, führt jedoch zur Bildung polymerer Al-Spezies (s.o). Auch wenn die Korrelation von Nährlösung und Feldbonitur nicht zu leugnen ist, dürfen die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere Lösungsversuche übertragen werden.

Eine signifikante Korrelation zwischen relativem Wurzelwachstum in Lösungskultur und Kornertrag fanden HOWELER UND CADAVID (1976) bei der Analyse von 240 Reissorten. Bei dieser Analyse erstreckte sich die Lösungskultur über einen Zeitraum von drei Wochen. Auch REID ET AL. (1971) konnten bei Gerste eine positive Korrelation zwischen Topfversuchen mit saurem Boden und einer Lösungskultur über 18 Tage nachweisen. Möglicherweise hat bei diesen Versuchen der etwas längere Zeitraum der Lösungskultur eine positive Korrelation begünstigt. Bei Sojabohnen sind deutlich weniger Berichte vorhanden, welche die Eignung von Lösungsversuchen als Test für Feldtoleranz bestätigen. CAMPBELL UND CARTER (1990) konnten für 12 Sojagenotypen eine Korrelation von 81 % zwischen Wurzelwachstum in Lösungskultur (11  $\mu\text{M}$  Al, pH 4.6) und Sproßtrockenmasse bei Kultur in saurem Boden im Gewächshaus nachweisen. Daß SARTAIN UND KAMPRATH (1978) und SAPRA ET AL. (1982) keine Beziehung zwischen der Al-Toleranz in Lösungs- und Topfkultur finden konnten, begründet CAMPBELL UND CARTER (1990) mit unzureichender Versuchswiederholung. In einer Reihe von Versuchen konnten NOBLE ET AL. (1982; 1984; 1987) ebenfalls keine Korrelation zwischen Lösungs- und Topfkultur finden. Ergebnisse von Feldversuchen stimmten dagegen gut mit den Lösungstests überein.

In dieser Arbeit wurde eine signifikant negative Korrelation zwischen der realtiven Wurzellänge in Lösungskultur und Pflanzenhöhe am Standort Lampung gefunden. Diese Beobachtung kann nicht mit unzureichender Versuchswiederholung erklärt werden. Daß diese negative Beziehung kein einmaliges Phänomen ist, zeigt eine Untersuchung von KASIM ET AL. (1990). Die Autoren fanden bei Mais ebenfalls eine negative Rangkorrelation zwischen relativer Wurzellänge in Lösungskultur und der Vitalität im Feldversuch.



Bei einer Analyse von 938 Sojagenotypen in Lösungskultur konnten HORST UND KLOTZ (1990) zwar eine gute Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien, aber keine Korrelation zur Leistungsfähigkeit im Feldversuch nachweisen. Basierend auf der Annahme, daß möglicherweise mechanischer Widerstand die Al-Toleranz beeinflusst, entwickelten die Autoren eine Kulturmethode mit Quarzsand und Nährlösung (HORST ET AL., 1990). HORST UND KLOTZ (1990) fanden eine schwache aber signifikante Korrelation zwischen Sand- und Lösungskultur. Die Korrelation zu Feldversuchen wurde durch den Einsatz von Quarzsand zwar höher blieb aber unsignifikant. In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verschob sich das Bild dahingehend, daß keine Korrelation zwischen Lösungs- und Sandkultur feststellbar war. Dagegen wurde zwischen dem relativen Feldertrag auf saurem Boden und der relativen Wurzelmasse in Sandkultur eine signifikante positive Korrelation gefunden. Diese Diskrepanz in den beobachteten Beziehungen zwischen verschiedenen Kulturmethoden, kann möglicherweise durch die Kulturdauer erklärt werden. HORST UND KLOTZ (1990) analysierten das Wurzelwachstum in Sandkultur über einen Zeitraum von 4 Tagen, im Gegensatz zu 33 Tagen Beobachtungszeitraum in dieser Arbeit. Durch die längere Dauer entsprach die Sandkultur dieser Arbeit vermutlich mehr der Feldkultur, was zu einer höheren Korrelation der Ergebnisse führte.

Für einen direkten Vergleich von kurzzeitiger Kultur in Fest- und Flüssigmedium wurde die Kulturmethode der Filterkultur entwickelt. Die Versuche in Lösungs- und Filterkultur wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt und die gleichen Meßparameter wurden erfasst. Trotzdem besteht keine Korrelation zwischen den relativen Wurzellängen in beiden Kulturmethoden. Es muß also ein fundamentaler Unterschied zwischen beiden Methoden bestehen. Auch zu den Ergebnissen der Sandkultur und Feldversuche wurde, abgesehen von der negativen Korrelation zur Pflanzenhöhe am Standort Lampung, keine Beziehung gefunden. Damit hat sich die Hoffnung, mit der Filterkultur einen "boden-ähnlichen" Schnelltest zu entwickeln leider nicht erfüllt.

Daß die Kulturmethode einen entscheidenden Einfluß auf die Al-Toleranz hat wurde von HORST UND KLOTZ (1990) und dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen. Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Kulturmethode können daher grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Die kurzzeitigen Tests dieser Arbeit waren offensichtlich ungeeignet, um Genotypen für den Anbau auf saurem Boden zu identifizieren. Die Sandkulturmethode nimmt eine Zwischenstellung im Bezug auf Feldversuche und kurzzeitige Lösungsversuche ein. Die Kulturzeit lag mit 33 Tagen zwischen einer vollen Vegetationsperiode und drei Tagen der Lösungskultur. Auch das Substrat verbindet Boden und Lösungskultur. Diese Testmethode war vermutlich aus diesem Grund die einzige, welche eine signifikant positive Korrelation zu den relativen Erträgen auf sauren Böden erzielte. Leider ist der Aufwand dieser Methode so groß, daß sie als Alternative für Feldversuche kaum Vorteile bringt.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung von Lösungsversuchen als schnellen Ersatz für Feldversuche, bleiben Zweifel offen. In einer Reihe von Untersuchungen wurde die

Eignung zwar deutlich nachgewiesen, in ebenso vielen Fällen war die Korrelation aber nur schwach ausgebildet oder fehlend. Eine allgemein gültige Bestätigung von Lösungsversuchen, als Testmethode in der Züchtung, liegt also keinesfalls vor. Die Beziehung sollte weiterhin für jede spezielle Versuchsanstellung überprüft werden. Dies bringt auch ein Zitat von C.D. Foy (FOY ET AL., 1993), einem der Väter der Al-Toleranz-Forschung, deutlich zum Ausdruck: "Our findings illustrate the complexitiy of plant response to Al in acid soils. Methods of selecting soybeans for adaptation to acid soils remain far from standardized; perhaps they can never be".

### 4.3 Physiologische Grundlagen der Al-Toxizität

Da deutliche Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Testmethode und Al-Toleranz vorhanden sind, soll diese Beobachtung näher betrachtet werden. Eine naheliegende Erklärung für diese Wechselwirkung ist, daß mit den verschiedenen Untersuchungsmethoden unterschiedliche Faktoren der Toleranz erfasst werden. Bei der Betrachtung von Feldversuchen ist dies offensichtlich, da hier ein Komplex von Einflüssen erfasst wird, in welchem Al-Toxizität nur einen Faktor darstellt. Die Erklärung der Unterschiede in den Gewächshausversuchen ist mit diesem Ansatz weniger offensichtlich. Da in all diesen Versuchen die Umweltbedingungen, besonders im Wurzelbereich, gut kontrolliert wurden, ist davon auszugehen, daß Al-Toxizität immer der limitierende Faktor für das Pflanzenwachstum war. Die Wechselwirkung mit der Kulturmethode, wäre jedoch erklärbar, wenn sich auch Al-Toleranz weiter in verschiedene physiologische Reaktionen auftrennen ließe. Um mögliche Toleranzmechanismen beurteilen zu können, müssen die physiologischen Ursachen der Al-Toxizität genauer betrachtet werden.

Die Toxizität einiger Al-Ionspezies ist noch unklar (s. 4.1), daher verwundert es nicht, daß auch der primäre Wirkmechanismus von Aluminium auf physiologischer Ebene nach wie vor umstritten ist (TAYLOR, 1995; KOCHIAN, 1995; HORST, 1995). Aluminium geht mit einer Vielzahl von intrazellulären und extrazellulären Stoffen Bindungen ein, daher wurden nahezu ebensoviele Mechanismen der Phytotoxizität vorgeschlagen. Auswirkungen von Al-Streß sind in der Zellwand, der Plasmamembran und dem Symplasten nachzuweisen.

#### 4.3.1 Zellteilung oder Zellstreckung

Die Reduktion des Wurzelwachstums ist das erste und wichtigste Symptom von Al-Toxizität. Daher wurde schon frühzeitig ein Zusammenhang mit der Zellteilung im Wurzelmeristem vermutet (CLARKSON, 1965). Eine Reihe von Untersuchungen konnten die Wechselwirkung von Aluminium mit Chromatin und eine Hemmung der Zellteilung nachweisen (BRAZDOVICOVA ET AL., 1994; LIU ET AL., 1995; MATSUMOTO, 1988; MORIMURA ET AL., 1978). Bei Mais verursacht die Applikation von Aluminium an die meristematische Zone eine Hemmung des Wurzelwachstums, nicht aber eine Applikation an die Elongationszone (RYAN ET AL., 1993). Andere Autoren kommen bei der gleichen Spezies zu dem konträren Schluß, daß nicht die meristematische Zone, sondern die Elongationszone die höchste Sensitivität gegenüber Aluminium aufweist (KOLLMEIER ET AL., 2000; SIVAGURU UND HORST, 1998). Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, daß Al die Elongation hemmen kann. Bei Soja ist die Zellteilungsrate des Meristems offenbar weniger sensitiv, als die Elongationsrate der Wurzel (HORST UND KLOTZ, 1990). KOCHIAN (1995) weist darüber hinaus darauf hin, daß die Hemmung des Wurzelwachstums so schnell erfolgt, daß die primäre Ursache sehr wahrscheinlich nicht in der Zellteilung zu finden ist.

### 4.3.2 Symplast oder Apoplast

Eng verbunden mit der Frage, ob Zellteilung oder Zellstreckung zuerst geschädigt werden, ist die Frage, ob Al-Toxizität ein primär symplastischer oder apoplastischer Effekt ist. Zur Beurteilung dieser Frage muß die Mobilität von Aluminium betrachtet werden.

Es besteht weitgehend Einigkeit darüber, daß bei Al-exponierten Wurzeln der weit überwiegende Teil des aufgenommenen Al in der Zellwand gebunden wird. Über Menge und Rate der Aufnahme in den Symplasten sind jedoch stark differierende Angaben zu finden. LAZOF ET AL. (1994; 1996) konnten bei Soja bereits nach 30 min Aluminium im Symplasten nachweisen, bei Hafer gelang dieser Nachweis dagegen erst nach zehn Tagen (MARIENFELD ET AL., 1995; MARIENFELD UND STELZER, 1993). Auch Untersuchungen an dem Modellsystem *Chara corallina*, einer Alge mit Riesenzellen, zeigten, daß sich 99,99 % des akkumulierten Al in der Zellwand befand. Eine Aufnahme über die Plasmamembran wurde auch gefunden, allerdings in sehr geringer Rate (REID ET AL., 1995; RENGEL UND REID, 1997).

Auch wenn der Weg und die Rate der Al-Aufnahme noch unklar sind, ist doch erwiesen, daß Al die Plasmamembran passieren kann. Eine toxische Wirkung im Symplasten kann daher nicht ausgeschlossen werden.

### 4.3.3 Symplastische Phytotoxizität

Da Al offensichtlich in den Symplasten eindringen kann (LAZOF ET AL., 1996), stellt sich die Frage, welche Auswirkungen dies auf den intrazellulären Stoffwechsel hat. Da in der intakten Zelle ein pH-Wert von etwa 7.5 aufrecht erhalten wird, ist zu erwarten, daß Al als  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  vorliegt. Das Aluminat-Ion ist weder intrazellulär noch extrazellulär toxisch (KINRAIDE, 1990; MARTIN, 1988). Da außerdem im Cytosol eine Vielzahl potentieller Liganden vorhanden sind, liegt die Aktivität von freiem  $\text{Al}^{3+}$  etwa im Bereich von  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  Mol/l. Trotzdem kann die Toxizität durch Wechselwirkungen mit Stoffen, welche eine sehr hohe Affinität zu Al haben, nicht ausgeschlossen werden (MARTIN, 1988; TICE ET AL., 1992).

Aus der medizinischen Forschung ist bekannt, daß Al die Signaltransduktion über die Phosphoinositidkaskade beeinflussen kann (HAUG ET AL., 1994; SHI ET AL., 1993). Obwohl das System in Pflanzenzellen noch unzureichend charakterisiert ist, sind Auswirkungen auf Proteinphosphorylierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol wahrscheinlich.

Calcium spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels, als Cofaktor von zahlreichen Enzymen und als "second messenger" (KAUSS, 1987). Dabei ist umstritten, ob Al-Streß zu einer Zunahme oder Abnahme von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  führt, da es auch bei reduzierter Aufnahme, aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden könnte (LINDBERG UND STRID, 1997; JONES ET AL., 1998a; 1998b;). Ein plötzlicher

Anstieg des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels kann zur Bildung von Callose führen und damit die Elongation der Wurzel hemmen (HORST, 1995; WISSEMEIER ET AL., 1987).

Darüberhinaus greift  $\text{Al}^{3+}$ , durch Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$  Haushaltes oder direkte Interaktion, in die Regulation Calmodulin-abhängiger Stoffwechselfvorgänge ein. Es ist allerdings umstritten, ob  $\text{Al}^{3+}$  an Calmodulin bindet und zu Strukturveränderungen führt (SIEGEL UND HAUG, 1983a; SIEGEL UND HAUG, 1983b; SLASKI, 1989; SLASKI, 1990; YOU UND NELSON, 1991).

An Al-gestressten Pflanzenwurzeln wurden Veränderungen im Cytoskelett festgestellt, was zu einer Hemmung des Wurzelwachstums führen könnte (BLANCHAFLORE ET AL., 1998; HORST ET AL., 1999; SASAKI ET AL., 1997a; SASAKI ET AL., 1997b). Es wird vermutet, daß Aluminium, Magnesium aus GTP- bzw. ATP-Komplexen verdrängt, und hierdurch Aufbau und Stabilität von Mikrotubuli und Actinfilamenten beeinträchtigt werden (GRABSKI UND SCHINDLER, 1995; SIVAGURU ET AL., 1999).

Die starke Bindung von  $\text{Al}^{3+}$  an die energiereichen Phosphate ATP und GTP hat vermutlich massive Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel (MARTIN, 1986; PETERSON UND BERGMAN, 1989). Auch das Verhältnis von NAD zu NADP verschiebt sich durch Beeinflussung der Calmodulin-abhängigen NAD-Kinase (LORENC-PLICINSKA UND KAROLEWSKI, 1994). Hierdurch werden weitere energieabhängige Stoffwechselfvorgänge direkt oder indirekt in Mitleidenschaft gezogen.

Auf eine Reihe weiterer eher spekulativer Wirkungen, wie etwa die Beeinflussung der Phytohormonregulation (KOLLMEIER ET AL., 2000; MARSCHNER, 1991), soll hier nicht näher eingegangen werden. Die Wechselwirkung von Aluminium mit dem Chondriom wurde bereits oben dargestellt.

#### 4.3.4 Apoplastische Phytotoxizität

Insbesondere HORST (1995) vertritt die These, daß Al nicht in den Symplasten aufgenommen werden muß, um toxisch zu wirken. Ausgehend von der Annahme, daß Al nur in geringen Mengen und langsam die Plasmamembran durchdringt (DELHAIZE ET AL., 1993a; GODBOLD ET AL., 1988), entwickelte Horst und Grauer ein Model, welches Al-Toxizität mit rein extrazellulären physiologischen Wirkmechanismen erklärt (GRAUER, 1993; GRAUER UND HORST, 1992). Das Model basiert auf der Annahme, daß die Bindung an, bzw. Konkurrenz um sensitive Bindungsstellen in der Zellwand und der äußeren Plasmamembran Al-Toxizität bedingt. Dies stützt sich unter anderem auf die verbreitete Beobachtung, daß steigende Konzentrationen von mehrwertigen Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  in der Lage sind, die Toxizität einer bestimmten Al-Aktivität zu reduzieren. Die Auswirkungen von Al auf die Plasmamembran wurden bereits oben dargestellt, deshalb wird hier nur auf die Bindungsstellen in der Zellwand eingegangen.

Als wichtigster Effekt wird hier die Wechselwirkung mit der Pektinmatrix der Zellwand aufgeführt. BLAMEY ET AL. (1993) konnten in einem *in vitro* Versuch zeigen, daß die Zugabe von Al die Permeabilität einer künstlichen Ca-Pektat Membran sofort

und grundlegend reduziert. Aber auch Wechselwirkungen mit anderen Zellwandbestandteilen, wie Enzymen, Extensin und Xyloglucan ändern höchstwahrscheinlich nicht nur die physikalische sondern auch die funktionelle Integrität der Zellwand. Eine sofortige Reduktion der Zellwandelastizität expandierender Zellen, würde die sehr schnelle Reaktion des Wurzellängenwachstums hervorragend erklären. In eigenen Versuchen konnte eine Einschränkung des Wurzelwachstums bereits 15 min nach Al-Zugaben beobachtet werden (nicht dargestellt).

#### **4.3.5 Wechselwirkung mit der Plasmamembran**

Der Plasmamembran kommt die Vermittlerrolle zwischen Apoplast und Symplast zu. Hier finden eine Reihe wichtiger Stoffwechselprozesse statt, welche von Al beeinflusst werden können. Viele Publikationen befassen sich mit der Aufnahme von Nährstoffen in die Wurzelzelle, bei Anwesenheit von Al (FOY ET AL., 1978; LASSEIGNE ET AL., 1996; OZAKI ET AL., 1998). Die Bindung von Aluminium kann sowohl zu einer Hyperpolarisation, als auch zu einer Depolarisation führen und damit die Aufnahme verschiedener Ionen unspezifisch hemmen (KINRAIDE, 1993; OLIVETTI ET AL., 1995; LINDBERG UND STRID, 1997; SIVAGURU ET AL., 1999). Darüber hinaus können auch Calcium- und Magnesiumkanäle spezifisch gehemmt werden (HUANG ET AL., 1992; RENGEL UND ELLIOT, 1992). Allerdings konnte für beide Ionen gezeigt werden, daß das Wurzelwachstum bereits bei Al-Konzentrationen reduziert ist, bei welchen die Aufnahme von Ca und Mg noch nicht beeinflusst wird (RYAN ET AL., 1994b; GODBOLD UND JENTSCHKE, 1998).

Die Integrität bzw. Fluidität der Plasmamembran kann auch durch Lipidperoxidation (CAKMAK UND HORST, 1991; RATH, 2000; STASS UND HORST, 1995) gestört werden, damit werden praktisch alle Membranvorgänge behindert.

## 4.4 Mögliche Toleranzmechanismen

Bei der oben dargestellten Fülle an Toxizitätsmechanismen sind theoretisch ebensoviele Toleranzmechanismen der Pflanze denkbar. Tatsächlich wurden aber nur relativ wenige in der Forschung näher untersucht. Im Prinzip stehen der Pflanze zwei verschiedene Strategien zur Verfügung. Al-Streß kann vermieden werden, oder der Stoffwechsel kann so angepasst werden, daß aufgenommenes Al toleriert wird (CARVER UND OWNBY, 1995; TAYLOR, 1988c; KOCHIAN, 1995; MARSCHNER, 1991). Aufgrund der örtlichen Trennung wird häufig auch von "interner" und "externer" Toleranz gesprochen.

Externe Toleranzmechanismen haben den konzeptionellen Vorteil, daß alle oben beschriebenen Toxizitätsmechanismen verhindert werden, indem die Wechselwirkung mit Al verhindert wird. Interne Toleranzmechanismen müßten dagegen für jeden betroffenen Stoffwechselvorgang entwickelt werden. Es ist zu vermuten, daß aus diesem Grund wesentlich mehr im Bereich der externen Toleranz geforscht wurde (KOCHIAN, 1995).

MARSCHNER (1991) beschreibt den reduzierten Bedarf an Nährstoff als internen Toleranzmechanismus, da er der Pflanze ermöglicht, unter Streßbedingungen zu existieren. Da Nährstoffmängel im Zusammenhang mit Al-Toxizität eher als sekundäre Effekte angesehen werden, kann dies hier eigentlich nicht als Al-Toleranzmechanismus angesprochen werden.

Über die Entwicklung toleranter Stoffwechselprodukte, Enzyme und Regulationssysteme liegen keinerlei Informationen vor. Daher verbleiben als symplastische Toleranzmechanismen wiederum nur "interne" Vermeidungsstrategien. In Tee, einer Al-Akkumulator Pflanze, wird Al offensichtlich in der Wurzel chelatisiert und als nicht toxisches Spezies in das Blattgewebe verlagert (MATSUMOTO ET AL., 1976). Aus Lösungskultur-Versuchen wurde geschlossen, daß Al von Proteinen im Cytoplasma gebunden wird (ANIOL, 1984), oder in der Vacuole kompartimentiert wird (TAYLOR, 1988a). MA ET AL. (1998) haben die interne Entgiftung durch Oxalsäure bei Buchweizen dokumentiert.

Insgesamt ist das Verständnis interner Toleranzmechanismen bestenfalls bruchstückhaft (KOCHIAN, 1995) und die Hinweise mangelhaft.

Im Bezug auf externe Toleranzmechanismen werden hauptsächlich drei Strategien diskutiert. Die Reduzierung der Kationen-Austausch-Kapazität (= KAK) der Zellwand könnte zu einer geringeren Affinität von Al zur Wurzel führen und dadurch den Streß vermindern. Durch eine Anhebung des pH-Wertes in der Rhizosphäre könnten tolerante Pflanzen Al entgiften bevor es empfindliche Wurzelbereiche schädigen kann. Oder die Entgiftung von Al in der Rhizosphäre erfolgt durch die Ausscheidung organischer Säuren.

Die Hypothese, daß eine Reduktion der Elektronegativität (KAK) der Zellwand zu einer geringeren Bindung von Al und Mn und damit zu einer Reduktion des Al-Streß führen könnte, wurde schon sehr früh aufgestellt (VOSE UND RANDALL, 1962). Tatsächlich existieren Berichte, daß Pflanzen, welche an saure Böden angepasst sind über eine geringere KAK verfügen (BLAMEY ET AL., 1990; BÜSCHER ET AL., 1990). Bei einer Betrachtung vieler Pflanzengenotypen konnte jedoch keine eindeutige Beziehung zwischen KAK und Al-Toleranz hergestellt werden (GRAUER, 1992). Bei der Resistenz gegen Schwermetalle, wurde sogar der gegenteilige Effekt beobachtet. Die Bindung von Schwermetallionen an die Zellwand, gefördert durch eine hohe KAK, erhöhte die Resistenz (VERKLEIJ UND SCHAT, 1990; WANG UND EVANGELOU, 1994). Insgesamt muß diese Hypothese aus heutiger Sicht skeptisch betrachtet werden, auch wenn ein Beitrag zu Al-Toleranz nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Änderung der KAK kann als Übergang zwischen internen und externen Toleranzmechanismen betrachtet werden, da die Wirkung zwar außerhalb der Zelle auftritt, aber möglicherweise innerhalb eines geschädigten Gewebes (HORST, 1995). Die beiden übrigen Toleranzmechanismen sind eindeutig extern angesiedelt, da sie außerhalb der Wurzel in der umgebenden Rhizosphäre stattfinden.

Die Hypothese, daß Al-tolerante Pflanzen die Toxizität reduzieren, indem sie den pH-Wert der Rhizosphäre anheben, ist konzeptionell sehr interessant und überzeugend. Dennoch kann nach Betrachtung der umfangreichen Literatur zu diesem Thema (TAYLOR, 1991) ein entscheidender Beitrag pflanzeninduzierter pH-Änderungen in der Rhizosphäre ausgeschlossen werden. Beispielsweise fanden TANG VAN ET AL. (1989) bei einem Lösungsversuch, daß ein Al-sensitiver Reisgenotyp den pH-Wert der Lösung stärker erhöhte als ein Al-toleranter Genotyp. Auch eine Untersuchung mit besserer örtlicher Auflösung, Dank dem Einsatz von pH-Mikroelektroden, konnte bei zwei unterschiedlich sensitiven Weizensorten keinen systematischen Unterschied nachweisen (MIYASAKA ET AL., 1989). Nicht zuletzt wird argumentiert, daß die Ausscheidung von Basen durch die Pflanzenwurzel, zur Bildung von  $Al_13$  führen könnte, was die Toxizität möglicherweise sogar erhöhen kann.

Die Ausscheidung organischer Säuren, und damit die Entgiftung von Al in der Rhizosphäre bietet ein ähnlich überzeugendes Konzept wie die Anhebung des pH-Wertes.  $Al^{3+}$ -Ionen bilden mit verschiedenen niedermolekularen organischen Säuren sehr stabile Komplexe aus (HUE ET AL., 1986; KERVEN ET AL., 1995). Dies zeigen auch die Modellrechnungen in 3.2 mit Gleichgewichtskonstanten, welche von GERKE (1997) und NORDSTROM UND MAY (1996) übernommen wurden. Malat weist eine etwas geringere Affinität zu Al auf als Citrat und bindet daher  $Al^{3+}$ -Ionen nicht ganz so effektiv. Diese Tatsache erklärt vermutlich auch die Beobachtung, daß Al von Malat weniger effektiv detoxifiziert wird als Citrat (HUE ET AL., 1986; OWNBY UND POPHAM, 1989). Daß niedermolekulare Säuren in der Lage sind die toxische Wirkung von Al in sauren Lösungen durch Komplexierung zu reduzieren, konnte in einer Reihe von Untersuchungen nachgewiesen werden (OWNBY UND POPHAM, 1989; SUHAYDA UND



HAUG, 1986; SUTHIPRADIT ET AL., 1990). Die Hypothese der spezifischen Ausscheidung von organischen Säuren durch die Pflanzenwurzel, hat in letzter Zeit viel Unterstützung erfahren und soll im Zusammenhang mit weiteren Ergebnissen dieser Arbeit näher betrachtet werden (s. 4.5.1)

#### 4.4.1 Ursachen der unterschiedlichen Reaktion auf verschiedene Kulturmethode

Zunächst aber wird die Frage geklärt, ob die oben beschriebene schlechte Korrelation der Lösungsversuche zu den Feld-, Sand-, und Filterversuchen, durch die Erfassung unterschiedlicher Toleranzmechanismen erklärt werden kann. Die oben dargestellten Hypothesen bieten Ansätze zur Erklärung der Unterschiede zwischen Sand-, Filter- und Lösungskultur. Der auffälligste Unterschied in den Kulturbedingungen besteht darin, daß in Sand- und Filterkultur ein vielfaches der Al-Konzentration eingesetzt werden mußte um, mit der Lösungskultur vergleichbare Toxizitätssymptome auszulösen. In der Untersuchung von HORST UND KLOTZ (1990) waren in Sandkultur zehnfach höhere Al-Konzentrationen nötig. Dieser Effekt, wurde in der vorliegenden Arbeit voll bestätigt. Hier lösten 20 µM Al in Lösung eine stärkere Reduktion des Wurzelwachstums aus als 1400 µM in Sandkultur. Daraus kann geschlossen werden, daß Soja in Sandkultur Al-Konzentrationen toleriert, welche um mehr als den Faktor 70 höher liegen als in Lösungskultur. Der höhere Faktor im Vergleich zu HORST ET AL. (1990) kann dadurch erklärt werden, daß in der vorliegenden Arbeit auf Phosphat und den Chelatoren in der Nährlösung verzichtet wurde. Beide Stoffe binden Al sehr effektiv. Um den Einfluß des Kulturmediums in unmittelbar vergleichbaren Versuchen zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit Sojakeimlinge parallel in Lösung und auf Filtern kultiviert und die Wurzellänge gemessen. Auch hier wurde eine um den Faktor 40 höhere Al-Konzentration toleriert. Ein vergleichbarer Effekt wurde von LARSEN ET AL. (1998) bei Versuchen mit *Arabidopsis thaliana* dokumentiert. Zur Identifikation von Al-toleranten Mutanten wurden die Pflanzen in Gel kultiviert. Das Gel wurde zuvor mit einer 1500µM Al haltigen Lösung equilibriert um Al-Toxizität auszulösen. In weiteren Analysen wurden die Mutanten in Lösungskultur mit nur 25 µM Al kultiviert, um Al-Streß auszulösen.

Pflanzen tolerieren also in festen Medien um ein bis zwei Zehnerpotenzen höhere Al-Konzentrationen als in Lösungskultur. Der entscheidende Unterschied zwischen den Kulturmethode besteht darin, daß die Wurzeln in festen Medien in der Lage sind die Rhizosphäre zu beeinflussen, während das Rhizosphärenmedium in der Lösungskultur ständig ausgetauscht wird. Die wesentlich höhere Toleranz in festen Medien beruht also höchst wahrscheinlich auf einer Entgiftung der Rhizosphäre durch Wurzel-ausscheidungen.

Die Erklärung von HORST ET AL. (1990), daß der mechanische Widerstand die erhöhte Toleranz bedingt, konnte ebenso ausgeschlossen werden wie die Möglichkeit, daß die Festmedien selbst Al-Ionen binden oder entgiften. Um den Austausch der

Rhizosphärenlösung zu reduzieren, wurden Versuche in unbelüfteter und damit nicht-turbulenter Lösungskultur durchgeführt (nicht dargestellt). Hier zeigte sich, daß ein vielfaches der Al-Konzentration der turbulenten Lösung toleriert wurde. Besonders deutlich wird dieses Phänomen, wenn an einem Wurzelsystem mit einer Lösung zwei unterschiedliche Wachstumsreaktionen ausgelöst werden können (Abbildung 37). Dieses Phänomen wurde zufällig in einem längerfristigen Kulturversuch mit turbulenter Lösung beobachtet. Bei diesem Versuchsaufbau verblieb zwischen dem Wasserspiegel der Lösung und der Fixierung der Pflanzen ein Luftraum von ca. 1 cm. In diesem Bereich wurden die Seitenwurzeln nicht von der Lösung umspült, sondern nur von den Spritzern der platzenden Luftblasen leicht benetzt. Diese Seitenwurzeln zeigten ein praktisch ungehindertes Wachstum, während das Wachstum der Seitenwurzeln in der turbulenten Lösung nahezu vollständig blockiert wurde. Dieser Beobachtung ist zu entnehmen, daß das Wurzelwachstum, als Maß für die Al-Toleranz, stark davon abhängt, wie stark die Nährlösung an der Wurzeloberfläche umgewälzt wird. Es ist also durchaus möglich, daß Wurzeln in Nährlösung, abhängig von der Intensität der Belüftung und der Position im Lösungsbehälter, deutlich unterschiedlichem Al-Streß ausgesetzt sind. Dies ist vermutlich ein weiterer Grund dafür, daß es sehr schwierig ist Al-Streß-Versuche zu kalibrieren.



**Abbildung 37: Ca. 3 Wochen alte Wurzeln aus Al-haltiger Lösungskultur.**

Die oben dargestellten Versuche und Beobachtungen belegen zweifelsfrei, daß die **Entgiftung der Rhizosphäre** der entscheidende Toleranzmechanismus der Sojabohne gegenüber Al-Streß ist.

Bei Versuchen in turbulenter Lösungskultur wird also eine Form der **internen Toleranz** erfasst, während in der direkt vergleichbaren Filterkultur die **externe Toleranz** (Beeinflußung der Rhizosphäre) erfasst wird. Diese beiden Eigenschaften sind offensichtlich nicht korreliert. Aus diesen Überlegungen ergeben sich Konsequenzen für den Vergleich von Lösungskultur und Feldversuch. Im Boden ist die Pflanzenwurzel sicher in der Lage die Rhizosphäre zu beeinflussen. In Lösungskultur kann der, für den Anbau auf sauren Böden, entscheidende Mechanismus der Al-Toleranz also nicht erfasst werden. Aus diesem Grund muß die Selektion von Genotypen, basierend auf Daten aus Lösungskultur, **grundsätzlich in Frage gestellt** werden.

## 4.5 Die Entgiftung der Rhizosphäre

Mit der Gelfärbemethode konnte die Entgiftung freier  $Al^{3+}$ -Ionen in der Rhizosphäre direkt sichtbar gemacht werden. Dabei zeigte sich, daß nur im Bereich der Wurzelspitze Aluminium entgiftet wird. Daß die Ausscheidung detoxifizierender Stoffe auf die Wurzelspitze, den Bereich der höchsten Sensitivität der Wurzel, beschränkt ist, weist darauf hin, daß es sich um eine spezifische Toleranzreaktion handelt.

Wird diese Exudation als spezifische Reaktion auf Al-Streß akzeptiert, so kann umgekehrt aus dem Ort der Ausscheidung auf den Ort primärer Toxizität geschlossen werden (vgl. 4.3.1). Die Vermessung von hematoxylingefärbten Gelen ergab, daß die Exudation in einem Bereich von 2-3 mm axialer Ausdehnung, 2-3 mm hinter der Wurzelspitze stattfindet. Dies würde bedeuten, daß weder die Wurzelhaube, noch der meristematische Bereich nennenswerte Mengen an Al-detoxifizierenden Stoffen ausscheiden. Im Umkehrschluß heißt das, daß diese beiden Gewebe auch nicht die primären Orte toxischer Al-Wirkung sind. Die beobachtete Exudationszone deckt jedoch auch die Elongationszone nicht vollständig ab. Daraus folgt, daß die Frage, ob Zellteilung (Meristem) oder Zellstreckung (Elongationszone) Ziele der Al-Toxizität sind, weiter differenziert werden muß.

BALUSKA ET AL. (1990) wiesen erstmals auf den speziellen Status einer Gruppe von Zellen am distalen Ende der Elongationszone hin. Später wurde dieser Gewebebereich genauer differenziert und die Bezeichnungen "Distal Elongation Zone" (DEZ) (ISHIKAWA UND EVANS, 1993b; ISHIKAWA UND EVANS, 1995) bzw. "Distal Transition Zone" (DTZ) (BALUSKA ET AL., 1996) geprägt. BALUSKA ET AL. (1996) identifizierten bei Mais die DTZ im Bereich von 1.7-3.4 mm hinter der Wurzelspitze. Die Zellen dieser Entwicklungsstufe haben die Zellteilung abgeschlossen und bereiten sich offenbar auf die schnelle Streckung in der Elongationszone vor. In diesem Stadium reagieren die Zellen in einer Reihe physiologischer Reaktion anders, und z.T. entgegengesetzt zu den Zellen der Elongationszone. ISHIKAWA UND EVANS (1993a; 1993b) zeigten die spezielle Reaktion der DTZ gegenüber Schwerkraft-, Berührungs-, elektrischer, hormoneller und Wasserstreß-Stimulation. MASSON ET AL. (1993) konnten bei *A. thaliana* unterschiedliche Genexpressionsmuster zwischen DTZ und Elongationszone nachweisen. Es wurden "promotor-trap" Insertionsmutanten (s. 4.8) gefunden, deren Expression auf die DTZ beschränkt war. Ebenso wurden Mutanten gefunden, welche Reportergene in der absoluten Wurzelspitze und der Elongationszone, nicht aber der DTZ, exprimierten.

Aus den Ergebnissen der Gelfärbeversuche und der Tatsache, daß die DTZ offensichtlich sehr sensitiv auf viele Umweltreize reagiert, kann geschlossen werden, daß bei Soja möglicherweise auch Al-Toxizitäts- und Al-Toleranzmechanismen auf diese Zellen beschränkt sind. Diese These wird durch Untersuchungen am Mais unterstützt. SIVAGURU UND HORST (1998) konnten durch die hochauflösende

Applikation von Al an Maiswurzeln zeigen, daß die höchste Sensitivität im Bereich von 1-2 mm hinter der Wurzelspitze auftritt. In einer Folgeuntersuchung wurde die massive Beeinträchtigung des Cytoskeletts der Epidermis- und äußeren Kortezellen im Bereich der DTZ, innerhalb der ersten Stunde der Al-Applikation nachgewiesen (SIVAGURU ET AL., 1999).

#### 4.5.1 Ausscheidung organischer Säuren

Wie aber, wird die beobachtete Entgiftung der Rhizosphäre von der Pflanze bewerkstelligt? Da die These der pH-Barriere in der Literatur kaum noch Unterstützung findet, wurde in dieser Arbeit gezielt nach organischen Säuren gesucht, welche durch Chelatisierung Aluminium binden können.

Die Analyse von Rhizosphärenlösung von Sojawurzeln zeigte, daß Malat, Citrat, Oxalat und Phosphat ausgeschieden werden. In einer einfachen  $\text{CaCl}_2$  Lösung bei pH 4.3 lag die Konzentration der Stoffe knapp über der Detektionsgrenze. Nach der Applikation von Al-Streß konnte ein starker Anstieg der Malat- und Citratexudation nachgewiesen werden. Die Exudation von Oxalat und Phosphat stieg dagegen nur geringfügig an. Die Malatexudation unter Al-Streß lag bei der Sorte 'Malabar' signifikant niedriger als in der Sorte 'IAC 17'. Bei der Citratausscheidung konnte kein Unterschied zwischen den Sorten nachgewiesen werden. Das Verhältnis der Ausscheidungen mit bzw. ohne Al-Streß lag in der Sorte 'Malabar' höher, da 'IAC 17' eine höher konstitutive Ausscheidung aufwies. Ein sortenspezifischer Unterschied in der Al-Entgiftung, zwischen den beiden untersuchten Genotypen, bleibt also zweifelhaft. Die Sorten wurden ausgewählt, da sie minimale bzw. maximale Al-Toleranz in Sandkultur aufwiesen. In späteren kurzzeitigen Versuchen in Filter- und Lösungskultur konnte dieser Toleranzunterschied nicht bestätigt werden. Möglicherweise beruht also die Tatsache, daß keine deutlichen Unterschiede in der Ausscheidung organischer Säuren gefunden wurden darauf, daß sich die Sorten in der Al-Toleranz nicht deutlich unterscheiden. Für eine klare Absicherung der Korrelation zwischen sortenspezifischer Al-Toleranz und Exudation sind weitere Untersuchungen erforderlich. Die Ausscheidung organischer Säuren als Reaktion auf Al wurden hier erstmals für Sojabohne dokumentiert.

Bei anderen Pflanzenarten ist dieses Phänomen relativ gut beschrieben. Die erste Veröffentlichung, welche sich konkret mit dem Effekt der Al induzierten Ausscheidung organischer Säuren befasst, stammt von MIYASAKA ET AL. (1991). Nach Kultur in einer aseptischen Al-haltigen Lösung über acht Tage, schüttete das Wurzelsystem einer Al-toleranten Gartenbohnenorte siebzigmal so viele Citrat aus, als bei der Kultur ohne Al-Streß und zehnmal so viel wie eine Al-sensitive Sorte.

Am besten untersucht dürfte die Al-induzierte Ausscheidung von Malat an Wurzelspitzen von Weizen sein. DELHAIZE ET AL. (1993a; 1993b) konnten eine hohe Korrelation zwischen Al-induzierter Malatexudation, Ausschluß von Al aus der Wurzelspitze und Al-Toleranz nachweisen. Die Autoren folgerten, daß die Malatexudation die Wurzelspitzen toleranter Genotypen durch Komplexierung freier

$\text{Al}^{3+}$ -Ionen vor Toxizität schützt. RYAN ET AL. (1995) wiesen nach, daß die Malat Ausschüttung eine  $\text{Al}^{3+}$ -spezifische Reaktion ist und durch  $\text{Al}_{13}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  nicht ausgelöst werden kann. Wie in dieser Arbeit für Soja demonstriert wurde, ist auch bei Weizen die Ausscheidung auf die Wurzelspitze begrenzt. In weiteren Untersuchungen mit verschiedenen Al-toleranten und Al-sensitiven Sorten, wurde die Korrelation zwischen Malat Exudation und Al-Toleranz bestätigt (RYAN ET AL., 1994a; BASU ET AL., 1994). Die Ausscheidung von Malat scheint also ein genereller Al-Toleranzmechanismus bei Weizen zu sein.

Sehr ähnliche Effekte wie bei Weizen konnte PELLET ET AL. (1995) bei Mais nachweisen. Hier erfolgte bei Al-Streß eine schnelle Ausschüttung von Citrat an Wurzelspitzen toleranter Genotypen. In der gleichen Studie wurde auch die Ausscheidung von anorganischem Phosphat beobachtet, es blieb jedoch unklar, ob dieser Effekt zur Al-Bindung beitrug. JORGE UND ARRUDA (1997) beobachteten bei Mais die Ausscheidung von Malat.

Welche Säuren als Reaktion auf Al-Streß ausgeschieden werden, ist offensichtlich artspezifisch. Citratausscheidung wurde bei Cassia (MA ET AL., 1997) und Oxalat bei Taro und Buchweizen (MA UND MIYASAKA, 1998; ZHENG ET AL., 1998b) gefunden. Eine gleichzeitige Ausscheidung von Citrat und Malat wie in dieser Arbeit bei Soja, wurde nur von ZHENG ET AL. (1998b) bei Raps, Hafer und Rettich berichtet.

Die verschiedenen Chelatoren weisen eine unterschiedliche Affinität zu  $\text{Al}^{3+}$  auf und sind daher vermutlich auch unterschiedlich effektiv bei der Entgiftung von Al. Es ist also möglich, daß sortenspezifische Unterschiede nicht nur in der Menge der Ausscheidungen, sondern auch im Verhältnis der verschiedenen organischen Säuren begründet sind. Bisher wurde dieser Effekt jedoch bei keiner Pflanzenart beschrieben. Die in dieser Arbeit zwischen zwei Sorten gefundenen Unterschiede im Verhältnis von Malat zu Citrat, geben bestenfalls einen Hinweis auf die Möglichkeit sortenspezifischer Unterschiede, lassen sich aber statistisch nicht absichern.

Die Frage, ob die ausgeschiedenen Mengen an organischen Säuren ausreichen, um Al vollständig zu entgiften und die Toleranz mancher Genotypen zu erklären, ist nach wie vor umstritten (JONES ET AL., 1996; PARKER UND PEDLER, 1998). Auch der Abbau durch Mikroorganismen in der Rhizosphäre, könnte eine effektive Entgiftung behindern (JONES UND KOCHIAN, 1996). In dieser Arbeit konnten unter Al-Streß sehr hohe Ausscheidungsraten für Citrat und Malat gefunden werden. Weiterhin wurde durch eine direkte Visualisierung der Entgiftungszone nachgewiesen, daß diese räumlich eng begrenzt ist. Die Modellierung der Ionengleichgewichte unter den gefundenen Bedingungen zeigte, daß die Größenordnung der Ausscheidungen ausreicht, um Al **vollständig** zu entgiften.

Bei der Beurteilung, ob die Konzentration ausreicht, spielt das Volumen, welches entgiftet werden muß eine entscheidende Rolle. Bei der Abschätzung des Volumens, wurden sehr konservative Werte angenommen. Die Entgiftungszone beschränkt sich jedoch vermutlich axial auf den Bereich der DTZ und radial auf eine dünne Schicht

außerhalb des Apoplasten der Epidermis. Es muß also nur ein sehr geringes Volumen entgiftet werden. Das heißt, das Verhältnis von Al zu organischen Säuren ist noch vorteilhafter für eine Entgiftung, als in den vorgestellten Berechnungen (s. 3.3.3.2).

Auch die temporäre Komponente muß beachtet werden. Bei normalem Wachstum durchlaufen die Wurzelzellen in maximal 1-2 h das sensitive Stadium der DTZ. Diese temporäre Komponente muß auch bei der Beurteilung des Einflusses von Mikroorganismen beachtet werden. Die Messungen in dieser Arbeit wurden nicht unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, trotzdem konnten große Mengen niedermolekularer Säuren gefunden werden. Die Rhizosphäre ist unter natürlichen Bedingungen ein Ort hoher Mikroorganismenaktivität. Eine höhere Abbaurate als im Versuch ist daher wahrscheinlich. Die Mikroflora der Rhizosphäre entwickelt sich jedoch langsam, basierend auf organischen Ausscheidungen der Pflanzenwurzel. Daher entsteht ein Gradient in der Dichte der Mikroorganismen von den apicalen zu basalen Wurzelbereichen (SCHÖNWITZ UND ZIEGLER, 1989). Es ist also durchaus denkbar, daß ein massiver mikrobieller Abbau der Komplexbildner erst einsetzt, wenn die Zellen das sensitive Stadium bereits durchwachsen haben. Detaillierte Untersuchungen zu diesem Thema fehlen noch.

Durch die enge zeitliche und örtliche Begrenzung der Wurzelausscheidung, ist auch ein langfristiger Schutz vor Al-Toxizität denkbar, ohne daß es für die Pflanze zu hohen Energieverlusten kommt. Tatsächlich konnten ZHENG ET AL. (1998a) zeigen, daß Buchweizen und Rettich über einen Zeitraum von 10 Tagen hohe Mengen organischer Säuren ausscheiden können. Bei einer toleranten Weizensorte und Raps nahm die Ausscheidungsrate während des Versuchszeitraums langsam ab.

Einen überzeugenden Beweis für die Möglichkeit der Al-Entgiftung durch Citratexudation lieferten DE LA FUENTE ET AL. (1997). Den Autoren gelang es, die Al-Toleranz von Tabak und Papaya durch die Überproduktion von Citrat zu erhöhen. Die Pflanzen wurden mit einem Konstrukt aus dem 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus und einem bakteriellen Citratsynthase Gen transformiert. Die transgenen Pflanzen zeigten einen 2-3 fach höheren Citratsynthasegehalt als Kontrollpflanzen. Der Gehalt an Citrat im Gewebe und die Ausscheidung von Citrat an der Wurzel lagen in den transgenen Pflanzen um den Faktor 10 bzw. 4 höher als in den Kontrollgenotypen. Als Folge dieser genetischen Veränderung zeigten die Pflanzen eine nachweislich höhere Al-Toleranz. So konnten Papayapflanzen der Kontrollgruppe, bei Al-Konzentrationen über 50 µM kein Wurzelsystem entwickeln. Die transgenen Pflanzen dagegen, zeigten normales Wachstum bis zu einer Al-Konzentration von 300µM. Als Lösung für eine Anhebung der Al-Toleranz von leistungsfähigen Kulturpflanzen, bietet sich diese Methode vermutlich nicht an. Auch wenn bisher keine Hinweise darauf vorliegen, ist doch anzunehmen, daß die konstitutive Überexpression der Citratsynthase und die folgende Überproduktion von Citrat in allen Geweben zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels und Energiehaushaltes der Pflanze führen.

## 4.6 Diversitätsanalyse

Bei der Diversitätsanalyse von 45 Soja Genotypen, basierend auf 323 genetischen Markern, wurde eine Gruppierung in sechs Cluster abgeleitet. Die Herkunft der Genotypen wurde als Ursache dieser Gruppierung identifiziert.

Die Eigenschaft "Herkunft" als genetisch definiertes Merkmal zu betrachten, scheint zunächst problematisch. Es kann schließlich nicht erwartet werden, daß im Genom einer Pflanze verankert ist, aus welchem Land sie stammt. Das beobachtete Phänomen kann zwei mögliche Gründe haben. Die erste Möglichkeit, sind unterschiedliche Umweltbedingungen an den verschiedenen Herkunftsorten, welche jeweils Genotypen einer bestimmten genetischen Konstitution selektieren. Der zweite mögliche Grund ist in der Zuchtgeschichte der Sorten zu suchen. Die Anteile beider Erklärungen am jeweiligen Cluster hängt von dem Material und den gefundenen Gruppen ab. Bei Wildformen kann eher eine ähnliche genetische Konstitution aufgrund gleicher Selektionsbedingungen erwartet werden. Bei intensiv züchterisch bearbeiteten Kulturpflanzen, wie der Sojabohne, kann im allgemeinen davon ausgegangen werden, daß genetische Ähnlichkeiten auf eine gemeinsame Zuchtgeschichte zurückzuführen sind. Häufig werden auch bei Kulturpflanzen Gruppierungen nach bestimmten agronomischen Eigenschaften, wie Reifezeit, Vernalisationsverhalten, oder Verarbeitungseigenschaften gefunden ( z.B. HATZ, 1997). Dies sollte jedoch nicht zu der Annahme verleiten, diese Eigenschaften könnten ohne weiteres aus den Markerdaten abgeleitet werden. Meist beruht die Beziehung auf einer gemeinsamen Zuchtgeschichte der Genotypen des jeweiligen Typs.

Auch die in dieser Arbeit gefundenen Gruppen lassen sich, soweit verfügbar, anhand von Stammbaumdaten bestätigen. Aufgrund der Gruppierung in verschiedenen Cluster, wurden die US-amerikanischen Sorten in zwei Genpools aufgetrennt. Die Existenz von zwei Genpools in Nordamerika beruht auf zwei unabhängigen Zuchtprogrammen im mittleren Westen und im Süden der USA (GIZLICE ET AL., 1993). Beide Zuchtprogramme basieren auf relativ wenigen Vorfahren, welche jeweils nur zu einer der beiden Gruppen entscheidend beigetragen haben. Die zehn Genotypen 'CNS', 'S-100', 'Tokyo', 'PI54610', 'Dunfield', 'Illini', 'Roanoke', 'Haberlandt', 'Arksoy', 'PI240664', tragen etwa 78 % zum Genpool der südlichen USA bei, aber nur ca. 16% zum Genpool der nördlichen USA (GIZLICE ET AL., 1994). Dagegen tragen zehn andere Genotypen etwa 72 % zum nördlichen, aber nur ca. 5 % zum südlichen Genpool bei. Die genannten Vorfahren des südlichen Genpools haben auch massiv zum Genom der hier untersuchten brasilianischen Sorten beigetragen (SPEHAR, 1995a; 1995b). Die Sorte 'IAC 9' erhielt 100 %, 'Cristalina' 87.5 %, 'Doko RC' mindestens 75 %, ihres Genoms von diesen Vorfahren. Für die Sorten 'Savanna' und 'IAC 17' sind keine detaillierten Angaben verfügbar, sie stammen aber aus dem gleichen Zuchtprogramm wie 'Doko RC' bzw. 'IAC 9' (SPEHAR, 1995b), was auf ähnliche Verwandtschaftsverhältnisse schließen läßt. Die Vereinigung der brasilianischen Herkunft mit dem Genpool der südlichen USA in einen Genpool "tropisches Amerika" ist also auch nach Stammbaumdaten voll



gerechtfertigt. Daß die Sorte 'Jogun', trotz Frühreife, nicht zu den Sorten der nördlichen USA gruppiert wurde, beruht vermutlich darauf, daß sie nur 0.7 % als Vorfahre zu diesem Genpool beigetragen hat. Ähnliches gilt für die Sorte 'Biloxi', sie hat nur 0.04 % zum tropisch-amerikanischen Genpool beigetragen und wurde folgerichtig nicht in den entsprechenden Cluster aufgenommen.

Die Betrachtung der Stammbaumdaten zeigt, daß die Ergebnisse der Diversitätsanalyse sehr verlässlich sind und die realen Verwandtschaftsverhältnisse gut widerspiegeln. Damit kann auch die Zuordnung unbekannter Genotypen zuverlässig interpretiert werden.

Die untersuchten Linien der USDA Genbank bilden in dieser Analyse einen erstaunlich homogenen Cluster. Grundsätzlich wäre zu erwarten, daß zufällig gewählte Genbankakzessionen eine deutlich höhere Variabilität aufweisen als Zuchtsorten. Daß Genbanklinien in molekulargenetischen Analysen homogene Gruppen mit ähnlicher Variabilität wie Zuchtsorten bilden, wurde bereits in anderen Untersuchungen gefunden (THOMPSON ET AL., 1998; KISHA ET AL., 1998). Daraus kann geschlossen werden, daß auch eine langjährige Zucht von Hochleistungssorten die genetische Diversität nicht zwangsläufig einschränkt.

Die Gruppe indonesischer Sorten bildet den homogensten und stabilsten Cluster. Das läßt darauf schließen, daß die genetische Basis in diesem Genpool noch geringer ist als die der amerikanischen Genpools. Dies zeigt auch die mittlere genetische Distanz von 0.149, innerhalb dieses Genpools, im Vergleich zu 0.166 und 0.197 in den beiden amerikanischen Genpools (Tabelle 15). Soweit Stammbaumdaten vorhanden sind, deuten auch diese auf eine sehr schmale genetische Basis. Die Sorten 'Wilis', 'Kerinci', 'Slamet' und 'Sindoro' haben vier gemeinsame Eltern (DARMAN, 1996). Die gleichen Eltern haben etwa 50 % zum Genpool aller seit 1971 in Indonesien entwickelten Sorten beigetragen. Die Sorte 'Malabar' entstammt der Kreuzung 'No.1592 x Wilis'. Trotzdem befindet sich diese Sorte nicht im indonesischen Cluster. Entweder ist also der Einfluß der Linie 'No.1592' sehr stark, oder aber die Stammbaumdaten sind nicht korrekt. Daß Informationen über Genotypen nicht immer verlässlich sind, zeigen die Genotypen 'Wilis' und 'Wilis2', welche beide unter dem Sortennamen 'Wilis', aber von unterschiedlichen Quellen bezogen wurden. 'Tambora', die zweite indonesische Sorte, welche außerhalb des indonesischen Clusters liegt, wurde nicht in Indonesien gezüchtet, sondern importiert.

Aufgrund der relativ geringen Diversität im indonesischen Sortenspektrum, ist mittel- bis langfristig die Nutzung von fremden Zuchtmaterial zu empfehlen, um die Variabilität und damit den Zuchtfortschritt zu sichern. Die Linien 'B3911', 'B3577' und 'B3578', welche vermutlich aus indonesischen Landrassen stammen (DARMAN 1999 pers. Mitt.), zeigen keine hohe genetische Distanz zu den indonesischen Sorten. Diese Linien sind daher nicht geeignet die Diversität im indonesischen Sortenspektrum zu erhöhen. Nach den vorliegenden Daten ist die Nutzung von Material aus dem nigerianischen bzw. tropisch-amerikanischen Genpool zu bevorzugen. Die

afrikanischen Genotypen 'TGX-1448-2', 'TGX-536-0' und 'M-351' stehen dem indonesischen Genpool genetisch näher als die brasilianischen Genotypen. Bei Feldversuchen im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, daß die afrikanischen Sorten auch eine bessere Anpassung an Klima und Anbaubedingungen in Indonesien aufweisen, als die brasilianischen Sorten. Ob eine positive Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit zum indonesischen Genpool und der Anpassung an indonesische Anbaubedingungen besteht, kann aus den vorliegenden Daten nicht sicher abgeleitet werden. Eine genauere Untersuchung dieser Hypothese wäre jedoch für die zukünftige Auswahl von Importsorten wünschenswert.

Für die Auswahl von Kreuzungseltern zur Entwicklung Al-toleranter Genotypen bietet die Diversitätsanalyse keine unmittelbaren Ansatzpunkte. Die Al-Toleranz hat keine nachweisbaren Einfluß auf die Gruppenbildung. Bei Weizen haben FOY ET AL. (1974) und TAKAGI ET AL. (1983), von einer Korrelation zwischen Herkunft und Al-Toleranz berichtet. Beide Gruppen schlossen, daß durch der Bodentyp am Herkunftsort durch natürliche Selektion die Al-Toleranz erhöht hat. TAKAGI ET AL. (1983) identifizierten die höchste Al-Toleranz in brasilianischen Weizenlinien.

In der vorliegenden Untersuchung ist ebenfalls eine leichte Tendenz zu einer höheren Al-Toleranz im brasilianischen Genpool erkennbar. Bei der Betrachtung über alle Testmethoden hinweg (Tabelle 24), stammen vier der fünf tolerantesten Genotypen aus Brasilien. Dagegen stammen die sechs sensitivsten Genotypen aus Indonesien. Die beiden Sorten 'Slamet' und 'Sindoro' wurden in Indonesien als Al-tolerant beschrieben (SUNARTO, 1996) sind aber den brasilianischen Sorten offensichtlich unterlegen. In der Überlegenheit der brasilianischen Sorten spiegelt sich vermutlich die systematische Anpassung der Sorten an den Anbau auf saurem Boden wieder (SPEHAR, 1995b). Das Toleranzniveau der nigerianischen Sorten scheint zwischen dem des indonesischen und dem des brasilianischen Genpools zu stehen. Für Sortenentwicklung für den Anbau auf sauren Böden Indonesiens, sollten zunächst die afrikanischen Linien eingesetzt werden, da wegen der besseren Anpassung an die Anbaubedingungen relativ schnell Erfolge erzielt werden können. Langfristig ist die Nutzung des brasilianischen Genpools zu empfehlen, da hier höhere Al-Toleranz und vermutlich auch höheres Ertragspotential zu erreichen ist (DARMAN, 1996; SPEHAR, 1995b). Die Linien 'TGX-1448-2' und 'M-351' wurden bereits in mehrjährige Leistungsprüfungen übernommen. Die brasilianischen Genotypen sind für einen direkten Anbau ungeeignet, wurden aber in Zuchtprogramme als Eltern aufgenommen (Darman 1999 pers. Mitt.).

Der indonesische Genpool ist im Gegensatz zum brasilianischen und europäischen Genpool weitgehend unbeeinflußt vom US-amerikanischen Soja Genpool (SUMARNO UND ADISARWANTO, 1996). Daher bieten sich indonesische Sorten als Kreuzungseltern für die Erweiterung des Genpools der südlichen USA an. Im Gegensatz zu Genbanklinien kann hier, trotz großer genetischer Distanz, auf vorselektiertes Material zurückgegriffen werden (SNELLER ET AL., 1997).

## 4.7 Genetik der Al-Toleranz

Bei der Vielzahl der möglichen Toxizitäts- und Toleranzmechanismen, ist ein komplexes multigenes Vererbungsschema zu erwarten (TAYLOR, 1991). Tatsächlich haben Kreuzungsversuche gezeigt, daß, selbst innerhalb einer Art, Al-Toleranz unterschiedlich vererbt werden kann (CARVER UND OWNBY, 1995). Dies wird sicher auch dadurch verursacht, daß in verschiedenen Untersuchungen unterschiedliche Aspekte der Al-Toleranz erfaßt werden.

Weizen ist die Kulturpflanze, bei welcher mit Abstand die umfangreichsten Untersuchungen zur Genetik der Al-Toleranz vorliegen. Nach konventionellen Kreuzungsversuchen wurde mehrfach von einer einfachen dominanten oder partiell dominanten Vererbung der Al-Toleranz berichtet (KERRIDGE UND KRONSTAD, 1986; CAMPBELL UND LAFEVER, 1978; CARVER ET AL., 1993; WHEELER ET AL., 1992). Diese Autoren wiesen jedoch alle darauf hin, daß für die vollständige Erklärung der Al-Toleranz weitere Gene wirken müssen. (ANIOL UND GUSTAFSON, 1990) faßten die Erkenntnisse dahingehend zusammen, daß mehrere Hauptgene, sowie Nebengene geringerer Wirkung beteiligt sein müssen.

Die Analyse von 'Chinese Spring' Substitutionslinien erlaubte die Lokalisierung von Hauptgenen auf den Chromosomen 4D und 2D langer Arm, sowie auf dem kurzen Arm von 5A (TAKAGI ET AL., 1983). Weitere Gene mit geringerer Wirkung wurden auf den Chromosomen 6AL, 7AS, 3DL, 4AL und 7D identifiziert (ANIOL UND GUSTAFSON, 1984). Da 'Chinese Spring' aber selbst nur eine mittlere Toleranz aufweist, sind möglicherweise weitere Gene beteiligt (ANIOL UND GUSTAFSON, 1990).

In isogenen Linien aus einer Kreuzung der sensitiven Weizensorte 'Egret' mit der toleranten Sorte 'Carazinho' (FISHER UND SCOTT, 1987) untersuchten DELHAIZE ET AL. (1993a) den Genlocus "Alt1". DELHAIZE ET AL. (1993b) wiesen dabei nach, daß dieser Genlocus, durch eine erhöhte Ausschüttung von Malat an der Wurzelspitze, Al-Toleranz bedingt. Auch hier wurde aber deutlich, daß in der Sorte 'Carazinho' weitere Toleranzgene aktiv sein müssen, da die isogene 'Egret'-Linie eine geringere Toleranz aufwies.

LUO UND DVORAK (1996) gelang die Kartierung eines "Alt2" benannten Toleranzgens auf dem distalen Bereich des Chromosoms 4DL in Substitutionslinien aus 'Chinese Spring' und '*T. turgidum* cv. Langdon'. Es konnten RFLP-Marker mit einer Kopplung von 4 cM identifiziert werden. Ob "Alt1" und "Alt2" verschiedene Genloci darstellen wurde nicht geklärt. Etwa zur gleichen Zeit kartierten RIEDE UND ANDERSON (1996) den Locus "AltBH" ebenfalls auf dem Chromosom 4DL. Die spaltende Population der Eltern 'BH1146' und 'Anahuac' zeigte ein klar bimodale Verteilung der Al-Toleranz in Lösungskultur. Der identifizierte Genlocus erklärte 85% der phänotypischen Variabilität. Es wurde ein RFLP-Marker im Abstand von nur 1.1 cM identifiziert.

Für die Vererbung der Al-Toleranz in Sojabohne waren bis vor kurzem nur wenige Informationen verfügbar. HANSON UND KAMPRATH (1979) fanden für die Wachstums-

rate von Keimlingswurzeln in Lösungskultur eine Heritabilität von 0.67. Eine Selektion auf Al-Toleranz sollte also auch bei Soja erfolgreich sein. In Testkreuzungen der Sorte 'IAC 7' mit den Sorten 'IAC 9', 'IAC 2' und 'Biloxi' prüften SPEHAR UND GALWAY (1995) verschiedene Vererbungsmodelle. Ein einfaches additiv-dominanz Modell war in keiner Kombination ausreichend für die Erklärung der genetischen Varianz. Der starke Einfluß epistatischer Wirkungen läßt auf die Wechselwirkung mehrerer Gene schließen.

BIANCHI-HALL ET AL. (1998) untersuchten das Wurzelwachstum einer F4 Nachkommenschaft der Sorten 'Young' und 'PI416937' in Lösungskultur. 'Young' ist eine sensitive Leistungssorte während 'PI 416937' eine sehr tolerante Genbanklinie ist. Es wurde das absolute Wachstum mit bzw. ohne Al-Streß, sowie das relative Wurzelwachstum unter Al-Streß ermittelt und jeweils als individuelle Eigenschaft betrachtet. Für absolutes und relatives Wachstum wurde eine sehr hohe Heritabilität ermittelt. Das absolute Wurzelwachstum mit und ohne Al-Streß war in der Nachkommenschaft normalverteilt. Daraus schlossen die Autoren auf eine quantitativ multigene Vererbung. Die Verteilung des relativen Wurzelwachstums war dagegen deutlich zweigipfelig, was als qualitativer Geneffekt gedeutet wurde.

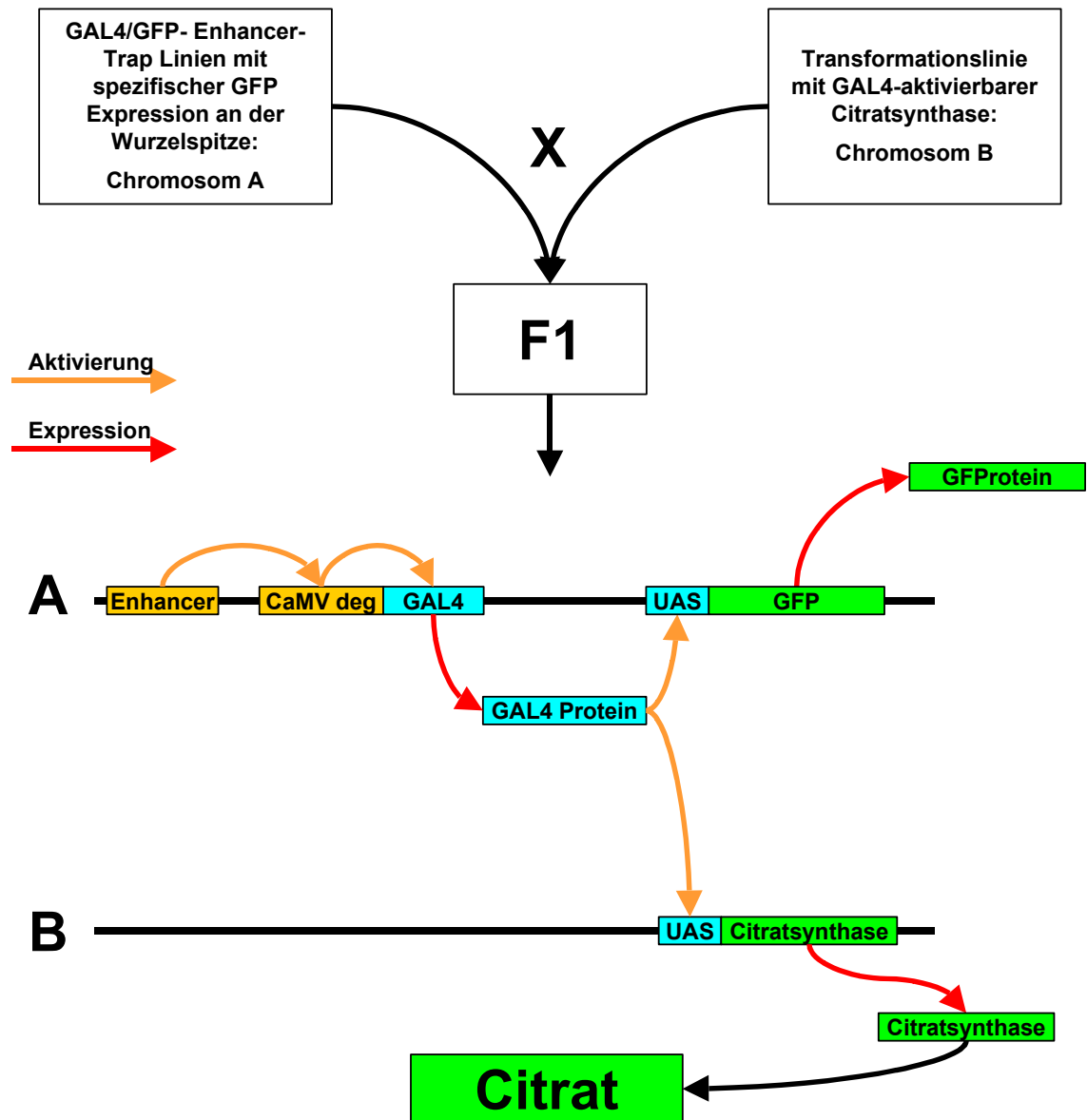
In der vorliegenden Arbeit wurde in der Population 'Wilis x B3578' eine ähnliche Verteilung der relativen Wurzellänge gefunden wie in der Population 'Young x PI416937'. Die bimodale Verteilung in der hier vorgestellten Population ist jedoch weniger deutlich. Dies kann durch die geringere Differenz der Eltern erklärt werden. Während die Eltern in der Untersuchung von BIANCHI-HALL ET AL. (1998) ca. 105 % bzw. 45 % relatives Wachstum zeigten, erzielten 'B3578' und 'Wilis', 81 % bzw. 55 % relatives Wurzelwachstum. Möglicherweise sind also die Vererbungsmodi in diesen Kreuzungen vergleichbar. Der Vergleich ist besonders interessant, da BIANCHI-HALL ET AL. (2000) in einer folgenden Studie eine QTL-Analyse (Quantitative Trait Loci) der Population durchführten. Es wurden fünf QTL's für absolutes Wurzelwachstum unter Al-Streß identifiziert, sowie vier QTL's für relatives Wurzelwachstum. Drei dieser Loci haben Einfluß auf beide Eigenschaften. Zwischen mehreren Loci wurden epistatische Wechselwirkungen nachgewiesen. Alle Loci waren streßspezifisch, hatten also keinen Einfluß auf das Wurzelwachstum ohne Al-Streß. Der auf Grund der Häufigkeitsverteilung des relativen Wachstums vermutete qualitative oder starke quantitative Genlocus konnte nicht identifiziert werden. Keiner der identifizierten QTL's erklärte mehr als 10 % zur Gesamtvarianz. Insgesamt trugen alle QTL's nur 32 % bzw. 24 % zur Varianz des absoluten bzw. relativen Wurzelwachstums bei. Diese Ergebnisse stellen die Nutzung der identifizierten RFLP-Marker für eine markergestützte Selektion stark in Frage. Darüber hinaus ist einer der Marker auch mit einem Locus für vorzeitiges Hülsenplatzen gekoppelt, was eine Nutzung weiter erschwert. Da die Kreuzungspopulationen 'Doko RC x Wilis' und 'Wilis x B3578' keine grundlegend bessere Ausgangslage für eine Genkartierung bieten als die von BIANCHI-HALL ET AL. (1998) untersuchte Population, stellt sich die Frage, ob eine QTL-Analyse dieser Populationen lohnenswert ist.

Alle bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, daß Al-Toleranz in Soja hoch multigen veranlagt ist. Bisher wurde kein, dem Weizen vergleichbares, Hauptgen für Al-Toleranz identifiziert. Die Züchtung auf Al-Toleranz wird daher bei Soja auch weiterhin langsam voran schreiten. Auch mit markergestützter Selektion sind nach heutigen Erkenntnissen keine schnellen Fortschritte zu erwarten.

## 4.8 Ausblicke zur Entwicklung toleranter Genotypen

Die Erfolge der letzten 30 Jahre in der Züchtung Al-toleranter Genotypen bei Soja sind bescheiden (ARMIGER ET AL., 1968; FOY ET AL., 1969). Weder in Nordamerika noch in Asien oder Europa wurde eine wirklich Al-resistente Sojasorte entwickelt (BIANCHI-HALL ET AL., 1998). Die Probleme, welche zu dieser Tatsache geführt haben, wurden bereits dargestellt. Auch moderne markergestützte Züchtungstechniken scheinen mangels geeigneter Genressourcen wenig Aussicht auf Erfolg zu haben. Im Gegensatz dazu hat die Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Toxizitäts- und Toleranzmechanismen in den letzten Jahren deutlich zugenommen (z.B. SIVAGURU ET AL., 1999). Möglicherweise können die vielfältigen Probleme bei der Selektion Al-toleranter Genotypen umgangen werden, wenn direkt auf diese Kenntnisse zurück gegriffen wird. Es ist heute relativ genau bekannt auf welches Pflanzengewebe Aluminium toxisch wirkt. Weiterhin besteht Einigkeit darüber, daß die Ausscheidung von Chelatoren ein wichtiger und effektiver Toleranzmechanismus ist. Mit diesen Informationen sollte es möglich sein, transgene Pflanzen mit verbesserter Al-Toleranz zu entwickeln. DE LA FUENTE ET AL. (1997) konnten diese Möglichkeit bereits durch die Überexpression der Citratsynthase nachweisen. Ein Schwachpunkt dieses Systems ist die mögliche Störung von Stoffwechsel und Energiehaushalt der Pflanze, wegen der unspezifischen Überproduktion von Citrat. Damit dieses Prinzip in leistungsfähigen Sorten eingesetzt werden kann, muß die Citratausscheidung auf die Al-sensitiven Zellen an der Wurzelspitze konzentriert werden. Durch eine Beschränkung der Stoffausscheidung auf die empfindlichen Wurzelbereiche kann die Effizienz der Entgiftung gegenüber dem System von DE LA FUENTE ET AL. (1997) gesteigert und zugleich der Energiehaushalt der Pflanze entlastet werden.

Alle Voraussetzungen für die Entwicklung von Transformanten mit zellspezifischer Citratausscheidung sind bereits vorhanden. Citratsynthase-Gene wurden bereits aus verschiedenen Organismen isoliert und sequenziert. Auch Systeme zur gewebe-spezifischen Expression beliebiger Gene stehen zu Verfügung. BRAND UND PERRIMON (1993) entwickelten ein binäres "Enhancer-Trap" System, um bestimmte Zelltypen in *Drosophila* Larven markieren zu können und so deren Entwicklung zu verfolgen. HASELOFF (2000) hat dieses System an *Arabidopsis* angepaßt und eine Bibliothek von GAL4/GFP-Enhancer-Trap Linien mit wurzelspezifischer Expression entwickelt. Diese Linien stehen zur Verfügung und könnten problemlos genutzt werden, um eine zell-spezifische Überexpression der Citratsynthase und damit eine Citratausscheidung an der Wurzelspitze auszulösen.



**Abbildung 38: Schema zur gentechnologischen Aktivierung gewebespezifischer Überproduktion von Citrat an der Wurzelspitze.**

Das Prinzip des binären Enhancer-Trap Systems beruht darauf, daß das GAL4-Gen aus Hefe mit einem degenerierten Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (= CaMV deg Abbildung 38) kombiniert und in Arabidosis transformiert wird. Der degenerierte Promotor wird nur aktiv, wenn das Enhancer-Trap-Element hinter einem pflanzen-eigenem Enhancer-Element eingebaut wird. In diesem Fall kommt es, je nach Enhancer, zu einer gewebespezifischen Expression des GAL4 Gens. Das GAL4-Protein wirkt in Hefe als Transskriptionsfaktor für die Expression verschiedener Gene, hat aber in Tieren und höheren Pflanzen keine Wirkung. Die von HASELOFF (2000) entwickelten Arabidopsis Transformanten enthalten neben dem GAL4-Enhancer-Trap Element auch ein GFP-Gen (= grün fluoreszierendes Protein) mit einem GAL4-aktivierbarem Promotor (= UAS Upstream-Aktivator-Sequenz). Kommt es unter der Steuerung eines

pflanzeigenen Enhancers zur gewebespezifischen Expression von GAL4, so aktiviert dies die Expression von GFP. Mit einem Fluoreszenzmikroskop kann GFP in intakten Arabidopsiskeimlingen nachgewiesen und Transformationslinien mit gewünschten Expressionsmustern selektiert werden. Es wurden Linien identifiziert, welche GFP nur in der Wurzelhaube (z.B. J1103), der Elongationszone (z.B. Q2393), älteren Wurzelbereichen (z.B. J0631) oder in der Wurzelhaube und älteren Wurzelteilen, nicht aber der Elongationszone (z.B. J2642), exprimieren.

Diese Linien können genutzt werden, um ein Citratsynthasegen gezielt in bestimmten Wurzelbereichen zu aktivieren (s. Abbildung 38). Hierzu muß das Gen an ein GAL4-aktivierbares Steuerelement (UAS) gekoppelt und in Arabidopsis transformiert werden. Das Gen wird in dieser Transformationslinie nicht exprimiert. Erst durch Kreuzung der Transformationslinie mit einer GAL4/GFP-Enhancer-Trap Linie werden die beiden Fremdgene im F1-Nachkommen vereinigt. Die gewebespezifische Expression des GAL4-Gens steuert dann die Expression der Citratsynthase. Durch die Kreuzung mit verschiedenen Enhancer-Trap Linien, kann die Auswirkung einer Citratüberproduktion in verschiedenen Wurzelbereichen untersucht werden. Ebenso können auch andere Gene, welche zu einer Ausscheidung von Chelatoren führen, getestet werden. An der Modellpflanze Arabidopsis können daher leicht verschiedene Gen-Enhancer Kombinationen geprüft werden. Wenn eine Kombination aus effektiver Entgiftung und minimaler Beeinflussung der Leistungsfähigkeit identifiziert ist, kann das System auf Soja und andere Pflanzenarten übertragen werden.

Alle nötigen Voraussetzungen für die Entwicklung von Al-Toleranz durch Gentransfer sind verfügbar. Daher ist diese Strategie vermutlich schneller und effektiver zu realisieren, als konventionelle oder markergestützte Selektion.



## 5 Zusammenfassung

Es war das Ziel dieser Arbeit, Strategien für die Entwicklung Al-toleranter Sojasorten für den Anbau auf sauren Mineralböden Indonesiens zu entwickeln.

Zu diesem Zweck wurde die Situation der genetischen Diversität im indonesischen Sortenspektrum und im Vergleich weltweiter Genpools untersucht, geeignete Selektionsmethoden identifiziert, und spaltende Populationen für eine Markerkorrelation entwickelt.

Die genetische Diversität von 45 Sojagenotypen weltweiter Herkunft wurde anhand von 323 AFLP-, RFLP-, und RAPD-Markern abgeschätzt. In der Minimal-Varianz Gruppierungsmethode konnte eine Gruppierung der Genotypen in sechs Cluster identifiziert werden. Diese Cluster korrelieren eindeutig zur Herkunft der Genotypen.

Die Analysen haben gezeigt, daß der indonesische Soja-Genpool sehr homogen und völlig isoliert von amerikanischen, europäischen und afrikanischen Genpools ist. Um einen langfristigen Zuchtfortschritt sicherzustellen, ist es notwendig, die Diversität innerhalb des indonesischen Sortenspektrums zu erhöhen. Die in dieser Arbeit untersuchten Genbanklinien aus Sammlungen innerhalb Indonesiens sind nicht für die Erhöhung der genetischen Diversität geeignet. Für eine langfristige Züchtungsstrategie bietet sich die Nutzung des brasilianischen Genpools an, da dieser eine hohe genetische Distanz zum indonesischen Genpool, ein hohes Ertragspotential und eine höhere Al-Toleranz aufweist.

In Versuchen zur Identifikation einer schnellen und zuverlässigen Methode zur Selektion Al-toleranter Genotypen, wurden verschiedene Kulturmethoden untersucht. Dabei wurde die Kulturdauer, das Substrat, der pH-Wert und die Al-Konzentration variiert. Alle Variablen haben, zum Teil in sehr engen Grenzen, einen starken Einfluß auf die Pflanzenentwicklung. Es besteht eine starke Wechselwirkung zwischen Kultursubstrat und Al-Konzentration.

Die Al-Toxizität hängt, neben der Konzentration, vor allem davon ab, welches Al-Ion in der Lösung dominiert. Da die verschiedenen Al-Ionenspezies kaum messtechnisch zu differenzieren sind, wurde die Verfügbarkeit toxischer  $Al^{3+}$ -Ionen in Testlösungen mit dem Computerprogramm PRODEF/MINTEQ A2 modelliert. Bei pH-Werten unter 4.3 liegt Al zu über 80 % als toxisches  $Al^{3+}$ -Ion vor. In einem pH-Bereich von 4.3-5.3 nimmt der Anteil der  $Al^{3+}$ -Ionen stark ab. Dieser pH-Bereich wurde als ungeeignet für Al-Streßversuche identifiziert, da sich hier geringe pH-Schwankungen stark auf die Al-Toxizität auswirken.

Die Variation des pH-Wertes im Wurzelmedium hat gezeigt, daß Sojawurzeln bei pH-Werten über 4.3 ein nahezu ungestörtes Wachstum zeigen. Bei pH-Werten unter 4.0 wird das Wurzelwachstum in allen Kulturmethoden stark beeinträchtigt. Der Spielraum

zwischen ungehindertem Wurzelwachstum und irreversibler Gewebeerstörung beträgt weniger als eine pH-Stufe.

Die Ergebnisse der Ionenmodellierung und der Säurestreßversuche ergaben, daß ein pH-Wert von 4.3 zur Analyse der Al-Toleranz von Soja optimal ist. Bei diesem pH-Wert werden die beiden pH-abhängigen Systeme "Al<sup>3+</sup>-Verfügbarkeit" und "Säurestreß" so kombiniert, daß Al-Toxizität weitgehend unabhängig vom pH-Wert untersucht werden kann.

Die Rangfolge der Al-Toleranz der Sorten, gemessen an der relativen Wurzelmasse in Sandkultur, ist hoch korreliert zur Rangfolge der Sorten, gemessen am relativen Ertrag auf zwei Al-Streßstandorten. Diese Kulturmethode ist daher geeignet, Genotypen mit erhöhter Al-Toleranz im Feld zu identifizieren. Die Sandkulturmethode ist jedoch sehr aufwendig.

Die Kulturversuche haben gezeigt, daß die Entgiftung der Rhizosphäre durch Wurzel-ausscheidungen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Al-Toleranz spielt. Daher wurde eine Methode entwickelt, welche die direkte Visualisierung der Al-Entgiftung in der Rhizosphäre ermöglicht. Die Entgiftung der Rhizosphäre ist, wie die Toxizitätssymptome, auf die Wurzelspitze beschränkt. Die maximale Ausscheidung komplexierender Stoffe erfolgt etwa 2-3 mm hinter der Wurzelhaube.

Durch die Analyse von Rhizosphärenlösungen konnte, erstmals für Soja, gezeigt werden, daß Al-Streß die Ausscheidung von Malat und Citrat stimuliert. Die Messungen erlauben eine Schätzung der Konzentrationen dieser Komplexbildner in der Rhizosphäre. Die Modellierung der resultierenden Ionengleichgewichte läßt den Schluß zu, daß die Menge der Wurzel-ausscheidungen ausreicht, um Al<sup>3+</sup>-Ionen effektiv zu binden. In Zukunft könnte daher die Al-stimulierte Ausscheidungsrate organischer Säuren direkt als Selektionskriterium genutzt werden.

Zur Vorbereitung der Marker gestützten Selektion und Entwicklung molekularer Marker für Al-Toleranz, wurden zwei spaltende Populationen entwickelt und untersucht. In beiden Nachkommenschaften wurde eine quantitative Vererbung des relativen Wurzelwachstums gefunden. Die Population 'Doko RC x Wilis' ist wegen einer höheren genetischen und phänotypischen Differenz der Eltern besser für eine QTL-Analyse geeignet als die Population 'Wilis x B3578'. Wegen der von der Normalverteilung abweichenden Häufigkeitsverteilung der relativen Wurzellänge und einer sehr hohen Umweltvarianz kann geschlossen werden, daß wenige Gene an der Vererbung beteiligt sind. Aktuelle Literatur zeigt jedoch, daß die Entwicklung nutzbarer Marker trotzdem problematisch sein kann.

Die markergestützte Selektion als Zuchtstrategie verspricht daher keinen schnellen und durchgreifenden Erfolg. Die Probleme bei der Erfassung des Phänotyps behindern die Entwicklung eng gekoppelter Marker. Zudem sind bei Soja bisher keine Hauptgene mit starker Wirkung auf die Al-Toleranz identifiziert worden. Es müßte auf QTL's

selektiert werden, was auch bei besserer Phänotypisierung in anderen Populationen bisher nicht hinreichend gelungen ist.

Als alternative Strategie zur Entwicklung Al-toleranter Sojagenotypen wird daher die genetische Transformation vorgeschlagen. Es ist erarbeitet worden, wo und wie die Pflanzenwurzel auf Al-Streß reagiert. Dieser natürliche Toleranzmechanismus könnte in transgenen Pflanzen nachgebildet und verstärkt werden. Systeme zur gezielten Expression und geeignete Gene, für die Realisierung dieser Strategie, sind verfügbar.

## 6 Literaturverzeichnis

- ALLISON, J. D., D. S. BROWN, UND K. J. NOVO-GRADEC. 1991. MINTEQA2/PRODEFA2, A Geochemical Assessment Model for Environmental Systems, version Version 3.0. U.S. Environmental Protection Agency.
- ALVA, A. K., F. P. C. BLAMEY, D. G. EDWARDS, UND C. J. ASHER. 1986. An evaluation of aluminum indices to predict aluminum toxicity to plants grown in nutrient solutions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 17: 1271-1280.
- ALVA, A. K., G. L. KERVEN, D. G. EDWARDS, UND C. J. ASHER. 1991. Reduction in toxic aluminium to plants by sulfate complexation. *Soil Science* 152: 351-359.
- ALVA, A. K., M. E. SUMNER, Y. C. LI, UND W. P. MILLER. 1989. Evaluation of three aluminum assay techniques for excluding aluminum complexed with fluoride or sulfate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 38-44.
- ANIOL, A. 1984. Induction of aluminium tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminium in nutrient solution. *Plant Physiol.* 75: 551-555.
- ANIOL, A., UND J. P. GUSTAFSON. 1984. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 701-705.
- ANIOL, A., AND J. P. GUSTAFSON. 1990. Genetics of tolerance in agronomic plants. *in Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (A. J. Shaw, ed.): 255-267.
- ARMIGER, W. H., C. D. FOY, A. L. FLEMING, UND B. E. CLADWELL. 1968. Differential Tolerance of Soybean Varieties to an Acid Soil High in Exchangeable Aluminum. *Agronomy Journal* 60: 67-70.
- BACKHAUS, K., B. ERICHSON, W. PLINK, UND R. WEIBER. 1996. *Multivariate Analysenmethoden*, 8. Edition. Springer, Berlin.
- BAIER, A. C., D. J. SOMERS, UND J. P. GUSTAFSON. 1995. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breeding* 114: 291-296.
- BALUSKA, F., S. KUBICA, UND M. HAUSKNECHT. 1990. Postmitotic 'isodiametric' cell growth in maize root apex. *Planta* 181: 269-274.
- BALUSKA, F., D. VOLKMAN, UND P. W. BARLOW. 1996. Specialised zones of development in roots: view from the cellular level. *Plant Physiol* 112: 217-223.
- BARNES, R. B. 1975. The determination of specific forms of aluminum in natural water. *Chem. Geol.* 15: 177.

- BASU, U., D. GODBOLD, UND G. J. TAYLOR. 1994. Aluminium resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J. Plant. Physiol.* 144: 747-753.
- BERTRAM, R., E. STIEBER, AND W. GEBNER. 1996. Toxizität von Aluminium Al-Spezies in protolysierten Aluminiumchloridlösungen Verhältnisse unter biologisch relevanten Konzentrationen. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 8: 78-82.
- BERTSCH, P. M., UND D. R. PARKER. 1996. Aqueous Polynuclear Aluminum Species. Seiten: 117-170, *in* The Environmental Chemistry of Aluminum (G. Sposito, ed.) Lewis Publishers, Boca Raton.
- BIANCHI-HALL, C. M., T. E. CARTER, T. W. RUFTY, C. ARELLANO, H. R. BOERMA, D. A. ASHLEY, UND J. W. BURTON. 1998. Heritability and resource allocation of aluminum tolerance derived from soybean PI416937. *Crop Science* 38: 513-522.
- BIANCHI-HALL, C. M., T. E. J. CARTER, M. A. BAILEY, M. A. R. MIAN, T. W. RUFTY, D. A. ASHLEY, H. R. BOERMA, C. C. ARELLANO, R. S. HUSSEY, UND W. A. PARROTT. 2000. Aluminum Tolerance Associated with Quantitative Trait Loci Derived from Soybean PI 416937 in Hydroponics. *Crop Science* 40: 538-545.
- BLAMEY. 1995. Techniques for assessing plant responses on acid soils. Seiten: 221-233, *in* Plant Soil Interactions at Low pH (R. A. Date, ed.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- BLAMEY, F. P. C., C. J. ASHER, D. C. EDWARDS, UND G. L. KERVEN. 1993. In vitro evidence of aluminium effects on solution movement through root cell walls. *J. Plant. Nutr.* 16:555-562.
- BLAMEY, F. P. C., D. C. EDMEADES, UND D. M. WHEELER. 1990. Role of root cation-exchange capacity in differential aluminium tolerance of *Lotus* species. *J. Plant. Nutr.* 13: 729-744.
- BLAMEY, F. P. C., D. G. EDWARDS, UND C. J. ASHER. 1983. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongations in solution culture. *Soil Science* 136: 197-207.
- BLANCHFLOR, E. B., D. L. JONES, UND S. GILROY. 1998. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* 118: 159-172.
- BLOOM, P. R., UND S. M. ERICH. 1996. The Quantitation of Aqueous Aluminum. Seiten: 1-38, *in* The Environmental Chemistry of Aluminum (G. Sposito, ed.) Lewis Publishers, Boca Raton.
- BRAND, A. H., UND N. PERRIMON. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.

- BRAZDOVICOVA, M. M., G. VIZAROVA, AND T. ZATKALIKOVA. 1994. The effect of aluminium on mitotic activity and levels of free cytokinins in barley (*Hordeum vulgare*) roots. *Biologia Bratislava* 49: 899-904.
- BÜSCHER, P., N. KOEDAM, UND D. VAN SPEYBROECK. 1990. Cation exchange properties and adaptation to soil acidity in bryophytes. *New Phytol* 115: 177-186.
- CAKMAK, I., UND W. J. HORST. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83: 463-468.
- CAMARGO, C. E. D. O. 1984. The pH of nutritive solutions in the tolerance of wheat cultivars to aluminium toxicity. *Bragantia* 43: 327-335.
- CAMERON, R. S., O. S. P. RICHIE, UND A. D. ROBSON. 1986. Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to barley. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 1231.
- CAMPBELL, K. A. G., UND T. E. CARTER, JR. 1990. Aluminum tolerance in soybean: I. Genotypic correlation and repeatability of solution culture and greenhouse screening methods. *Crop Science* 30: 1049-1054.
- CAMPBELL, L. G., UND H. N. LAFEVER. Year. Heritability and gene effects for aluminum tolerance in wheat *in* 5th Int. Wheat Genet. Symp. Kapoor Art Press, New Delhi: 963.
- CARVER, B. F., UND J. D. OWNBY. 1995. Acid soil tolerance in wheat. *Adv. Agron.* 54: 117-173.
- CARVER, B. F., W. E. WHITMORE, E. L. SMITH, UND L. BONA. 1993. Registration of four aluminum-tolerant winter wheat germplasms and two susceptible near-isolines. *Crop Science* 33: 1113-1114.
- CLARKSON, D. T. 1965. The effect of aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in root apices of *Allium cepa*. *Anal. Bot.* 29: 309-315.
- DARMAN, M. A. Year. Improved Varieties and Breeding Strategy of Soybean in Indonesia *in* Research and Development of Soybean Production in Indonesia. BPP Teknologi, Jakarta: 68-70.
- DE LA FUENTE, J. M., V. RAMIREZ-RODRIGUEZ, J. L. CABRERA-PONCE, UND L. HERRERA-ESTRELLA. 1997. Aluminium Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrat Synthesis. *Science* 276: 1566-1568.
- DELHAIZE, E., S. CRAIG, C. D. BEATON, R. J. BENNET, V. C. JAGADISH, UND P. J. PANDALL. 1993a. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminium in root apices. *Plant Physiol.* 103: 685-693.
- DELHAIZE, E., P. R. RYAN, UND P. J. RANDALL. 1993b. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.

- DEVINE, T. E., C. D. FOY, UND D. L. MASON. 1979. Aluminium tolerance in soybean germplasm. Soybean Genetics Nesletter 6: 34-39.
- DIATLOFF, E., S. M. HARPER, C. J. ASHER, UND F. W. SMITH. 1998. Effects of humic and fulvic acids on the rhizotoxicity of lanthanum and aluminium to corn. Australian Journal of Soil Research 36: 913-919.
- DICE, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. Ecology 26: 297-302.
- FEHR, W. R. 1980. Soybean. Seiten: 589-598, in Hybridization of Crop Plants (W. R. Fehr, ed.) American Society of Agronomy-Crop Science Society of Amerika, Madison.
- FISHER, J. A., UND B. J. SCOTT. 1987. Response to selection for aluminium tolerance. Seiten: 135-137, in Priorities in Plant/Soil Relations: Research for Plant Production (P. G. E. Searle, and B. G. Davey, eds.). The University of Sydney, Sydney.
- FOY, C. D. 1992. Soil chemical factors limiting plant root growth. Seiten: 97-149, in Limitations in Plant Growth (J. L. Hatfield, and B. A. Stewart, eds.). Springer-Verlag, New York.
- FOY, C. D., R. L. CHANEY, UND M. C. WHITE. 1978. The Physiology of Metal Toxicity in Plants. Annual Reviews Plant Physiol. 29: 511-566.
- FOY, C. D., A. L. FLEMING, UND W. H. ARMIGER. 1969. Aluminum Tolerance of Soybean Varieties In Relation to Calcium Nutrition. Agronomy Journal 61: 505-511.
- FOY, C. D., H. N. LAFEVER, J. W. SCHWARTZ, UND A. L. FLEMING. 1974. Aluminum Tolerance of Wheat Cultivars Related to Region of Origin. Agronomy Journal 66: 751-758.
- FOY, C. D., L. P. SHALUNOVA, UND E. H. LEE. 1993. Acid soil tolerance of soybean (*Glycine max* L. Merr.) germplasm from the USSR. Journal of Plant Nutrition 16: 1593-1617.
- FURRER, G. 1993. New aspects on the chemistry of aluminum in soils. Aquat. Sci. 55: 281.
- GERKE, J. 1997. Aluminum and iron(III) species in the soil solution including organic complexes with citrate and humic substances. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 160: 427-432.
- GILL, G., J. K. FROST, UND K. A. MILLER. 1974. A new formula for a half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation. Acta Cytol. 18: 300-311.

- GIZLICE, Z., T. E. J. CARTER, UND J. W. BURTON. 1993. Genetic diversity in North American soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. *Crop Science* 33: 614-620.
- GIZLICE, Z., T. E. J. CARTER, UND J. W. BURTON. 1994. Genetic Base for North American Public Soybean Cultivars Released between 1947 and 1988. *Crop Science* 34: 1143-1151.
- GODBOLD, D. L., E. FRITZ, UND A. HUTTERMANN. 1988. Aluminum toxicity and forest decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 3888-3892.
- GODBOLD, D. L., UND G. JENTSCHKE. 1998. Aluminium accumulation in root cell walls coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. *Physiologia Plantarum* 102: 553-560.
- GOLDMAN, I. L., T. E. CARTER, JR., UND R. P. PATTERSON. 1989a. A detrimental interaction of subsoil aluminium and drought stress on the leaf water status of soybean. *Agronomy Journal* 81: 461-463.
- GOLDMAN, I. L., T. E. CARTER, JR., UND R. P. PATTERSON. 1989b. Differential genotypic response to drought stress and subsoil aluminum in soybean. *Crop Science* 29: 330-334.
- GRABSKI, S., UND M. SCHINDLER. 1995. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* 108: 897-901.
- GRAUER, U. 1992. Faktoren der Aluminium-Toleranz in verschiedenen Pflanzen. Dissertation; Institut für Pflanzenernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- GRAUER, U. E. 1993. Modelling anion amelioration of aluminium phytotoxicity. *Plant and Soil* 157: 319-331.
- GRAUER, U. E., UND W. J. HORST. 1990. Effect of pH and nitrogen source on aluminium tolerance of rye (*Secale cereale* L.) and yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Plant and Soil* 127: 13-21.
- GRAUER, U. E., UND W. J. HORST. 1992. Modelling cation amelioration of aluminium phytotoxicity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 166-172.
- GUTTMAN, H., UND E. HENGGE. 1990. Anorganische Chemie: eine Einführung. VCH, Weinheim.
- HANSON, W. D., UND E. J. KAMPRATH. 1979. Selection for Aluminum Tolerance in Soybean Based on Seedling-Root Growth. *Agronomy Journal* 71: 581-586.
- HASELOFF, J. 2000. Visualising cells in developing plant meristems, URL: <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>.
- HATZ, B. 1997. Untersuchungen der genetischen Diversität innerhalb der Gattung *Hordeum* mit molekularen Markertechniken. Dissertation; Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technischen Universität München, Freising.



- HAUG, A., B. SHI, UND V. VITORELLE. 1994. Aluminium interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* 68: 1-7.
- HEM, J. D., UND C. E. ROBERSON. 1990. Aluminum hydrolysis reactions and products in mildly acidic aqueous systems *in* Chemical Modeling of Aqueous Systems (D. C. Melchior, and R. L. Bassett, eds.). American Chemical Society, Washington D.C.
- HETHERINGTON, S. J., C. J. ASHER, UND F. P. C. BLAMEY. 1988. Comparative tolerance of sugarcane, navybean, soybean and maize to aluminium toxicity. *Australian Journal of Agricultural Research* 39: 171-176.
- HORST, W. J. 1995. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 158: 419-428.
- HORST, W. J., UND F. KLOTZ. 1990. Screening soybean for aluminium tolerance and adaptation to acid soils *in* 3. Kluwer Academic Publishers, International Symposium on Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition: 355-360.
- HORST, W. J., F. KLOTZ, UND P. SZULKIEWICZ. 1990. Mechanical impedance increases aluminium tolerance of soybean (*Glycine max*) roots. *Plant and Soil* 124: 227-231.
- HORST, W. J., N. SCHMOHL, M. KOLLMEIER, F. BALUSKA, UND M. SIVAGURU. 1999. Does Aluminium affect root growth of maize through interactions with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? *Plant and Soil* 215: 163-174.
- HOWELER, R. H., UND L. F. CADAVID. 1976. Screening of Rice Cultivars for Tolerance to Al-toxicity in Nutrient Solutions as Compared with a Field Screening Method. *Agronomy Journal* 68: 551-555.
- HUANG, J. W., J. E. SHAFF, D. L. GRUNES, UND L. V. KOCHIAN. 1992. Aluminum Effects on Calcium Fluxes at the Root Apex of Aluminum-Tolerant and Aluminum-Sensitive Wheat Cultivars. *Plant Physiol.* 98: 230-237.
- HUE, N. V., G. R. CRADDOCK, UND F. ADAMS. 1986. Effects of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 28.
- HUNTER, D., UND D. S. ROSS. 1991. Evidence for phytotoxic hydroxy-aluminum polymer in organic soil horizons. *Science* 251: 1056-1058.
- ISHIKAWA, H., UND M. L. EVANS. 1993a. Contribution of the central and distal elongation zone to root electrotopism. *Am. Soc. Gravitational Space Biol. Bull.* 7: 91.
- ISHIKAWA, H., UND M. L. EVANS. 1993b. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* 102:1203-1210.
- ISHIKAWA, H., UND M. L. EVANS. 1995. Specialised Zones of Development in Roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727.

- JACKSON, G. E. 1982. Studies on the chelation of aluminium for, biological application. Part 1. Citric acid. South African Journal of Chemistry 35: 89-92.
- JANSEN, S., S. DESSEIN, F. PIESCHAERT, E. ROBBRECHT, UND E. SMETS. 2000. Aluminium accumulation in leaves of *Rubiaceae*: systematic and phylogenetic implications. Annals of Botany 85: 91-101.
- JONES, D. L., S. GILROY, P. B. LARSEN, S. H. HOWELL, UND L. V. KOCHIAN. 1998a. Effect of aluminum on cytoplasmic  $Ca^{2+}$  homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.). Planta 206: 378-387.
- JONES, D. L., UND L. V. KOCHIAN. 1996. Aluminium-organic acid interactions in acid soils. I. Effects of root-derived organic acids on the kinetics of Al dissolution. Plant and Soil 182: 221-228.
- JONES, D. L., L. V. KOCHIAN, UND S. GILROY. 1998b. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. Plant Physiol. 116: 81-89.
- JONES, D. L., A. M. PRABOWO, UND L. V. KOCHIAN. 1996. Aluminium-organic acid interactions in acid soils. II. Influence of solid phase sorption on organic acid-Al complexation and Al rhizotoxicity. Plant and Soil 182: 229-237.
- JORGE, R. A., UND P. ARRUDA. 1997. Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. Phytochemistry 45: 675-681.
- KASIM, F., W. L. HAAG, UND C. E. WASSOM. 1990. Genotypic response of corn to aluminum stress. II. Field performance of corn varieties in acid soils and its relationship with performance at seedling stage. Indonesian Journal of Crop Science 5: 53-65.
- KASIM, F., UND C. E. WASSOM. 1990. Genotypic response of corn to aluminum stress. I. Seedling tests for measuring aluminum tolerance in nutrient solutions. Indonesian Journal of Crop Science 5: 41-51.
- KAUSS, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Annu. Rev. Plant Res. 38: 47-72.
- KEIM, P., B. W. DIERS, T. C. OLSON, UND R. C. SHOEMAKER. 1990. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. Genetics 126: 735-742.
- KEIM, P., R. GROOS, UND R. C. SHOEMAKER. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. Soybean Genetic Newsletter 15: 150-151.
- KEIM, P., J. M. SCHUPP, S. E. TRAVIS, K. CLAYTON, T. ZHU, L. SHI, A. FERREIRA, D. M. WEBB, T. ZHU, UND L. A. SHI. 1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. Crop Science 37: 537-543.
- KERRIDGE, P. C., UND W. E. KRONSTAD. 1986. Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat. Agronomy Journal 60: 710.

- KERVEN, G. L., P. L. LARSEN, L. C. BELL, UND D. G. EDWARDS. 1995. Quantitativ  $^{27}\text{Al}$  NMR spectroscopic studies of Al (III) complexes with organic acid ligands and their comparison with GEOCHEM predicted values. *Plant and Soil* 171: 35-39.
- KHATIWADA, S. P., D. SENADHIRA, A. L. CARPENA, R. S. ZEIGLER, UND P. G. FERNANDEZ. 1996. Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 93: 738-744.
- KINRAIDE, T. B. 1990. Assessing the rhizotoxicity of the aluminate ion,  $\text{Al}(\text{OH})_4$ . *Plant Physiol.* 93: 1620-1625.
- KINRAIDE, T. B. 1991. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant and Soil* 134: 167-178.
- KINRAIDE, T. B. 1993. Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. *Physiologia Plantarum* 88: 619-625.
- KINRAIDE, T. B. 1997. Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *Journal of Experimental Botany* 48: 1115-1124.
- KINRAIDE, T. B., UND D. R. PARKER. 1989. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminium. *Plant, Cell and Environment* 12: 479-487.
- KINRAIDE, T. B., UND D. R. PARKER. 1990. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant.* 79: 283-288.
- KISHA, T. J., B. W. DIERS, J. M. HOYT, UND C. H. SNELLER. 1998. Genetic diversity among soybean plant introductions and North American germplasm. *Crop Science* 38: 1669-1680.
- KLOPROGGE, J. T., D. SEYKENS, L. W. GEUS, UND J. B. H. JANSEN. 1993. The effects of concentration and hydrolysis on the oligomerization and polymerization of Al(III) as evident from the  $^{27}\text{Al}$  NMR chemical shifts and linewidths. *J. Non-Crystal. Solids* 160: 144.
- KOCHIAN, L. V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 237-260.
- KOLLMEIER, M., H. H. FELLE, UND W. J. HORST. 2000. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminium? *Plant Physiol* 122: 945-956.
- LARSEN, P. B., J. DEGENHARDT, C.-Y. TAI, L. M. STENZIER, S. H. HOWELL, UND L. V. KOCHIAN. 1998. Aluminum- Resistant Arabidopsis Mutants That Exhibit Altered Patterns of Aluminum Accumulation and Organic Acid Release from Roots. *Plant. Physiol.* 117: 9-18.

- LASSEIGNE, F. T., T. J. SMALLEY, H. A. MILLS, UND W. P. MILLER. 1996. Aluminum tolerance, mineral nutrition, and growth of "Helleri" holly in solution culture. *J. Plant Nutr.* 19: 1551-1567.
- LAZOF, D. B., J. G. GOLDSMITH, T. W. RUFTY, UND R. W. LINTON. 1994. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol.* 106: 1107-1114.
- LAZOF, D. B., J. G. GOLDSMITH, T. W. RUFTY, UND R. W. LINTON. 1996. The early entry of Al into cells of intact soybean roots. A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. *Plant Physiol.* 112: 1289-1300.
- LINDBERG, S., UND H. STRID. 1997. Aluminium induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 99: 405-414.
- LIU, D., W. JIANG, W. WANF, UND L. ZHAI. 1995. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test. *Isr. J. Plant: Sci.* 43: 125-133.
- LORENC-PLICINSKA, G., UND P. KAROLEWSKI. 1994. Aluminium effects the pyridine nucleotide redox state in roots of scots pine. *Acta Soc. Bot. Polon.* 63: 167-171.
- LUO, M. C., UND J. DVORAK. 1996. Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. *Euphytica* 91: 31-35.
- MA, J., S. ZHENG, H. MATSUMOTO, J. F. MA, UND S. J. ZHENG. 1997. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* 38: 1019-1025.
- MA, J. F., S. HIRADATE, UND H. MATSUMOTOT. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* 117: 753-759.
- MA, J. F., UND S. C. MIYASAKA. 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* 118: 861-865.
- MARIENFELD, S., H. LEHMANN, UND R. STELZER. 1995. Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant and Soil* 171: 167-173.
- MARIENFELD, S., UND R. STELZER. 1993. X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *Plant Physiol.* 141: 569-573.
- MARSCHNER, H. 1991. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant and Soil* 134: 1-20.
- MARTIN, R. B. 1986. The chemistry of Aluminum as related to biology and medicine. *Clin. Chem* 32: 1797-1806.

- MARTIN, R. B. 1988. Bioinorganic chemistry of aluminum. Seiten: 2-57, in *Metal Ions in Biological Systems: Aluminum and its Role in Biology* (H. Sigel, and A. Sigel, eds.). Marcel Dekker, New York.
- MASSON, P., J. SEDBROOK, R. RUTHERFORD, P. HILSON, K. CARROLL, T. CASPAR, C. SIMMONS, K. LINDSEY, UND P. GALLOIS. 1993. Molecular genetics of root gravitropism and waving in *Arabidopsis thaliana*. *Am. Soc. Gravitational Space Biol. Bull.* 7: 26-27.
- MATSUMOTO, H. 1988. Changes of the structure of pea chromatin by aluminum. *Plant Cell Physiol.* 29: 281-287.
- MATSUMOTO, H., E. HIRASAWA, S. MORIMURA, UND E. TAKAHASHI. 1976. Localisation of aluminium in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 627-631.
- MIYASAKA, S. C., J. G. BUTA, R. K. HOWELL, UND C. D. FOY. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96: 737-743.
- MIYASAKA, S. C., L. V. KOCHIAN, J. E. SHAFF, UND C. D. FOY. 1989. Mechanisms of aluminium tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH,  $K^+$ , and  $H^+$  transport and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91: 1188-1196.
- MORIMURA, L. M., E. TAKAHASHI, UND H. MATSUMOTO. 1978. Association of aluminum with nuclei and inhibition of cell division in onion (*Allium cepa*) roots. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 88: 395-401.
- NOBLE, A. D., M. V. FEY, UND J. D. LEA. 1982. Effects of soluble aluminum on seedling root elongation of 25 soybean cultivars. *Crop. Prod.* 11: 119-121.
- NOBLE, A. D., UND T. HARDING. 1989. Aluminium and pH effects on dry bean root growth in nutrient solution. *S. Afr. J. Plant Soil* 6: 245-249.
- NOBLE, A. D., J. D. LEA, UND M. V. FEY. 1984. Response of five soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars to lime and phosphorus on an acid Normandian subsoil. *S. Afr. J. Plant Soil* 1: 51-56.
- NOBLE, A. D., J. D. LEA, UND M. V. FEY. 1987. Performance of five soybean cultivars in relation to lime and phosphorus levels on acid Ultisol. *S. Afr. J. Plant Soil* 4: 140-142.
- NOBLE, A. D., M. E. SUMNER, UND A. K. ALVA. 1988. Comparison of aluminum and 8-hydroxyquinoline methods in the presence of fluoride for assaying phytotoxic aluminum. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52: 1059-1063.
- NORDSTROM, D. K., UND H. M. MAY. 1996. Aqueous Equilibrium Data for Mononuclear Aluminum Species. Seiten: 39-80, in *The Environmental Chemistry of Aluminum* (G. Sposito, ed.) Lewis Publishers, Boca Raton.

- OLIVETTI, G. P., J. R. CUMMING, UND B. ETHERTON. 1995. Membran potential depolarization of root cap cells precedes aluminum tolerance in snapbean. *Plant Physiol.* 109: 123-129.
- OWNBY, J. D., UND H. R. POPHAM. 1989. Citrat reverses the inhibition of wheat root growth caused by aluminum. *J. Plant. Physiol.* 135: 588-591.
- OZAKI, T., S. ENOMOTO, Y. MINAI, S. AMBE, F. AMBE, UND Y. MAKIDE. 1998. Influence of Aluminum on the uptake of various cations from solution into carrots. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 235: 285-289.
- PARKER, D. R., UND P. M. BERTSCH. 1992. Formation of the "Al<sub>13</sub>" tridecameric polycation under divers synthesis conditions. *Environ. Sci. Technol.* 26: 914.
- PARKER, D. R., T. B. KINRAIDE, UND L. W. ZELAZNY. 1989. On the phytotoxicity of polynuclear hydroxy-aluminum complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 789-796.
- PARKER, D. R., UND J. F. PEDLER. 1998. Probing the "malate hypothesis" of differential aluminum tolerance in wheat by using other rhizotoxic ions as proxies for Al. *Planta* 205: 389-396.
- PAVAN, M. A., J. P. BINGHAM, UND P. F. PRATT. 1982. Toxicity of aluminum to coffee in Ultisols and Oxisols amended with CaCO<sub>3</sub>, MgCO<sub>3</sub> and CaSO<sub>4</sub>. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 1201.
- PELLET, D. M., D. L. GRUNES, UND L. V. KOCHIAN. 1995. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196: 788-795.
- PETTERSON, S., UND B. BERGMAN. 1989. Effects of aluminium on ATP pools and utilization in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: a model for the *in vivo* toxicity. *Physiol. Plant.* 76: 527-534.
- POLLE, E., C. F. KONZAK, UND J. A. KITTRICK. 1978. Visual Detection of Aluminum Tolerance Levels in Wheat by Hematoxylin Staining of Seedling Roots. *Crop Science* 18: 823-827.
- PRECHT, M. 1987. *Bio-Statistik*, 4 edition. R. Oldenbourg, München.
- RATH, I. 2000. Untersuchungen zur Aluminiumtoxizität und zur Selektion aluminiumresistenter Zelllinien der Sojabohne. Dissertation; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster.
- REID, D. A., A. L. FLEMING, UND C. D. FOY. 1971. A Method for Determining Aluminum Response of Barley in Nutrient Solution in Comparison to Response in Al-Toxic Soil. *Agonomy Journal* 63: 600-603.
- REID, R. J., M. A. TESTER, UND F. A. SMITH. 1995. Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta* 195: 362-368.

- RENGEL, Z., UND D. C. ELLIOT. 1992. Mechanism of Aluminum inhibition of net  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol.* 98: 632-638.
- RENGEL, Z., UND R. J. REID. 1997. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant and Soil* 192: 31-35.
- RIEDE, C. R., UND J. A. ANDERSON. 1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Science* 36: 905-909.
- RITCHIE, G. S. P. 1995. Soluble aluminium in acid soils: Principles and practicalities. *Plant and Soil* 171: 17-27.
- ROY, A. K., S. ARCHANA, UND T. GEETA. 1988. Some aspects of aluminum toxicity in plants. *Botanical Reviews* 54: 145-178.
- RYAN, P. R., E. DELHAIZE, UND P. J. RANDALL. 1994a. Malate efflux from root apices; evidence for a general mechanism of Al-tolerance in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 231-243.
- RYAN, P. R., E. DELHAIZE, UND P. J. RANDALL. 1995. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 531-536.
- RYAN, P. R., J. M. DiTOMASO, UND L. V. KOCHIAN. 1993. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* 44: 437-446.
- RYAN, P. R., T. B. KINRAID, UND L. V. KOCHIAN. 1994b.  $\text{Al}^{3+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* 192: 98-103.
- SAGHAI-MAROOF, M. A., K. M. SOLIMAN, R. W. JORGENSEN, UND R. W. ALLARD. 1984. Ribosomal spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.
- SAPRA, V. T., T. MEBRAHTU, UND L. M. MUGWIRA. 1982. Soybean germplasm and cultivar aluminum tolerance in nutrient solution and Bladen clay loam soil. *Agronomy Journal* 74: 687-690.
- SARTAIN, J. B., UND E. J. KAMPRATH. 1978. Aluminum tolerance of soybean cultivars based on root elongation in solution culture compared with growth in acid soil. *Agronomy Journal* 70: 17-20.
- SASAKI, M., Y. YAMAMOTO, J. F. MA, UND H. MATSUMOTO. 1997a. Early events induced by aluminum stress in elongating cells of wheat root. *in* Plant nutrition for sustainable food production and environment (T. Ando, and e. al., eds.). Kluwer Academic Publishers., Dordrecht.

- SASAKI, M., Y. YAMAMOTO, UND H. MATSUMOTO. 1997b. Aluminum inhibits growth and stability of cortical microtubules in wheat (*Triticum aestivum*) root. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: 469-472.
- SCHÖNWITZ, R., UND H. ZIEGLER. 1989. Interaction of maize roots and rhizosphere micro-organisms. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152: 217-222.
- SEIP, H. M., L. MULLER, UND A. NAAS. 1984. Aluminum speciation: comparison of two spectrophotometric analytical methods and observed concentrations in some acidic aquatic systems in southern Norway. *Water Air Soil Pollut.* 23: 81.
- SHI, B., K. CHOU, UND A. HAUG. 1993. Aluminium impacts elements of the phosphoinositide signalling pathway in neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 121: 109-118.
- SHOEMAKER, R. C., D. GRANT, AND M. IMSANDE. 2000. Soybean Database, URL: <http://genome.cornell.edu/cgi-bin/WebAce/webace?db=soybase>. Update: 05.2000.
- SIEGEL, N., UND A. HAUG. 1983a. Aluminium interactions with calmodulin. Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochem. Biophys. Acta* 744: 36-45.
- SIEGEL, N., UND A. HAUG. 1983b. Calmodulin-dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: Abiochemical model of aluminum toxicity in roots. *Physiol. Plant* 59:285-291.
- SIVAGURU, M., F. BALUSKA, D. VOLKMAN, H. H. FELLE, UND W. J. HORST. 1999. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119: 1073-1082.
- SIVAGURU, M., UND W. J. HORST. 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminum-tolerant apical root zone of maize. *Plant Physiol* 116: 155-163.
- SLASKI, J. J. 1989. Effects of aluminium on calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase activity in wheat (*Triticum aestivum*) root tips. *Plant Physiol.* 133: 696-701.
- SLASKI, J. J. 1990. Response of calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase to root tips from various cultivated plants. *Plant Physiol* 136: 40-44.
- SNELLER, C. H., J. W. MILES, UND J. M. HOYT. 1997. Agronomic performance of soybean plant introductions and their genetic similarity to elite lines. *Crop Science* 37: 1595-1600.
- SPEHAR, C. R. 1990. Clonal propagation of F1 hybrids as- a tool in genetic studies of the soya bean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Euphytica* 47: 21-23.
- SPEHAR, C. R. 1994. Field screening of soya bean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm for aluminium tolerance by the use of augmented design. *Euphytica* 76: 203-213.



- SPEHAR, C. R. 1995a. Diallel analysis for mineral element absorption in tropical adapted soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). *Theor. Appl. Genet.* 90: 707-713.
- SPEHAR, C. R. 1995b. Impact of strategic genes in soybean on agricultural development in the Brazilian tropical savannahs. *Field Crops Research* 41: 141-146.
- SPEHAR, C. R., UND N. W. GALWAY. 1995. Generation mean analysis of root growth under aluminium-stress hydroponics in the soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). *Pesq. agropec. bras.* 30: 963-970.
- SPSS 1999. SPSS für Windows, version 9.0.0. SPSS Incorporation.
- SPSS 2000. SPSS für Windows, version 10.0.7. SPSS Incorporation.
- STASS, A., UND W. J. HORST. 1995. Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. *Plant and Soil* 171: 113-118.
- STEVENS, D. P., M. J. MCCLAUGHLIN, UND A. M. ALSTON. 1997. Phytotoxicity of aluminium-fluoride complexes and their uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant and Soil* 192: 81-93.
- SUHAYDA, C. G., UND A. HAUG. 1986. Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. *Physiol. Plant.* 68: 189-195.
- SUMARNO, UND T. ADISARWANTO. 1996. The Progress of Soybean Production Techniques in Indonesia *in* Research and Development of Soybean Production in Indonesia. BPP Teknologi, Jakarta: 71-73.
- SUTHIPRADIT, S., D. G. EDWARDS, UND C. J. ASHER. 1990. Effects of aluminium on tap-root elongation of soybean (*Glycine max*), cowpea (*Vigna unguiculata*) and green gram (*Vigna radiata*) grown in the presence of organic acids. *Plant and Soil* 124: 233-237.
- TAKAGI, H., H. NAMAI, UND K. MURAKAMI. 1983. Exploration of aluminum tolerant genes in wheat *in* 6th Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto: 143.
- TANG VAN, H., N. TRUONG THI, UND H. LAUDELOUT. 1989. Effect of aluminium on the mineral nutrition of rice. *Plant and Soil* 114: 173-185.
- TAYLOR, G. J. 1988a. Aluminium tolerance is independent of rhizosphere pH in *Triticum aestivum* L. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19: 1217-1227.
- TAYLOR, G. J. 1988b. The Physiology of aluminum tolerance. Seiten: 165-198, *in* Metal Ions in Biological Systems (H. Sigel, and A. Sigel, eds.). Marcel Dekker, New York.
- TAYLOR, G. J. 1988c. The physiology of aluminum tolerance. Seiten: 165-198, *in* Metal ions in biological systems. (H. Siegel, ed.) Marcel Dekker, New York.

- TAYLOR, G. J. 1991. Current views of the aluminum stressresponse; the physiological basis of tolerance. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 10: 57-93.
- TAYLOR, G. J. 1995. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. Seiten: 255-269, *in Plant and Soil Interactions at Low pH* (R. A. Date, and e. al., eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- THOMPSON, A. R., A. C. KUNWAR, H. S. GUTOWSKY, UND E. OLDFIELD. 1987. Oxygen-17 and aluminium-27 nuclear magnetic resonance spectroscopic investigations of aluminium(III) hydrolysis products. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.:* 2317.
- THOMPSON, J. A., R. L. NELSON, UND L. O. VODKIN. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Science* 38: 1348-1355.
- TICE, K. R., D. R. PARKER, UND D. A. DEMASON. 1992. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminium fractions in root tips of aluminium-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100: 309-318.
- VERKLEIJ, J. A., UND C. H. SCHAT. 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. Seiten: 179-193, *in Evolutionary aspects of heavy metal tolerance in plants* (J. Shaw, ed.) CRC Press, Boca Raton.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNERS, A. FRIJTERS, UND J. PTO. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- VOSE, P. B., UND P. J. RANDALL. 1962. Resistance to aluminium and manganese toxicities in plants related to variety and cation-exchange capacity. *Nature* 196: 85-86.
- WAGATSUMA, T., UND M. KANEKO. 1987. High toxicity of hydroxy-aluminium polymer ions to plant roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 33: 57-67.
- WANATABE, T., M. OSAKI, T. YOSHIHIRA, UND T. TADANO. 1998. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melanostoma malabathricum* L. *Plant and Soil* 201: 165-173.
- WANG, J., UND V. P. EVANGELOU. 1994. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. Seiten: 124-137, *in Handbook of Plant and Crop Physiology* (M. Pessarakli, ed.) Marcel Dekker, New York.
- WHEELER, D. M., D. C. EDMEADES, R. A. CHRISTIE, UND R. GEARDENER. 1992. Comparison of techniques for determining the effect of Aluminium on growth of, and inheritance of aluminium tolerance in wheat. *Plant and Soil* 146: 1-8.
- WISSEMEIER, A. H., F. KLOTZ, UND W. J. HORST. 1987. Aluminium induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Physiol.* 129: 487-492.
- YOU, G., UND D. J. NELSON. 1991. Al<sup>3+</sup> versus Ca<sup>2+</sup> ion binding to methionine and tyrosin spin-labeled bovin brain calmodulin. *J. Inorg. Biochem.* 41: 283-291.

- ZABEAU, M., AND P. VOS. 1992. Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprinting. European Patent Application, EP 0 534 858 A1. Keygene, Wageningen.
- ZHANG, W. H., UND Z. RENGEL. 1999. Aluminium induces an increase in cytoplasmatic calcium in intact wheat root apical cells. *Austr. J. Plant Physiol.* 26: 401-409.
- ZHENG, S., J. MA, H. MATSUMOTO, S. J. ZHENG, UND J. F. MA. 1998a. Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiologia Plantarum* 103: 209-214.
- ZHENG, S. J., J. F. MA, UND H. MATSUMOTO. 1998b. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117: 745-751.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungs Verzeichnis

Abbildung 1: Lösungsansätze für den Anbau von Soja auf sauren Böden.....	4
Abbildung 2: Apparatur zur Kultivierung von Keimlingen auf vertikalen Filterpapieren.....	13
Abbildung 3: Lage der Standorte der Feldversuche Sitiung, Lampung und Malang in Indonesien.....	15
Abbildung 4: Pfropfung von Sojabohnen .....	19
Abbildung 5: Kulturmethoden zur Gewinnung von Rhizosphärenlösung.....	21
Abbildung 6: Eluenten Konzentration während der HPLC-Analyse.....	22
Abbildung 7: Schema einer Diversitätsanalyse mit molekulargenetischen Markern ...	32
Abbildung 8: Position der Sorten in den ersten beiden Dimensionen einer dreidimensionalen Skalierung der genetischen Distanzen.....	37
Abbildung 9: Fusionsebenen-Diagramm und Dendrogramm der Average Linkage Gruppierungsmethode.....	41
Abbildung 10: Fusionsebenen-Diagramm und Dendrogramm der Minimal-Varianz Gruppierungsmethode.....	43
Abbildung 11: Darstellung der 6 Cluster-Partition der Minimal-Varianz Methode im dreidimensionalen Raum der multidimensionalen Skalierung.....	44
Abbildung 12: Dendrogramm der Gruppen und Clustereigenschaften .....	47
Abbildung 13: Anteile unterschiedlicher Aluminiumionenspezies am gelösten Aluminium bei verschiedenen pH-Werten .....	49
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung unterschiedlicher Aluminiumionenspezies, bei verschiedenen Citrat-Konzentrationen in einer 400 µM Aluminium Lösung .....	50
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung unterschiedlicher Aluminiumionenspezies, bei verschiedenen Malat-Konzentrationen in einer 400 µM Aluminiumlösung .....	51
Abbildung 16: Mittlere relative Trockenmasse von Sproß und Wurzel bei verschiedenen pH-Werten.....	53

Abbildung 17: Durchschnittlicher zeitlicher Verlauf der Wurzellänge bei verschiedenen pH-Werten und Kulturmethoden.....	54
Abbildung 18: Wurzelwachstum nach 3 Tagen in Abhängigkeit von pH-Wert und Kulturmethode. ....	55
Abbildung 19: Schematische Darstellung der pH-abhängigen Systeme Al-Ionengleichgewicht und Wurzelwachstum.....	56
Abbildung 20: Relative Trockenmassen von Wurzel und Sproß gemittelt über Sorten.	58
Abbildung 21: Mittleres relatives Wurzelwachstum der Sorten 'Malabar' und 'BR86-9508' in Filterkultur. ....	62
Abbildung 22: Mittlere Wurzellänge bei verschiedenen Kulturmethoden und Al-Konzentrationen .....	63
Abbildung 23: Vergleich des relativen Wurzelwachstums zwischen Kulturmethoden und Konzentrationen nach 3 Tage .....	64
Abbildung 24: Vergleich des relativen Wurzelwachstums der Sorten in Filter- und Lösungskultur unter Streßbedingungen .....	67
Abbildung 25: Mittlere Pflanzenhöhe und Bestand am Standort Malang .....	68
Abbildung 26: Vergleich der Pflanzenentwicklung an den Versuchsstandorten Malang, Sitiung und Lampung. ....	70
Abbildung 27: Hematoxylin gefärbtes Agarosegel nach 16-stündiger Kultur von Sojawurzeln. ....	78
Abbildung 28: Nahaufnahme des Bereichs der Wurzelspitze eines Hematoxylin gefärbten Agarosegels nach 2 Stunden Inkubationszeit. 1-Wurzeldurchmesser; 2-Exudationszentrum; 3-Wurzelspitze; 4-Abstand Wurzelspitze-Exudationszentrum. ....	79
Abbildung 29: Wurzelspitzen von Wurzel mit bzw. ohne Aluminium Streß.....	80
Abbildung 30: HPLC Detection organischer Säuren in Rhizosphärenlösung mit 500µM CaCl <sub>2</sub> .....	82
Abbildung 31: HPLC Detektion organischer Säuren in Rhizosphärenlösung mit 500µM AlCl <sub>3</sub>	82
Abbildung 32: Malat- und Citrat-Ausscheidung von Wurzelspitzen der Sorten IAC 17 und Malabar .....	83
Abbildung 33: Wurzelwachstum der Elternlinien und F2-Nachkommen in 48 Stunden mit bzw. ohne Al-Streß.....	89
Abbildung 34: Wurzelwachstum der Elternlinien und F3-Familien nach 72 h mit bzw. ohne Al-Streß .....	90

---

Abbildung 35: Boxplot der relativen Wurzellänge von Individuen der Kreuzungseltern und Nachkommenschaften. ....	91
Abbildung 36: Histogramm der relativen Wurzellänge in der F3 Nachkommenschaft sowie Mittelwert der Eltern und Nachkommen und ideale Normalverteilung. ....	92
Abbildung 37: Ca. 3 Wochen alte Wurzeln aus Al-haltiger Lösungskultur. ....	109
Abbildung 38: Schema zur gentechnologischen Aktivierung gewebespezifischer Überproduktion von Citrat an der Wurzelspitze. ....	122

## 7.2 Tabellen Verzeichnis

Tabelle 1: Anteile saurer Böden ( $\text{pH} < 5.5$ ) an der nutzbaren Landfläche in den Indonesischen Provinzen nach RADJAGUKGUK, (1983) und DARMAN (1996).....	2
Tabelle 2: Gleichgewichtskonstanten verschiedener Aluminiumionenspezies in verdünnter wässriger Lösung.....	8
Tabelle 3: Liste der untersuchten Sorten .....	10
Tabelle 4: Varianten der Sandkulturversuche.....	11
Tabelle 5: Varianten der Lösungs- und Filterversuche.....	15
Tabelle 6: Boden und Klimadaten der Versuchsstandorte Malang, Lampung und Sitiung.....	16
Tabelle 7: Sequenz der Schnittstellen, Adaptoren und Primer .....	25
Tabelle 8: Programm für vorselektive PCR-Amplifikation.....	27
Tabelle 9: Programm für selektive PCR-Amplifikation und Fragment Markierung... ..	28
Tabelle 10: Programm für PCR-Amplifikation von RAPD Fragmenten.....	29
Tabelle 11: Kontingenztafel.....	30
Tabelle 12: Benutzte molekulare Marker und Anzahl polymorpher Fragmente .....	34
Tabelle 13: Zusammenfassung der Distanzmatrix.....	35
Tabelle 14: Streß-Werte und Fehlerquadrate bei Skalierung und 2-4 Dimensionen.....	36
Tabelle 15: Mittlere genetische Distanzen innerhalb und zwischen den Clustern .....	45
Tabelle 16: Korrelation zwischen Clustern und Herkunftsgruppen. ....	46
Tabelle 17. Mittelwerte und Schwankungsbreite des pH-Wertes während des Versuchsverlaufs.....	57
Tabelle 18: Relative Wurzeltrockenmasse der Sorten in der $1400 \mu\text{M}$ Al Variante, Ränge und multipler Mittelwertsvergleich .....	59
Tabelle 19: Relative Sproßtrockenmasse nach Kultur $1400\mu\text{M}$ Al haltigem Sand, sowie Rangordnung und multipler Mittelwertsvergleich. ....	60
Tabelle 20: Relatives Wurzelwachstum bei $20 \mu\text{M}$ Aluminium in Lösungskultur nach 3 Tagen sowie homogene Untergruppen nach Tukey's Test.....	65
Tabelle 21: Relatives Wurzelwachstum bei $750 \mu\text{M}$ Aluminium in Filterkultur nach 3 Tagen, sowie homogene Untergruppen nach multiplem Mittelwertsvergleich. ....	66

---

Tabelle 22: Ertrag je Pflanze und Pflanzenhöhe am Versuchsstandort Lampung relativ zum Standort Malang.....	71
Tabelle 23: Ertrag je Pflanze und Pflanzenhöhe am Versuchsstandort Sitiung relativ zum Standort Malang. Ränge auf Spannweite 1-17 skaliert.....	72
Tabelle 24: Ränge der Sorten bei verschiedenen Kulturmethoden und Meßparametern .....	75
Tabelle 25: Korrelation der Rangfolgen in verschiedenen Kulturmethoden und Meßparameter nach 'Spearman`s' Rangkorrelation .....	76
Tabelle 26: Ausscheidungsraten organischer Säuren bezogen auf eine Wurzelspitze. .	84
Tabelle 27: Konzentration von Malat und Citrat nach einer Stunde Efflux in eine hypothetische Rhizosphäre .....	84
Tabelle 28: Verteilung der Ionenspezies in einer hypothetischen Rhizosphärenlösung.....	85
Tabelle 29: Relative Wurzellänge von Eltern und F2 Nachkommen der Population 'Doko RC x Wilis' .....	87
Tabelle 30: Genetische Distanzkoeffizienten zwischen den Genotypen .....	148
Tabelle 31: Koordinaten der Genotypen in dreidimensionaler Skalierung .....	150



Tabelle 30: Genetische Distanzkoeffizienten zwischen den Genotypen

	Kalmit	Dorado	Tampomas	Malabar	Tambora	Kerinci	Wilis	Cristalina	IAC-9	Savanna	Doko RC	Gasoy-17	Essex	Forrest	Norchief	Hawkeye	Maple Arrow	PI159322	PI381674	Perry	PI81042	Kent	PI417021
Kalmit	.00	.32	.36	.35	.29	.34	.35	.28	.38	.29	.40	.30	.32	.31	.34	.25	.29	.37	.29	.25	.35	.26	.29
Dorado	.32	.00	.37	.38	.34	.37	.38	.38	.40	.38	.37	.32	.39	.34	.34	.33	.25	.30	.33	.33	.32	.33	.34
Tampomas	.36	.37	.00	.31	.32	.19	.06	.36	.38	.34	.36	.29	.35	.31	.40	.36	.36	.39	.38	.34	.38	.34	.35
Malabar	.35	.38	.31	.00	.27	.32	.31	.32	.34	.32	.36	.34	.34	.33	.40	.38	.36	.32	.29	.33	.32	.33	.34
Tambora	.29	.34	.32	.27	.00	.25	.31	.26	.34	.28	.29	.29	.32	.31	.38	.33	.38	.31	.29	.27	.28	.28	.31
Kerinci	.34	.37	.19	.32	.25	.00	.20	.31	.39	.33	.36	.31	.34	.33	.39	.38	.38	.40	.37	.33	.37	.34	.39
Wilis	.35	.38	.06	.31	.31	.20	.00	.36	.38	.36	.36	.30	.35	.31	.40	.36	.37	.38	.38	.34	.36	.34	.35
Cristalina	.28	.38	.36	.32	.26	.31	.36	.00	.26	.18	.29	.22	.24	.27	.27	.27	.32	.32	.29	.28	.28	.28	.31
IAC-9	.38	.40	.38	.34	.34	.39	.38	.26	.00	.28	.28	.27	.29	.31	.34	.31	.33	.34	.33	.32	.30	.32	.35
Savanna	.29	.38	.34	.32	.28	.33	.36	.18	.28	.00	.28	.21	.25	.27	.34	.31	.31	.29	.28	.30	.32	.31	.28
Doko RC	.40	.37	.36	.36	.29	.36	.36	.29	.28	.28	.00	.27	.30	.27	.36	.38	.37	.33	.32	.34	.34	.33	.37
Gasoy-17	.30	.32	.29	.34	.29	.31	.30	.22	.27	.21	.27	.00	.24	.16	.33	.28	.26	.31	.26	.25	.26	.25	.28
Essex	.32	.39	.35	.34	.32	.34	.35	.24	.29	.25	.30	.24	.00	.27	.27	.31	.33	.31	.33	.25	.32	.24	.31
Forrest	.31	.34	.31	.33	.31	.33	.31	.27	.31	.27	.27	.16	.27	.00	.31	.32	.27	.30	.31	.26	.30	.26	.34
Norchief	.34	.34	.40	.40	.38	.39	.40	.27	.34	.34	.36	.33	.27	.31	.00	.18	.28	.32	.35	.27	.30	.28	.38
Hawkeye	.25	.33	.36	.38	.33	.38	.36	.27	.31	.31	.38	.28	.31	.32	.18	.00	.26	.31	.28	.21	.30	.23	.35
Maple Arrow	.29	.25	.36	.36	.38	.38	.37	.32	.33	.31	.37	.26	.33	.27	.28	.26	.00	.31	.29	.30	.28	.29	.31
PI159322	.37	.30	.39	.32	.31	.40	.38	.32	.34	.29	.33	.31	.31	.30	.32	.31	.31	.00	.28	.33	.30	.32	.32
PI381674	.29	.33	.38	.29	.29	.37	.38	.29	.33	.28	.32	.26	.33	.31	.35	.28	.29	.28	.00	.27	.28	.26	.28
Perry	.25	.33	.34	.33	.27	.33	.34	.28	.32	.30	.34	.25	.25	.26	.27	.21	.30	.33	.27	.00	.27	.02	.35
PI81042	.35	.32	.38	.32	.28	.37	.36	.28	.30	.32	.34	.26	.32	.30	.30	.30	.28	.30	.28	.27	.00	.26	.25
Kent	.26	.33	.34	.33	.28	.34	.34	.28	.32	.31	.33	.25	.24	.26	.28	.23	.29	.32	.26	.02	.26	.00	.35
PI417021	.29	.34	.35	.34	.31	.39	.35	.31	.35	.28	.37	.28	.31	.34	.38	.35	.31	.32	.28	.35	.25	.35	.00
Missoy	.36	.37	.29	.32	.30	.28	.30	.32	.37	.34	.34	.33	.32	.31	.34	.32	.36	.34	.32	.31	.36	.30	.40
Biloxi	.32	.36	.34	.30	.23	.31	.35	.29	.38	.30	.27	.30	.31	.30	.37	.38	.35	.33	.28	.32	.32	.31	.34
Jutro	.21	.30	.40	.37	.34	.40	.40	.36	.37	.35	.40	.36	.37	.35	.33	.25	.19	.33	.31	.34	.31	.34	.30
Labrador	.19	.30	.34	.32	.31	.33	.34	.28	.34	.30	.38	.26	.29	.27	.25	.25	.13	.32	.28	.25	.28	.23	.28
Lumut	.32	.39	.16	.29	.31	.23	.18	.33	.33	.33	.35	.29	.31	.28	.37	.34	.33	.37	.32	.29	.33	.29	.31
Genjah jep.	.34	.39	.16	.27	.31	.22	.17	.33	.38	.33	.34	.32	.34	.31	.35	.31	.37	.40	.34	.30	.34	.30	.35
Sindoro	.33	.34	.16	.32	.31	.21	.17	.32	.37	.33	.35	.27	.31	.29	.35	.31	.33	.36	.33	.31	.34	.30	.31
Slamet	.30	.33	.18	.28	.28	.24	.21	.27	.32	.25	.30	.25	.25	.25	.31	.31	.28	.32	.29	.31	.31	.31	.27
PI416937	.28	.29	.34	.34	.28	.32	.34	.29	.34	.31	.36	.27	.31	.32	.33	.29	.32	.33	.29	.30	.24	.30	.22
IAC-17	.27	.30	.30	.33	.30	.32	.31	.23	.29	.25	.29	.16	.27	.19	.34	.29	.25	.33	.26	.22	.26	.23	.32
Major	.23	.27	.35	.33	.31	.35	.34	.30	.31	.33	.34	.29	.33	.29	.30	.28	.19	.36	.30	.30	.27	.30	.24
Picador	.27	.36	.36	.39	.35	.38	.36	.30	.34	.32	.36	.27	.34	.28	.30	.24	.26	.30	.32	.28	.32	.27	.31
Goldor	.25	.28	.33	.32	.29	.34	.32	.26	.34	.29	.30	.27	.27	.30	.26	.23	.25	.32	.26	.23	.29	.23	.28
Samsoy	.37	.36	.28	.27	.27	.28	.30	.30	.34	.31	.29	.31	.30	.31	.34	.32	.35	.35	.34	.33	.35	.33	.39
M-351	.37	.33	.36	.38	.33	.31	.36	.31	.34	.30	.34	.28	.34	.33	.40	.35	.33	.34	.28	.33	.32	.33	.31
TGX-536-0	.34	.37	.28	.31	.25	.26	.26	.28	.34	.28	.30	.25	.30	.23	.36	.34	.32	.37	.33	.29	.28	.31	.34
TGX-1448-2	.33	.37	.25	.30	.26	.28	.26	.28	.32	.27	.32	.24	.32	.29	.35	.29	.30	.32	.27	.30	.29	.31	.30
B3577	.32	.39	.15	.35	.32	.23	.17	.33	.38	.36	.36	.29	.34	.31	.41	.34	.34	.40	.37	.32	.37	.33	.32
B3578	.29	.37	.14	.29	.29	.22	.15	.33	.37	.34	.36	.28	.33	.29	.37	.32	.32	.38	.35	.28	.33	.29	.31
B3911	.33	.37	.18	.29	.26	.23	.17	.33	.36	.34	.35	.29	.33	.28	.41	.36	.36	.35	.35	.29	.29	.30	.28
Wilis2	.34	.38	.09	.32	.31	.23	.10	.36	.39	.34	.39	.30	.34	.31	.40	.34	.37	.38	.36	.31	.35	.31	.35
Jogun	.30	.36	.34	.34	.26	.34	.32	.26	.33	.27	.36	.26	.26	.33	.35	.33	.34	.32	.30	.32	.22	.33	.14

	Misoy	Biloxi	Jutro	Labrador	Lumut	Genjah jepang	Sindoro	Slamet	PI416937	IAC-17	Major	Picador	Goldor	Samsoy	M-351	TGX-536-0	TGX-1448-2	B3577	B3578	B3911	Wilis2	Jogun
Kalmit	.36	.32	.21	.19	.32	.34	.33	.30	.28	.27	.23	.27	.25	.37	.37	.34	.33	.32	.29	.33	.34	.30
Dorado	.37	.36	.30	.30	.39	.39	.34	.33	.29	.30	.27	.36	.28	.36	.33	.37	.37	.39	.37	.37	.38	.36
Tampomas	.29	.34	.40	.34	.16	.16	.16	.18	.34	.30	.35	.36	.33	.28	.36	.28	.25	.15	.14	.18	.09	.34
Malabar	.32	.30	.37	.32	.29	.27	.32	.28	.34	.33	.33	.39	.32	.27	.38	.31	.30	.35	.29	.29	.32	.34
Tambora	.30	.23	.34	.31	.31	.31	.31	.28	.28	.30	.31	.35	.29	.27	.33	.25	.26	.32	.29	.26	.31	.26
Kerinci	.28	.31	.40	.33	.23	.22	.21	.24	.32	.32	.35	.38	.34	.28	.31	.26	.28	.23	.22	.23	.23	.34
Wilis	.30	.35	.40	.34	.18	.17	.17	.21	.34	.31	.34	.36	.32	.30	.36	.26	.26	.17	.15	.17	.10	.32
Cristalina	.32	.29	.36	.28	.33	.33	.32	.27	.29	.23	.30	.30	.26	.30	.31	.28	.28	.33	.33	.33	.36	.26
IAC-9	.37	.38	.37	.34	.33	.38	.37	.32	.34	.29	.31	.34	.34	.34	.34	.34	.32	.38	.37	.36	.39	.33
Savanna	.34	.30	.35	.30	.33	.33	.33	.25	.31	.25	.33	.32	.29	.31	.30	.28	.27	.36	.34	.34	.34	.27
Doko RC	.34	.27	.40	.38	.35	.34	.35	.30	.36	.29	.34	.36	.30	.29	.34	.30	.32	.36	.36	.35	.39	.36
Gasoy-17	.33	.30	.36	.26	.29	.32	.27	.25	.27	.16	.29	.27	.27	.31	.28	.25	.24	.29	.28	.29	.30	.26
Essex	.32	.31	.37	.29	.31	.34	.31	.25	.31	.27	.33	.34	.27	.30	.34	.30	.32	.34	.33	.33	.34	.26
Forrest	.31	.30	.35	.27	.28	.31	.29	.25	.32	.19	.29	.28	.30	.31	.33	.23	.29	.31	.29	.28	.31	.33
Norchief	.34	.37	.33	.25	.37	.35	.35	.31	.33	.34	.30	.30	.26	.34	.40	.36	.35	.41	.37	.41	.40	.35
Hawkeye	.32	.38	.25	.25	.34	.31	.31	.31	.29	.29	.28	.24	.23	.32	.35	.34	.29	.34	.32	.36	.34	.33
Maple Arrc	.36	.35	.19	.13	.33	.37	.33	.28	.32	.25	.19	.26	.25	.35	.33	.32	.30	.34	.32	.36	.37	.34
PI159322	.34	.33	.33	.32	.37	.40	.36	.32	.33	.33	.36	.30	.32	.35	.34	.37	.32	.40	.38	.35	.38	.32
PI381674	.32	.28	.31	.28	.32	.34	.33	.29	.29	.26	.30	.32	.26	.34	.28	.33	.27	.37	.35	.35	.36	.30
Perry	.31	.32	.34	.25	.29	.30	.31	.31	.30	.22	.30	.28	.23	.33	.33	.29	.30	.32	.28	.29	.31	.32
PI81042	.36	.32	.31	.28	.33	.34	.34	.31	.24	.26	.27	.32	.29	.35	.32	.28	.29	.37	.33	.29	.35	.22
Kent	.30	.31	.34	.23	.29	.30	.30	.31	.30	.23	.30	.27	.23	.33	.33	.31	.31	.33	.29	.30	.31	.33
PI417021	.40	.34	.30	.28	.31	.35	.31	.27	.22	.32	.24	.31	.28	.39	.31	.34	.30	.32	.31	.28	.35	.14
Misoy	.00	.32	.37	.35	.26	.27	.29	.29	.37	.34	.32	.31	.30	.26	.32	.31	.32	.31	.28	.31	.28	.38
Biloxi	.32	.00	.36	.29	.33	.27	.33	.28	.32	.30	.33	.37	.30	.33	.33	.27	.29	.33	.29	.31	.33	.32
Jutro	.37	.36	.00	.17	.36	.41	.38	.33	.28	.34	.16	.26	.25	.36	.36	.37	.35	.39	.36	.37	.38	.32
Labrador	.35	.29	.17	.00	.32	.34	.31	.28	.26	.24	.16	.24	.25	.35	.32	.34	.29	.34	.31	.35	.33	.28
Lumut	.26	.33	.36	.32	.00	.16	.19	.22	.34	.30	.32	.32	.28	.29	.34	.27	.26	.18	.15	.20	.18	.32
Genjah jep	.27	.27	.41	.34	.16	.00	.19	.23	.34	.31	.37	.34	.30	.24	.33	.26	.24	.13	.12	.20	.17	.34
Sindoro	.29	.33	.38	.31	.19	.19	.00	.21	.30	.30	.31	.33	.29	.25	.30	.26	.24	.19	.19	.20	.17	.27
Slamet	.29	.28	.33	.28	.22	.23	.21	.00	.27	.27	.28	.32	.27	.27	.30	.25	.25	.24	.21	.25	.20	.26
PI416937	.37	.32	.28	.26	.34	.34	.30	.27	.00	.26	.24	.32	.29	.34	.30	.34	.30	.33	.31	.34	.35	.22
IAC-17	.34	.30	.34	.24	.30	.31	.30	.27	.26	.00	.27	.30	.28	.30	.30	.24	.24	.28	.27	.30	.31	.29
Major	.32	.33	.16	.16	.32	.37	.31	.28	.24	.27	.00	.28	.25	.36	.34	.31	.32	.35	.32	.33	.34	.27
Picador	.31	.37	.26	.24	.32	.34	.33	.32	.32	.30	.28	.00	.23	.35	.35	.33	.28	.32	.30	.31	.35	.33
Goldor	.30	.30	.25	.25	.28	.30	.29	.27	.29	.28	.25	.23	.00	.28	.29	.27	.29	.30	.27	.29	.30	.29
Samsoy	.26	.33	.36	.35	.29	.24	.25	.27	.34	.30	.36	.35	.28	.00	.21	.25	.25	.30	.27	.25	.31	.35
M-351	.32	.33	.36	.32	.34	.33	.30	.30	.30	.30	.34	.35	.29	.21	.00	.30	.24	.32	.32	.29	.36	.33
TGX-536-0	.31	.27	.37	.34	.27	.26	.26	.25	.34	.24	.31	.33	.27	.25	.30	.00	.25	.24	.24	.21	.29	.32
TGX-1448	.32	.29	.35	.29	.26	.24	.24	.25	.30	.24	.32	.28	.29	.25	.24	.25	.00	.22	.23	.22	.28	.27
B3577	.31	.33	.39	.34	.18	.13	.19	.24	.33	.28	.35	.32	.30	.30	.32	.24	.22	.00	.08	.17	.19	.33
B3578	.28	.29	.36	.31	.15	.12	.19	.21	.31	.27	.32	.30	.27	.27	.32	.24	.23	.08	.00	.14	.15	.31
B3911	.31	.31	.37	.35	.20	.20	.20	.25	.34	.30	.33	.31	.29	.25	.29	.21	.22	.17	.14	.00	.14	.27
Wilis2	.28	.33	.38	.33	.18	.17	.17	.20	.35	.31	.34	.35	.30	.31	.36	.29	.28	.19	.15	.14	.00	.33
Jogun	.38	.32	.32	.28	.32	.34	.27	.26	.22	.29	.27	.33	.29	.35	.33	.32	.27	.33	.31	.27	.33	.00

**Tabelle 31: Koordinaten der Genotypen in dreidimensionaler Skalierung**

<i>Genotyp</i>	<i>Dimension</i>			<i>Genotyp</i>	<i>Dimension</i>		
	<i>1.</i>	<i>2.</i>	<i>3.</i>		<i>1.</i>	<i>2.</i>	<i>3.</i>
Kalmit	0.70	1.76	0.05	Missoy	-1.15	-0.36	1.56
Dorado	1.48	1.85	-0.87	Biloxi	-0.43	-0.93	-1.40
Tampomas	-2.09	0.44	0.21	Jutro	1.86	1.67	-0.27
Malabar	-1.10	-0.55	-1.65	Labrador	1.02	0.93	0.01
Tambora	-0.54	-0.49	-1.21	Lumut	-1.36	0.31	0.47
Kerinci	-2.09	0.20	-0.04	Genjahje	-1.74	0.08	0.40
Wilis	-2.05	0.51	0.17	Sindoro	-1.26	0.55	0.07
Cristali	0.70	-1.17	0.17	Slamet	-0.57	0.10	-0.07
IAC-9	1.09	-1.95	0.70	PI416937	0.73	0.75	-1.12
Savanna	0.65	-1.39	-0.31	IAC-17	0.39	-0.23	0.16
Doko RC	0.20	-2.38	0.14	Major	1.07	1.09	-0.22
Gasoy17	0.24	-0.60	0.27	Picador	1.06	0.77	1.29
Essex	0.47	-1.26	0.91	Goldor	0.54	0.47	0.38
Forrest	0.10	-0.63	1.01	Samsoy	-1.10	-1.14	0.53
Norchief	1.91	0.08	1.67	M-351	-0.06	-1.12	-1.43
Hawkeye	1.20	0.66	1.15	TGX-536-0	-1.11	-0.58	0.22
Maple Arrow	1.52	0.96	0.47	TGX-1448-2	-0.72	-0.28	-0.34
PI159322	1.95	-0.97	-0.71	B3577	-1.75	0.70	0.29
PI381674	1.29	-0.46	-0.92	B3578	-1.31	0.65	0.17
Perry	0.50	0.11	1.12	B3911	-1.51	0.24	-0.33
PI81042	1.33	-0.25	-0.88	Wilis2	-1.81	0.81	0.28
Kent	0.57	0.09	1.01	Jogun	0.41	0.24	-1.48
PI417021	0.77	0.77	-1.66				