

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 ABA-Langstreckentransport von der Pflanzenwurzel in den -spross

#### 4.1.1 ABA, ein Signal aus der Wurzel

Im pflanzlichen Organismus regeln, ebenso wie im Tierreich, Hormone die Anpassung der Lebewesen an sich verändernde Umweltbedingungen. Man unterscheidet 9 Stoffklassen, die als Regulatormoleküle auftreten: Abscisinsäure, Auxine, Cytokinine, Ethylen, Gibberelline, Jasmonate, Salicylsäure, Brassinosteroide und, in eingeschränkter Weise, Polyamine.

Ein wesentlicher Unterschied dieser Wachstumsregulatoren zu tierischen Hormonen ist, dass sie nicht hoch spezifisch im Organismus bewirken. Ihr Wirkungsspektrum umfasst mehrere physiologische Vorgänge.

Die bekannteste Funktion des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) ist die Regulation der Stomatafunktion in Blättern (Hetherington und Davies 1998). Eine Erhöhung des Blatt-ABA-Gehaltes führt zum Schluss der Stomata (Assmann 1993). Der Hormonrezeptor liegt für diesen Vorgang auf der apoplastischen Seite der Schließzellen (Hartung 1983, Wilkinson und Davies 1997). Ursachen für erhöhte ABA-Gehalte im Gewebe sind Salinität des Bodens, niedrige Temperaturen oder Trockenheit (vgl. 3.2.1.1). Fällt das Gewebewasserpotenzial unter einen Schwellenwert von  $-0.5$  bis  $-1.0$  MPa ab (Hartung und Heilmeier 1993), so steigt die ABA-Biosynthese. Abscisinsäure wird von jedem pflanzlichen Gewebe produziert. Die Frage, ob nun die Blätter selbst die zum Stomataschluss nötige ABA produzieren oder andere Organe wie z.B. Wurzeln, wurde lange konträr beantwortet.

Das erste „Split-root“-Experiment von Blackman und Davies (1985) belegte die Theorie, dass die im Blatt regulierend wirkende ABA in der Pflanzenwurzel produziert wird. Während dieser Experimente wurde ein Teil des Wurzelsystems gut bewässert, so dass das Blattwasserpotenzial der Versuchspflanze unverändert blieb. Ein weiterer Teil des Wurzelsystems wurde Trockenstress ausgesetzt, so dass sich in

---

ABA produziert wurde. Die Blattleitfähigkeit der so behandelten Pflanzen lag signifikant unter der von Kontrollpflanzen. Da aber das Blattwasserpotenzial konstant gehalten wurde, konnte die verstärkte Biosynthese dort nicht stattgefunden haben (Pierce und Raschke 1981).

Diese Ergebnisse konnten sowohl mit weiteren vertikalen (Zhang et al. 1987) als auch horizontalen „Split-root“-Experimenten (Neales et al. 1989, Bano et al. 1993, Zhang und Davies 1989) an verschiedenen Pflanzenarten (*Commelina communis*, *Helianthus annuus*, *Oryza sativa* und *Zea mays*) reproduziert werden. Der ABA-Gehalt von Sonnenblumenwurzeln steigt bereits zwischen Wasserpotenzialwerten von  $-0.2$  bis  $-0.4$  MPa linear an. Im Blatt dagegen bleibt der ABA-Gehalt in einem Bereich von  $-0.04$  bis  $-0.6$  MPa konstant und steigt erst bei einem Blattwasserpotenzial von  $-0.9$  MPa stark an (Prof. Dr. K. Dörffling, nicht publiziert).

Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass die Pflanzenwurzel als erstes Pflanzenorgan beginnenden Trockenstress durch Abnahme ihres Gewebewasserpotenzials „registrieren“ und dementsprechend ABA synthetisieren. Das Phytohormon gelangt dann über die Langstreckenleitungsbahnen des Xylems an die apoplastische Seite der Stomata. Eine Korrelation zwischen Bodenwasserpotenzial und Stomatakontrolle konnte von Davies und Zhang (1991) gezeigt werden.

Der Stomataschluss im Blatt folgt also einem Hormonsignal, das in den Wurzeln entsteht. Dies erfordert einen schnellen und effektiven Transport des Phytohormons vom Produktions- (Wurzel) zum Wirkort (Stomata im Blatt).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine gesicherten Ergebnisse über Wege und Mechanismen des ABA-Transportes in Wurzeln vor.

#### **4.1.2 Experimenteller Ansatz**

Wasser- und ABA-Flüsse durch die Wurzeln von Versuchspflanzen wurden durch Unterdruck erzeugt, der auf Schnittflächen des Meso- bzw. Hypokotyls dekapitierter Mais- bzw. Sonnenblumenpflanzen angelegt wurde (vgl. 2.6.2). Dieser subatmosphärische Druck erzeugte, ähnlich wie der Transpirationssog, einen radialen Wasser- ( $J_{Vr}$ ) und ABA-Fluss ( $J_{ABA}$ ) durch die Wurzel in das Xylem.  $J_{Vr}$ ,  $J_{ABA}$  und auch die ABA-Konzentrationen im Xylem ( $c_X^{ABA}$ ) änderten sich mit der Stärke des

---

Vorbedingungen für die Ermittlung von  $J_{Vr}$  und  $J_{ABA}$  in den Experimenten der vorliegenden Arbeit waren Wasser- und Abscisinsäureflüsse im stationären Bereich. Es dauerte zwischen 10 min und 40 min bis sowohl Wasser- als auch ABA-Flüsse im Gleichgewicht (steady-state-Bedingungen) waren. Durch  $J_{Vr}$  und  $J_{ABA}$  bei bestimmten subatmosphärischen Drücken konnten dann die hydraulische Leitfähigkeit des Wurzelsystems ( $L_{pr}$ ) und der Reflexionskoeffizient der Wurzel für ABA ( $\sigma_{ABA}$ ) berechnet werden (3.5.2 und 2.6.2).  $L_{pr}$  und  $\sigma_{ABA}$  werden als Durchschnittswerte für ganze Wurzelsysteme angegeben, obwohl bekannt ist, dass sich Transportkoeffizienten und -flüsse im Verlauf der Wurzelentwicklung ändern (Melchior und Steudle 1993, Frensch et al. 1996).

In den verwendeten Wurzelsystemen war in den basalen Wurzelteilen das späte Metaxylem bereits entwickelt. In den älteren Wurzelteilen bildeten sich der Caspary'sche Streifen in der Endodermis und auch in der Hypodermis (3.1.2). Eine Suberinlamelle lagerte sich um diese herum. Die äußersten Wurzelspitzen enthielten noch kein entwickeltes Metaxylem und waren deshalb hydraulisch vom Rest der Wurzel isoliert (Steudle 1994b). Diese anatomischen Veränderungen der Wurzel sollten zu Veränderungen des Wasser- und Stofftransportes durch die Versuchswurzeln führen. Jedoch waren diese Komplikationen für die Experimente der vorliegenden Arbeit nicht entscheidend, da die hydraulischen Leitfähigkeiten der verwendeten Maiswurzeln (Durchschnitts- $L_{pr} = 1 - 5 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ) denen individueller Wurzeln ähnlich waren (Steudle und Frensch 1989, Zhu und Steudle 1991, Zimmermann und Steudle 1998).

Über die hydraulische Leitfähigkeit von *Helianthus annuus* Wurzeln gibt es noch keine Daten in der Literatur. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte ein  $L_{pr}$  von  $6.6 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$  abgeschätzt werden. Die hydraulische Leitfähigkeit der Sonnenblume liegt somit eine Größenordnung unter der von Maiswurzeln und entspricht in etwa den von Steudle und Brinckmann (1989) an *Phaseolus coccineus* gemessenen Daten.

Um  $\sigma_{ABA}$  von Mais- und Sonnenblumenwurzeln zu berechnen, wurde  $J_{ABA}$  nur aus der „Solvent-drag“-Komponente identifiziert (2.6.2). Die aktive ABA-Aufnahme ( $J^*_{ABA}$ ) und ihre passive Diffusion durch den Wurzelzylinder [ $P_S^{ABA} \cdot (c_X^{ABA} - c_0^{ABA})$ ] wurden vernachlässigt. Um ABA-Permeabilitätskoeffizienten ( $P_S^{ABA}$ ) eines intakten

---

ohne einen Wasserfluss extrapoliert (Gleichung 5). Die erhaltenen Daten deuteten einen um einige Größenordnungen kleineren  $P_S^{ABA}$  an, als er von Fiscus (1982b) für *Phaseolus vulgaris* Wurzeln bestimmt wurde. Der Beitrag der diffusiven Komponente für  $J_{ABA}$  sollte deshalb bei den verwendeten, geringen ABA-Konzentrationen (1 nM bis 500 nM) vernachlässigbar klein sein. Die Komponente der aktiven Aufnahme  $J_{ABA}^*$  kann in Gegenwart von hydrostatischen Druckgradienten und hohen Wasserflussraten ebenfalls vernachlässigt werden. Wurden extrem niedrige ABA-Konzentrationen extern appliziert ( $c_0^{ABA} \leq 10$  nM ABA) ergaben sich sehr niedrige oder sogar negative Reflexionskoeffizienten (3.2.1.3.1). Dies entstand durch die endogene ABA-Produktion, die auch bei ungestressten Pflanzen ein  $c_X^{ABA}$  von 1 nM bis 10 nM ABA erzeugte. Wurden höhere, externe ABA-Konzentrationen benutzt ( $c_0^{ABA} \geq 20$  nM ABA), war dieser Fehler vernachlässigbar.

Ein carrier-vermittelter ABA-Transport tritt nur in den äußersten Wurzelspitzen der Versuchspflanzen auf und konnte bereits in der Wurzelhaarzone nicht mehr detektiert werden (Hartung und Dierich 1983, Astle und Rubery 1983, Milborrow und Rubery 1985, Fleming et al. 1991).

#### **4.1.3 Der ABA-Transportweg: symplastisch versus apoplastisch**

Im Spross wird ABA unter Stressbedingungen (Salinität des Bodens, Trockenheit, Nährstoffmangel (P) oder Ammoniumernährung) hauptsächlich im Xylem von den Wurzeln zu den Blättern transportiert (Hartung und Jeschke 1999, Jeschke et al. 1997a und b, Peuke et al. 1994, Kefu et al. 1991). Diese rezirkuliert wiederum aus den Blättern via Phloem in die Wurzeln, wo das Xylem erneut beladen wird (Hartung und Jeschke 1999). ABA-Konzentrationen im Xylemsaft trockengestresster Sonnenblumenwurzeln können 100 bis zu 125 nM ABA betragen (Gowing et al. 1993, Masia et al. 1994).

Der Biosyntheseort von ABA in Wurzeln ist im Cytosol der Mesophyllzellen aus Cortex und Stele (Hartung et al. 1999) lokalisiert. Gesicherte Erkenntnisse, wie Abscisinsäure aus dem Wurzelgewebe in das Xylem transportiert wird, lagen zu Beginn der vorliegenden Experimente nicht vor.

Im Wurzelgewebe wurde für ABA (Slovik et al. 1995, Daeter et al. 1993) wie auch für

---

Malinowski 1995) und Nährsalze (Anderson 1975 und 1976) ein rein symplastischer Transport postuliert.

ABA ist eine schwache Säure ( $pK_a = 4.8$ ). Je nach pH-Wert des umgebenden Mediums stellt sich nach Henderson-Hasselbalch ein anderes Gleichgewicht zwischen der ungeladenen, protonierten Säure (ABAH) und dem Anion ( $ABA^-$ ) ein. ABAH kann durch Zellmembranen diffundieren,  $ABA^-$  dagegen ist nahezu membranimpermeabel (Jovanovic et al. 1992, Gratzner 1993, Daeter et al. 1993, Daeter 1994, Kaiser und Hartung 1981). Unter regulären physiologischen Bedingungen liegt in den verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle immer ein Teil der Gesamt-ABA protoniert vor (Apoplast: pH-Wert 5.1 bis 6, Daeter et al. 1993, Felle 1998, 6-33% der Gesamt-ABA als freie Säure; Cytosol: 7.0 bis 7.25, Daeter et al. 1993, <1% der Gesamt-ABA als freie Säure; Vakuole: 6.25- 6.30, Daeter et al. 1993, 3% der Gesamt-ABA als freie Säure). Diese kann sich diffusiv über die Plasmamembran verteilen und wird im Kompartiment mit dem höchsten pH-Wert „gefangen“ („Anionenfallenmechanismus“, Hartung und Slovik 1991, Slovik et al. 1995). Unter Annahme eines rein symplastischen Transportes könnte die Beladung des Wurzelxylems aus den Wurzelzellen nur mittels Diffusion der freien Säure über die Plasmamembran der Wurzelparenchymzellen erfolgen.

Ein carrier-vermittelter, aktiver ABA-Transport aus dem Cytosol in die Xylemgefäße erscheint unwahrscheinlich. In Wurzeln von *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Phaseolus vulgaris* und *Pisum sativum* konnte ein ABA-Carrier nur in den ersten 4 mm der Wurzelspitze (Wurzelspitze und Verlängerungszone) nachgewiesen werden. (Hartung und Dierich 1983, Astle und Rubery 1983, Milborrow und Rubery 1985, Fleming et al. 1991). Diese Carrier besitzen ein extrem niedriges pH-Optimum (pH=3-4) und ihre kinetischen Parameter korrelieren nicht mit physiologischen, endogenen ABA-Konzentrationen (Fleming et al. 1991). Die vorhandenen Carrier dienen weiterhin nur der Aufnahme von ABA in das Cytosol. Ein Efflux-Carrier zur Beladung des Apoplasten mit ABA konnte im Gegensatz zum IAA-Transport nicht nachgewiesen werden (Astle und Rubery 1983). In älteren Wurzelregionen wurde kein carrier-vermittelter ABA-Transport gefunden.

Eine Beladung des Wurzelxylems durch Diffusion der protonierten ABA-Moleküle aus der Gleichgewichtseinstellung im Cytosol hätte bei einer Verstärkung des Transpirationsstromes eine Verdünnung der apoplastischen ABA-Konzentrationen

---

Computermodell zur Simulation des ABA-Longstreckentransportes in intakten Pflanzen von Slovik et al. (1995) für symplastischen ABA-Transport erhalten. Die ABA-Abgabe vom Symplasten der Xylemparenchymzellen in das Lumen der Xylemgefäße war hierbei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Daher erzeugte ein verstärkter Wasserfluss durch die Wurzel (wie er nach erhöhter Transpiration auftritt) eine Reduktion der Xylem-ABA-Konzentration ( $c_X^{ABA}$ ). Diese führte zu starken Schwankungen der ABA-Konzentration im Xylem und somit auch im Schließzellenapoplasten (Slovik et al. 1995).

Steudle (1994a und 1994b) postulierte jedoch, dass gelöste Teilchen durch die Wurzel eventuell mit dem Wasser durch „Solvent-drag“ radial über einen apoplastischen Bypass direkt in die Xylemgefäße mitgenommen werden könnten. White et al. (2000) berichtet sogar bei Calcium-Ionen von einem solchen Bypass in *Arabidopsis*-Wurzeln.

Die Menge an ABA, die zusätzlich zum symplastischen Transport apoplastisch in das Xylem transportiert wird, hängt vom Wurzelreflexionskoeffizienten, der apoplastischen ABA-Konzentration, der Wasserflussrate, dem pH-Gradienten über dem Wurzelrindenplasmalemma und von den untersuchten Pflanzenspezies ab.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Pflanzenarten untersucht, um die apoplastische Komponente des Gesamt-ABA-Transportes zu bestimmen:

Die monokotyle Poaceae *Zea mays* L. und die dikotyle Asteraceae *Helianthus annuus* L..

Bereits bei Aufnahmeexperimenten zeigte sich, dass die Wurzelgewebe der beiden Arten ABA auf verschiedene Weisen transportierten (3.2.1.2.2). ABA-Gabe zum Medium führte bei *Zea mays* zu einer Erhöhung des radialen Wasserflusses mit einer gleichzeitigen Steigerung der internen Xylem-ABA-Konzentration  $c_X^{ABA}$ . Bei Sonnenblume steigerte sich  $c_X^{ABA}$  nicht.

Ein Vergleich der Reflexionskoeffizienten  $\sigma_{ABA}$  der beiden untersuchten Arten unter gleichen Versuchsbedingungen (3.2.1.3.1) zeigte, dass  $\sigma_{ABA}$  der Sonnenblumenwurzeln immer größer war als  $\sigma_{ABA}$  der Maiswurzeln. Wurden 100 nM bis 500 nM ABA ins externe Medium gegeben, so dass intern ein ABA-Signal entstand, welches auch durch Erhöhung des endogenen Wurzel-ABA-Gehaltes durch Stress entstehen könnte (3.2.1.3.3), so erhielt man für *H. annuus*  $\sigma_{ABA}$ -Werte

---

zeigten unter denselben Versuchsbedingungen wesentlich niedrigere  $\sigma_{ABA}$ -Werte (0.54 – 0.83; subatmosphärischer Druck: -0.06 MPa) als Sonnenblumenwurzeln. Für beide Arten lagen die Reflexionskoeffizienten noch unterhalb von 1, so dass ein apoplastischer Bypass nicht ausgeschlossen werden konnte (Steudle 1994a und 1994b).

Diese unterschiedlichen Transportraten der Versuchspflanzen konnten nicht durch eine erhöhte ABA-Metabolisierungsrate des Sonnenblumenwurzeltgewebes erklärt werden (3.3). So lag die Vermutung nahe, dass die Ursache für die reduzierte ABA-Aufnahme ins Xylem eine erniedrigte Permeabilität des Wurzelapoplasten von *Helianthus annuus* war.

Ist der apoplastische Transportweg erschwert, so sollte der ABA-Transport durch die Sonnenblumenwurzel verstärkt symplastisch erfolgen.

Steudle und Brinckmann (1989) postulierten für die dikotyle Pflanze *Phaseolus coccineus* L. einen verstärkten symplastischen Wassertransport im Vergleich zum apoplastischen. Die hydraulische Leitfähigkeit einzelner Wurzelcortexzellen von *P. coccineus* war zwei Größenordnungen höher als die intakter Wurzelsysteme. Mit diesem dominierenden „cell-to-cell“ Transportweg der Bohne erklärten die Autoren erhöhte Wurzelreflexionskoeffizienten von *P. coccineus*.

Eine genaue Berechnung der symplastischen und der apoplastischen Komponente am Gesamt-ABA-Transport ist experimentell nicht möglich, da Abscisinsäure auf Grund ihrer Moleküleigenschaften immer auf beiden Wegen durch die Wurzel transportiert wird.

Dieses „Problem“ konnte durch Verwendung von [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Methylglucopyranose für Transportexperimente gelöst werden (3.2.2.1).  $\alpha$ -Methylglucopyranose wird von der Pflanze weder produziert noch metabolisiert. Eine aktive Aufnahme des Zuckers in Wurzelzellen von *Zea mays* L. findet nicht statt (Fleischer und Ehwald 1995). Die Hydrophilie von  $\alpha$ -Methylglucopyranose ist im Bereich der physiologischen, apoplastischen pH-Werte (5.1 bis 6; Felle 1998, Daeter et al. 1993) wesentlich größer als die der ABA. Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von  $\alpha$ -Methylglucopyranose zwischen Oktanol und einer wässrigen Phase ergab, dass sich nahezu 100% des Zuckers im hydrophilen Medium befand. ABA löste sich in diesem pH-Bereich ebenso gut in Oktanol wie in Wasser ( $K_r = \pm 1$ ) (3.4).

Ein apoplastischer Transport des gelösten Zuckers (inklusive Hydrathülle) im

---

Wasserfluss erscheint unwahrscheinlich. Im Gegensatz zur ABA kann sich  $\alpha$ -Methylglucopyranose nicht in lipophilen Zellwandbestandteilen „lösen“. Der hydrophile Zucker sollte von der Endodermis ausgefiltert und nur durch Diffusion in den Symplasten und von dort, ebenfalls diffusiv, in das Xylem gelangen. Es liegt ein rein symplastischer Transport vor.

Für Transportexperimente mit *Zea mays* lagen die Werte von  $\sigma_{\alpha\text{-Methylglucopyranose}}$  signifikant über den Werten von  $\sigma_{\text{ABA}}$  und entsprachen den gemessenen Reflexionskoeffizienten  $\sigma_{\alpha\text{-Methylglucopyranose}}$  und  $\sigma_{\text{ABA}}$  der Sonnenblume. Es bestätigte sich die Vermutung, dass Transportprozesse durch Wurzeln von *H. annuus* zu einem signifikanten Anteil symplastisch ablaufen, während in Maiswurzeln beim ABA-Transport ein apoplastischer Beitrag zu finden ist. Das Zuckersignal verdünnte sich ( $\sigma_{\alpha\text{-Methylglucopyranose}}$  stieg an) nach einer Verstärkung des Wasserflusses durch die Wurzel (Erhöhung des subatmosphärischen Druckes) sowohl bei den Messungen mit Sonnenblume als auch von Mais. Dieser Verdünnungseffekt wird für einen symplastischen Stoff-Transport postuliert (Anderson 1975 und 1976, Slovik et al. 1995).

Für ABA konnte eine solche typische Verdünnung des Hormon-Signals nur bei Sonnenblumenwurzeln und geringen externen ABA-Konzentrationen (5 nM ABA) beobachtet werden (3.2.1.3.1). Bei gesteigerten ABA-Mengen im Medium (100 nM und 500 nM ABA) fand keine Verdünnung statt. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass auch bei Sonnenblumenwurzeln ein kleiner apoplastischer Beitrag zum Gesamt-ABA-Transport geleistet wird.

Verschiedene Autoren haben PTS (Trisodium-3-Hydroxy-5,8,10-Pyrentrisulfonat) als Tracer für den apoplastischen Wasserfluss benutzt. Sie nahmen dabei an, dass dieser Stoff in den Zellwänden so beweglich ist wie Wasser (Hanson et al. 1985, Moon et al. 1986, Skinner und Radin 1994).

Zimmermann und Steudle (1998) zeigten jedoch, dass PTS nicht als Tracer für den apoplastischen Wasserfluss angesehen werden kann. PTS-Flüsse waren während Druck-Perfusionsexperimenten (Druckgradienten: 0 bis 0.4 MPa) bei unterschiedlichen Arten sehr niedrig. Nur 0.01% bis 0.6% der extern applizierten PTS wurde im Xylemsaft wiedergefunden. Übereinstimmende Ergebnisse finden sich bei Gloy (1995), die PTS bei Sonnenblume und Mais anwandte.

Unterschiede zum ABA Transport werden zum einen durch die Tatsache erklärt,

---

von ABA (264 Da). Zusätzlich besitzt PTS drei Sulfonsäuregruppen, die bei physiologischem pH-Wert dissoziiert sind. PTS, ein großes und polares Anion, muss im Zellwandgeflecht, das ebenfalls negative Ladungen trägt, auf einen größeren Widerstand stossen als das sehr kleine, ungeladene Molekül Wasser (18 Da) und die kleine, im undissoziierten Zustand lipophile ABA.

#### 4.1.4 Der Verdünnungseffekt

Die Beobachtung, dass eine ABA-Aufnahme aus dem Wurzelmedium mit dem „Solvent-drag“ des Wassers eventuell eine Verdünnung der ABA im Xylem durch gesteigerten Wasserfluss kompensieren kann, steht im Widerspruch zu den Vermutungen von Jackson et al. (1996) und Else et al. (1994, 1995). Diese Autoren postulierten für den ABA-Transport einen Verdünnungseffekt im Xylem, wie er bei einem rein symplastischen Hormontransport und sich verändernden Wasserflussraten zu erwarten ist.

Für Nährelemente wurde wiederholt gezeigt, dass Wasser- und Teilchenflüsse nahezu ungekoppelt ablaufen (Anderson 1975 und 1976, Miller 1985). Dies hat eine Verdünnung der Nährstoffkonzentration im Xylem nach Erhöhung des Wasserflusses zur Folge. Mit der Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit zur Gewinnung von Xylemsäften mittels Unterdruck konnte dies bestätigt werden (2.6.2).

Radialer ABA-Transport durch Wurzeln unterscheidet sich also von dem der Nährsalze.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach einer Erhöhung von  $J_{Vr} c_X^{ABA}$  niemals verdünnt (3.2.1.3.1). In Mais erhöhte sich  $c_X^{ABA}$  sogar mit steigendem radialen Wasserfluss. Aus den Unterschieden zwischen Mais und Sonnenblume ergab sich wiederum die Vermutung, dass die Barriere für die ABA-Permeation in Sonnenblumenwurzeln effektiver ist als die in Maiswurzeln. Folglich war die „passive Selektivität“, ausgedrückt durch  $\sigma_{ABA}$ , bei *H. annuus* größer als bei *Z. mays*. Dieser Konsequenz folgend, werden mehr ABA-Moleküle bei ihrem radialen, wasserflussgekoppelten Transport durch den Wurzelzylinder von der Barriere der Sonnenblumenwurzel zurückgehalten als von der in Maiswurzeln.

---

#### 4.1.5 Der Reflexionskoeffizient $\sigma_{ABA}$

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, ein substanzieller „Solvent-drag“ von ABA in Wurzeln, wird von Fiscus (1982b) und Markhart (1982), die ABA-Transportkoeffizienten in Bohnenwurzelsystemen untersucht haben, bestätigt. Die Autoren legten Druck auf ein Wurzelsystem in Nährlösung mit ABA-Konzentrationen im mikromolaren Bereich an. Sie fanden einen ABA-Permeabilitätskoeffizienten von  $3.5 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$  und ein  $\sigma_{ABA}$ , das nahe an 1 lag. Diese letzten Angaben ähneln den Ergebnissen für *H. annuus* der vorliegenden Arbeit, widersprechen aber denen von Mais. Hier lag  $\sigma_{ABA}$  deutlich unter 1. Die Transportkoeffizienten von Fiscus (1982b) und Markhart (1982) wurden in Gegenwart von hohen externen ABA-Konzentrationen gemessen, die 2 – 3 Größenordnungen über denen dieser Arbeit lagen. Weiterhin wurden von den oben genannten Autoren hohe Drücke auf das Wurzelsystem gelegt und damit große Volumenflüsse untersucht. Diese sollten grosse ABA-Konzentrationen im Wurzelapoplasten aufbauen. Tatsächlich war die ABA-Flussdichte, trotz des hohen Reflexionskoeffizienten, in den Experimenten von Fiscus (1982b) und Markhart (1982) um mehr als drei Größenordnungen höher als die in den vorliegenden Experimenten gemessenen. Da  $J_{ABA}$  mit erhöhtem Wasserfluss anstieg, favorisierten oben genannte Autoren die Idee, dass ABA mit dem Transpirationsstrom ins Xylem gelangt, obwohl sie wegen des großen Reflexionskoeffizienten ( $\sigma_{ABA} \approx 1$ ) und der hohen ABA-Konzentrationen einen diffusiven Beitrag zum Gesamt-ABA-Transport nicht ausschließen konnten. Auf Grund der hohen Wasserflussraten und der hohen extern applizierten ABA-Konzentrationen fanden sie aber dennoch einen Verdünnungseffekt der unphysiologisch hohen ABA-Flüsse.

Wan und Zwiazek (2000) konnten kürzlich die Theorie eines apoplastischen Bypasses und des Transportes von ABA mit dem Wasserstrom bei *Populus tremuloides* bestätigen.

Für junge Wurzeln, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurde die Endodermis (Steudle et al. 1993, Peterson und Steudle 1993) oder eine Exodermis (Cruz et al. 1992, Stasovsky und Peterson 1993, North und Nobel 1995, 1993, 1991, Zimmermann und Steudle 1998, Zimmermann et al. 2000) als Hauptpermeationsbarrieren der Wurzel diskutiert. Diese Gewebe enthalten ein Caspary'sches Band aus Suberin in den transversen und radialen

Die Tatsache, dass die Verhältnisse von  $J_{ABA}$  bei hohem subatmosphärischen Druck ( $J_{ABA}$  (-0.06 MPa)) im Vergleich zu niedrigem subatmosphärischen Druck ( $J_{ABA}$  (-0.02 MPa)) (3.2.1.3.1) immer größer waren als  $J_{Vr}$  (-0.06 MPa)/  $J_{Vr}$  (-0.02 MPa) widerspricht nicht der oben genannten These, dass Caspary'sche Streifen im Wurzelapoplasten eine effektive Barriere sind. Eine signifikante Barriere für apoplastischen Bypass-Fluss sollte ABA vor oder in ihr erhöhen.  $J_{ABA}$  sollte sich dann bei gesteigertem Wasserfluss verstärkt erhöhen.

Trifft diese Konzentrations-Polarisation vor der Barriere zu, so ist  $(c_X^{ABA} + c_0^{ABA})/2$  als Abschätzung der ABA-Konzentration innerhalb der Barriere nicht zutreffend (Gleichung 6). Diese würde unter den oben dargelegten Bedingungen die realen Verhältnisse in der Permeationsbarriere unterschätzen. Wenn aber die ABA-Konzentrationen in der Barriere unterschätzt wurden, so sollte das reale  $\sigma_{ABA}$  größer sein als das aus  $c_X^{ABA}$ ,  $c_0^{ABA}$ ,  $J_{Vr}$  und  $J_{ABA}$  abgeschätzte. Dies bedeutet, dass die hier angegebenen Werte der Wurzelreflexionskoeffizienten eine untere Grenze beschreiben. Hinzu kommt die Tatsache, dass ein Fluss endogener ABA in das Xylem ( $J_{ABA}^*$ ) die Berechnung von  $\sigma_{ABA}$  und dessen Interpretation, speziell bei niedrigen, extern applizierten ABA-Konzentrationen erschwert. Die Ergebnisse zeigen, dass externe Konzentrationen von 20 bis 50 nM ABA für den „Solvent-drag“ nötig sind, um den Effekt von  $J_{ABA}^*$  zu kompensieren. In dem Fall, dass  $J_{ABA}^*$  nicht vernachlässigt werden kann, errechnet sich der Gesamt-ABA-Fluss aus

$$J_{ABA} = J_{Vr} \cdot c_X^{ABA} = (1 - \sigma_{ABA}) \cdot 0.5 (c_X^{ABA} + c_0^{ABA}) J_{Vr} + J_{ABA}^* \quad (\text{Gleichung 15})$$

Die Lösung dieses Gleichungssystems nach  $\sigma_{ABA}$  lautet demnach:

$$\sigma_{ABA} = 1 - \frac{2c_X^{ABA}}{c_X^{ABA} + c_0^{ABA}} \cdot \left(1 - \frac{J_{ABA}^*}{J_{ABA}}\right), \quad (\text{Gleichung 16})$$

wobei  $J_{ABA} > J_{ABA}^*$ . Gleichung 15 unterscheidet sich von Gleichung 16 im letzten Term auf der rechten Seite. Wenn dieser exakt bekannt wäre, könnte dieser Term zur Korrektur des endogenen ABA-Flusses verwendet werden. Gleichung 16 zeigt, dass diese Korrektur ebenfalls  $\sigma_{ABA}$  erhöhen würde. Auf der anderen Seite reduziert sich, wenn  $J_{ABA}^* = 0$  oder vernachlässigbar klein im Vergleich zum „Solvent-drag“ ist,

---

$$\sigma_{ABA} = 1 - \frac{2c_X^{ABA}}{c_X^{ABA} + c_0^{ABA}} \quad (\text{Gleichung 17})$$

die zur Berechnung der Reflexionskoeffizienten verwendet wurde (Gleichung 6).

Diese Effekte sollten aber auch nicht überschätzt werden. Die erhaltenen  $\sigma_{ABA}$ -Werte sind nur etwas niedriger als Reflexionskoeffizienten, die für Salze und weitere polare Substanzen bei Mais und anderen Pflanzenarten mit der Wurzeldrucksonde gemessen wurden (z.B. Steudle und Frensch 1989, Steudle 1994b). Diese Messungen wurden in Abwesenheit eines Wasserflusses gemacht und sind daher frei von Konzentrations-Polarisations- oder „sweep-away“-Effekten (Dainty 1963). Auswirkungen ungerührter Schichten bei der Diffusion wurden in Erwägung gezogen (Steudle und Frensch 1989).

Aus allen diesen Überlegungen heraus sollten, zumindest für Mais, die absoluten  $\sigma_{ABA}$ -Werte kleiner als 1 sein.

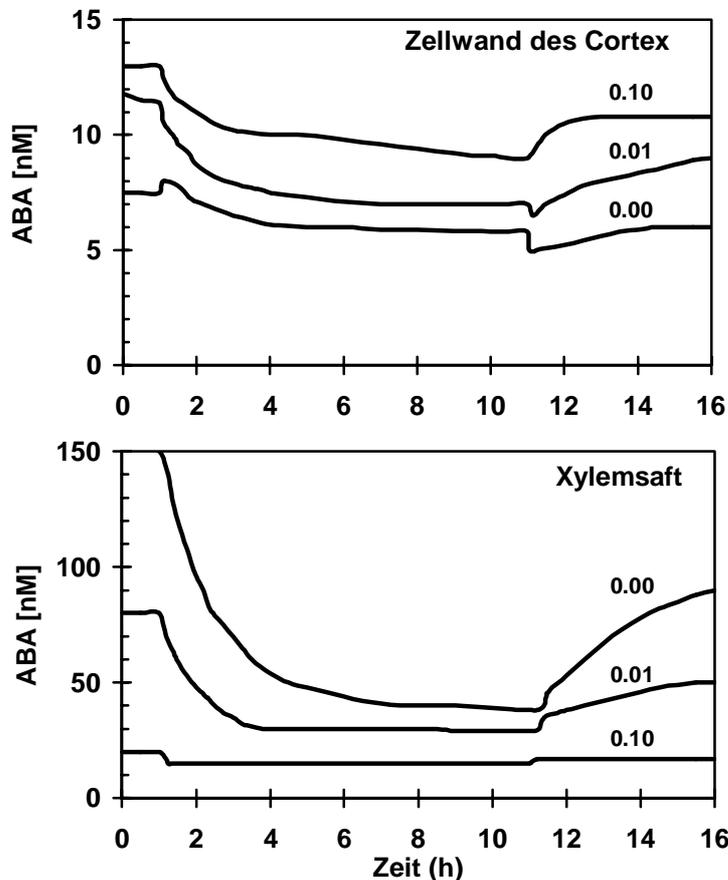
Allerdings sind die substanziellen Veränderungen von  $\sigma_{ABA}$  für unterschiedliche  $c_X^{ABA}$  (3.2.1.3.1) nicht ganz klar. Dies zeigt, dass Wurzelreflexionskoeffizienten, die in Gegenwart von Volumenflüssen gemessen wurden, mit Vorsicht diskutiert werden müssen.

Der einzige Weg, diese Schwierigkeiten zu umgehen, ist die Messung von Reflexionskoeffizienten in Abwesenheit eines Wasserflusses, z.B. mit einer Wurzeldrucksonde (Steudle 1993, Steudle und Peterson 1998). Bei dieser Methode werden jedoch Konzentrationen des Osmotikums im Millimolarbereich benötigt. Dies ist für Abscisinsäure nicht anwendbar.

#### **4.1.6 Modellierung des ABA-Transportweges**

Die Vorstellung, dass trotz hoher apparenter Reflexionskoeffizienten  $\sigma_{ABA}$  beträchtliche Mengen an ABA apoplastisch durch die Wurzel in die Xylemgefäße transportiert werden, um dort die ABA-Konzentration bei veränderlichem Wasserfluss unverändert oder sogar ansteigen zu lassen, stimmt gut mit den Aussagen einer Computersimulation von Stefan Slovik überein. Nach dem mathematischen Modell einer Pflanze von Slovik et al. (1995) wurde  $c_X^{ABA}$  unter der Bedingung eines steigenden Transpirations-Wasserflusses und der Annahme eines rein

Bypasses von 1% in das Slovík'sche Modell verminderte die Verdünnung bereits signifikant. Ein 10%iger Bypass hielt die ABA-Konzentration im Xylem nach Steigerung der Transpiration konstant (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1** Computersimulation des zeitlichen Verlaufes der ABA-Konzentration in corticalen Zellwänden und Xylemsäften einer Modellwurzel. Nach 1h wurde der Transpirationsfluss verstärkt, nach 11h wieder reduziert. Die 3 Kurven zeigen ABA-Konzentrationsveränderungen bei rein symplastischem Transport (kein apoplastischer Bypass, 0.00) oder wenn entweder 1% (0.01) oder 10% (0.10) der Gesamt-ABA apoplastisch in die Xylemgefäße transportiert werden.

#### 4.1.7 Kapazität des apoplastischen Transportweges

Die Reflexionskoeffizienten  $\sigma_{ABA}$  wurden auf der einen Seite bei verstärktem Unterdruck (Wasserfluss  $J_{Vr}$ ) erniedrigt, stiegen aber auf der anderen Seite mit steigender externer ABA-Konzentration an. Dies bekräftigt die Vermutung, dass ein entscheidender Beitrag einer apoplastischen ABA-Transportkomponente auf  $J_{ABA}$  nur in Gegenwart physiologisch niedriger ABA-Konzentrationen stattfindet ( $c_0^{ABA} \leq 500$  nM ABA). Die Kapazität des Wurzelapoplasten und der Permeationsbarriere ist bei physiologischen ABA-Konzentrationen  $c_0^{ABA}$  ausreichend, um zu dem Gesamt-ABA-Transport  $J_{ABA}$  einen entscheidenden Beitrag zu leisten. Diese Kapazität erhöht sich nicht linear mit steigendem externen ABA-Angebot und kann gesättigt werden. Entscheidend sollte die Porenanzahl von Endo- und Exodermis sein, die groß genug ist, um ABA nicht aus dem Wasserstrom auszufiltern.

---

Gleichzeitig nimmt die diffusive Komponente bei hohen externen ABA-Konzentrationen zu. Eine Verdünnung des ABA-Signals im Xylem ist bei unphysiologisch hohen externen ABA-Konzentrationen und großen Wasserflüssen trotz einer, hier nicht mehr sichtbaren, apoplastischen ABA-Transportkomponente zu erwarten (Jackson et al. 1996, Else et al. 1994 und 1995, Fiscus 1982b, Markhart 1982:  $c_0^{ABA} = 10 \mu\text{M ABA}$ ;  $\Delta P = 0.3 \text{ MPa}$ ). Der apoplastische Beitrag zum Gesamt-ABA-Transport ist demnach limitiert.

Der Wurzelapoplast wird mit ABA zum einen aus der Rhizosphäre gespeist (Hartung et al. 1996, Sauter und Hartung 2000). Von dort gelangt das Phytohormon, wie auch in den vorliegenden Experimenten, mit dem Wasserfluss in die Zellwand. Zum anderen wird die Zellwand ständig aus dem Cytosol beladen. Hier wandert das protonierte ABA-Molekül über die Zellmembran in den Apoplasten. Da die ABA-Moleküle ständig mit dem Wasserstrom weggespült werden, erfolgt ein kontinuierliches Nachladen von ABA aus den Zellen. Unter Stressbedingungen produzieren die Wurzelzellen mehr ABA, so dass der ABA-Gehalt trockengestresster Wurzeln ansteigt (3.2.1.1). Die Frage, ob der apoplastische Wasserfluss aus der Gleichgewichtseinstellung zwischen Cytosol und Zellwand unter Stressbedingungen mit ausreichend ABA versorgt wird, konnte mittels Tet (3.2.1.3.3) geklärt werden. Tet hemmt den oxidativen Abbau der ABA in Mais- und Sonnenblumenwurzeln (3.3) und anderen Pflanzenarten und -teilen (Rademacher et al. 1987, Rademacher 1988, Daeter 1994). Inkubation in Tetcyclacis erhöhte die ABA-Konzentrationen der Versuchspflanzen auf ein Niveau, wie es unter Stresssituationen gefunden wird (Gowing et al. 1993, Masia et al. 1994). Ein verstärkter Wasserdurchfluss durch die Wurzeln verdünnte das ABA-Signal in den Versuchswurzeln nicht. Es war sogar ein Anstieg der Hormonkonzentration im Xylem zu verzeichnen. Diese Nachstellung einer Stresssituation mit erhöhten cytosolischen ABA-Gehalten zeigt, dass das Beladungssystem des Apoplasten unter physiologischen Bedingungen effektiv genug ist, um einen substanziellen apoplastischen Bypass zu gewährleisten.

#### **4.1.8 Einfluss des pH-Wertes**

Die Umverteilung und der Transport von Abscisinsäure ist in allen Teilen der Pflanze stark von dem pH-Gradienten zwischen den einzelnen Gewebekompartimenten

---

abhängig. Wie bereits vorher dargelegt, reichert sich ABA nach Henderson-Hasselbalch und dem „Anionenfallenprinzip“ in alkalischen Zellkompartimenten an. Hartung et al. 1988, Hartung und Slovik (1991), Slovik et al. (1992) und Slovik und Hartung (1992 a bis c) belegten für Blätter von *Valerianella locusta* eine schnelle Umverteilung von ABA aus dem Cytosol in den Blattapoplasten unter Stress. Dies geschah sowohl auf experimentellem Wege als auch mittels einer Computer-Modellierung. Trockenheit erhöht den apoplastischen pH-Wert (Baumwolle: Hartung et al. 1988) und senkt den cytoplasmatischen ab (Daeter und Hartung 1990, Hartung und Slovik 1991). Dieser verstärkte pH-Gradient bewirkt einen ABA-Ausstrom vom Symplasten in den Blattapoplasten (Slovik und Hartung 1992 a-c).

Von Daeter et al. (1993) wurde untersucht, ob diese Mechanismen auch bei der ABA-Kompartimentierung und -umverteilung in Wurzelsystemen zutreffen.

Sie belegten, dass das Wurzelgewebe verschiedener Versuchspflanzen (*Zea mays* und *Phaseolus coccineus*) nur schwach auf den Stressfaktor Trockenheit reagieren. Spickett et al. (1992 und 1993) zeigten dies auch unter Salinität und osmotischem Stress. Der cytosolische und vakuoläre pH-Wert stieg um 0.2 bis 0.3 pH-Einheiten. Übereinstimmende Ergebnisse finden sich bei Pfister-Sieber und Brändle (1994).

Ein schneller ABA-Umverteilungsmechanismus in der Pflanzenwurzel kann daher, auch wegen der wesentlich geringeren Permeabilitäten von Wurzelcortexplasmalemma und-tonoplast (Jovanovic et al. 1992, Daeter und Hartung 1990, Daeter et al. 1993, Daeter und Hartung 1993) im Vergleich zum Blatt, ausgeschlossen werden.

Hartung et al. (1998) sehen die stärksten Effekte auf die Umverteilung zwischen den Wurzelzellen und dem Apoplasten in der Veränderung rhizosphärischer pH-Werte. Je nach Bodentyp können Pflanzenwurzeln von einer Rhizosphäre mit pH-Werten von 3.0 bis 8.0 umgeben sein (Hartung et al. 1996, Sauter und Hartung 2000). In der Bodenlösung sind dabei ABA-Konzentrationen von 1 nM bis 10 nM nachzuweisen. Böden mit hohen Salzkonzentrationen (extreme Standorte wie z.B. Wüsten) haben meist sehr alkalische Böden (Hartung et al. 1990). Hier ist mit einer verminderten Hormon-Aufnahme zu rechnen, da nach dem „Anionenfallenprinzip“ ABA an die Bodenlösung abgegeben wird. Saure Böden hingegen sollten die ABA-Aufnahme nach diesem Prinzip verstärken. Sehr komplexe Verhältnisse liegen in Duplexböden vor (Turner et al. 1992). Ein Wurzelsystem wird hier in unterschiedlichen Bereichen

---

Felle (1998) zeigte mit der Mikroelektrodenteknik, dass sich der Maiswurzelapoplast in gepufferten Medien der pH-Werte 8 bis 5 um 0.5 pH-Einheiten ansäuerte. Liegt eine saure Rhizosphäre vor, steht in der Zellwand ein größerer Prozentsatz der Gesamt-ABA in der protonierten Form zur Verfügung. Der cytosolische pH-Wert bleibt nach einer Veränderung des Medien pH-Wertes aber nahezu unverändert (Gerendás und Ratcliffe 2000, Fox et al. 1990).

Eine saure Wurzelumgebung sollte demnach einen vorhandenen apoplastischen Bypass von ABA verstärken, da zum einen eine verstärkte Aufnahme aus der Bodenlösung zu erwarten ist, zum anderen auf Grund der unveränderten cytosolischen pH-Werte der Apoplast weiterhin mit ABA gespeist wird. In der angesäuerten Zellwand liegt mehr protonierte ABA vor, die mit dem Wasserstrom durch den Caspary'schen Streifen transportiert werden kann.

Wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit der Medien-pH-Wert von 5.5 auf den  $pK_a$  von Abscisinsäure (4.8) reduziert, so reduzierte sich auch der apparente Reflexionskoeffizient  $\sigma_{ABA}$  für Mais und Sonnenblume signifikant (3.2.1.3.2). Dies bestätigte oben vorgestellte Überlegungen. Wurde der Wasserfluss durch die Versuchswurzeln verstärkt, so verstärkte sich das ABA-Signal. Ein starker apoplastischer Bypass war sichtbar.

Eine Alkalisierung der Nährlösung auf einen pH-Wert von 8 erhöhte erwartungsgemäß  $\sigma_{ABA}$  für Mais. Die apoplastischen Wurzelbarrieren sind gegenüber dem ABA-Anion effektiver. Es muss allerdings auch unter diesen Bedingungen ein geringer apoplastischer ABA-Bypass vorhanden sein, da keine Verdünnung des Hormonsignals Steigerung von  $J_{Vr}$  auftrat. Bei Sonnenblumenwurzeln änderte sich  $\sigma_{ABA}$  bei einem pH-Wert von 8 nicht im Vergleich zu 5.5. Die Kapazität des Apoplasten von *H. annuus* für ABA war bereits bei einem pH-Wert von 5.5 erreicht. Erst eine drastische Erhöhung der protonierten ABA-Moleküle (pH=4.8) führte zur einer Transportverstärkung.

Dieses Ergebniss passt somit zu der These, dass der ABA-Transport in Sonnenblumenwurzeln unter physiologischen Bedingungen zu einem großen Teil symplastisch abläuft und der apoplastische Weg wenig genutzt werden kann.

Signifikante pH-Wert-Verschiebungen in der Rhizosphäre ergeben sich auch durch veränderte Stickstoff (N)-Quellen der Pflanze. Liegt als einzige N-Quelle Ammonium vor, so sinkt der pH-Wert der Rhizosphäre ab (1.7 pH-Einheiten: diese Arbeit, 1 bis 2

---

Wurzelgewebe steigt gleichzeitig sowohl der cytosolische als auch der vakuoläre pH-Wert an (Roberts et al. 1982, Fox et al. 1990, Müller et al. 1990, Gerendás und Ratcliffe 2000).

Ammoniumernährung sollte zum einen zu einer verstärkten ABA-Aufnahme aus der Rhizosphäre führen (saurer Boden-pH-Wert). Zum anderen sollte wegen des verstärkten pH-Gradienten zwischen Symplast und Apoplast die aufgenommene ABA verstärkt in das Cytosol gelangen. Der verstärkte symplastische ABA-Transport würde dann zu erhöhten ABA-Konzentrationen im Xylem führen. Dieses Hormonsignal sollte aber bei sich verstärkendem Wasserfluss verdünnt werden, da die apoplastische Transportkomponente unter diesen experimentellen Bedingungen am Gesamt-ABA-Transport nur einen geringen Anteil hat.

Tatsächlich konnte dies mit Ergebnissen dieser Arbeit belegt werden. Maiswurzelgewebe nahm ABA bei einer externen Konzentration von 100 nM so stark auf, dass der apparente Reflexionskoeffizient negativ war ( $c_x^{ABA} > c_0^{ABA}$ ). Die Xylem-ABA-Konzentration lag über 100 nM. Gleichzeitig verdünnte sich das Hormonsignal bei verstärktem Unterdruck (3.2.1.3.2).

Auch Peuke et al. (1994) fanden bei ammoniumernährten Rhizinuspflanzen eine um den Faktor 8 verstärkte Akkumulation von ABA in der Wurzel im Vergleich zu nitraternährtem *R. communis*. In den Blättern war ABA nur um den Faktor 2 erhöht. Spross und Petiolen zeigten keinen Unterschied hinsichtlich des ABA-Gehaltes. Die Xylemsaft ABA-Konzentration verfünffachte sich unter Ammoniumernährung.

---

## 4.2 Einfluss apoplastischer Barrieren auf den ABA-Longstrecken-transport

### 4.2.1 Apoplastische Barrieren

Die Zellwand von Pflanzenwurzeln wird im Bereich des Cortex von zwei apoplastischen Barrieren begrenzt. Zum ersten mal wurden solche Strukturen von Caspary (1866) als „dunkle Punkte“ in Wurzelquerschnitten beschrieben. Fortan bezeichnete man diese Strukturen als „Caspary'sche Bänder“. Die innere Abgrenzung zur Stele hin, die Endodermis, wird von allen Gefäßpflanzen ausgebildet (Peterson 1992). Die äußere Begrenzung, ein spezialisierter Typ der Hypodermis, wird in der, der Rhizodermis folgenden Zelllage gebildet. Beide enthalten nach Guttenberg (1968) ein Caspary'sches Band. Eine Hypodermis mit Caspary'schem Band wird in der vorliegenden Arbeit nach Peterson (1988) als *Exodermis* bezeichnet. Dieses Band ist Teil der Zellwand (Mittellamelle) und besteht aus Lignin und Suberin. Es füllt die intermicrofibrillären Räume des Zellwandnetzes, die normalerweise mit Wasser gefüllt sind (Peterson 1989).

Caspary'sche Bänder bilden sich in den transversen und radialen Longitudinalwänden und nicht in den Tangentialwänden von Endo- und Hypodermis. Das Caspary'sche Band ist dabei in der Endodermis auf einen Zellwandbereich beschränkt, während er in einer Exodermis meist die komplette, antiklinale Zellwand belegt (Peterson 1989). Es wird sowohl in Endo- als auch Exodermis je nach Pflanzenart und Geschwindigkeit des Wurzelwachstums bereits wenige mm über der Wurzelspitze gebildet (Wilcox 1962, Perumalla und Peterson 1986). Das exodermale Caspary'sche Band entwickelt sich dabei meist vor dem endodermalen (Enstone und Peterson 1992b).

Sowohl Exodermis als auch Endodermis können im Laufe der Wurzelentwicklung weitere Entwicklungsstufen erfahren. Die Ausbildung des Caspary'schen Bandes allein wird als Stadium I bezeichnet. Diesem kann die Auflagerung einer Suberinlamelle (Stadium II) und weiterer mit Suberin und Lignin inkrustierter Cellulose-Schichten (Stadium III) folgen (Clarkson und Robards 1975, Peterson 1989). Bereits im Stadium I, mit der Ausbildung des Caspary'schen Bandes, wird die

---

Nach Spicer (1989) hatte das Auftreten dieser Struktur in nicht-verwandten Taxa ökologische und nicht phylogenetische Signifikanz.

Untersuchungen von Damus et al. (1997) und Brundrett et al. (1990) zeigten, dass niedrigere Gefäßpflanzen und Gymnospermen zwar eine Endodermis, aber keine Exodermis (mit Ausnahme einiger Arten der Familie der Selaginellaceen) besitzen. Von über 200 untersuchten Angiospermenarten (Wilson et al. 1983, Perumalla et al. 1990, Peterson und Perumalla 1990) bilden über 90% eine Exodermis aus. Die Versuchspflanzen dieser Arbeit, *Zea mays* und *Helianthus annuus*, besitzen nach diesen Studien eine einschichtige Exodermis.

#### **4.2.2 Caspary'sche Streifen und ABA**

Von verschiedenen Autoren wurde gezeigt, dass eine Stimulation der Endo- und/oder Exodermisbildung nach Trockenheit (Jupp und Neumann 1987, North und Nobel 1991, Cruz et al. 1992) oder niedrigen Temperaturen (Clarkson et al. 1987) beobachtet werden kann.

Bei Mais wird die Bildung einer Exodermis durch Exposition der Wurzel an feuchte Luft erreicht (Enstone und Peterson 1998, Zimmermann und Steudle 1998, Zimmermann et al. 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit reduzierte Hydrokultur die Suberinisierung, Luftkultur stimulierte diese (3.1.2 und 3.1.3.3).

Versuchs-Maispflanzen, die in Luftkultur angezogen wurden, enthielten sowohl in ihren Wurzeln als auch Blättern mehr ABA. Obwohl die ABA-Gehalte in diesen Wurzeln [ $5.3 \text{ pmol (g FG)}^{-1}$ ] typischen Gehalten ungestresster Maiswurzeln entsprachen (Zhang und Davies 1989), besteht dennoch die Möglichkeit, dass die signifikant erhöhten Blatt-ABA-Gehalte auf ein Wurzel-Spross-Signal mild trockengestresster Wurzeln zurückgeht (Zhang et al. 1987, Davies und Zhang 1991). Müller et al. 1989 belegten, dass ABA in Wurzeln Entwicklungsprozesse initiieren kann. Das Wurzel/Spross-Verhältnis nimmt bei mildem Trockenstress zu, es erfolgt eine Stimulation der Seitenwurzelbildung und verstärkte Wurzelhaarbildung (Trewavas und Jones 1991, Hofer 1996). Tatsächlich zeigten die untersuchten aeroponischen Maispflanzen diese ABA-induzierten, morphologischen Merkmale im Vergleich zu den Hydrokulturpflanzen (3.1.1.1), obwohl nur in den Blättern, nicht im

---

Ein weiterer ABA-Effekt ist die Stimulierung der Suberinisierung in pflanzlichen Geweben. Soliday et al. (1978) untersuchte die wundinduzierte Suberinisierung von Kartoffelscheiben und –gewebekulturen. ABA zeigte eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der Suberinformation bis zu einer Konzentration von  $10^{-4}$  M sowohl in Kartoffelscheiben als auch –gewebekulturen. Auxin dagegen brachte nur geringe Effekte. Zeier 1998 zeigte, dass sich in 10  $\mu$ M ABA kultivierten Maispflanzen das Gewicht von isolierten Endo- und Hypodermen im Vergleich zu Kontrollen verdoppelte. Gleichzeitig nahm der Suberingehalt, bezogen auf die Wurzellänge in der Exodermis, um den Faktor 2.5 zu. Das Stresshormon ABA kann also bei Wassermangel eine gesteigerte Suberinisierung auslösen, die als Langzeiteffekt den Wasserverlust der Wurzel an die Rhizosphäre verringert. Chandler und Robertson (1994) zeigen in ihrer Arbeit Anhaltspunkte, dass es sich bei den Genen der Suberinbiosynthese möglicherweise um ABA-regulierte Gene handelt.

Die signifikanten morphologischen und anatomischen Veränderungen von aeroponischen Maiswurzeln im Vergleich zu in Hydrokultur angezogenen könnten demnach ABA induziert sein. Die Wurzelanatomie und –morphologie der Maispflanzen aus Luftkultur entspricht dabei eher den in natürlichen, im Boden vorkommenden Verhältnissen (Degenhardt und Gimmler 2000).

Ein Nährstoffmangel ist für beide Kultivationsstechniken auszuschließen, da diese mit ihrer Versorgung von Mikro- und Makronährelementen im optimalen Bereich lagen (3.1.3.2, Marschner 1995, Degenhardt 2000).

#### **4.2.3 Qualitative und quantitative Untersuchung Caspary'scher Bänder**

Die Darstellung Caspary'scher Bänder von Maiswurzeln erfolgte in vorliegender Arbeit mikroskopisch. Mit dem lipophilen Farbstoff Sudan konnten die Lipide der Suberinlamelle angefärbt (Gerlach 1984, Wilson und Peterson 1983) und mittels Hellfeld-Mikroskopie untersucht werden. Sensitivere Möglichkeiten bietet die Fluoreszenzmikroskopie. Mit dem Fluorochrom Berberin-Hemisulfat können Caspary'sches Band und Suberinlamelle gefärbt werden. Gegenfärben mit Anilin-Blau oder Toluidin-Blau-O reduziert die Fluoreszenz der oberflächlichen Suberinlamelle, so dass nur das Caspary'sche Band weiterfluoresziert (Brundrett et al. 1988). Diese Methoden wurden erfolgreich auch bei weiteren, verschiedenen

---

Pflanzenarten angewendet (z.B. Peirson und Dumbroff 1969, Moon et al. 1983, Wilson und Peterson 1983, Brundrett et al. 1988, Peterson 1988, Peterson 1992).

Endo- oder Exodermen von *H. annuus*-Wurzelquerschnitten der vorliegenden Arbeit konnten allerdings weder mit Suberin III noch mit Berberin-Hemisulfat angefärbt werden. Nach Perumalla et al. (1990) besitzen Sonnenblumenwurzeln jedoch solche Strukturen.

Die alleinige, mikroskopische Überprüfung der Wurzelanatomie war daher nicht ausreichend, um genaue Aussagen über die Stärke der apoplastischen Barriere des individuellen Versuchsobjektes zu treffen. Zum einen scheinen gewebespezifische Merkmale Färbungen zu erschweren (*H. annuus*), zum anderen muss ein gewisser Schwellenwert an Suberin im Gewebe erreicht werden, damit der gefärbte Nachweis für das Auge sichtbar wird. Mittels Fluoreszenz konnten zwar geringere Suberinmengen sichtbar gemacht werden als im Hellfeld, hier ergibt sich aber das Problem, dass Berberin sehr unspezifisch sowohl Suberin, Lignin als auch Callose färbt und die exakten färbbaren Strukturen nicht bekannt sind. Folgerungen hinsichtlich absoluter qualitativer oder quantitativer Suberinzusammensetzungen sind nicht möglich.

Von Schreiber et al. (1994 und 1999) wurde eine Methode entwickelt, nach der suberinisierte und lignifizierte Gewebe von Pflanzenwurzeln enzymatisch isoliert und der Gehalt an Suberinmonomeren mittels GC/MS qualitativ und quantitativ analysiert werden können.

Das Gesamt-Suberin besteht dabei aus einer aromatischen Domäne, die veresterte Ferulasäure, p-Cumarsäure und p-Hydroxybenzoesäure beinhaltet. Diese Komponenten tragen wahrscheinlich kaum zum lipophilen Charakter des Suberins bei und dienen hauptsächlich der Pathogenabwehr (Kolattukudy 1984 und 1987, Nicholson und Hammerschmidt 1992). Die zweite, aliphatische Domäne des Suberins beinhaltet die eigentlich hydrophoben Bausteine: langkettige Fettsäuren und Alkohole der Kettenlängen C<sub>16</sub> – C<sub>28</sub>, in seltenen Fällen bis C<sub>30</sub> (Luftwurzeln von *Monstera deliciosa*) (Kolattukudy et al. 1975, Zeier und Schreiber 1998a). Das aliphatische Suberin enthält 5 Hauptsubstanzklassen:

$\omega$ -Hydroxysäuren (gesättigt und einfach ungesättigt), 1, $\omega$ -Disäuren (gesättigt und einfach ungesättigt), primäre Carbonsäuren, primäre Alkohole und 2-Hydroxy-Carbonsäuren (Zeier 1998, Schreiber et al. 1999).

---

Der Gehalt von isolierten Exo- und Endodermen an aliphatischem Suberin und dessen qualitativer Zusammensetzung schwankt je nach untersuchter Art, Entwicklungszustand der suberinisierten Gewebe und vorhandenen Umwelteinflüssen (Tab. 4-1 und Tab. 4-2; Schreiber et al. 1994<sup>1</sup>, Schreiber 1996<sup>1</sup>, Zeier und Schreiber 1997<sup>1</sup>, und 1998a<sup>2</sup>, Schreiber et al. 1999, Zeier et al, 1999a<sup>3</sup> und 1999b<sup>4</sup>, Zimmermann et al 2000<sup>5</sup>, Degenhardt und Gimmler 2000<sup>6</sup>, vorliegende Arbeit<sup>7</sup>).

Die große Variabilität der Suberingehalte in Endo- und Exodermen (0.4%-20%; w/w) bis jetzt untersuchter monokotyler und dikotyler Pflanzenspecies macht deutlich, dass sich Barriereigenschaften individueller Wurzeln verschiedener Pflanzenarten gegenüber Wasser und darin gelösten Substanzen stark unterscheiden müssen.

**Tab. 4-1** Aliphatische Suberingehalte von isolierten, endodermalen Zellwänden von 6 monokotylen (*Monstera deliciosa* Liebm., *Clivia miniata* Reg., *Agapanthus africanus* Hoffmgg., *Aspidistra elatior* Bl., *Iris germanica* L. und *Allium cepa* L., *Zea mays* L.) und 4 dikotylen (*Pisum sativum* L., *Cicer arietinum* L., *Ricinus communis* L. und *Helianthus annuus* L.) Pflanzenarten.

ENDODERMIS: Aliphatische Suberindomäne % (w/w)						
Untersuchte Kulturbedingungen	Art und		Entwicklungsstadium der Endodermis			
			Stadium I (Caspary'sches Band)	Stadium II (Suberinlamelle)	Stadium III (tertiäre Zellwandauflagerungen)	
(M: Monokotyle, D: Dikotyle; LW: Luftwurzel, H: Hydrokultur, L: Luftkultur, B: Bodenkultur)						
<i>M. deliciosa</i> <sup>2</sup>	M	LW	0.4			
<i>C. miniata</i> <sup>1</sup>	M	B	1.2			
<i>P. sativum</i> <sup>3</sup>	D	L	2.5			
<i>C. arietinum</i> <sup>3</sup>	D	H		19.5		
<i>R. communis</i> <sup>3</sup>	D	B		9.8		
<i>A. africanus</i> <sup>2</sup>	M	B			3.0	↓ Sek. Zellwandauflagerungen nehmen zu
<i>A. elatior</i> <sup>2</sup>	M	B			2.5	
<i>A. cepa</i> <sup>2</sup>	M	H			1.8	
<i>I. germanica</i> <sup>2</sup>	M	B			1.6	
<i>Z. mays</i> <sup>4</sup>	M	H	1.4-2.5	2.5-4.8		1.3-2.2
<i>Z. mays</i> <sup>5</sup>	M	H	0.05			0.4
<i>Z. mays</i> <sup>5</sup>	M	L	0.05			1.0
<i>Z. mays</i> <sup>6</sup>	M	B		1.1		
<i>Z. mays</i> <sup>7</sup>	M	H	2.1-2.6	2.6-4.9		2.0-2.3
<i>Z. mays</i> <sup>7</sup>	M	L	1.0-8.0	5.0-8.0		2.0-4.0
<i>H. annuus</i> <sup>7</sup>	D	H		1.4		

<sup>1</sup>Schreiber et al. 1994

<sup>2</sup>Zeier und Schreiber 1998a

<sup>5</sup>Zimmermann et al. 2000

<sup>1</sup>Schreiber 1996

<sup>3</sup>Zeier et al. 1999a

<sup>6</sup>Degenhardt und Gimmler 2000

<sup>1</sup>Zeier und Schreiber 1997

<sup>4</sup>Zeier et al. 1999b

<sup>7</sup>vorliegende Arbeit

Suberingehalte der hier untersuchten Maispflanzen aus Hydrokultur korrelieren gut mit den von Zeier et al. (1999) veröffentlichten Werten. Während der Endodermisentwicklung stieg der Suberingehalt des reinen Caspary Streifens von 2%-3% mit der Ausbildung einer Suberinlamelle auf 3%-5% an, um dann nach Auflagerung tertiärer, nicht suberinisierter Zellwandauflagerungen wieder abzufallen. Dieser „Verdünnungseffekt“ geht auf die lignifizierte Celluloseauflagerungen zurück, die zwar das Endodermisgewicht erhöhen, aber nicht zum Suberingehalt beitragen

ausgeprägten Effekt sieht man bei isolierten Exodermen (Schreiber et al. 1999). Neben der Anatomie und Morphologie entsprechen auch die Suberingehalte aeroponischer Maiswurzeln denen aus natürlicher Bodenkultur (Tab. 4-1, Degenhardt und Gimmler 2000).

**Tab. 4-2** Aliphatische Suberingehalte von isolierten, endodermalen Zellwänden von 6 monokotylen (*Monstera deliciosa* Liebm., *Clivia miniata* Reg., *Agapanthus africanus* Hoffmngg., *Aspidistra elatior* Bl., *Iris germanica* L. und *Allium cepa* L., *Zea mays* L.) und 4 dikotylen (*Pisum sativum* L., *Cicer arietinum* L., *Ricinus communis* L. und *Helianthus annuus* L.) Pflanzenarten.

EXODERMIS: Aliphatische Suberindomäne % (w/w)					
Untersuchte Kulturbedingungen	Art und		Typ des Hypodermisisolates		
	M	LW	Mehrschichtig	Exodermis im Stadium I	Exodermis im Stadium II
<i>M. deliciosa</i> <sup>2</sup>	M	LW	5.0		
<i>C. miniata</i> <sup>1</sup>	M	B	0.7		
<i>P. sativum</i> <sup>3</sup>	D	L			1.3
<i>C. arietinum</i> <sup>3</sup>	D	H			0.5
<i>R. communis</i> <sup>3</sup>	D	B			4.7
<i>A. africanus</i> <sup>2</sup>	M	B	2.4		
<i>A. elatior</i> <sup>2</sup>	M	B	1.1		
<i>A. cepa</i> <sup>2</sup>	M	H			2.3
<i>I. germanica</i> <sup>2</sup>	M	B	4.2		
<i>Z. mays</i> <sup>4</sup>	M	H		1.1	1.4-2.0
<i>Z. mays</i> <sup>5</sup>	M	H		0.4	0.6
<i>Z. mays</i> <sup>5</sup>	M	L		1.0	0.8
<i>Z. mays</i> <sup>6</sup>	M	B		2.0	
<i>Z. mays</i> <sup>7</sup>	M	H		0.7-0.9	0.9-1.3
<i>Z. mays</i> <sup>7</sup>	M	L		1.0-1.8	0.9-1.4
<i>H. annuus</i> <sup>7</sup>	D	H		2.8	

<sup>1</sup>Schreiber et al. 1994

<sup>2</sup>Zeier und Schreiber 1998a

<sup>5</sup>Zimmermann et al. 2000

<sup>1</sup>Schreiber 1996

<sup>3</sup>Zeier et al. 1999a

<sup>6</sup>Degenhardt und Gimmler 2000

<sup>1</sup>Zeier und Schreiber 1997

<sup>4</sup>Zeier et al. 1999b

<sup>7</sup>vorliegende Arbeit

Wie bereits von Zimmermann et al. (2000) untersucht, beschleunigte und verstärkte die Anzucht von Maiswurzeln in feuchter Luft (Luftkultur) auch in den vorliegenden Experimenten die Ausbildung der Caspary'schen Bänder und der Suberinlamelle im

---

des jüngeren Wurzelbereichs (Exodermis in Stadium I, Tab. 4-2). Hier ist der Suberingehalt bei aeroponischen Wurzeln um den Faktor 1.5-2.4 (3.1.3.3, Zimmermann et al. 2000) erhöht. Der Reifungsprozess der Exodermis setzt bei aeroponischen Maispflanzen schneller ein (Enstone und Peterson 1998), so dass sie ihr Entwicklungsendstadium schneller erreichen (Clarkson et al. 1987). Eine genauere Analyse des Suberingehaltes einer Maisexodermis im Verlaufe ihres Reifungsprozesses als in Zimmermann et al. (2000) ergab, dass dieser im jüngsten (erste 20% der Gesamtwurzellänge, Zone 1 aus 3.1.3.3) und ältesten (letzte 20% der Gesamtwurzellänge, Zone 5 aus 3.1.3.3) Bereich bei in Luft- und Hydrokultur angezogenen Maiswurzeln nahezu identisch ist. Bereits in der folgenden Zone 2 (zweites Fünftel im jüngeren Wurzelbereich) treten die größten Unterschiede im Suberingehalt zwischen den beiden Anzuchtformen auf.

An der Gesamtmasse der isolierten Gewebe trägt Suberin neben Lignin, Kohlehydraten und Zellwandproteinen den geringsten Anteil (0.4% - 20%; w/w).

Dikotyle besitzen nach bisherigen Untersuchungen mehr Suberin als Monokotyle (Zeier et al. 1999a). Dies trifft auch auf die in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersuchte Sonnenblumenwurzel zu. Die einschichtige Exodermis von *H. annuus* enthält nach *R. communis* (Tab. 4-2) das Isolat mit der größten Suberinmenge. Der apoplastische Transportweg durch Sonnenblumenwurzeln ist also, wie unter 4.1 gefordert, im Vergleich zu Maiswurzeln erschwert. Bereits in Hydrokultur ist die Exodermis von *H. annuus* stark ausgeprägt und könnte der Grund für die reduzierte ABA- und Wassertransportkapazität (3.2.1.3) von Sonnenblumenwurzeln sein. Mais aus Luftkultur enthält im Vergleich zu hydroponischem ebenfalls erhöhte Suberingehalte in seiner Zellwand. Die Transportrate von apoplastisch transportierten Substanzen sollte daher erniedrigt sein.

#### **4.2.4 Barriereigenschaften von Endo- und Exodermis**

Die im Apoplasten ausgebildeten Caspary'schen Bänder blockieren diesen Weg für Ionen (Baker 1971, Robards et al. 1973, Clarkson und Robards 1975, Peterson 1987, 1988 und 1989, Perumalla et al. 1990, Enstone und Peterson 1998, Frensch et al. 1996, Gierth et al. 1999) und ermöglichen so den Wurzeln eine gezielte Nährstoffaufnahme und den Ausschluss toxischer Substanzen.

---

(z. B. Peterson et al. 1978, Peterson et al. 1980, Peterson 1988, Moon et al. 1986 und Enstone und Peterson 1992a und b).

Das unmodifizierte Zellwandnetz ist negativ geladen und wird von wassergefüllten Tunneln durchzogen. Diese Durchlässe wurden von Carpita et al. (1979) als Poren bezeichnet. Angaben zum Durchmesser dieser Poren bewegen sich zwischen 3.5 bis 10 nm (Peterson 1988) und 35 bis 52 Å ( $1 \text{ Å} = 1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$ ) (Carpita et al. 1979). Die Inkrustierung der Zellwand mit Suberinbausteinen wird zum einen die Porengröße des Zellwandnetzes verringern. Zum anderen steigt die Lipophilie dieses Apoplastenbereiches.

Eine Abschätzung der Porengröße oder der Lipophilie eines Caspary'schen Streifens ist in der Literatur nicht zu finden. Moleküle, die durch diesen „Zellwandfilter“ gelangen, müssen hinreichend klein und/oder lipophil sein. Der platzbestimmende Molekülring der ABA besitzt einen Durchmesser von 8 - 11 nm (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. C. Robl, Schmalte et al. 1977) und könnte somit eventuell Poren der Zellwand durchqueren. Wasser (Zimmermann et al. 1998 und 2000), aber auch größere, zweiwertige Ionen wie Lanthan oder Calcium (Ionenradius: 0.452 nm und 0.412 nm) (Peterson et al. 1986, Peterson 1987, White 2000) können noch durch den apoplastischen Filter gelangen.

Das Transportverhalten dieser Substanzen muss sich von dem größerer Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden. Berberin-Diffusionsexperimente mit den in dieser Arbeit untersuchten Maiswurzeln zeigten ebenfalls, dass gebildete hypodermale Caspary'sche Streifen Farbstoffeintritt in den Wurzelcortex verhinderten. Cortextgewebe, das nicht von einer Exodermis geschützt wurde, war dem Fluoreszenzfarbstoff diffusiv frei zugänglich (3.2.2.3).

Auch die diffusive Aufnahme von ABA in 100 bis 120 mm lange Wurzelstücke wurde durch die Anwesenheit einer Exodermis reduziert. Die ABA-Aufnahmerate in Wurzelstücke mit Caspary'schem Band in der Hypodermis war um den Faktor 2.7 erniedrigt (3.2.1.2.3). Einen stärkeren Effekt hatte eine Exodermis auf die Aufnahme von Sorbit in Wurzelstücke. Die Sorbit-Aufnahmerate war in Wurzelstücken mit Exodermis um den Faktor 4.4 (3.2.2.2.1) reduziert. Substanzen wie z.B. Sorbit, die auf Grund ihrer geringen Aufnahme ins Wurzelgewebe (Gratzer 1993) als Osmoticum verwendet werden, gelangen diffusiv zuerst in die Zellwand. Treffen sie auf eine hydrophile apoplastische Barriere, so werden sie dort wesentlich effektiver

---

(Daeter 1994), ist anzunehmen, dass dies auch durch suberinisierte Zellwände möglich ist.

Radiale Wasserflüsse durch Wurzeln, angetrieben von osmotischen Gradienten, nutzen im wesentlichen den „cell to cell“-Weg und nur in geringem Umfang den apoplastischen (Steudle 1994b). Obwohl diese apoplastische Komponente sehr klein ist, reduziert sich dennoch die osmotische Leitfähigkeit von Maiswurzeln mit zunehmendem Entwicklungsgrad der Endodermis (Frensch und Steudle 1989, Frensch et al. 1996).

Transportcharakteristika von Wurzeln ändern sich jedoch nach Art des angelegten Druckgradienten (Brouwer 1953).

Die Leitfähigkeit von Maiswurzeln unter hydrostatischen Druckgradienten ist um eine Größenordnung höher als die osmotisch angetriebene (Steudle und Peterson 1998, Frensch et al. 1996). Unter diesen Bedingungen erfolgt der Wassertransport hauptsächlich im Wurzelapoplasten (Steudle 1994, Steudle et al. 1999). Die Endodermis erwies sich hier zwar als Barriere für Ionen, nicht aber für Wasser (Steudle et al. 1993, Peterson et al. 1993). Sanderson (1983) zog aus seinen Beobachtungen ebenfalls den Schluss, dass Wasser durch die Zellwand transportiert wird und die Endodermis, speziell unter transpirierenden Bedingungen, für Wasser durchlässig sein sollte.

Selbst der Fluoreszenzfarbstoff Berberin-Hemisulfat konnte mittels „Solvent-drag“ des Wasserflusses einer transpirierenden Pflanze schneller durch den Wurzelcortex „mitgenommen“ werden, als dies in derselben Zeit durch reine Diffusion geschehen könnte (Aloni et al. 1998). Die apoplastische Barriere Endodermis wurde mittels „Solvent-drag“ aber nicht überwunden.

#### **4.2.5 Gekoppelter ABA- und Wassertransport**

ABA könnte nun auf Grund seiner bereits diskutierten Molekülcharakteristika mit dem „Solvent-drag“ des Wasserflusses auch durch die für hydrophile Ionen und große Fluoreszenzfarbstoffe impermeablen Caspary Streifen transportiert werden.

Fließen Wasser und auch ABA apoplastisch durch Maiswurzeln, sollten bei einer Verstärkung des apoplastischen Widerstandes durch Ausbildung einer Exodermis, die Wasser- und ABA-Transportraten reduziert werden.

---

Tatsächlich fanden Zimmermann und Steudle (1998) und Zimmermann et al. (2000) eine reduzierte Wasserleitfähigkeit bei aeroponischen Maiswurzeln um die Faktoren 1.5 bis 3.6, je nach Wurzelalter.

In 4.1 wurde gezeigt, dass ABA in Maiswurzeln aus Hydrokultur zu einem großen Teil apoplastisch durch „Solvent-drag“ mit dem Wasser transportiert wird. Diese Schlussfolgerung wurde auf Grund der Beobachtung gezogen, dass nach Erhöhung des radialen Wasserflusses  $J_{Vr}$  die ABA-Konzentrationen im Xylem  $c_X^{ABA}$  niemals erniedrigt wurden.  $c_X^{ABA}$  stieg sogar mit steigendem  $J_{Vr}$ . Dieselbe Tendenz wurde auch bei den untersuchten aeroponischen Maiswurzeln gefunden. Ein apoplastischer Bypass für ABA besteht demnach auch in Wurzeln mit einer Exodermis. Die Zunahme von  $c_X^{ABA}$  nach erhöhtem Wasserfluss war für Maiswurzeln ohne Exodermis tendenziell, aber nicht signifikant für alle untersuchten externen ABA-Konzentrationen  $c_0^{ABA}$  höher.

Der radiale ABA-Fluss  $J_{ABA}$  stieg auch bei aeroponisch kultivierten Maiswurzeln stärker als  $J_{Vr}$ . Dieser Effekt ist, wie auch bei den Wurzeln aus Hydrokultur, auf Konzentrations-Polarisations-Effekte vor der apoplastischen Barriere zurückzuführen. Ein Anstieg des radialen Wasserflusses muss demnach auch bei Luftkulturwurzeln mit einer Exodermis den „Solvent-drag“-Effekt verstärken.

In Mais mit Exodermis war die Leitfähigkeit von ganzen Wurzelsystemen um den Faktor 1.3 (Saugexperimente, 3.5.2) und 2.1 (Wurzeldrucksondenexperimente, 3.5.3) erniedrigt. Gleichzeitig waren die radialen ABA-Flüsse um die Faktoren 2.0 bis 3.7 ebenfalls reduziert (3.2.1.3.1). Die simultanen Veränderungen beider Parameter lassen nun erneut auf einen gekoppelten Transport beider Substanzen schließen.

Für Wasser ist unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen hydrostatischer Druckgradienten ein vorwiegend apoplastischer Transport postuliert (Steudle 1994a und b, Steudle und Peterson 1998). Auch bei Wurzeln mit Exodermis muss demnach für ABA ein apoplastischer Bypass geöffnet sein, der in seiner Gesamtheit allerdings kleiner ist als ein Bypass durch ein einzelnes Caspary'sches Band.

Dies wird durch Aufnahmeexperimente von ABA in einer Konzentration von 500 nM in intakte Maiswurzelsysteme mit einem (Endodermis) oder zwei (Endodermis und Exodermis) Caspary'schen Bändern bestätigt. Wurzelgewebe ohne Exodermis enthielten 3mal mehr ABA als solche, die durch ein hypodermales Band im

---

Da sowohl der radiale Wasser- als auch der ABA-Fluss in ähnlichem Umfang bei Anwesenheit einer Exodermis reduziert waren, blieb die ABA-Konzentration im Xylem (das Wurzel-Spross-Signal) unverändert.

Folglich war die „passive Selektivität“ hydroponischer Wurzeln, ausgedrückt durch ihre apparenten Reflexionskoeffizienten  $\sigma_{ABA}$ , nicht signifikant niedriger im Vergleich zu den aeroponischen Maiswurzeln.

Das reale Hormonsignal, das über das Xylem die Stomata erreicht, hat trotz reduzierter Wasserleitfähigkeit von Maiswurzeln mit einem hypodermalen Caspary'schen Band auf Grund des ABA-Bypass-Flusses dieselbe Intensität.

#### **4.2.6 Einfluss des pH-Wertes**

Einflüsse auf die Stärke des Hormonsignals im Xylem hat, wie bereits unter 4.1 ausführlich dargelegt, der pH-Wert der Rhizosphäre. Saure pH-Werte fördern einen apoplastischen Bypass-Fluss. Dies bestätigte sich auch bei aeroponischen Maiswurzeln. Der Reflexionskoeffizient  $\sigma_{ABA}$  lag bei einem Medien-pH-Wert von 8.0 signifikant höher als bei 5.5. Allerdings scheint die Kapazität des apoplastischen Bypasses in Wurzeln mit 2 Caspary'schen Bändern geringer und bereits bei einem pH-Wert von 5.5 ausgelastet zu sein. Eine weitere Erhöhung der protonierten ABA-Moleküle in einem Medium eines pH-Wertes von 4.8 konnte den ABA-Transport nicht weiter steigern.

#### **4.2.7 Die Schutzfunktion der Exodermis**

Im natürlichen System ist eine Exodermis allerdings keine Aufnahmebarriere für ABA, da das Phytohormon unter Stressbedingungen im Wurzelgewebe gebildet wird (3.2.1.1). Von dort aus verteilt es sich, wie unter 4.1 diskutiert in die Zellwand und kann apoplastisch mit dem Wasser in den Spross weitertransportiert werden.

Hier ist es wahrscheinlicher, dass Wurzeln sich mit dieser äußeren Barriere vor Verlust von Wasser, Nährstoffen und Hormonen schützen. Eine weitere Funktion der Exodermis ist in diesem Zusammenhang die Verhinderung von Pilzinfektionen (Van Fleet 1961, Kolatukudy 1984 und 1987, Kamula et al. 1995).

Zur Bestimmung von Kompartimentgrößen und deren Austauschraten für individuelle

---

entwickelt. Effluxkurven von Gewebestücken, die zuvor mit der zu untersuchenden Substanz bis zum „steady-state“ beladen wurden, konnten in 3 individuelle Exponentialkomponenten zerlegt werden. Diese wurden den in Serie angeordneten Kompartimenten Apoplast, Cytosol und Vakuole zugeordnet (Walker und Pitman 1976). Jedes Kompartiment wird dabei durch seine Halbwertszeit und Größe für die spezielle Substanz definiert.

Behl et al. (1981) validierte dieses für Ionen konzipierte Modell für ABA. Für das Stresshormon Abscisinsäure wurde ebenfalls ein typisches 3-phasiges Effluxmuster beschrieben (Behl et al. 1981, Behl und Hartung 1984 und 1987).

Effluxanalysen versiegelter Wurzelstücke der vorliegenden Arbeit (3.2.1.2.4 und 3.2.2.2.2) wiesen ebenfalls diese 3 Effluxphasen mit typischen Halbwertszeiten auf, sofern sie keine vollausgebildete, durchgängige Exodermis besaßen. Die Anwesenheit einer Exodermis veränderte das Bild. Effluxkurven konnten bis 5000 Effluxsekunden nur in 2 Komponenten zerlegt werden. Danach schloss sich eine weitere, schnellere Efflux-Komponente an.

Die Ursache für das Auftreten des zweiten Effluxes ist nicht ganz klar. Ein Grund könnte sein, dass ABA Ionenabgabe in das Xylem und den Apoplasten induziert (Karmoker und van Steveninck 1978, Van Steveninck et al. 1988) und so der Wurzeldruck steigt (3.5.5.3). Ein Undichtwerden der Versiegelung bei gesteigertem Innendruck könnte einen weiteren, schnelleren Efflux bewirken. Ein Beleg für diese Theorie ist, dass die Stärke des zweiten Effluxes abhängig von der Suberinisierung der Hypodermis ist. In der Reihenfolge kurze Wurzelspitzen, lange Wurzelspitzen und Wurzelsegmente nimmt der Folgeefflux zu. Wurzelbereiche, die zum Medium nicht so stark abgedichtet sind, sollten osmotische Druckgradienten leichter durch Wasser- und/oder Ionenabgabe ausgleichen können.

Dieselbe Beobachtung konnte auch bei Effluxkompartimentanalysen mit Sorbit gemacht werden. Hier wiesen aber nur die aeroponischen Wurzelsegmente ein 2-phasiges Effluxmuster mit einem sich anschließenden, schnelleren Folgeefflux auf. Sorbit kann den Druck im Apoplasten nicht aktiv wie ABA, sondern nur durch die eigene Akkumulation in der Wurzel erhöhen. Daher war es zu erwarten, dass dieser Effekt bei Sorbit nicht so groß ist wie unter ABA-Behandlung.

Die Tatsache, dass sich die Effluxzunahme bei unversiegelten Wurzelsegmenten zwar verringern, aber nicht ganz verhindern lässt, zeigt, dass der Druckaufbau im

---

Durch die Anwesenheit einer Exodermis werden demnach noch weitere Transportkomponenten verändert, die aber in den vorliegenden Experimenten nicht aufgeklärt werden konnten.

Während bei Wurzelproben ohne Exodermis jeder Effluxkomponente genau ein Gewebekompartiment zugeordnet werden kann, ist dies bei einem 2-phasigen Effluxmuster nicht möglich. Es ist wahrscheinlich, dass die schnellere Komponente dem Zellwandbereich vor dem Caspary'schen Streifen entspricht. Die zweite Effluxkomponente umfasst dann den Apoplasten innerhalb der Exodermis, das Cytosol und die Vakuole. Eine Exodermis hätte demnach eine Permeabilität für ABA, die gleich oder größer als die des Tonoplasten ist. Eine Unterscheidung der innerhalb der Exodermis liegenden Kompartimente ist damit nicht mehr möglich.

Aeroponische kurze Wurzelspitzen, deren Suberingehalt in der Hypodermis ähnlich dem hydroponischer Wurzelspitzen ist, besaßen, wie erwartet, ein 3-phasiges Effluxmuster.

Je stärker die Exodermis eines Wurzelstückes ausgebildet war, desto kleiner war dessen für ABA frei zugänglicher Zellwandraum. Das Verhältnis der ABA-Menge der Zellwand hydroponischer zu aeroponischen Wurzelsegmenten betrug 0.27. Peterson (1987) erhielt ein Verhältnis des frei zugänglichen Zellwandraumes für Sulfat-Ionen bei versiegelten Zwiebelwurzeln mit Exodermis zu unversiegeltem Cortexgewebe ohne Stele von 0.16 bis 0.26. Die Autorin belegte, da das Verhältnis der Zellwand von Außerhalb zu Innerhalb des Caspary'schen Bandes 0.25 bis 0.27 betrug, dass der frei zugängliche Apoplast für Sulfat-Ionen nur aus dem Zellwandbereich vor der Exodermis bestand. Peterson (1987) folgerte daraus, dass ein hypodermales Caspary'sches Band für Sulfat-Ionen eine impermeable Barriere ist.

Diese Schlussfolgerung gilt auch für ABA, allerdings nur unter der Bedingung, dass kein Druckgradient an der Wurzel anliegt. Wird im natürlichen System ABA im Wurzelgewebe produziert, sollte die Anwesenheit einer Exodermis demnach sogar zu einer höheren ABA-Akkumulation im Wurzelgewebe führen, da dieses vor ABA-Verlust an die Rhizosphäre geschützt ist. Maiskeimlinge, kultiviert in einem alkalischen Substrat (Schlacke, pH-Wert der Bodenlösung: 8.0), verloren im Vergleich zu *Vicia faba*-Keimlingen, die keine Wurzelexodermis ausbilden, weniger ABA an die Bodenlösung (Degenhardt et al. 2000).

Die Unterschiede in den Halbwertszeiten für radioaktiven ABA-Austausch des

---

Zusammensetzung der Rhizodermis und Hypodermis erklären. Der erhöhte Lignin- und Suberingehalt in jungen Wurzelbereichen von Mais aus Luftkultur (Zimmermann et al. 2000) reduzieren die diffusive Permeabilität für ABA.

Eine Effluxkompartimentanalyse mit dem Osmotikum Sorbit zeigte, dass sich, bei Verwendung dieser Substanz, die hauptsächlich in den Apoplasten aufgenommen wird, der oben beschriebene Exodermis-Effekt verstärkte.

Der Quotient der apoplastischen Sorbit-Menge hydroponischer zu aeroponischen Wurzelsegmenten betrug 0.18. Der für Sorbit frei zugängliche Zellwandbereich ist also kleiner als der für ABA, was wohl auf die geringere „Löslichkeit“ des hydrophilen Sorbits in einer lipophilen Matrix im Vergleich zu ABA zurückzuführen ist. Dies drückt sich auch in den absoluten Sorbit-Gehalten der Wurzelkompartimente aus, die im Vergleich zu den ABA-Gehalten signifikant erniedrigt waren.

Praktische Relevanz besitzt eine Wurzelexodermis weiterhin, indem sie Wurzeln vor Wasserverlust an einen trocknenden Boden mit geringem Wasserpotenzial schützt. Taleisnik et al. (1999) untersuchten verschiedene Pflanzenspezies mit und ohne Exodermis bezüglich ihrer Fähigkeit Wasser im Wurzelgewebe zurückzuhalten. Exodermale Spezies (z. B. *Zea mays*, *Helianthus annuus* oder *Allium cepa*) zeichneten sich durch eine signifikant höhere Wasserretentionskapazität aus als nicht-exodermale Spezies.

Anders als die Endodermis (Peterson et al. 1993, Steudle et al. 1993) scheint eine Exodermis eine Barriere für Wasser sowohl unter transpirierenden (hydrostatischer Druckgradient) als auch diffusiven Bedingungen zu sein. Das bedeutet, dass im diffusiven Wasserfluss neben dem „cell-to-cell“-Weg (Steudle und Frensch 1996) ein signifikanter apoplastischer Beitrag enthalten sein muss (Taleisnik et al. 1999).

In den vorliegenden Experimenten konnte dies unter Verwendung von 40 mm langen Maiswurzelspitzen und –segmenten aus Luft- und Hydrokultur bestätigt werden (3.5.6). Wurzelspitzen und hydroponische Wurzelsegmente, die keine ausgeprägte Exodermis besaßen (3.1.2 und 3.1.3.2), verloren signifikant schneller Wasser und waren bereits nach 80 min Austrocknung bei 10% ihres Anfangswassergehaltes angelangt. Die aeroponischen Wurzelsegmente, abgedichtet durch eine Exodermis, besaßen noch nach 450 min Austrocknung 20% ihres Anfangswassergehaltes.

---

### 4.3 ABA-Effekte auf Wurzeln

Die wohl bekannteste Regulationsaufgabe der Abscisinsäure, der Schluss der Stomata in der Blattepidermis, ist inzwischen sowohl hinsichtlich der ablaufenden physiologischen Prozesse, als auch der Signaltransduktionskette weitgehend aufgeklärt (Assmann 1993, McRobbie 1998, Thomas et al. 1997, Leung und Giraudat 1998).

Über ABA regulierte Genexpression in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen wie z.B. Kälte, Trockenheit und Salinität wurden mehrere Übersichtsartikel veröffentlicht (Chandler und Robertson 1994, Leung und Giraudat 1998).

Molekularbiologische Analysen stressinduzierter mRNA-Pools führten zur Aufklärung von ABA-sensiblen Promotoren, die an ABA-induzierter Genexpression beteiligt sind (Giraudat et al. 1994, Leung und Giraudat 1998).

Studien an ABA-defizienten und ABA-insensitiven *Arabidopsis*-, Mais- und Tomaten-Mutanten führten zur Klonierung der korrespondierenden ABA-Perzeptionsorte (Thomas et al. 1997).

Die Suche nach einem spezifischen ABA-Rezeptor (von Hipkins und Hilman 1986 gefordert) in gereinigten Plasmamembranen von *A. thaliana* (Pedron et al. 1998) und Aleuron-Protoplasten von *H. vulgare* (Wang et al. 1995) verlief erfolgreich. Der monoklonale Antikörper JIM19, der sich an Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine von Epidermisstreifen von *C. communis* und *P. sativum* band (Knox et al. 1995), reduziert die ABA-induzierte Genexpression.

Hinsichtlich der ABA-Wirkungen und -Mechanismen der Signaltransduktion in Wurzeln ist weit weniger bekannt.

Physiologische Daten über die Aufnahmestimulierung und Umverteilung von Ionen durch ABA sind widersprüchlich. Eine Mehrheit der publizierten Studien zeigte, dass ABA den Ionentransport in der Wurzel reguliert, ohne dabei die Ionenaufnahme zu verändern. In älteren Publikationen wurde dabei eine verminderte Ionen-Abgabe aus dem stelären Symplasten in die Xylemgefäße beobachtet (z.B. Cram und Pitman 1972, Shaner et al. 1975). Fiscus (1981) jedoch postulierte sowohl eine ABA-induzierte Kurzzeit- als auch eine Langzeitabgabe von Ionen in das Xylem. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass  $K^+$  (Karmoker und van Steveninck 1978,

---

(Karmoker und van Steveninck 1978, Fiscus 1982a) und  $\text{NO}_3^-$  (Glinka 1980) verstärkt abgegeben werden. Fournier et al. (1987) und Glinka und Abir (1989) stellten die These auf, dass ABA die Membranpermeabilität für Ionen erhöht.  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt ABA-ähnliche Effekte (Quintero et al. 1999), und spielt deshalb eventuell eine Rolle als second-messenger.

In der vorliegenden Arbeit änderte sich das osmotische Potenzial von Maiswurzelgewebe nach ABA-Gabe nicht. Gleichzeitig stieg der Wurzeldruck um 16% – 32% an (3.5.5), was auf stimulierten Ionenfluss aus dem Wurzelgewebe in das Xylem schließen lässt. Auch in den Flussexperimenten (3.5) machte sich die gesteigerte Ionenabgabe bemerkbar. Bei einer nach ABA-Gabe um den Faktor 2 bis 3 gesteigerten hydraulischen Leitfähigkeit der untersuchten Maiswurzelssysteme verdünnte sich das osmotische Potenzial nicht oder nur bis zu einem Faktor von 0.7. Der Gesamtfluss aller osmotisch aktiven Substanzen nahm also zu.

Der Zellturgor hingegen veränderte sich nach Inkubation in 10 bis 100 nM ABA nicht signifikant (3.5.5.3). Hohe externe ABA-Gaben ( $1\mu\text{M}$ ) ließen den Zellturgor zeitabhängig von der Hormonapplikation, wie von Roberts 1998 für steläre Protoplasten gefordert, ansteigen.

Molekularbiologische und elektrophysiologische Techniken bestätigten die Existenz von ABA-sensitiven-Transportkanälen für  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Ca}^{2+}$  (Roberts 1998). Jeannette et. al (1999) zeigten in Suspensionszellen von *A. thaliana*, dass ABA in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M ( $10\mu\text{M}$ ) die Plasmamembran depolarisierte und einen Kanal aktivierte, der Kalium aus der Zelle transportierte.

Für Maiswurzelzellen aus dem Zentralzylinder konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Roberts et al. (1998), Gaymard et al. (1998) und De Boer (1998) fanden keine Aktivierung oder sogar eine Inhibierung von auswärtsgerichteten  $\text{K}^+$ -Kanälen in der Stele durch ABA. Allerdings wurden diese Experimente mit ABA der Konzentrationen von 10-20  $\mu\text{M}$  durchgeführt, so dass eine Aktivierung unter physiologischen Bedingungen (0.1-1  $\mu\text{M}$  ABA) nicht auszuschließen ist.

Ein weiterer ABA-Effekt auf Wurzelebene ist die Regulierung der hydraulischen Leitfähigkeit ( $L_p$ ). Berichte in der Literatur über die Richtung dieses Effektes sind widersprüchlich.

---

Marhart et al. (1979), Fiscus (1981 und 1982a) konnten belegen, dass ABA speziell bei sehr großen Wasserflüssen ( $\Delta P = 5\text{bar}$ ) und hohen Hormon-Konzentrationen ( $2 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ )  $L_p_r$  reduzierte.

Andere Autoren dagegen konnten für unterschiedliche Pflanzenarten nach Applikation verschiedener ABA-Konzentrationen (z.B. Glinka 1980: *Helianthus annuus*, 4  $\mu\text{M}$  ABA; Glinka und Abir 1989: *Helianthus annuus*, 4  $\mu\text{M}$  ABA; Fournier et al. 1987: *Helianthus annuus*, 4  $\mu\text{M}$  ABA; Ludewig et al. 1988: *Helianthus annuus*, 10 nM – 100  $\mu\text{M}$  ABA; BassiriRad und Radin 1992: *Hordeum vulgare*, 10  $\mu\text{M}$ ; Zhang et al. 1995: *Zea mays*, 1 $\mu\text{M}$ -100  $\mu\text{M}$  ABA; Quintero et al. 1998: *Helianthus annuus*, 4  $\mu\text{M}$  ABA; Quintero et al. 1999: *Helianthus annuus*, 4  $\mu\text{M}$  ABA) stimulierende Effekte auf  $L_p_r$  feststellen.

Eine Langzeitapplikation von ABA über 24 h führte nach anfänglicher Stimulation zur Ausgangsleitfähigkeit zurück oder reduzierte diese sogar (Fournier et al. 1987).

Jeschke et al. (1997) experimentierten mit Maispflanzen, die ihre Wasserversorgung allein aus den seminalen Wurzeln bezogen. Die Pflanzen kompensierten ihre limitierte Wurzelaufnahme­fläche durch eine gesteigerte hydraulische Leitfähigkeit. Die Autoren vermuteten, dass in den Blättern synthetisierte ABA zu den Wurzeln transportiert wurde und dort  $L_p_r$  stimulierte.

Der exakte Regulationsmechanismus von Abscisinsäure auf Wurzelebene ist nicht bekannt. Ähnlich den Vorgängen im Blatt erhöht  $\text{Ca}^{2+}$  die Sensitivität des Wurzelgewebes für ABA (Quintero et al. 1999, Glinka 1980).  $\text{K}^+$ -Mangel verstärkt die  $L_p_r$ -Stimulierung durch ABA (Quintero et al. 1998).

Für eine Regulierung des Wassertransportes auf Zellebene sprechen die Hemmung des ABA-induzierten Wasserflusses durch CCCP, einem Protonophor (Karmoker und van Steveninck 1978),  $\text{HgCl}_2$  (Quintero et al. 1999, Henzler und Steudle 1995) und Anaerobiose (Fournier et al. 1987). Glucose steigert den Effekt (Fournier et al. 1987). Zur Klärung der ABA-Wirkungsweise auf die hydraulische Leitfähigkeit von Maiswurzeln wurden in der vorliegenden Arbeit der ABA-Effekt auf  $L_p_r$  sowohl auf der Ebene eines Wurzelsystems, einer einzelnen Primärwurzel als auch auf Zellniveau untersucht. Der zeitliche Verlauf der  $L_p_r$ -Regulation in Abhängigkeit verschiedener, physiologischer ABA-Konzentrationen wurde bestimmt.

---

### 4.3.1 Effekt auf der Ebene eines Wurzelsystems

Wie bei Glinka (1977) wurde aus dekapitierten Wurzelsystemen mittels Unterdruck (2.6.2) Xylemsaft gewonnen. Mit dieser, den natürlichen Transpirationssog nachahmenden Methode, können bis zu 1 bar unter atmosphärischem Druck an das Xylem angelegt werden. Ein Problem bei diesen niedrigen hydrostatischen Druckgradienten ist es, zwischen osmotisch und hydrostatisch angetriebenen Stoff- und Wasserflüssen zu unterscheiden. Die so gewonnenen hydraulischen Leitfähigkeiten (3.5.2:  $0.8-2.7 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ) sind jedoch mit denen, die bei größeren hydrostatischen Druckgradienten gemessen wurden (z.B. Zhu und Steudle 1991, Peterson und Steudle 1993, Frensch et al. 1996, Zimmermann und Steudle 1998), vergleichbar. Zudem ist bekannt, dass osmotische Druckgradienten keine starken Volumenflüsse verursachen und somit nur niedrige Leitfähigkeiten induzieren (z.B. Steudle und Frensch 1989, Zimmermann und Steudle 1998). Daher sollten bei den vorliegenden Ergebnissen osmotisch angetriebene Wasserflüsse vernachlässigbar sein.

In den vorliegenden Experimenten erhöhten 500 nM ABA  $L_{pr}$  sowohl von hydroponischen als auch von aeroponischen Maiswurzeln um den Faktor 2 bzw. 3 (3.5.2). Aeroponische Maiswurzeln mit Exodermis hatten nach ABA-Applikation hydraulische Leitfähigkeiten von hydroponischen Maiswurzeln. Dies zeigte, dass Pflanzenwurzeln mittels ABA zusätzliche Wassertransportwege öffnen können.

### 4.3.2 ABA-Effekt auf der Ebene einer Primärwurzel

Zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse auf Wurzelebene wurde der ABA-Effekt auf  $L_{pr}$  einzelner Primärwurzeln mit Hilfe der Drucksondentechnik (2.7.4.2) überprüft. Vorteil dieser Methodik ist, dass osmotische Druckgradienten die Wasserrelaxationsprozesse nicht stören können.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass die längere Halbwertszeit  $T_{1/2}^W B$  der Wasserrelaxationskurven bis zu 120 min nach ABA-Applikation abnahmen, um dann tendenziell wieder anzusteigen. Die schnellere Phase der Druckrelaxationen ( $T_{1/2}^W A$ ) wurde durch ABA nicht reguliert (3.5.3).

Bei Mais konnte gezeigt werden, dass diese kürzere Halbwertszeit  $T_{1/2}^W A$  den apoplastischen Wasserfluss repräsentiert (z.B. Zhu und Steudle 1991, Azaizeh et al.

---

$L_{pA}$  liegt in derselben Größenordnung wie die hydraulischen Leitfähigkeiten ganzer Wurzelsysteme (Steudle 1993).

Die gesamte Leitfähigkeit eines Maiswurzelsystems oder einer Primärwurzel ( $0.6 - 6.5 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ) war in den vorliegenden Experimenten genauso groß wie  $L_p$  einer einzelnen Zelle ( $6.8 \pm 6.4 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ). Die Wurzeleitfähigkeit des symplastischen Wassertransportes sollte durch die in Reihe geschalteten Widerstände der einzelnen Zellen eine geringere Leitfähigkeit als  $L_{pA}$  für den symplastischen Wurzeltransport erzeugen, wie dies für  $L_{pB}$  der Fall ist. Ein weiterer Hinweis, dass  $T_{1/2}^W A$  den apoplastischen Teil des Wasserrelaxationsprozesses darstellt, ist die Tatsache, dass  $L_{pA}$  durch die Anwesenheit eines Caspary'schen Bandes in der Hypodermis signifikant reduziert wird (3.5.3). Dies ist auch bei ganzen Wurzelsystemen der Fall (3.5.2, Zimmermann und Steudle 1998).

Um den Beitrag des symplastischen Wasserflusses durch Pflanzenzellen über den gesamten Wurzelradius zu bestimmen, wäre es notwendig,  $L_p$  tieferer Zelllagen von Cortex und Stele zu kennen. Aus geometrischen Gründen sollten diese mehr zum Gesamt- $L_{p_r}$  beitragen (Steudle und Brinckmann 1989). Diese Zellen sind jedoch aus technischen Gründen schwer messbar.

In *Lotus japonicus* zeigte  $L_{p_r}$  eines Wurzelsystems einen deutlichen diurnalen Rhythmus (ebenso wie die mRNA, die für Wasserkanäle kodiert), obwohl das  $L_p$  corticaler Zellen konstant bleibt (Henzler et al. 1999, Clarkson et al. 2000). Dies wurde durch eine Limitierung des Wurzel- $L_{p_r}$  durch die Endodermis und die stelären Gewebe erklärt.

Die Regulation von  $T_{1/2}^W B$  durch ABA deutet auf einen Einfluss der Abscisinsäure auf den „cell-to-cell“-Weg des Wassers hin. Wasser muss während seiner Passage durch die Pflanzenwurzel viele Membranen durchqueren. Diese Membranschritte sind geschwindigkeitsbestimmend für den Wassertransport.

Unter Bedingungen von Wassermangel, bei erhöhter ABA-Synthese im Wurzelgewebe, kann in der Wurzel durch Verbesserung des symplastischen Weges der Wassertransport optimiert werden, insbesondere dann, wenn eine Exodermis einen erhöhten apoplastischen ABA-Gehalt ermöglicht.

Für Wurzeln von *Helianthus annuus* wurde in 4.1 ein vorwiegend symplastischer Wasser- und Stofftransport postuliert. Die Tatsache, dass ABA bei einem subatmosphärischen Druck von  $-0.03 \text{ MPa}$  zu einer Steigerung des radialen

---

stimulierende Wirkung von ABA auf die Zelleitfähigkeit sollte in Pflanzenarten mit dominierend symplastischem Wassertransport ausgeprägter sein.

### **4.3.3 ABA-Effekt auf Zellebene**

Bereits Markhart et al. (1979) sowie Glinka und Abir (1989) stellten die These auf, dass ABA auf die Zellmembran wirkt und diese hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften ändert.

In der vorliegenden Arbeit hatte ABA in Konzentrationen, wie sie in gestressten Pflanzenteilen zu finden sind (100 nM bzw. 1000 nM: Masia et al. 1994, Hartung et al. 1999), den stärksten Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit auf Zellniveau. Inkubation der Maiswurzeln in 100 nM bzw. 1000 nM ABA erhöhte  $L_p$  um den Faktor 7 bzw. 27 über den Kontrolllevel. 10 nM ABA, eine Konzentration wie sie im Apoplasten ungestresster Maiswurzeln anzutreffen ist (3.2.1.3.1), zeigte keinen Effekt.

Maxima der  $L_p$ -Zunahmen entstanden 1 h nach ABA-Inkubationsbeginn. Danach nahm  $L_p$  wieder bis auf das Kontrollniveau ab. Nur zu Beginn eines stressinduzierten ABA-Signals steigt in der Wurzel die hydraulische Leitfähigkeit an. Auch Fournier et al. (1987) bemerkten bei ABA 2 bis 3 h nach Applikation noch eine Steigerung des Wasserflusses. Nach 24 h war dieser Effekt nur noch schwach zu erkennen, oder er war negativ.

Bei beginnendem Wasserstress erzeugt ABA sowohl durch Biosynthese als auch durch Erhöhung der Wurzelwasserleitfähigkeit ein sich verstärkendes Hormonsignal. Dieses wird mit dem Wasserfluss zu den Blättern transportiert und schließt dort die Stomata.

Eine andauernde Erhöhung von  $L_p$  und  $L_{pr}$  bei bereits geschlossenen Stomata wäre nicht sinnvoll. Ein transienter Effekt auf die Leitfähigkeit, wie er gefunden wurde, sorgt dafür, dass die Pflanze immer mit ausreichend Wasser versorgt ist.

### **4.3.4 Einfluss des pH-Wertes**

Eine Erhöhung der Zelleitfähigkeit fand nur unter sauren Bedingungen (Medien-pH = 5.5) statt. Applikation von ABA in alkalisches Medium (pH = 8; über 99% der ABA liegt als Anion vor) konnte  $L_p$  nicht stimulieren.

---

Bürner et al. (1993) zeigten, dass das ABA-Anion nicht in künstliche Phospholipid-Monolayer eingebaut werden kann.

Dies wiederum führt zu der Schlussfolgerung, dass der ABA-Rezeptionsort für die Regulation von  $L_p$  innerhalb der Zelle oder in der Zellmembran liegen muss.

Für Schließzellen wurde gefunden, dass der ABA-Rezeptionsort auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembranen liegt, da eine Alkalisierung des Schließzellenapoplasten den Stomataschluss nicht verhinderte (Hartung 1983, Wilkinson und Davies 1997, Hartung et al. 1998).

Eine ABA-Mikroinjektion in die Schließzellen führte zu keinem Effekt, Injektion in den Apoplasten jedoch bewirkte Stomata-Schluss (Anderson et al. 1994). Für auswärtsgerichtete, ABA-sensitive  $K^+$ -Kanäle wurden ebenfalls extrazelluläre Perzeptionsorte nachgewiesen (Jeannette et al. 1999). Hornberg und Weiler (1984) lokalisierten eine ABA-Bindungsstelle an der Plasmalemmaaußenseite von *Vicia faba*-Schließzellen, was kürzlich von Desikan et al. (1999) für Reis bestätigt wurde.

Pflanzenzellen unterschiedlicher Gewebe können also unterschiedliche ABA-Perzeptionsorte und -mechanismen besitzen. Dies ermöglicht eine Vielfalt von Wirkungen für ein Pflanzenhormon.

#### **4.3.5 Spezifität des ABA-Signals**

Die Stimulierung der hydraulischen Leitfähigkeit war sowohl auf Zell- als auch auf Wurzelebene spezifisch für ABA. Andere ABA-Isomere, -derivate und Pflanzenhormone zeigten keinen Effekt (3.5.2 und 3.5.4.4).

Das Ansteigen des Wasserflusses  $J_{vr}$  nach Applikation von ABA-Glucoseester ist wahrscheinlich ein Ergebnis der Spaltung des ABA-Konjugates durch eine  $\beta$ -Glucosidase, wie sie im Apoplasten von Blättern (Dietz et al. 2000) und Maiswurzelcortex (Sauter und Hartung 2000) nachgewiesen wurde.

(-)-cis-trans-ABA schien in Lösung nicht stabil zu sein. Eingefroren bei  $-25^\circ\text{C}$  wandelten sich 4% der (-)-cis-trans-ABA in das (+)-Enantiomer um. Ein zusätzlicher Tag Aufbewahrung bei  $8^\circ\text{C}$  im Dunkeln bewirkte eine 10%ige Umwandlung. Zwei weitere Stunden bei  $25^\circ\text{C}$  in Nährlösung, wie für Versuchszwecke notwendig, wandelten 30% der eingesetzten (-)-cis-trans-ABA in die physiologisch aktive (+)-cis-trans-ABA um.

---

Maiswurzeln, deren Wasserflüsse sofort nach Auftauen der (-)-cis-trans-ABA-Lösung aus -25°C getestet worden waren, zeigten keinen  $J_{Vr}$ -Anstieg. Wurde diese Lösung einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt, stieg  $J_{Vr}$  der Versuchspflanzen um den Faktor 1.5. Der leichte Wasserflussanstieg nach Applikation von (-)-cis-trans-ABA ist somit wahrscheinlich auf eine „Kontaminierung“ mit (+)-cis-trans-ABA zurückzuführen.

Der Effekt des synthetischen ABA-Analogs LAB 173 117 (Jung und Grossmann 1986) ist schwieriger zu erklären. LAB 173 117 ist eine Mischung aus verschiedenen Isomeren. Diese wird von einem monoklonalen Antikörper gegen (+)-cis-trans ABA zu 100% erkannt. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich während der Lagerung ABA gebildet hat.

Cytokinine wie Kinetin und Zeatin reduzierten  $J_{Vr}$  leicht. Auxin (Indol-3-Essigsäure) und Essigsäure, die denselben  $pK_a$  wie ABA haben, erniedrigten  $J_{Vr}$  ebenfalls tendenziell. Eine Stimulation des radialen Wasserflusses durch Maiswurzeln wird somit nicht durch andere Phytohormone erreicht und ist auch kein Säureeffekt.

Einen leicht stimulierenden Effekt hatte auch der (+)-cis-trans-ABA-Methylester auf  $J_{Vr}$ .

Von Churchill et al. (1992) wird berichtet, dass ABA-Methylester die Kältetoleranz von *Bromus inermis* um 75% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle erhöhte. ABA-Methylester war damit nach (+)-cis-trans-ABA das aktivste der getesteten ABA-Derivate. Jung und Grossmann (1985) berichten von einer vergleichbaren Aktivität von ABA und ABA-Methylester bei der Erniedrigung der Transpiration von *Hordeum vulgare*. Die Blattalterung wurde ebenfalls beschleunigt jedoch nur halb so effektiv wie durch ABA. Eine Spaltung der Esterbindung und eine Freisetzung von ABA durch Esterasen des Wurzelcortexapoplasten kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Auf Wurzelebene muss demnach für die Regulierung der hydraulischen Leitfähigkeit der Wurzel ein Mechanismus existieren, der spezifisch für (+)-cis-trans-ABA ist.

#### **4.3.6 Aquaporine: Schlüssel zur ABA-regulierten Wasserleitfähigkeit von Pflanzenwurzeln?**

Aquaporinvermittelter Wassertransport durch Zellmembranen mit einer Aktivierungsenergie  $<5 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Engel et al. 2000) findet sowohl in tierischen

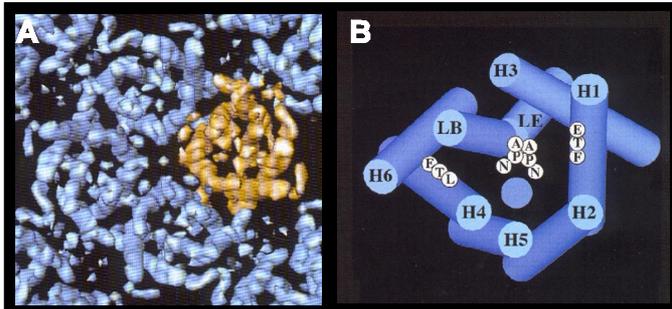
Preston und Agre 1991) als auch in pflanzlichen Geweben (Wayne und Tazawa 1990, Henzler und Steudle 1995, Schäffner et al. 1998, Eckert et al. 1999) statt.

Agre et al. (1987) und Denker et al. (1988) gelang die Isolation eines 28 kDa großen Proteins, das in Erythrocyten und Nierentubuli exprimiert wird (CHIP: channel like integral protein of 28 kDa). Für diesen Proteintyp der MIP-Familie (Membrane intrinsic Protein) wurde 1997 der Begriff Aquaporin eingeführt.

In Pflanzen findet man Aquaporine sowohl im Plasmalemma (PIP: Plasmalemma intrinsic Protein; Daniels et al. 1994, Kammerloher et al. 1994, Maurel 1997, Tyerman et al. 1999) als auch im Tonoplasten (TIP: Tonoplast intrinsic Protein; Maurel et al. 1993, Maurel 1997, Weig et al. 1997).

Alle Aquaporine besitzen zwei hoch-konservierte Sequenzbereiche, deren zentrales Motiv als NPA-Boxen (Asparagin-Prolin-Alanin) beschrieben werden. Aquaporine sind tetramere Proteine mit 4 unabhängigen Wasserkanälen (Smith und Agre 1991, Jung et al. 1994, Engel et al. 2000) (Abb. 4-2).

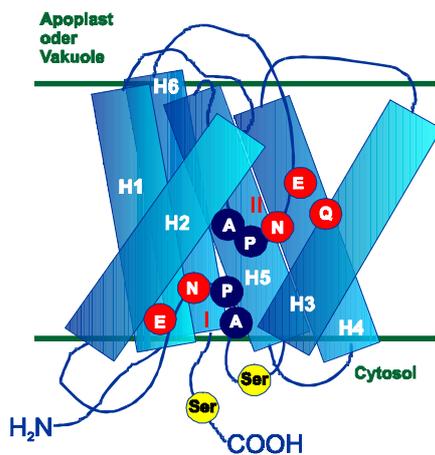
**Abb. 4-2** Die tetramere Anordnung von AQP.1 und seine 3-dimensionale molekulare Architektur. (A)



Aufsicht auf eine zentrale Tetramereinheit mit 4 Aquaporinmonomeren in jeder Ecke. (B) Anordnung der membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices (H1 bis H6) mit dem porenformenden, zentralen NPA-Motiv.

Abbildung verändert nach Engel et al. 2000

Jedes Aquaporin-Monomer besitzt 6 membrandurchspannende  $\alpha$ -Helices (Li et al. 1997). Jedes dieser Monomere hat einen Durchmesser von 6-7 nm und enthält in Aufsicht eine zentrale Vertiefung, die die Funktion einer Pore besitzt (Walz et al. 1994). Diese entsteht durch die beiden partiell hydrophoben Schleifen I und II (Abb. 4-3), die von beiden Seiten in die Membran eintauchen. Von Heymann et al. (1998) wurde das von Jung et al. (1994) konzipierte „hourglass“-Modell der 3-dimensionalen Aquaporinstruktur verfeinert.



**Abb. 4-3** Prinzipieller Bauplan eines Aquaporines der Plasmamembran und des Tonoplasten. Der erste und dritte cytosolische Loop enthält die hochkonservierte NPA- (Asparagin-Prolin-Alanin)-Box, die als relativ hydrophobe Struktur in die Plasmamembran eintaucht (I, II) und so eine 7. transmembrane Struktur erzeugt. Konservierte Serin-Stellen (Ser) werden *in vitro*, *in vivo* und im Oocyten-system phosphoryliert und dephosphoryliert und tragen wahrscheinlich zur Regulierung der Wassertransportaktivität bei.

Abbildung verändert nach Heymann et al. 1998 zitiert in Kjellbom et al. 1999

Die Autoren stellten einen variierenden Durchmesser der Pore mit Radien zwischen 0.35 bis 0.6 nm fest (Heymann et al. 1998, Scheuring et al. 1999). Am Wassertransport sollen die 5 Aminosäuren [E-N-N-E-Q] nach dem Prinzip des „single file“-Mechanismus beteiligt sein ( Abb. 4-3).

#### 4.3.6.1 Induktion von Aquaporinen durch ABA

Im tierischen System nimmt die wasserkanalvermittelte Permeabilität von Geweben nach einer Applikation des antidiuretischen Hormons Vasopressin zu (Nielsen et al. 1995).

Eine ähnliche Rolle scheint das Stresshormon Abscisinsäure bei pflanzlichen Aquaporinen zu spielen. Kaldenhoff et al. (1993 und 1996) stellten fest, dass ABA die Promotoraktivität und die Transkription von PIP1b in *A. thaliana* erhöht. Mariaux et al. (1998) zeigten, dass Transkripte von PIP1a aus *Craterostigma plantagineum* durch ABA und/oder Trockenheit reguliert werden. Gao et al. (1999) fanden einen erhöhten PIP1-Transkriptionslevel in *Brassica napus* nach ABA-Applikation.

#### 4.3.6.2 Lokalisation von Aquaporinen im Wurzelgewebe

Sowohl in Blättern als auch in Wurzeln verschiedener Pflanzen wurde die Expression von Aquaporinen hauptsächlich im vaskulären Gewebe und den umgebenden Zellen beobachtet (*Nicotiana tabacum*: Yamamoto et al. 1991, *Common ice plant*: Yamada

---

Schäffner 1998, Warkalla 1999). In Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* war die Expression von PIP1a in allen Zelltypen zu finden. Die Mitglieder der PIP2-Familie dagegen waren auf den Bereich der Endodermis und den Zentralzylinder beschränkt (Warkalla 1999).

Aquaporine sind demnach im Wurzelgewebe immer dann stark vertreten, wenn der apoplastische Transportweg durch lipophile Barrieren blockiert ist (Endodermis).

In der vorliegenden Arbeit war der Aquaporin-mRNA-Gehalt im Maiswurzelcortex, anders als bei *Arabidopsis thaliana*, immer größer als in der Wurzelstele (3.6.1).

Die verwendeten Maiskeimlinge wuchsen in feuchter Luft und besaßen, wie für Luftkultur beschrieben, eine Exodermis (3.1.2.2). Da diese apoplastische Struktur der Wasseraufnahme als signifikante Barriere entgegensteht (Zimmermann und Steudle 1998, Zimmermann et al. 2000, diese Arbeit), ist eine Aquaporin-Akkumulation im Cortex, speziell im Bereich der Exodermis, zu erwarten und sinnvoll.

#### **4.3.6.3 Regulation der Aquaporinaktivität**

Die Regulation des Aquaporinstatus in Maiswurzelcortexzellen durch ABA und somit deren  $L_p$  könnte zum einen durch eine Aktivierung der Aquaporin-Transkriptionsrate erfolgen (Kaldenhoff et al. 1995, Eckert et al. 1999).

Die Induktion der Zelleitfähigkeit ( $L_p$ ) der vorliegenden Experimente (3.5.4) nach einstündiger Inkubation von Maiswurzeln in 100 nM oder 1000 nM ABA kann jedoch nicht durch erhöhte Aquaporintranskription erklärt werden.

Inkubation des Maiswurzelcortex in verschiedenen ABA-Konzentrationen zeigte, dass bis zu 2h nach Hormonapplikation keine signifikante Erhöhung von Aquaporin-mRNA detektiert werden konnte (3.6.2).

Zum anderen sind neben der transkriptionellen sind noch weitere Mechanismen der Aquaporinregulation bekannt (Kaldenhoff et al. 1999, Kjellbom et al. 1999).

$\alpha$ -TIP des Tonoplasten von Bohne und *PM28A* des Spinatplasmalemmas wurden durch Phosphorylierung aktiviert (Johansson et al. 1996, Maurel et al. 1995). Als Phosphorylierungsstelle dienen die Aminosäuren Serin und Threonin im ersten cytoplasmatischen Loop des Proteins. Diese Phosphorylierungsstelle ist in allen Aquaporinen konserviert, unterscheidet sich aber zwischen PIPs und TIPs. Aktivierung erfolgt durch eine membrangebundene  $Ca^{2+}$ -abhängig Proteinkinase

---

In tierischen Nierenzellen tritt eine weitere Möglichkeit der Aquaporinregulation auf. Vasopressin bindet an der extrazellulären Seite der Zellmembran und aktiviert eine Adenylat-Zyklase. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A phosphoryliert AQP.2 in periplasmatischen Vesikeln, die daraufhin mit der apikalen Zellmembran fusionieren und somit die Membranpermeabilität für Wasser erhöhen (Nielsen et al.1995).

Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wurde für PIP1 mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie nachgewiesen (Robinson et al. 1996). Einstülpungen der Plasmamembran wanderten in das Cytosol und weiter in die Zentralvakuole von Mesophyllzellen von *A. thaliana*.

Trotz dieser weiteren Aktivierungsmöglichkeiten zeigten *antisense*-Konstrukte von *Nicotiana tabacum* bezüglich des Aquaporins 1 (*Nt.AQP.1*) im Tonoplasten und Plasmalemma keinen verminderten Wasserflussanstieg nach ABA-Applikation im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollen (3.6.4).

In antisense-Konstrukten wird die Produktion an mRNA des transformierten Gens zwar reduziert, jedoch nicht völlig unterdrückt (Prof. Dr. R. Kaldenhoff und Dr. A. Weig, persönliche Mitteilung). Die Menge an produziertem PIP *Nt.AQP.1* und TIP *Nt.AQP.1* könnte immer noch ausreichen, um im aktivierten Zustand  $J_{Vr}$  nach ABA-Applikation ansteigen zu lassen. Zudem wurde gefunden, dass Aquaporine ca. 20% der gesamten, integralen Membranproteine stellen (Kjellbom et al. 1999, Johansson et al. 1996). Inzwischen wurden 27 Mitglieder der MIP-Familie analysiert (Kjellbom et al. 1999, Weig et al. 1997). Der partielle Ausfall eines Aquaporins muss demnach keine erkennbare Auswirkung haben.