
3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung des Pflanzenmaterials

3.1.1 Pflanzenmorphologie

3.1.1.1 *Zea mays* L.

Karyopsen von *Zea mays* wurden 4 Tage bei 25°C im Dunkeln vorgekeimt. Neben der Primärwurzel entwickelten die Pflanzen 3 bis 5 weitere, dem mesokotylen Bereich entspringende Wurzeln. Die Länge der Primärwurzel betrug zu diesem Zeitpunkt 86 ± 16 mm, die Mesokotyle waren 46 ± 12 mm lang (MW \pm SD, n = 30). Die, noch von der Koleoptile geschützten, Primärblätter hatten eine Länge von 21 ± 4 mm (MW \pm SD, n = 30 Pflanzen).

Abb. 3-1 11 Tage alte Maiswurzeln, 7 Tage entweder in Hydro- oder Luftkultur angezogen. Aeroponische kultivierte Maiswurzeln entwickelten innerhalb dieser Wachstumswoche ein größeres Wurzelsystem als hydroponisch kultivierte.



Nach siebentägiger Kultur entweder in Hydro- oder Luftkultur erreichte die Primärwurzel eine Länge von 0.40 ± 0.05 m bzw. 0.53 ± 0.05 m (MW \pm SD, n = 36-51 Wurzeln) (Abb. 3-1).

Versuchspflanzen aus Hydrokultur entwickelten ein Frischgewicht (FG) von 0.57 ± 0.34 g mit einer Wurzeloberfläche von 0.005 ± 0.003 m² (MW \pm SD, n = 64 Wurzeln). Gleichaltrige Pflanzen aus Luftkultur erreichten ein Wurzel-FG von 1.95 ± 0.02 g mit einer Wurzeloberfläche von 0.018 ± 0.0001 m² (MW \pm SD, n = 56 Wurzeln). Das Wurzelwachstum von *Zea mays* war somit in Luftkultur signifikant erhöht (T-Test (A); $p \leq 0.0001$). Der relative Wurzelwassergehalt lag bei beiden Kulturtechniken bei 95.1 ± 0.3 % (MW \pm SD, n = 6 Wurzeln).

Anders als ihre Wurzeln, unterschieden sich die Primärblätter von Pflanzen aus Hydro- und Luftkultur kaum im Wachstum. Die maximale Länge der aeroponischen Primärblätter war mit 0.20 ± 0.04 m tendenziell kürzer als die der hydroponischen Primärblätter (0.25 ± 0.01 m) (MW \pm SD, n = 6 Blätter). Insgesamt führte dies zu einem Wurzel/Spross-Verhältnis von 2.3 ± 0.3 für Maiswurzeln aus Luftkultur und 1.5 ± 0.1 für Maiswurzeln aus Hydrokultur (MW \pm SD, n = 6 Wurzeln). Die relativen Wassergehalte (RWG) der Blätter waren mit 91.8 ± 0.5 % für beide Kulturbedingungen gleich.

3.1.1.2 *Helianthus annuus* L.



Samen von *Helianthus annuus* wurden 4 Tage bei 25 °C im Dunkeln vorgekeimt. Die Länge der entwickelten Wurzeln betrug zu diesem Zeitpunkt 43 ± 15 mm, die des Hypokotyls war 25 ± 6 mm (MW \pm SD, n = 30 Pflanzen).

Nach 6 Tagen in Hydrokultur wuchsen die Wurzeln auf Längen von 0.18 ± 0.05 m heran. Die Hypokotyle waren 0.10 ± 0.03 m lang (MW \pm SD, n = 30 Pflanzen). Untersuchte Sonnenblumenwurzeln entwickelten in dieser Zeit ein FG von 0.32 ± 0.24 g und eine Wurzeloberfläche von 0.003 ± 0.002 m² (MW \pm SD, n = 28 Wurzeln).

Das FG des Sprosses inklusive der entwickelten Blätter lag bei 1.07 ± 0.33 g (MW \pm SD, n = 30 Sprosse). Der relative Wassergehalt (RWG) der Wurzeln lag bei $94 \pm 11\%$. Die Blätter besaßen einen RWG von $96 \pm 1\%$ (MW \pm SD, n = 30 Blätter).

Abb. 3-2 Zehn Tage alter Sonnenblumenkeimling,

3.1.1.3 *Nicotiana tabacum* L.

Nach 4-wöchiger Anzucht der Tabakkeimlinge auf einem Vermikulit-Sand-Gemisch (vgl. 2.1) wurden die Pflanzen vorsichtig in Hydrokultur überführt und dort 7 bis 15 Tage weiterkultiviert (Abb. 3-3).

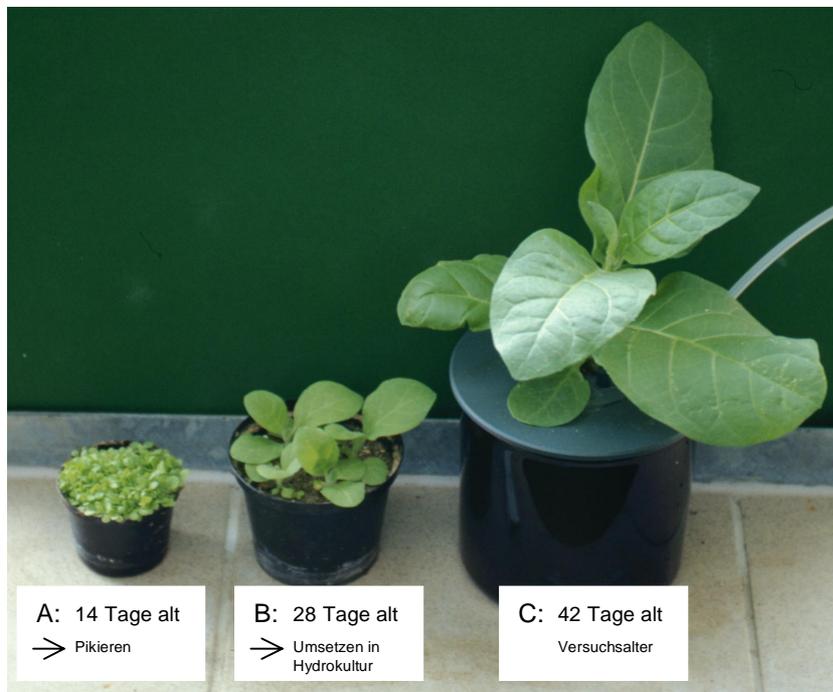


Abb. 3-3 Anzucht von *Nicotiana tabacum*. 14 Tage alte Tabakkeimlinge (A) wurden pikiert und weitere 14 Tage in einem Vermikulit-Sand-Gemisch kultiviert (B). Nach 28 bis 31 Tagen wurde das feste Substrat vorsichtig aus den Wurzeln gewaschen und die Keimlinge in Hydrokultur überführt. Nach 7 bis 14 Tagen in Hydrokultur konnten die Tabak-Pflanzen für Versuche verwendet werden (C).

Zum Versuchszeitpunkt waren die Versuchspflanzen 31 bis 58 Tage alt und besaßen Wurzelfrischgewichte von 0.45 g bis 3.37 g (Tab. 3-1).

Die transformierten Pflanzen von *N. tabacum* cv. Xanthi wiesen dabei ein um den Faktor 1.6 (Linie: TIP-M1-1) und 1.8 (Linie: TIP-M1-5) verstärktes Wurzelwachstum pro Tag im Vergleich zum Wildtyp auf. Die transformierten Pflanzen von *N. tabacum* cv. Samsun zeigten zum Versuchszeitpunkt ein geringeres Wachstum pro Tag als der Wildtyp (Faktor: 0.6).

Die Zusammenfassung der morphologischen Daten aller untersuchten Keimlinge von *Nicotiana tabacum* befindet sich in Tab. 3-1.

Tab. 3-1 Zusammenfassung der morphologischen Daten aller untersuchten Keimlinge von *Nicotiana tabacum*. Tabakpflanzen der Sorte Xanthi (TIP-M1-1 und TIP-M1-5) waren *antisense*-Konstrukte bezüglich des Nt.AQP.1 aus dem Tonoplasten (TIP). Tabakpflanzen der Sorte Samsun (PIP-18-3, PIP-4-3, PIP-11-7, PIP-3-4) waren *antisense*-Konstrukte bezüglich des Nt.AQP.1 aus dem Plasmalemma (PIP). Angegeben sind das Alter der Versuchspflanzen am Versuchstag mit der in Hydrokultur verbrachten Tage, das Wurzelfrischgewicht und die Berechnung des durchschnittlichen Wurzelwachstums pro Tag während des Anzuchtzeitraumes. MW \pm SD, n = 3 – 6 Wurzelsysteme

	Alter der Versuchspflanzen	Tage in Hydrokultur	Wurzelfrischgewicht (g)			Wurzelwachstum (g d ⁻¹ *100)		
Untersuchung von Nt.AQP.1 aus dem Tonoplasten (TIP)								
in Wurzeln von <i>Nicotiana tabacum antisense</i>-Konstrukten								
<i>N. t. cv. Xanthi</i>	(d)	(d)	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
Wildtyp	42-58	12-15	1.2	\pm	0.9	2.4	\pm	1.3
TIP-M1-1	37-43	7-8	1.5	\pm	0.7	3.8	\pm	1.8
TIP-M1-5	37-44	7-8	1.7	\pm	0.7	4.3	\pm	2.0
Untersuchung von Nt.AQP.1 aus dem Plasmalemma (PIP)								
in Wurzeln von <i>Nicotiana tabacum antisense</i>-Konstrukten								
<i>N. t. cv. Samsun</i>	(d)	(d)	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
Wildtyp	35	13	2.8	\pm	0.6	7.9	\pm	1.7
PIP-18-3	34	13	1.7	\pm	0.2	5.0	\pm	0.7
PIP-4-3	31-34	11-14	1.6	\pm	0.3	4.9	\pm	1.1
PIP-11-7	31	11	1.4	\pm	0.2	4.6	\pm	0.5
PIP-3-4	35-36	12-13	1.6	\pm	0.2	4.4	\pm	0.5

3.1.2 Wurzelanatomie

3.1.2.1 *Zea mays* L. - Hydrokultur

Bei den untersuchten Wurzeln begann die Zone der Wurzelhaarbildung 30 mm oberhalb der Wurzelspitze. Bis 100 mm oberhalb der Wurzelspitze konnte mikroskopisch weder in der Endo- noch in der Hypodermis ein Caspary'sches Band detektiert werden (Abb. 3-4 A und B). Ab durchschnittlich 110 mm über der Wurzelspitze konnte sowohl mittels Suberinfärbung (Abb. 3-4 C) als auch mittels Berberin-Fluoreszenz (Abb. 3-4 D) eine primäre Endodermis mit Caspary'schem Band nachgewiesen werden. In der Hypodermis waren zu diesem Zeitpunkt der Maiswurzelentwicklung immer wieder suberinisierte Felder in der Hypodermis zu erkennen (Abb. 3-4 E und F).

120 mm bis 140 mm oberhalb der Wurzelspitze begann die Seitenwurzelzone. In diesem Bereich fand der Übergang von einer primären in eine sekundäre Endodermis mit Suberinlamelle statt (Abb. 3-4 G). Mittels Berberin-Fluoreszenz konnte in diesem Bereich nur ein Caspary'sches Band nachgewiesen werden (Abb. 3-4 H). 180 mm oberhalb der Wurzelspitze erstreckte sich die Berberin-Fluoreszenz des endodermalen Caspary'schen Bandes über die gesamte Radialwand (Abb. 3-4 I und J). Die Suberinlamelle umkleidete indessen sowohl die radialen, als auch die tangentialen Zellwände (Abb. 3-4 K). In der Hypodermis waren weiterhin entweder nur Felder suberinisierter Zellen zu beobachten (Abb. 3-4 L) oder keine der hypodermalen Zellen produzierte Suberin (Abb. 3-4 J). Seitenwurzeln, die hier die Endodermis durchbrachen, erzeugten einen apoplastischen Bypass-Fluss (Abb. 3-4 J) (Steudle et al. 1993, Frensch et al. 1996).

280 bis 310 mm über dem Wurzelapex wurden in der Endodermis sekundäre Zellwandauflagerungen der inneren radialen und tangentialen Zellwände sichtbar (Abb. 3-4 M). Die Hypodermis wies hier keine verstärkte Suberinisierung auf (Abb. 3-4 N). Ab 330 mm oberhalb der Wurzelspitze wurde eine tertiäre Endodermis gefunden (Abb. 3-4 O und P). Zu diesem Zeitpunkt der Wurzelentwicklung verstärkte sich auch die Suberineinlagerung in der Hypodermis (Abb. 3-4 Q).

Direkt unterhalb der Wurzelbasis, in Bereichen, die zeitweilig der Luft ausgesetzt waren, konnte eine komplette Exodermis (Hypodermis mit Caspary'schem Band) und

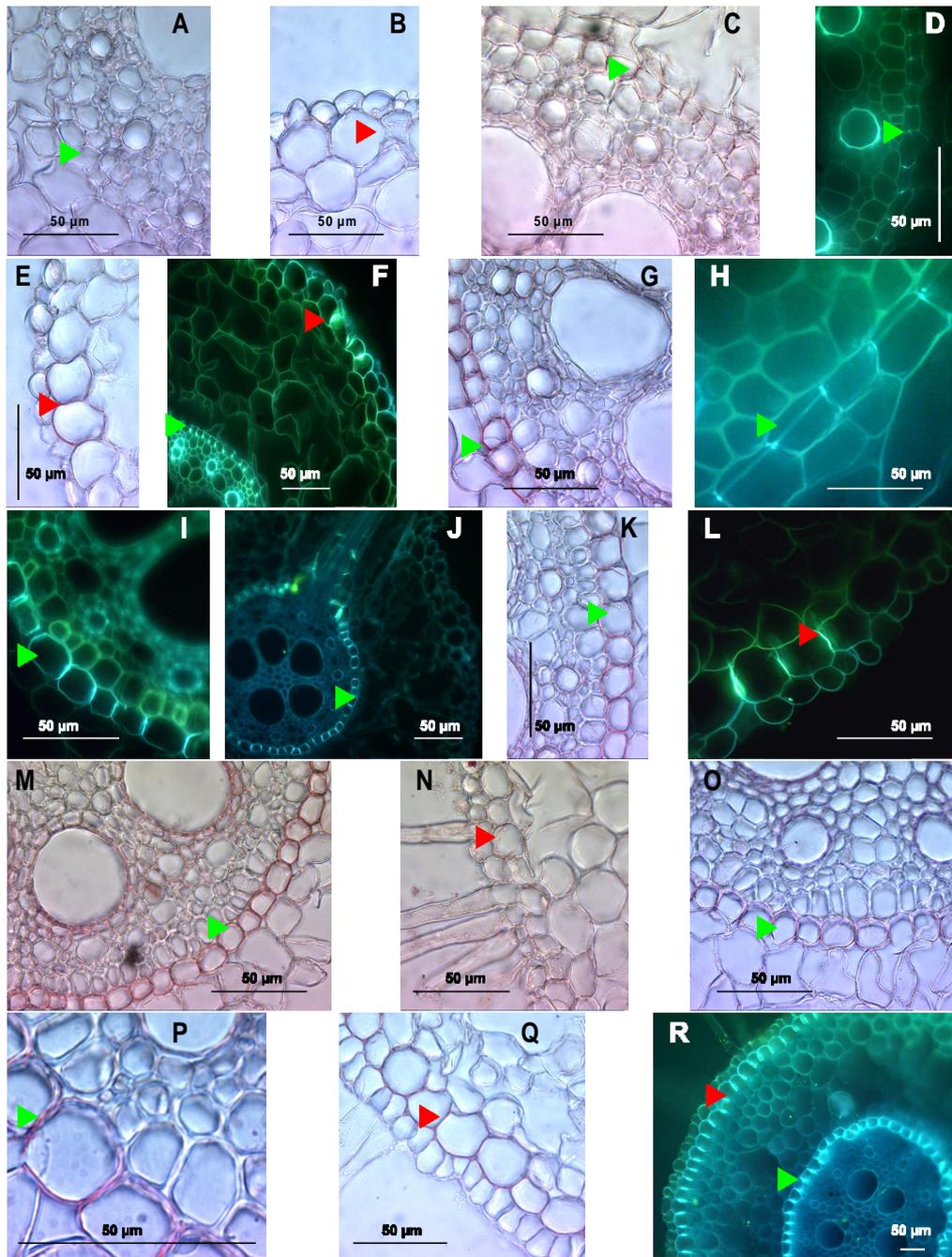


Abb. 3-4 Handschnitte 11 Tage alter Maisprimärwurzeln, angezogen in Hydrokultur. Die frischen Schnitte wurden entweder mit Suberin III (A, B, C, E, G, K, M, N, O, P, Q) oder mit Berberin-Hemisulfat / Anilin-Blau-O (D, F, H, I, J, L, R) (vgl. 2.2.2) gefärbt. Die Vergrößerungen waren 200x, 400x oder 1000x. Die Schnitte wurden in unterschiedlichen Abständen vom Wurzelapex angefertigt: A, B: 80mm; C, D, E, F: 110 mm; G, H: 140mm; I, J, K, L: 180 mm; M, N: 300 mm; O, P, Q: 360 mm; R: 390 mm. Dargestellt ist die Entwicklung der Mais-Endodermis ▶ (C, D, F: primärer Zustand; G, H, I, J, K, M: sekundärer Zustand; O, P, R: tertiärer Zustand) und der Hypodermis ▶ (A, B, J, N: keine Suberinisierung; E, F, L: Suberinfelder; Q, R: Hypodermis mit Caspary'schem Band = Exodermis)

3.1.2.2 *Zea mays* L. - Luftkultur

Auch aeroponisch kultivierte Maispflanzen entwickelten ihre Wurzelhaarzone 30 mm oberhalb der Wurzelspitze. Diese war jedoch im Vergleich zu Hydrokulturwurzeln stärker ausgeprägt (Hofer 1996).

Bereits in diesem jungen Entwicklungszustand konnte mittels Berberin-Fluoreszenz eine primäre Endodermis mit Caspary'schem Band (Abb. 3-5 A) gefunden werden. Zusätzlich war in diesem Teil der Maiswurzel eine primäre Exodermis zu beobachten (Abb. 3-5 B).

40 mm über dem Wurzelapex belegte das hypodermale Caspary'sche Band bereits die kompletten radialen Zellwände (Abb. 3-5 C).

60 bis 70 mm oberhalb der Wurzelspitze ging der primäre Zustand sowohl der Exo- als auch der Endodermis in einen sekundären über. Die Suberinlamelle war sowohl den radialen als auch den tangentialen Zellwänden aufgelagert (Abb. 3-5 D).

120 mm bis 160 mm oberhalb der Wurzelspitze begann die Seitenwurzelzone. Sowohl Exo- als auch Endodermis wurden hier von entstehenden Lateralwurzeln durchbrochen (Abb. 3-5 E). Dies erzeugte, wie schon bei den Hydrokulturpflanzen beschrieben, apoplastische Bypass-Flüsse.

280 mm bis 300 mm oberhalb des Wurzelapex begannen sich an den inneren radialen und den tangentialen Zellwänden zusätzliche Auflagerungen anzusetzen (Abb. 3-5 F). Nach 330 mm bis 350 mm fand man eine typische, U-förmige Endodermis (Abb. 3-5 G und H) mit durchgehender, sekundärer Exodermis (Abb. 3-5 I und J).

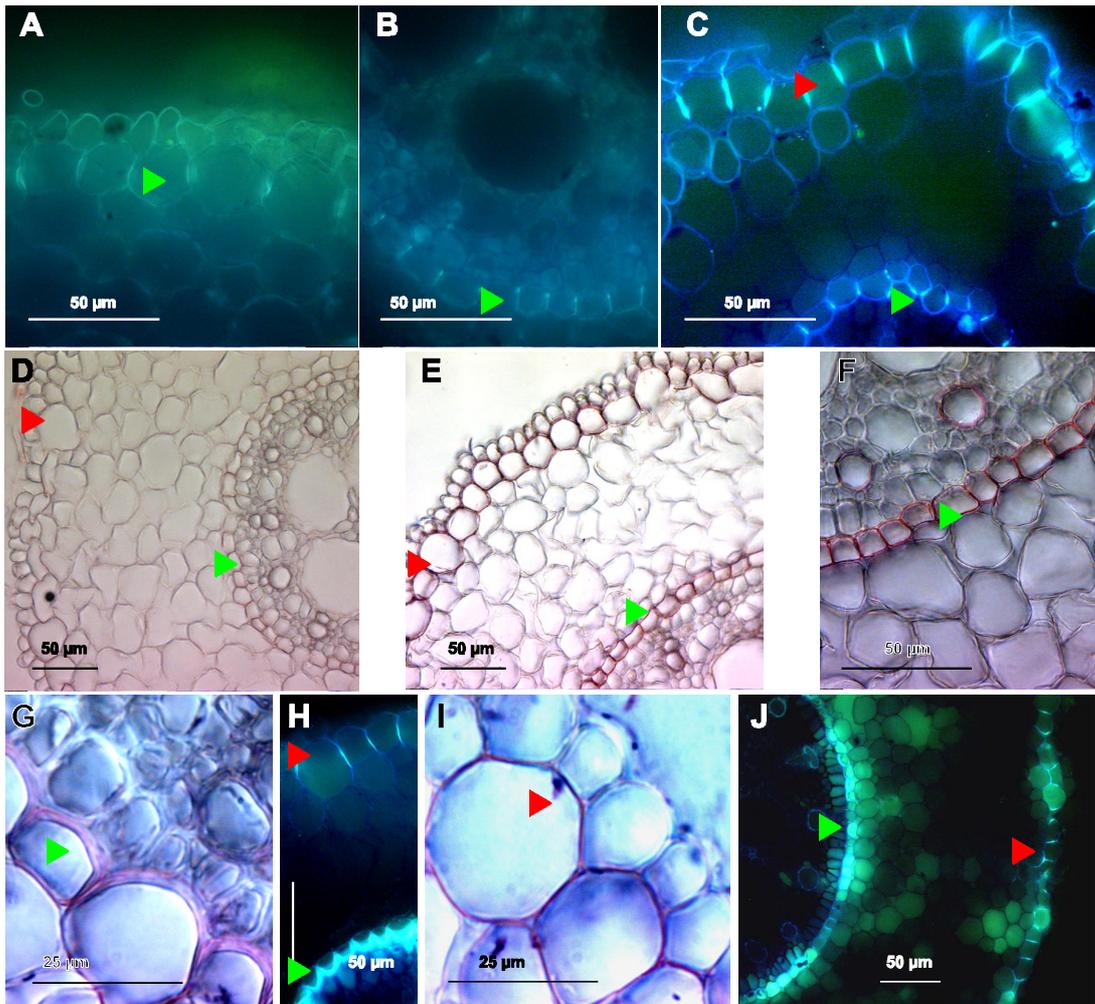


Abb. 3-5 Handschnitte 11 Tage alter Maisprimärwurzeln, angezogen in Luftkultur. Die frischen Schnitte wurden entweder mit Suberin III (D, E, F, G, I) oder mit Berberin-Hemisulfat / Anilin-Blau-O (A, B, C, H, J) (vgl. 2.2.2) gefärbt. Die Vergrößerung war 200x, 400x oder 1000x. Schnitte wurden in unterschiedlichen Abständen vom Wurzelapex angefertigt: A, B: 30 mm; C: 40 mm; D: 60 mm; E: 140 mm; F: 290 mm; G, H, I, J: 340 mm. Dargestellt ist die Entwicklung der Mais-Endodermis ► (B, C: primärer Zustand; D, E, F: sekundärer Zustand; G, H, J: tertiärer Zustand) und der Mais-Exodermis ► (Hypodermis mit Caspary'schem Band; A, C: primärer Zustand; D, E, F, H, I, J: sekundärer Zustand)

3.1.2.2.1 Vermessung der Cortexzellen

Anhand von skalierten, mikroskopischen Fotografien wurden der mittlere Zelldurchmesser und die Zelllänge von Maiswurzelcortexzellen, abhängig von der Zelllage, bestimmt. Die Wurzelquer- und Wurzellängsschnitte wurden dabei 40 bis 80 mm oberhalb der Wurzelspitze angefertigt (vgl. 2.1.2).

Die Zellen der 1. und 2. Zelllage besaßen ein Volumen von im Mittel 183 bis 188 pl und eine Zelloberfläche von 13 nm² (Tab. 3-2).

Tab. 3-2 Zelldurchmesser, Zelllänge, mittleres Zellvolumen und mittlere Zelloberfläche von Maiswurzelcortexzellen. Zelllage 1 ist die äußerste Zellschicht des Wurzelcortex nach der Rhizodermis. Die Zelllagen 2 bis 6 folgen in Richtung Stele. Für den Zelldurchmesser und die –länge ist der MW ± SD gegeben, n = Anzahl der Zellen. Aus den Mittelwerten von Zelldurchmesser und Zelllänge wurde die mittlere Zelloberfläche berechnet.

	Zelllage											
Rhizodermis←	1		2		3		4		5		6	
Zelldurchmesser (10 ⁻⁶ m)	29	± 6	29	± 7	32	± 15	32	± 7	31	± 7	31	± 6
	n	= 100	n	= 100	n	= 100	n	= 100	n	= 100	n	= 100
Zelllänge (10 ⁻⁶ m)	138	± 48	143	± 61	139	± 50	133	± 46	143	± 45	142	± 50
	n	= 41	n	= 50	n	= 56	n	= 55	n	= 51	n	= 53
mittleres Zellvolumen (10 ⁻¹⁵ m ³)	183		188		210		214		213		217	
mittlere Zelloberfläche (10 ⁻⁹ m ²)	13		13		14		13		14		14	

3.1.2.3 *Helianthus annuus* L. - Hydrokultur

Sonnenblumenwurzeln aus Hydrokultur entwickelten selbst in der ältesten Wurzelzone an der Wurzelbasis keine mit Suberin III oder Berberin-Hemisulfat färbbaren Suberinlamellen oder Caspary'sche Streifen in der Endo- oder Hypodermis (Abb. 3-6 A). Die fluoreszierenden Spots in den Zellwandkreuzungspunkten zwischen der innersten corticalen und der äußeren stelären Zellschicht stellen Harzkanäle dar (Abb. 3-6 B) (Tetley 1925, Williams 1954). Die Fluoreszenz dieser

enzymatischem Verdau der Wurzel (vgl. 2.3.3) konnten eine hypodermale und eine endodermale Zellschicht isoliert werden. Dies zeigte bereits, trotz des negativen Färberesultats, das Vorhandensein einer suberinisierten und/oder lignifizierten Hypo- und Endodermis an. Die isolierten endodermalen Gewebe von *Helianthus annuus* enthielten in regelmäßigen Abständen verdickte, fortlaufende „Kanäle“ in den radialen Zellwänden. Diese Kanäle zeigten eine starke Eigenfluoreszenz (Abb. 3-6 D).

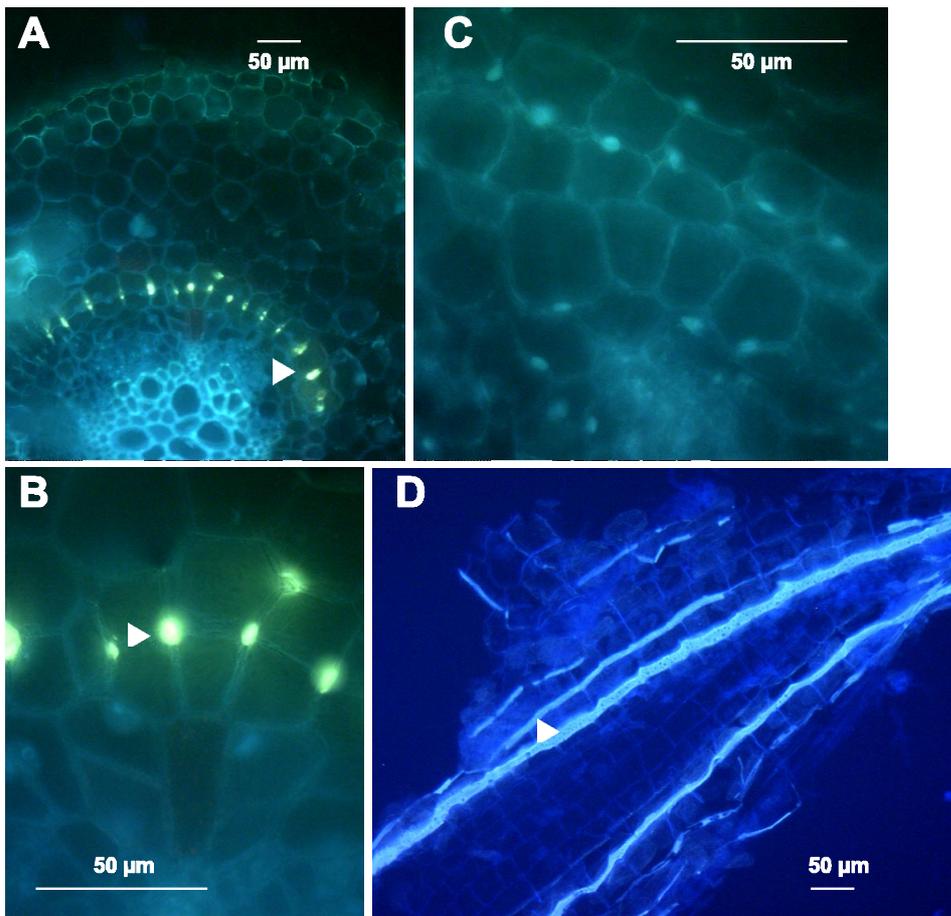


Abb. 3-6 Handschnitte und endodermales Gewebe 10 Tage alter Sonnenblumenwurzeln, angezogen in Hydrokultur. Die Abbildungen stammen aus dem ältesten Bereich der Hauptwurzel, direkt unter der Wurzelbasis. Die Vergrößerungen betragen 100x und 400x. Schnitt A wurde mit Berberin-Hemisulfat / Anilin-Blau-O (vgl. 2.2.2) angefärbt. Die Proben B, C und D sind ungefärbt. Schnitt C wurde 1h in einem Gemisch von Chloroform / Methanol (1:1; v/v) extrahiert. Abbildung D stellt ein Stück isoliertes Endodermisgewebe dar. Auffällig sind in A, B und D die fluoreszierenden Harzkanäle ▷.

3.1.3 Chemische Charakterisierung

3.1.3.1 Elementaranalysen von Wurzeln und Blättern von *Zea mays* L.

Neben der Analyse der ABA-Verhältnisse in *Zea mays* L. cv Helix der beiden Anzuchtmethoden Hydro- und Luftkultur wurden Elementaranalysen von getrocknetem Blatt- und Wurzelgewebe (vgl. 2.3.1) durchgeführt (Tab. 3-3). Dies geschah, um die Nährstoffversorgung der Pflanzen unter den beiden Kulturbedingungen vergleichen zu können.

Tab. 3-3 Elementaranalysen von getrockneten Wurzel- und Blattgewebeproben intakter Pflanzen von *Zea mays* L. cv Helix. Die Maispflanzen wurden sowohl in Hydro- als auch in Luftkultur angezogen. Die Gehalte sind als Gewichtsprozent angegeben. Das Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis (C/N-Verhältnis) ist auf die molare Masse der beiden Elemente bezogen. MW \pm SD, n = 6 Gewebeproben

<i>Zea mays</i> L.				
Nährstoff	Hydrokultur		Luftkultur	
	Gew.-% der Blätter	Gew.-% der Wurzeln	Gew.-% der Blätter	Gew.-% der Wurzeln
Kohlenstoff	39.4 \pm 0.8	34.0 \pm 0.6	40.6 \pm 0.4	36.8 \pm 0.5
Stickstoff	5.4 \pm 0.1	5.2 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2
C/N Verhältnis	8.5	7.6	10.7	14.8
Wasserstoff	5.4 \pm 0.1	5.2 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2
Schwefel	0.30 \pm 0.01	0.60 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	0.80 \pm 0.07
Phosphor	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Kalium	6.6 \pm 0.4	7.2 \pm 0.2	6.2 \pm 0.6	6.5 \pm 0.8
Magnesium	0.30 \pm 0.02	0.40 \pm 0.04	0.30 \pm 0.02	0.50 \pm 0.06
Calcium	0.30 \pm 0.02	0.50 \pm 0.04	0.40 \pm 0.03	0.60 \pm 0.05
Natrium	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Eisen	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Aluminium	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Mangan	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Zink	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

Die Gewebe enthielten Gehalte an detektierbaren Elementen, die gut ernährten und

Pflanzen aus Hydro- und Luftkultur waren keine nennenswerten Unterschiede zu analysieren. Das C/N-Verhältnis der Blätter war für beide Kultivationsstechniken 8. Aeroponische Wurzeln hatten ein C/N-Verhältnis von 15, hydroponische ein C/N-Verhältnis von 11.

3.1.3.2 Suberinbestimmung in Hypo- und Endodermisisolaten aus *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L.

Um die mikroskopischen Ergebnisse aus 3.1.2 zu ergänzen, wurden neben den oben genannten Inhaltsstoffen der Suberingehalt enzymatisch isolierter Hypo- und Endodermen von *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L. bestimmt (vgl. 2.3.3). Jeder Einzelwert wurde aus 30 Einzelpflanzen gewonnen. Die Reproduzierbarkeit der Methode lag für unabhängige Anzuchten bei 15% (Zeier 1998).

Mais wurde sowohl in Hydro- als auch in Luftkultur angezogen. Zum Erntezeitpunkt waren die Pflanzen 11 Tage alt, wobei sie jeweils 7 Tage unter den verschiedenen Kulturbedingungen heranwuchsen. Aeroponisch kultivierte Wurzeln waren zu diesem Zeitpunkt 0.54 ± 0.04 m lang (MW \pm SD, n = 30). Hydroponisch kultivierte Wurzeln erreichten dagegen nur eine Länge von 0.40 ± 0.05 m (MW \pm SD; n = 30).

Die Wurzeln wurden jeweils in 5 gleichgroße Stücke zerteilt und analysiert (2.3.3.1). Zone 1 beinhaltete den jüngsten Wurzelteil (Apex), Zone 5 den Ältesten (Wurzelbasis) (Abb. 3-7).

Hypodermisisolat von Wurzeln aus Luftkultur enthielten bis hin zur Wurzelbasis mehr aliphatisches Suberin als Maiswurzeln aus Hydrokultur (Abb. 3-7 A). Am größten war der Unterschied in den jüngeren Wurzelbereichen. Zone 2 der aeroponischen Wurzeln enthielt 1.5 mal soviel Suberin (1.7 % des TG) im Vergleich zu Hydrokulturwurzeln (1.1 % des TG).

Ein Vergleich der Suberingehalte der hypodermalen mit den endodermalen Zellwandisolaten von Maiswurzeln zeigte, dass die Endodermis beider Kultivationsstechniken mehr Suberin enthielt als die Hypodermis. Für das aliphatische Suberin lag der Faktor bei 1 bis 4 (Abb. 3-7 B), für das aromatische bei 1 bis 2 (Abb. 3-7 C und D).

Ein deutlicher Unterschied der endodermalen Suberingehalte war, im Vergleich zur Hydrokultur, bei den isolierten Hypodermen im jüngeren Wurzelbereich jedoch nicht

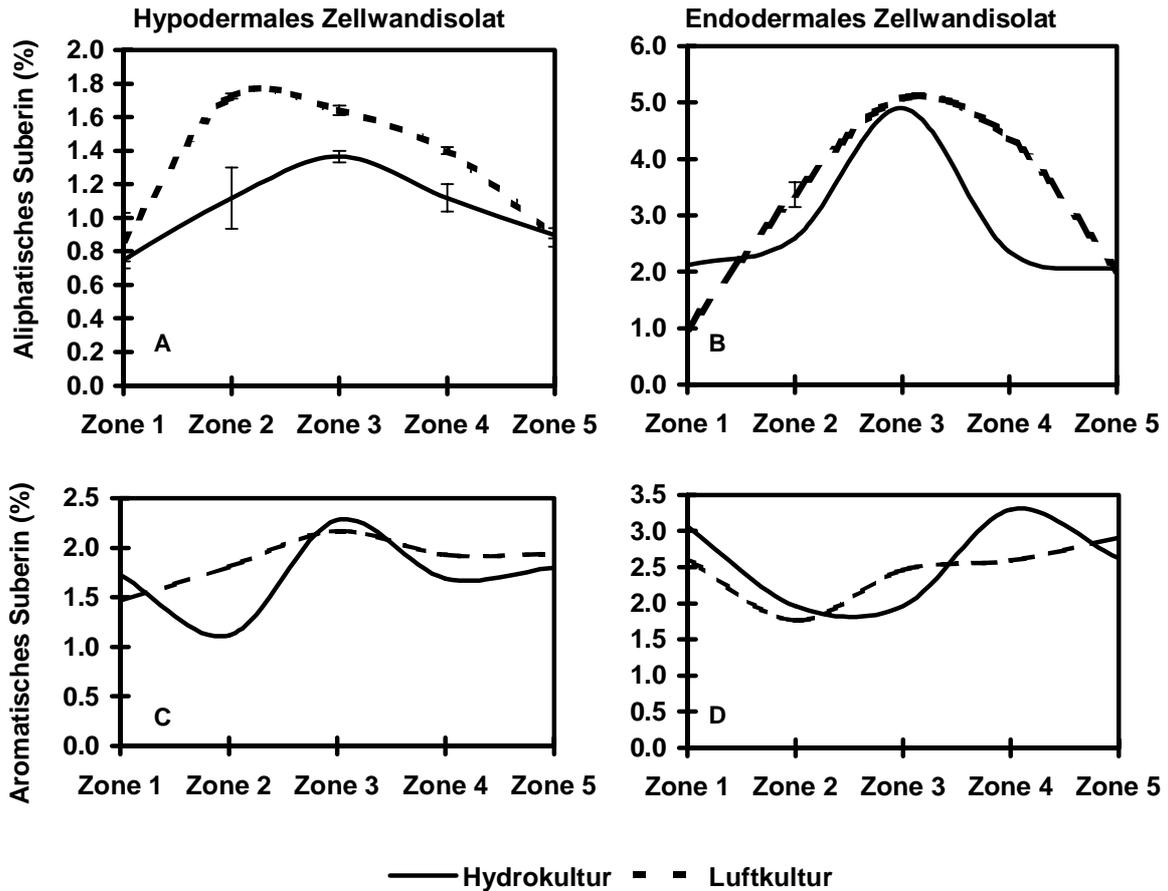


Abb. 3-7 Gehalte an aliphatischem und aromatischem Suberin aus hypodermalen und endodermalen Zellwandisolaten von 11 Tage alten *Zea mays* Keimlingen. Die Pflanzen wurden entweder 7 Tage in Hydrokultur (—) oder parallel dazu 7 Tage in Luftkultur (- -) angezogen. Die erhaltenen Primärwurzeln wurden in 5 gleich große Stücke zerteilt (Zone 1: Wurzelapex bis Zone 5: Wurzelbasis). Diese wurden getrennt voneinander untersucht. MW \pm MA aus 2 unabhängigen Anzuchten von 30 Pflanzen

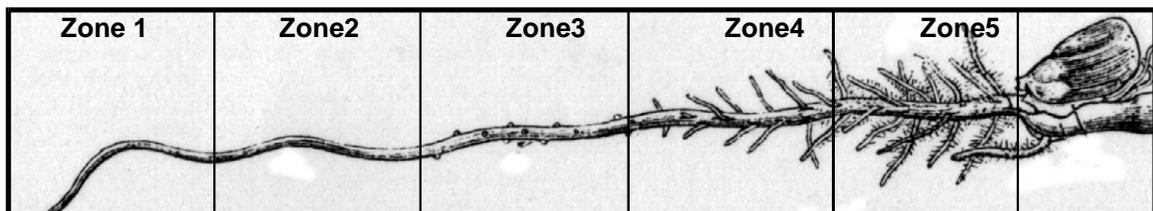


Abbildung entnommen aus: Julius von Sachs, Lehrbuch der Botanik, 1873

Der Gehalt an estergebundenen Aromaten (aromatisches Suberin) änderte sich dagegen weder im Verlauf der Wurzelentwicklung noch bei den unterschiedlichen Kultivationsmethoden (s. Abb. 3-7 C und D).

Bei einer Untersuchung von *Helianthus annuus* aus Hydrokultur zeigte sich dagegen, dass diese dikotyle Pflanze in den hypodermalen Zellwandisolaten sowohl mehr an aromatischem (Faktor 3) als auch an aliphatischem Suberin (Faktor 2) im Vergleich zum endodermalen Isolat (Abb. 3-8) besaß.

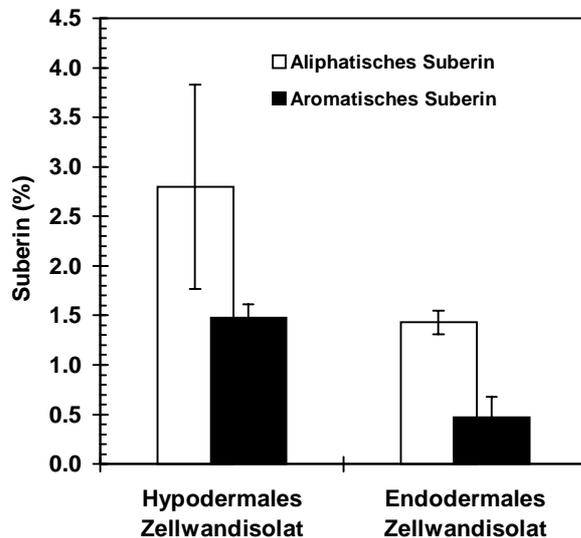


Abb. 3-8 Gehalt an aromatischem (■) und aliphatischem (□) Suberin der hypodermalen und endodermalen Zellwandisolate von *Helianthus annuus* L. aus 30 Wurzeln. Die Angaben in % beziehen sich auf den Anteil am Trockengewicht. MW ± MA, n = 2

3.1.3.3 Abscisinsäure (ABA)-Gehalte in Wurzeln und Blättern von *Zea mays* L.

Wurzel- und Blattgewebe von 11 Tage alten Maiskeimlingen, jeweils 7 Tage entweder in Hydro- oder Luftkultur kultiviert (vgl. 2.1), wurden auf ihren endogenen ABA-Gehalt hin überprüft (Abb. 3-9). Die Wurzeln enthielten bei beiden Anzuchtmethoden mehr ABA als die Blätter (Faktor 1.4 bei Luftkultur, nicht signifikant, T-Test (B), $p > 0.3$; Faktor 2.3 bei Hydrokultur, signifikant, T-Test (B), $p \leq 0.05$). Ein Vergleich der ABA-Gehalte von Wurzeln beider Anzuchtmethoden ergab keinen signifikanten Unterschied (Hydrokultur: $4.3 \pm 2.0 \text{ pmol (g FG)}^{-1}$, n= 6; Luftkultur: $5.3 \pm 2.3 \text{ pmol (g FG)}^{-1}$, n=6), jedoch eine Tendenz leicht erhöhter ABA-Gehalte in der aeroponischen Kultur. Blätter aus aeroponisch angezogenen Maispflanzen ($3.8 \pm 1.3 \text{ pmol (g FG)}^{-1}$, n=8) enthielten doppelt soviel Abscisinsäure (T-Test (A) , $p \leq 0.01$) im Vergleich zu hydroponischen Blättern ($1.93 \pm 0.4 \text{ pmol (g FG)}^{-1}$, n=7).

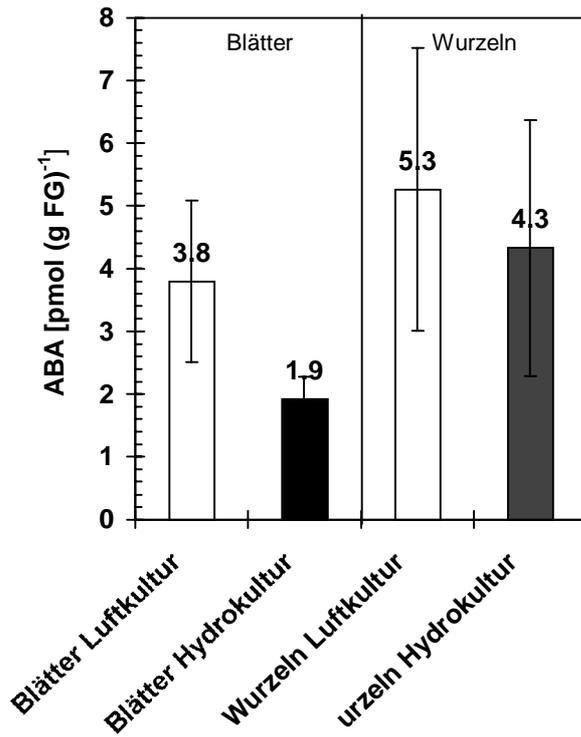


Abb. 3-9 Gewebe-ABA-Gehalte [pmol (g FG)⁻¹] von Primärblättern und Wurzeln von *Zea mays* L. Die Keimlinge wurden sowohl in Hydrokultur (■) als auch in Luftkultur angezogen (□). MW ± SD, n = 6 – 8 Wurzeln

3.2 Transportstudien

3.2.1 Transport von Abscisinsäure

3.2.1.1 ABA-Produktion in Wurzeln von *Zea mays* L. unter Trockenstress

Intakte, 11 Tage alte Maispflanzen, die je 7 Tage sowohl aeroponisch als auch hydroponisch kultiviert waren, wurden in einen Klimaschrank zur Austrocknung gehängt. An mehreren Zeitpunkten zwischen Versuchsbeginn und 5 Stunden nach diesem (Abb. 3-10) wurden die Wurzeln geerntet und mittels ELISA der ABA-Gehalt der Gewebe bestimmt.

In Wurzeln aus beiden Kultivierungstechniken war der ABA Gehalt bereits nach 30 min Austrocknung signifikant (einseitiger T-Test (A) , $p \leq 0.03$, Faktor 1.6 (Hydrokultur) und 1.8 (Luftkultur)) über den endogenen Gehalt ungestresster Pflanzen bei Versuchsbeginn [$5 \text{ pmol (g FG)}^{-1}$] gestiegen. Nach 1 Stunde Austrocknung hatte sich der endogene ABA-Gehalt um den Faktor 3.4 erhöht, bei Hydrokulturwurzeln um den Faktor 7 (Tab. 3-4).

Tab. 3-4 Abscisinsäuregehalte in Primärwurzeln von *Zea mays* L. aus Hydrokultur und Luftkultur in pmol bezogen auf 1 g FG. Es ist der ABA-Gehalt der ungestressten Kontrollen (0h) und der trockengestressten Wurzeln angegeben. Der ABA Gehalt steigt mit der Dauer des Trockenstresses. Er kann bei hydroponischen Wurzeln nach einer Wiederbewässerung wieder auf sein Ausgangsniveau reduziert werden. MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

Gehalt an ABA in Wurzeln von <i>Zea mays</i> L.		
	Hydrokultur	Luftkultur
Austrocknungsdauer	[pmol (g FG)^{-1}]	[pmol (g FG)^{-1}]
(h)	MW \pm SD	MW \pm SD
0	5.2 \pm 0.9	5.3 \pm 1.5
0.5	8.3 \pm 1.7	9.8 \pm 6.5
1	36.0 \pm 4.2	18.1 \pm 5.4
5	1347.7 \pm 145.5	909.5 \pm 247.1
16 h Wiederbewässerung	3.8 \pm 1.7	11.8 \pm 1.8

Nach zwei Stunden Austrocknung hatten Wurzeln aus Hydrokultur im Vergleich zu aeroponischen Wurzeln 4.2 mal soviel ABA produziert (Abb. 3-10).

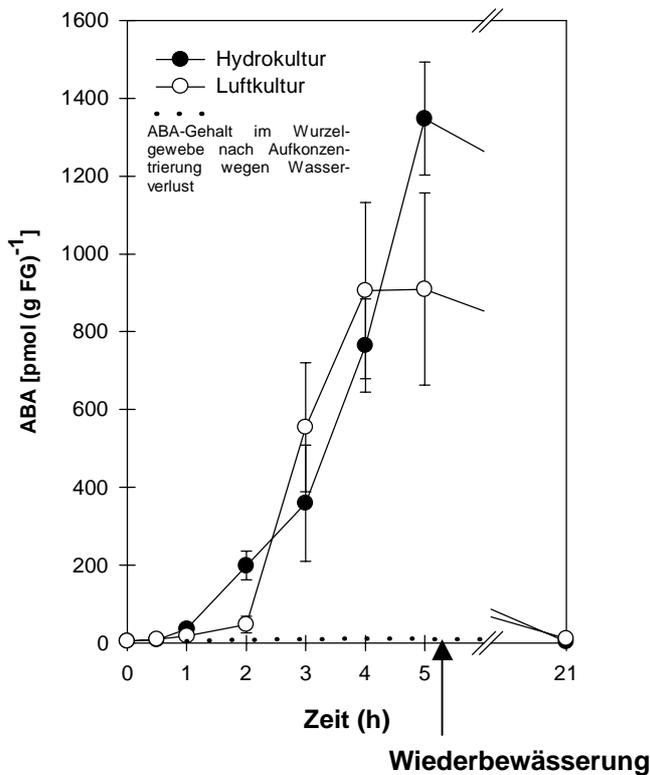


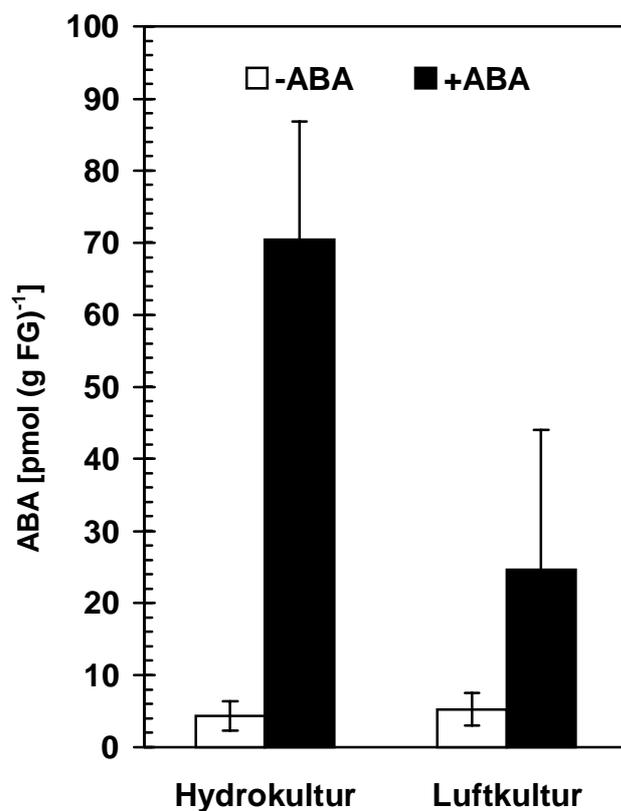
Abb. 3-10 Abscisinsäuregehalte in Primärwurzeln von *Zea mays* L. aus Hydrokultur (-●-) und Luftkultur (-○-) in (pmol g FG)⁻¹. Es ist der ABA-Gehalt der ungestressten Kontrollen (0h) und der trockengestressten Wurzeln angegeben. Die Aufkonzentrierung der ABA im Wurzelgewebe durch Wasserverlust (---) bleibt weit unter den gemessenen Werten. Der ABA-Gehalt steigt mit der Dauer des Trockenstresses. Er kann nach einer Wiederbewässerung der intakten Maispflanzen fast auf sein Ausgangsniveau reduziert werden. MW ± SD, n = 3 Wurzeln

Nach vier Stunden Austrocknung konnte bei aeroponischen Maiswurzeln kein weiterer Anstieg des stress-induzierten ABA-Gehaltes festgestellt werden. In hydroponischen Wurzeln stieg er während der 5 Stunden Austrocknung kontinuierlich an (1348 pmol (g FG)⁻¹). Durch eine reine Aufkonzentrierung der ABA im Gewebe nach Wasserverlust könnten zu diesem Zeitpunkt in Maiswurzeln beider Kulturbedingungen nur 13 pmol (g FG)⁻¹ ABA gefunden werden. Die Pflanzen verloren während dieser 5-stündigen Austrocknungszeit bis zu einer Stunde nach Austrocknungsbeginn Wasser (60%). Danach konnte kein weiterer Wasserverlust beobachtet werden (Daten nicht aufgeführt). Im Anschluß an die 5-stündige Austrocknung wurden die Pflanzen 16 Stunden wiederbewässert. Der ABA-Gehalt sank bei den in Hydrokultur angezogenen Maispflanzen auf den Ausgangswert zurück. Der ABA-Gehalt der aeroponischen Pflanzen blieb um den Faktor 2 erhöht (Tab. 3-4). Nach der Wiederbewässerung besaßen die Pflanzen ihr Ausgangsgewicht.

3.2.1.2 ABA-Aufnahme und -Efflux des Wurzelgewebes von *Zea mays* L.

3.2.1.2.1 Aufnahme in die Wurzeln intakter Pflanzen

Intakte, 11 Tage alte Maispflanzen, 7 Tage hydro- oder aeroponisch kultiviert, wurden im Gewächshaus in 500 nM ABA-Nährlösung (2.7.2) für drei Stunden unter einer Quecksilberdampflampe bei 25°C inkubiert. Das Maiswurzelgewebe enthielt bei



Versuchsbeginn endogen 4 bis 5 pmol ABA (g FG)⁻¹. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit hatten Wurzeln aus Hydrokultur [70.4 pmol (g FG)⁻¹] im Vergleich zu Wurzeln aus Luftkultur [24.6 pmol (g FG)⁻¹] (Abb. 3-11) dreimal soviel ABA aufgenommen.

Abb. 3-11 Abscisinsäuregehalt von Maiswurzeln aus Hydro- und Luftkultur vor (□) und nach (■) Inkubation in 500 nM ABA für 3 Stunden im Licht.

Der pH-Wert der Nährlösung war 5.5; MW ± SD, n = 4-6 Wurzelsysteme

3.2.1.2.2 Transport in das Xylem dekapitierter Pflanzen

11 Tage alte Mais- und 10 Tage alte Sonnenblumenpflanzen, in Hydrokultur angezogen, wurden dekapitiert und an einer Saugapparatur befestigt (2.6.2). Bei einem subatmosphärischen Druck von -0.03 MPa, der an das Xylem angelegt wurde, wurde Xylemsaft gewonnen. Exsudate dekapitierter Sonnenblumen enthielten 0.5 bis 5 nM ABA, Mais 2 bis 13 nM (Abb. 3-12 A). Nach Zugabe von 100 nM ABA zum Medium stieg der ABA-Gehalt im Xylem von *Zea mays* bis auf 22 nM an.

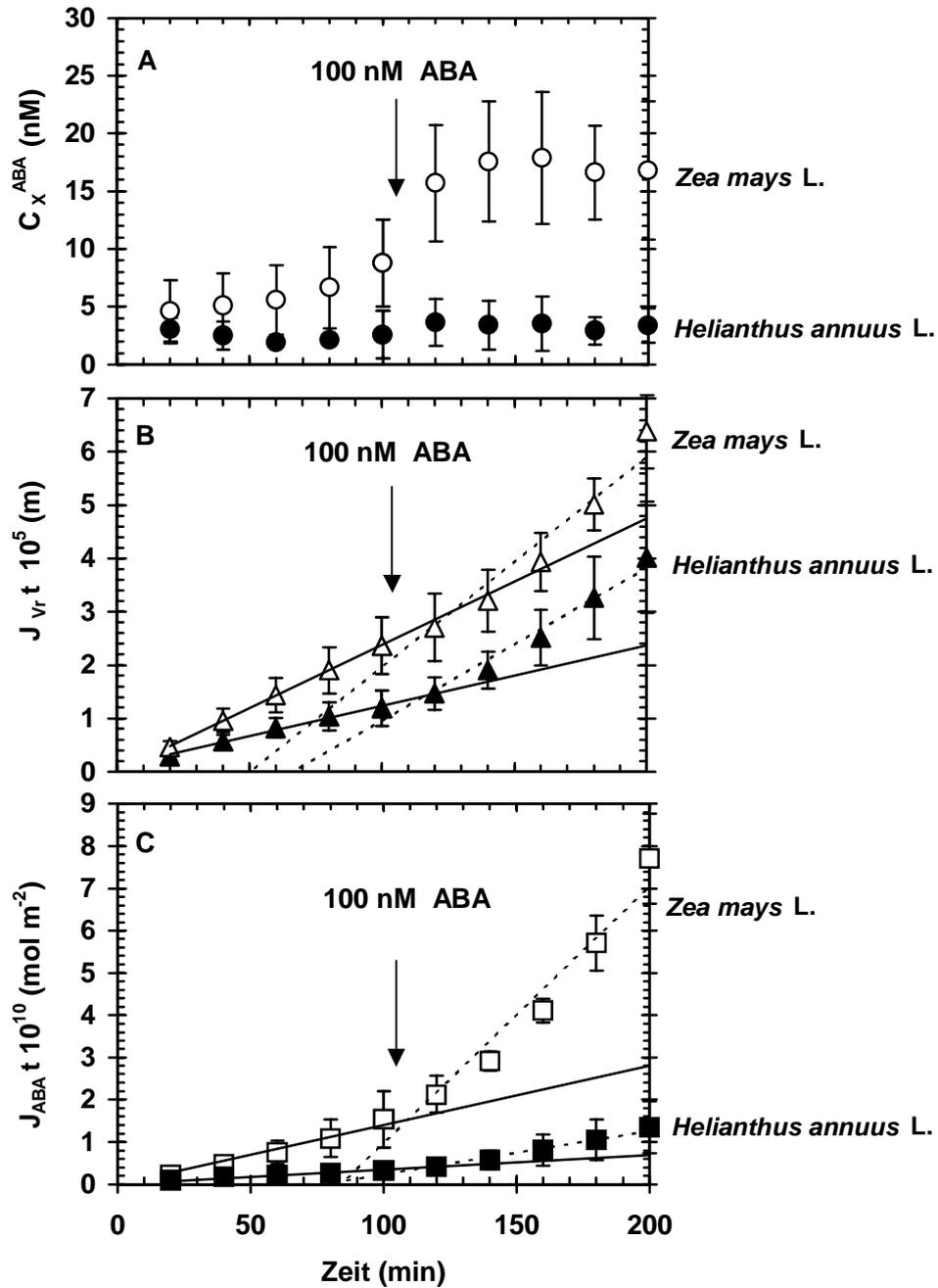


Abb. 3-12 ABA-Konzentrationen im Xylem (●, A), radialer Wasserfluss J_{vr} (▲, B) und radialer ABA-Fluss J_{ABA} (■, C) durch Wurzeln von *Zea mays* L. (offene Symbole) und *Helianthus annuus* L. (geschlossene Symbole) bei einem subatmosphärischen Druck von -0.03 MPa. Nach 100 min (↓) wurde ABA in einer Endkonzentration von 100 nM dem Wurzelmedium zugesetzt. MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

Im Gegensatz dazu stiegen die ABA-Konzentrationen im Xylem von *Helianthus annuus* nicht an (1.6 bis 6.3 nM ABA; Abb. 3-12 A). Der Wasserfluss durch die

und um 2.4 bei *Helianthus annuus*. Die abgeschätzten L_{pr} -Werte für diesen subatmosphärischen Druck (-0.03 MPa) stiegen für beide Spezies signifikant an (T-Test, $p \leq 0.05$, $n = 4$). Im Durchschnitt erhöhte sich die hydraulische Leitfähigkeit der Maiswurzeln von $1.3 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ auf $2.2 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$. Bei Sonnenblumen erhöhte sich L_{pr} von $6.6 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ auf $1.6 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (Abb. 3-12 B). Der Abscisinsäurefluss (J_{ABA}) durch Maiswurzeln nach ABA-Zugabe zum Medium war im Vergleich zur Sonnenblume um den Faktor 5.6 größer (Abb. 3-12 C).

3.2.1.2.3 Aufnahme in Wurzelspitzen

An der Schnittstelle versiegelte, 80 bis 100 mm lange Wurzelspitzen (2.7.4.1) von Mais, hydro- und aeroponisch kultiviert, wurden in einem Aufnahmebuffer (pH = 5.5) inkubiert, der $10 \mu\text{M}$ [^{14}C]Abscisinsäure enthielt. Um den oxidativen ABA-Abbau zu unterbinden war 10^{-5} M Tetcyclacis zugesetzt. Wurzelgewebe aus Hydrokultur nahm ABA in dieser Konzentration 2.7 mal schneller auf als Pflanzen aus Luftkultur (Abb. 3-13).

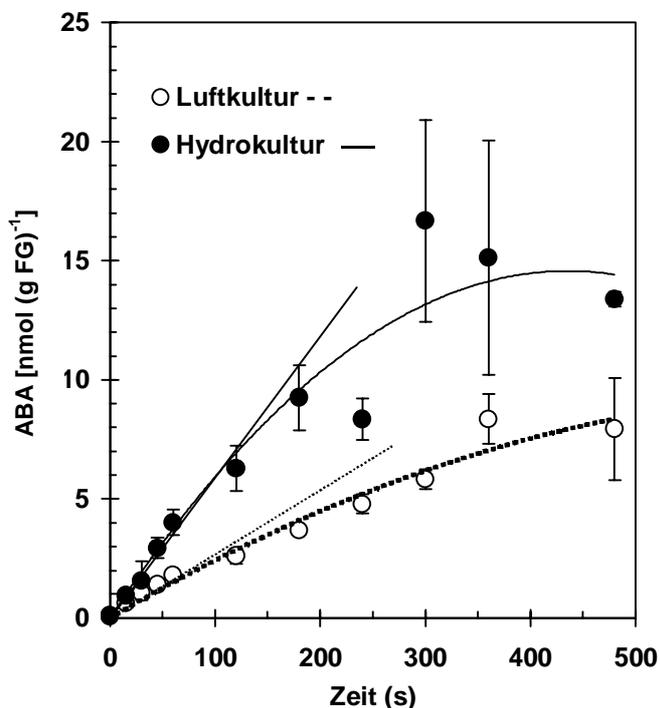


Abb. 3-13 Zeitverlauf der [^{14}C]ABA-Aufnahme in versiegelte, lange Wurzelspitzen (80 bis 110 mm lang) von Maiswurzeln aus Hydrokultur (-●-) und Luftkultur (-○-). Der pH-Wert des Wurzelmediums war 5.5, ABA war darin in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ enthalten. Um den oxidativen Abbau der ABA zu unterbinden, war Tetcyclacis in einer Konzentration von 10^{-5} M im Nährmedium enthalten. Die Netto-ABA-Aufnahmerate errechnete sich aus dem linearen Anfangsteil der Aufnahmekinetik (—). MW \pm MA, $n = 2$ Wurzeln.

Die Netto-ABA-Aufnahmerate, aus dem linearen Anfangs-Part der Aufnahmekinetik berechnet, betrug $2.8 \text{ nmol (g FG)}^{-1}(\text{h})^{-1}$ für hydroponische und $1.1 \text{ nmol (g FG)}^{-1}(\text{h})^{-1}$ für aeroponische Wurzelspitzen.

Eine Wiederholung des Versuchs ergab Aufnahmeraten von 2.4 und 1.8 $\text{nmol (g FG)}^{-1}(\text{h})^{-1}$ für hydroponische Maiswurzeln und $1.4 \text{ nmol (g FG)}^{-1}(\text{h})^{-1}$ für Wurzeln aus Luftkultur (MW, $n = 3$ Wurzelspitzen).

3.2.1.2.4 Efflux aus Wurzelstücken

Um die Geschwindigkeit der Abgabe von ABA an das umgebende Medium zu messen, wurden 80-110 mm lange und 40-50 mm lange Wurzelspitzen und -segmente (2.7.4.1) von *Zea mays* aus Hydro- und Luftkultur mit $10 \mu\text{M}$ [^{14}C]ABA in Gegenwart von 10^{-5} M Tetcyclacis beladen. Anschließend wurde der Isotopenaustausch mit externer, nicht-radioaktiver ABA über 7 Stunden verfolgt.

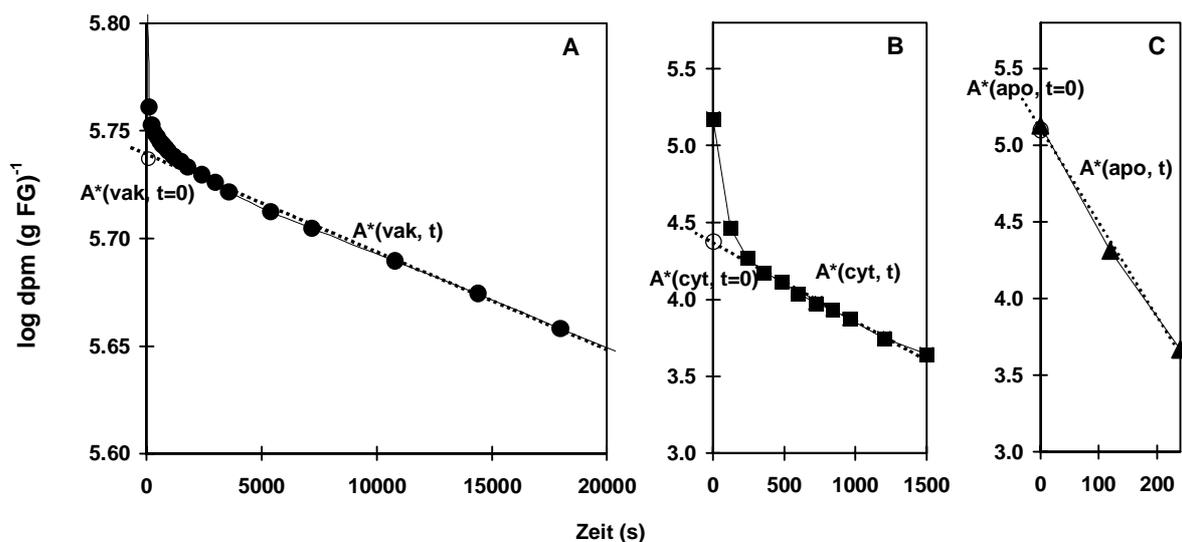


Abb. 3-14 Typisches Beispiel eines Effluxexperimentes aus einem versiegelten, hydroponischen Wurzelsegment von *Zea mays* in ein nicht-radioaktives Medium ($10 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5$) nach 16 h Inkubation in $10 \mu\text{M}$ [^{14}C]ABA bei $\text{pH} 5.5$. Dargestellt sind die vakuoläre Komponente (●), die cytosolische Komponente (■) (Differenz aus [^{14}C]ABA-Gesamtgehalt und vakuolärem [^{14}C]ABA-Gehalt) und die apoplastische Komponente (▲) (Differenz aus [^{14}C]ABA-Gesamtgehalt und vakuolärem und cytosolischem [^{14}C]ABA-Gehalten).

- $A^*(\text{vak}, t)$, $A^*(\text{vak}, t_0)$: Gehalt an radioaktiver ABA in der Vakuole zum Zeitpunkt t oder zu Beginn des Experiments (t_0) ○.
- $A^*(\text{cyt}, t)$, $A^*(\text{cyt}, t_0)$: Gehalt an radioaktiver ABA im Cytosol zum Zeitpunkt t oder zu Beginn des Experiments (t_0) ○.
- $A^*(\text{apo}, t)$, $A^*(\text{apo}, t_0)$: Gehalt an radioaktiver ABA im Apoplasten zum Zeitpunkt t oder zu Beginn des Experiments (t_0) ○.

Abb. 3-14 zeigt ein typisches Beispiel eines ABA-Effluxes aus einem hydroponischen Wurzelstück.

Aus den Steigungen der Geraden des linearen Teils am Ende der Effluxkurve ließen sich die ABA-Austauschraten über Tonoplasten, Plasmalemma und Apoplast berechnen. Die Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse ergaben die Gehalte an Radioaktivität im jeweiligen Kompartiment.

In den abgebildeten Kurven lassen sich drei Phasen unterscheiden. Das schnell austauschende Kompartiment (Abb. 3-14 C) entspricht dabei dem Apoplasten, das nächste dem Cytosol (Abb. 3-14 B) und das am langsamsten austauschende Kompartiment der Vakuole (Abb. 3-14 C) (Jeschke 1972, Lüttge 1973).

Dieses typische, dreiphasige Efflux-Muster konnte nur bei den hydroponischen Maiswurzeln beobachtet werden. ABA-Effluxkurven aus langen aeroponischen Wurzelspitzen oder –segmenten zeigten nur 2 Komponenten, an die sich nach 5000 s ein zweiter, schnellerer Efflux anschloss (Abb. 3-15, Tab. 3-5: k_B). Der Efflux aus den kurzen Wurzelspitzen wies, ähnlich wie bei den hydroponischen Wurzeln, drei Efflux-Komponenten auf. Ein „Knick“ zu einem weiteren, schnelleren Efflux trat nicht

auf.

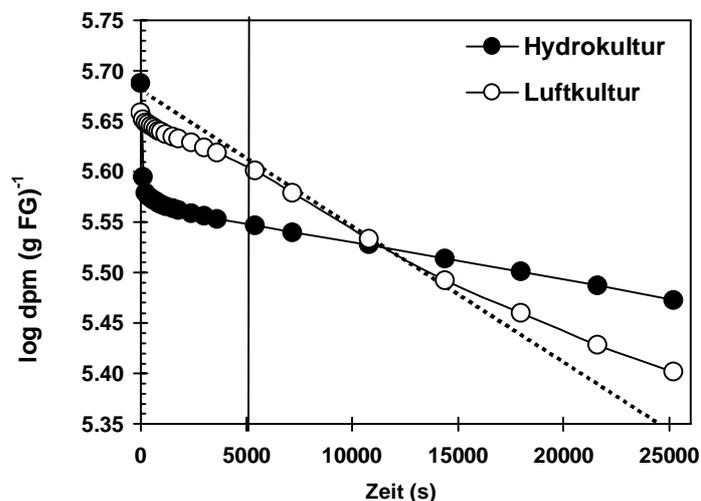


Abb. 3-15 Vergleich typischer ABA-Effluxmuster von Maiswurzelsegmenten aus Hydrokultur (-●-) und Luftkultur (-○-).

Das Effluxmuster aeroponischer Maiswurzelsegmente ging nach einem typischen Beginn nach 5000 s in einen zweiten, schnelleren Efflux über (- -). ABA war in einer Konzentration von 10 μM vorhanden; pH = 5.5

Die Halbwertszeiten des ABA-Austausches des Apoplasten (Kompartiment 1) waren bei hydroponischen Maiswurzeln im Vergleich zu Luftkultur-Wurzeln signifikant erniedrigt (einseitiger T-Test (A) , $p \leq 0.05$). Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied bei den Wurzelsegmenten (Faktor 2.6), es folgten die langen Wurzelspitzen (Faktor 1.7) und schließlich die kurzen Wurzelspitzen (Faktor 1.5)

den kurzen Wurzelspitzen auf. Der ABA-Efflux war hier im Vergleich zu den entsprechenden hydroponischen Geweben um den Faktor 2 verlangsamt. Bei den kurzen Wurzelspitzen entsprachen sich die Halbwertszeiten des Kompartimentes 3 (Vakuole) für Hydro- und Luftkultur. $T_{ABA}^{1/2}$ des Kompartimentes 3 der langen Wurzelspitzen und der Maiswurzelsegmente aus Luftkultur (Vakuole und Stele) waren um die Faktoren 2.1 bzw. 1.3 im Vergleich zur Hydrokultur erniedrigt (Tab. 3-5).

Tab. 3-5 Zeitkonstanten k , Halbwertszeiten des radioaktiven ABA-Tracer Austausches ($T_{ABA}^{1/2}$) und ABA-Gehalte (C_{ABA}) der drei Kompartimente Apoplast (1), Cytosol (2) und Vakuole (3) von jungen Maiswurzeln aus Hydro- bzw. Luftkultur. Effluxkurven von Experimenten mit Maiswurzeln aus Hydrokultur zeigten ein typisches 3-phasiges Effluxmuster. Effluxkurven aeroponischer Wurzeln zeigten nur 2 unterscheidbare Kompartimente. Nur bei den Experimenten mit 40 mm langen, aeroponischen Wurzelstücken (kurze Wurzelspitzen) wurden 3 Kompartimente gefunden. Zusätzlich zeigte Kompartiment 3 (Vakuole) der aeroponischen Maiswurzelstücke nach einem typischen Anfangsverlauf mit der Zeitkonstante k_A nach 5000 Effluxsekunden eine weitere Effluxkomponente mit der Zeitkonstanten k_B . MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

		Apoplast			Cytosol			Vakuole			
		Kompartiment 1			Kompartiment 2			Kompartiment 3			
		k	$T_{ABA}^{1/2}$	C_{ABA}	k	$T_{ABA}^{1/2}$	C_{ABA}	k_A	$T_{ABA}^{1/2}$	C_{ABA}	k_B
		10^3			10^4			10^6			10^6
Hydrokultur		s^{-1}	s	nmol (g FG) $^{-1}$	s^{-1}	min	nmol (g FG) $^{-1}$	s^{-1}	h	nmol (g FG) $^{-1}$	s^{-1}
Wurzel-	MW	4.5	201	1.1	5	25	0.40	3.7	53.1	7.7	-
segment	SD	2.6	124	0.5	1	8	0.20	0.4	5.6	0.8	-
Lange	MW	9.5	80	2.5	10	20	0.30	6.1	34.2	9.0	-
Wurzelspitze	SD	3.6	31	0.5	7	21	0.03	2.1	10.3	2.3	-
Kurze	MW	13	53	2.2	60	3	0.90	8.7	22.3	17.8	-
Wurzelspitze	SD	1.5	4	0.2	48	2	0.50	1.0	2.8	1.0	-
Luftkultur		s^{-1}	s	nmol (g FG) $^{-1}$	s^{-1}	min	nmol (g FG) $^{-1}$	s^{-1}	h	nmol (g FG) $^{-1}$	s^{-1}
Wurzel-	MW	1.3	527	0.3	-	-	-	7.7	25	10.3	10.3
segment	SD	0.2	106	0.1	-	-	-	0.5	1.5	1.6	1.4
Lange	MW	5	143	0.6	-	-	-	7.6	25.6	12.6	8.2
Wurzelspitze	SD	1	31	0.6	-	-	-	0.3	1	0.5	0.2
Kurze	MW	8.8	81	0.3	24	6	0.2	8.3	23.2	17.1	8.8
Wurzelspitze	SD	2.2	15	0.2	11	2	0.1	0.8	2.4	0.6	0.3

Das „Abknicken“ in einen weiteren, schnelleren Efflux bei den aeroponischen Wurzeln war bei den Wurzelsegmenten am stärksten ausgeprägt ($\frac{k_B}{k_A} = 1.32$). Die langen Wurzelspitzen knickten nur um den Quotienten $\frac{k_B}{k_A} = 1.09$, die kurzen um 1.06 ab (Tab. 3-5).

Die für ABA zugängliche Größe der drei Kompartimente wird durch den Gehalt an Radioaktivität zu Versuchsbeginn wiedergespiegelt (A^*_{vak,t_0} ; A^*_{cyt,t_0} ; A^*_{apo,t_0}). Kompartiment 3 der aeroponischen Wurzeln stellt hierbei die Summe aus Cytosol und Vakuole dar (s. Diskussion). Es ist daher durchgehend größer als Kompartiment 3 der hydroponischen Wurzeln (Tab. 3-5; Abb. 3-16). Kompartiment 1, das für beide Kulturtechniken den Apoplasten darstellte, war für Wurzeln aus Hydrokultur größer (Faktor 3.7: Wurzelsegment; Faktor 4.2 und 7.3: lange und kurze Wurzelspitzen) (Tab. 3-5, Abb. 3-16).

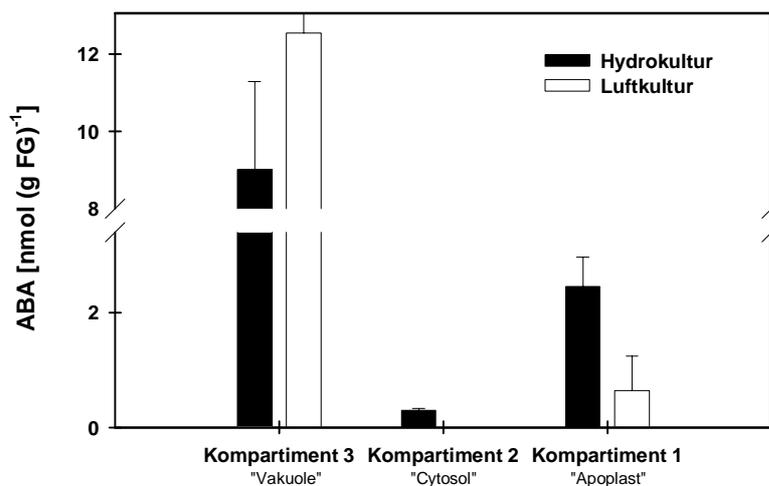


Abb. 3-16 Zugängliche Größe der Kompartimente Apoplast, Cytosol und Vakuole in langen Maiswurzelspitzen kultiviert in Hydrokultur (■) und Luftkultur (□), dargestellt durch den Gehalt an radioaktiver ABA zu Versuchsbeginn ($A^*_{t_0}$). Kompartiment 3 der aeroponischen Wurzeln vereinigte sowohl Vakuole als auch Cytosol in sich. MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

3.2.1.3 ABA-Transport in die Xylemgefäße

Abscisinsäure aus trockengestressten Wurzeln (s. 3.2.1.1) wird zu den Blättern transportiert und bewirkt dort den Schluss der Stomata (Blackman und Davies 1985). Der exakte Weg, dem ABA aus dem Wurzelgewebe in das Xylem folgt, sollte anhand der folgenden Versuchsreihen mit *Helianthus annuus* L. und *Zea mays* L. aufgeklärt werden.

Eine Möglichkeit, um einen schnellen Abtransport der ABA aus dem Wurzelgewebe in das Xylem zu gewährleisten, ist ein passiver Fluss mit dem Transpirations-Wasserstrom. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden 11 Tage alte Maispflanzen, angezogen in Hydro- und Luftkultur, und 10 Tage alte hydroponische Sonnenblumenkeimlinge dekapitiert und druckdicht an einer Saugapparatur (vgl. 2.6.2) befestigt. Bei einem Unterdruck von -0.02 MPa wurde ein steady-state Xylemsaftfluss in die Kapillare induziert. Nach Erhöhung des Flusses (J_{Vr}) durch Verstärkung des subatmosphärischen Druckes auf -0.06 MPa konnte nach Bestimmung der ABA-Flüsse (J_{ABA}) eine Korrelation zwischen J_{Vr} und J_{ABA} errechnet werden.

3.2.1.3.1 Einfluss der ABA-Konzentration im Wurzelmedium

Um verschieden starke Stresssituationen zu simulieren, wurden im Wurzelmedium der Versuchspflanzen unterschiedliche ABA-Konzentrationen eingestellt (Tab. 3-6).

Tab. 3-6 Zusammenfassung der verwendeten Pflanzen und der ABA-Konzentrationen in deren Wurzelmedien (+: gemessen; n.g.: nicht gemessen).

Pflanzen	ABA-Konzentration im Wurzelmedium (nM)						
	0	5	10	20	50	100	500
<i>Zea mays</i> L. - Hydrokultur	+	+	+	+	+	+	+
<i>Zea mays</i> L. - Luftkultur	+	+	+	+	+	+	+
<i>Helianthus annuus</i> L.	+	+	n.g.	n.g.	n.g.	+	+

Der Wasserfluss nahm sowohl für Mais beider Kultivationsmethoden als auch für Sonnenblume nach Erhöhung des Unterdruckes in allen Versuchsreihen um den Faktor 1.7 bis 2.1 zu (Tab. 3-7). Mit dem Wasserfluss (J_{Vr}) stieg auch der Abscisinsäurefluss (J_{ABA}) an. Der ABA-Fluss-Anstieg war um den Faktor 1.2 bis 3.5 größer als der Wasserflussanstieg (Tab. 3-7). Eine Ausnahme bildete *H. annuus* in einer externen ABA-Konzentration von 5 nM. Unter diesen Bedingungen nahm J_{Vr} stärker zu als J_{ABA} (Faktor: 1.9).

Tab. 3-7 Zusammenstellung der radialen ABA- (J_{ABA}) und Wasserflüsse (J_{Vr}) durch Wurzeln von *Zea mays* aus Hydro- bzw. Luftkultur und hydroponischen Sonnenblumen. Xylemsaft wurde durch Anlegen eines Unterdruckes an das Xylem dekapitierter Pflanzen gewonnen. Das Verhältnis von J_{ABA} und J_{Vr} bei niedrigem (-0.02 MPa) und hohem (-0.06 MPa) Unterdruck ($J_{ABA} (-0.06 \text{ MPa})/J_{ABA} (-0.02 \text{ MPa})$ und $J_{Vr} (-0.06 \text{ MPa})/J_{Vr} (-0.02 \text{ MPa})$) ist gegeben in Abhängigkeit von der ABA-Konzentration im Medium c_0^{ABA} . MW \pm SD, n = Anzahl der Wurzelsysteme

c_0^{ABA} <i>Zea mays</i> L. – Hydrokultur		
(nM)	Verhältnis von $J_{ABA} (-0.06 \text{ MPa})/$ $J_{ABA} (-0.02 \text{ MPa})$	Verhältnis von $J_{Vr} (-0.06 \text{ MPa})/$ $J_{Vr} (-0.02 \text{ MPa})$
500	5.9 \pm 1.8 (n = 5)	1.9 \pm 0.3 (n = 5)
100	3.4 \pm 1.1 (n = 5)	2.0 \pm 0.4 (n = 7)
50	3.4 \pm 1.4 (n = 8)	1.7 \pm 0.3 (n = 12)
20	8.0 \pm 3.5 (n = 5)	2.3 \pm 0.4 (n = 5)
10	2.6 \pm 1.1 (n = 6)	1.7 \pm 0.3 (n = 6)
5	3.5 \pm 1.2 (n = 4)	1.7 \pm 0.3 (n = 5)
c_0^{ABA} <i>Zea mays</i> L. – Luftkultur		
(nM)	Verhältnis von $J_{ABA} (-0.06 \text{ MPa})/$ $J_{ABA} (-0.02 \text{ MPa})$	Verhältnis von $J_{Vr} (-0.06 \text{ MPa})/$ $J_{Vr} (-0.02 \text{ MPa})$
500	3.1 \pm 1.4 (n = 9)	1.9 \pm 0.3 (n = 9)
100	2.9 \pm 1.0 (n = 9)	1.7 \pm 0.4 (n = 9)
50	1.9 \pm 0.5 (n = 8)	1.5 \pm 0.3 (n = 8)
20	4.9 \pm 3.1 (n = 9)	1.9 \pm 0.5 (n = 9)
10	4.0 \pm 1.7 (n = 9)	1.8 \pm 0.4 (n = 9)
5	3.1 \pm 1.5 (n = 8)	1.7 \pm 0.6 (n = 8)
c_0^{ABA} <i>Helianthus annuus</i> L. – Hydrokultur		
(nM)	Verhältnis von $J_{ABA} (-0.06 \text{ MPa})/$ $J_{ABA} (-0.02 \text{ MPa})$	Verhältnis von $J_{Vr} (-0.06 \text{ MPa})/$ $J_{Vr} (-0.02 \text{ MPa})$
500	3.5 \pm 1.2 (n = 5)	1.7 \pm 0.2 (n = 5)
100	2.0 \pm 0.7 (n = 6)	1.7 \pm 0.3 (n = 6)
5	1.1 \pm 0.3 (n = 5)	2.1 \pm 0.4 (n = 7)

Abb. 3-17 zeigt Abscisinsäureflüsse und –konzentrationen im Xylemsaft von *Zea mays* und *Helianthus annuus* aus Hydrokultur unter simulierten Stressbedingungen

im Medium). Die ABA-Konzentrationen im Xylem lagen bei externen ABA-Konzentrationen von 500 nM und niedrigem, subatmosphärischem Druck (-0.02 MPa) für Sonnenblume bei 6 bis 19 nM, für Mais bei 6 bis 22 nM. Abscisinsäureflüsse (J_{ABA}), berechnet aus der ABA-Konzentration im Xylem (c_X^{ABA}) und J_{Vr} , betragen unter diesen Bedingungen im Mittel $8.3 \cdot 10^{-14} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bzw. $5.6 \cdot 10^{-14} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nach Erniedrigung des Druckes auf -0.06 MPa stiegen die ABA-Konzentrationen im Xylemsaft von *H. annuus* auf 40 nM und bei *Zea mays* auf 70 nM. Korrespondierend stieg J_{ABA} um den Faktor 3.5 bzw. 8.0. Im Vergleich zu dieser hohen ABA-Konzentration waren die Abscisinsäureflüsse bei 5 nM im externen Medium signifikant erniedrigt (T-Test (A), $p \leq 0.001$).

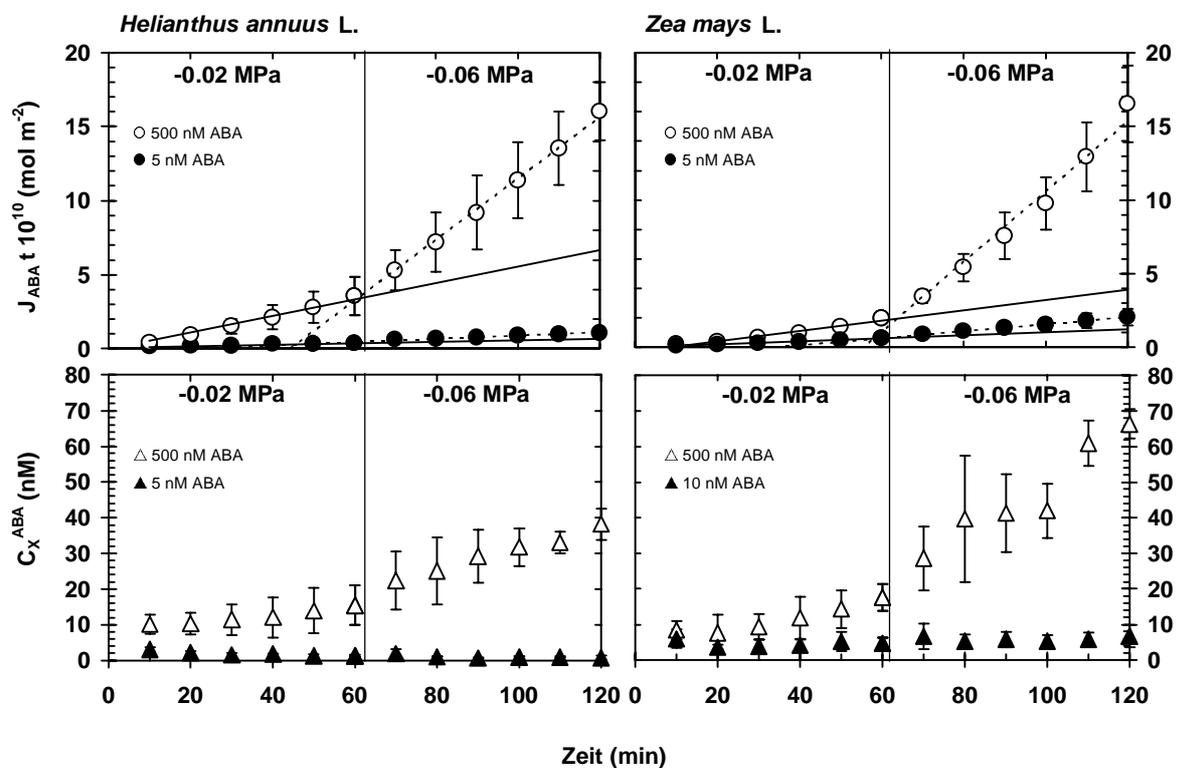


Abb. 3-17 Effekt von unterschiedlichen, subatmosphärischen Drücken (-0.02 MPa und -0.06 MPa) auf den Fluss (J_{ABA} , \bullet) und die Xylemsaftkonzentration von ABA (c_X^{ABA} , \blacktriangle) in Wurzeln von Mais und Sonnenblume unter Einwirkung unterschiedlicher, extern applizierter ABA-Konzentrationen (500 nM, offene Symbole; 5 nM und 10 nM, ausgefüllte Symbole). MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

Bei einem Vergleich von hydro- mit aeroponisch kultivierten Maiswurzeln wurde deutlich, dass die Zunahme der Wasserflüsse (J_{Vr}) nach Unterdruckverstärkung (-0.02 MPa auf -0.06 MPa) sich über den gesamten untersuchten

zeigte sich dasselbe Bild (Tab. 3-7). Abb. 3-18 zeigt die gewonnenen Daten bei einer extern applizierten ABA-Konzentration von 20 nM ABA. Die ABA-Konzentrationen im Xylemsaft beider Kultivierungstechniken lagen bei einem subatmosphärischen Druck von -0.02 MPa zwischen 1 nM und 5 nM ABA (Abb. 3-18 A). Der Wasserfluss (J_{Vr}) war bei aeroponisch angezogenen Wurzeln, im Vergleich zu hydroponischen, um 20% erniedrigt (Abb. 3-18 B). Abscisinsäureflüsse (J_{ABA}) berechnet aus c_X^{ABA} und J_{Vr} lagen im Mittel bei $1.5 \cdot 10^{-14}$ mol $m^{-2} s^{-1}$ bzw. $0.6 \cdot 10^{-14}$ mol $m^{-2} s^{-1}$. Nach Verstärkung des Vakuums auf -0.06 MPa stiegen die ABA-Konzentrationen auf 14 nM in Hydrokulturwurzeln und 6 nM ABA in den Luftkulturwurzeln (Abb. 3-18 A). Korrespondierend stieg J_{ABA} um den Faktor 8 bzw. 5 (Abb. 3-18 C, Tab. 3-7).

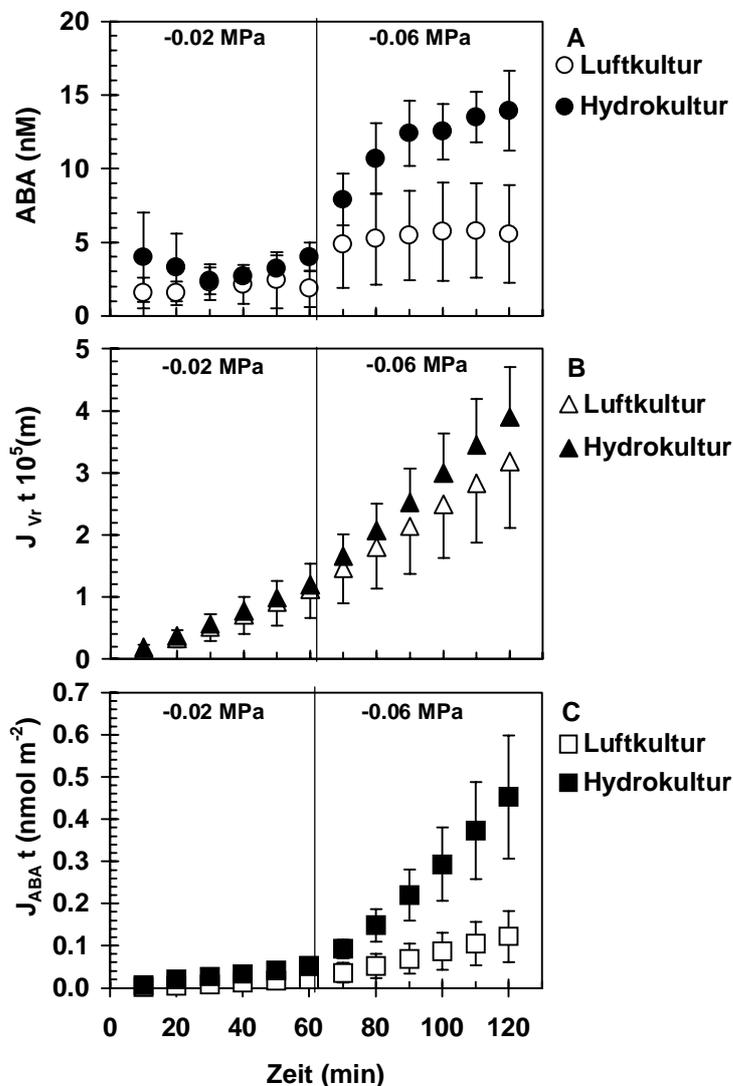


Abb. 3-18 ABA-Konzentrationen im Xylem (A), radialer Wasserfluss J_{Vr} (B) und radialer ABA-Fluss J_{ABA} (C) durch Maiswurzeln, angezogen in Hydro- (ausgefüllte Symbole) und Luftkultur (offene Symbole) bei subatmosphärischen Drücken von -0.02 und -0.06 MPa. Medien-ABA-Konzentration war 20 nM. MW \pm SD, n = 5-9 Wurzeln.

Die absoluten ABA-Flüsse durch Maiswurzeln, gemessen bei -0.06 MPa, waren bei hydroponisch kultivierten Maiswurzeln immer größer als bei aeroponisch

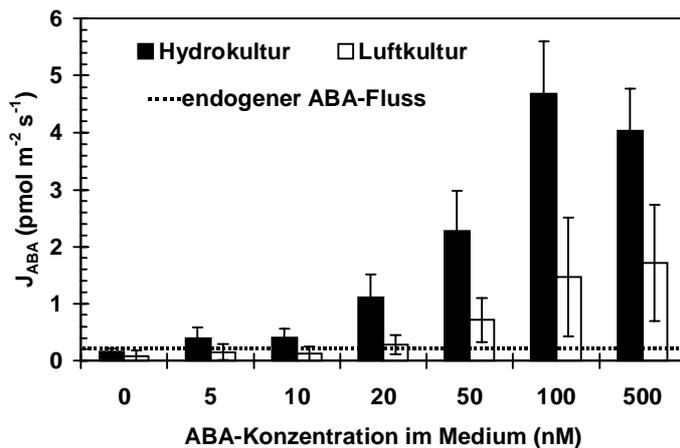


Abb. 3-19 J_{ABA} bei einem Druckunterschied von -0.06 MPa und verschiedenen, extern applizierten ABA-Konzentrationen (0 bis 500 nM). Die ABA-Flüsse durch hydroponisch angezogene Wurzeln (gefüllte Säulen) sind durchgängig größer als bei aeroponisch kultivierten Maiswurzeln (offene Säulen). MW \pm SD, n = 3-9 Wurzeln

Die Quotienten hydroponischer vs. aeroponischer ABA-Flüsse für unterschiedliche Abscisinsäurekonzentrationen im Medium lagen zwischen 2.0 und 3.7 mit einem MW von 2.9 ± 0.6 (\pm SD, n = 7). Die endogenen ABA-Konzentrationen im Xylem (in Abwesenheit externer ABA) betragen 1 bis 10 nM ABA bei Hydrokultur und 1 bis 9 nM bei Luftkultur. Dies entsprach einem Fluss endogener ABA von $1.6 \cdot 10^{-14}$ mol m⁻² s⁻¹ bzw. $0.8 \cdot 10^{-14}$ mol m⁻² s⁻¹ (subatmosphärischer Druck: -0.06 MPa). Um J_{ABA} über dieses Niveau zu erhöhen, mussten mindestens 20 nM ABA zu den hydroponischen und 50 nM ABA zu aeroponischen Wurzeln gegeben werden. Die ABA-Flüsse durch die Wurzeln nahmen mit erhöhter Abscisinsäurekonzentration im Medium zu. Diese Zunahme war jedoch nach Erhöhung der externen ABA-Konzentration auf über 50 nM für Luftkultur und 100 nM für Hydrokultur nicht mehr signifikant.

Um die Barrierestärke der untersuchten Wurzeln für ABA zu bestimmen, wurde der Reflexionskoeffizient σ_{ABA} (Gleichung 6) berechnet (Tab. 3-8). Bei niedrigen ABA-Konzentrationen im Medium war σ_{ABA} relativ niedrig (0 bis 0.5), stieg aber auf Werte über 0.9 nach einer Erhöhung der externen ABA-Konzentration auf 500 nM an. ABA-Reflexionskoeffizienten von *Helianthus annuus* waren durchgängig höher als die von *Zea mays* und lagen zwischen 0.49 und 0.97. Bei 100 nM ABA im Wurzelmedium und -0.02 MPa Unterdruck betragen die Reflexionskoeffizienten im Mittel 0.68 für Mais und 0.97 für Sonnenblume. Nach Erhöhung des subatmosphärischen Drucks (-0.06 MPa) auf das Xylem sanken die Werte des apparenten Reflexionskoeffizienten σ_{ABA} für Mais auf 0.54 ab und blieben für Sonnenblume gleich (Abb. 3-20)

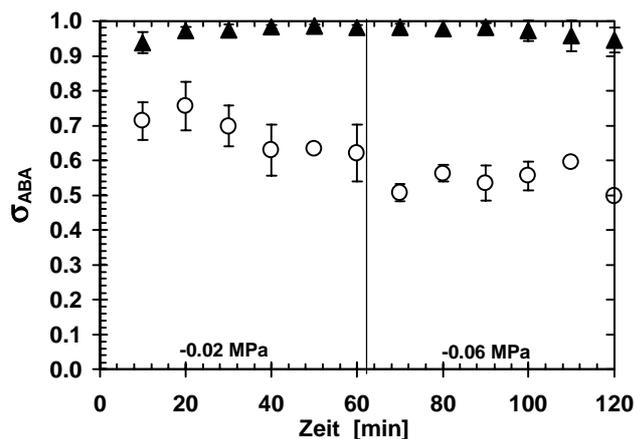


Abb. 3-20 Apparenter Reflexionskoeffizient (σ_{ABA}) von Sonnenblumen-(▲) und Mais-(○) Wurzeln als eine Funktion der Dauer der ABA-Inkubation und des angelegten hydrostatischen Druckgradienten. Extern applizierte ABA-Konzentration war 100 nM: pH des Mediums: 5.5. MW \pm SD, n = 3-4 Wurzeln

Die beiden Kultivierungstechniken Hydro- und Luftkultur hatten keinen Einfluss auf σ_{ABA} von Mais (Tab. 3-8).

Tab. 3-8 Apparenter Reflexionskoeffizient σ_{ABA} von Abscisinsäure für Wurzeln von *Zea mays* und *Helianthus annuus* unter steady-state-Bedingungen. Mais wurde sowohl in Hydro- als auch in Luftkultur angezogen. Die Sonnenblumenkeimlinge waren nur in Hydrokultur kultiviert. σ_{ABA} ist für alle untersuchten Konzentrationen und Unterdrücke angegeben. Negative Reflexionskoeffizienten entstehen, wenn der endogene ABA-Fluss größer ist als der exogene. MW \pm SD, n = 3-9 Wurzeln, -: nicht gemessen

c_0^{ABA} Druckunterschied		Apparenter Reflexionskoeffizient σ_{ABA} von		
(nM)	(MPa)	<u><i>Zea mays</i> L.</u>	<u><i>Zea mays</i> L.</u>	<u><i>Helianthus annuus</i> L.</u>
		Hydrokultur	Luftkultur	Hydrokultur
500	0.02	0.96 \pm 0.02	0.89 \pm 0.05	0.94 \pm 0.01
	0.06	0.83 \pm 0.05	0.85 \pm 0.03	0.87 \pm 0.03
100	0.02	0.68 \pm 0.06	0.65 \pm 0.10	0.97 \pm 0.02
	0.06	0.54 \pm 0.04	0.52 \pm 0.11	0.97 \pm 0.02
50	0.02	0.71 \pm 0.04	0.63 \pm 0.13	-
	0.06	0.48 \pm 0.09	0.61 \pm 0.12	-
20	0.02	0.73 \pm 0.27	0.75 \pm 0.14	-
	0.06	0.12 \pm 0.12	0.59 \pm 0.19	-
10	0.02	0.40 \pm 0.07	0.68 \pm 0.23	-
	0.06	0.28 \pm 0.05	0.54 \pm 0.26	-
5	0.02	0.08 \pm 0.15	0.48 \pm 0.26	0.49 \pm 0.18
	0.06	-0.10 \pm 0.10	0.35 \pm 0.26	0.68 \pm 0.10

3.2.1.3.2 Einfluss des pH-Wertes

Hydro- und aeroponisch kultivierte Maiswurzeln, sowie in Hydrokultur angezogene *Helianthus*-Wurzeln wurden druckdicht an einer Saugapparatur befestigt (vgl. 2.6.2). Der apparente Reflexionskoeffizient konnte nach Einstellung von steady-state Bedingungen bei einem subatmosphärischen Druck von -0.06 MPa berechnet werden (Gleichung 6).

Für ABA-Anionen (pH=8; 99.9% der Gesamt-ABA liegt deprotoniert vor) waren Wurzeln eine starke Barriere. Die Reflexionskoeffizienten lagen bei 0.84 für Mais aus Hydrokultur und 0.91 für Mais aus Luftkultur. *Helianthus annuus*-Wurzeln besaßen die stärksten Barriereigenschaften. Ihr apparenter Reflexionskoeffizient lag für diesen alkalischen pH-Wert bei 0.96 (Abb. 3-21).

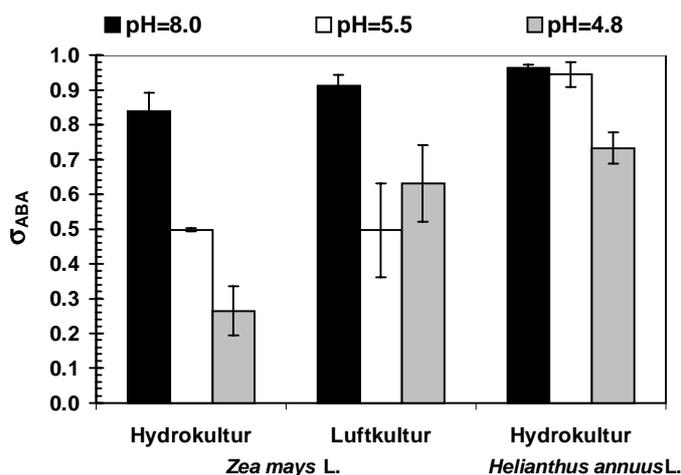


Abb. 3-21 Apparente Reflexionskoeffizienten im steady-state von 10 Tage alten hydroponischen Sonnenblumenwurzeln und 11 Tage alten Maiswurzeln kultiviert in Hydro- oder Luftkultur. Die Messungen fanden bei Wurzelmedien-pH-Werten von 8.0 (■), 5.5 (□) und 4.8 (■) statt. ABA-Konzentration im Medium war 100 nM. MW \pm SD, n = 6

Senkt man den Medien-pH-Wert auf 4.8 (entsprechend dem pK_a von ABA) ab, wird bei Sonnenblume der radiale ABA-Transport ins Xylem deutlich erleichtert (Abb. 3-21). Bei Maiswurzeln erniedrigte bereits ein externer pH-Wert von 5.5 (mehr als 80% der Gesamt-ABA liegt in der deprotonierten Form vor) σ_{ABA} auf 0.5. Ein Absenken des pH-Wertes auf 4.8 führte nur bei Maiswurzeln aus Hydrokultur zu einer weiteren Transporterhöhung. Bei aeroponisch angezogenen Maiswurzeln lag σ_{ABA} zwar immer höher, die Unterschiede waren aber nicht signifikant (Abb. 3-21; T-Test (A), $p > 2$).

Ein konstanter Reflexionskoeffizient stellte sich sowohl für *H. annuus*-, als auch für *Z. mays*-Wurzeln 10 bis 30 min nach Verstärkung des Unterdruckes ein (Abb. 3-22,

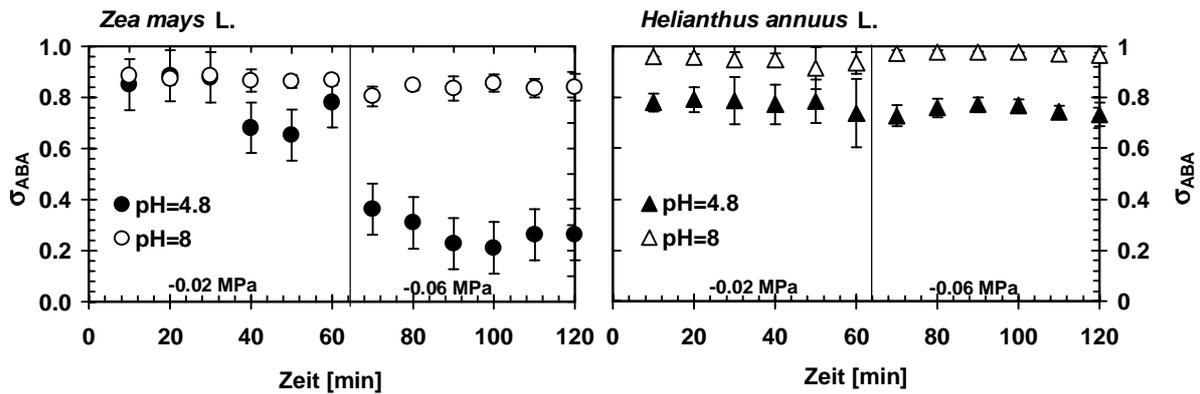


Abb. 3-22 Zeitverlauf des pH-Effektes auf σ_{ABA} von Mais-(●) und Sonnenblumen-(▲) Wurzeln bei alkalischem (pH = 8, offene Symbole) und saurem (pH = 4.8, ausgefüllte Symbole) pH-Wert. Eine rasche Abnahme von σ_{ABA} konnte nur bei Mais, nicht aber bei Sonnenblume beobachtet werden. Die externe ABA-Konzentration betrug während der Experimente 100 nM. MW \pm SD, n = 3-4 Wurzeln

Um den Effekt eines sauren Wurzelmediums auf σ_{ABA} von 11 Tage alten, hydroponischen Maiswurzeln zu untersuchen, wurden diese Medien auf indirekte Art angesäuert.

10 Tage alte Maispflanzen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in einem Nährmedium kultiviert, das Ammonium als einzige Stickstoffquelle beinhaltete. Dies bewirkte eine Reduktion des Medien-pH-Wertes auf 3.83 (Tab. 3-9). Bei diesem pH-Wert liegt 90% der Gesamt-ABA als protoniertes, ungeladenes Säuremolekül vor. Zur Simulation eines Stresssignals wurden alle Pflanzen 2 h vor Versuchsbeginn in 100 nM ABA inkubiert (vgl. 2.7.5).

Tab. 3-9 ABA-Flusszunahme ($J_{ABA}(-0.06 \text{ MPa})/ J_{ABA}(-0.02 \text{ MPa})$), Wasserflusszunahme ($J_{Vr}(-0.06 \text{ MPa})/ J_{Vr}(-0.02 \text{ MPa})$) nach Unterdruckerhöhung und apparenter Reflexionskoeffizient σ_{ABA} in Abhängigkeit vom Medien-pH-Wert. σ_{ABA} sinkt bei hydroponischen Maiswurzelsystemen nach Verstärkung des subatmosphärischen Druckes um 0.04 MPa. Die pH-Veränderungen im Wurzelmedium wurden nicht durch organische Pufferlösungen erreicht, sondern durch eine eintägige Ammoniumernährung. ABA-Konzentration im Medium war 100 nM. MW \pm SD, n = Wurzelsysteme

pH der Nährlösung	Verhältnis von $J_{ABA}(-0.06 \text{ MPa})/ J_{ABA}(-0.02 \text{ MPa})$	Verhältnis von $J_{Vr}(-0.06 \text{ MPa})/ J_{Vr}(-0.02 \text{ MPa})$	Reflexionskoeffizient σ_{ABA}		Verdünnung des ABA-Signals	n
			-0.02 MPa	-0.06 MPa		
Nitratnährlösung (Kontrolle)						
5.50 \pm 0.00	3.40 \pm 1.10	2.0 \pm 0.4	0.68 \pm 0.06	0.54 \pm 0.04	-	5
1 d Ammonium						
3.83 \pm 0.10	1.86 \pm 0.72	2.2 \pm 0.3	negativ	negativ	+	5-7

Eine 1-tägige Inkubation der Maiswurzeln in einem Ammonium-Nährmedium ließ zum einen die Wasserflusszunahme nach Unterdruckerhöhung tendenziell von 2.0 der Kontrolle auf 2.2 ansteigen (Tab. 3-9). Gleichzeitig reduzierte sich der Anstieg von J_{ABA} signifikant (einseitiger T-Test (A), $p \leq 0.04$) von 3.4 auf 1.9. Eine Verdünnung des ABA-Signals war zu messen. Die Reflexionskoeffizienten σ_{ABA} lagen im negativen Bereich (Tab. 3-9). Dies bedeutet, dass die ABA-Konzentration im Xylem auf Grund endogener Hormon-Biosynthese über der exogen applizierten liegt.

3.2.1.3.3 Einfluss des endogenen ABA-Gehaltes der Wurzel

Um den endogenen ABA-Gehalt in Wurzeln von Mais und Sonnenblume zu erhöhen, wurde der Nährlösung Tet zugesetzt (vgl. 2.7.5). Tet reduziert den oxidativen Abbau von ABA (Rademacher 1988, Daeter 1994) und erhöht somit den endogenen ABA-Gehalt.

In das Wurzelmedium wurden zusätzlich 5 nM ABA gegeben, um die natürlichen Abscisinsäurekonzentrationen im Boden nachzustellen (Hartung et al. 1996, Sauter und Hartung 2000). Die ABA-Konzentrationen im Xylemsaft lagen für Mais bei 10 nM bis 20 nM (-0.02 MPa) und bei 32 nM bis 48 nM (-0.06 MPa) (Abb. 3-23). Der ABA-Gehalt im Xylemsaft von *H. annuus* änderte sich nicht abhängig vom angelegten

detektierten ABA-Konzentrationen entsprachen denen, die nach einer Applikation von 70nM bis 100nM ABA in das Wurzelmedium von Mais bzw. 100nM bis 500nM in das Wurzelmedium von Sonnenblume erreicht wurden (Abb. 3-23).

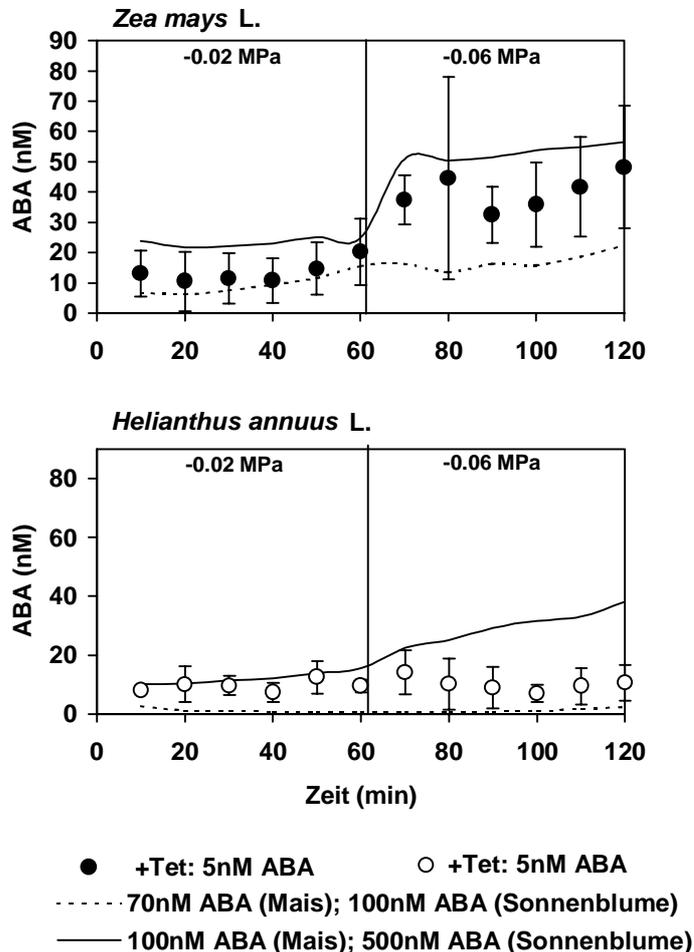


Abb. 3-23 Endogene ABA-Konzentration im Xylemsaft von 11 Tage alten Keimlingen von *Zea mays* L. und 10 Tage alten Keimlingen von *Helianthus annuus* L. aus Hydrokultur. Der Nährlösung (pH=5.5) war Tetracyclacin (10^{-5} M) zugegeben, um den endogenen ABA-Spiegel anzuheben. Zum anderen waren dem Medium 5nM ABA appliziert, um natürliche Verhältnisse der ABA-Bodenlösung zu simulieren. Die erhaltenen Xylem-ABA-Konzentrationen entsprachen denen eines Stresssignals (—;--). MW \pm SD, n = 3 Wurzelsysteme

Nach Erhöhung des Unterdrucks stieg der Wasserfluss für Mais um einen Faktor von 1.6 ± 0.4 (MW \pm SD, n = 5 Wurzeln), für Sonnenblume um einen Faktor von 1.2 ± 0.2 (MW \pm SD, n = 3 Wurzeln). Gleichzeitig verstärkte sich J_{ABA} um einen Faktor von 4.0 ± 0.8 (Mais) bzw. 1.2 ± 0.2 (Sonnenblume) (MW \pm SD, n = 3-5 Wurzeln).

3.2.2 Transport von hydrophilen Substanzen

3.2.2.1 α -Methylglucopyranose

Um die Barrierestärke von Mais- und Sonnenblumenwurzeln bezüglich hydrophiler

den Xylemsaft dieser Pflanzen untersucht. Dazu wurden die Pflanzen dekapitiert und druckdicht an einer Saugapparatur fixiert. Nach 2-stündiger Inkubation in einer 100 nM Zuckerlösung wurde Xylemsaft bei -0.02 MPa und -0.06 MPa gewonnen. Über den Gehalt an Radioaktivität in den Wurzelexsudaten konnte der apparente Reflexionskoeffizient $\sigma_{\text{Methylglucopyranose}}$ berechnet werden. Dieser betrug für *H. annuus* 0.93 ± 0.01 (-0.02 MPa) und 0.95 ± 0.02 (-0.06 MPa). Maiswurzeln zeigten einen $\sigma_{\text{Methylglucopyranose}}$ von 0.96 ± 0.01 (-0.02 MPa) und 0.97 ± 0.01 (-0.06 MPa) (MW \pm SD, $n = 18$ Messungen von 3 Wurzeln).

3.2.2.2 Sorbit

3.2.2.2.1 Aufnahme in Wurzelspitzen

Versiegelte, lange Wurzelspitzen (vgl. 2.7.4.1) von Mais, hydro- und aeroponisch kultiviert, wurden in einem Aufnahmebuffer inkubiert, der [^{14}C]-Sorbit enthielt. Wurzelgewebe aus Hydrokultur nahm Sorbit in der angebotenen Konzentration 4-mal schneller auf als Pflanzen aus Luftkultur (Abb. 3-24). Die Netto-Aufnahmerate, aus dem linearen Anfangspart der Aufnahmekinetik berechnet, betrug 0.61 $\text{nmol (g FG)}^{-1} (\text{h})^{-1}$ für hydroponische und 0.14 $\text{nmol (g FG)}^{-1} (\text{h})^{-1}$ für aeroponische Wurzelspitzen.

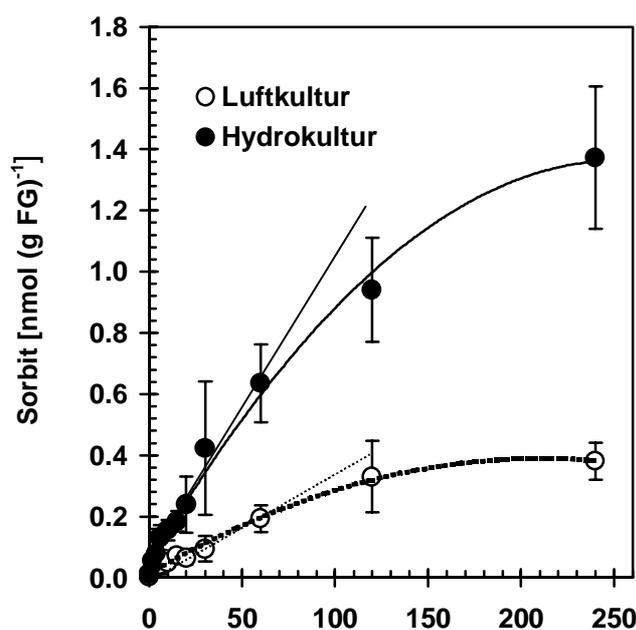


Abb. 3-24 Zeitverlauf der [^{14}C]Sorbit-Aufnahme in versiegelte, lange Wurzelspitzen von Mais aus Hydrokultur (-●-) und Luftkultur (-○-). pH-Wert des Wurzelmediums war 5.5, Sorbit war darin in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ enthalten. Aus dem linearen Anfangspart der Aufnahmekinetik konnte die Netto-Sorbit-Aufnahmerate berechnet werden (—, - - -). MW \pm SD, $n = 4$ Wurzeln

3.2.2.2 Efflux aus Wurzelstücken

Um die Geschwindigkeit der Abgabe von Sorbit an das umgebende Medium zu messen, wurden versiegelte, lange und kurze Wurzelspitzen und –segmente (vgl. 2.7.4.1) von *Zea mays* aus Hydro- und Luftkultur mit [^{14}C]-Sorbit beladen. Anschließend wurde der Austausch des aufgenommenen radioaktiven Sorbits mit nicht-radioaktivem Sorbit über 7 Stunden verfolgt. Maiswurzeln aus Hydrokultur wiesen, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, ein typisches, 3-phasiges Effluxmuster auf. Versiegelte aeroponische Wurzelsegmente dagegen zeigten nur 2 Komponenten, an die sich ein weiterer, schnellerer Efflux anschloss.

In Abb. 3-25 wird ein typisches Beispiel eines Sorbit-Effluxes aus versiegelten Wurzelsegmenten von *Zea mays* dargestellt. Hydroponische Segmente nahmen während des 16-stündigen Beladungszeitraumes im Durchschnitt 3.3-mal soviel Sorbit im Vergleich zu aeroponischen Segmenten auf (Hydrokultur: 1.67 ± 0.15 nmol [^{14}C]-Sorbit; Luftkultur 0.51 ± 0.11 nmol [^{14}C]Sorbit, MW \pm SD, n = 3). Nach 5000 s knickte der Sorbit-Efflux aus aeroponischen, versiegelten Wurzelsegmenten in einen weiteren, schnelleren Efflux ab (Abb. 3-25).

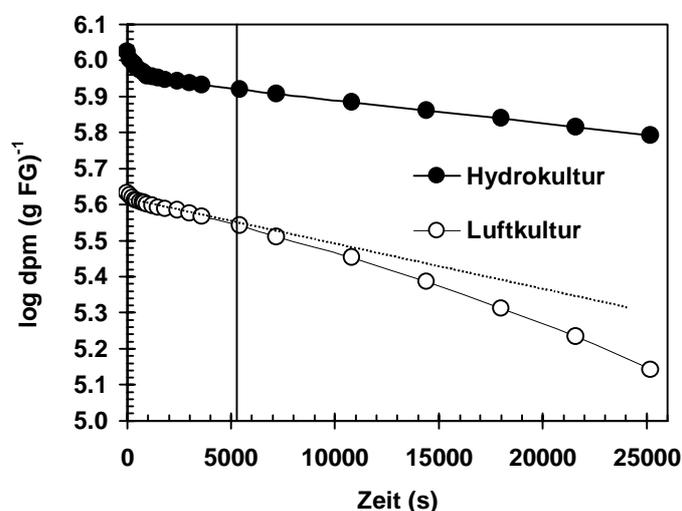


Abb. 3-25 Vergleich typischer Sorbit-Effluxmuster von Maiswurzelsegmenten aus Hydrokultur (-●-) und Luftkultur (-○-).

Das Effluxmuster aeroponischer Maiswurzelsegmente wechselte nach einem typischen Beginn von 5000 s in einen zweiten schnelleren Efflux über (- -). Sorbit war in einer Konzentration von 10 μM vorhanden.

Die Halbwertszeiten des Sorbit-Austausches aus dem Apoplasten der hydroponischen Maiswurzeln waren tendenziell aber nicht signifikant erhöht (T-Test (A), $p=0.05$, Tab. 3-10). Das Kompartiment 2 (Cytosol) findet man bei aeroponischen Wurzelsegmenten nicht. $T_{\text{Sorbit}}^{1/2}$ des Kompartiments 2 war bei den langen und kurzen, aeroponischen Wurzelspitzen im Vergleich zur Hydrokultur tendenziell verlangsamt. Das Kompartiment 3 der Wurzelsegmente aus Luftkultur, das somit cytosolischen

Kompartiment 3 (Vakuole) der Hydrokultur. Das lange, aeroponische Wurzelstück hatte im Vergleich zur Hydrokultur ein signifikant verlangsamtes $T_{\text{Sorbit}}^{1/2}$ im Kompartiment 3 (Faktor 1.3, T-test (A), $p \leq 0.05$). Die Halbwertszeit der kurzen Wurzelspitzen war nicht unterschiedlich für Hydro- und Luftkultur (Tab. 3-10). An das Kompartiment 3 schloss sich bei den aeroponischen Wurzelsegmenten ein weiterer Efflux an, dessen Geschwindigkeitskonstante k_B um den Faktor 1.9 größer war als die Geschwindigkeitskonstante k_A des Kompartiments 3 zu Beginn des vakuolären Effluxes (Tab. 3-10).

Tab. 3-10 Zeitkonstanten k , Halbwertszeiten des radioaktiven Sorbit-Tracer Austausches ($T_{\text{Sorbit}}^{1/2}$) und Sorbit-Gehalte (c_{Sorbit}) der drei Kompartimente Apoplast (1), Cytosol (2) und Vakuole (3) von jungen Maiswurzeln aus Hydro- und Luftkultur. Effluxkurven von Experimenten mit Maiswurzeln aus Hydrokultur zeigten ein typisches 3-phasiges Effluxmuster. Effluxkurven der aeroponischen Wurzelsegmente zeigten nur 2 unterscheidbare Kompartimente. Bei Experimenten mit kurzen und langen Wurzelspitzen wurden 3 Kompartimente gefunden. Zusätzlich zeigte Kompartiment 3 (Vakuole) der aeroponischen Maiswurzelsegmente nach einem typischen Anfangsverlauf mit der Zeitkonstanten k_A nach 5000 Effluxsekunden eine weitere Effluxkomponente mit der Zeitkonstanten k_B . MW \pm SD, $n = 3$ Wurzeln

		Apoplast Kompartiment 1			Cytosol Kompartiment 2			Vakuole Kompartiment 3			
		k	$T_{\text{Sorbit}}^{1/2}$	c_{Sorbit}	k	$T_{\text{Sorbit}}^{1/2}$	c_{Sorbit}	k_A	$T_{\text{Sorbit}}^{1/2}$	c_{Sorbit}	k_B
		10^3			10^4			10^6			
		s^{-1}	s	nmol (g FG)^{-1}	s^{-1}	min	nmol (g FG)^{-1}	s^{-1}	h	nmol (g FG)^{-1}	s^{-1}
Hydrokultur											
Wurzel-	MW	1.0	809	0.17	3.3	38	0.05	6.3	31	1.43	-
segment	SD	0.4	369	0.03	0.9	13	0.00	0.2	1	0.14	-
Lange	MW	2.9	251	0.16	1.9	63	0.06	4.0	49	0.46	-
Wurzelspitze	SD	0.9	65	0.03	0.2	8	0.00	0.4	5	0.21	-
Kurze	MW	1.4	583	0.09	1.6	74	0.06	6.8	49	0.09	-
Wurzelspitze	SD	0.8	267	0.06	0.2	12	0.05	6.8	33	0.12	-
Luftkultur											
Wurzel-	MW	1.3	564	0.03	-	-	-	10.1	19	0.47	19.7
segment	SD	0.3	102	0.00	-	-	-	2.3	4	0.11	0.8
Lange	MW	3.6	209	0.03	1.5	80	0.05	3.1	63	0.17	-
Wurzelspitze	SD	1.3	69	0.01	0.4	21	0.00	0.2	5	0.05	-
Kurze	MW	1.8	462	0.13	1.5	81	0.09	3.3	60	0.18	-
Wurzelspitze	SD	0.8	248	0.04	0.3	18	0.03	0.8	12	0.00	-

Die für Sorbit zugängliche Größe der drei Kompartimente wird durch den Gehalt an Radioaktivität ($[^{14}\text{C}]\text{Sorbit}$) in diesen zu Versuchsbeginn widerspiegelt (A^*t_0) (vgl. 2.7.4.1). Die Gehalte an Sorbit in den einzelnen Wurzelkompartimenten der kurzen Wurzelspitzen waren für Mais aus Hydro- und Luftkultur nicht signifikant unterschiedlich. Bei langen Wurzelspitzen waren die Sorbitmengen im Kompartiment 3 für Hydrokultur um den Faktor 2.7 erhöht, bei Wurzelsegmenten betrug dieser 3.0 (Tab. 3-10). Das Kompartiment 2 der langen Wurzelspitzen war bei den hydroponischen Wurzeln um den Faktor 1.3 größer. Am deutlichsten traten die Unterschiede im Kompartiment 1, dem Apoplasten, auf. Das hydroponische, apoplastische Kompartiment war für Sorbit um den Faktor 4.8 (lange Wurzelspitzen) bzw. 6.1 (Wurzelsegmente) größer als das der aeroponischen Maiswurzeln (Abb. 3-26). Die kurzen Wurzelspitzen zeigten keine signifikanten Unterschiede im apoplastischen Sorbitgehalt abhängig von der Kulturtechnik.

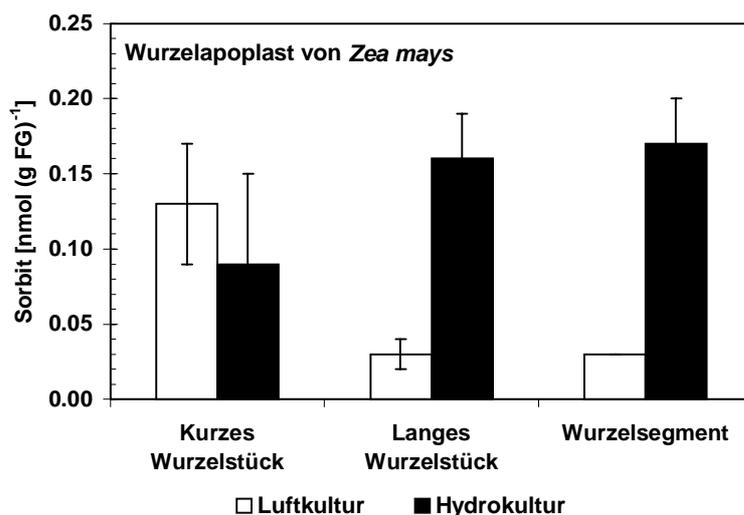


Abb. 3-26 Gehalte an radioaktivem $[^{14}\text{C}]\text{Sorbit}$ im Apoplasten der untersuchten Maiswurzelspitzen aus Luftkultur (□) und Hydrokultur (■). MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

Um das „Abknicken“ der Effluxkurven aeroponischer Wurzelsegmente nach 5000 s in einen schnelleren Efflux zu untersuchen, wurden versiegelte und unversiegelte Maiswurzelsegmente mit $[^{14}\text{C}]\text{Sorbit}$ beladen und die Abgabe der Radioaktivität über 7 Stunden in ein nicht-radioaktives Medium verfolgt. Dabei nahmen unversiegelte Wurzelsegmente $1.8 \pm 1.5 \text{ nmol Sorbit (g FG)}^{-1}$ auf, versiegelte Wurzelsegmente dagegen enthielten 3.6 mal weniger Sorbit im Gewebe ($0.5 \pm 0.1 \text{ nmol (g FG)}^{-1}$, MW \pm SD, n = 3).

Tab. 3-11 Geschwindigkeitskonstanten k des Sorbiteffluxes aus Wurzelsegmenten von 11 Tage alten, aeroponischen Maiswurzelsegmenten deren Schnittflächen entweder mit Paraffin versiegelt oder unversiegelt waren. k_A ist die Geschwindigkeitskonstante der Vakuole vor dem Abknicken, k_B nach dem Abknicken in den schnelleren, vakuolären Efflux. Die Zunahme der Effluxgeschwindigkeit wird durch das Verhältnis von k_B zu k_A ausgedrückt. MW \pm SD, $n = 3$ Wurzelsegmente

Wurzelsegment von <i>Zea mays</i> L.					
Komponente 3 - Luftkultur					
versiegelt			unversiegelt		
Geschwindigkeitskonstanten		Effluxzunahme	Geschwindigkeitskonstanten		Effluxzunahme
k_A (s^{-1}) 10^5	k_B (s^{-1}) 10^5	k_B / k_A	k_A (s^{-1}) 10^5	k_B (s^{-1}) 10^5	k_B / k_A
1.04 \pm 0.02	1.97 \pm 0.08	1.95 \pm 0.35	1.19 \pm 0.17	1.72 \pm 0.37	1.45 \pm 0.23

Die Zeitkonstanten des Sorbit-Effluxes aus Kompartiment 3 vor (k_A) und nach (k_B) dem Abknicken der Effluxkurven unterschieden sich nicht signifikant. Das Abknicken in einen schnelleren Efflux ließ sich durch das Weglassen der Versiegelung nicht abstellen, aber um einen Faktor von 1.3 reduzieren.

3.2.2.3 Berberin-Hemisulfat

Versiegelte Maiswurzelstücke (500 bis 800 mm oberhalb der Wurzelspitze), kultiviert in Luft- (Abb. 3-27 A und B) und Hydrokultur (Abb. 3-27 C), wurden für 60 min in einer Berberin-Hemisulfat-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff mit KSCN gefällt (2.2.2.3). Auf diese Weise sollte der diffusiv verfügbare apoplastische Bereich von Maiswurzeln beider Kultivationsmethoden untersucht werden.

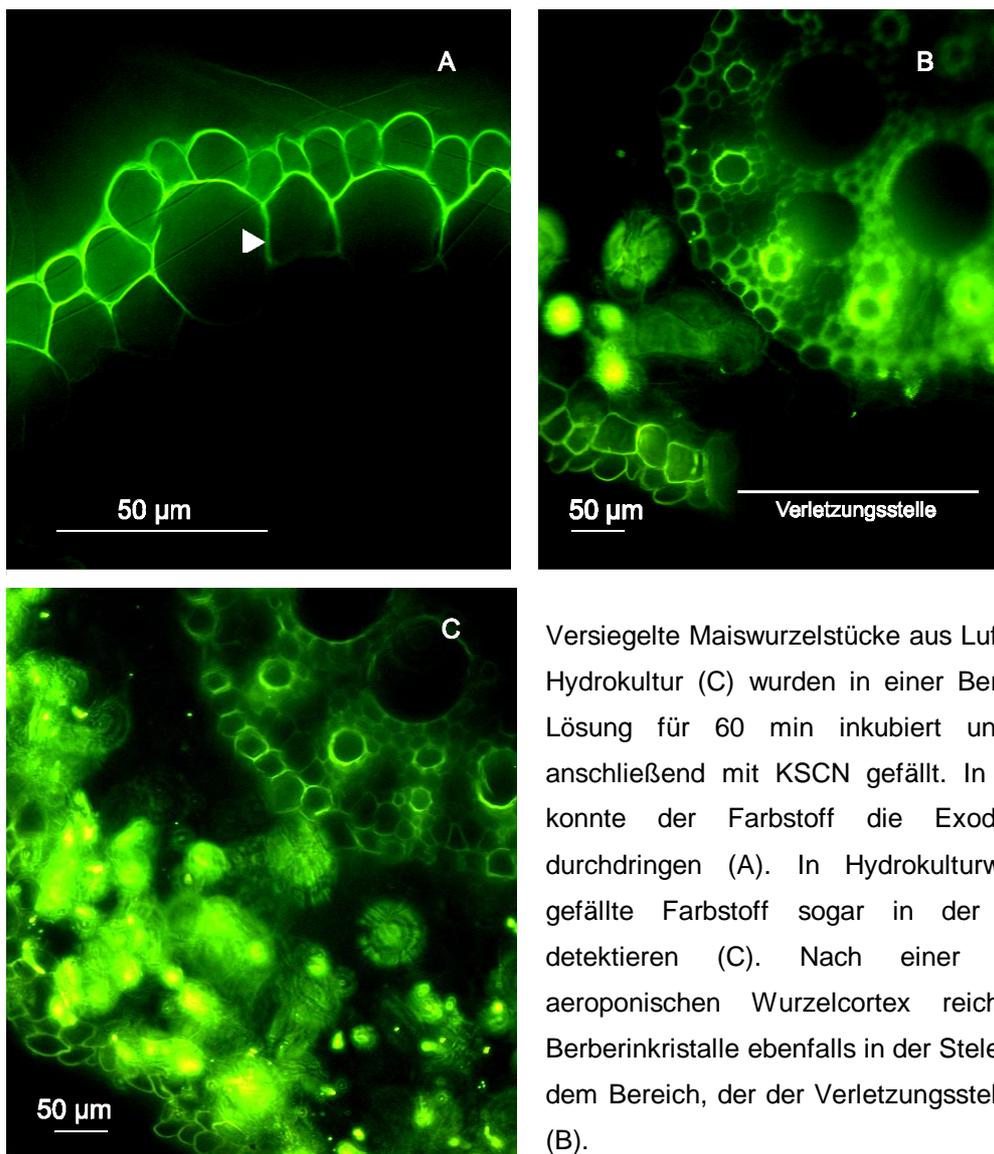


Abb. 3-27

Versiegelte Maiswurzelstücke aus Luftkultur (A, B) und Hydrokultur (C) wurden in einer Berberin-Hemisulfat-Lösung für 60 min inkubiert und der Farbstoff anschließend mit KSCN gefällt. In Luftkulturwurzeln konnte der Farbstoff die Exodermis \triangleright nicht durchdringen (A). In Hydrokulturwurzeln war der gefällte Farbstoff sogar in der Wurzelstele zu detektieren (C). Nach einer Verletzung des aeroponischen Wurzelcortex reicherten sich die Berberinkristalle ebenfalls in der Stele an, besonders in dem Bereich, der der Verletzungsstelle gegenüberliegt (B).

Bei der Untersuchung frischer Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop stellte sich heraus, dass Berberin-Hemisulfat in aeroponischen Wurzeln nur in die Rhizodermis und in die erste Hälfte der folgenden Cortezellschicht eindringen konnte (Abb. 3-27 A). Andere Zellwände wurden nicht angefärbt. Wurde der Wurzelcortex vor der Berberin-Inkubation mit einer Rasierklinge verletzt, so wurden die Berberinkristalle bis in den Xylemgefäßwänden gefunden. Am stärksten war die Färbung gegenüber der Gewebeerletzung (Abb. 3-27 B).

In Maiswurzeln aus Hydrokultur wurden die Zellwände von der Rhizodermis bis hin zu den Xylemwänden in der Stele gefärbt. Im Cortexgewebe fanden sich Akkumulationen von Berberinkristallen (Abb. 3-27 C).

3.3 ABA-Metabolisierung in Wurzelgewebe von *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L.

Um die Hemmung des oxidativen Abbaus der Abscisinsäure durch Tetcyclacis zu überprüfen (Rademacher 1988, Daeter 1994), wurden intakte Pflanzen von Mais und Sonnenblume nach 24-stündiger Vorinkubation in Tet für 2h in Nährlösung inkubiert, die 100 nM [¹⁴C]-ABA enthielt. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die nicht mit Tet behandelt worden waren (vgl. 2.4).

Der Gesamtradioaktivitätsgehalt in Maiswurzeln, deren ABA-Abbau nicht gehemmt war, bestand nach 2h nur noch zu 50% aus Abscisinsäure. Die andere Hälfte der aufgenommenen [¹⁴C]-ABA war bereits metabolisiert worden. Bei *H. annuus* waren zum gleichen Zeitpunkt erst 30% der aufgenommenen ABA abgebaut worden (Tab. 3-12).

Tab. 3-12 Prozentualer Anteil von Abscisinsäure und deren Metabolite in Wurzeln von *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L. als Anteil der aufgenommenen Gesamtradioaktivität von Kontrollpflanzen (-Tetcyclacis) oder nach 24h Inkubation in 10^{-5} M Tetcyclacis (+Tetcyclacis). 2 Stunden vor der Ernte wurden die Pflanzen in Nährlösung inkubiert, die neben Tet 100 nM radioaktive [14 C]-ABA enthielt. MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

Wurzeln	- Tetcyclacis		+ Tetcyclacis	
	ABA (%)	ABA-Metabolite (%)	ABA (%)	ABA-Metabolite (%)
von	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD
<i>Zea mays</i> L.	50.6 \pm 1.0	49.5 \pm 1.0	85.1 \pm 0.7	15.0 \pm 0.7
<i>Helianthus annuus</i> L.	66.3 \pm 4.3	33.8 \pm 4.3	86.5 \pm 0.5	13.5 \pm 0.5

Tetcyclacis hemmte den ABA-Metabolismus signifikant, so dass nach 2-stündiger ABA Exposition sowohl bei *Zea mays* als auch bei *Helianthus annuus* nur 16% bzw. 13% der aufgenommenen ABA abgebaut wurden. Bei diesen ABA-Metaboliten handelt es sich vermutlich um ABA-Konjugate.

3.4 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von ABA, α -Methylglucopyranose und Sorbit zwischen Oktanol und einer wässrigen Phase

Um die Verteilung von ABA, des hydrophilen Zuckers α -Methylglucopyranose und des Zuckeralkoholes Sorbit zwischen einem wässrigen und einem lipophilen Kompartiment (z.B. Apoplast und Caspary'scher Streifen oder Zellmembran) abhängig vom pH-Wert zu überprüfen, wurde der Verteilungskoeffizient K_r von radioaktiv markierter α -Methylglucopyranose, Sorbit und ABA zwischen Wasser und Oktanol, abhängig vom pH-Wert im wässrigen Medium, bestimmt.

Der Verteilungskoeffizient für ABA gibt dabei jeweils das Verhältnis der Gesamt-ABA in den beiden Phasen an und nicht nur das der protonierten Säuremoleküle (vgl. 2.5). Für α -Methylglucopyranose und Sorbit änderte sich der Verteilungskoeffizient nicht abhängig vom pH-Wert. Er nahm Werte zwischen 0.01 und 0.02 ein, d. h. nahezu 100% des Zucker oder des Zuckeralkoholes befanden sich in der wässrigen Phase (Abb. 3-28).

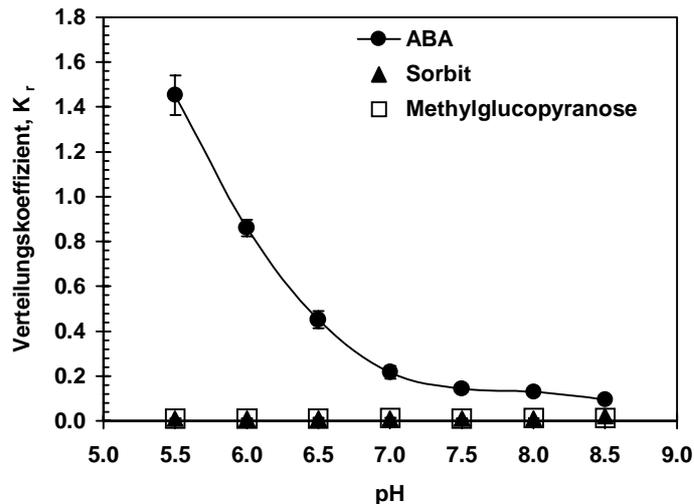


Abb. 3-28 Verteilungskoeffizient K_r von ABA (●), Sorbit (▲) und Methylglucopyranose (□) zwischen einer wässrigen Lösung und Oktanol in Abhängigkeit vom pH-Wert der wässrigen Phase. MW \pm SD, n = 3 Messungen von unabhängigen Proben.

Der Verteilungskoeffizient für ABA dagegen zeigte sich stark vom pH-Wert abhängig. Hatte das wässrige Medium einen pH-Wert von 5.5, so lag der Verteilungskoeffizient bei 1.5. Dies bedeutet, dass das protonierte ABA-Molekül besser in hydrophoben als in hydrophilen Lösungsmitteln löslich ist. Bis zu einem pH-Wert von 7.0 sank der Verteilungskoeffizient für ABA bis auf 0.2 und blieb dort bis zu einem pH-Wert von 8.5 nahezu konstant.

3.5 Abscisinsäure und die Wasserleitfähigkeit von Maiswurzeln

3.5.1 Zeitlicher Verlauf der ABA-Wirkung auf den Wasserfluss und dessen Spezifität

Um die Wirkung von Abscisinsäure auf den Wasserfluss durch Maiswurzeln in die Xylemgefäße zu bestimmen, wurden 11 Tage alte, hydroponisch kultivierte Pflanzen druckdicht an einer Saugapparatur befestigt (vgl. 2.6.2).

Nach Erreichen eines steady-state-Wasserflusses bei einem Unterdruck von -0.06 MPa wurde (\pm)-cis-trans-ABA in einer Endkonzentration von 100 nM zum Wurzelmedium gegeben (Abb. 3-29). Der radiale Wasserfluss (J_{Vr}) begann 10 bis 20 min nach ABA-Zugabe anzusteigen. Ein neuer steady-state- J_{Vr} auf einem höheren Niveau wurde nach weiteren 80 bis 110 min erreicht (Abb. 3-29).

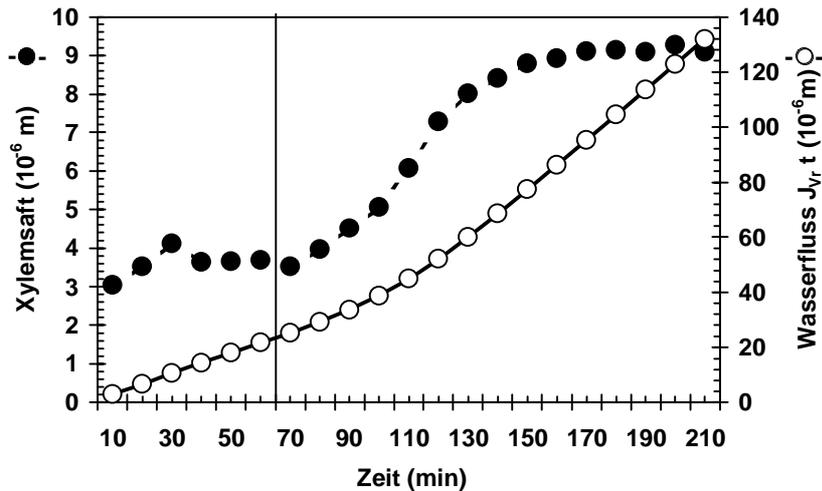


Abb. 3-29 Typisches Experiment zur Messung des ABA-Effektes auf J_{Vr} einer einzelnen Maiswurzel. Das Gesamtxylemsaftvolumen (-●-) und der radiale Wasserfluss J_{Vr} (-○-) sind dargestellt. J_{Vr} nahm im Vergleich zum Kontrollfluss nach (\pm)-cis-trans-ABA-Behandlung zu. Ein neuer steady-state Wasserfluss stellte sich nach 80 min ein.

Neben der Zeitabhängigkeit wurde die Spezifität des ABA-Effektes auf den Xylem-Wasserfluss getestet. Neben (\pm)-cis-trans-ABA bei einem pH-Wert von 5.5 und 8.0 wurden (+)-cis-trans-ABA, (-)-cis-trans-ABA, (\pm)-trans-trans-ABA, ABA-Glucoseester, ABA-Methylester, LAB 173 711 (ein synthetisches ABA-Analogon), die Pflanzenhormone Gibberellinsäure, Kinetin, Zeatin und Indol-3-Essigsäure und Essigsäure in einer Konzentration von 100 nM getestet (Abb. 3-30).

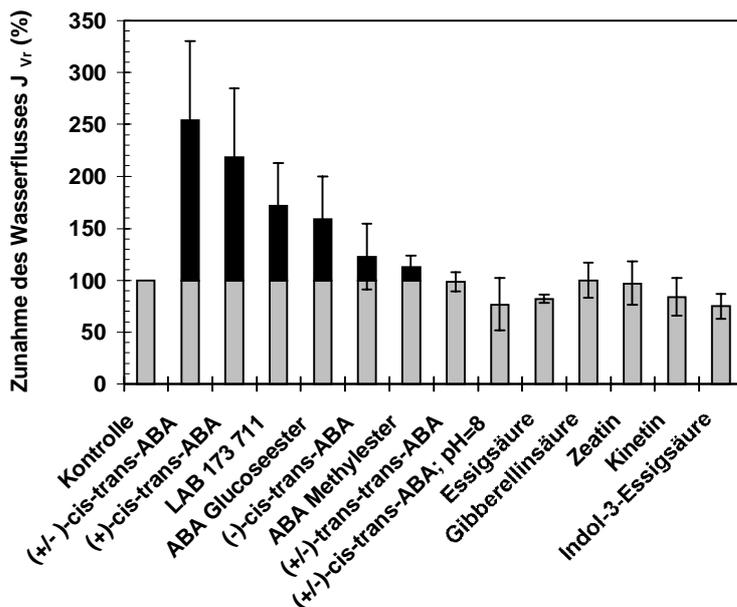


Abb. 3-30 Veränderung des radialen Wasserflusses J_{Vr} in % nach Applikation von 100 nM verschiedener ABA-Isomere und -derivate, weiteren Phytohormonen und dem synthetischen ABA-Analogon LAB 173 711. Der Kontroll-Wasserfluss wurde für jede Pflanze vor der jeweiligen Behandlung bestimmt. MW \pm SD, n = 3-6 Wurzeln

Ein Anstieg von J_{Vr} über den Kontroll-Wasserfluss wurde in abnehmender

Glucoseester, (-)-cis-trans-ABA und dem ABA-Methylester erreicht. (\pm)-cis-trans-ABA und (+)-cis-trans-ABA erhöhten J_{Vr} um den Faktor 2.5 und 2.2. Der Unterschied zwischen dem Isomeren-Gemisch und der reinen (+)-cis-trans-ABA war nicht signifikant (T-Test (A), $p > 0.2$).

LAB 173 711, ABA-Glucoseester und (-)-cis-trans-ABA stimulierten J_{Vr} um den Faktor 1.7, 1.6 und 1.2. Alle anderen getesteten Substanzen steigerten J_{Vr} nicht (Abb. 3-30).

3.5.2 Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit eines Wurzelsystems (L_{pr}) bei niedrigen Unterdrücken

Um die hydraulische Leitfähigkeit von in Hydrokultur angezogenen, 11 Tage alten Maispflanzen bei den verwendeten Unterdrücken (0 bis -0.08 MPa) zu bestimmen, wurden dekapitierte Pflanzen druckdicht an einer Saugapparatur befestigt (vgl. 2.6.2). Zum Vergleich wurden parallel L_{pr} -Messungen von 11 Tage alten Maiswurzeln aus Luftkultur angefertigt.

Die steady-state-Xylemsaftflüsse (J_{Vr}) wurden für die Unterdrücke 0, -0.02 , -0.04 , -0.06 und -0.08 MPa bestimmt. Abb. 3-31 A und B zeigen, dass für eine gegebene Druckdifferenz ΔP der Xylemsaftfluss pro Einheit Wurzeloberfläche ($J_{Vr} \cdot t$) linear mit der Zeit anstieg. Aus den Steigungen der Wasserflüsse (J_{Vr}), aufgetragen gegen den verwendeten Unterdruck (Abb. 3-31 C), wurde L_{pr} berechnet.

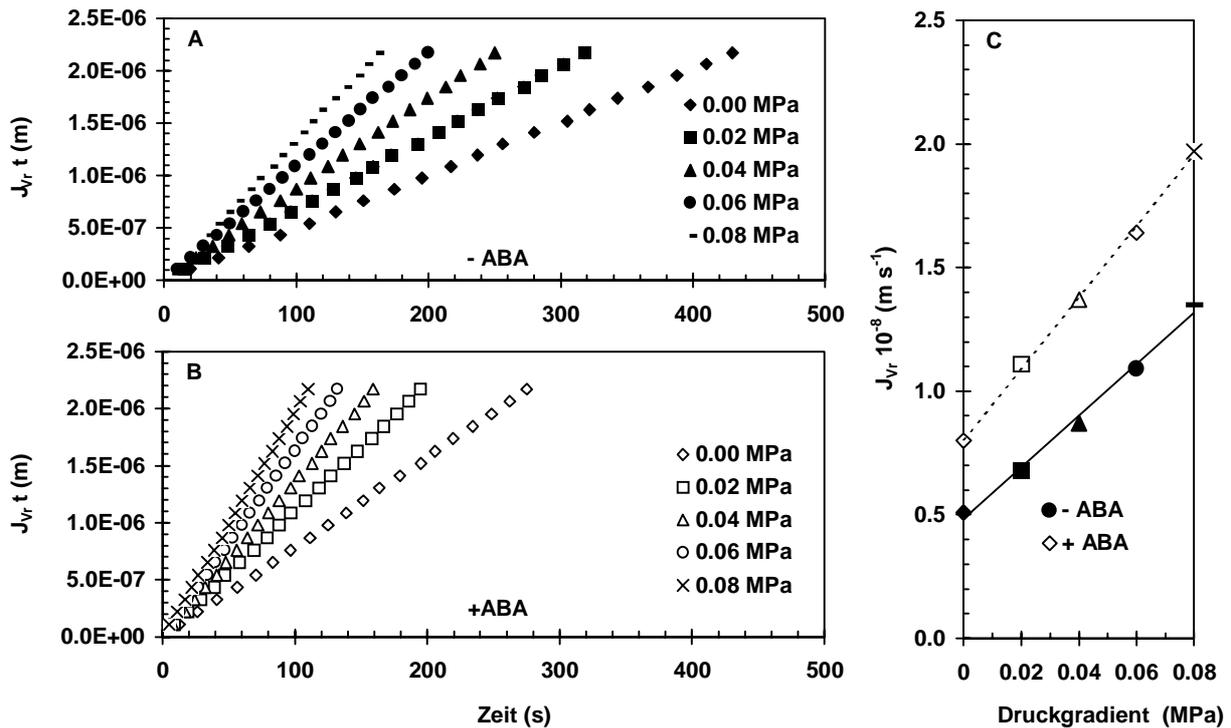


Abb. 3-31 A-C Xylemsaftfluss J_{vr} eines aeroponischen Maiswurzelsystems in Gegenwart von hydrostatischen Druckgradienten. Das durch die Maiswurzeln transportierte Wasservolumen stieg linear mit der Zeit bei den unterschiedlichen Druckgradienten an.

- A) Kontroll-Bedingungen (ausgefüllte Symbole)
 B) Effekt von 500 nM ABA (offene Symbole)
 C) Wasserfluss pro Einheit Wurzeloberfläche (J_{vr} in $\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), berechnet aus den Steigungen der Wasserflussgeraden in A und B. Die Werte wurden gegen den angelegten hydrostatischen Druckgradienten aufgetragen. Aus der Steigung der Wasserfluss-Druck-Geraden errechnet sich die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln (L_{pr}).

Die Wasserleitfähigkeiten waren bei Maiswurzeln aus Hydrokultur vor der ABA-Behandlung um den Faktor 2 größer im Vergleich zu aeroponischen Wurzeln. Nach Gabe von 500 nM ABA zum Medium stieg L_{pr} sowohl bei Maiswurzeln aus Hydrokultur (Faktor: 3) als auch aus Luftkultur (Faktor: 1.5) an (Tab. 3-13).

Tab. 3-13 Hydraulische Leitfähigkeiten (L_{pr}) von jungen Maiswurzeln, angezogen in Hydro- und Luftkultur. L_{pr} wurde für beide Kulturtechniken vor und nach 2-stündiger Inkubation in 500 nM ABA gemessen. Die Messwerte geben L_{pr} -Werte für ein Maiswurzelsystem an.

Pflanze	- ABA	+ ABA
Nr.	L_{pr}	L_{pr}
	$10^7 \text{ (m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}\text{)}$	$10^7 \text{ (m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}\text{)}$
Hydrokultur		
H1	1.7	5.3
H2	1.8	6.7
H3	2.7	4.4
H4	1.8	7.0
H5	1.2	5.3
MW \pm SD	1.8 \pm 0.5	5.7 \pm 1.1
Pflanze	- ABA	+ ABA
Nr.	L_{pr}	L_{pr}
	$10^7 \text{ (m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}\text{)}$	$10^7 \text{ (m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}\text{)}$
Luftkultur		
A1	0.8	1.2
A3	0.8	1.4
A4	0.7	1.1
A5	0.8	1.5
A6	0.9	1.2
A7	1.1	1.4
MW \pm SD	0.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2

Die Leitfähigkeiten der Maiswurzeln aus Luftkultur lagen nach ABA-Behandlung im Bereich ungestresster Hydrokulturpflanzen.

3.5.3 Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit einer Primärwurzel (L_{pr})

In diesen Experimenten wurde der ABA-Effekt auf die Leitfähigkeit von Maisprimärwurzeln mit einer Wurzeldrucksonde gemessen (vgl. 2.7.6.2). Um den Effekt einer Exodermis auf L_{pr} zu untersuchen, wurden 11 Tage alte Primärwurzeln aus Hydro- und Luftkultur verglichen.

Messungen der Wurzeldruckrelaxationen nach Erniedrigung oder Erhöhung des Wurzeldruckes ergaben typische, exponentiell verlaufende Zeit-Druck-Kurven (Abb. 3-32 A) des Wassertransportes.

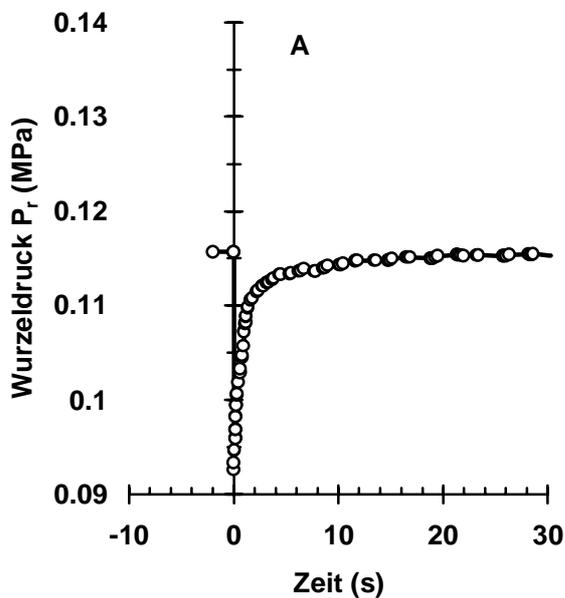
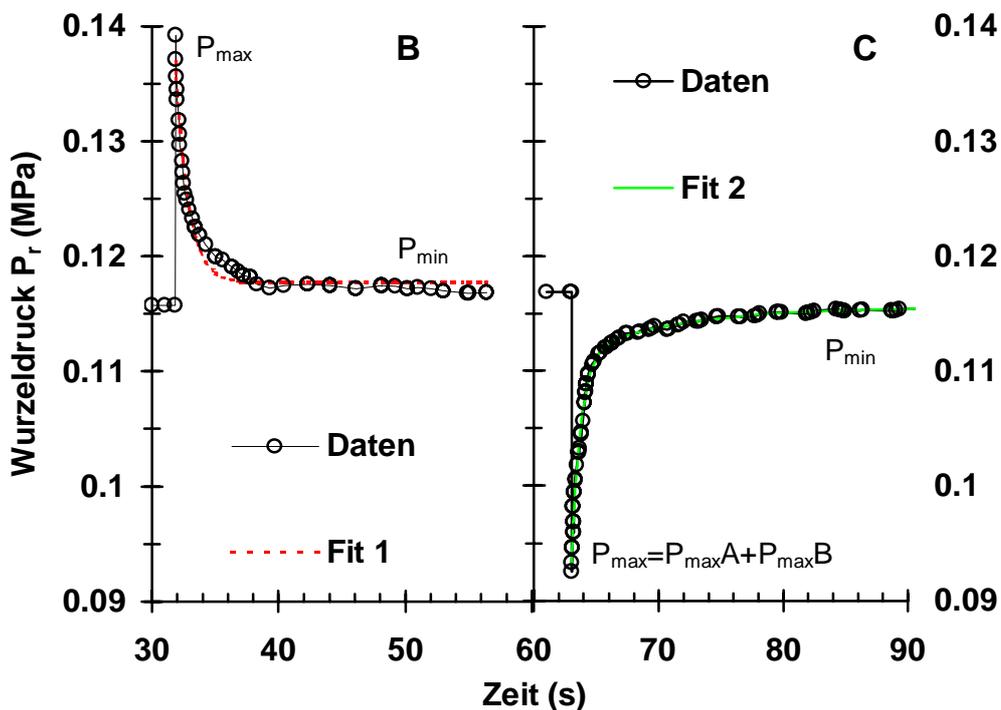


Abb. 3-32 A-C Typisches Experiment von Wurzeldruckrelaxationen nach Erniedrigung (A und C) oder Erhöhung (B) des Druckes im Xylem. Über eine exponentiell verlaufende Zeit-Druck-Kurve relaxiert der angehobene oder erniedrigte Wurzeldruck zurück zum steady-state Druck (P_{\min}). Diese Exponentialfunktion kann nur durch ein Gleichungssystem mit 2 Variablen beschrieben werden (Fit 2; C). Der Relaxationsprozess beinhaltet 2 Halbwertszeiten des Wasseraustausches $T_{1/2}^W$ A und $T_{1/2}^W$ B.



Jede Relaxationskurve zeigte dabei einen 2-phasigen Verlauf (Abb. 3-32 B und C) mit 2 Halbwertszeiten $T_{1/2}^W$ A und $T_{1/2}^W$ B. Ein monophasischer Fit der gemessenen

Wurzeldruckdaten P_r (Fit 1, Gleichung: $P_r = P_{\min} + (P_{\max} - P_{\min}) \cdot e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{T_{1/2}^W}}$) beschrieb zwar

Relaxationskurve konnte so jedoch nicht exakt berechnet werden (Abb. 3-32 B). Daher mussten die Zeit-Druck-Kurven an eine Exponentialfunktion mit 2 Variablen

angepasst werden (Fit 2; Gleichung: $P_r = P_{\min} + (P_{\max}A - P_{\min}) \cdot e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{T_{1/2}^W A}} + P_{\min} + (P_{\max}B - P_{\min}) \cdot e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{T_{1/2}^W B}}$; Abb. 3-32 C). Die schnellere Halbwertszeit $T_{1/2}^W A$ resultierte in einer hydraulischen Leitfähigkeit ($L_{p,r}A$) für Maiswurzeln aus Luftkultur von $2.0 \pm 1.8 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ und $4.2 \pm 1.7 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ für Maiswurzeln aus Hydrokultur (MW \pm SD, n = 201 Messungen von 5 Wurzeln; Tab. 3-14). $L_{p,r}A$ von aeroponischen Maiswurzeln war signifikant kleiner (Faktor: 2) als $L_{p,r}A$ von hydroponischen Wurzeln (T-Test (A); $p \leq 0.0001$).

Ein typisches Experiment mit einer einzelnen, hydroponischen Primärwurzel ist in Abb. 3-33 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 s wurde ABA in einer Endkonzentration von 100 nM zum Medium gegeben. $T_{1/2}^W A$ (und somit $L_{p,r}A$) wurde durch die ABA-Behandlung nicht beeinflusst. Dies galt für beide Kulturbedingungen (Tab. 3-14).

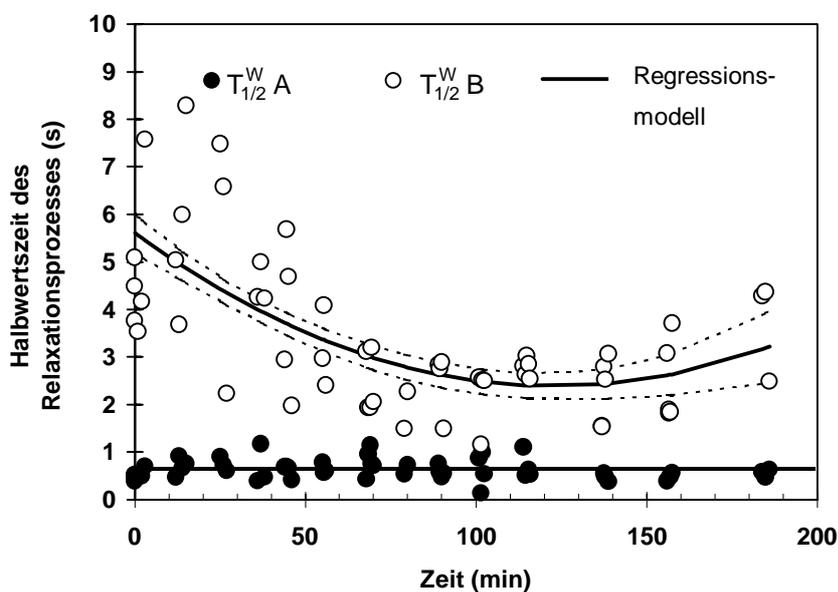


Abb. 3-33 Zeitlicher Verlauf von $T_{1/2}^W A$ (●) und $T_{1/2}^W B$ (○) nach 100 nM ABA-Behandlung zum Zeitpunkt 0 s eines typischen Experiments mit einer Maisprimärwurzel, angezogen in Hydrokultur. Die Datenpunkte sind einzelne Messwerte einer Wurzel. Das Modell der quadratischen Regression (—) und dessen 95%iger Vertrauensbereich (- · -) ist hinzugefügt.

Die zweite, längere Halbwertszeit $T_{1/2}^W B$ ergab eine hydraulische Leitfähigkeit $L_{p,r}B$, die eine Größenordnung kleiner war als $L_{p,r}A$ (Tab. 3-14). In mit ABA behandelten Wurzeln aus Hydro- und Luftkultur verkürzte sich $T_{1/2}^W B$. Minima waren 70 bis 100 min nach Inkubationsbeginn zu beobachten (Abb. 3-33, Tab. 3-14). Dies korrespondierte

mit einer um den Faktor 4 (Luftkultur) bzw. 3 (Hydrokultur) erhöhten hydraulischen Leitfähigkeit $L_{p,r}B$ (Tab. 3-14).

Tab. 3-14 Hydraulische Leitfähigkeiten ($L_{p,r}$) von einzelnen Maisprimärwurzeln. $L_{p,r}A$ veränderte sich nicht während einer Behandlung mit 100 nM ABA. Währenddessen stieg $L_{p,r}B$ nach 100 bis 180 min an. MW \pm SD, n = Anzahl der Messungen

Maiswurzeln aus Luftkultur				Maiswurzeln aus Hydrokultur					
$L_{p,r}A$									
	$L_{p,r} \cdot 10^7$ (m s ⁻¹ MPa ⁻¹)		n =		$L_{p,r} \cdot 10^7$ (m s ⁻¹ MPa ⁻¹)		n =		
A1	0.5	\pm 0.2	44	H1	6.5	\pm 1.8	11		
A2		1.1 \pm 0.9	43	H2		2.3 \pm 0.9	50		
A3		3.4 \pm 1.5	42	H3		3.1 \pm 1.6	53		
A4		0.6 \pm 0.5	31	H4		3.7 \pm 1.8	49		
A5		4.5 \pm 1.7	41	H5		5.3 \pm 1.8	38		
$L_{p,r}B$ n = 3-7									
Pflanze	Zeit (min)	$L_{p,r} \cdot 10^7$ (m s ⁻¹ MPa ⁻¹)	Zeit (min)	$L_{p,r} \cdot 10^7$ (m s ⁻¹ MPa ⁻¹)	Pflanze	Zeit (min)	$L_{p,r} \cdot 10^7$ (m s ⁻¹ MPa ⁻¹)	Zeit (min)	$L_{p,r} \cdot 10^7$ (m s ⁻¹ MPa ⁻¹)
A1	0	0.02 \pm 0.01	61-75	0.09 \pm 0.03	H1	0	0.68 \pm 0.21	73-74	1.90 \pm 0.40
A2	0	0.10 \pm 0.05	108-122	0.50 \pm 0.20	H2	0	0.22 \pm 0.05	121-147	0.60 \pm 0.30
A3	0	0.30 \pm 0.05	108-122	0.90 \pm 0.30	H3	0	0.41 \pm 0.06	116-138	0.76 \pm 0.22
A4	0	0.10 \pm 0.04	158-182	0.50 \pm 0.17	H4	0	0.42 \pm 0.15	152-166	1.10 \pm 0.45
A5	0	0.30 \pm 0.09	180-210	0.70 \pm 0.20	H5	0	0.46 \pm 0.12	106-123	1.50 \pm 0.43

120 min nach Beginn der ABA-Behandlung konnte eine leichte, aber nicht signifikante Tendenz eines Wiederanstieges von $L_{p,r}B$ verzeichnet werden. Die Abnahme von $T_{1/2}^W B$ in Abb. 3-33 und Tab. 3-14 war für alle getesteten Wurzeln sowohl aus Hydro- als auch aus Luftkultur signifikant unterschiedlich von Null ($p \leq 0.0001$) (Statistische Methoden s. 2.9).

3.5.4 Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit in Cortezellen (L_p)

3.5.4.1 Zeitlicher Verlauf

Um den zeitlichen Ablauf des ABA-Effektes auf einzelne Wurzelzellen im Cortex von

Drucksonde angefertigt (vgl. 2.7.6.3). Es war möglich, Zellen über einen Zeitraum von 2 Stunden stabil zu halten, d. h. der Zellturgor sank während des Versuchszeitraumes nicht ab. In diesen Zellen wurden vor und nach Inkubation in 1000 nM ABA die Eigenschaften des Zellwassertransports gemessen (Abb. 3-34).

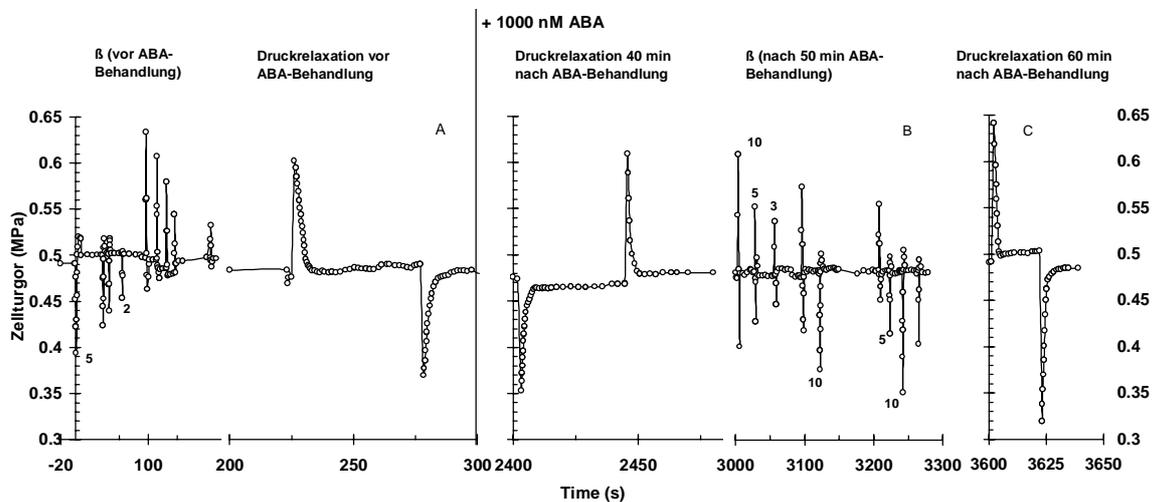


Abb. 3-34 Typisches Experiment zur Messung der Zelleitfähigkeit von *Zea mays* L. In Cortezellen wurden sowohl der zeitliche Verlauf von Zelldruckrelaxationen als auch der Elastizitätsmodul β vor (A) und nach ABA-Behandlung (1000 nM; B, C) gemessen. Nach 60 min ABA-Inkubation relaxierte der Zellturgor deutlich schneller zu seinem steady-state-Druck zurück, als zu Beginn des Experiments. Der Elastizitätsmodul nahm ebenfalls ab.

Abb. 3-34 A und B zeigen die Ergebnisse eines typischen Experimentes mit einer Maiswurzelcortezelle. Dargestellt sind $T_{1/2}^W$: Halbwertszeit des Wassertransports (s), β : Elastizitätskoeffizient der Zelle (MPa mm^{-3}) und die hydraulische Leitfähigkeit der Zelle: L_p ($\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$).

Während der ersten Stunde der ABA-Inkubation nahm $T_{1/2}^W$ von 3 s bis auf ein Minimum von 0.5 s ab. Die Halbwertszeit zu Beginn des Experiments wurde nach 2 h ABA-Inkubation wieder erreicht. Parallel zu $T_{1/2}^W$ nahm der Elastizitätsmodul β von $2.5 \cdot 10^4$ auf $1.7 \cdot 10^4 \text{ MPa mm}^{-3}$ ab (Abb. 3-35 A). Nach Gleichung 13 resultierte dies in einer um den Faktor 6 erhöhten hydraulischen Leitfähigkeit der Zelle (L_p) (Abb. 3-35 B).

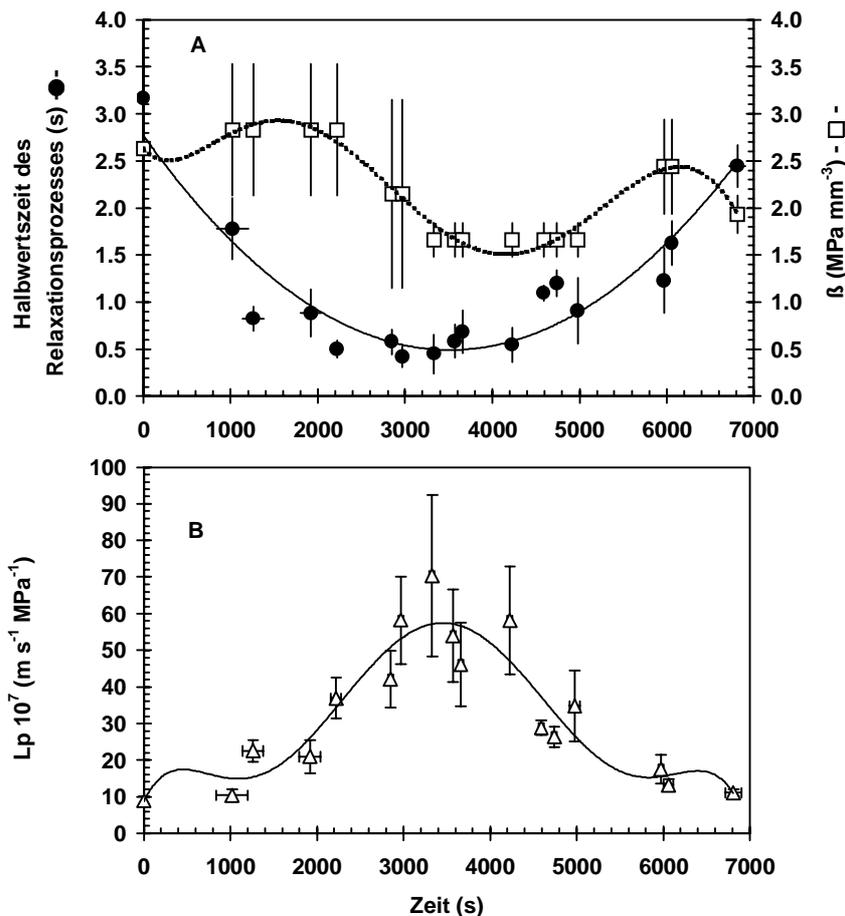


Abb. 3-35 Zeitverlauf von $T_{1/2}^W$ (-●-) (Halbwertszeit des Wasserrelaxationsprozesses) und β (-□-) (Elastischer Modul der Wurzelcortexzelle pro 1 mm³ Zellvolumen) einer einzelnen Wurzelcortexzelle von *Zea mays* (A). Die ABA-Inkubation begann zum Zeitpunkt 0. Es folgte eine Abnahme von $T_{1/2}^W$ und β , die in einer erhöhten hydraulischen Leitfähigkeit der Zelle (-△-) (L_p) resultierten (B). pH-Wert des Mediums war 5.5. MW \pm SD, n = 3 Messungen an einer Zelle

Die Wiederholung des Versuchs führte zu einem um den Faktor 12 erhöhten L_p mit einem Maximum nach 50 min (Daten nicht dargestellt).

3.5.4.2 Konzentrationsabhängigkeit

Um den zeitlichen Verlauf des ABA-Effektes zu überprüfen und zusätzlich den Einfluss der Pflanzenhormonkonzentration auf L_p zu untersuchen, wurden Maiswurzeln, in Hydrokultur angezogen, in 10 nM, 100 nM oder 1000 nM ABA für 10 min, 30 min, 1 h oder 2 h inkubiert und dann untersucht.

Als Kontrolle dienten Wurzelcortexzellen, die 1 h in Nährlösung ohne ABA inkubiert waren.

Die Kontroll-Wurzeln hatten ein L_p von $6.8 \pm 6.4 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (MW \pm SD, n = 20 Zellen) (Abb. 3-36). Eine ABA-Inkubation von 100 nM bzw. 1000 nM steigerte L_p über eine Stunde hinweg bis zu Maxima von $49 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (Faktor: 7) und $180 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (Faktor: 27) (Abb. 3-36).

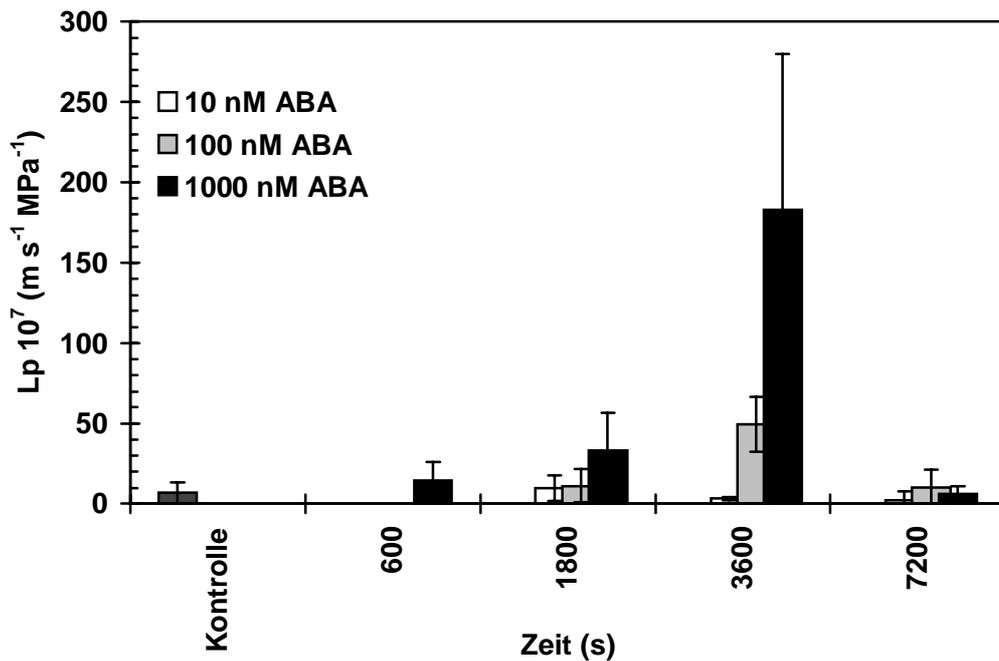


Abb. 3-36 Hydraulische Leitfähigkeit (Lp) von Cortezzellen in Maiswurzeln, die in 10 nM (□), 100 nM (■) und 1000 nM (■) ABA zwischen 10 min und 2 h inkubiert waren. Kontrollwurzeln waren 1 h in einem Nährmedium ohne ABA inkubiert. pH-Wert der Nährlösung war 5.5. MW ± SD, n = 4 – 20 Zellen

Nach 2 h Inkubation kehrten die Zelleitfähigkeiten zum Ausgangswert zurück. Eine ABA-Applikation von 10 nM war wirkungslos (Abb. 3-36).

3.5.4.3 pH-Abhängigkeit

Um zu überprüfen, ob das ABA-Anion die hydraulische Zelleitfähigkeit ebenso erhöht wie die protonierte Säure, wurden Maiswurzeln in einer Nährlösung inkubiert, die 100 nM ABA enthielt und deren pH-Wert zusätzlich auf 8.0 eingestellt war. Wie in Abb. 3-37 ersichtlich, erwies sich das ABA-Anion während 2-stündiger Inkubationsdauer als wirkungslos.

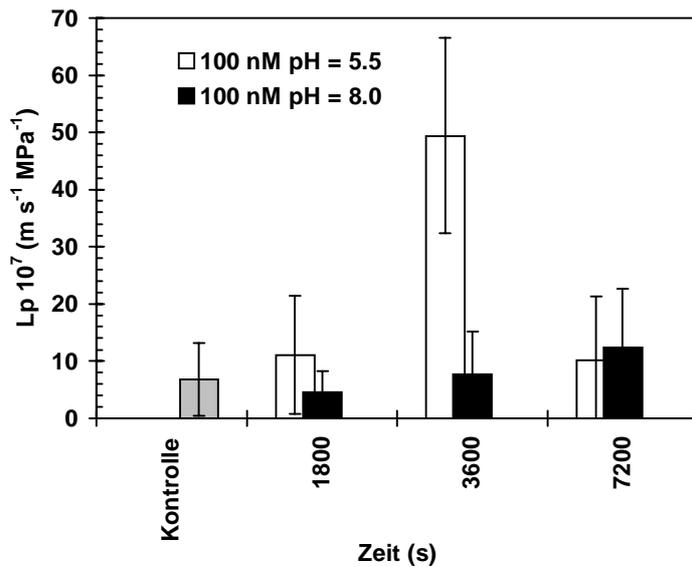


Abb. 3-37 Hydraulische Leitfähigkeit (Lp) von Maiswurzelcortexzellen, inkubiert in 100 nM ABA bei einem pH-Wert von 5.5 (□) und 8.0 (■), abhängig von der Dauer der ABA-Behandlung. Kontrollwurzeln (■) waren in einer Nährlösung mit pH = 5.5 inkubiert. MW ± SD, n = 4 – 20 Zellen.

3.5.4.4 Spezifität

Messungen von Lp an Maiswurzelcortexzellen wurden neben ABA mit Kinetin und Indol-3-Essigsäure in einer Konzentration von 1000 nM durchgeführt. Die Spezifität des ABA-Signals auf zellulärer Ebene konnte so getestet werden.

Maiswurzeln wurden 1h in Nährlösung mit den Pflanzenhormonen inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Wurzeln.

Nur (±)-cis-trans-ABA vergrößerte Lp signifikant über den Kontrolllevel. Kinetin und Indol-3-Essigsäure (IES) erniedrigten Lp tendenziell um die Faktoren 4 bzw. 3 (Abb. 3-38).

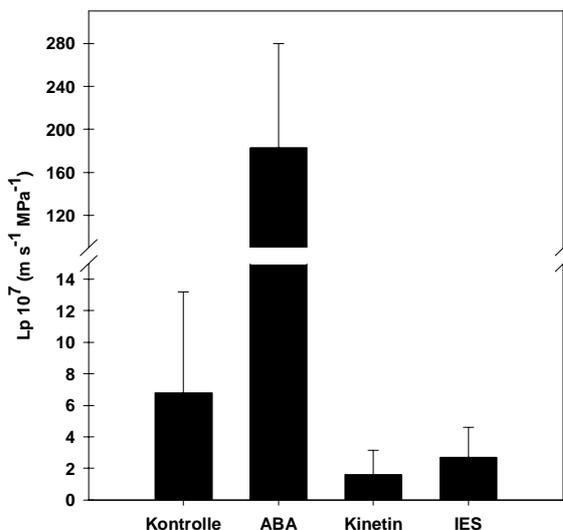


Abb. 3-38 Hydraulische Leitfähigkeiten (Lp) von corticalen Maiswurzelzellen nach Behandlung mit 1000 nM ABA, Kinetin oder Indol-3-Essigsäure für 1h. Kontrollwurzeln wurden für 1h in Nährlösung ohne Phytohormon inkubiert. pH-Wert der Nährlösung war 5.5. MW ± SD, n = 6-20 Zellen

Gleichzeitig reduzierte ABA den elastischen Modulus der Zelle (β) von 3.6 MPa mm^{-3} auf im Mittel 1.5 MPa mm^{-3} (Abb. 3-39). Die Phytohormone Indol-3-Essigsäure und Kinetin steigerten β tendenziell.

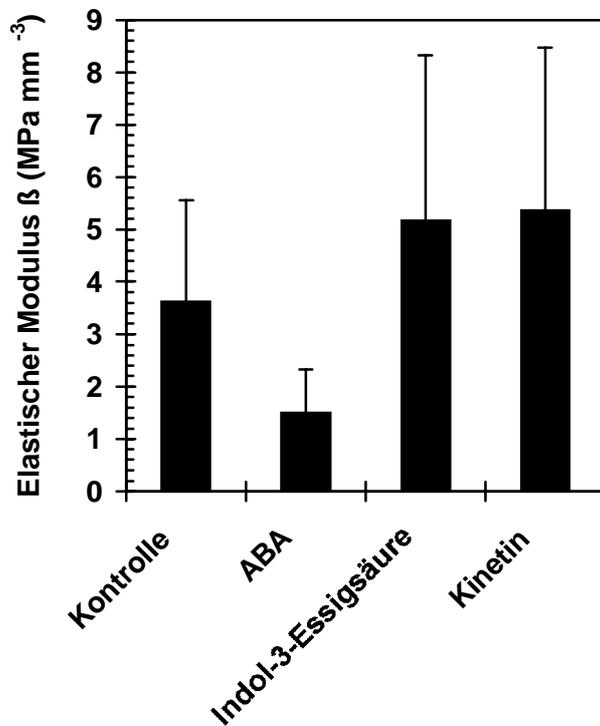


Abb. 3-39 Elastischer Modulus (β) von corticalen Maiswurzelzellen hydroponischer Wurzeln 40 bis 80 mm oberhalb des Wurzelapex. Die Maiswurzeln wurden für eine Stunde in 1000nM ABA, Indol-3-Essigsäure oder Kinetin inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Wurzeln. MW \pm SD, n = 5-20 Zellen

3.5.5 Wirkung von ABA auf das osmotische Potenzial

3.5.5.1 Gewebe von Wurzelsegmenten

Zur Bestimmung des osmotischen Potenzials im Gewebe von versiegelten, langen Wurzelstücken wurden diese in einem Versuchsmedium (pH = 5.5) inkubiert (vgl. 2.7.1), das $10 \mu\text{M}$ ABA und 10^{-5} M Tet enthält.

Während einer 3-stündigen ABA-Inkubation änderte sich das osmotische Potenzial von hydroponischen Maiswurzelgeweben nicht (Abb. 3-40).

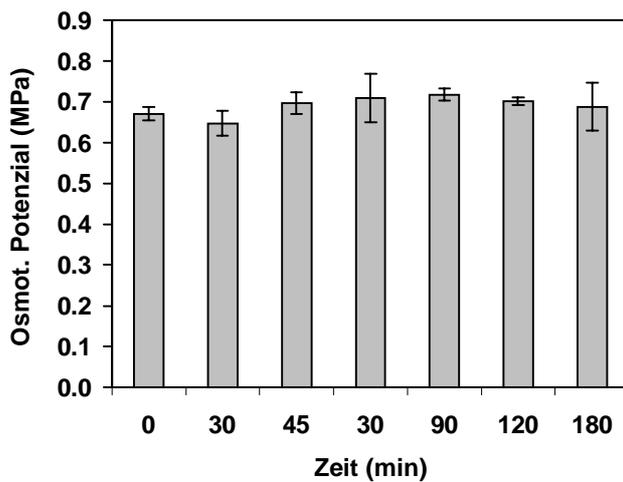


Abb. 3-40 Osmotisches Potenzial von mit Paraffin versiegelten 120 mm langen hydroponischen Maiswurzelspitzen. Die Wurzelstücke wurden in einem Medium inkubiert (pH=5.5), das 10 μ M ABA und 10^{-5} M Tetracyclis enthielt. MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

Die Wurzelgewebestücke besaßen ein osmotisches Potenzial von 0.69 ± 0.04 MPa (MW \pm SD, n = 20 Wurzeln).

Mit längerer Inkubation bis zu 24 h in der beschriebenen Pufferlösung nahm das osmotische Potenzial der Gewebe bis auf 0.5 MPa ab (Tab. 3-15).

Tab. 3-15 Osmotisches Potenzial von mit Paraffin versiegelten 120 mm langen hydroponischen und aeroponischen Maiswurzelspitzen. Die Wurzelspitzen wurden in einem Medium inkubiert (pH=5.5), das 10 μ M ABA und 10^{-5} M Tetracyclis enthielt. MW \pm SD, n = 3 Wurzeln

	Inkubationsdauer (h)				
	0	8	18	19	24
Osmotisches Potenzial von Maiswurzelspitzen nach ABA-Inkubation (MPa)					
Hydrokultur	0.67 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.05	0.56 ± 0.04
Luftkultur	0.66 ± 0.08	0.59 ± 0.12	0.55 ± 0.08	0.46 ± 0.06	0.57 ± 0.21

Zwischen Wurzelstücken aus Hydro- und Luftkultur konnte kein Unterschied festgestellt werden.

3.5.5.2 Xylemsaft dekapitierter Pflanzen

3.5.5.2.1 Osmotische Exsudation dekapitierter Maispflanzen

Dekapitierte, 11 Tage alte, hydroponische Maispflanzen wurden druckdicht an einer Saugapparatur befestigt. Der Xylemsaftfluss und das osmotische Potenzial des

ABA in einer Konzentration von 100 nM im Wurzelmedium erzeugte bei rein osmotisch getriebener Exsudation eine Erhöhung des Wasserflusses um $18 \pm 6 \%$ (Faktor: 1.18; MW \pm SD, n = 4 Wurzeln). Gleichzeitig verringerte sich das osmotische Potenzial des Xylemsaftes um im Mittel 32% (Abb. 3-41).

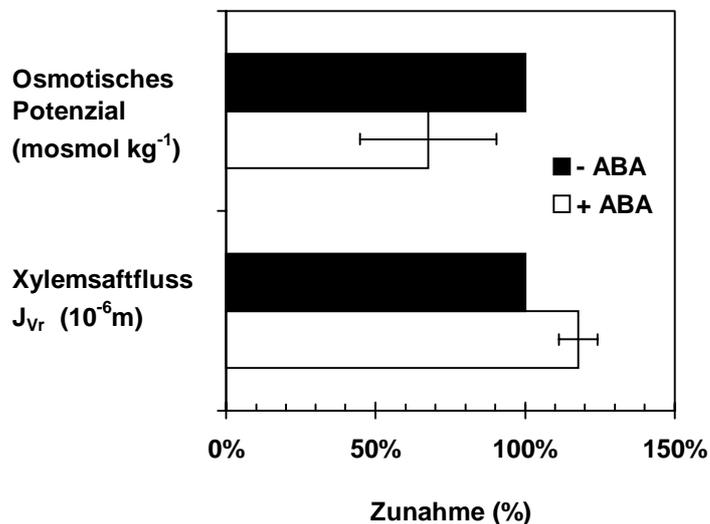


Abb. 3-41 Veränderung des osmotischen Potenzials und des Xylemsaftflusses J_{vr} der rein osmotisch angetriebenen Exsudation nach ABA-Behandlung (+ABA). Als Kontrollpotenzial und Kontrollfluss dienten die Werte vor der Hormonbehandlung (-ABA). MW \pm SD, n = 6 Wurzeln

Bei Kontrollpflanzen, die nicht mit ABA behandelt wurden, nahm der Wasserfluss in denselben Zeitabständen auf $81\% \pm 5\%$ (MW \pm SD, n = 6 Wurzeln) des Anfangsflusses ab. Ebenso wie bei den ABA-behandelten Pflanzen sank das osmotische Potenzial auf $69\% \pm 30\%$ des Anfangspotenzials (MW \pm SD, n = 6 Wurzeln).

3.5.5.2.2 Exsudation dekapitierter Maispflanzen unter hydrostatischen Druckgradienten

Applikation von 100 nM ABA zum Wurzelmedium von *Zea mays* erhöhte den Xylemsaftfluss um den Faktor 2.5 bei einem hydrostatischen Druckgradienten von 0.06 MPa (vgl. 3.5.1). Die hydraulische Leitfähigkeit des gesamten Maiswurzelsystems über einen subatmosphärischen Druckbereich von 0 bis -0.08 MPa wurde nach ABA-Behandlung (500 nM) um den Faktor 3.2 (Pflanzen aus Hydrokultur) bzw. 1.6 (Pflanzen aus Luftkultur) erhöht (vgl. 3.5.2). Das osmotische Potenzial des gewonnenen Xylemsaftes sank parallel mit verstärktem Unterdruck für beide Kultivationsstechniken ab (Abb. 3-42 A und B).

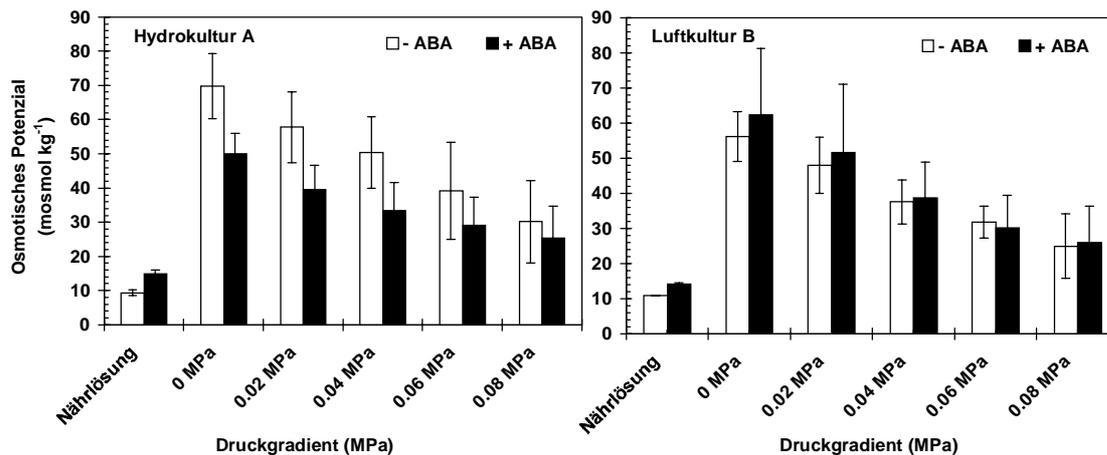


Abb. 3-42 Osmotisches Potenzial von Wurzelexsudaten 11 Tage alter, hydroponischer (A) und aeroponischer (B) Maiswurzelsysteme und deren Nährlösungen. Das osmotische Potenzial des Xylemsaftes fiel mit gesteigertem subatmosphärischem Druck sowohl für ABA-behandelte (■) als auch für unbehandelte Wurzeln (□). MW \pm SD, n = 5-7 Wurzeln

Der Xylemsaft von Pflanzen aus Hydrokultur hatte bei niedrigen Unterdrücken (0 bis -0.04 MPa) nach ABA-Applikation ein geringeres osmotisches Potenzial als im unbehandelten Zustand (Abb. 3-42 A). Bei höheren Unterdrücken (-0.06 MPa und -0.08 MPa) bestand kein signifikanter Unterschied mehr.

Bei Wurzeln aus Luftkultur erhöhte eine ABA-Inkubation das osmotische Potenzial tendenziell aber nicht signifikant über den Kontrollwert.

Die beiden Kultivierungstechniken beeinflussten das osmotische Potenzial nicht signifikant (Abb. 3-42 A und B).

3.5.5.3 Wurzeldruck und Zellturgor

Der Wurzel- und der Zelldruck konnten vor und nach ABA-Applikation mit der Wurzel- und Zelldrucksonde bestimmt werden (vgl. 2.6.4).

Inkubation von 11 Tage alten Maiswurzeln in 100 nM ABA führte zu einem Wurzeldruckanstieg um $16 \pm 13\%$ bei aeroponischen und $32 \pm 28\%$ bei hydroponischen (MW \pm SD, n = 4 – 5 Wurzeln). Der Wurzeldruck stieg bei beiden Kulturen 50 min bis 60 min nach ABA-Applikation an. Nach einer Stunde Phytohormonbehandlung blieb er für die restliche Versuchszeit (60 min bis 100 min)

Der Zellturgor war nach Applikation von 1000 nM ABA im Vergleich zur Kontrolle nach Inkubationszeiten von 0.5 h und 1 h erhöht (T-Test (A), $p \leq 0.05$). Inkubation der Wurzeln in 100 nM oder 10 nM ABA führte zu einem erniedrigten Zellturgor im Vergleich zu 1000 nM (Abb. 3-43).

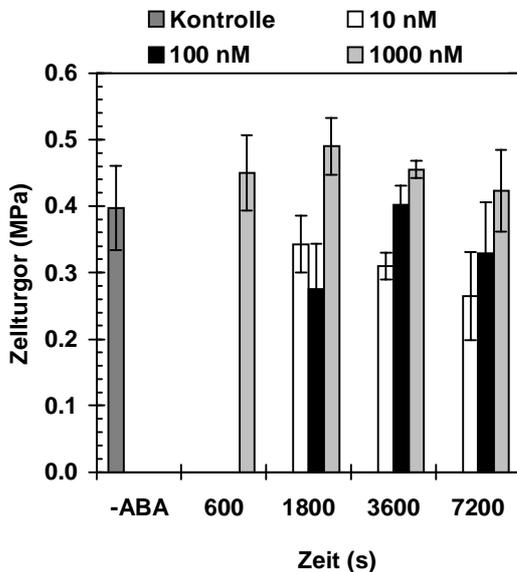


Abb. 3-43 Zellturgor von corticalen Maiswurzelszellen nach Inkubation der Wurzeln in 10 nM (□), 100 nM (■) und 1000 nM (▒) ABA. Als Kontrolle (■) dienen unbehandelte Wurzeln (-ABA). MW \pm SD, n = 3-20 Zelle

10 nM ABA im Medium senkte den Zellturgor nach 1h Inkubation unter den Kontrolllevel

3.5.6 Wasserabgabe aus isolierten Wurzeln

Voll turgeszente, kurze Wurzelspitzen und -segmente von *Zea mays* (vgl. 2.7.4.1), wurden mit Paraffin versiegelt und deren RWG bei 25°C und 60% rel. Luftfeuchte bestimmt.

Wurzelproben von hydroponischen Maispflanzen hatten bereits nach 60 min 90% ihres Gewebewassers verloren (kurze Wurzelspitzen: 94 ± 6 %, Wurzelsegmente: 88 ± 9 %, MW \pm SD, n = 3 Wurzelspitzen). Kurze Wurzelspitzen von Maispflanzen aus Luftkultur hatten zu diesem Zeitpunkt 82 ± 6 % ihres Gewebewassers abgegeben. Aeroponische Wurzelsegmente besaßen nach 1h Austrocknung noch 59 ± 11 % ihres Anfangswassergehaltes (Abb. 3-44).

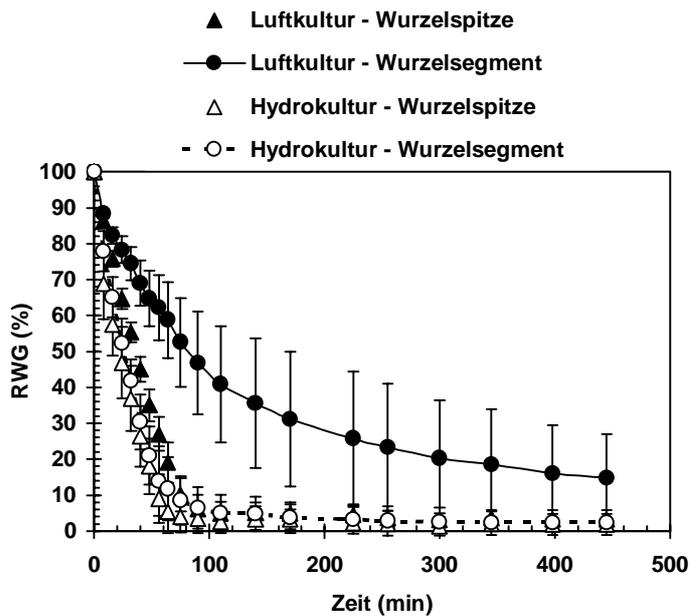


Abb. 3-44 Relativer Wassergehalt von 40 mm langen Wurzelspitzen (\triangle und \blacktriangle) und Wurzelsegmenten (\circ und \bullet ; 50 mm bis 110 mm über der Wurzelspitze) von *Zea mays* Primärwurzeln aus Hydrokultur (offene Symbole) und Luftkultur (ausgefüllte Symbole). Zum Zeitpunkt 0 min wurden die Wurzeln zur Austrocknung der Raumluft ausgesetzt. MW \pm SD, n = 3 Wurzelspitzen

Nach 7 Stunden Austrocknung enthielten die aeroponischen Wurzelsegmente im Mittel noch 15% des Gesamtwassergehaltes. Alle anderen Wurzelteile waren zu diesem Zeitpunkt auf 2 – 3 % des Anfangswassergehaltes eingetrocknet. Inkubation der Wurzelsegmente für 2h in 100 nM ABA vor Versuchsbeginn beeinflussten den verzögerten Wasserverlust aus aeroponischen Wurzelsegmenten nicht (Abb. 3-45).

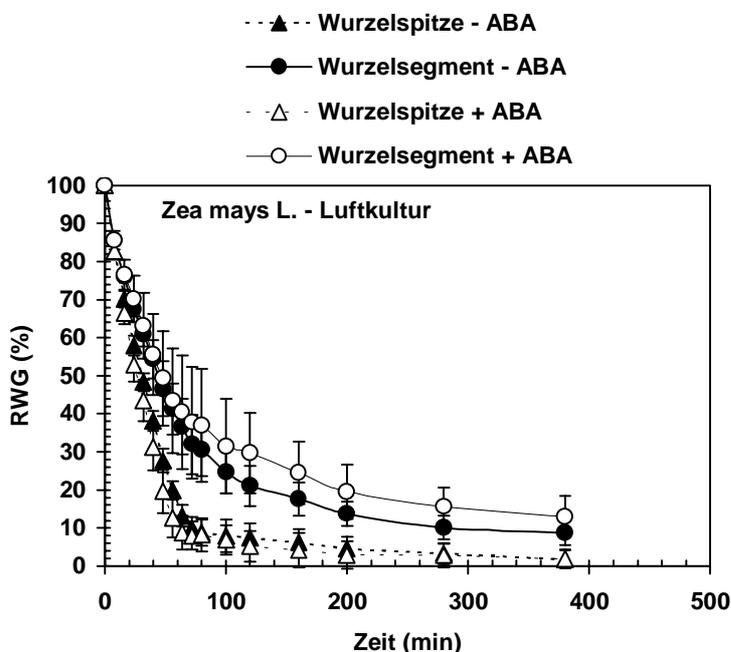


Abb. 3-45 Relativer Wassergehalt von 40 mm langen Wurzelspitzen (\triangle und \blacktriangle) und Wurzelsegmenten (\circ und \bullet ; 50 mm bis 110 mm über der Wurzelspitze) von aeroponischen *Zea mays*-Primärwurzeln, die entweder mit 100 nM ABA behandelt wurden (offene Symbole) oder unbehandelt waren (ausgefüllte Symbole). Zum Zeitpunkt 0 min wurden die Wurzeln zur Austrocknung der Raumluft ausgesetzt. MW \pm SD, n = 3 Wurzelspitzen

3.6 Abscisinsäure und Aquaporine

3.6.1 Lokalisation von Aquaporinen in Maiswurzeln

Um zu überprüfen, ob putative Wasserkanäle im Wurzelcortex von *Zea mays* exprimiert werden, wurde Maiswurzelgewebe mechanisch in seinen Zentralzylinder (Stele) und den Wurzelcortex getrennt (vgl. 2.8.1) und das Expressionsniveau von PIP-mRNA beider Gewebe im Vergleich bestimmt.

Beim Heraustrennen der Stele aus der Wurzel wurde entweder die Endodermis zerrissen, oder sie blieb intakt und der Cortex riss an seiner innersten Zellschicht auf (Abb. 3-46). Die in den Endodermiszellen produzierte mRNA wurde somit nicht erfasst oder wurde der Stele zugeordnet.

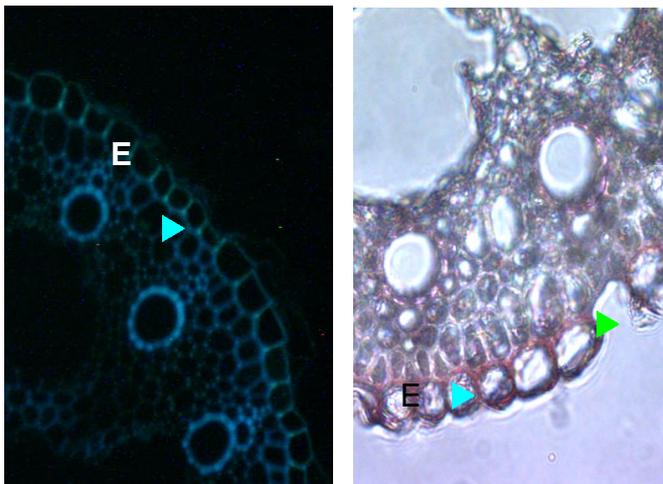


Abb. 3-46 Querschnitte durch die Stele von Maiswurzeln 40 mm oberhalb des Wurzelapex. Der Cortex wurde mechanisch von der Stele getrennt. Die Endodermis (E) zerreißt dabei entweder (▶), oder bleibt am Cortex haften (▶).

Für die Versuche wurde mRNA von Cortex und Stele aus einem Pool à 10 Wurzeln 2 unabhängiger Pflanzenanzuchten gewonnen.

Bei gleichen mRNA-Mengen enthielten Cortex und Stele gleiche Mengen an mRNA des α -Tubulin-Standards (Cortex: 100% (Bezugsmenge), Stele: $104 \pm 7\%$, MW \pm MA, n = 2 Gewebepools á 10 Wurzeln).

Abb. 3-47 A bis F zeigen die Ergebnisse von quantitativen RT-PCRs mit Primern für die putativen Wasserkanäle *PIP_{all}* (A), *Zm6* (B), *Zm26* (C), *Zm35* (D), *ZmPIP1* (E) und *TC_10431* (F) (2.8.5.2). Bei gleicher eingesetzter mRNA-Menge besaß das Cortexgewebe immer ein höheres PIP-Expressionsniveau als die Stele.

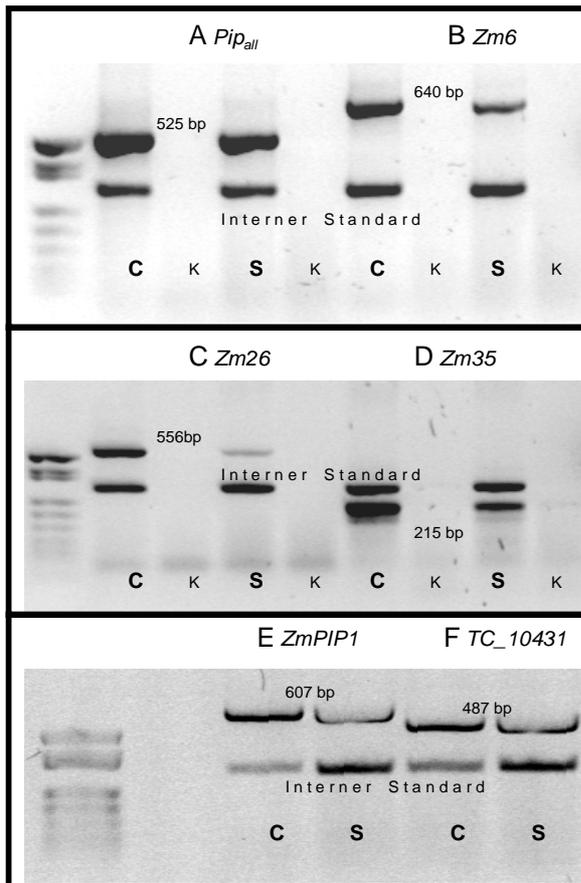
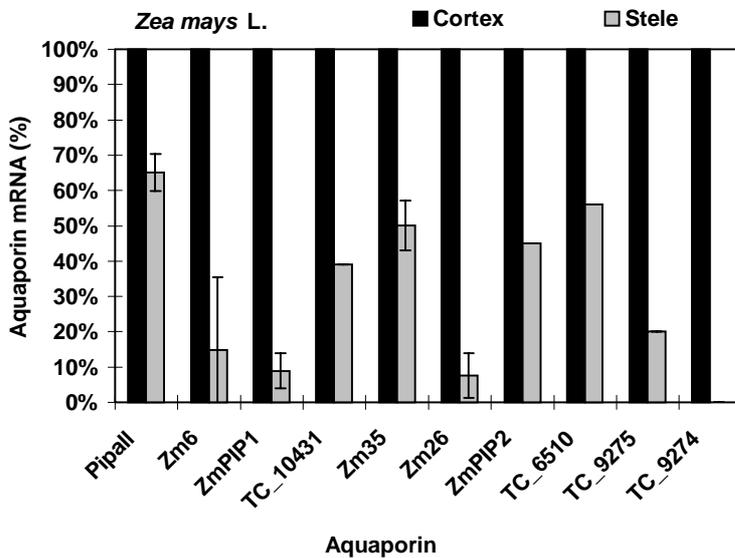


Abb. 3-47 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Produkten der exprimierten PIPs *PIP_{all}*, *Zm6*, *Zm26*, *Zm35*, *ZmPIP1* und *TC_10431* einer quantitativen RT-PCR. Es werden die jeweiligen mRNA-Expressionsniveaus der getrennten Gewebe Cortex (C) und Stele (S) von Maisprimärwurzeln miteinander verglichen. Die Gewebeprobe wurden 20 bis 60 mm oberhalb des Wurzelapex entnommen. Interner Standard ist *pAW109* (308 bp). Kontrollen (K) sind RT-PCR Proben ohne Reverse Transkriptase. Die Fotografie des Geles wurde invertiert.

Weitere Analysen bezüglich der PIP-Expression aus der Wasserkanal-Familie PIP1 (*Zm6*, *ZmPIP1*, *TC_10431*) und PIP2 (*Zm26*, *Zm35*, *ZmPIP2*, *TC_6510*, *TC_9275*, *TC_9274*) (2.8.5.2) bestätigten dieses Verteilungsmuster (Abb. 3-48). *TC_9274*, ein Gen der Aquaporinfamilie PIP2, konnte in der Stele nicht nachgewiesen werden. Die Expression der Aquaporin-mRNA im stelären Gewebe im Vergleich zum Cortex war bei *PIP_{all}* am stärksten ($65 \pm 5\%$, MW \pm SD, n = 3 RT-Ansätze aus 2 unabhängigen Pflanzenanzuchten). Die Expressionsrate der weiteren untersuchten Aquaporine war in der Stele um den Faktor 0.56 bis hin zu keiner Expression erniedrigt (Abb. 3-48).

Abb. 3-48 Expressionsrate von putativen Aquaporinen der Familien PIP1 (*Zm6*, *ZmPIP1*, *TC_10431*)



und PIP2 (*Zm26*, *Zm35*, *ZmPIP2*, *TC_6510*, *TC_9275*, *TC_9274*)

und von *PIP_{all}* in Maiswurzelgeweben. Das

Expressionsniveau des jeweiligen putativen Wasserkanals im

Cortex wurde als 100% gesetzt. Im Zentralzylinder (Stele) der

Wurzelproben wurde bei gleichen mRNA-Mengen weniger PIP-

mRNA nachgewiesen als im Cortex. MW ± SD, n = 3 RTs aus

2 unabhängigen Pflanzenanzuchten

3.6.2 Einfluss von ABA auf die Transkription von Aquaporin-mRNA

Um den Einfluss von ABA auf die Transkription von putativer Aquaporin-mRNA zu testen, wurde Wurzelcortexgewebe von *Zea mays* in 1000 nM ABA für 0, 30, 45, 60, 90 und 120 min inkubiert (Zeitreihe). Zusätzlich wurde Cortexgewebe für 1 h mit ABA-Nährlösung der Konzentrationen 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM und in Nährlösung ohne ABA beladen (Konzentrationsreihe). Nach Isolation der mRNA wurde mittels der verfügbaren Aquaporin-Primer das ABA-abhängige PIP-Expressionsniveau im Wurzelcortex untersucht.

Abb. 3-49 zeigt die RT-PCR-Analyse zur ABA-Zeitreihe für *PIP_{all}*. Die Bahnen 1 bis 6 stellen die Inkubationsdauer der Cortexgewebe von 0 h bis 2 h in 1000 nM ABA dar.

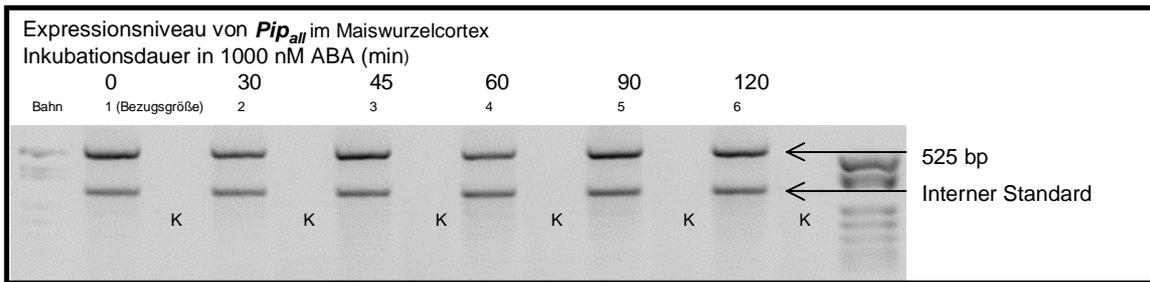


Abb. 3-49 Gelelektrophoretische Auftrennung des DNA-Produktes von *PIP_{all}* aus dem Maiswurzelcortex (20 bis 60 mm oberhalb des Wurzelapex). Die intakten Keimlinge waren vor der Gewebeernte 30 min (Bahn 2), 45 min (Bahn 3), 60 min (Bahn 4), 90 min (Bahn 5) und 120 min (Bahn 6) in einer 1000 nM ABA-Nährlösung inkubiert. Keimlinge, die nur in Nährlösung aufbewahrt wurden, dienten als Bezugsgröße (Bahn 1). Interner Standard ist *pAW109* (308 bp). Kontrollen (K) sind RT-PCR Proben ohne Reverse Transkriptase. Die Fotografie des Geles wurde invertiert.

Nach Abgleich mit dem internen biologischen und biochemischen Standard konnte für alle erfassten PIPs keine signifikante Erhöhung der Wasserkanalexpression mit der Dauer der ABA-Inkubation festgestellt werden (Tab. 3-16).

Tab. 3-16 Expressionsniveau in % von Maiswurzelcortexgewebe nach unterschiedlich langer Inkubation in 1000 nM ABA. Weder die Aquaporinexpression der PIP1-Familie (*PIP_{all}*) noch der PIP2-Familie (*Zm26*, *Zm35*) stieg nach ABA-Einwirkung. Die Aquaporinexpression der unbehandelten Wurzeln (0 min ABA-Inkubation) wurde als Bezugsgröße (100%) verwendet. MW \pm SD, n = 2 RTs aus einem Pool von 10 Wurzeln

Expressionsniveau (%)		Inkubation in 1000nM ABA (min)					
	0 (Bezugsgröße)	30	45	60	90	120	
Aquaporinfamilie PIP 1							
<i>PIP_{all}</i>	100	79	90	65	86	83	
Aquaporinfamilie PIP 2							
<i>Zm26</i>	100	34 \pm 26	50 \pm 27	22 \pm 0	25 \pm 8	63 \pm 22	
<i>Zm35</i>	100	96 \pm 11	132 \pm 23	98 \pm 0	107 \pm 26	104 \pm 25	

Die Schwankungen des PIP-Expressionsniveaus um das der unbehandelten Wurzeln (Bezugsgröße: 0 min ABA-Inkubation) lagen für die putativen Aquaporine *PIP_{all}* und *Zm35* im Ungenauigkeitsbereich der Methode der quantitativen RT-PCR. Nach Wang et al. 1989 liegt dieser bei \pm 20%. Das Aquaporin-Expressionsniveau von *Zm26* (PIP2) sank während der Inkubationsdauer mit ABA auf 22% des Anfangsniveaus

Abb. 3-50 A bis E zeigen die RT-PCR-Analysen zur ABA-Konzentrationsabhängigkeit für *Zm26* (A), *PIP1_MC* (B), *Zm6* (C), *PIP_{all}* (D) und den internen biologischen Standard α -*Tubulin* (E). Die Bahnen 1 bis 5 enthielten mRNA von Cortexgeweben, die in 0 bis 10 μ M ABA inkubiert waren. Nach Abgleich mit dem internen biologischen und biochemischen Standard konnte nach Berücksichtigung der Methodenungenauigkeit ($\pm 20\%$) für alle erfassten PIPs keine signifikante Erhöhung der Wasserkanalexpression abhängig von der ABA-Konzentration festgestellt werden (Tab. 3-17). Eine einmalige Induktion von *Zm6* (Abb. 3-50 C) durch ABA war in weiteren cDNA-Pools nicht mehr zu detektieren.

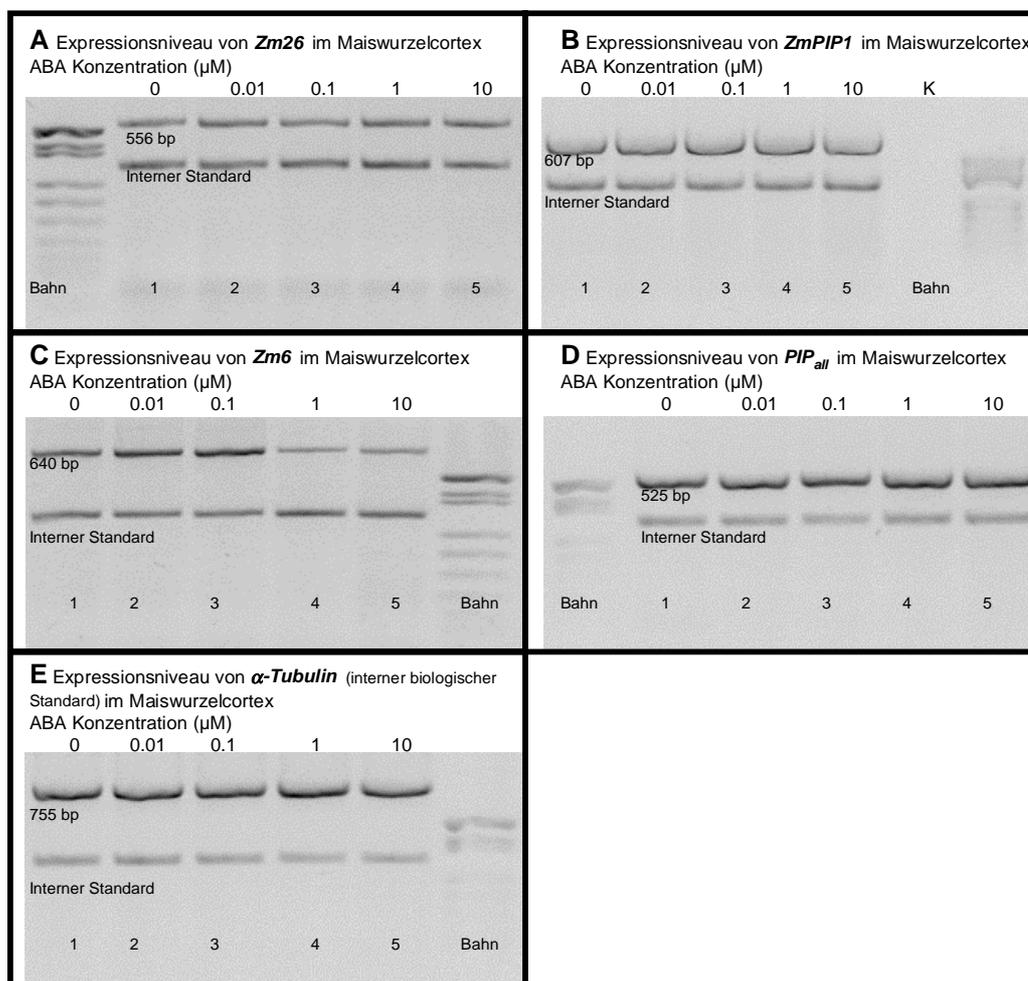


Abb. 3-50 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Produkte von *Zm26*, *ZmPIP1*, *Zm6*, *PIP_{all}* und des α -*Tubulin*-Standards aus dem Maiswurzelcortex (20 bis 60 mm oberhalb des Wurzelapex). Die intakten Keimlinge waren vor der Gewebeernte 1 h in 0.01 μ M (Bahn 2), 0.1 μ M (Bahn 3), 1 μ M (Bahn 4) und 10 μ M (Bahn 5) ABA inkubiert. Keimlinge, die 1 h nur in Nährlösung aufbewahrt wurden (ohne ABA), dienten als Bezugsgröße (Bahn 1). Interner Standard ist *pAW109* (308 bp). Kontrollen (K) sind RT-PCR Proben ohne Reverse Transkriptase. Die Fotografie des Geles wurde invertiert.

Tab. 3-17 Expressionsniveau in % von Maiswurzelcortexgewebe nach 60 min Inkubation in ABA unterschiedlicher Konzentration. Weder die Aquaporinexpression der PIP1-Familie (*PIP_{all}*, *ZmPIP1* und *TC_10431*) noch der PIP2-Familie (*Zm26*, *Zm35*, *ZmPIP2*, *TC_6510*, *TC_9274* und *TC_9275*) stieg nach ABA-Einwirkung. Die Induktion von *Zm6* war nicht reproduzierbar. Die Aquaporinexpression der Gewebe nach 60 minütiger Inkubation in ABA-freier Nährlösung wurde als Bezugsgröße (100%) verwendet. MW ± SD, n = 2 RTs aus einem Pool á 10 Wurzeln; -: nicht detektiert

	Expressionsniveau (%)				
	Inkubation für 1h in ABA (µM)				
	0 (Bezugsgröße)	0.01	0.1	1	10
Aquaporinfamilie PIP 1					
<i>PIP_{all}</i>	100	125 ± 7	139 ± 23	91 ± 29	123 ± 44
<i>Zm6</i>	100	154 ± 30	130 ± 20	52 ± 43	92 ± 72
<i>ZmPIP1</i>	100	125 ± 3	108 ± 3	82 ± 15	89 ± 20
<i>TC_10431</i>	100	101	74	114	106
Aquaporinfamilie PIP 2					
<i>Zm26</i>	100	148 ± 2	74 ± 12	65 ± 6	77 ± 12
<i>Zm35</i>	100	103 ± 20	95 ± 19	58 ± 17	64 ± 1
<i>ZmPIP2</i>	100	85	72	99	63
<i>TC_6510</i>	100	70	-	85	64
<i>TC_9274</i>	100	61	27	55	26
<i>TC_9275</i>	100	75	81	93	53

3.6.3 Sequenzierung der *PIP_{allr}* und *PIP_{all(B)}*-Transkripte

Die Primer *PIP_{all_f2/f3}* und *PIP_{all_r}* hybridisierten mit stark konservierten Bereichen der Aquaporin-Gensequenz. Um zu untersuchen, ob mit dieser Methode unterschiedliche putative Aquaporine detektiert wurden, erfolgte eine Sequenzierung der Transkripte aus den Primerpaaren *PIP_{all_f2/r}* und *PIP_{all_f3/r}* (Abb. 3-51).

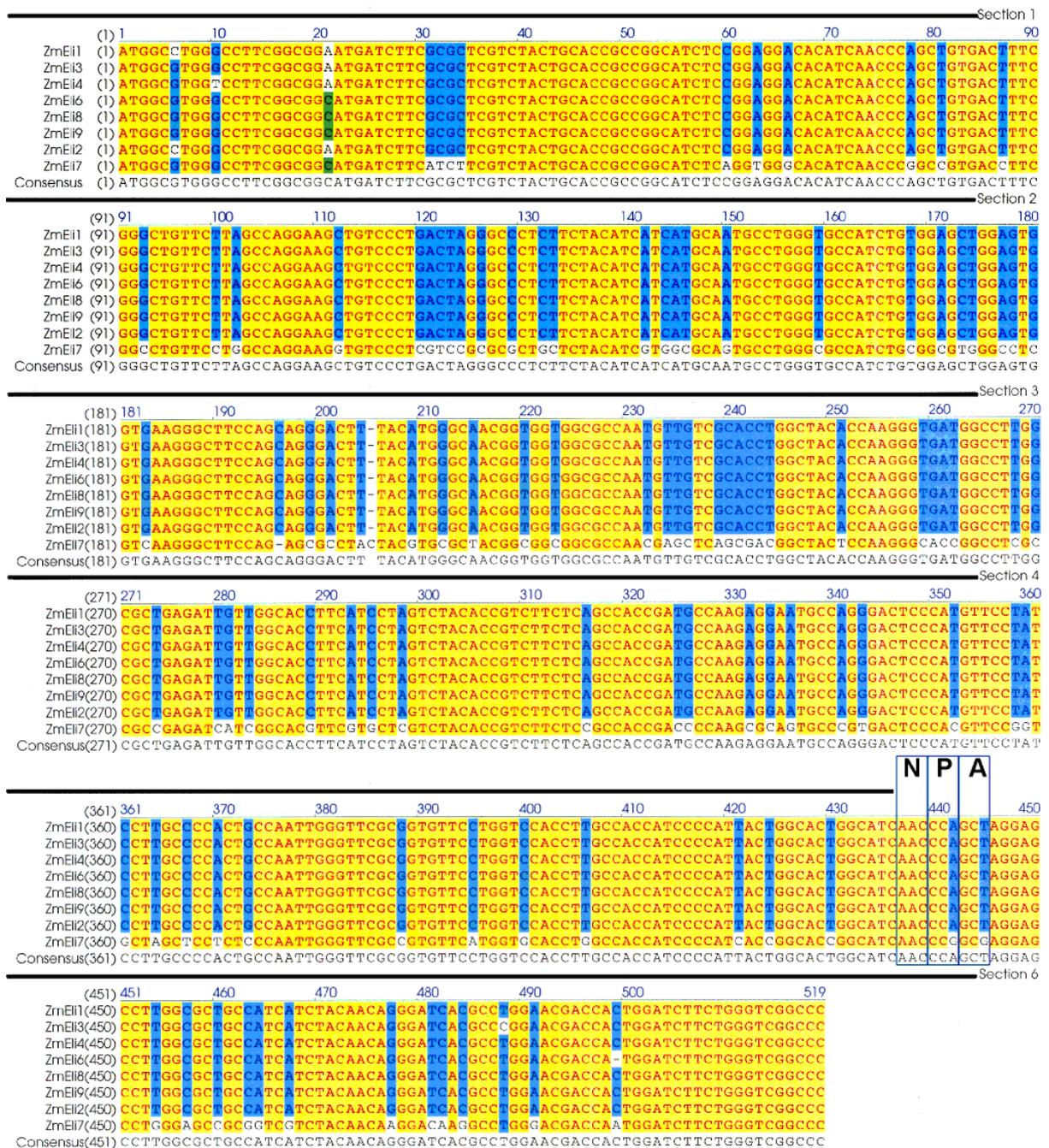


Abb. 3-51 Sequenzanalyse der klonierten DNA-Fragmente aus den Primerpaaren $PIP_{all_f2/r}$ (ZmEli1, 2, 3 und 4) und $PIP_{all_f3/r}$ (ZmEli6, 7, 8 und 9). Das für Aquaporine hoch-konservierte NPA-Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin) (blau eingerahmt) wird durch die Nukleotid-Sequenz AAC CCA GCT oder AAC CCA GCT (ZmEli7) kodiert. Das Gen ZmEli7 unterscheidet sich von den übrigen klonierten Wasserkanälen.

Die willkürlich gepickten Klone zeigten eine große Homologie. Die Genprodukte des Primerpaares $PIP_{all_f2/r}$ (ZmEli1 bis 4) waren nahezu identisch (Homologien von 99.4% bis 100%). Bei den Sequenzen des Primerpaares $PIP_{all_f3/r}$ unterschied sich der Klon ZmEli7 zu 21% von den Klonen ZmEli6 bis 9 (Homologien von ~100%). Es wurde davon ausgegangen, dass maximal 2 Aquaporingene durch die Primerpaare erfasst wurden. Unterschiede vor und nach dem sequenzierten Bereich konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Das, für die Membranprotein-Familien der Aquaporine hoch-konservierte NPA (Asparagin-Prolin-Alanin)-Motiv wurde in allen sequenzierten Genen detektiert (Abb. 3-51).

3.6.4 Einfluss von ABA auf den Wasserfluss durch Wurzeln von AQP.1-*antisense*-Konstrukten aus *Nicotiana tabacum* L.

Wurzeln dekapitierter Keimlinge von *Nicotiana tabacum* L. wurden druckdicht an einer Saugapparatur fixiert (vgl. 2.6.2). Bei einem subatmosphärischen Druck von -0.03 MPa wurde der steady-state-Wasserfluss vor (J_{Vr-ABA}) und nach (J_{Vr+ABA}) Behandlung der Wurzeln mit 100 nM ABA bestimmt. Es wurden die Zunahmen der Wasserflüsse J_{Vr} ($\frac{J_{Vr+ABA}}{J_{Vr-ABA}}$) des Wildtypes mit den *antisense*-Konstrukten bezüglich eines Wasserkanals (vgl. 2.7.6.5) verglichen.

Die transformierten Tabak-Pflanzen erzeugten entweder geringere Mengen des Aquaporines 1 (Nt. AQP.1) im Plasmalemma (PIP) (Linien PIP-18-3, PIP-4-3, PIP-11-7, und PIP-3-4: 5% - 15% der mRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp) oder im Tonoplasten (TIP) (Linien TIP-M1-1 und TIP-M1-5: 31% - 37% der mRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Kaldenhoff und Dr. A. Weig).

Die Zunahme des Xylemsaftflusses nach ABA-Behandlung war für die Wildtypen sowohl der PIP-*antisense*-Konstrukte als auch der TIP-*antisense*-Konstrukte gleich (Wildtyp PIP: 1.5 ± 0.3 ; Wildtyp TIP: 1.7 ± 0.1 ; MW \pm SD, n = 3; Abb. 3-52).

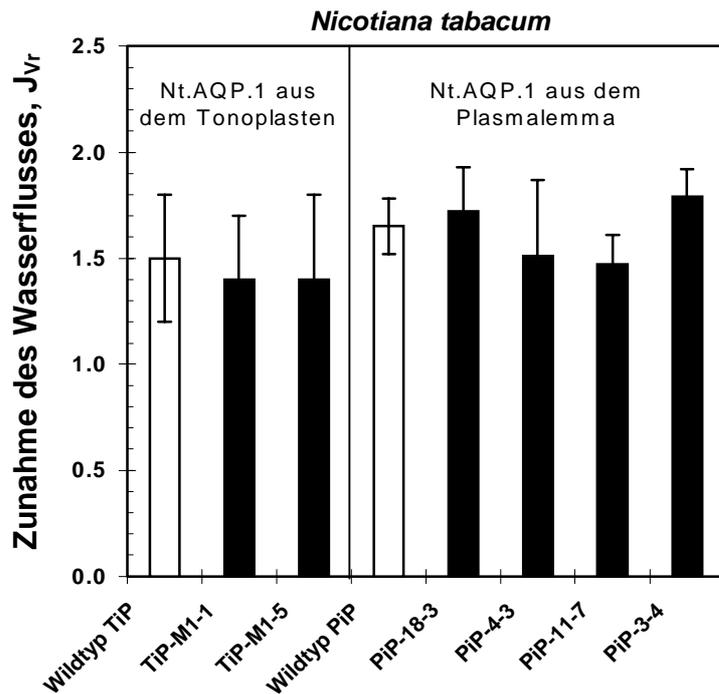


Abb. 3-52 Zunahmen der steady-state-Wasserflüsse J_{vr} durch Wurzeln von *Nicotiana tabacum* nach Zugabe von 100 nM ABA zum Wurzelmedium ($\frac{J_{vr+ABA}}{J_{vr-ABA}}$). Es wurden die Wildtypen der Tabakpflanzen mit *antisense*-Konstrukten bezüglich des Aquaporins Nt.AQP.1 aus Tonoplast und Plasmalemma verglichen. MW \pm SD, n = 3-6 Wurzelsysteme

Die Zunahmen der Wasserflüsse ($\frac{J_{vr+ABA}}{J_{vr-ABA}}$) veränderten sich bei *antisense*-Konstrukten der Tabakpflanzen, die weniger Nt.AQP.1 mRNA produzierten, nicht signifikant im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp. Sie lagen im Mittel bei 1.3 bis 1.8 (Abb. 3-52).

Die endogenen Wurzel-ABA-Gehalte der TIP-*antisense*-Konstrukte waren im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Wildtyp TIP: 0.9 ± 0.4 pmol ABA (g FG)⁻¹; TIP-M1-1: 1.9 ± 0.6 pmol ABA (g FG)⁻¹; TIP-M1-5: 1.5 ± 0.6 pmol ABA (g FG)⁻¹; MW \pm SD, n = 3-4).

Die endogenen Wurzel-ABA-Gehalte der PIP-*antisense*-Konstrukte waren im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht. Diese Versuchspflanzen besaßen im Mittel höhere Wurzel-ABA-Gehalte als die TIP-*antisense*-Konstrukte (Wildtyp: Faktor 7; *antisense*-Konstrukte: Faktoren 1.3 bis 8.0).