

# Funktionelle NMR-Mikroskopie an Pflanzenwurzeln

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

vorgelegt von

**Ilja Kaufmann**

aus Würzburg

Würzburg 2008

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Physik und Astronomie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

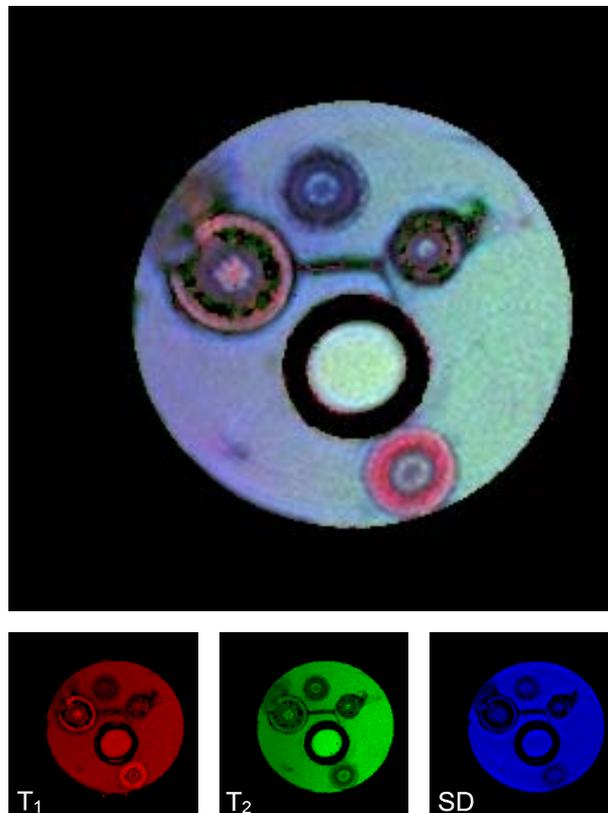
3. Prüfer:

im Promotionskolloquium

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Funktionelle NMR-Mikroskopie an Pflanzenwurzeln



Back to the roots ...  
... but relaxed!

**für**  
**Olga Kaufmann**  
**1950 – 2006**

Das Titelbild zeigt ein Falschfarben-NMR-Bild von den Wurzeln einer Maispflanze in Nährlösung. Es wurde im Jahr 2002 als Motiv für die Plakate und Flyer zur 600-Jahrfeier der Uni Würzburg verwendet. Darunter sind die Bilder in den drei Grundfarben zu sehen, aus deren Überlagerung es zusammengesetzt wurde. Sie zeigen die NMR-Parameter  $T_1$ ,  $T_2$  und Spindichte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen der NMR</b>	<b>9</b>
2.1	Kernspins im statischen Magnetfeld . . . . .	9
2.2	Kernspins im HF-Wechselfeld . . . . .	9
2.2.1	Relaxation der Transversalmagnetisierung: $T_2^*$ und $T_2$ . . . . .	10
2.2.2	Relaxation der Longitudinalmagnetisierung: $T_1$ . . . . .	10
2.2.3	Die Bloch-Gleichungen . . . . .	11
2.3	Kernspins in Magnetfeldgradienten . . . . .	11
2.3.1	Der k-Raum . . . . .	12
2.4	Grundlegende NMR-Bildgebungs-Sequenzen . . . . .	13
2.4.1	Das Gradientenecho . . . . .	13
2.4.2	Das Spinecho . . . . .	14
2.4.3	Multiechos . . . . .	15
2.4.4	Turbospinecho . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Biologische Grundlagen</b>	<b>17</b>
3.1	Pflanzenzellen . . . . .	17
3.2	<i>Zea mays</i> und Wurzelanatomie . . . . .	17
3.3	Pflanzenanzucht und Messbedingungen . . . . .	20
<b>4</b>	<b>Hardware</b>	<b>21</b>
4.1	AMX500-Spektrometer . . . . .	21
4.2	HF-Probenkopf, Klimakammer und Gaswechsellmesser . . . . .	21
4.3	HF-Spulen . . . . .	22
4.4	NMR-Wurzel-Röhrchen . . . . .	22
4.5	Modulares Probenkopfdesign . . . . .	24
<b>5</b>	<b>NMR-Methoden</b>	<b>29</b>
5.1	Sequenzauswahl für die Bildgebung an Wurzeln . . . . .	29
5.2	Turbospinecho Bildgebungssequenzen . . . . .	30
5.2.1	2D-Turbospinecho-Bildgebung . . . . .	30
5.2.2	3D-Turbospinecho-Sequenz . . . . .	32
5.2.3	Turbospinecho mit Phasengradienten-„Blips“ . . . . .	33
5.3	$T_1$ -Karten . . . . .	36
5.4	$T_2$ -Karten . . . . .	38
5.5	$T_2^*$ -Karten . . . . .	39
5.6	Flussgeschwindigkeits-Karten . . . . .	43
<b>6</b>	<b>Auswertung radialsymmetrischer Parameterstrukturen</b>	<b>45</b>

<b>7</b>	<b>NMR-Relaxationsprozesse in Pflanzengewebe</b>	<b>49</b>
7.1	Relaxationsmechanismen auf molekularer Ebene . . . . .	49
7.1.1	Paramagneten und Relaxationszeiten . . . . .	51
7.2	Weitere $T_2$ -Relaxations-Mechanismen . . . . .	51
7.2.1	Chemischer Austausch und $T_2$ -Relaxation . . . . .	52
7.2.2	Diffusion und $T_2$ -Relaxation . . . . .	52
7.3	Relaxationszeiten und Kompartimentation . . . . .	54
7.3.1	Multiexponentielle Relaxation . . . . .	54
7.3.2	Kompartimentgröße . . . . .	56
7.3.3	Austauschzeiten und Permeabilität . . . . .	57
7.4	Relaxation und Wassergehalt . . . . .	61
7.5	Übersicht der Relaxationszeit-Abhängigkeiten . . . . .	61
<b>8</b>	<b>Relaxationsmessung bei freier Diffusion</b>	<b>63</b>
8.1	Simulation von Relaxation und Diffusion . . . . .	63
8.2	Relaxation an einer Oberfläche . . . . .	67
8.3	Relaxation und Diffusion in dünnen Schichten . . . . .	68
8.4	Diffusion und Ortsauflösung der Relaxation . . . . .	69
8.5	Der weiße Ring . . . . .	72
<b>9</b>	<b>Anwendungen und biologische Ergebnisse</b>	<b>79</b>
9.1	Pflanzenwurzeln unter Trockenstress . . . . .	79
9.1.1	Experimentverlauf, Auswertung und Darstellung . . . . .	79
9.1.2	Normalwerte in Maiswurzeln . . . . .	83
9.1.3	Reaktionen unter Trockenstress . . . . .	85
9.1.4	Regeneration nach Wiederbewässerung . . . . .	87
9.1.5	Reaktionen auf erneute Beleuchtung . . . . .	89
9.1.6	Entstehung von Kavitationen . . . . .	90
9.1.7	Wiederbefüllung von Gefäßen nach Kavitation . . . . .	92
9.1.8	Wurzelschäden durch Trockenstress . . . . .	100
9.2	Volumenfluss, Exsudation und Wurzeldruck . . . . .	103
9.3	Relaxationszeiten und Zellgrößen . . . . .	110
9.4	Kontrastmittelaufnahme von Wurzeln . . . . .	114
9.5	Wurzeln in inhomogenen Umgebungsmedien . . . . .	118
9.6	3D-Struktur von Wurzeln . . . . .	121
9.7	Messungen an <i>Phaseolus vulgaris</i> . . . . .	124
<b>10</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>127</b>

**Anhang**

<b>Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
<b>Summary</b>	<b>135</b>
<b>Nährlösung „Long Ashton“</b>	<b>139</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>141</b>
<b>Literatur</b>	<b>143</b>
<b>mit allerbestem Dank an...</b>	<b>155</b>
<b>Index</b>	<b>157</b>

# 1 Einleitung

Der Energielieferant für das Leben auf diesem Planeten ist die Sonne, um die er kreist. Abgesehen von wenigen Ausnahmen wie Cyanobakterien sind Pflanzen die einzigen Lebensformen, die in der Lage sind, diese Energie direkt zu nutzen. Damit sind alle anderen von ihnen abhängig. Lange Zeit hielt die Wissenschaft mit dieser Erkenntnis und einfachen, klaren Vorstellungen von deren Funktionsweisen die Pflanzen für ausreichend erforscht. Mit Hilfe von Chlorophyll wird das Sonnenlicht genutzt, um aus  $\text{CO}_2$  und Wasser energiereiche Zucker aufzubauen und der Atmosphäre Sauerstoff zuzuführen. Sonnenlicht sorgt für Verdunstung an den Blattoberflächen; in den Leitbahnen, den Xylemgefäßen, baut sich ein Unterdruck auf, und Wasser und gelöste Nährstoffe werden aus dem Boden nach oben „gesaugt“. Diese als „Kohäsionstheorie“ (1894/95 von Dixon [DJ94, DJ95] und 1895 von Askenasy [Ask95]) bekannte Theorie ist in den letzten Jahren immer umstrittener geworden. Die Existenz negativer Drücke im Sinne von Zugspannungen innerhalb der Wasserphase im Xylem ist unumstritten und wurde bereits 1925 von Renner [Ren25] in plausiblen Größenordnungen bestimmt. Allgemein geht man heute von negativen Druckwerten bis zu maximal  $-0.7\text{MPa}$  aus, wie sie auch mit der Druckmesssonde von Balling und Zimmermann 1990 [BZ90] im intakten Xylem direkt gemessen werden konnten.<sup>1</sup> Der jedoch notwendige postulierte enorme negative Druck von unter  $-1.0\text{MPa}$  in den Gefäßen (z.B. hoher Bäume) konnte bislang nur in indirekten und invasiven Experimenten [SHHB64] gemessen werden. Bereits bei geringeren Zugspannungen treten Kavitationen in den Gefäßen auf. Dass diese problemlos von den Pflanzen wieder befüllt werden können, hat auch die Verfechter der Kohäsionstheorie im engeren Sinn zu Erweiterungen und Ergänzungen des zu einfachen Modells veranlasst (vgl. z.B. [LN03]).

Auf der anderen Seite sprechen zu viele Fakten gegen die hohen Zugspannungen und dafür, dass die Kohäsion nur einer von mehreren Mechanismen ist, die die Pflanzen gleichzeitig für den Langstreckentransport des Wassers einsetzen [ZSWH04].

Auch die Rolle der Wurzeln muss dabei diskutiert werden [MCG01] und ist bei verschiedenen Arten vielleicht nicht nur in jungen Pflanzenstadien oder unter Stressbedingungen beim Wassertransport relevant [Ste00].

Daneben hat das Wissen über die Pflanzen immer mehr Details hinzugewonnen, und es erscheint schon lange nicht mehr so klar und einfach strukturiert wie noch vor wenigen Jahrzehnten. Das Zusammenspiel mit der Umwelt, mit Tieren (z.B. zur Bestäubung oder zur Samenverbreitung), mit Pilzen und dem Boden, die eine entscheidende Rolle bei der Wasser- und Nährstoffaufnahme spielen, scheint unglaublich komplex zu sein. Pflanzen wachsen auf trockenem Sand, in salzigem

---

<sup>1</sup>Da in dieser Arbeit häufig Zahlenwerte mit Dezimalstellen in durch Kommata getrennter Aufzählung vorkommen, werde ich zur einfacheren Lesbarkeit den im Englischen üblichen Dezimalpunkt verwenden.

Wasser, andere transportieren Wasser aus der Tiefe in höhere Bodenschichten, um dort notwendige Nährstoffe zu lösen [XB93].

Neben der Klärung von Fragen aus der biologischen und ökologischen Grundlagenforschung ist ein Studium der Pflanzenwurzeln auch für die Agrartechnik von entscheidendem Interesse. Mit einem tieferen Verständnis ihrer Funktionalität und Erklärungen, warum verschiedene Pflanzen auf trockenen oder salzigen Böden gedeihen können, finden sich vielleicht Ansätze, solche widrigen Bedingungen zu kompensieren und auch anderen Kulturpflanzen zugänglich zu machen. Transpirationsraten von Bäumen und damit Wäldern, die unmittelbar mit dem Wassertransport verbunden sind, sind weiterhin wichtig für ein detailliertes Verständnis der Wasserkreisläufe auf der Erde und müssen in Zusammenhang mit Wetter- und Klimaabläufen ebenfalls betrachtet werden.

Die Untersuchung von Wurzeln im umgebenden Medium mit herkömmlichen Methoden stößt jedoch leicht an ihre Grenzen. Zum einen ist der Zugang zu Wurzeln durch ein Medium nicht mit jeder Messsonde möglich. Zum anderen können die empfindlichen Wurzeln durch eine invasive Messung leicht in ihrer normalen Funktion gestört werden. Insbesondere für Fragestellungen zu funktionellen Vorgängen scheint es deshalb sinnvoll, eine Methode heranzuziehen, die diese Probleme umgeht und ggf. auch eine gemeinsame Untersuchung von Wurzeln und Umgebungsmedium erlaubt.

Bildgebende Verfahren, wie sie in der Medizin eingesetzt werden, haben in dieser Hinsicht ein großes Potential, und allen voran bietet die Kernspintomographie (NMR für engl. „nuclear magnetic resonance“ oder deutsch „nukleare Magnet-Resonanz“) ein weites Feld an Anwendungsmöglichkeiten und messbaren Parametern. Besonders aufgrund der leichten Zugänglichkeit von solchen Größen wie Flussgeschwindigkeit [vAS84, KLT<sup>+</sup>96], Wasserkonzentration oder Diffusion [KHB<sup>+</sup>95] hat sich die NMR-Bildgebung in der funktionellen Pflanzenforschung in den letzten Jahren immer weiter etabliert [Köc01, RPZH99, Rat94].

Trotz der umfangreichen Fragestellungen werden relativ wenige NMR-Untersuchungen an Pflanzenwurzeln durchgeführt. Hauptsächlich spektroskopische Studien, auch mittels <sup>31</sup>P- oder <sup>13</sup>C- NMR, beschäftigen sich mit der Analyse von Metaboliten aus den Wurzeln, i.d.R. anhand von Extrakten oder Wurzelfragmenten. Einzelne Untersuchungen dieser Art wurden jedoch auch in-vivo an intakten Pflanzenwurzeln durchgeführt [EDDNZ00, RG00, SHPG96]. Als bildgebende Experimente an Wurzeln finden sich vorwiegend Studien von kompletten Wurzelsystemen [BRP93, SMJ92] und in hoher Auflösung von herausgeschnittenen Wurzelstücken [CLL<sup>+</sup>87] (30 μm x 30 μm x 2.0mm) oder in Projektion [CBJ88] (5 μm x 5 μm). Die NMR-Mikroskopie an Pflanzenwurzeln hat bislang keine sonderlich breite Anwendung gefunden, obwohl einzelne Studien bereits gezeigt haben, dass hiermit Informationen über Wurzeln und ihr umgebendes Medium gewonnen werden können [MJK90]. Für funktionelle Studien sind diese Methoden aber nur in einzelnen Fällen zur Anwendung gekommen [CHSW97, RCC00, BJK86].

Ein lohnendes Objekt derartiger Untersuchungen ist z.B. *Zea mays*. Zum einen

handelt es sich beim Mais um eine bedeutende Kulturpflanze, so dass das grundlegende Verständnis der besten Wachstumsbedingungen für den wirtschaftlichen Ertrag von Interesse ist. Zum anderen sorgt dieses Interesse dafür, dass bereits zahlreiche Daten anderer (Grundlagen-) Studien an diesen Pflanzen vorliegen. Auch im Bereich der NMR sind schon vereinzelt Untersuchungen an Maiswurzeln vorgenommen worden [BR84, CLL<sup>+</sup>87].

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, um funktionelle NMR-Mikroskopie an Pflanzenwurzeln routinefähig betreiben zu können. Aufgebaut wurde dabei auf früher am Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 des Physikalischen Institutes der Universität Würzburg durchgeführten Arbeiten [Olt98, Kau98, RZH99a]. Angewendet wurden die erarbeiteten Methoden hauptsächlich zur Untersuchung der Funktionen von *Zea mays*, so dass hierzu vorliegende Literaturdaten verglichen und zu neuen Erkenntnissen ergänzt werden konnten.

Nach einer kurzen Einführung in die physikalischen Grundlagen der NMR und in die biologischen Grundlagen der Pflanzenanatomie werden die Methoden vorgestellt, die zur Durchführung und Auswertung von funktionellen NMR-Studien an Pflanzenwurzeln erarbeitet wurden.

Eine notwendige Voraussetzung für solche Untersuchungen war der Aufbau und die Optimierung von geeigneter Hardware, die einerseits eine schonende Pflanzenanzucht und andererseits einen guten Zugang zum Wurzelbereich für den HF-Resonator erlaubt. Zusätzlich wurde im Rahmen der Arbeit ein völlig neues Probenkopfkonzept entwickelt, das es in Zukunft ermöglicht, Spezialhardware, wie sie z.B. hier für die Versorgung und Überwachung der Pflanzen im NMR-Gerät benötigt wird, mit unterschiedlichen NMR-HF-Kanälen zu kombinieren.

Im Weiteren werden die implementierten NMR-Sequenzen vorgestellt. Limitierend für die Sequenzentwicklung sind hier insbesondere starke Suszeptibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Pflanzengeweben ebenso wie zu eingeschlossenen Lufträumen und dem Umgebungsmedium [KRZ94]. Daher wurden ausschließlich Spinechosequenzen [Hah50] verwendet. Für Flussmessungen konnte auf eine am Lehrstuhl etablierte Standardsequenz zurückgegriffen werden [Kuc96, RZH99b]. Für hoch aufgelöste Karten der NMR-Parameter  $T_1$ ,  $T_2$  und  $T_2^*$  wurden neue Sequenzen entwickelt und implementiert, die auf dem Turbospinecho-Prinzip [HNF86] basieren, um eine ausreichende zeitliche Auflösung für funktionelle Studien zu erzielen.

Eine umfangreiche Literaturrecherche zu den Zusammenhängen zwischen NMR-Parametern und physiologischen Abläufen in Pflanzen und Pflanzenzellen wurde mit eigenen theoretischen Betrachtungen und einer Computersimulation ergänzt. Diese bilden die Grundlage für die Interpretation der Messergebnisse an Maiswurzeln. Daneben führten sie zur Erklärung eines hier neu beschriebenen Bildkontrastes, der Relaxation und Diffusion kombiniert.

Neben Messungen zur Untersuchung dieses Bildkontrastes werden abschließend die verschiedenen Studien vorgestellt, die an den Wurzeln intakter Maispflanzen

durchgeführt wurden. Allen voran dienten dabei Trockenstress-Experimente zur Untersuchung des Wasserhaushaltes in den Wurzeln, wobei insbesondere die Entstehung und Wiederbefüllung von Kavitationen in den Xylemgefäßen untersucht wurden. Weitere Experimente ergänzen die Erkenntnisse zu Relaxationszeiten und Wassertransport und runden die Demonstration der Möglichkeiten der funktionellen NMR-Mikroskopie an Pflanzenwurzeln ab.



## 2 Grundlagen der NMR

### 2.1 Kernspins im statischen Magnetfeld

Viele Atomkerne besitzen einen nicht verschwindenden Kernspin  $\vec{S}$ , eine Eigenschaft, die zum klassischen Eigendrehimpuls äquivalent ist. Im klassischen Sinn physikalisch messbar ist dabei immer nur die Z-Komponente des Spins.

Aufgrund der Ladung des Atomkernes ist mit dem Spin auch ein magnetisches Moment  $\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$  verbunden. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Wasserstoffkerne, also Protonen ( $p^+$ ), behandelt, deren gyromagnetisches Verhältnis  $\gamma_{p^+} = g_{p^+} e / 2m_{p^+} \approx 267.5 \cdot 10^6 \frac{\text{rad}}{\text{s} \cdot \text{T}}$  ( $\frac{\gamma}{2\pi} \approx 42.58 \frac{\text{MHz}}{\text{T}}$ ) beträgt, wobei der Landé-Faktor  $g_{p^+} \approx 5.586$  die Abweichung vom klassischen magnetischen Moment beinhaltet.

Entsprechend des gyromagnetischen Verhältnisses spalten die Energieniveaus der Atomkerne in einem angelegten äußeren Magnetfeld  $B_0$  auf. Die Energiedifferenz der beim Proton entstehenden zwei Niveaus beträgt  $\Delta E = \hbar \gamma_{p^+} B_0$ . Aus der Boltzmannstatistik für die unterschiedliche Besetzung der beiden Niveaus resultiert eine klassische Nettomagnetisierung<sup>2</sup>

$$M_z = \frac{n \gamma^2 \hbar^2 B_0}{4k_B T}$$

bei der Temperatur  $T$ , mit Boltzmannkonstante  $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$  und einer Spindichte  $n$ .

Die zur Energiedifferenz gehörende Frequenz  $\omega_0 = \Delta E / \hbar = \gamma B_0$  kann klassisch als Larmorfrequenz betrachtet werden, mit der die Magnetisierung um die durch  $\vec{B}_0$  vorgegebene Achse präzediert.

Ein makroskopisches Spinensembel, das in  $B_0$  eine einheitliche Larmorfrequenz besitzt, wird als Isochromat bezeichnet.

### 2.2 Kernspins im HF-Wechselfeld

Ein mit der Frequenz  $\omega_0 = \Delta E / \hbar = \gamma B_0$  rotierendes HF-Wechselfeld  $B_1$ , das zusätzlich senkrecht zu  $B_0$  angelegt wird, stellt aus Sicht der mit  $\omega_0$  präzedierenden Magnetisierung ein weiteres stationäres Feld dar und führt somit zu einer weiteren Präzessionsbewegung mit  $\omega_1 = \Delta E / \hbar = \gamma B_1$ . Sie bringt die Isochromaten aus der zu  $\vec{B}_0$  parallelen Gleichgewichtslage (auch als „Longitudinalmagnetisierung“ oder „z-Magnetisierung“ bezeichnet). Wird dieses  $B_1$ -Feld nach kurzer Zeit wieder abgeschaltet, spricht man von einem HF-Puls. Die  $B_1$ -Feldstärke und die Dauer dieses Pulses bestimmen den Drehwinkel (den sog. „Flipwinkel“  $\alpha$ )

<sup>2</sup>Der Index  $p^+$  wird im Folgenden weggelassen. Alle elementspezifischen Größen in dieser Arbeit, wie  $\gamma$ , beziehen sich ausschließlich auf Wasserstoff.

und seine Phase bestimmt die Richtung der Auslenkung. Ein  $90^\circ$ -Puls bedeutet dabei eine vollständige Überführung der Longitudinalmagnetisierung in sog. „Quer-“ bzw. „Transversalmagnetisierung“, so dass im klassischen Bild die Magnetisierung in der Ebene senkrecht zu  $B_0$  präzediert. Der erste HF-Puls, der im Lauf eines Experimentes Transversalmagnetisierung erzeugt, wird oft als „Anregungspuls“ bezeichnet, da hiernach signalgebende Magnetisierung zur Verfügung steht.

### 2.2.1 Relaxation der Transversalmagnetisierung: $T_2^*$ und $T_2$

In einer umgebenden Spule induziert die frei präzedierende Transversalmagnetisierung ein Spannungssignal der Frequenz  $\omega_0$ , das als „free induction decay“ (FID) bezeichnet wird. Dieses Signal zeigt einen exponentiellen Abfall, der mit der Zeitkonstanten  $T_2^*$  beschrieben wird.

Hauptsächlich zwei Mechanismen sorgen für diesen Signalabfall. Zum einen besitzen verschiedene Spinensembel (somit Isochromaten) aufgrund von Inhomogenitäten des statischen  $B_0$  Feldes unterschiedliche Larmorfrequenzen. Die Magnetisierung dephasiert, und mit dem Betrag ihrer Vektorsumme nimmt das Signal ab. Für Inhomogenitäten, die zu solchen lokalen Feldgradienten führen, sind hauptsächlich Übergänge innerhalb des Probenvolumens zwischen Materialien bzw. Geweben verschiedener Suszeptibilitäten verantwortlich. Auch eingelagerte para- oder gar ferromagnetische Teilchen verzerren das lokale Magnetfeld. Die Zeitkonstante für den exponentiellen Signalabfall aufgrund von Feldinhomogenitäten ist eine Funktion dieser Feldgradienten  $T_{inhom.} = f(\nabla B_0)$ .

Der zweite Mechanismus ist ein Relaxationsprozess, der mit der Zeitkonstanten  $T_2$  beschrieben und als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet wird. Durch Wechselwirkungen der Spins untereinander verlieren sie ihre Phasenkohärenz. Auch dies führt in der Vektorsumme zu einer Signalreduktion.

In für bildgebende NMR-Anwendungen interessanten Proben dominieren zumeist deren Inhomogenitäten das  $T_2^*$ , das sich aus beiden Zeitkonstanten zusammen ergibt:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{inhom.}}$$

### 2.2.2 Relaxation der Longitudinalmagnetisierung: $T_1$

Wechselwirkungen der Spins mit ihrer Umgebung (dem „Gitter“) führen zu einem Energieaustausch und ermöglichen es dem Spinsystem, ins thermodynamische Gleichgewicht zurückzukehren. Dieser mit der Zeitkonstanten  $T_1$  beschriebene Vorgang wird Spin-Gitter-Relaxation genannt und sorgt für einen Wiederaufbau der Longitudinalmagnetisierung. Detaillierter wird auf die Mechanismen, die den Relaxationszeiten zugrunde liegen, noch einmal in Kap. 7 eingegangen, wo für

die Interpretation späterer Messergebnisse Zusammenhänge zwischen Relaxation und Eigenschaften des Pflanzengewebes zusammengestellt werden.

### 2.2.3 Die Bloch-Gleichungen

Die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung im  $B_0$ -Feld nach einem HF-Puls kann durch eine Vektordifferentialgleichung beschrieben werden. Unter Einbeziehung der Relaxationsprozesse ergibt sich:

$$\dot{\vec{M}} = \gamma (\vec{M} \times \vec{B}) + \begin{pmatrix} -M_x/T_2^* \\ -M_y/T_2^* \\ (M_0 - M_z)/T_1 \end{pmatrix} \quad (1)$$

Die drei Gleichungen für die einzelnen Raumrichtungen werden Bloch-Gleichungen [BHP46] genannt.

## 2.3 Kernspins in Magnetfeldgradienten

Wird dem  $B_0$ -Feld ein ortsabhängiges Magnetfeld gleicher Feldrichtung, ein Gradient, hinzugefügt, dann wird die Larmorfrequenz der Isochromaten entsprechend ortsabhängig. Für ein linear von der Ortskomponente  $x$  abhängiges Gradientenfeld  $B_{Grad.}(x, t) = G(t) \cdot x$  erhält ein Isochromat nach einer Zeit  $t$  eine Phase  $\Phi$  gegenüber den Isochromaten des „reinen“  $B_0$ -Feldes aufgeprägt:

$$\Phi = \int_0^t \gamma G(t) x(t) dt \quad (2)$$

Entwickelt man diesen Ausdruck für den Ort  $x(t)$  des Isochromaten in eine Taylorreihe, so erhält man die sogenannten Gradientenmomente  $M_i$ :

$$\begin{aligned} \Phi &= \int_0^t \gamma G(t) x_0 dt + \int_0^t \gamma G(t) \dot{x} t dt + \int_0^t \gamma G(t) \frac{1}{2} \ddot{x} t^2 dt + \dots \\ \Phi &= \gamma M_0 x_0 + \gamma M_1 \dot{x} + \gamma M_2 \ddot{x} + \dots \end{aligned} \quad (3)$$

Diese Signalphase kann benutzt werden, um Informationen über Orte und Bewegungen der Isochromaten zu erhalten.

### Lesegradient

Legt man während der Datenakquisition einen Gradienten  $G_R$  (sog. Lesegradient – engl. read gradient) an, haben rein stationäre Isochromaten bei jedem aufgenommenen Datenpunkt eine neue Phase  $\Phi_x = \int_0^{t_R} \gamma G_R(t) x_0 dt$ , entsprechend ihrem Ort  $x_0$  unter dem Gradienten und der vergangenen Zeit  $t_R$  vom Beginn der Gradientenschaltung an. Für rechteckige Gradientenpulse mit der Dauer  $t_R$  und der Gradientenstärke  $G_R$  gilt  $\Phi_x = \gamma t_R G_R x_0$ .

### Phasengradient

Der gleiche Effekt wird erzielt, wenn ein Gradient  $G_P$  an und nach der Zeit  $t_P$ , aber noch vor der Datenaufnahme wieder abgeschaltet wird. Variiert man Dauer oder Stärke eines solchen Gradienten von Akquisition zu Akquisition, erhalten die Isochromaten entlang seiner Richtung auch jeweils eine neue Phase  $\Phi_y = \int_0^{t_P} \gamma G_P(t) y_0 dt$  (hier senkrecht zum oben beschriebenen Lesegradienten, aber ohne Einschränkung der Allgemeinheit in y-Richtung gewählt). Da diese Phase für alle Datenpunkte der folgenden Akquisition gilt, wird ein solcher Gradient als Phasengradient (engl. phasegradient) bezeichnet. Für rechteckige Gradientenpulse gilt ebenso  $\Phi_y = \gamma t_P G_P y_0$ .

### Schichtgradient

In den meisten Fällen soll nicht die komplette Probe, sondern nur ein Bereich bzw. eine dünne Schicht für ein Querschnittsbild angeregt werden. Dazu legt man während der Applikation des HF-Pulses einen Feldgradienten an. Durch diesen sog. Schichtgradienten (engl. slicegradient) wird die Resonanz- und damit die Anregungsfrequenz der Spins ortsabhängig entsprechend  $\omega(z) = \gamma (B_0 + G_z \cdot z)$ . Der lineare Zusammenhang zwischen Frequenz und Ort „übersetzt“ das Frequenzspektrum  $B_1(\omega)$  des Pulses direkt in das Anregungsprofil  $\alpha(z) = \gamma B_1(\omega(z))$  der (hier ohne Beschränkung der Allgemeinheit zu  $z$  senkrecht gewählten) Schicht. Mit der Einhüllenden des Pulsverlaufes, als Fouriertransformierte des Spektrums, kann so das Profil der Schicht vorgegeben werden. Die Bandbreite des Pulses, die umgekehrt proportional zu seiner Dauer ist, bestimmt somit auch die Dicke dieser Schicht.

Der Anteil des Schichtgradienten der nach der Mitte des HF-Pulses wirksam ist, bewirkt eine Dephasierung der Magnetisierung in  $z$ , die durch einen entgegengesetzten Schichtgradienten wieder ausgeglichen werden muss.

#### 2.3.1 Der k-Raum

Mit kombinierter Verwendung von zueinander senkrechten Phasengradient  $G_P$  und Lesegradient  $G_R$  erhält jeder Isochromat bei jedem aufgenommenen Datenpunkt eine eigene Phase, entsprechend der Gradientenwirkdauer  $t_P$  und  $t_R$ . Das in jedem Datenpunkt repräsentierte Signal  $S$  ist das Integral der Signale aller Isochromaten (lokale Spindichte  $\rho(x, y)$ ) des Probenvolumens<sup>3</sup>  $V$ :

$$S(\gamma G_R t_R, \gamma G_P t_P) = \int_V \rho(x, y) \cdot e^{i\gamma t_R G_R x} \cdot e^{i\gamma t_P G_P y} \cdot dV \quad (4)$$

Die mit Fortschreiten der Akquisitionszeit  $t_R$  einerseits und sukzessiver Erhöhung des Phasengradienten  $G_P$  andererseits abgetastete Parameterebene ( $k_x = \gamma G_R t_R$ ,  $k_y = \gamma G_P t_P$ ) wird k-Raum genannt. Allgemein für 3 Dimensionen und nicht notwendig rechteckige Gradientenverläufe:

<sup>3</sup>Das Integral über den Anteil  $dz$  ergibt hierbei die Schichtdicke  $\Delta z$ .

$$\vec{k} = \int_0^t \gamma \vec{G}(t) dt \quad (5)$$

An Gleichung (4) kann man erkennen, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen erhaltenem Signal  $S(\vec{k})$  und Spindichteverteilung  $\rho(\vec{x})$  eine Fouriertransformation ist, mittels welcher aus den akquirierten Daten somit auch das Bild rekonstruiert wird:

$$\rho(\vec{x}) = \int S(\vec{k}) \cdot e^{i\vec{k}\vec{x}} \cdot d\vec{k} \quad (6)$$

## 2.4 Grundlegende NMR-Bildgebungs-Sequenzen

Aus den bis hier vorgestellten Möglichkeiten der HF-Pulse und Feldgradienten lassen sich verschiedenste Methoden entwickeln, um durch die Anregung und Manipulation einer Probe Bilder aus dieser zu gewinnen. Die Abfolge der HF- und Gradientenpulse eines derartigen Experimentes wird als „Sequenz“ oder „Methode“ bezeichnet und oft in Ablaufdiagrammen wie in Abbildung (1) oder Abbildung (2) dargestellt. Neben Zeitachsen für die Feldgradienten der drei Raumrichtungen enthalten diese Sequenzdarstellungen (meist zuoberst) eine Achse für die HF-Pulse, in der auch das auftretende (und akquirierte) Signal aus der Probe eingezeichnet wird. Im folgenden sollen die Grundlagen für die in dieser Arbeit verwendeten und in Kap. 5 vorgestellten Sequenzen dargestellt werden.

### 2.4.1 Das Gradientenecho

Das Signal, das aufgezeichnet wird, während ein Lesegradient anliegt, entstammt einer Zeile des  $k$ -Raumes (vgl. 2.3.1). Üblicherweise wird die Richtung des Lesegradienten mit  $k_x$ , die des Phasengradienten mit  $k_y$  bezeichnet. Die höchste Signalstärke und die Informationen über den Kontrast der großen Bildstrukturen finden sich im Zentrum des  $k$ -Raumes ( $k_x = 0$ ), wenn bildlich gesprochen die Isochromaten („Spins“) entlang des Lesegradienten gerade in Phase sind. Damit nach einem HF-Anregungspuls das Spinsystem die  $k$ -Raum-Mitte durchläuft, während der Lesegradient anliegt, wird vorab ein negativer, dephasierender Präparationsgradient in derselben Raumrichtung geschaltet (engl. „Prereadgradient“). Dieser sorgt dafür, dass die Akquisition an einem Punkt auf der negativen  $k_x$ -Achse beginnt. Das maximale Signal,

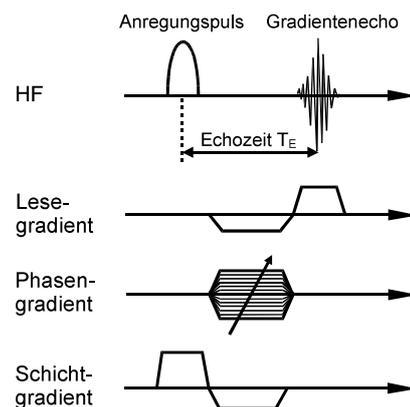


Abb. 1: Gradientenecho Bildgebungs-Sequenz.

das sich nun einstellt, wenn das Spinsystem die k-Raum-Mitte durchläuft, wird als „Gradientenecho“ bezeichnet.

Um auf diese Weise ein vollständiges Bild aufzunehmen, müssen mehrere k-Raum-Zeilen akquiriert werden. Dazu wird die Anregung und Datenaufzeichnung, jeweils nach Abwarten einer gewissen Relaxationszeit, mehrfach wiederholt. Vor der Akquisition wird (meist gleichzeitig zum Präparationsgradienten) ein Phasengradient geschaltet, mit bei jeder Wiederholung anderer Gradientenstärke.

Um nur eine begrenzte Probenschicht anzuregen, wird üblicherweise während des HF-Pulses ein Schichtgradient angelegt. Insgesamt ergibt sich eine Sequenz, wie sie in Abbildung (1) dargestellt ist.

Während des Lesegradients werden nur die Phasenunterschiede refokussiert, die durch den Präparationsgradienten erzeugt wurden. Aufgrund aller anderen Feldinhomogenitäten fällt die Signalstärke mit zunehmender Echozeit  $T_E$ , d.h. mit zeitlichem Abstand zwischen Anregungspuls und Echo, exponentiell mit  $T_2^*$  ab. In Proben mit sehr kurzem  $T_2^*$  bedient man sich daher bevorzugt Spinechosequenzen.

### 2.4.2 Das Spinecho

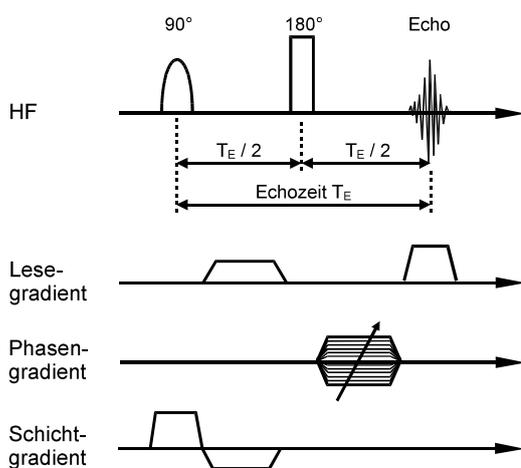


Abb. 2: Spinecho Bildgebungs-Sequenz.

dasselbe Vorzeichen besitzen. Abbildung (2) zeigt den einfachsten Fall einer solchen Spinechosequenz.

Nach derselben Zeit  $T_E/2$ , die auch zwischen Anregungs- und 180°-Puls vergangen war, heben sich alle dephasierenden Gradienten genau auf, und es kommt zum sog. „Spinecho“. Anregungspuls und Echo sind also zeitlich symmetrisch um den 180°-Puls angeordnet. Präparations- und Lesegradien müssen auf diese Symmetrie abgestimmt werden, um maximales Signal zu erhalten - Gradienten- und Spinecho müssen zusammenfallen. Mikroskopische Gradienten wie an Suszeptibilitätssprüngen werden bei dieser Methode ebenso kompensiert wie ma-

Bei einem Spinecho [Hah50] wird nach dem Anregungspuls, für den zumeist ein Flipwinkel von  $90^\circ$  gewählt wird, ein weiterer HF-Puls eingesetzt, der die Magnetisierung um  $180^\circ$  dreht. Dies ist gleichbedeutend mit einer Spiegelung der Magnetisierung über die Achse, um die die Drehung erfolgt. Im k-Raum bedeutet es eine Punktspiegelung am Ursprung. Nach dem  $180^\circ$ -Puls erscheint die dephasierende Wirkung aller Gradienten dadurch so, als ob sie das umgekehrte Vorzeichen gehabt hätten. Präparationsgradient und Lesegradien müssen in einer Spinechosequenz also

kroskopische  $B_0$ -Feldinhomogenitäten. Der Signalverlust zwischen Anregung und akquiriertem Echo folgt somit dem deutlich langsameren exponentiellen Abfall mit  $T_2$ , anstatt  $T_2^*$ , vgl. auch Abbildung (16).

Je länger die Echozeit eines Spinechoexperimentes ist, desto stärker kann Diffusion der Spins durch die Feldinhomogenitäten die Refokussierung nach dem  $180^\circ$ -Puls verhindern. Auf die Spinphasen wirken durch die Ortsverschiebung unterschiedliche Feldstärken. Dieser Effekt kann im Rahmen der  $T_2$ -Relaxation beschrieben werden und wird in Abschnitt 7.2.2 näher ausgeführt.

### 2.4.3 Multiechos

Unter einem Multiecho oder Echozug versteht man die wiederholte Refokussierung der Magnetisierung ohne Neuankregung. Dies kann durch eine Abfolge von Gradientenechos (vgl. 2.4.1) wie bei einem EPI (Echo-Planar-Imaging [TLBC91]) realisiert sein oder durch wiederholte Spinechos (Abschnitt 2.4.2) mittels refokussierender HF-Pulse. Ein solches Multi-Spin-Echo wurde bereits 1954 von Carr und Purcell zum ersten Mal vorgestellt [CP54] und wird häufig als CP-Sequenz bezeichnet. Nennt man die Zeit zwischen Anregungspuls und erstem Echo auch hier Echozeit, so wird der Abstand zwischen den folgenden Echos als „Interechozeit“ ( $T_{i.E}$ ) bezeichnet.

Eine  $90^\circ$ -Phasenverschiebung<sup>4</sup> zwischen Anregungs- und Refokussierungspuls vermindert dabei Einflüsse inhomogener  $B_1$ -Felder. Diese Verbesserung des Multiechoexperimentes durch Meiboom und Gill [MG58] ist als CPMG-Sequenz bekannt.

Zu beachten ist auch das Auftreten sog. „höherer Echos“. Damit wird die Refokussierung von Magnetisierung bezeichnet, die erst nach mehreren Pulsen auftritt. Der einfachste Fall hiervon ist das sog. „stimulierte Echo“, das mittels zweier  $90^\circ$  Pulse erzeugt wird. Wie letztlich jeder Puls mit jedem und der Kombination aller weiteren Pulse stets ein Echo erzeugt, wurde von Hennig [Hen91] im Detail beschrieben.

Die Behebung weiterer Artefakte solcher Sequenzen durch Pulsphasenzyklen wurde von Graumann [GOS86] ausführlich beschrieben.

Mehrere konkrete Beispiele für Multi-Spinecho-Sequenzen werden in Kapitel 5 vorgestellt, vgl. z.B. Abbildung (16).

### 2.4.4 Turbospinecho

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Methoden, Multi-Spin-Echos in Bildgebungssequenzen zu nutzen. Zum einen können nach einmaliger Phasenkodierung viele Echos aufgezeichnet und zur Verbesserung des SNR (engl. Signal to Noise Ratio für Signal-zu-Rauschen-Verhältnis) gemittelt werden. Zum anderen besteht

---

<sup>4</sup>Mit dieser sog. „Pulsphase“ ist die räumliche Orientierung (die Richtung in der X-Y-Ebene) der Drehachse gemeint, um die die Flipwinkel der Pulse bestimmt sind.

die Möglichkeit, nach jedem Echo einen Gradienten zu schalten, der die Phasenkodierung zurücknimmt, und nach dem folgenden Refokussierungspuls einen neuen Phasenschritt zu kodieren. Diese Methode, mit einem einzigen Anregungspuls mehrere Phasenraumschritte in einem Echozug zu erhalten, wurde 1986 von Hennig et.al. [HNF86] als RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) eingeführt. Mittlerweile hat sie viele Optimierungen und Variationen erfahren (vgl. [MWWJ90] oder HASTE [KGH94]), die auch als TSE (Turbo Spin Echo) bekannt sind.

Während des Echozuges fällt die Signalintensität mit  $T_2$  ab. Sind die  $T_2$ -Zeiten der Probe lang genug gegenüber der Dauer für Kodierung und Aufnahme der Echos, können ggf. alle k-Raum-Schritte eines Bildes in einem Zug aufgenommen werden. Je nach gewünschtem  $T_2$ -Kontrast werden dann die Phasenschritte für die Mitte des k-Raumes, die die Hauptintensität des Bildes bestimmt, an entsprechende Stellen im Echozug gelegt.

## 3 Biologische Grundlagen

### 3.1 Pflanzenzellen

Der Kontrast in NMR-Bildern von biologischem Gewebe hängt vom inneren Aufbau der verschiedenen Gewebe, deren Wassergehalt und der Zusammensetzung von Zellflüssigkeiten ab. Für eine genauere Diskussion dieses Zusammenhangs in Abschnitt 7 soll der grundsätzliche Aufbau von Pflanzengewebe kurz erörtert werden.

Zwischen den Zellen verschiedener Pflanzenarten und Gewebe gibt es erhebliche Größenunterschiede, von  $4\mu\text{m}$  bis  $2\text{cm}$  Durchmesser bei Riesenalgen [Nob83]. In den später betrachteten Wurzeln von *Zea mays* bewegt sich die Größe etwa zwischen  $10\mu\text{m}$  und  $40\mu\text{m}$ .

Das größte Volumen nimmt in ausgewachsenen Zellen mit bis zu 95% die Vakuole ein. Sie kann als Wasser- und Nährstoffreservoir oder Endlagerstätte von Giftstoffen dienen sowie zur Aufrechterhaltung des Zelldruckes (Turgor). Die Vakuole wird von der Tonoplastenmembran eingeschlossen und vom Zytoplasma umgeben. Das Zytoplasma enthält alle funktionellen Pflanzenorganellen wie den Zellkern, die Mitochondrien, Plastiden und das Zytoskelett. Damit liegt im Zytoplasma eine große Konzentration an Nährstoffen ebenso wie sehr große Membran- und Proteinoberflächen (z.B. Zytoskelett) vor. Die Proteinkonzentration liegt zwischen 10% und 30%, so dass ein Großteil des Wassers im Zytoplasma an Proteine gebunden vorliegt [SS91].

Nach außen wird die Zelle von der Zellmembran (Plasmalemma) abgeschlossen, die ihrerseits von der aus Zellulose und anderen Kohlenhydraten bestehenden Zellwand umgeben ist. Membranen besitzen eine Dicke von etwa  $6\text{nm}$  bis  $10\text{nm}$ , die Zellwände  $0.5\mu\text{m}$  bis  $2.0\mu\text{m}$ . Wo die Zellwände benachbarter Zellen nicht direkt miteinander vernetzt sind, finden sich Interzellularräume. Das gesamte System aus miteinander verbundenen Interzellularräumen, zu denen auch die flüssigkeitsgefüllten, porösen Zellwände gehören, wird als Apoplast bezeichnet.

### 3.2 *Zea mays* und Wurzelanatomie

Der größte Teil der Anwendungsexperimente dieser Arbeit erfolgte an den Wurzeln von *Zea mays* der Sorte Bangui.

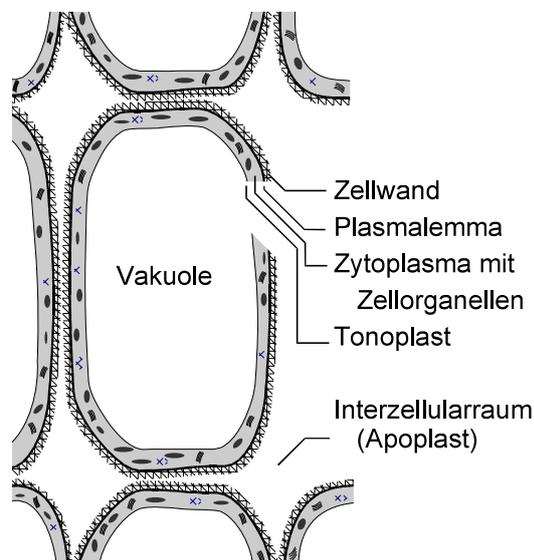


Abb. 3: Aufbau typischer Pflanzenzellen.

Wie die meisten Monokotylen (einkeimblättrige Pflanzen) bilden Gräser, und so auch Mais, ein homorhizes Wurzelsystem, d.h. viele gleichwertige Wurzeln sprossen nebeneinander aus der Pflanze. Im Alter von 7 bis 14 Tagen, in dem die Pflanzen hauptsächlich gemessen wurden, hatten sich jedoch meistens noch keine sprossbürtigen Versorgungswurzeln, neben der bei der Keimung gewachsenen, ausgebildet. Somit konnte auch die Auswertung der Messungen in jedem Fall auf die „Haupt-“ Wurzel konzentriert werden.

Das Wurzelwachstum findet in der Spitze statt, die von einer sog. Wurzelhaube (der Kalyptra) umgeben ist (vgl. rechtes Schema in Abbildung (4)). Diese Haube wird durch das Medium geschoben und enthält u.a. den Gravitationsinn für die Wachstumsrichtung. Oberhalb der Kalyptra befindet sich das Wurzelgewebe in der Differenzierungsphase, in der ein weiteres Längenwachstum der Zellen stattfindet und sich die verschiedenen Gewebetypen ausdifferenzieren. Darüber schließt sich die für Wasser- und Nährstoffaufnahme wichtigste Zone an, in der sich aus den Zellen der Epidermis Wurzelhaare gebildet haben und so eine sehr große Oberfläche bilden.

Bis zum Messzeitpunkt erreichten die Wurzeln üblicherweise eine Länge von 20cm bis 30cm und der Messbereich lag ca. 4cm unterhalb des Kornes und damit in der basalen Zone der Wurzel. Hier ist die Epidermis häufig abgestorben und abgefallen, und es beginnen sich Seitenwurzeln auszubilden. Oftmals ist unklar, ob die äußerste Schicht durch Epidermis oder Hypodermis gebildet wird, so dass gelegentlich allgemeiner von „Rizodermis“ gesprochen wird.

Monocotyle zeigen i.d.R. kein sekundäres Dickenwachstum, so dass die Wurzeln ihren endgültigen Durchmesser von maximal 1.5mm schon nach der Ausdifferen-

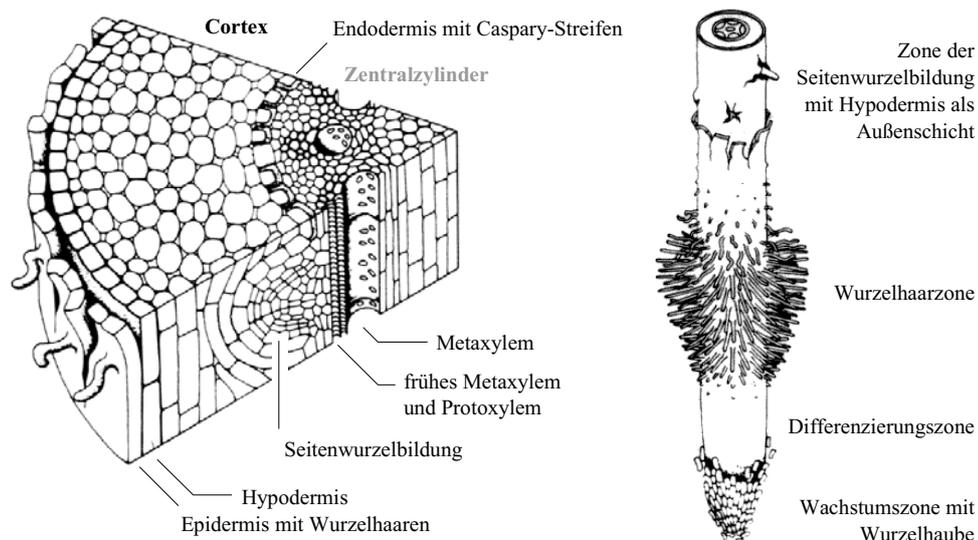


Abb. 4: Schematischer Schnitt durch eine Maiswurzel (verändert nach [LKB94]). Alle Messungen dieser Arbeit an Maiswurzeln fanden in der Zone der Seitenwurzelnbildung statt.

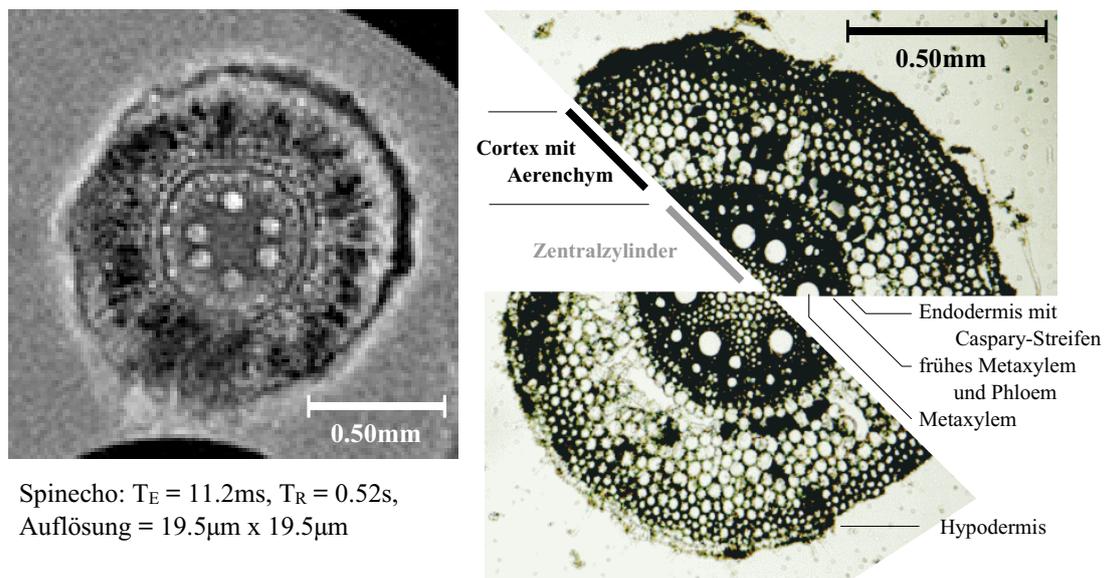


Abb. 5: Links: Ausschnitt aus einem NMR-Mikroskopiebild. Rechts: Lichtmikroskopieschnitt zum Vergleich. Beide Bilder zeigen den Querschnitt einer ca. 10 Tage alten Maiswurzel, im Bereich der Nebenwurzelbildung etwa 4cm unterhalb des Korns.

zierung der Gewebe besitzen. Damit bleibt auch der Cortex, der den Zentralzylinder umgibt, erhalten und wird nicht durch Wachstum abgesprengt. Bei Gräsern wie Mais und Reis bildet sich insbesondere in Hydrokultur im Cortex das sog. Aerenchym aus, gasgefüllte Interzellularräume, die die Versorgung der Wurzeln mit Sauerstoff unterstützen.

Der Zentralzylinder wird vom Cortex durch die Endodermis abgetrennt, deren Zellen durch den Caspary-Streifen „dicht“ miteinander verbunden sind, so dass hier apoplasmatischer Transport stark eingeschränkt ist. In den Zentralzylinder gelangen Wasser und gelöste Substanzen nur durch die Zellmembranen der Endodermis.

Auch innerhalb des Zentralzylinders setzt sich der hauptsächlich radialsymmetrische Aufbau fort. Dicht innerhalb seines Randes finden sich „frühe“ Metaxylemgefäße<sup>5</sup> und Phloemleitbündel abwechselnd in einem Ring angeordnet. Letztere transportieren Zucker und Nährstoffe, die in den Blättern produziert werden, in die Wurzeln. Dieser Ring ist in vielen der später gezeigten NMR-Aufnahmen zu erkennen, aber ohne dass eine Unterscheidung zwischen Phloembündeln und Xylemgefäßen möglich wäre. In Ermangelung eines Fachwortes aus der Literatur für diesen Bereich der ringförmig angeordneten Gefäße wird im Folgenden der Begriff „Vaskularring“ dafür verwendet werden. Weiter innen befinden sich die auffällig großen Leitgefäße des „späten“ Metaxylems. Sie übernehmen den hauptsächlichen Wasser- und Nährstofftransport aus den Wurzeln in die Pflanze. Sowohl in

<sup>5</sup> „früh“ bedeutet dabei, dass dieses Xylem bereits in der jungen Wurzel aktiv ist, vor der Ausdifferenzierung der großen Metaxylemgefäße.

der NMR- als auch der Lichtmikroskopie in Abbildung (5) sind sie deutlich zu erkennen.

### 3.3 Pflanzenanzucht und Messbedingungen

Samen von *Zea mays* wurden in Dunkelheit auf nassem Papier gekeimt, bis die Wurzeln nach 3–4 Tagen eine ausreichende Länge ( $> 3\text{cm}$ ) erreicht hatten, um die Pflanzen auf die Wurzelröhrchen (vgl. 4.4) umsetzen zu können. Ausgehend von dieser Länge konnten die Wurzeln in die Röhrchen hineinwachsen, die mit einer nitrathaltigen Nährlösung [Hew66] gefüllt waren und mit Luft begast wurden, um die Wurzeln mit Sauerstoff zu versorgen. Mit einer Quecksilberdampflampe wurden die Pflanzen in einem Tagesrhythmus von 6:00h bis 21:00h mit ca.  $800\mu\text{E}$  beleuchtet. Die Temperatur betrug  $25^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit 40%. Gemessen wurde an Pflanzen im Alter zwischen 7 und 14 Tagen.

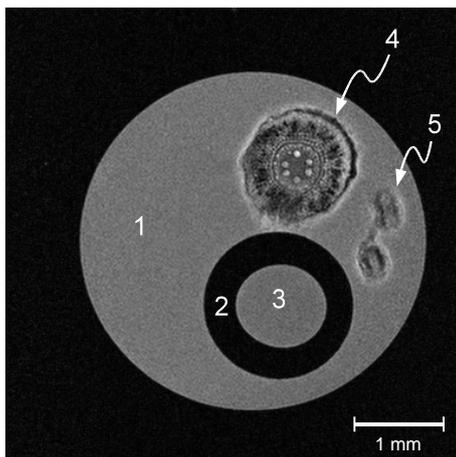


Abb. 6: typisches NMR-Bild: 1 - Nährlösung, 2 - Kapillare, 3 - Vergleichslösung, 4 - Hauptwurzel, 5 - Nebenwurzeln.

Die Überführung in den NMR-Tomographen fand während der Lichtphase statt, was eine Unterbrechung der Beleuchtung von ca. 15min bis 30min zur Folge hatte. In der Klimakammer des Probenkopfes herrschte während der Messungen eine Luftfeuchtigkeit zwischen 60% und 80%, eine Temperatur zwischen  $18^\circ\text{C}$  und  $22^\circ\text{C}$ , und die Beleuchtungsstärke im Bereich der Blätter betrug  $500\mu\text{E}$  bis  $1000\mu\text{E}$ . Je nach funktionellem Experiment, wurde der Tageszyklus gleichmäßig weitergeführt, jedoch mittels einer IR-gefilterten 12V/50W Halogenlampe [Kau98]. Da an den Wurzeln gemessen wurde, war eine weitere Begasung des Nährmediums nicht möglich. Während der Gerätejustierung hatten die Pflanzen ca. 40min Zeit, sich zu

aklimatisieren.

Abbildung (6) zeigt als NMR-Bild den transversalen Schnitt durch den üblichen in dieser Arbeit verwendeten Probenaufbau. Man sieht die Nährlösung (1) im Glasröhrchen, das selbst kein Signal gibt. In der Nährlösung befindet sich eine Kapillare (2) aus Polyethylen, die ebenfalls mit Nährlösung als Referenz (3) gefüllt ist. Diese ist wichtig für Experimente, in denen die Nährlösung um die Wurzel entfernt oder durch andere Medien ausgetauscht wird. Oberhalb der Kapillare ist schließlich die Hauptwurzel (4) zu sehen, sowie rechts zwei Nebenwurzeln (5).

## 4 Hardware

### 4.1 AMX500-Spektrometer

Alle NMR-Experimente wurden an einem AMX500 der Firma Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten / Karlsruhe durchgeführt. Der heliumgekühlte supraleitende Magnet besitzt eine Feldstärke von 11.75T (Protonen-NMR-Frequenz 500MHz) und eine vertikale Bohrung mit 89mm Durchmesser. Hierfür steht ein Mikroskopiegradientensystem zur Verfügung, das in alle drei Raumrichtungen bei maximalem Strom von 30A eine Gradientenstärke von 660mT/m erzielt. Die Bohrung im Gradientensystem bietet 40mm Durchmesser Platz für HF-Spule, Probenhalterung und Probe. Mit dieser Ausstattung sind räumliche Auflösungen bis zu  $15.6 \times 15.6 \times 30.0 \mu\text{m}^3$  erreicht worden [HSB<sup>+</sup>04]. Mit dem zugehörigen 50W HF-Sender und der verwendeten Spule (vgl. 4.3) lag die Dauer für einen 90°-Puls bei 8ms.



Abb. 7: AMX500.

### 4.2 HF-Probenkopf, Klimakammer und Gaswechsellmes-ser

Speziell für NMR-Untersuchungen an Pflanzen steht für das AMX ein Klimakammerprobenkopf zur Verfügung [Kau98, Olt98, KLT<sup>+</sup>96]. Er enthält die HF-Zuleitung und das Ankoppelnetzwerk für austauschbar aufsetzbare HF-Spulen (vgl. 4.3) und dient als Halterung für die Probenröhrchen (vgl. 4.4). Der Bereich um die und oberhalb der Messstelle kann mit einer Röhre, als Verlängerung des HF-Schirmes, luftdicht umschlossen werden. Siehe auch 4.5.

Im Zusammenspiel mit einer Gaswechsellmesanlage XMS400 der Firma Heinz Walz GmbH, Effeltrich [Hei90], können Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Beleuchtungsstärke in der Kammer gemessen werden. Durch den Vergleich des ein- und ausgehenden Luftstroms werden mittels IR-Spektrometrie CO<sub>2</sub>-Assimilation und Transpiration der Pflanze bestimmt.

### 4.3 HF-Spulen



Abb. 8: Helmholtzspule.

Bei den hier vorgestellten Experimenten kamen ausschließlich zwei der für diesen Probenkopf verfügbaren HF-Resonatoren zur Anwendung. Hauptsächlich wurde mit einer Helmholtzspule mit 6mm Radius gemessen, die passend für 5mm Probenröhrchen (vgl. 4.4) entworfen wurde. Da die Probe in Form der Engstelle eines Glasröhrchens (vgl. 4.4) nicht axial in einen umschließenden Resonator eingebracht werden kann, wären ein Birdcageresonator oder eine Sattelspule nur geeignet, wenn sie sich öffnen ließen, was bei den geringen Abmessungen aber kaum realisierbar erscheint. Trotz des besseren Füllfaktors dieser Spulen, die der Zylinderform der Messstelle entsprechen, erscheint somit eine offene Helmholtzspule als einzig praktikable Lösung.

Für größere Proben (bis  $\emptyset=16\text{mm}$ ), die ohne Engstellen längs eingebracht werden können, wurde ein linearer 8-Bein-Birdcageresonator (Durchmesser 20mm und Beinlänge 20mm) benutzt, der im Rahmen einer Praktikumsarbeit entstand.

### 4.4 NMR-Wurzel-Röhrchen

Für NMR-Messungen an Wurzeln muss eine Möglichkeit gefunden werden, die Wurzeln ausreichend mit Nährmedium zu versorgen und gleichzeitig einen möglichst direkten Zugang für den HF-Resonator zu schaffen. Um unnötigen SNR-Verlust zu vermeiden, sollte das Resonatorvolumen das Probenvolumen nur so weit überschreiten wie unbedingt notwendig. Wird das gesamte Nährlösungsvolumen, der gesamte Wurzelbereich in einen entsprechend großen Resonator eingebracht, lässt sich zwar die Struktur des Wurzelsystems untersuchen, die Physiologie einzelner Wurzeln aber kaum mehr auflösen (vgl. 9.5). Für die senkrechte Anordnung im AMX erscheint als günstigste Lösung ein Probenröhrchen mit einer Engstelle, durch welche die Wurzeln hindurch wachsen können. Dieses Konzept wurde bereits in [Kau98] verwirklicht und im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Anwendungserfahrungen entscheidend verbessert:

Die starre „Glaswulst“, die das Röhrchen im Probenkopfsöckel hielt, wurde eingespart. Statt dessen kam ein O-Ring zum Einsatz, der gleichzeitig das Dichtungsproblem für die Gaswechsellmessungen löst und mehr Spiel zur Positionierung bietet.

Das Volumen oberhalb der Messstelle wurde deutlich erhöht, auch durch eine Vergrößerung des Durchmessers, da hier der Raum nicht wie im unteren Bereich durch das Trägerrohr des Probenkopfes auf 16mm limitiert ist. Damit steht auch für längere Messungen ausreichend Nährlösung zur Verfügung. Das verhindert ein Austrocknen des Messbereiches, was durch die Beladungsänderung zu einer Frequenzverschiebung des Resonators und einer Verschlechterung der Impedanzanpassung führt.

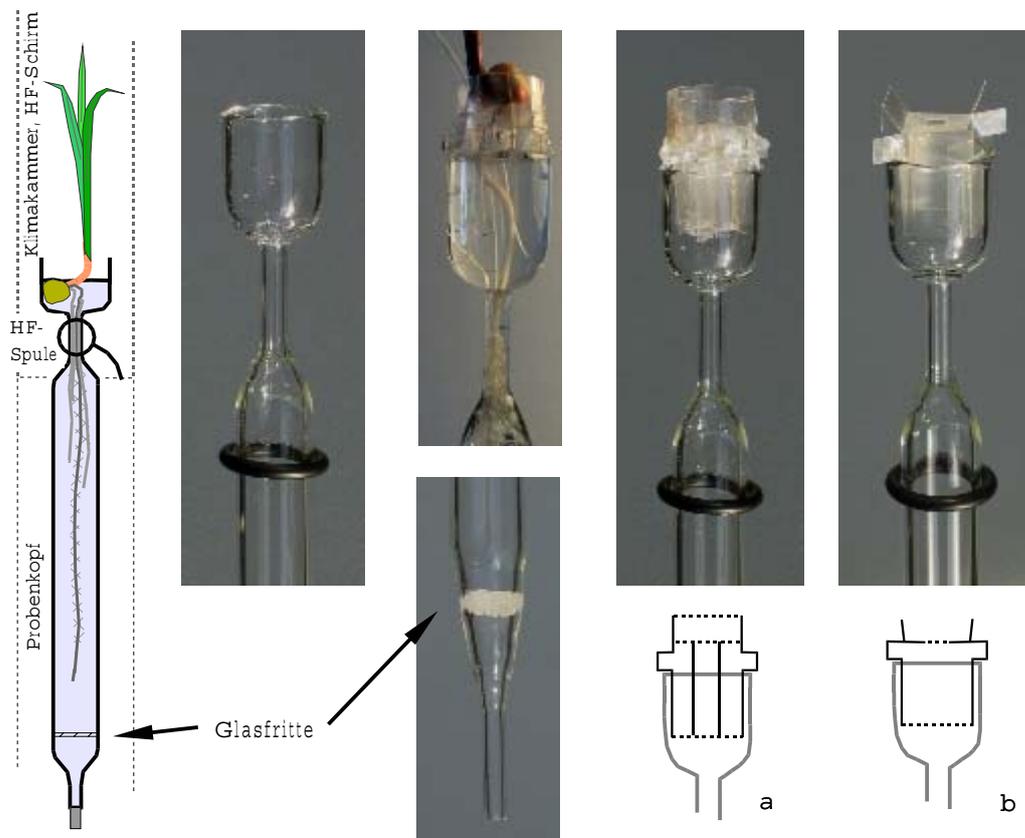


Abb. 9: Verbesserte Wurzel-NMR-Röhrchen mit großem „Nährlösungsreservoir“ oberhalb des Messbereiches. Rechts: zwei Ausführungen des Aufsatzes, der das Samenkorn von der Nährlösung trennt und damit Schimmelbildung vorbeugt (Details im Text).

Die Glasfritte als unterer Abschluss des Wurzelbereiches und zum Aufsprudeln der Begasung konnte relativ grob gewählt werden, was das Durchfließen der Nährlösung ebenso wie die Reinigung erleichtert.

Das Einsetzen der Pflanzen mit Saatkorn in die Nährlösung führte oft zu Schimmelbildung, die sich auch auf den Wurzel- und Messbereich ausbreitete. Um das zu verhindern, wurden Aufsätze aus PE-Folie entworfen, die das Korn oberhalb des Nährlösungsspiegels halten und so ein Verschimmeln verhindern. Version a in Abbildung (9) bietet ein senkrechtes Raster, durch das die Wurzeln in den Messbereich einwachsen können. Version b ist oben durch eine Fläche abgeschlossen, deren einzelne Öffnung dafür sorgt, dass ausschließlich die Hauptwurzel die Nährlösung erreicht und selektiv als einzige die Pflanze versorgen kann.

Neben diesen gläsernen Wurzel-NMR-Röhrchen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit solche aus Plexiglas entworfen, die der Länge nach in zwei Kompartimente geteilt sind. Sie können für „split-root-Experimente“ eingesetzt werden, bei denen dem Wurzelsystem einer Pflanze zwei unterschiedliche Nährlösungen angeboten werden [Sch01].

## 4.5 Modulares Probenkopfdesign

Die Probenhalterungen, die für Messungen in einem vertikalen Hochfeldmagneten wie dem AMX eingesetzt werden, werden als Probenköpfe bezeichnet und enthalten z.B. auch die HF-Leitungen und Anschlüsse für die Resonatoren. Die HF-Zuleitung endet häufig in einem Balun<sup>6</sup>, der als triaxiale  $\lambda/4$ -Strecke für eine Symmetrisierung des angelegten HF-Spannungssignals sorgt [CH89]. Das symmetrische Signal ist für die Ankopplung von Quadraturspulen (Birdcages) nahezu unerlässlich; außerdem dient der Balun als Mantelwellensperre. Ein Ankoppelnetzwerk, das zumeist kapazitiv für eine Impedanzangleichung des Resonators auf die üblicherweise  $50\Omega$  der Zuleitungen sorgt (sog. „Match“) und ebenso eine Feinabstimmung der Resonatorfrequenz zulässt (sog. „Tune“), wird häufig ebenfalls mit im Probenkopf integriert. Die Kombination aus einer HF-Leitung, dazugehörigem Balun und Ankoppelnetzwerk für eine bestimmte Frequenz wird innerhalb eines Probenkopfes als Kanal bezeichnet.

Bei 40mm Innendurchmesser des Gradientensystems und 5mm durchmessenden Proben finden in üblicher Bauweise maximal vier Kanäle in einem Probenkopf Platz. Diese Anzahl reduziert sich, sobald größere Proben berücksichtigt oder andere Vorrichtungen oder Zuleitungen im Probenkopf benötigt werden. Bei der Anschaffung oder dem Bau eines Probenkopfes muss man sich daher anhand der möglichen Einsatzgebiete genau überlegen, für welche Frequenzen und damit Kerne man Kanäle vorsieht, und bleibt dann auf diese beschränkt. Im derzeit verfügbaren Klimakammerprobenkopf für das AMX konnten beispielsweise neben den Klimazuleitungen nur zwei HF-Kanäle untergebracht werden, die für die Messung von  $^1\text{H}$  und  $^{23}\text{Na}$  abgestimmt sind (Siehe auch 4.2). Messungen von z.B. Phosphor oder  $^1\text{H}$  in Quadratur sind damit ausgeschlossen worden. Um solchen Einschränkungen in Zukunft zu begegnen, wurde in Zusammenarbeit mit einer zeitgleich angefertigten Dissertation über NMR-Hardware [Beh08] ein neues Konzept [KB05, BKHJ08] entwickelt und umgesetzt. Die Grundlage hierfür bildet die Idee eines modularen Aufbaus, bei dem einzelne Kanäle dem Probenkopf hinzugefügt bzw. zu einem Probenkopf zusammengesetzt werden können.

Die erste realisierte Ausführung wurde für das Mikroskopie-Gradientensystem eines Bruker Avance 750 WB Magneten konstruiert, dessen innere Geometrie sich lediglich in der Entfernung des Isozentrums von der Bohrungsöffnung mit 642mm gegenüber 545mm vom AMX unterscheidet. Dieser modulare Probenkopf wurde für Spektroskopieanwendungen ausgelegt. Er lässt daher den gleichzeitigen Einsatz von 4 HF-Kanälen zu und bietet in seiner Achse Platz für 5mm Probenröhrchen. Es stehen zwei  $^1\text{H}$ -Kanäle für einen möglichen Quadraturbetrieb zur Verfügung und je ein weiterer, abgestimmt auf  $^{31}\text{P}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , sowie  $^2\text{D}$ . Letzterer ist primär als Frequenzlock ausgelegt [Beh08]. Ein achter Kanal ohne Balun, d.h. auch ohne Frequenzfestlegung, ist z.B. für  $^{39}\text{K}$  vorgesehen, für welches bei 17.6T und somit 35MHz die Länge der  $\lambda/4$ -Strecke etwa 1685mm betragen

---

<sup>6</sup>kurz für engl. „balanced to unbalanced“

und die Baulänge des Probenkopfkanales übersteigen würde.

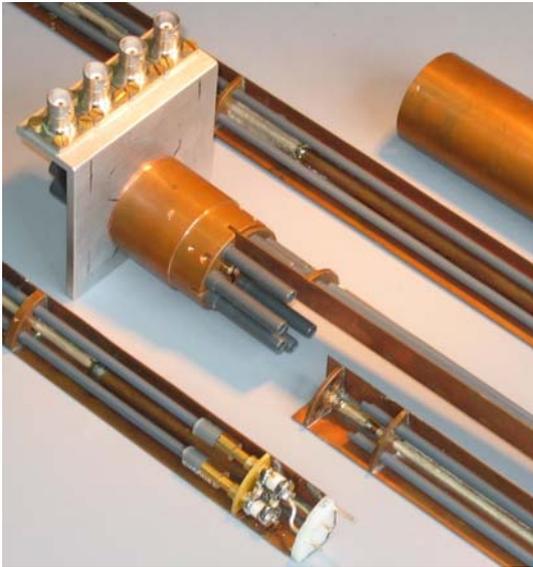


Abb. 10: Modularer 4-Kanal Probenkopf für Avance 750 WB. Sockel mit einem konnektierten und drei weiteren Kanalmodulen.

Der Außenleiter der HF-Leitung aus Semi-Rigid-Kabel und der Balun sind über ihre gesamte Länge leitend mit dem geviertelten zentralen Trägerrohr verbunden, um eine gleichmäßige Erdung zu gewährleisten und den Aufbau von Potentialdifferenzen zu verhindern. Der Anschluss an die weitere HF-Leitung im Sockel

Seite 26 zeigt den schematischen Aufbau des Konzeptes anhand dieses Probenkopfes und Abbildung (10) ein Foto der gefertigten Komponenten. Ein zylindrischer Sockel dient als Basis für die Kanalmodule, die als 90° Kreissegmente realisiert sind. Der mechanische Träger jedes Moduls ist ein inneres 90° Segment aus Kupferrohr, das mit zwei Seitenwänden aus Kupferblech hart verlötet wurde. Damit ist auch eine gute Abschirmung der Kanäle untereinander gegeben. Stabilisierung bieten in verschiedenen Ebenen eingefügte Kupferscheiben. Nach außen erfolgt die HF-Abschirmung durch ein umschließendes Kupferrohr, das auch zur Stabilisierung und mechanischen Fixierung der eingesetzten Kanäle dient.

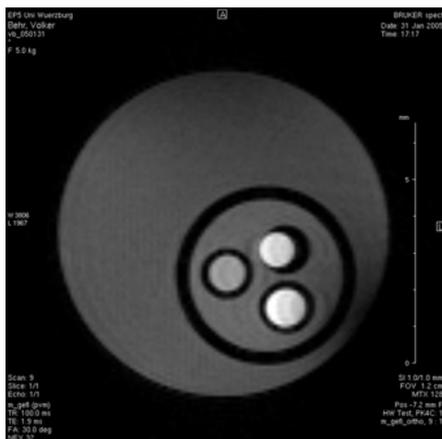


Abb. 11:  $^1\text{H}$ -FLASH Bild eines Kontrastphantoms mit Gd-DTPA, TR=100ms, TE=1.9ms, FOV=12mm x 12mm, 128Pkt x 128Pkt, Schichtdicke 1.0mm, 32 Mittelungen.

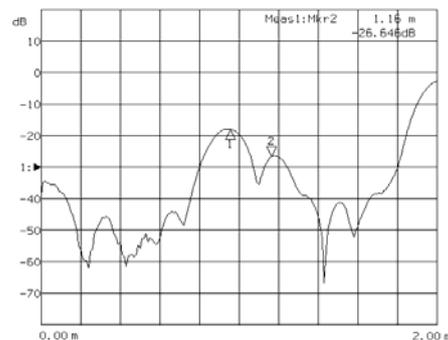


Abb. 12: "fault locations" Signalreflexionen in Koaxialleitung. Marker 1 - BNC-Buchse, Marker 2 - MCX-Buchse

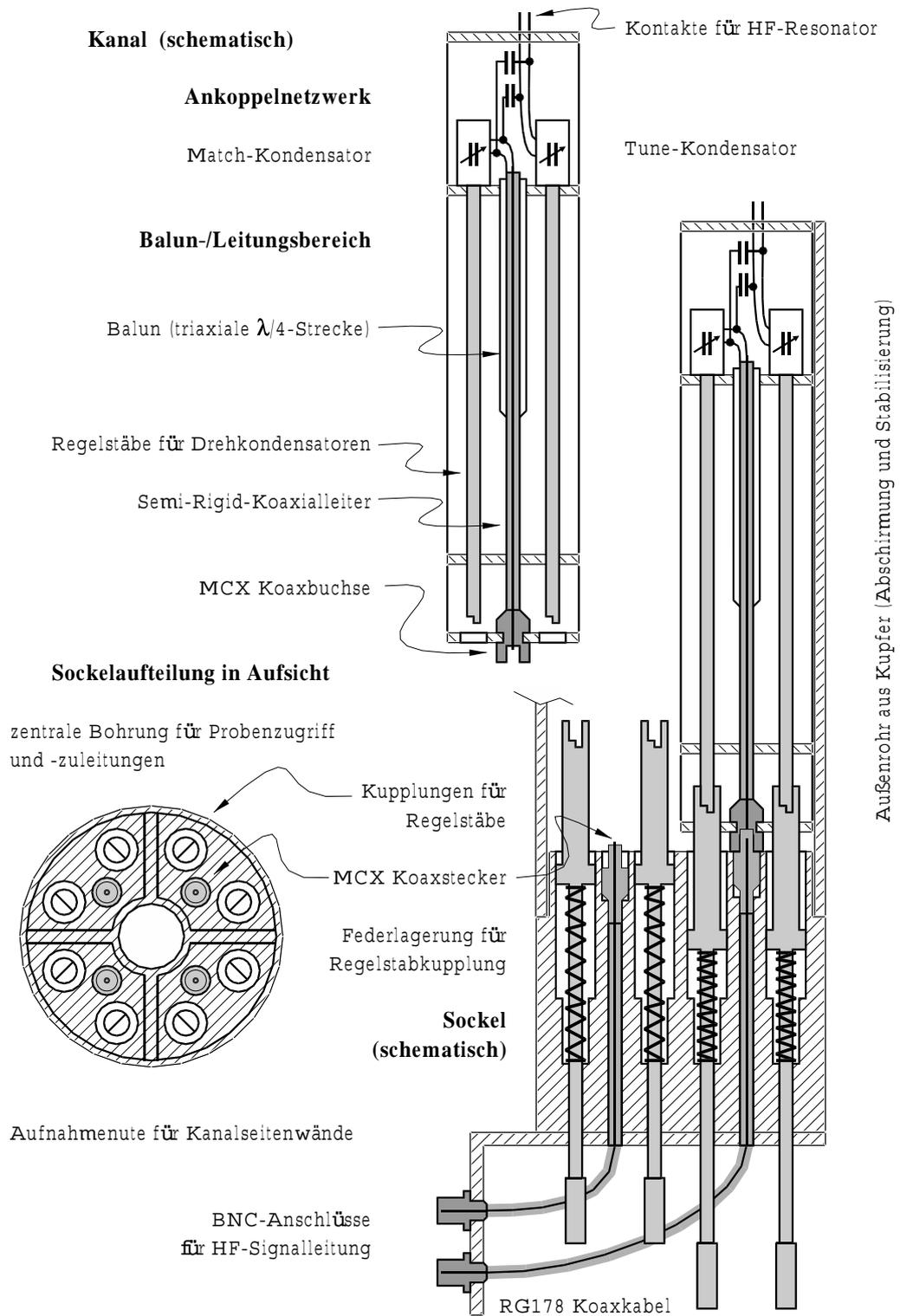


Abb. 13: Modulares Probenkopfdesign für 4 Kanäle, schematische Darstellung.

erfolgt über einen MCX-Stecker<sup>7</sup>. Durch den Sockel führt ein RG178 Koaxialkabel zu den BNC-Buchsen, an denen die HF-Leitung vom Sender respektive zum Empfänger angeschlossen wird. Im Bereich des massiven Kupfersockels selbst ist das Kabel abisoliert, um auch hier eine gleichmäßige Erdung zu erzielen.

Um Zugriff auf die regelbaren Kondensatoren im Ankoppelnetzwerk zu haben, werden durch jeden Kanal zwei Stäbe geführt, die über einen Kupplungsmechanismus mit ihrer Fortführung im Sockel verbunden werden. Eine Federlagerung im Sockel sorgt dabei für ein gleichmäßiges Einrasten der Kupplung sowie den nötigen Spielraum für das Aus- und Einschrauben des Dielektrikums der Drehkondensatoren.

Mit einem Agilent 8712ET Network-Analyzer wurde eine „fault location“ Bestimmung durchgeführt. Das Gerät misst dabei die Stärke der Signalreflexionen auf dem Leitungsweg und stellt sie abhängig vom Abstand zu sich selbst dar. Wie Abbildung (12) zeigt, tritt die stärkste Störung am Anschluss der Signalleitung an der externen BNC-Buchse auf (Marker 1). Die durch den modularen Aufbau zusätzliche interne Verbindung zwischen Sockelleitung und Kanal mittels MCX-Steckern (Marker 2) stellt mit -26.6dB eine deutlich geringere Störung dar.

Zur Überprüfung der Funktionalität im Zusammenspiel mit dem Avance 750 WB wurde mit einem der <sup>1</sup>H-Kanäle ein FLASH-Bild aufgenommen, das in Abbildung (11) zu sehen ist. Es zeigt ein wassergefülltes 10mm-NMR-Röhrchen, welches als „Strukturphantom“ ein weiteres wassergefülltes 5mm-NMR-Röhrchen enthält. Darin befinden sich drei Kapillaren mit je 0.1mmol/l, 1.0mmol/l und 10mmol/l Gd-DTPA-Lösung. Aufgrund der hohen Suszeptibilität erscheint die Lösung mit 10mmol/l Gd-DTPA in Richtung des Auslesegradienten verschoben. Für die Umsetzung des modularen Probenkopfkonzepes in einem Klimakammerprobenkopf für das Avance 750 WB Spektrometer liegen bereits erste Konstruktionszeichnungen vor.

Aufgrund des höheren Probenplatzbedarfs gegenüber der Spektroskopieausführung gehen sie von einer 120° Aufteilung mit zwei wechselbaren verfügbaren HF-Kanälen aus (vgl. Abbildung (14)). Ein Drittelsegment wäre ebenso wie ein zentrales Trägerrohr fest mit dem Sockel verbunden und würde die Luftleitungen sowie Anschlüsse für Klima- und Lichtsensoren enthalten

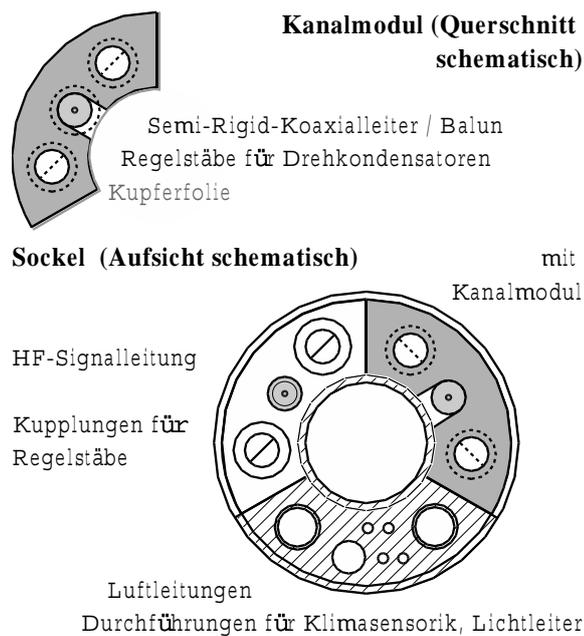


Abb. 14: Modulares Konzept für Klimakammerprobenkopf.

<sup>7</sup>„MICROAX-Verbinder“ bzw. „Mikrominiatur-Koaxialverbinder“ 50Ω der Firma Suhner

(vgl. [Kau98]).

Für die Kanäle wäre hier auch eine massive Ausführung, beispielsweise aus POM<sup>8</sup>, denkbar, in die HF-Leitung mit Balun und Durchführungen für die Regelstäbe als Nute eingelassen sind. Als Abschirmung könnte in diesem Fall Kupferfolie dienen. Eine solche Umsetzung dürfte verschiedene Vorteile mit sich bringen: mechanische Stabilität, dauerhaft genaue Außenmaße verglichen mit den gelöteten Seitenwänden, unempfindlichere da kompaktere Kanäle im nicht eingesetzten Zustand.

---

<sup>8</sup>Polyoxymethylen

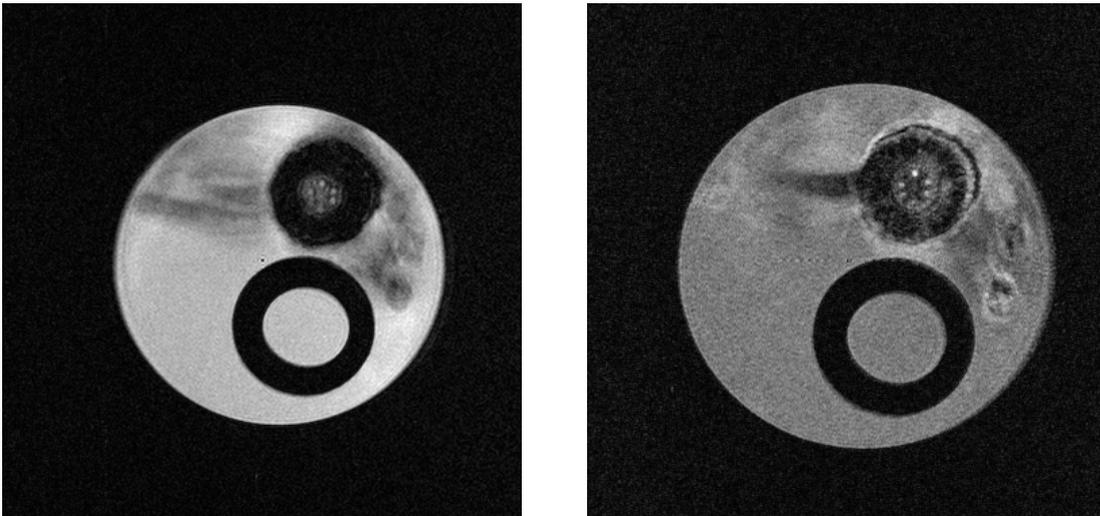


Abb. 15: Bildstörungen aufgrund der Suszeptibilitätssprünge in Pflanzenwurzeln und ihre Abhängigkeit von der Echozeit in FLASH-Sequenzen. Links:  $T_R=12.9\text{ms}$ ,  $T_E=5.8\text{ms}$ ,  $\text{FOV}=5.6\text{mm} \times 5.6\text{mm}$ ,  $256\text{Pkt} \times 256\text{Pkt}$ . Rechts: mit minimierter Echozeit,  $T_R=10.7\text{ms}$ ,  $T_E=2.1\text{ms}$ ,  $\text{FOV}=5.0\text{mm} \times 5.0\text{mm}$ ,  $256\text{Pkt} \times 256\text{Pkt}$ .

## 5 NMR-Methoden

Im Folgenden werden die NMR-Bildgebungs-Sequenzen vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden. Einzig für die Flussbildgebung konnte dabei auf eine am Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 etablierte Sequenz zurückgegriffen werden. Alle weiteren wurden am AMX neu implementiert und für die Mikroskopie an Wurzeln optimiert oder gänzlich neu entwickelt. In diesem Rahmen wurde z.B. der Einsatz sog. „Blips“ für Turbospinechos untersucht, eine 3D-Turbospinecho-Sequenz geschrieben und eine  $T_2^*$ -Sequenz als Hybrid aus Gradienten- und Turbospinecho entwickelt.

### 5.1 Sequenzauswahl für die Bildgebung an Wurzeln

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von funktionellen Studien sind kurze Akquisitionszeiten für die gewünschten Bilder und Parameterkarten, um in Zeitreihen die Veränderungen in der Physiologie der Pflanzen beobachten zu können. Eine der schnellsten Bildgebungssequenzen steht mit dem sog. FLASH [HFM<sup>+</sup>86] zur Verfügung. Diese Gradientenechosequenz basiert auf einem kleinen Flipwinkel des Anregungspulses, so dass ohne eine lange Relaxationsdauer abzuwarten stets Longitudinalmagnetisierung für eine weitere Anregung (den nächsten k-Raum-Schritt) zur Verfügung steht.

Wie bereits in Abschnitt 2.4.1 ausgeführt, ist der exponentielle Abfall der Signalstärke mit der Echozeit bei Gradientenechosequenzen von der Zeitkonstanten  $T_2^*$  abhängig. Bei Proben mit extrem kurzen  $T_2^*$ -Zeiten, wie in Pflanzenwurzeln

(vgl. 5.5), führt dies zu starkem Signalverlust. Abbildung (15) zeigt links das Ergebnis eines FLASH-Experimentes mit  $T_E=5.8\text{ms}$  Echozeit. Besonders der Bereich des Cortex' ist aufgrund der starken Suszeptibilitätssprünge zwischen Zellen und Aerenchym nicht mehr erkennbar. In der Literatur wurde für hochaufgelöste Aufnahmen von Wurzeln daher teilweise mit Vakuuminfiltration gearbeitet, um die Lufträume des Aerenchyms zu füllen [CLL<sup>+</sup>87]. Für *in vivo* Experimente und die hier vorgenommenen funktionellen Studien erscheint ein solcher Eingriff jedoch ungeeignet.

Um den Effekt zu reduzieren, wurde für das AMX ein optimiertes FLASH-Experiment mit minimierter Echozeit ( $T_E=2.1\text{ms}$ ) implementiert. Wie im rechten Bild zu erkennen, können dadurch derartige Störungen deutlich reduziert werden. Um Hardwarebeschränkungen, besonders der maximalen Gradientenschalt-dauer pro Zeit („Dutycycle“), Rechnung zu tragen, mussten dafür an anderen Stellen im NMR-Programm Delays eingeführt werden. Das führte zu einer deutlichen Verlängerung der Gesamtaufnahmedauer (ca. Faktor 4 bei gleicher Anzahl Mittelungen). Daneben bleiben auch bei minimierter Echozeit in vielen Proben Suszeptibilitätsstörungen sichtbar. Zusammen mit weiteren Folgen dieser Optimierung, wie hoher Sweepweite (Frequenz der Punkteabtastung bei der Signalaufnahme), „vorgezogenem Echo“ (die k-Raum-Mitte wird bereits nach einem Viertel der Aquisitionsdauer durchlaufen), erschienen Gradientenechos für NMR-Bildgebung an Pflanzenwurzeln, bei den gegebenen Rahmenbedingungen, in den meisten Fällen als ungeeignet.

Daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich Spinechosequenzen eingesetzt. Um trotzdem eine ausreichende Zeitauflösung für die funktionellen Experimente zu gewährleisten, wurden dabei weitestgehend Turbospinechos realisiert.

## 5.2 Turbospinecho Bildgebungssequenzen

Die Grundlagen von Turbospinecho-Sequenzen (TSE) wurden bereits in Abschnitt 2.4.4 dargestellt. Im Folgenden werden die Details der Methoden vorgestellt, wie sie im Rahmen dieser Arbeit implementiert wurden. Dabei wurde auch erstmals eine Möglichkeit untersucht und beschrieben, die Bild-Artefakte, die bei der Verwendung von sog. „Blips“ in einer Multi-Spinecho-Sequenz entstehen, zu reduzieren.

### 5.2.1 2D-Turbospinecho-Bildgebung

Für Bildgebung an Pflanzenwurzeln wurde am AMX eine TSE-Sequenz implementiert, die für ein FOV von  $5\text{mm} \times 5\text{mm}$  mit maximal  $256 \times 256$  Punkten optimiert wurde, womit eine maximale Auflösung von  $19.5\mu\text{m} \times 19.5\mu\text{m}$  erreicht wird. Die Schichtdicke wurde in den meisten Fällen mit  $500\mu\text{m}$  gewählt. Diese Voxelform ist an die zu untersuchenden Wurzeln angepasst, die in Längsrich-

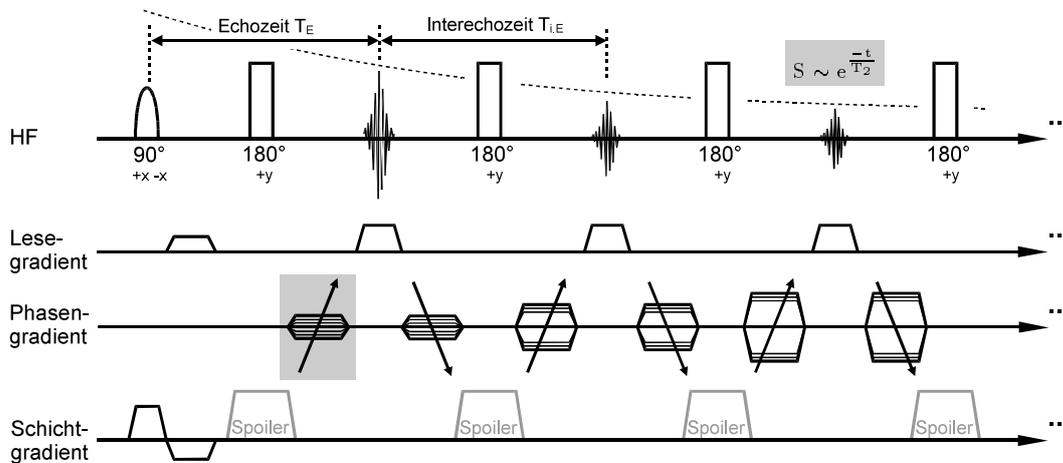


Abb. 16: Turbospinecho-Sequenz. Die ersten Echos der Echozüge werden für die k-Raum-Mitte verwendet, um ohne maßgeblichen  $T_2$ -Abfall maximale Signalintensität im Bild zu erhalten. Feine Strukturen und scharfe Kanten werden dadurch stärker  $T_2$ -gewichtet. Wird der ganze Echozug identisch phasenkodiert, also nur der grau hinterlegte Phasengradient geschaltet, ergibt sich die CPMG-Sequenz mit dem eingezeichneten  $T_2$ -Abfall, die für die  $T_2$ -Karten verwendet wurde.

tung wenig Strukturschwankungen aufweisen. Trotz einer hohen Auflösung in der Ebene steht somit ein großes signalgebendes Voxelvolumen zur Verfügung. Die hierbei erreichbare Echo- und Interechozeit betrug 9.1ms. Ein Vergleich mit den  $T_2$ -Zeiten zwischen 20ms und 60ms in den Pflanzenwurzeln und bis etwa 100ms in der Nährlösung (vgl. 5.4) zeigt, dass die ursprüngliche Signalstärke beim 4. Echo im ungünstigsten Fall auf ein Sechstel und im günstigsten auf gut die Hälfte abgefallen ist. Ein Echozug mit mehr als 8 Echos erscheint hiermit nicht praktikabel.

Dementsprechend wurde die Sequenz segmentiert. Für 256 Phasenschritte wurden 32 Anregungspulse verwendet und jeweils 8 Echos aufgenommen (16 Anregungspulse für 128 Phasenschritte). Die jeweils ersten Echos dieser Echozüge wurden für die mittleren Phasenraumzeilen kodiert, um die maximale Signalintensität mit minimaler  $T_2$ -Gewichtung auszunutzen. Im Sequenzdiagramm in Abbildung (16) ist diese Methode der k-Raum-Abtastung anhand der dargestellten Phasengradient-Schritte zu erkennen; Abbildung (18)-links zeigt den Weg durch den Phasenraum während eines Echozuges.

Eine hundertprozentige  $B_1$ -Feldhomogenität ist leider nie gegeben, so dass es innerhalb der Messschicht auch bei idealer Pulsdauer zu Abweichungen von den idealen 90°- und 180°-Pulsen kommt. Um Bildstörungen hierdurch zu minimieren, wurde der erwähnte 90°-Phasenshift zwischen Anregungs- und Refokussierungspuls [MG58] verwendet und über eine um 180° wechselnde Pulsphase des Anregungspulses [GOS86] gemittelt.

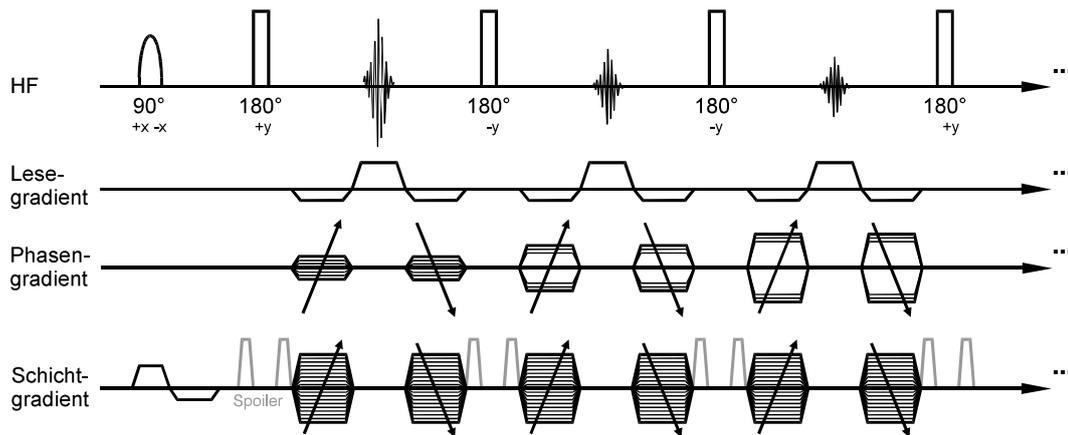


Abb. 17: 3D-Turbospinechosequenz.

Mit der erwähnten Echozeit und einer Repetitionszeit von 1s ergab sich ein optimaler Bildkontrast in den Wurzeln, wie auch anhand der synthetischen Bildkontraste in Abbildung (40) nachzuvollziehen ist.

Die Schichtauswahl erfolgt mit einem gaußförmigen Anregungspuls (Dauer  $500\mu s$ ), was zu einem ebensolchen Anregungsprofil führt. Der in Abbildung (16) angedeutete Spoiler während des nicht schichtselektiven Refokussierungspulses (Dauer um  $20\mu s$ ) beseitigt den nach diesem Puls auftretenden FID-Anteil.

### 5.2.2 3D-Turbospinecho-Sequenz

Aus dem 2D-TSE wurde eine 3D-Sequenz entwickelt. Die hauptsächliche Änderung hierfür besteht in einem zweiten Phasengradienten in Schicht-Richtung, der in Wiederholungen des ursprünglichen 2D-Experimentes durchlaufen wird. Für eine isotrope Auflösung wurden die Werte dieses zweiten Phasengradienten identisch zum ersten gewählt. Die Probe geht nach „oben“ und „unten“ über die Messebene, für die diese Phasenkodierung erfolgt, hinaus. Außerdem besitzt die angeregte Schicht keine ganz scharfen Grenzen, sondern erreicht abgeschwächt auch Probenbereiche außerhalb der Schicht, wenn Schichtdicke und Phasenkodierung rechnerisch exakt gewählt werden. Dadurch entstehen durch die Fouriertransformation bei der Bildrekonstruktion Einfaltungen des oberen Probenbereiches in den unteren Bildbereich und umgekehrt. Um diese zu vermeiden, wird die angeregte Schicht rechnerisch um ca. 20% schmaler gewählt als dem FOV der ursprünglichen Ebene entsprechen würde.

Daneben wurden folgende Verbesserungen [MWWJ90, GOS86, MG58] durchgeführt, um der höheren Artefaktanfälligkeit der 3D-Sequenz entgegenzuwirken. Der Akkumulation von Ungenauigkeiten des  $180^\circ$ -Pulses wird durch einen symmetrischen, alternierenden Phasenzklus begegnet  $+ - - + + - - +$ . Während des  $180^\circ$ -Pulses werden die Spoiler abgeschaltet, um trotz dessen hoher Bandbreite Störungen auszuschließen. Der Phasengradient für die 3. Raumrichtung ebenso

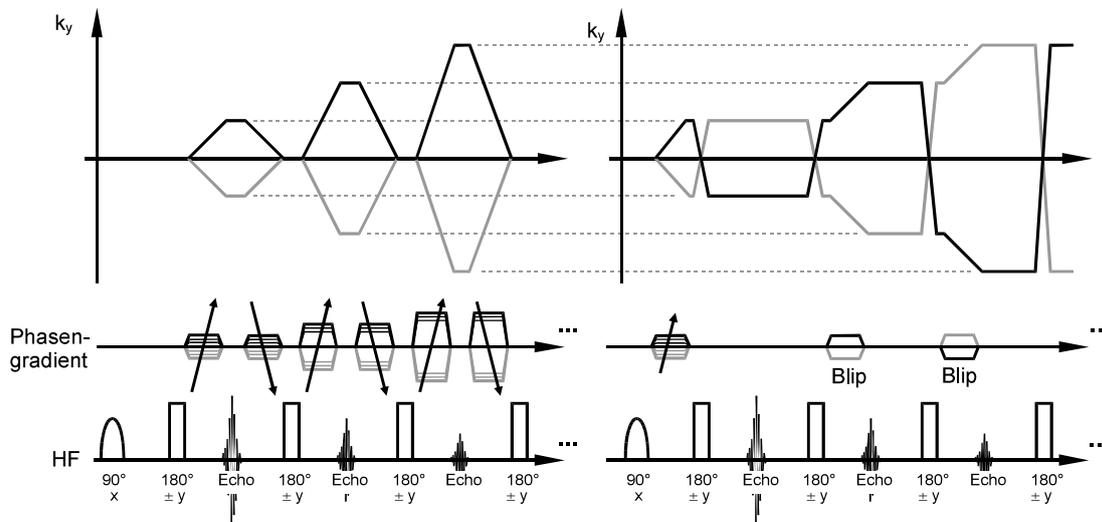


Abb. 18: Weg durch den Phasenraum ( $k_y$ -Achse entspricht Phasenkodierrichtung) während eines Turbospinechozuges. Links: herkömmliche Phasenkodierung mit Phaserewindern. Rechts: stufenweise Phasenerhöhung mit „Blips“; der  $180^\circ$  Puls invertiert dabei jeweils die Phase des zuvor ausgelesenen Echos.

wie die Dephasierungsgradienten in Ausleserichtung werden nach dem Refokussierungspuls angelegt sowie nach jedem Echo vor dem nächsten Puls zurückgenommen. So wirken diese Gradienten als zusätzliche Spoiler, sorgen aber viel mehr noch dafür, dass sich das System während des Refokussierungspulses am  $k$ -Raum-Ursprung befindet. Sowohl FID-Anteile als auch höhere Echos des Pulszuges werden dadurch für jedes Echo immer korrekt phasenkodiert. Wie bei den 2D-Sequenzen wird auch hier über einen zweistufigen Anregungspulsphasenzyklus gemittelt.

Die Aufnahme eines Datensatzes mit  $128^3$  Voxeln dauert mit einem 8-Echo-Zug und einem  $T_R$  von 1.092s etwa 70 Minuten. Bei einem FOV von  $(5\text{mm})^3$  ergibt sich eine isotrope Auflösung von  $40\mu\text{m}$ .

### 5.2.3 Turbospinecho mit Phasengradienten-„Blips“

Einer der größten Zeitfaktoren, der neben der eigentlichen Datenakquisition (Dauer 5.12ms bei 128 Punkten mit 25kHz Samplingrate) die Inter-Echozeit in der TSE-Sequenz bestimmt, ist die Dauer der Phasengradienten zwischen Echos und Refokussierungspulsen. Einschließlich der Gradientenrampen müssen hierfür zweimal  $1.43\text{ms}$  eingerechnet werden, verglichen mit etwa  $20\mu\text{s}$  für den Refokussierungspuls. Da der Anregungspuls mit  $500\mu\text{s}$  deutlich kürzer ist als die Akquisitionszeit, spielt er selbst für das erste Echo keine Rolle.

Will man die Inter-Echozeit verkürzen, um bei gleichen  $T_2$ -Zeiten mehr Echos aufnehmen zu können, ohne durch eine höhere Samplingrate das SNR zu reduzieren, oder um die  $T_2$ -Gewichtung weiter zu reduzieren, bietet es sich also an,

bei den Phasengradienten anzusetzen.

Mit „Blips“ werden kurze inkrementelle Gradientenpulse bezeichnet, auf deren Grundlage sich zumindest theoretisch kürzere Interechozeiten realisieren ließen. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, die starken Artefakte zu reduzieren, die beim tatsächlichen Einsatz von Blips in einer Turbospinecho-Sequenz entstehen. Die theoretischen Grundlagen, Ergebnisse einer Sequenzimplementierung am AMX sowie die Möglichkeiten und Einschränkungen des Verfahrens werden im Folgenden dargestellt.

Abbildung (18) zeigt links den herkömmlichen Weg durch den k-Raum während eines Echozuges mit Phasenrewindern. Es besteht die Möglichkeit, stattdessen vor dem ersten Refokussierungspuls den ersten Phasenschritt zu kodieren und dann Gradientenpulse zu schalten, die jeweils nur den Unterschied zum nächsten Phasenraumschritt beinhalten. Bei gleicher Gradientendauer ließe sich damit die maximale Gradientenstärke für 8 Echos je Echozug von 90% auf 11% reduzieren oder stattdessen die Gradientendauer von den oben erwähnten 1.4ms gerätebedingt auf 0.3ms verkürzen.

Diese relativen Phasengradienten wurden als Erweiterung der Multi-Gradientenecho-Methode EPI (Echo Planar Imaging) [Man77] eingeführt. Sie werden als „Blips“ bezeichnet und wurden um 1987 erstmals von Rzedzian und Pyket [RP87] und Doyle, Chapman et al. [DTC+86, CTO+87] beschrieben. Sequenzen dieses Typs werden als BEST (blipped echo-planar single-puls technique) oder als BEPI (blipped EPI) bezeichnet.

Die 1990 getroffene Feststellung, dass die Verwendung von Blips für Multi-Spin-echo-Methoden bislang nicht gezeigt wurde [MWWJ90], hat bis heute ihre Gültigkeit behalten. Im folgenden soll kurz dargestellt werden, warum das so ist und wie man den Problemen möglicherweise begegnen könnte.

Eine unproblematische Änderung gegenüber der Gradientenechomethode besteht darin, dass die Refokussierungspulse die Phase invertieren (im k-Raum spiegeln), d.h. die Blips müssen im Vorzeichen abwechseln.

Daneben erzeugt jeder HF-Puls mit jedem anderen und jeder Kombination der vorangegangenen Pulse ein Echo [Hen91]. In der üblichen TSE-Sequenz besitzen alle diese überlagerten Echos dieselbe Phasenkodierung, die direkt vor jedem Echo eingestellt und nach jedem Echo zurückgenommen wird. Im Falle der „geblippten“ Sequenz besitzt jedes der überlagerten Echos jedoch nur die Phasenkodierung, die seit dem ersten das jeweilige Echo verursachenden Puls mittels der Blips appliziert wurde. Die Magnetisierung, die während einer Akquisitionsphase das Echo formt, enthält somit neben der gewünschten auch eine Reihe stark abweichender Phaseninformationen. Als Folge treten nach der Rekonstruktion erhebliche Artefakte in Phasenrichtung auf, wie in Abbildung (19-a) zu sehen.

Als Abhilfe wurde nun eine Mittelung über verschiedene Phasenzyklen für die Refokussierungspulse entwickelt, so dass sich höhere Echos auslöschten.

Jeder reale  $180^\circ$ -Puls lässt sich als Kombination aus einem idealen (nur refo-

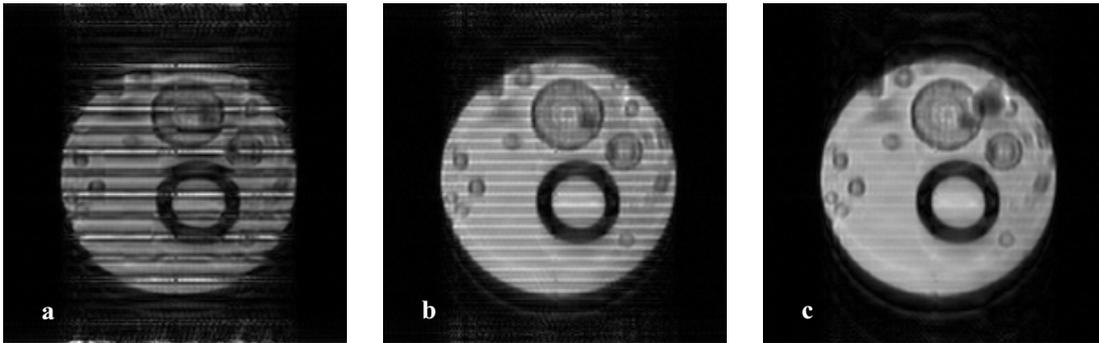


Abb. 19: Gebliptes TSE von Maiswurzeln. FOV=5mm x 5mm, 128Pkt x 128Pkt, Schichtdicke=0.5mm,  $T_R=1.083s$ ,  $T_E=9.1ms$ , 8 Echos. a - ohne Phasenzyklus, b - vierfach Phasenzyklus, c - 16-fach Phasenzyklus. Weitere Details im Text.

kussierenden)  $180^\circ$ -Puls und einem neu-anregenden  $90^\circ$ -Puls zusammengesetzt denken. Beginnend mit

+ + + + + + + +

als Phasen<sup>9</sup> der 8 Refokussierungspulse eines Echozuges, erzeugt der  $90^\circ$ -Anteil mit jedem folgenden  $180^\circ$ -Puls ein Echo. Ein zusätzlicher Echozug mit alternierenden Pulsphasen

+ + + + + + + +  
- + - + - + - +

führt zu identischer Refokussierung der „gewünschten“ Magnetisierung; die Echoanteile aus jeweils benachbarten Pulsen sind jedoch um  $\pi$  phasenverschoben und löschen sich bei Mittelung der beiden Echozüge aus. Um die stimulierten Echos zu eliminieren, die von jeweils drei aufeinanderfolgenden Pulsen verursacht werden, wird dieser Phasenzyklus wiederum verdoppelt und ab jedem dritten Puls invertiert, d.h. jedes zweite Phasenpaar wird invertiert.

+ + + + + + + +    - + - + - + - +  
+ - - + + - - +    - - + + - - + +

(Der  $90^\circ$ -Anregungspuls wird dabei als erster Puls gezählt.) Jetzt erzeugen jeweils drei Pulse zusammen das zur ersten Hälfte des Phasenzyklus' (die oben gezeigten 2 Pulsphasenreihen) umgekehrte Vorzeichen. Das Ergebnis als Mittelung dieser 4 Phasenzyklen ist in Abbildung (19-b) zu sehen. Verdoppelt man den Phasenzyklus weitere zweimal, indem die Phase ab jedem 4. und dann ab jedem 5. invertiert wird, reduzieren sich die Artefakte weiter, wie in Abbildung (19-c) zu sehen. Einen Überblick und detailliertere Einführung in die Auswahl bestimmter Echoanteile in einem Multi-Spinecho-Zug mittels Phasenzyklen gibt z.B. [BM89].

<sup>9</sup>In der Nomenklatur von Abbildung (18) ist damit +y bzw. -y gemeint.

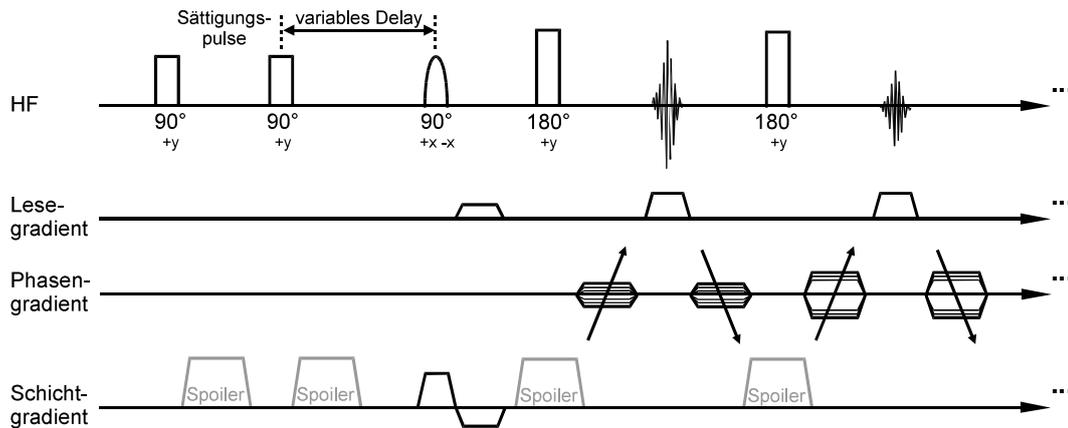


Abb. 20: Puls- und Gradientenschema eines Anregungsschrittes (8 Phasenschritte) der implementierten  $T_1$ -Sequenz: Saturation recovery Vorexperiment gefolgt von einem 8 Echo Turbo-spinecho.

Die hier entwickelte Methode eliminiert zwar die stärksten Störungen, um jedoch alle zu beseitigen, müsste über alle  $2^8$  möglichen Kombinationen für den 8-teiligen Phasenzklus des 8-Echozuges gemittelt werden. Bereits wesentlich eher übersteigt die Gesamtdauer des Experimentes ohne sichtliche Vorteile die Dauer einer gleichwertigen einfachen Spinechosequenz.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es nicht wie vielfach angenommen grundsätzlich unmöglich ist, geblippte Phasengradienten auch bei Multi-Spinecho-Methoden einzusetzen. Für eine praktikable Anwendung bedarf die Methode aber weiterer Verbesserungen, daher wird im Rahmen der weiteren Arbeit auch auf die übliche Phasenkodierung bei Turbo-spinechobildern zurückgegriffen.

Der verfolgte Ansatz, der auf einer Mittelung geeigneter Refokussierungs-Puls-Phasenzyklen beruht, eliminiert sehr gut die stärksten Artefakte aufgrund „niedriger“ Mehrfachechos. Um ohne Vervielfachung des Zeitaufwandes auch die höheren und zugleich schwächeren Echos zu reduzieren, sollte eine Kombination mit Konzepten aus anderen Phasen- und Pulszyklen (z.B. auch solchen, die in „Steady-State“ Bildgebungssequenzen verwendet werden, um höhere Echos zu vermeiden [ZWN91]), untersucht werden.

### 5.3 $T_1$ -Karten

Parameterkarten, wie für die  $T_1$ -Werte, werden üblicherweise erzeugt, indem eine Reihe Bilder aufgenommen wird, während der sich der Einfluss des gewünschten Parameters auf die Signalstärke kontrolliert verändert. Kennt man den funktionellen Zusammenhang, kann pixelweise der Parameterwert durch Fit ermittelt werden. Häufig kommt dafür auch in der NMR-Mikroskopie die Methode der Magnetisierungspräparation [HBKL93] zum Einsatz, bei der ein Vorexperiment die

zur Verfügung stehende Longitudinalmagnetisierung mit dem gewünschten Parameter wichtet und direkt anschließend ein Bild oder ein Phasenschritt eines Bildes aufgenommen wird. Für T<sub>1</sub>-Karten gibt es hierbei zwei grundsätzliche Möglichkeiten: Bei der Methode des „Inversion-Recovery“ wird mit einem 180°-Puls die Ausgangsmagnetisierung invertiert (entlang -Z) und nach unterschiedlich langen Wartezeiten werden die Bilddaten aufgenommen. Beim „Saturation-Recovery“-Experiment zerstört („sättigt“) man mittels 90°-Pulsen und jeweils anschließendem Spoilergradienten die Magnetisierung und nimmt ebenso zu unterschiedlichen Zeiten während der T<sub>1</sub>-Relaxation Bilder auf [EA83].

Der Vorteil der ersten Methode ist eine höhere Genauigkeit, da auch der negative Anteil der Relaxationskurve erfasst wird.

Für die funktionellen Studien an Pflanzenwurzeln wurde jedoch aus Gründen der zeitlichen Auflösung die zweite Variante gewählt. Gegenüber ersterer benötigt man nach Aufnahme der Daten keine Wartezeit zur vollständigen Relaxation der Magnetisierung für die erneute Inversion, sondern kann direkt mit der Zerstörung der Restmagnetisierung den nächsten Schritt beginnen. Die Aufnahmedauer einer kompletten T<sub>1</sub>-Karte reduziert sich so mindestens auf ein Viertel.

Abbildung (20) zeigt das Schema der am AMX implementierten T<sub>1</sub>-Sequenz. Ein Vorexperiment aus zwei 90°-Pulsen mit jeweils anschließenden Spoilergradienten und variabler Wartezeit wurde vor dem Anregungspuls des beschriebenen 2D-Turbospinechos (Abschnitt 5.2.1) eingefügt. Zur Sättigung dienten dabei breitbandige Rechteckpulse, ohne Beschränkung auf die zu wählende Schicht, um durch ggf. im Xylem neu einfließende Magnetisierung (sog. Inflow-Effekt) die T<sub>1</sub>-Werte nicht zu verfälschen. Der Abstand  $\delta t$  zwischen dem letzten Sättigungspuls und dem Anregungspuls der Bildgebung wurde in 12 Schritten von 8.7ms bis auf 4.0s erhöht. Durch den Fit der beschreibenden Relaxationsfunktion

$$S(\delta t) = S_0(1 - e^{-\delta t/T_1}) \quad (7)$$

in jedem Bildpunkt wurden die T<sub>1</sub>-Karten (Abbildung (21)) ermittelt. Als zweiten Parameter aus diesem Fit erhält man die „Ausgangssignalstärke“  $S_0$ , die abgesehen von mehr oder weniger starken Gewichtungen (mit z.B. T<sub>2</sub> während der Echozeit  $T_E = T_{i,E} = 8.78\text{ms}$ ) in der Hauptsache die Ausgangsmagnetisierung  $M_0$  wiedergibt. Abbildung (23) im Abschnitt 5.4 zeigt eine solche Parameterkarte und den Einfluss von T<sub>2</sub> auf deren Werte, der im selben Abschnitt auch disku-

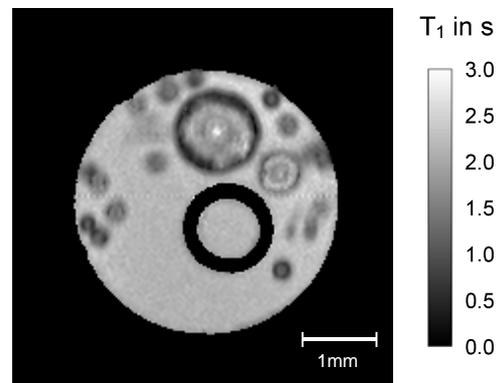


Abb. 21: Maiswurzeln. T<sub>1</sub>-Karte, FOV=5mm x 5mm, 128Pkt x 128Pkt, T<sub>E</sub>=8.8ms, Schichtdicke 0.5mm.

tiert wird. Es lässt sich feststellen, dass  $S_0$  als gute Näherung für die Spindichte verwendet werden kann. Da ihre Einheit ziemlich beliebig und von der Empfangskette des NMR-Geräts abhängig ist, werden Spindichtekarten für quantitative Aussagen stets auf eine bildinterne Referenz normiert. In den später gezeigten Messungen wurde dafür die Signalstärke in einer mit Nährlösung (vgl. Anhang Seite 139) gefüllten abgeschlossenen Referenzkapillare herangezogen.

## 5.4 $T_2$ -Karten

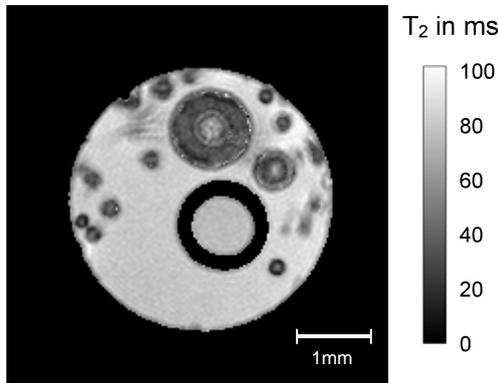


Abb. 22: Maiswurzeln,  $T_2$ -Karte. Multispinecho, FOV=5mm x 5mm, 128Pkt x 128Pkt,  $T_E=T_{i,E}=16.5\text{ms}$ ,  $T_R=1.7\text{s}$ , Schichtdicke 0.5mm.

$T_2$ -Karten wurden mit einer CPMG-Sequenz aufgenommen [MG58]. Nach einem Anregungspuls und dem Phasenkodierungsgradienten wurde ein Zug von 8 Echos akquiriert, deren Signalstärke mit  $T_2$  abfällt, wie in Abbildung (16) eingezeichnet.

Bei den kurzen zu messenden  $T_2$ -Zeiten in Pflanzen stellte sich eine Interechozeit mit  $T_{i,E}=16.5\text{ms}$  als geeignet heraus, um mit 8 Echos den maßgeblichen Verlauf des  $T_2$ -Abfalls abzutasten.  $T_2$  erhält man daraus durch Anfitzen der Relaxationsfunktion

$$S(t) = S_0 \cdot e^{-t/T_2} \quad (8)$$

an die Wertepaare  $(t_i, S_i)$ , wobei zu jedem Echo  $i$  ein  $t_i = i \cdot T_{i,E}$  gehört. Die Signalstärke  $S$  der einzelnen Echos in einem Echozug ist jedoch nicht allein von  $T_2$  und damit der Echozeit abhängig. Sie unterliegt daneben in jedem Echointervall einem Signalverlust durch ungenaue Pulswinkel der  $180^\circ$ -Refokussierungspulse und der Diffusionsgewichtung aufgrund von Spoiler- und Lesegradien [PH92, EVDVA98]. Detaillierter werden solche Prozesse im Abschnitt 7.2 beschrieben. Das Ergebnis des pixelweisen Fittes ergibt somit eine Karte, mit der sich die unteren Grenzen für  $T_2$  abschätzen lassen.

Die Karte in Abbildung (22) zeigt  $T_2$  in der Haupt- und den Nebenwurzeln einer 10 Tage alten Maispflanze. Die berechneten Werte liegen in der Wurzel zwischen 30ms und 60ms, in der Nährlösung zwischen 80ms und maximal 100ms. Der im Umgebungsmedium beobachtbare leichte " $T_2$ -Gradient" stammt von einer schlechten Durchmischung von kurz zuvor nachgefüllter Nährlösung und verbrauchtem Medium zwischen den Wurzeln.

Um die Auswirkung der  $T_2$ -Gewichtung auf die Spindichte-Werte  $S_0$  nach 5.3 zu untersuchen, wurde für jeden Bildpunkt der  $T_1$ -Sequenz

$$S'_0 = S_0 / e^{-T_E/T_2}$$

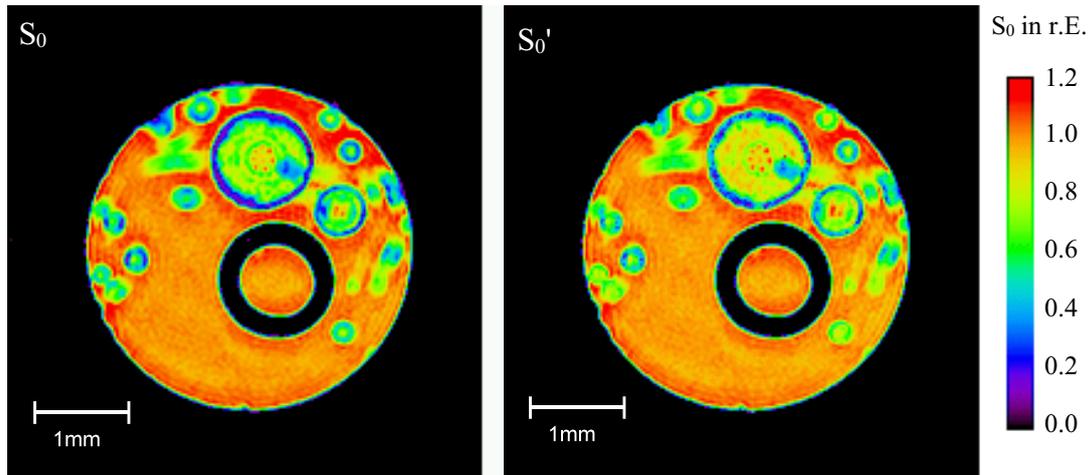


Abb. 23: Vergleich zwischen Spindichtekarte aus den  $T_1$ -Daten;  $S_0$  ohne,  $S_0'$  mit  $T_2$ -Korrektur, jeweils auf die Signalstärke der Nährlösung in der Kapillare normiert. Für eine feiner erkennbare SD-Wertabstufung wurde hier eine Farbdarstellung gewählt, deren Skala für beide Karten gilt. Zu Grunde liegende Daten: FOV=5mm x 5mm, 128Pkt x 128Pkt, Schichtdicke 0.5mm.

bestimmt. Da die ersten Echos jedes Zuges für die k-Raum-Mitte herangezogen werden, kann als kontrastbestimmende sog. „effektive Echozeit“ der  $T_1$ -Sequenz die einfache Echozeit  $T_E=8.78\text{ms}$  eingesetzt werden.

Der Vergleich zwischen  $S_0$  und  $S_0'$  in Abbildung (23) zeigt im korrigierten Bild erwartungsgemäß leicht erhöhte Spindichtewerte für die Wurzeln, gegenüber dem unkorrigierten. Bei  $T_2=80\text{ms}\pm 3\text{ms}$  im Umgebungsmedium und  $T_2=40\text{ms}\pm 14\text{ms}$  gemittelt in den Wurzeln ergibt sich zwischen den Korrekturfaktoren  $e^{T_E/T_2}=1.12$  bzw. 1.25 eine im Mittel 10%ige Abweichung. Da ein Spindichtebild auf eine bildinterne Referenz normiert werden muss, ist diese bildinterne relative Abweichung auch gleichzeitig der absolute Fehler. Verzichtet man (z.B. aus Zeitgründen) auf die Korrektur der Spindichte mittels einer zusätzlichen  $T_2$ -Karte, muss man einen derartigen Fehler akzeptieren und nötigenfalls diskutieren.

Da in dieser Sequenz die identischen Pulse und Gradienten verwendet werden wie in der  $T_1$ -Sequenz, werden bei der eben gezeigten Korrektur des Spindichtewertes neben  $T_2$  auch deren Einflüsse berücksichtigt. Durch die längere Echo- und Interechozeit ist die Gewichtung ungenauer Pulswinkel etwas geringer und die der Diffusion etwas stärker gegenüber der  $T_1$ -Sequenz, insgesamt erhält man jedoch eine bessere Fehlerkorrektur für die Spindichte aus der  $T_1$ -Sequenz, als es mit einer exakten Bestimmung von  $T_2$  möglich wäre.

## 5.5 $T_2^*$ -Karten

Eine gängige Methode zur zeitsparenden Erzeugung von  $T_2^*$ -Karten sind Multi-gradientenechos. Vor einem Echozug erfolgt einmalig eine Phasenkodierung, so

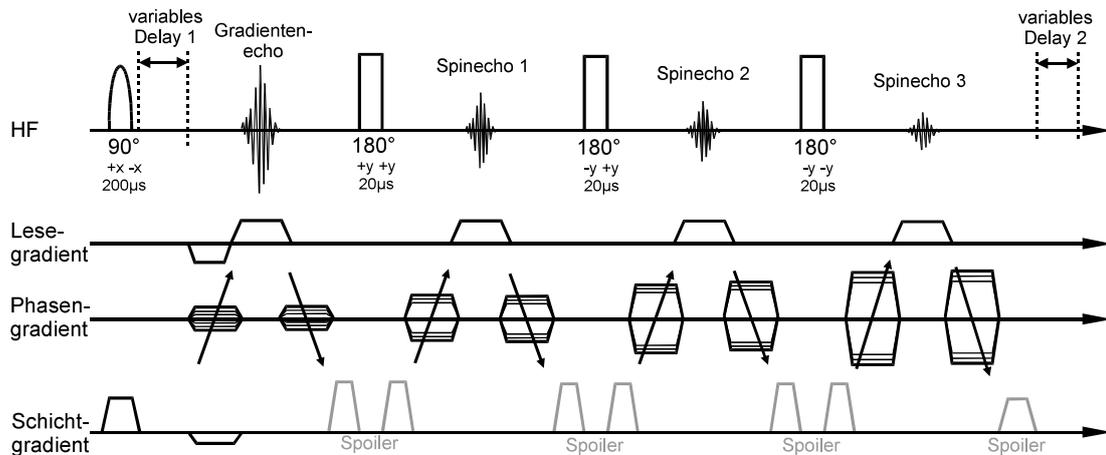


Abb. 24: Puls- und Gradientenschema der entwickelten  $T_2^*$ -Sequenz. Ein Gradientenecho (mit variabler Echozeit - Delay 1) wird dreimal mit neuer Phasenkodierung als Spinecho refokussiert. Delay 2 sorgt dafür, dass für jedes der 12 verschiedenen  $T_2^*$ -gewichteten Bilder die Repetitionszeit eines Anregungsschrittes konstant bleibt.

dass alle Echos eines Zuges jeweils dieselbe k-Raum-Zeile ergeben, jedes aber aufgrund der zunehmenden Gesamtechozeit eine andere  $T_2^*$ -Gewichtung besitzt. Die Schrittweite dieser  $T_2^*$ -Wichtung ist jedoch auf die relativ lange Interechozeit des Gradientenechos beschränkt, die sich hauptsächlich an der Akquisitionsdauer orientiert und mit Gradientenschaltzeiten für eine entsprechende Mikroskopiesequenz am AMX deutlich über 1.5ms gelegen hätte. Damit wäre das Abtasten des sehr schnellen  $T_2^*$ -Signalabfalls in Pflanzenwurzeln nur bedingt möglich gewesen. Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit eine andere Methode entwickelt.

Es wurde eine Reihe von 12 unterschiedlich  $T_2^*$ -gewichteten Bildern aufgenommen. Die Wichtung erfolgte durch die Variation der Echozeit eines einfachen Gradientenechos mit Hilfe eines variablen Delays (siehe Abbildung (24)). Die minimale Echozeit konnte dabei zwar nur auf 1.96ms optimiert werden, der weitere Verlauf des Signalabfalls jedoch in beliebig kleinen Schritten abgetastet werden, so dass bereits der zweite Datenpunkt das oben andiskutierte Multigradientenecho unterbieten kann. Aufgrund der sehr kurzen  $T_2^*$ -Zeiten der Pflanzenwurzeln wurden 12 verschiedene Gradientenechozeiten gewählt, beginnend mit 1.96ms, 2.45ms, 2.95ms, 3.95ms bis 129.94ms.

Um die Aufnahmedauer für eine  $T_2^*$ -Karte zu reduzieren, sollten innerhalb einer Wiederholung - nach einem  $90^\circ$ -Anregungspuls - insgesamt 4 Phasengradientenschritte aufgenommen werden. Damit die 3 weiteren möglichst wenig Signalverlust aufweisen, werden sie als Spinechozug durch  $180^\circ$ -Pulse erzeugt. Das erste Echo jedes Zuges wurde, wie bei den anderen implementierten TSE-Sequenzen auch, wiederum für die mittleren k-Raum-Zeilen kodiert.

Auch bei dieser Sequenz wird wieder über einen Anregungspulsphasenzyklus mit wechselndem Vorzeichen gemittelt und die Phase der Refokussierungspul-

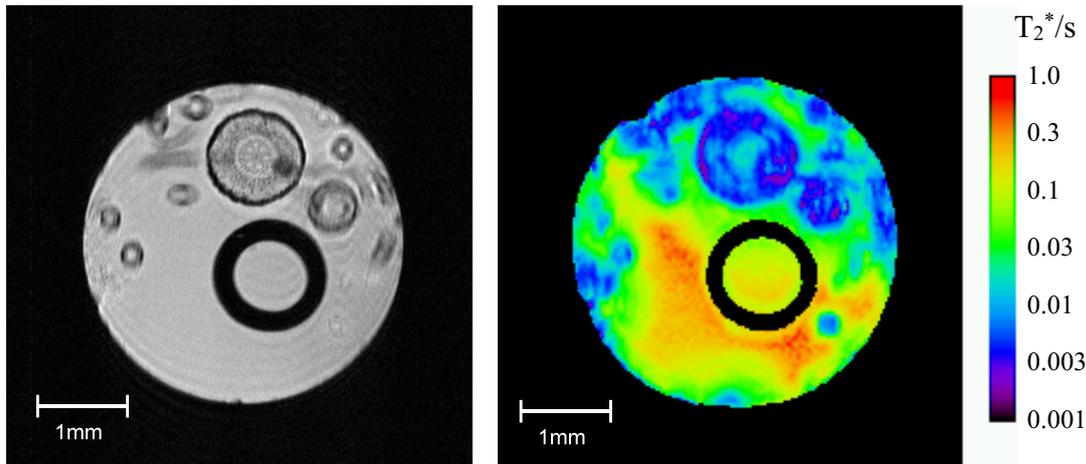


Abb. 25: Wurzel einer 10-Tage alten Maispflanze. Links: Turbospinecho FOV=5mm x 5mm, 256Pkt x 256Pkt, Schichtdicke 0.5mm, 4-Echo-Zug  $T_E=T_{iE}=9.1\text{ms}$ ,  $T_R=1.046\text{s}$ . Rechts:  $T_2^*$ -Karte, FOV=5mm x 5mm, 128Pkt x 128Pkt, Schichtdicke 0.5mm, logarithmische Werteskala. Die leicht unterschiedlichen Wurzelpositionen entstehen durch mehrstündigen Abstand der Aufnahmen, die scheinbare Wandstärkenänderung der Referenzkapillare durch den erfolgreichen  $T_2^*$ -Fit von Bildpunkten, die links aufgrund des Partial-Volume Effektes nicht mehr zu erkennen sind.

se um  $\pi/2$  gegen den  $90^\circ$ -Puls verschoben. Bei einer konstanten Repetitionszeit  $T_R=0.946\text{s}$  dauerte die Aufnahme einer  $T_2^*$ -Karte 24 Minuten.

Die Kombination aus Gradienten- und Turbospinecho erwies sich zwar als zeitsparende Methode für die  $T_2^*$ -Bildgebung, sie ist aber extrem anfällig für Artefakte in Phasenrichtung, aufgrund von Verschiebungen der Echos im Akquisitionsfenster, Überlagerungen verschiedener Phaseninformationen und der Signalabnahme während des Echozuges mit  $T_2$ .

Durch Nachjustieren des Dephasierungsgradienten in Ausleserichtung um  $-0.3\%$  gegenüber dem berechneten Wert, konnte die Position der Echos zwischen erstem Gradientenecho und den folgenden Spinechos so angeglichen werden, dass die hieraus verbliebenen Fehler in Phasenrichtung in der Parameterkarte nicht mehr ins Gewicht fallen. Das Ergebnis dieser Sequenz ist in Abbildung (25) im Vergleich mit einem hochauflösten TSE zu sehen.

Da  $T_2^*$ -Karten im weiteren Verlauf der Arbeit nicht für quantitative Untersuchungen benutzt werden sollten, wurde kein weiterer Aufwand in die Optimierung investiert. Das Ziel bei der Entwicklung und Implementation dieser Sequenz bestand lediglich in der Abschätzung und Demonstration der  $T_2^*$ -Relaxationszeiten in Pflanzenwurzeln und einer qualitativen Suche nach möglichen weiteren Ursachen für die extrem kurzen Zeiten - neben den Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen. Wie in den vorangegangenen Abschnitten für  $T_1$  und  $T_2$  geschehen, sollen an dieser Stelle die  $T_2^*$ -Charakteristika von Wurzeln und Medium kurz qualitativ diskutiert werden:

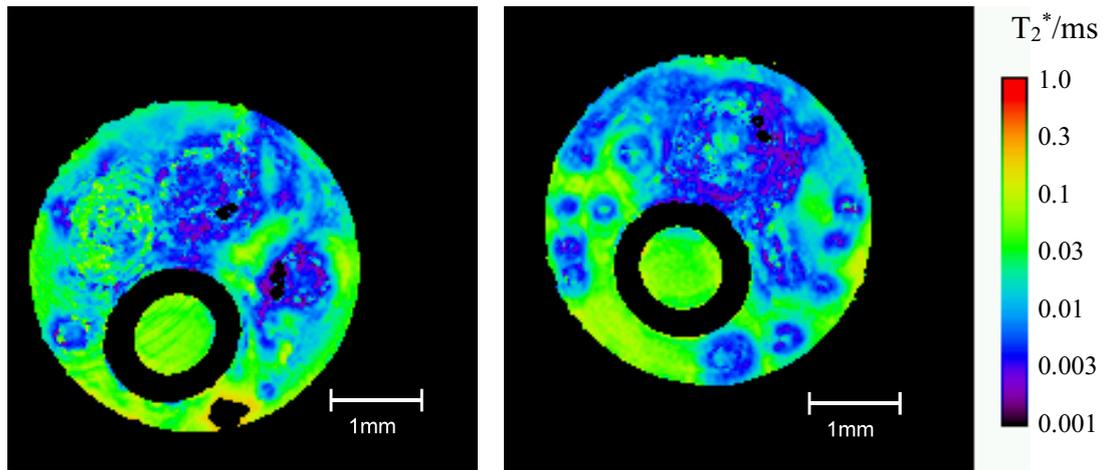


Abb. 26:  $T_2^*$ -Karten der Wurzeln zweier 2 Wochen alter Maispflanzen, links auf gereinigtem Wasser, rechts auf Nährlösung angezogen. (Logarithmische Werteskala) Gradientenecho mit folgendem 3-Spinechozug, FOV=5mm x 5mm, 128Pkt x 128Pkt, Schichtdicke 0.5mm.

Im freien Medium liegt  $T_2^*$  im Mittel bei  $0.25\text{s} \pm 0.07\text{s}$  und wird auch durch die Übergänge zum Gefäß oder der Polyethylenkapillare kaum beeinflusst (siehe Abbildung (25)). Auffällig ist die deutliche Reduktion des Wertes in der Umgebung kleinster Luftbläschen an der Glaswand, die man auch im TSE links in Abbildung (25) gut z.B. am unteren Bildrand erkennen kann. In der Wurzel liegt  $T_2^*$  zwischen 2ms und maximal 20ms. Pflanzen mit ausgeprägterem Aerenchym haben im Cortex zum Teil so kurze  $T_2^*$ -Zeiten (unter 1.5ms) und eine zu geringe Spindichte, um hier sinnvolle Werte zu erhalten (vgl. Abbildung (26)). Extrem kurze  $T_2^*$ -Zeiten finden sich ebenfalls im Bereich der Rizodermis, die als teils violetter Ring mit Werten unter 3ms zu erkennen ist.

Ein Vergleich (siehe Abbildung (26)) zwischen den Karten einer in gereinigtem Wasser und einer in Nährlösung gewachsenen Pflanze zeigen keine erkennbaren Unterschiede. Das spricht dafür, dass hauptsächlich Grenzflächen, wie die des Aerenchymgewebes, für eine Verkürzung der  $T_2^*$ -Zeit verantwortlich sind und eingelagerte paramagnetische Ionen aus dem Nährmedium (vgl. Anhang Seite 139) hier, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle spielen. In diesen beiden Bildern stören wesentlich mehr Nebenwurzeln und Wurzelhaare den  $T_2^*$ -Wert der Nährlösung als in Abbildung (25).

Durch einen bei diesen Aufnahmen noch nicht optimierten Dephasierungsgradienten in Ausleserichtung erscheinen im linken Bild ringförmige Fittungenauigkeiten im Bereich der Verschiebungsartefakte, die durch die leicht andere Probengeometrie in der rechten Karte nicht auftraten.

Die extrem kurzen  $T_2^*$ -Zeiten, die deutlich geringer sind als die mit Mikroskopiesequenzen und der vorliegenden Hardware erreichbaren Echozeiten, sind der Grund für die unbefriedigenden Ergebnisse der Gradientenecho-Bildgebung (vgl. Abbildung (15)). Deswegen wurden für die funktionelle Bildgebung an Pflanzenwurzeln

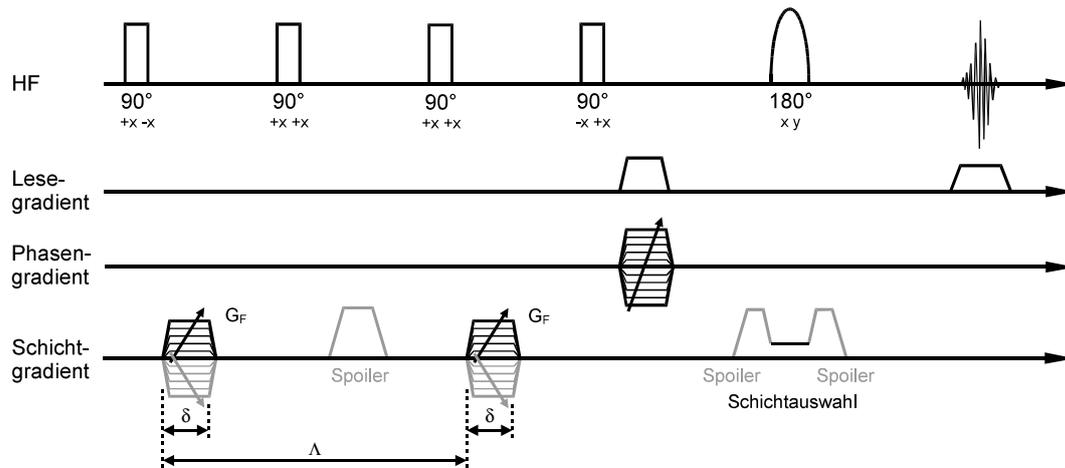


Abb. 27: Puls- und Gradientenschema der Spinecho-Flussbildbildungssequenz. Die Flusskodierung mit Unterdrückung des stationären Signals findet in Schicht-Richtung, also für Flüsse senkrecht durch die virtuelle Bildgebungsebene statt.

in dieser Arbeit Turbospinechosequenzen als schnelle Mikroskopiemethoden eingesetzt.

## 5.6 Flussgeschwindigkeits-Karten

Die Aufnahme der in dieser Arbeit gezeigten Flussgeschwindigkeitskarten erfolgte mit einer Spinechobildbildungssequenz, der eine Flussgewichtung mittels stimulierter Echos vorangestellt ist; vgl. [BD91, CF90, KKT<sup>+</sup>98]. Abbildung (27) zeigt das Sequenzschema mit den relevanten Parametern für die Auswertung der Flussgeschwindigkeit. Über acht unterschiedlich flusskodierte Bilder wurde die in [KKT<sup>+</sup>98] gezeigte Funktion gefittet, die um einen Diffusionsterm [ST65] erweitert wurde [Kuc96, RZH99b]:

$$f(v) = A \cdot \frac{\sin(2\pi \tilde{G}_F \delta \Lambda v)^2}{2\pi \tilde{G}_F \delta \Lambda v} e^{(-4\pi^2 \tilde{G}_F^2 D \delta^2(\Lambda-\delta/3))} \quad (9)$$

Hierbei bezeichnet

- $\tilde{G}_F$  – die Stärke des Flussgradienten in Hz/cm
- $\delta$  – die Gradientendauer
- $\Lambda$  – den Mitten-Abstand der beiden Flussgradienten
- $v$  – die mittlere Flußgeschwindigkeit bei parabolischem Geschwindigkeitsprofil
- $D$  –  $\approx 2.0 \cdot 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$  die Selbstdiffusionskonstante für freies Wasser
- $A$  – als weiterer erhaltener Fitparameter die Signalamplitude

Auf die Wirkung der Diffusion aufgrund von Bildgebungsgradienten wird nochmals genauer in Abschnitt 7.2.2 eingegangen.

Für das AMX optimiert, mit einer maximalen Flussgradientenstärke von 75% (des AMX-Maximalgradienten 660mT/m), wurde die Evolutionszeit der Flusskodierung zwischen den Gradienten auf 83ms gesetzt. Diese Werte sind mit Literaturwerten für Messungen in Pflanzenstängeln vergleichbar, da sich die Flussgeschwindigkeiten in den Wurzeln mit 0.3mm/s bis 1.2mm/s in derselben Größenordnung bewegen.

Alle gezeigten Flusskarten besitzen ein FOV von 5mm x 5mm, mit 128 x 32 aufgenommenen Punkten, die für die Fouriertransformation auf eine Matrix von 128 x 128 Punkten aufgefüllt wurden (sog. „zero-filling“). Die Echozeit betrug  $T_E=10.6\text{ms}$  und die Repetitionszeit  $T_R=1.1\text{s}$ .

## 6 Auswertung radialsymmetrischer Parameterstrukturen

Zur Auswertung von Parameterkarten biologischer Systeme werden häufig einheitliche Geweberegionen herausgegriffen (segmentiert), um aus den mit Rauschen behafteten Parameterkarten einen Mittelwert für den interessierenden Gewebetyp zu bestimmen. Diese Methode stößt an ihre Grenzen, wenn die Dicke einzelner Gewebeschichten nur noch in der Größenordnung weniger Bildpixel liegt. Viele Pixel lassen sich nur anteilig einer der benachbarten Gewebearten zuordnen und zeigen einen mittleren Parameterwert, was als Partial-Volume-Effekt bezeichnet wird. Außerdem liegen möglicherweise graduelle Änderungen der Werte über eine Gewebeschicht hinweg vor.

In radialsymmetrischen Strukturen (wie z.B. Maiswurzeln) kann man ein Pixel aufgrund seines Radiuswertes einem Gewebetyp zuordnen bzw. festlegen, welchen Anteil an zwei radial aufeinander folgenden Gewebewerten er besitzt. Durch die Mittelung nicht einer segmentierten Region, sondern der Pixel, die sich demselben Radius zuordnen lassen, erhält man ein radiales Profil, in dem neben den Gewebewerten auch deren Übergänge dargestellt sind. Ein solches Profil ist in Abbildung (28) für den Spindichteverlauf in einer Maiswurzel zu sehen. Für einen deutlichen Signal- und Zeitgewinn ließe sich eine exakt radiale Mittelung eleganter mit einer geeigneten NMR-Sequenz erzielen, wie sie in [MJvK<sup>+</sup>97] z.B. für ein CSI-Experiment zur Untersuchung der Metabolitenverteilung in Pflanzen vorgestellt wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten jedoch vor allem auch die von der

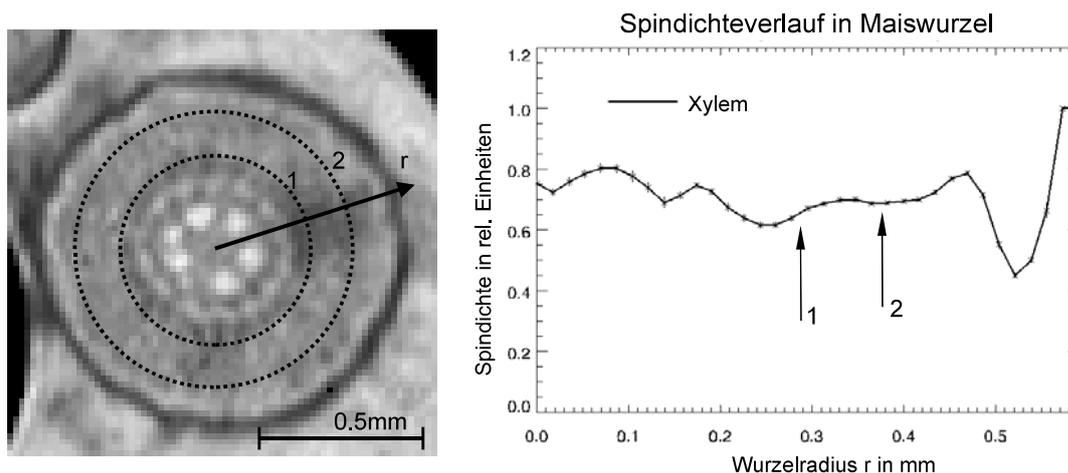


Abb. 28: Links: Ausschnitt aus einer Spindichtekarte mit Querschnitt durch eine 8 Tage alte Maiswurzel. Rechts: radiales (vgl. Pfeil links) Spindichteprofil; vom Wurzelmittelpunkt nach außen wurden die Spindichtewerte gleichen Radius' gemittelt (vgl. exemplarische gepunktete Kreise 1 und 2 links). Das Xylem wurde zuvor separat segmentiert.

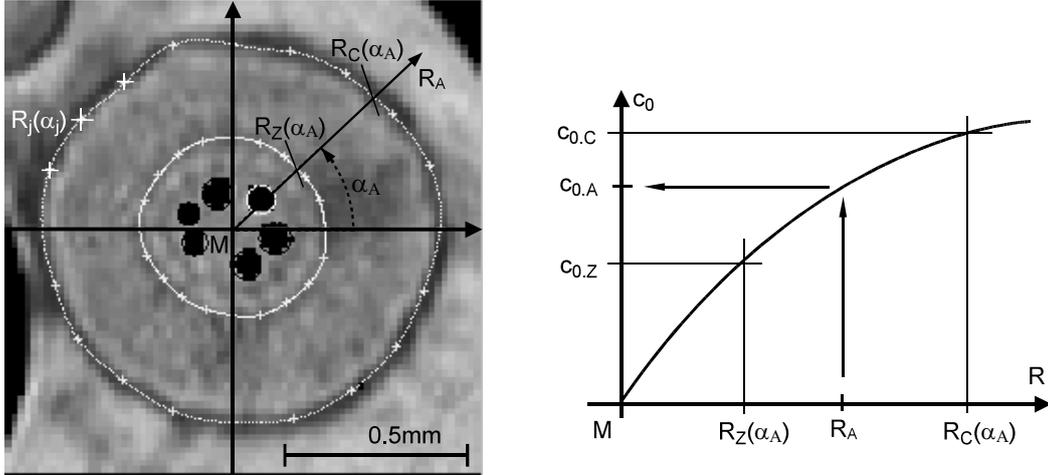


Abb. 29: Konturbestimmung. Links: Parameter für die mathematische Beschreibung zweier unregelmäßiger geschlossener Kurven. Rechts: Interpolation der Wertezuordnung zwischen den beiden benutzerdefinierten Kurven. Weitere Details im Text.

radialen Symmetrie abweichenden Strukturen (Xylemgefäße) untersucht werden. Zudem stand für die Aufnahme kompletter 2D-Karten (z.B. der NMR-Parameter  $T_1$  und Spindichte) ausreichend Signal und damit auch Zeit zur Verfügung. Daher wurden die radialen Verläufe aus diesen Karten bestimmt.

Reale Objekte besitzen selten eine ideal kreisrunde Struktur, was bei einer Mittelung entlang konzentrischer Kreise zu einer Verwischung der Gewebegrenzen führt, die zusätzlich zum Partial-Volume-Effekt auftritt. Deshalb wurde eine mathematische Methode entwickelt, um Mittelungen entlang von der Kreisform abweichender, aber geschlossener Pfade bilden zu können [KSHJ08].

Es wurde ein Benutzerinterface programmiert, das es ermöglicht, den Konturverlauf zweier markanter Gewebeschichten mit ausreichend vielen äquiangularen Punkten  $j$  als Stützstellen nachzuzeichnen sowie den Wurzelmittelpunkt zu markieren (siehe Abbildung (29) links). Als nachgezeichnete Konturen wurden bevorzugt der Übergang vom Medium zur Wurzel (im Folgenden mit Index 'C' für „Cortex“ bezeichnet) sowie der Übergang zwischen Cortex und Zentralzylinder (mit Index 'Z' für „Zentralzylinder“ bezeichnet) herangezogen. Für jede der beiden eingezeichneten Konturen wird ein mittlerer Radiuswert  $c_{0,C}$  und  $c_{0,Z}$  berechnet, dem alle Punkte auf dieser Kontur zugeordnet werden. Im Folgenden wird dargelegt, wie alle Bildpixel im Wurzelbereich je einer interpolierten „Konturlinie“ und deren mittleren Radius zugeordnet werden können.

In Polarkoordinaten wird jeder benutzerdefinierte Punkt  $j$  durch seinen Winkel  $\alpha_j$  und seinen Radius  $R_j$  bestimmt. Aus diesen  $R_j(\alpha_j)$  lässt sich eine Cos-Sin-Reihe berechnen, die als mathematisch-geometrische Beschreibung der so bestimmten Kontur dient.

$$R(\alpha) = \sum_k c_k \cos(\alpha \cdot k) + s_k \sin(\alpha \cdot k)$$

Die Koeffizienten der Reihenentwicklung erhält man als Real- ( $c_k$ ) und Imaginärteil ( $s_k$ ) der diskreten Fouriertransformierten der  $R_j(\alpha_j)$ . Das erste Element  $c_0$  der Cos-Reihe entspricht, als nullte Näherung der Konturlinie, dem mittleren („idealisierten“) Radius dieser Kontur. Die Bildpixel auf den beiden Konturlinien werden jeweils diesen „idealisierten Radien“  $c_{0,Z}$  und  $c_{0,C}$  zugeordnet. Für die Bildpixel  $A$ , die abseits der beiden vorgegebenen Konturen liegen, wird eine Zuordnung zu einem „idealisierten Radius“  $c_{0,A}$  durch Interpolation erreicht. Abhängig von der Winkelkoordinate  $\alpha_A$  eines Punktes sind durch den Wurzelmittelpunkt und die beiden Konturlinien drei Punkte für eine solche Interpolation vorgegeben. Daher wird die Zuordnung von  $R_A \rightarrow c_{0,A}$  durch ein Polynom zweiten Grades realisiert, das durch die drei Punkte  $M = (0, 0)$ ,  $(R_Z(\alpha_A), c_{0,Z})$  und  $(R_C(\alpha_A), c_{0,C})$  festgelegt wird (vgl. Abbildung (29) rechts).

Für jeden Kartenpunkt  $A$  wird abhängig vom Winkel  $\alpha_A$  dieses Polynom und damit aus dem zugehörigen  $R_A$  das  $c_{0,A}$  bestimmt. Schließlich wird der Mittelwert aller Punkte berechnet, die demselben „idealisierten Radius“  $c_{0,A}$  zugeordnet wurden.

Besser als mit einer „Mittlung entlang eines Pfades“ lässt sich dieses Verfahren als „Morphing“ der unregelmäßig konzentrischen Strukturen auf ideale Kreisform beschreiben.

In Abbildung (30) ist links die Konturkarte dargestellt, die für die hier gezeigte Wurzel aus den benutzerdefinierten Umrissen (vgl. Abbildung (29)) interpoliert wurde. Rechts zeigt sie das Ergebnis des so erhaltenen Spindichteprofiles im Vergleich mit dem Profil, das aus der einfacheren kreisförmigen Mittelung erhalten wurde (vgl. auch Abbildung (28)). Es ist deutlich zu erkennen, dass besonders

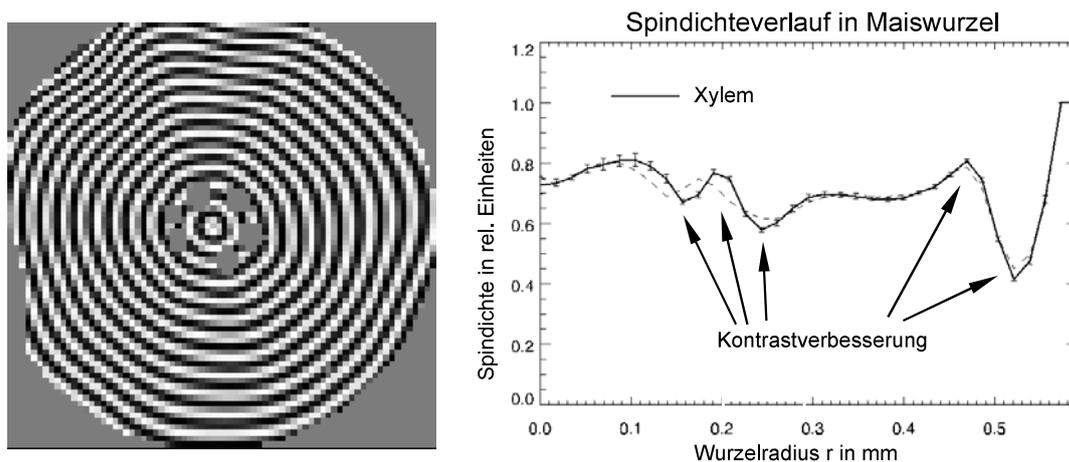


Abb. 30: Links: Interpolierte Konturkarte. Rechts: 'radiales' Spindichteprofil; vom Wurzelmittelpunkt nach außen wurden die Spindichtewerte der Punkte jeweils gleicher 'Konturlinien' gemittelt. Gestrichelt zum Vergleich das Profil der ideal kreisförmigen Mittelung aus Abbildung (28).

im Bereich des Vaskularrings und dem Übergang zum Cortex (linke drei Pfeile), der 'Parameterkontrast' zwischen den Geweberegionen deutlich verbessert werden konnte.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle im folgenden beschriebenen funktionellen Untersuchungen an Maiswurzeln auf diese Weise ausgewertet.

## 7 NMR-Relaxationsprozesse in Pflanzengewebe

Zur Untersuchung von Gewebeeigenschaften werden in der Pflanzen-NMR häufig die Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  betrachtet [VJK91, VARdJ<sup>+</sup>94, vdWCR<sup>+</sup>01, RCC00]. Neben der Xylem-Flussgeschwindigkeit wurden in dieser Arbeit ebenfalls diese Relaxationszeiten herangezogen, um funktionelle Änderungen in Pflanzenwurzeln zu quantifizieren.

Die gemessenen Werte von  $T_1$  und  $T_2$  hängen von verschiedenen Gewebeeigenschaften, besonders auf zellularer Ebene, ab. Zwar werden in der Literatur die beteiligten Mechanismen und Effekte oft im einzelnen angeführt, eine umfassende Zusammenstellung, besonders der anwendungsorientierten (mathematischen) Beschreibungen, ist jedoch kaum zu finden. Einzig für  $T_2$  gibt es eine gute Zusammenfassung der Arbeiten aus der Gruppe um van As in [VA07]. Um eine Grundlage für die Diskussion der Beobachtungen zu bieten, soll im vorliegenden Abschnitt ein derartiger Überblick gegeben werden. Es werden daher die Zusammenhänge zwischen physikalischen Vorgängen auf zellularer Ebene und den Relaxationszeiten anhand von Informationen aus der Literatur zusammengetragen und erörtert.

Ergänzt wird diese Zusammenstellung durch eigene Untersuchungen zum Verhalten von monoexponentiellen Fits bei der Beschreibung von Mehrkompartimentensystemen sowie durch Überlegungen zur Auswirkung der Durchmischung solcher Kompartimente bei Beschädigung trennender Membranen.

### 7.1 Relaxationsmechanismen auf molekularer Ebene

Die Spin-Gitter-Relaxation mit der Zeitkonstanten  $T_1$  wird in Flüssigkeiten durch schnell veränderliche lokale magnetische Felder verursacht (bewegte Dipole), die zu einem Energieübertrag und damit einer Änderung des Spinzustandes führen [HJW00].

Die Spin-Spin-Relaxation hat auf molekularer Ebene dieselbe Ursache, jedoch ist deren funktioneller Zusammenhang mit der Zeitkonstanten  $T_2$  ein anderer, da hier kein Energieübertrag stattfindet, sondern die Phasenkoheränz der angeregten Spins zerstört wird. Für das gemessene, in der NMR effektive  $T_2$  kommt eine Reihe weiterer Mechanismen hinzu, die später erörtert werden.

Die (komplexe) Fouriertransformierte der zeitlichen Änderung lokaler Felder wird „spektrale Dichte“  $Sp(\omega)$  genannt. Üblicherweise wird als Modell für lokale Feldfluktuationen die Rotationsdiffusion herangezogen [Can96], somit ein rein thermisch begründeter Prozess. Mit der Korrelationszeit  $\tau_c$ , anschaulich in etwa die Zeit, in der ein Dipol aufgrund der thermischen Eigenbewegung eine halbe Rotation ausführt, und  $B$  als Mittel der quadratischen Feldstärke der Dipole am

betrachteten Ort lässt sich der Realteil von  $Sp(\omega)$  darstellen als

$$Sp(\omega) = B \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

Die Larmorfrequenz  $\omega_0$  eines Spinsystems ist gleichbedeutend mit dem Energieunterschied der beiden Spinzustände der Protonen im Magnetfeld  $\Delta E = \hbar \gamma_p B_0 = \hbar \omega_0$  (siehe auch 2.1). Wie stark die Wechselwirkung zwischen Spinsystem und Umgebung ist, hängt von der angeführten Amplitude von  $Sp(\omega)$  für  $\omega_0$  ab.

Aus dieser Betrachtung lassen sich einige Faktoren nennen, von denen die beobachtete Relaxationszeit abhängt:

- von der Feldstärke, da diese  $\omega_0$  bestimmt
- von der Temperatur, die die statistische Rotation von Einzelteilchen maßgeblich bestimmt
- von der Viskosität des Mediums, die ebenfalls einen Einfluss auf  $\tau_c$  hat
- von der Anzahldichte und der Feldstärke vorhandener Dipole.

Mit die wichtigste Dipolwechselwirkung erfahren Kernspins mit gleichartigen Kernspins, was zur Spin-Spin-Relaxation führt und Grundlage der  $T_2$ -Relaxation ist.

Daneben kann es sich bei den wechselwirkenden Dipolen besonders um paramagnetische Moleküle bzw. Ionen handeln, die frei oder in Komplexen gebunden in der Lösung vorliegen ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , Gd-DTPA, etc.). Besonders gelöster Sauerstoff kann hieran einen nicht unerheblichen Anteil haben [Can96], der sich zudem mit verschiedenen chemischen Zuständen des Sauerstoffes ändert [MPR<sup>+</sup>92].

Des Weiteren spielen auch andere dipolare Interaktionen eine Rolle, wie mit den Kernspins anderer Elemente oder zwischen Kern- und Elektronenspins.

Die leichte Abschirmung der Kernspins vor dem  $B_0$  Feld durch die Elektronenhüllen der Moleküle, die von der chemischen Nachbarschaft des Kernes abhängt (die sog. „chemische Verschiebung“), beinhaltet eine Anisotropie, die ebenfalls eine Relaxation bewirkt.

Diese und weitere Mechanismen sind z.B. in [Can96] ausführlich dargestellt, zusammen mit der mathematischen Formulierung ihrer jeweiligen spektralen Dichten und Auswirkungen auf  $T_1$  und  $T_2$ . Dort wird auch gezeigt, dass sich die spektralen Dichten verschiedener, gleichzeitig an einem Spinsystem wirkender relaxiver Prozesse (Index  $i$ ) linear kombinieren lassen und sich die Relaxivitäten  $R_{1/2,i} = 1/T_{1/2,i}$  somit addieren:

$$\frac{1}{T_{1,ges.}} = \frac{1}{T_{1.1}} + \frac{1}{T_{1.2}} + \frac{1}{T_{1.3}} + \dots \quad \frac{1}{T_{2,ges.}} = \frac{1}{T_{2.1}} + \frac{1}{T_{2.2}} + \frac{1}{T_{2.3}} + \dots$$

Wirken mehrere relaxive Prozesse nicht auf ein vollständiges System, sondern jeweils nur auf einen gewissen Anteil  $a_i$  der Spins, addieren sich die Relaxivitäten

anteilmäßig:

$$\frac{1}{T_{ges.}} = \sum_i \frac{a_i}{T_i} \quad \text{bzw.} \quad R_{ges.} = \sum_i a_i R_i \quad (10)$$

Voraussetzung dafür ist, dass der Austausch der Spins zwischen den verschiedenen Relaxationsprozessen (bzw. besser: deren Einflussbereichen) sehr viel schneller ist als die einzelnen Relaxationsprozesse (für T<sub>1</sub> siehe z.B. [FPD82, BAK84]).

### 7.1.1 Paramagneten und Relaxationszeiten

Für die erwähnte Abhängigkeit des T<sub>1</sub> von der Viskosität  $\eta$  einer Lösung, die eine vorgegebene Konzentration  $N_{ion}$  paramagnetischer Ionen enthält, findet sich in der Literatur der funktionelle Zusammenhang [BR84, And58]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{K_{ion}\eta N_{ion}}{T}$$

T ist die absolute Temperatur und  $K_{ion}$  eine Konstante, die die dipolaren Eigenschaften der betrachteten Paramagneten beschreibt. Man kann ablesen, dass die T<sub>1</sub>-Relaxationszeit kürzer wird, wenn die Viskosität zunimmt.

Für ein Medium, das Paramagneten enthält, kann man die gemessene Relaxationszeit  $T_{1.obs.}$  nach Gleichung (10) aus den beiden Populationen „frei relaxierendes Wasser“, mit  $T_{1.intr.}$ , und „an Paramagneten schnell relaxierendes Wasser“ zusammensetzen. Mit der Konzentration  $c_{Paramagn.}$  kann dies dann geschrieben werden als

$$\frac{1}{T_{1.obs.}} = \frac{1}{T_{1.intr.}} + R \cdot c_{Paramagn.} \quad (11)$$

[Pri94]. Das konzentrationsbezogene R wird als Relaxivität der paramagnetischen Substanz, also des „Kontrastmittels“ bezeichnet. Es handelt sich um eine Konzentration-bezogene Materialkonstante und darf nicht mit den ebenfalls allgemein als Relaxivitäten bezeichneten reziproken Relaxationszeiten  $R_x=1/T_x$  verwechselt werden!

Gelöster Sauerstoff kann neben seiner Wirkung als Paramagnet auch indirekt auf die Relaxationszeiten wirken. Gelöste Ionen gehen, je nach O<sub>2</sub>-Konzentration im Lösungsmittel, verschieden gut Komplexbindungen ein, wodurch sich deren paramagnetische Eigenschaften ändern [MPR<sup>+</sup>92].

## 7.2 Weitere T<sub>2</sub>-Relaxations-Mechanismen

In ein gemessenes T<sub>2</sub> gehen alle Prozesse ein, die für eine statistische Dephasierung der angeregten Magnetisierung sorgen, also die Phasenkohärenz zerstören, indem „Einzelspins“ irreversible Phasen aufgeprägt werden.

### 7.2.1 Chemischer Austausch und $T_2$ -Relaxation

Schneller Austausch von Protonen<sup>10</sup> zwischen verschiedenen chemischen Umgebungen bewirkt eine statistische Variation der Resonanzfrequenz entsprechend der jeweiligen chemischen Verschiebung.

Dieser Effekt tritt besonders dort auf, wo die Protonen des Wassers mit den Hydroxylgruppen-Protonen von Zuckern, Stärke, Aminosäuren o.ä. austauschen können, bei Pflanzenzellen also verstärkt im Bereich der Zellwand. In Proteinlösungen und Gelen [HD90], ebenso wie in Pflanzenzellen [CDM98], ist es dieser Mechanismus, der  $T_2$  am stärksten bestimmt.

Neben der  $B_0$ -Feldstärke, mit der die chemische Verschiebung skaliert, ist er auch vom pH-Wert abhängig, der die Protonenaustauschrate beeinflusst [CDM98, KRSD05].

Bei Messung von  $T_2$  mittels einer CPMG-Sequenz (Abschnitt 2.4.3) ist der Beitrag  $R_{2,chem.ex.}$  des chemischen Austausches<sup>11</sup> an der Gesamtrelaxivität  $R_2$  von der verwendeten Interechozeit  $T_{i.E}$  abhängig, solange die Protonenaustauschzeit nicht sehr kurz ist gegenüber  $T_{i.E}$  [HD90]. Bei der Variation der Echozeit von 0.1ms auf 10ms finden letztgenannte einen Anstieg von  $R_2$  etwa um den Faktor 5 aufgrund dieses Effektes. Das korrespondiert mit ermittelten Protonenaustauschraten von 1000 bis 2000 pro Sekunde und Proton (siehe z.B. [KRSD05] für Aminosäuren). Verwendet man eine einfache Spinechosequenz mit variierender Echozeit, ergibt sich somit ein nicht mehr einfach exponentieller Zusammenhang zwischen Echozeit und Signalstärke als  $T_2$ -Abfall.

### 7.2.2 Diffusion und $T_2$ -Relaxation

Lokale Magnetfeldgradienten, wie sie an Übergängen zwischen Probenbereichen mit unterschiedlicher Suszeptibilität entstehen, sorgen für eine ortsabhängige Zusatzphase. In biologischen Objekten entzieht die unbestimmbare Geometrie solcher mikroskopischer Gradienten einer analytischen Betrachtung der Diffusion in diesen Gradienten die Grundlage. Die irreversible Dephasierung hierdurch wird somit i.d.R. als  $T_2$ -Effekt betrachtet [VARdJ+94].

Der starke Suszeptibilitätsunterschied zwischen Luft und Wasser bzw. Zellen bewirkt besonders in Pflanzengewebe mit vielen Luftporen einen starken  $T_2$ -Abfall. Von [CLL+87] wurden Maiswurzelsegmente mit Wasser Vakuum-infiltriert und dabei ein Signalanstieg beobachtet, der weit über der Spindichtezunahme durch das Auffüllen des Aerenchyms (mit 5-10 Vol.%) lag. Da die verwendete Sequenz eine starke  $T_2$ -Gewichtung enthielt, wurde dies von den Autoren als Verlängerung der  $T_2$ -Relaxationszeit, aufgrund des Wegfalls der mikroskopischen

<sup>10</sup>Auch wenn viele der in diesem Kapitel angeführten Aussagen allgemein auf NMR-sensitive Kerne bezogen werden können, soll die Betrachtung weiterhin ausschließlich Wasserstoffkerne betreffen.

<sup>11</sup>chemischer Austausch – engl. „chemical exchange“ als Index für die Relaxivität

Gradienten, interpretiert.

Auch dieser Beitrag zur Gesamtreloxivität  $R_2$  ist nicht unabhängig von den Experimentgrößen und proportional zu

$$R_{2.Dif.susz} \sim \langle G^2 \rangle T_{i.E}^2 D$$

[EVDVA98]. Die Interechozeit einer CPMG-Sequenz geht hier quadratisch ein ebenso wie das quadratische Mittel der lokalen Feldgradienten  $G$ , die wiederum direkt proportional zur  $B_0$ -Feldstärke sind.  $D$  bezeichnet die Diffusionskonstante.

Dieselbe Wirkung wie die probeninhärenten Suszeptibilitätsunterschiede haben die Gradienten eines Bildgebungsexperimentes in Zusammenwirkung mit der Diffusion, wie bereits in 5.4 erwähnt.

Im Zusammenhang mit den Gradienten für die Messung der Flussgeschwindigkeit wurde in Gleichung (9) der Diffusionsabschwächungsterm (Exponentialterm) aus [ST65] eingeführt. Vergleicht man die Flussgradienten aus Abbildung (27) mit den Lesegradienten in einem Multiechozug, wie hier in Abbildung (31)

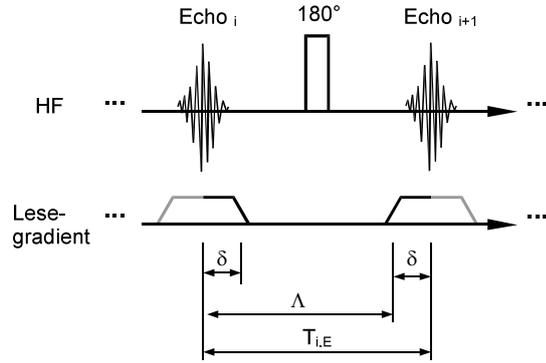


Abb. 31: Einzelne Interechozeit aus einer Multiechosequenz. Relevante Größen der Diffusionsabschwächung.

dargestellt, finden sich folgende Entsprechungen für die Diffusions-relevanten Zeiten:  $\delta =$  halbe Lesegradientendauer,  $\Lambda = T_{i.E} - \delta$ . Die Stärke des Lesegradienten  $\dot{G}_R$  kann man mit Hilfe der Auflösung  $\Delta x$  und der Akquisitionsdauer  $AQ$  auch schreiben als  $\dot{G}_R = (AQ \cdot \Delta x)^{-1}$ . Mit dem Term  $\exp(-T_{i.E}/T_{2.Dif.grad})$  kann man außerdem die Diffusionsabschwächung während einer Echozeit im Sinne einer Relaxation ausdrücken. Vergleicht man diesen Term mit dem Diffusionsterm, in dem die oben beschriebenen Größen ersetzt wurden, erhält man einen Ausdruck, der die Relaxivität bzw. die Relaxationszeit für die Diffusionsabschwächung angibt:

$$R_{2.Dif.grad} = \frac{1}{T_{2.Dif.grad}} = \frac{4\pi^2 \delta^2 D}{AQ^2 (\Delta x)^2 T_{i.E}} \left( T_{i.E} - \frac{4}{3}\delta \right)$$

Ausführlicher ist dies in [EVDVA98] erörtert. Phasengradienten tragen vernachlässigbar zu dieser Abschwächung bei, da sie für die signalbestimmende k-Raum-Mitte minimal sind. Weitere Gradienten, z.B. Spoiler, können als weitere zur Abschwächung zu multiplizierende und somit bei der Relaxivität zu addierende Komponenten berücksichtigt werden.

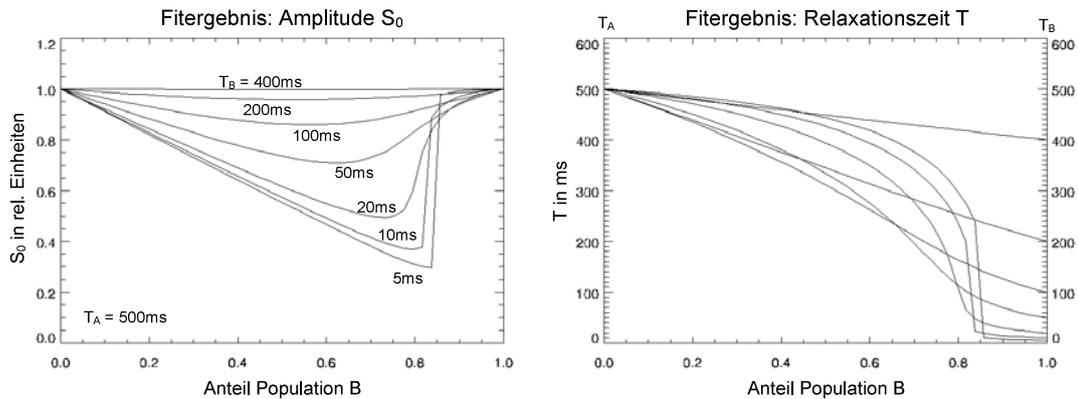


Abb. 32: Ergebnisse (links - Amplitude  $S_0$ , rechts - Relaxationszeit  $T$ ) des Fits der monoexponentiellen Relaxationsfunktion aus Gleichung (8) über theoretische Datenpunkte des biexponentiellen Abfalls aus Gleichung (12) eines Systems, das aus zwei Populationen besteht. Gezeigt ist, wie sich das Fitergebnis verändert abhängig vom Anteil der beiden Populationen am Gesamtsystem (wobei  $A=1-B$ ), für  $T_A=500\text{ms}$  und verschiedene Werte von  $T_B$ .

Nach den in 7.1 vorgestellten Mechanismen sollten  $T_1$  und  $T_2$  in derselben Größenordnung liegen und in reinem, freiem Wasser sogar als identisch angenommen werden können [SVA92]. Festzustellen bleibt, dass chemischer Austausch und Diffusionsabschwächung maßgeblich dafür verantwortlich sind, dass sich gemessene  $T_2$ -Werte häufig um mehrere Größenordnungen von den  $T_1$ -Werten derselben Probe unterscheiden. Bei der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten  $B_0$ -Feldstärke von  $11.7T$  liegt  $T_1$  im Pflanzengewebe z.B. in der Größenordnung von von  $1\text{s}$  und  $T_2$  im Bereich  $20\text{ms} - 200\text{ms}$ .

## 7.3 Relaxationszeiten und Kompartimentation

In Abschnitt 3.1 wurden Pflanzenzellen vorgestellt und festgestellt, dass sich pflanzliches Gewebe in drei Hauptkompartimente gliedert: Die extrazelluläre Flüssigkeit, das Zytoplasma und die Vakuole. Zellwand und Plasmalemma trennen dabei den Apoplasten vom Zellinneren und darin die Tonoplastenmembran das Zytoplasma von der Vakuole (siehe auch Abbildung (3) auf Seite 17).

### 7.3.1 Multiexponentielle Relaxation

Je nach Volumen und Wassergehalt tragen diese drei Kompartimente verschiedene Anteile zum mittleren NMR-Signal bei. Aufgrund ihrer jeweiligen Zusammensetzung besitzen sie unterschiedliche Relaxationszeiten, die man mit Hilfe multiexponentieller Fits bestimmen kann [SVA92], wenn ausreichend Signal und Stützstellen unter dem Relaxationsverlauf zur Verfügung stehen. Letztere Autoren finden in Apfelgewebe beispielsweise:  $T_2=1020\text{ms}$  in der Vakuole mit  $75.2\%$ ,

$T_2=190\text{ms}$  im Zytoplasma mit 16.4% und  $T_2=30\text{ms}$  im extrazellulären Medium mit 8.4% Signalanteil. Diese Anteile variieren zwischen verschiedenen Pflanzen- und Gewebearten. Häufig wird jedoch nur ein bi-exponentieller Abfall

$$S(t) = A \cdot e^{-t/T_A} + B \cdot e^{-t/T_B} \quad (12)$$

betrachtet und die Indizes A und B entweder zugehörig zu den Kompartimenten Vakuole und Zytoplasma ([BR84] in Wurzelsegmenten und [ZJ96] in isolierten Protoplasten) oder Vakuole und extrazelluläres Medium [HD90, SSBC78] interpretiert.

Grundsätzlich stellt die Vakuole den größten Volumenanteil und damit den dominierenden Einfluss auf eine gemessene Relaxationszeit dar.

Will man für zeitaufgelöste Untersuchungen die Messdauer kurz halten, wird man entweder auf räumliche Auflösung oder auf ausreichend Stützstellen bei der Abtastung der Relaxationskurven verzichten müssen. Somit werden auch in dieser Arbeit nur Relaxationsparameterkarten gezeigt, die aus einem mono-exponentiellen Fit resultieren. Daher wurde anhand von theoretischen Werten untersucht, welche Ergebnisse ein mono-exponentieller Fit über biexponentielle Daten liefert und welche Aussagen sich aus diesen Ergebnissen ableiten lassen.

Für ein System aus zwei Populationen A und B wurden mit Gleichung (12) für verschiedene Relaxationszeiten theoretische Datenpunkte erzeugt. Über diese Datenpunkte wurde mit einem „least-squares“-Fit<sup>12</sup>, wie er von der verwendeten Datenverarbeitungssprache IDL zur Verfügung gestellt wird, die monoexponentielle Funktion Gleichung (8) gefittet. Die Startwerte waren  $S_0=1$  für die Amplitude und  $T=A \cdot T_A + B \cdot T_B$  für die Relaxationszeit. In Abbildung (32) sind die resultierenden Fitparameter in Abhängigkeit vom Populationsanteil B am Gesamtsystem dargestellt. Es zeigt sich, dass man eine Relaxationszeit T erhält, die deutlich stärker vom längeren Wert  $T_A$  beeinflusst wird (vgl. auch [MW89]).

Da die Vakuolen der Pflanzenzellen nicht nur das größte Wasservolumen, sondern nach allen genannten Literaturquellen auch die deutlich längsten Relaxationszeiten (sowohl  $T_2$  als auch  $T_1$ ) innerhalb jedes Pflanzengewebes aufweisen, kann man davon ausgehen, dass diese Modellrechnung hier zutrifft. Man kann also davon ausgehen, dass man mit einer mono-exponentiellen Modellfunktion stets die Relaxationszeiten der Vakuole bestimmt. Abbildung (32) zeigt, dass man ab einem A von 80% das  $T=T_A$  um maximal 15% unterschätzt und auch zwischen 60% und 80% besonders bei großen Unterschieden zu  $T_B$  kaum mehr als 20% Abweichung nach unten in Kauf nehmen muss.

Daneben bleibt festzustellen, dass abhängig von den Membranpermeabilitäten der Austausch zwischen den Kompartimenten für eine Durchmischung sorgt, wodurch sich die gemessenen Relaxationszeiten ebenfalls beeinflussen. Für ho-

<sup>12</sup> „least-squares“ – Es werden, z.B. durch ein Gradientenabstiegsverfahren, die Parameter einer Modellfunktion gesucht, für die sich die kleinste Summe der quadratischen Abweichungen zwischen Funktion und Datenpunkten findet.

he Membranpermeabilitäten wird die biexponentielle Relaxation somit in eine monoexponentielle übergehen [vdWMV<sup>+</sup>02].

### 7.3.2 Kompartimentgröße

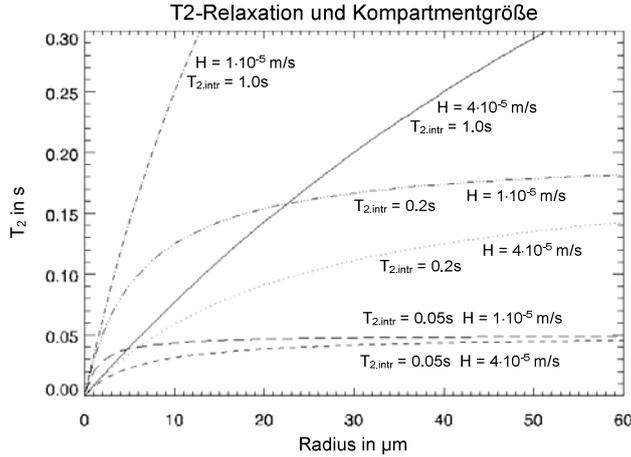


Abb. 33:  $T_2$ -Relaxationszeiten abhängig vom Zellradius, für verschiedene intrinsische  $T_2$  und Werte von  $H$  (Relaxationswirkung der Kompartimentbegrenzung).

partimentbegrenzung (oder Umgebung) beschreibt. In der Literatur [BT79] wird  $H$  als „surface sink strength density“ bezeichnet. Abhängig von der Größe eines Kompartiments ergibt sich die gemessene Relaxationszeit (bzw. die Relaxivität) als

$$R_{obs.} = \frac{1}{T_{obs.}} = \frac{1}{T_{intr.}} + H \left( \frac{1}{r_x} + \frac{1}{r_y} + \frac{1}{r_z} \right) \quad (13)$$

[vdWCR<sup>+</sup>01]. Die  $r_i$  sind die Radien in die drei Raumrichtungen, und  $T_{intr.}$  ist die intrinsische Relaxationszeit des Mediums im Kompartiment.

In [vdWCR<sup>+</sup>01] wurde  $H$  für das  $T_2$  von Stängelzellen von Mais ( $H=2.8 \cdot 10^{-5} \pm 0.52 \cdot 10^{-5}$  m/s) und Hirse ( $H=4.0 \cdot 10^{-5} \pm 0.44 \cdot 10^{-5}$  m/s) bestimmt.  $H$  ist ausschließlich linear von der Membranpermeabilität abhängig [VA07]. An der Membran findet keine Relaxation statt, sondern im Zytoplasma bzw. Interzellularraum relaxierte Magnetisierung diffundiert in die Vakuole hinein. Detaillierter wird dieser Mechanismus im folgenden Abschnitt betrachtet werden.

Abbildung (33) zeigt die Abhängigkeit der  $T_2$ -Relaxationszeit vom Radius kugelförmiger Zellen für verschiedene Parameter dieser Größenordnung.

Die vorgestellte Korrelation zwischen der Relaxationszeit und den Zellgrößen innerhalb einer Gewebeart wurde ebenfalls für  $T_1$  festgestellt [RCC00, WRF90].

Innerhalb der Vakuole liegen relativ wenige gelöste Substanzen vor, die die Relaxationszeiten gegenüber denen des reinen Wassers deutlich reduzieren könnten. Am stärksten machen sich daher die Bestandteile der Tonoplastenmembran bemerkbar sowie die Relaxation außerhalb der Vakuole in Kombination mit der Diffusion der relaxierten Magnetisierung in die Vakuole hinein. Alle daran beteiligten Prozesse kann man in einer Konstanten  $H$  zusammenfassen, die somit die relative Wirkung der Kom-

### 7.3.3 Austauschzeiten und Permeabilität

Wie zuvor angedeutet, ist der Einfluss der Vakuolenumgebung auf die Relaxationszeiten statt als Relaxation an deren Oberfläche genauer als Relaxation in den umgebenden Kompartimenten zu betrachten, die (relaxierte) Magnetisierung mit der Vakuole austauschen [SSBC78]. Es ergibt sich dabei derselbe Zusammenhang wie beim Austausch zwischen zwei durchmischten Populationen, wie z.B. den Hydrathüllen paramagnetischer Ionen und dem freien Lösungsmittel. Abhängig vom Mengenverhältnis zweier Populationen  $A/B$  und deren Relaxationszeiten  $T_{A.intr.}$  und  $T_{B.intr.}$  sowie der Verweildauer  $\tau_B$  in  $B$ , die der Austauschzeit mit  $A$  entspricht, ergibt sich [LM64, Gad95]

$$\frac{1}{T_{A.obs.}} = \frac{1}{T_{A.intr.}} + \frac{B}{A(\tau_B + T_{B.intr.})} \quad (14)$$

Dabei ist  $B$  ( $\ll A$ ) die deutlich kleinere Population,  $A$  also im Falle des Pflanzengewebes die Vakuole. Für sehr kurze Austauschzeiten  $\tau$  vereinfacht sich dieser Zusammenhang direkt zu Gleichung (10). Ansonsten gilt für die Verweildauer zweier Populationen:  $\tau_A/\tau_b = A/B$ . Damit kann Gleichung (14) auch umgeformt werden, wie sie in [SSBC78] angeführt wird:

$$\frac{1}{T_{A.obs.}} = \frac{1}{T_{A.intr.}} + \frac{1}{\tau_A} - \frac{1}{\tau_A \tau_B (1/\tau_B + 1/T_{B.intr.})}$$

Der funktionelle Zusammenhang ist im oberen Graphen von Abbildung (34) für verschiedene Relaxationszeiten und Populationsverhältnisse dargestellt, in Abhängigkeit von  $\tau_A$ .

Für sehr kurzes  $T_{B.intr.}$  kann der letzte (sog. „backflux“) Term auch vernachlässigt werden, der eine Korrektur für die Anteile darstellt, die unrelaxiert von  $B$  nach  $A$  zurückgelangen. Damit ergibt sich die einfachere Beziehung

$$\frac{1}{T_{A.obs.}} = \frac{1}{T_{A.intr.}} + \frac{1}{\tau_A} \quad (15)$$

die häufig in Zusammenhang mit starken Kontrastmitteln verwendet wird, die ins Zellaußenmedium appliziert werden. Diese Vereinfachung ist oben in Abbildung (34) zum Vergleich als dickerer, grau-gestrichelter Funktionsverlauf gezeigt.  $T_{A.intr.}$  ist gegenüber  $\tau$  und damit auch gegenüber  $T_{A.obs.}$  i.d.R. sehr groß, so dass ein ungenauer Wert für das intrinsische  $T_A$  nur einen geringen Fehler bei der Bestimmung der Austauschzeit bewirkt. Damit erscheint eine Schätzung des Wertes von  $T_{A.intr.}$  durchaus legitim, wie er z.B. in [SVA92] gleich dem Wert für freies Wasser angesetzt wird. Solange kein kurzes  $T_{B.intr.}$  vorliegt, also insbesondere vor der Zugabe eines Kontrastmittels, kann auch das gemessene  $T_{A.obs.}$  als  $T_{A.intr.}$  herangezogen werden [BR84] oder durch gezieltes Einstellen verschiedener  $T_{B.intr.}$  ein  $T_{A.intr.}$  aus Gleichung (14) ermittelt werden [ZJ96].

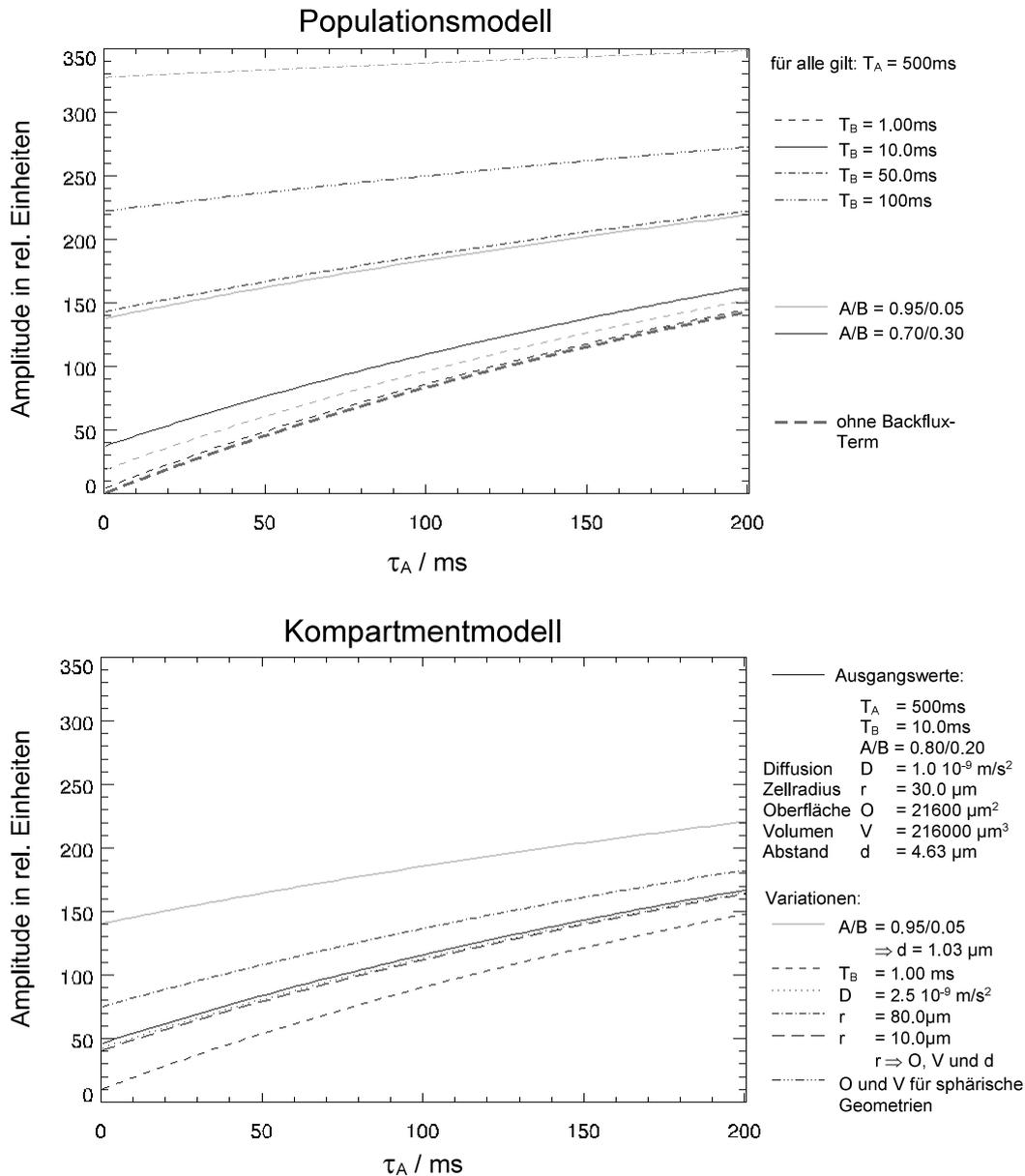


Abb. 34: Abhängigkeit der gemessenen Relaxationzeit  $T_A$  in Kompartiment A von der Austauschzeit  $\tau_A$  mit einem kleinen Kompartiment B, in dem eine schnelle Relaxation mit  $T_B$  stattfindet.  $A/B$  bezeichnet deren Volumenverhältnis. Oben: nach Gleichung (14), dem Modell aus [LM64, Gad95, SSBC78], das allgemein für den Protonenaustausch zwischen zwei „Populationen“ unterschiedlicher Relaxivität gilt. Unten: nach Gleichung (16) dem in [ZJ96] verwendeten Modell für Zellen, das gut mit ersterem übereinstimmt und, wie zu erkennen, auch nur geringe Abhängigkeit von den Geometrieparametern zeigt. Vgl. die durchgezogenen Linien beider Grafen sowie die schwarze, einfach-kurz gestrichelte. Der Funktionsverlauf für sphärische Geometrie ist deckungsgleich mit dem Verlauf für die Ausgangswerte und deshalb nicht zu erkennen.

In der Pflanzen-NMR wird häufig  $Mn^{2+}$  verwendet, um  $T_{B.intr.}$  so weit zu reduzieren, dass über die Beziehung aus Gleichung (15) die Austauschzeit ermittelt werden kann. Aus dieser wiederum kann die Permeabilität der Zellmembranen, üblicherweise interpretiert als die der Tonoplastenmembran, bestimmt werden mittels

$$P_d = \frac{V}{A \tau_A}$$

[SVA92, ZJ96, BR84]. Dabei sind  $A$  und  $V$  die Oberfläche und das Volumen der Zelle respektive der Vakuole. Für die Bestimmung von  $P_d$  kann nach diesen Gleichungen sowohl  $T_1$  [BR84] als auch  $T_2$  [SVA92] herangezogen werden. Auf Basis von  $T_1$  ergeben sich für Pflanzenzellen Werte, die um einen Faktor 2 bis 3 niedriger liegen als die Permeabilität, die man aus der hydraulischen Leitfähigkeit berechnet, die mit Hilfe einer Druckmesssonde bestimmt wurde; auf  $T_2$  basierende Werte liegen dagegen meist um einen Faktor 4 bis zu mehr als einer Größenordnung höher [ZJ96, SZ82].

Man sieht, dass sich umgekehrt auch die Relaxationszeiten mit der Permeabilität ändern können, die von verschiedensten biologischen und biochemischen Ursachen abhängen kann. Nach [VKG00] kann z.B. auch eine Umstrukturierung des Zytoskelettes zu einer Änderung der Permeabilität der Plasmamembran und damit Verkürzung der Relaxationszeiten in der Zelle führen.

In eine detailliertere Betrachtung der Relaxation in und des Austausches zwischen zwei Kompartimenten müssen auch deren Abmessungen und damit die Diffusion einbezogen werden. Ein solches Modell ist z.B. in [BR85, ZJ96] vorgestellt. Der Zusammenhang zwischen gemessener Relaxation und Austauschzeit  $\tau_A$  lässt sich dann folgendermaßen darstellen:

$$\frac{1}{T_{A.obs.}} = \frac{1}{T_{A.intr.}} + \frac{O_A f}{V_A \sqrt{T_{B.intr.}/D} + \tau_A O_A f} \quad (16)$$

$$\text{mit } f = \frac{e^{d/\sqrt{DT_{B.intr.}}} - 1}{e^{d/\sqrt{DT_{B.intr.}}} + 1}$$

Hierbei bezeichnet zusätzlich

- $D$  – die Diffusionskonstante im Kompartiment A
- $V_A$  – das Volumen von Kompartiment A
- $O_A$  – die Oberfläche von Kompartiment A
- $d$  – den Abstand benachbarter Kompartimente A, also in etwa die Breite von B.

Der Funktionsverlauf ist für verschiedenen Parameter in der unteren Grafik von Abbildung (34) dargestellt. Für einen Vergleich mit Gleichung (14) wurden  $V_A$ ,  $O_A$  und  $d$  in Abhängigkeit vom Volumenverhältnis  $A/B$  und einem „Zellradius“  $r$  bestimmt, für kubische Geometrie, so dass  $V_A = 8r^3$ ,  $O_A = 24r^2$  und

$d = r(\sqrt[3]{B/A + 1} - 1)$  angenommen wurde. Für andere Geometrien bleibt die Abhängigkeit dieser Größen untereinander bestehen, lediglich die Vorfaktoren ändern sich, was für sphärische Volumen und Oberflächen aber zu keiner Änderung des Funktionsverlaufes führt, der in Abbildung (34) deckungsgleich mit dem Verlauf für die Ausgangswerte ist. Es lässt sich außerdem gut feststellen, dass diese Beschreibung für kleine Kompartimente in den Verlauf des Populationsmodells übergeht.

Verringert sich die Menge des freien Wassers (Population A), während die Mengen der relaxiv wirkenden Komponenten (gelöste Substanzen, Zellwand, Membranen, Zytoskelett) und des daran relaxierenden Wassers (Population B) konstant bleiben, führt auch dies zu einer Verkürzung der Relaxationszeiten [VKG00]. Dabei gelten die Zusammenhänge nach Gleichung (14) und Gleichung (16), solange ein schneller Austausch zwischen den Populationen bzw. Kompartimenten stattfindet. Ist dies nicht der Fall, zeigt die Relaxation einen biexponentiellen Verlauf mit abnehmendem Anteil der längeren Komponente A. Hierbei entsteht bei gemittelter Betrachtung mittels eines monoexponentiellen Fits (aus Gründen wie in 7.3.1 erörtert) ein Abfall der Relaxationszeiten, der gering bleibt, solange A groß ist gegenüber B, für kleine A aber sprunghaft zunimmt.

Der bedeutende Unterschied zwischen  $T_1$  und  $T_2$  für die betrachteten Austauschprozesse liegt darin, dass diese Relaxationszeiten in Pflanzen um bis zu zwei Größenordnungen voneinander abweichen können. Damit unterscheidet sich die Wirkung der Austauschzeit zwischen zwei Kompartimenten auf die gemessenen Relaxationszeiten erheblich [ZJ96, BR85]. Typische Austauschzeiten liegen mit 10ms bis 50ms, in Einzelfällen bis zu 150ms, in der Größenordnung von  $T_2$  und sind deutlich verschieden von  $T_1$ . Betrachtet man Gleichung (15), wird klar, dass der Einfluss der Austauschzeit auf die längeren  $T_1$ -Zeiten stärker ist als auf  $T_2$ , wenn benachbarte Kompartimente mit sehr kurzen Relaxationszeiten vorliegen.

Im Hinblick auf die Interpretation später gezeigter Messdaten, soll abschließend der Fall durchgespielt werden, dass sich durch eine Beschädigung des Tonoplasten Vakuole A und Zytoplasma B durchmischen.

Für eine intakte Zelle setzt sich die Relaxationszeit der beiden Kompartimente A und B nach Gleichung (10) zusammen aus einem Anteil  $(1 - c_{A/B})$  freien Wassers mit  $T_{intr.} = 2.0s$  und einem Anteil  $c_{A/B}$  in verschiedenen Hydrathüllen gebundenen Wassers mit  $T_{hydr.} = 1.0ms$ . Für  $c_A = 5 \cdot 10^{-4}$  ergibt sich als effektive Relaxationszeit  $T_A = 1.0s$  in der Vakuole und für  $c_B = 10^{-1}$  ergibt sich  $T_B = 10ms$  im Zytoplasma. Nach einer Durchmischung beider Volumina mit Anteilen  $A/B = 90\%/10\%$  zu einem Volumen  $M = A + B$  findet sich eine Konzentration der Hydrathüllenpopulation mit  $c_M = 10^{-2}$ , und damit wird  $T_M = 92ms$ . Man sieht, dass ein sehr kleiner Volumenanteil der ursprünglichen Probe, der bei einer globalen Messung die Relaxationszeit kaum beeinflusst (vgl. Abbildung (32)), nach einer solchen

Durchmischung die Relaxationszeit erheblich verändern kann. Selbst für eine sehr kurze Austauschzeit von 10ms zwischen Zytoplasma und intakter Vakuole ergäbe sich nach Gleichung (14) immer noch eine beobachtete Relaxationszeit von 160ms für die kompletten Zellen – fast das Doppelte der eben berechneten Mischrelaxationszeit.

## 7.4 Relaxation und Wassergehalt

Häufig findet sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Spindichte und den Relaxationszeiten, so z.B. in [JBK87] für  $T_1$ . Hier wurden die höchsten jeweiligen Werte in den kleinen Zellen der Leitgefäße und Epidermis von Geranien gefunden, die kleinsten Werte im großzelligen Markparenchym. Daran sieht man auch, dass der Zellgrößen-Relaxationszeiten-Zusammenhang nicht über verschiedene Zell- bzw. Gewebetypen hinweg betrachtet werden kann. Der unterschiedliche Aufbau der Zellen und die verschiedenen Zusammensetzungen der Zellflüssigkeiten dominieren diesen Effekt. Ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen  $T_1$  und Spindichte wurde auch in [VJK91] während der Änderung beider Parameter in Trockenstressexperimenten an Farnstängeln beobachtet.

Nach [VARdJ+94] besteht ein guter Zusammenhang zwischen  $T_2$  in verschiedenen Geweben und dem klassisch bestimmten Wasserpotential. Für  $T_1$  wird dies auch von [VJK91] festgestellt.

[IIOM+96] zeigen in Tulpenzwiebeln einen starken Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität und der vorhandenen Menge freien Wassers, die üblicherweise aus langen  $T_1$ -Zeiten interpretiert wird [RCC00].

## 7.5 Übersicht der Relaxationszeit-Abhängigkeiten

Größen wie die Temperatur und die Feldstärke bleiben während eines funktionellen Experimentes i.d.R. konstant. So werden die Relaxationszeiten und damit der Bildkontrast hauptsächlich von den in diesem Kapitel vorgestellten Mechanismen beeinflusst.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Relaxationszeiten verkürzt werden durch:

- eine Erhöhung der Konzentration paramagnetischer Substanzen
- eine Erhöhung der Austauschrate des freien Wassers mit den Hydrathüllen solcher Substanzen/Ionen
- eine Erhöhung der Konzentration von Protonenpopulationen, die in anderen chemischen Umgebungen andere (sehr kurze) Relaxationszeiten haben
- eine Erhöhung des chemischen Austauschs mit solchen Populationen, z.B. durch Änderung des pH-Wertes
- eine Erhöhung der Viskosität

- eine Erhöhung des diffusionsgetriebenen Austauschs mit Populationen oder Kompartimenten mit kurzen Relaxationszeiten, z.B. auch durch erhöhte Membranpermeabilitäten
- eine Verringerung der Kompartimentgröße, die den Einfluss einer relaxierend wirkenden Kompartimentbegrenzung verstärkt.

Ausschließlich  $T_2$  wird weiterhin stark verkürzt durch:

- eine Erhöhung der Diffusion durch Gradienten an Suszeptibilitätssprüngen oder Gradienten des NMR-Experimentes
- stärkere Suszeptibilitätssprünge oder stärkere Gradienten des NMR-Experimentes
- schnellerer statistischer chemischer Austausch zwischen Umgebungen mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung.

## 8 Relaxationsmessung bei freier Diffusion

In Kapitel 7 wurden die Mechanismen dargestellt, die für die  $T_1$ - und  $T_2$ -Werte verantwortlich sind, die in Pflanzengewebe gemessen werden. Dabei spielen auch der diffusive Austausch von Magnetisierung zwischen Kompartimenten mit unterschiedlichen Relaxationsprozessen eine Rolle. Diese Kompartimente und die Diffusionswege waren jedoch stets als klein vorausgesetzt gegenüber einem Volumen (z.B. ein Bildvoxel), dessen Relaxationswerte in einem Experiment gemessen werden. Das bedeutet insbesondere, dass die Ursache für einen gemessenen Relaxationswert stets im selben Pixel liegt, in dem der Wert bestimmt wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun neu untersucht, welche Folgen sich in NMR-Bildern und Relaxationswertekarten ergeben, wenn die Diffusionsweiten während der Relaxation die räumliche Auflösung solcher Karten übersteigen. Dafür wurden Relaxation und Diffusion in einer Computersimulation modelliert und das Verhalten der Magnetisierung am Übergang zwischen Bereichen mit unterschiedlichen Relaxationszeiten berechnet (vgl. Abbildung (35)). Grundlagen und Ergebnisse der Simulationen werden im Folgenden dargestellt. Im Vergleich mit verschiedenen Messergebnissen konnte damit auch ein bislang unverstandener Bildkontrast im Zusammenhang mit Pflanzenwurzeln in Nährlösung erklärt werden [KSHJ08].

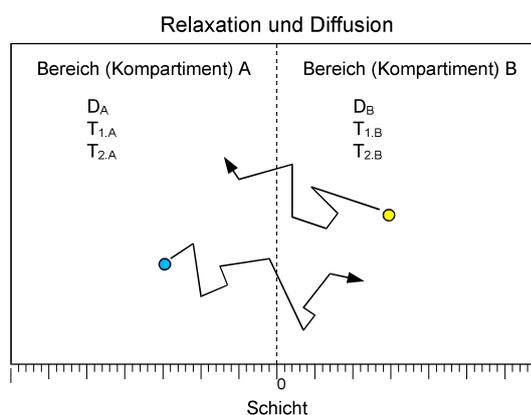


Abb. 35: In den Bild-/Wasserschichten am Übergang von Bereichen unterschiedlicher Relaxation bewirkt Diffusion eine (Werte-) Mischung.

### 8.1 Simulation von Relaxation und Diffusion

Eine kurze Übersicht zu verschiedenen Ansätzen, die in der Literatur für die mathematische Untersuchung von Diffusion bei räumlich aufgelösten NMR-Experimenten verwendet werden, findet sich in [NvdVA98]. Auch dort wird, mit einem analytischen Ansatz, die Wirkung von getrennten Bereichen mit unterschiedlichen Relaxationsbedingungen betrachtet. Das Ergebnis waren dabei Aussagen über die Auswirkungen von HF-Pulsen und Feldgradienten auf die Entwicklung von Phase und Amplitude der Magnetisierung unter Berücksichtigung der Relaxation und Diffusion zwischen verschiedenen Kompartimenten.

Abweichend sollen hier - ebenso räumlich aufgelöst - die effektiven Relaxationszeiten berechnet werden, die sich unabhängig vom durchgeführten NMR-Experiment ergeben, ausschließlich aufgrund der beteiligten physikalischen Prozesse. Dazu wurde das im Folgenden beschriebene Computermodell implementiert.

Es wird ein Volumen betrachtet, das in einer Richtung ( $x$ ) aus aufeinanderfolgenden Bereichen (Schichten) mit frei wählbaren Relaxationskonstanten  $T_1(x)$  und  $T_2(x)$  besteht. Innerhalb der Schichten, entsprechend den Raumrichtungen ( $y$  und  $z$ ), sind die Bedingungen konstant. Im Volumen ist freie Diffusion mit der Diffusionskonstanten  $D$  möglich.

Die Magnetisierung  $M$  setzt sich in jeder Schicht  $x$  aus drei verschiedenen Populationen zusammen:

- $M_A(x, t)$  - Angeregt und in Phase (signalgebend)
- $M_D(x, t)$  - Angeregt und dephasiert (nach  $T_2$ -Relaxation)
- $M_R(x, t)$  - Relaxiert (nach  $T_1$ -Relaxation)

Die absolute Spindichte wurde homogen = 1 angesetzt, so dass unter den verschiedenen  $M_i$  „Partialdichten“ zu verstehen sind, und in jeder Schicht  $x$  zu jeder Zeit  $t$  gilt:  $M_A + M_D + M_R = 1$ . Der Ausgangszustand der Simulation entspricht (durch einen  $90^\circ$ -Puls) vollständig angeregter Magnetisierung mit  $M_A = 1$  für jede Schicht  $x$ . Die Entwicklung des System wurde über 2000 Iterationen beobachtet; jede Iteration entsprach einem Zeitschritt von  $\Delta t = 2.0ms$ .

Der Relaxation mit  $T_2$  folgend verändern sich bei einer Iteration die Populationen der Magnetisierung in jeder Schicht wie folgt:

$$\begin{aligned} M'_A &= M_A(x, t) \cdot e^{-\Delta t/T_2} \\ M'_D &= M_D(x, t) + M_A(x, t) \cdot (1 - e^{-\Delta t/T_2}) \\ M'_R &= M_R(x, t) \end{aligned}$$

Gleichzeitig wirkt  $T_1$ -Relaxation, so dass sich die neuen Magnetisierungsanteile nach einem Relaxationsschritt ergeben zu:

$$\begin{aligned} M_A(x, t + \Delta t) &= M'_A \cdot e^{-\Delta t/T_1} \\ M_D(x, t + \Delta t) &= M'_D \cdot e^{-\Delta t/T_1} \\ M_R(x, t + \Delta t) &= M'_R + (M'_A + M'_D) \cdot (1 - e^{-\Delta t/T_1}) \end{aligned}$$

Nach der Relaxation wird die Diffusion für einen Iterationsschritt durchgeführt. Dafür werden die aktuellen  $M_i(x)$  mit einem Gauß-förmigen Faltungskern gefaltet. Das mittlere Verschiebungsquadrat, um das die Magnetisierung bei dieser Operation bewegt wird, muss der Diffusionsentfernung während des Zeitintervalls  $\Delta t$  entsprechen. Daraus ergibt sich der physikalische Abstand  $\Delta x$  der einzelnen Schichten der Simulation. Der exakte quantitative Zusammenhang dieser beiden physikalischen Größen ist beim Vergleich des späteren Simulationsergebnisses aus Abschnitt 8.5 mit Messdaten wichtig. Grundsätzlich handelt es sich bei der physikalischen Diffusion um einen Vorgang im dreidimensionalen Raum. Daher sollten für die Berechnung der Diffusionsentfernung die Einstein-Smoluchowski-Gleichung im Dreidimensionalen und für die Magnetisierungsverschiebung eine Faltung im Dreidimensionalen herangezogen werden. Die untersuchte Geometrie

besteht jedoch aus einer „geschichteten“ Abfolge unterschiedlicher Kompartimente, so dass effektiv nur eine lineare Diffusion untersucht wird, woran sich auch die Ausführung der Simulation in einem Schichtenmodell orientiert. Das würde für die Verwendung der mathematischen Zusammenhänge für den eindimensionalen Fall sprechen. Im Folgenden soll für beide Ansätze der Zusammenhang der Größen  $\Delta t$  und  $\Delta x$  berechnet werden, um zu zeigen, dass das Ergebnis identisch ist und sich sogar durch Projektion aufeinander abbilden lässt.

Für den allgemeinen dreidimensionalen Fall lässt sich ein gaußförmiger Faltungskern schreiben als:

$$k_{3D} = \begin{pmatrix} a_3 & a_2 & a_3 & a_2 & a_1 & a_2 & a_3 & a_2 & a_3 \\ a_2 & a_1 & a_2 & a_1 & a_0 & a_1 & a_2 & a_1 & a_2 \\ a_3 & a_2 & a_1 & a_2 & a_1 & a_2 & a_3 & a_2 & a_1 \end{pmatrix}$$

mit  $a_0 = 8/64$ ,  $a_1 = 4/64$ ,  $a_2 = 2/64$  und  $a_3 = 1/64$ . Die Normierung mit  $1/64$  sorgt für einen Erhalt der Gesamtmagnetisierung. Nach dem Zentralen Grenzwertsatz der Statistik könnte man hier jeden symmetrischen Faltungskern wählen, dessen Elementzahl klein ist gegen die Anzahl der Schritte der Simulation; in jedem Fall würde man nach einigen Schritten eine Gauß-förmige Verteilung erhalten.

Bei einmaliger Anwendung dieses Kernes, also in einem Zeitschritt  $\Delta t$ , wird die Magnetisierung jedes Raumelementes auf die 27 direkt benachbarten (das Ursprungsvoxel mit eingeschlossen) verteilt. Die dabei bewirkte mittlere Verschiebung der Magnetisierung kann man aus dem Verschiebungsquadrat berechnen:

$$\overline{d_{3D}^2} = \sqrt{\sum_i a_i \cdot (d_i \Delta x)^2 \cdot n_i} = \sqrt{6A_1} \Delta x$$

Dabei ist  $d_i = \sqrt{i}$  die Entfernung der Kern-Elemente vom Kern-Zentrum und  $n_0 = 1$ ,  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 12$  und  $n_3 = 8$  die Häufigkeit äquivalenter Elemente, sowie  $A_1 = a_1 + 4a_2 + 4a_3$ .  $\Delta x$  ist die räumliche Auflösung der Simulation im Sinne einer virtuellen Gitterkonstanten bzw. auch der Schichtabstand. Die Verschiebung muss der mittleren Diffusionsentfernung während des Zeitschrittes  $\Delta t$  entsprechen, die für den dreidimensionalen Fall nach der Einstein-Smoluchowski-Gleichung gegeben ist zu

$$\overline{d_{3D}^2} = \sqrt{6D\Delta t}$$

Aufgelöst nach der räumlichen Auflösung der Simulation  $\Delta x$  ergibt sich

$$\Delta x = \sqrt{\frac{D}{A_1} \Delta t} = 4.0 \mu m \quad (17)$$

mit den oben genannten Werten sowie der Selbstdiffusionskonstante für Wasser bei Raumtemperatur ( $D=2.0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ).

Die Diffusion in der y-z-Ebene des hier simulierten Diffusionsvolumens ist irrelevant, da das beschriebene System in dieser Richtung homogen ist. Daher wird der

Verlauf der Simulation auch nur entlang  $x$  ausgewertet und jede Schicht als ein beliebig in  $y$  und  $z$  ausgedehntes Element betrachtet. Die Simulation der Diffusion kann daher auch auf den eindimensionalen Fall reduziert werden. Die Projektion des gezeigten Faltungskernes auf  $x$  (oder  $y$  oder  $z$ ) ergibt

$$k_{1D} = (A_1 \quad A_0 \quad A_1) = \left( \frac{1}{4} \quad \frac{1}{2} \quad \frac{1}{4} \right)$$

mit dem oben bereits eingeführten  $A_1$  und  $A_0 = a_0 + 4a_1 + 4a_2$ . Dies ist exakt der gaußförmige Faltungskern, den man für einen Diffusionsschritt im Eindimensionalen ansetzen würde. Als mittlere Verschiebung hieraus ergibt sich:

$$\overline{d_{1D}} = \sqrt{\sum_i A_i \cdot (d_i \Delta x)^2 \cdot N_i} = \sqrt{2A_1 \Delta x}$$

( $N_0 = 1$ ,  $N_1 = 2$ ). Setzt man dies wiederum gleich mit der Einstein-Smoluchowski-Gleichung für eindimensionale Diffusion

$$\overline{d_{1D}} = \sqrt{2D\Delta t}$$

erhält man dieselbe Beziehung (Gleichung (17)) für die räumliche Auflösung wie im dreidimensionalen Ansatz und mit derselben Diffusionskonstanten wiederum  $\Delta x = 4.0 \mu\text{m}$ .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell ausschließlich für die Simulation der Diffusion zwischen zwei unterschiedlichen Kompartimenten herangezogen, auch wenn beliebig viele möglich wären. Abweichend vom Faltungskern wird das Volumen an seinen Grenzschichten  $x=0$  und z.B.  $x=99$  (für 100 Simulationsschichten) geschlossen, so dass hier nur diffusiver Austausch mit der inneren benachbarten Schicht stattfindet und entsprechend  $3/4$  der Magnetisierung in der Schicht bleiben. In beiden Grenzschichten könnte man eine Akkumulation von zu stark oder zu gering relaxierter Magnetisierung aus dem jeweils anderen Kompartiment erwarten. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Länge des gewählten Volumens von 100 Schichten bereits ausreicht, so dass kein wirksamer Anteil der im jeweils anderen Kompartiment relaxierten Magnetisierung hier ankommt. Im Rahmen der Simulation entsprechen diese nur einseitig offenen Abschlusschichten somit einem Kontinuum.

In jedem Simulationsschritt wurden für jede Schicht folgende Operationen durchgeführt:

- Berechnung der neuen Magnetisierungspopulationen nach  $T_2$ -Relaxation
- Berechnung der neuen Magnetisierungspopulationen nach  $T_1$ -Relaxation
- Verschiebung je eines Viertels jeder Magnetisierungspopulation in die angrenzenden zwei Schichten.

Nach Ablauf der Simulation können durch Fit von Gleichung (8) über  $M_A(x, t)$  und Gleichung (7) über  $M_R(x, t)$  die effektiv beobachteten Relaxationszeiten  $T_2(x)$  und  $T_1(x)$  für jede Schicht bestimmt werden.

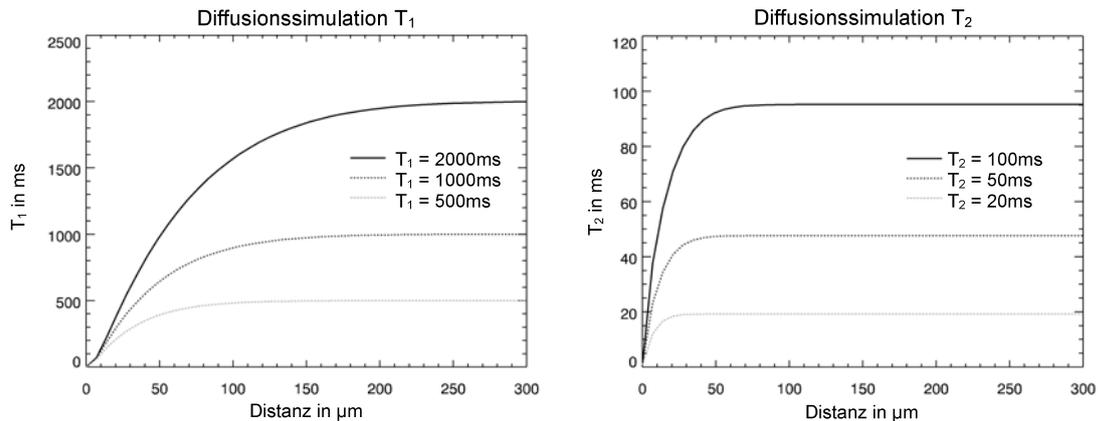


Abb. 36: Ergebnisse von drei Simulationen der Diffusion von bei  $x=0$  vollständig relaxierter Magnetisierung in ein Volumen mit endlichen Relaxationszeiten. Gezeigt ist der räumliche Verlauf der effektiv zu beobachtenden  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten. Die Beschriftung in den Grafiken gibt die zu Grunde liegenden Relaxationszeiten im freien Diffusionsvolumen an.

## 8.2 Relaxation an einer Oberfläche

In einer ersten Simulation von 100 Schichten wurden  $T_1$  und  $T_2$  über alle Schichten hinweg konstant gewählt. Als Ausnahme entsprach die Schicht  $x=0$  einer das Volumen begrenzenden Oberfläche, an der eine schnelle Relaxation stattfindet. Hier vorliegende Magnetisierung wurde in jedem Iterationsschritt vollständig relaxiert, d.h.  $M_R(0, t + \Delta t) = 1$ ,  $M_D(0, t + \Delta t) = M_A(0, t + \Delta t) = 0$ .

Die effektiven Relaxationszeiten, die sich in Abhängigkeit vom Abstand  $x$  zur „relaxierenden Wand“ ergeben, werden in den Diagrammen in Abbildung (36) gezeigt.

Im Bereich vor der „Wand“ ergibt sich ein zunächst nahezu linearer Anstieg der jeweiligen Relaxationszeit, der sich dann asymptotisch dem Wert in der freien Lösung nähert. Die Steigung des Anstiegs ist dabei für höhere „Zielwerte“ größer. Trotzdem ergibt sich für längere Relaxationszeiten der freien Lösung ein deutlich breiterer Übergangsbereich. Die Kurve für  $T_2=50\text{ms}$  erreicht ihren Endwert bereits im Abstand von  $50\mu\text{m}$ ,  $T_1$  von  $2000\text{ms}$  wird jedoch erst im Abstand von  $250\mu\text{m}$  bis  $300\mu\text{m}$  erreicht. Diese Werte liegen in derselben Größenordnung wie die jeweilige Diffusionslänge mit  $155\mu\text{m}$  für  $t=2000\text{ms}$  und  $24\mu\text{m}$  für  $t=50\text{ms}$ , mit der oben angeführten Diffusionskonstanten. Genauer wird darauf noch im Abschnitt 8.4 eingegangen.

Sehr gut ist auch der zusätzliche Beitrag der  $T_1$ -Relaxation auf  $T_2$  zu erkennen, so dass die erreichten  $T_2$ -Werte in der rechten Grafik in Abbildung (36) ( $95.2\text{ms}$ ,  $47.6\text{ms}$ ,  $19.2\text{ms}$ ) unter den Vorgabewerten der freien Lösung liegen. Zwei unabhängig wirkende Relaxationsmechanismen mit  $T_1=1000\text{ms}$  und  $T_2=50\text{ms}$  führen nach Gleichung (10) genau zu dem aus der rechten Grafik ablesbaren effektiven  $T_2=47.6\text{ms}$  der mittleren Kurve.

### 8.3 Relaxation und Diffusion in dünnen Schichten

Neben der Untersuchung von Pflanzenwurzeln in Nährlösung sind auch Messungen an weniger homogenen Umgebungsmedien wie z.B. feuchtem Sand interessant. Betrachtet man die Feuchtigkeit als kleine Kompartimente bzw. Wasserfilm auf den Oberflächen der Sandkörner, kann man die in Abschnitt 8.2 benutzte Simulation auch heranziehen, um die Relaxationswerte eines solchen Mediums zu verstehen. Für eine Interpretation z.B. der Feuchtigkeitsverteilung und Umverteilung im Bereich von Pflanzenwurzeln im Medium ist ein solches Verständnis hilfreich.

Um den in Abschnitt 8.2 gezeigten ortsabhängigen  $T_1$ -Verlauf vor einer relaxiv wirkenden Wand experimentell zu sehen, bedarf es einer ausreichenden Auflösung in einem Bildgebungsexperiment. Bei geringer Auflösung oder einer globalen Messung der Relaxationszeiten einer Probe erhält man einen Mittelwert des gezeigten Verlaufs. Mit der in Abschnitt 8.1 vorgestellten Simulation lassen sich auch die gemessenen Relaxationszeiten in Abhängigkeit von dem Volumen angeben, über das eine solche experimentbedingte Mittelung erfolgt.

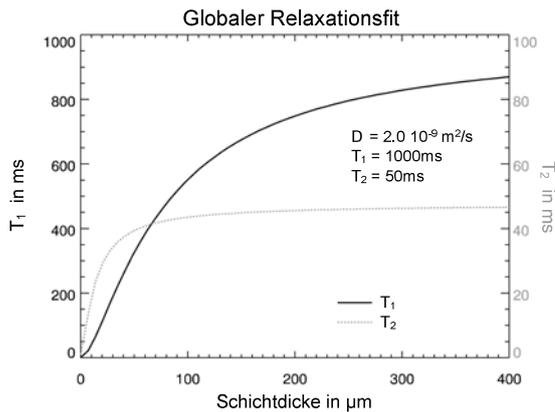


Abb. 37: Simulierte  $T_2$ - und  $T_1$ -Relaxationszeiten abhängig von der Dicke eines Flüssigkeitsfilmes auf einer stark relaxiv wirkenden Oberfläche bei  $x=0$ .

Dazu wird der Fit der Relaxationszeiten nicht über die zeitlichen  $M_A$ - bzw.  $M_R$ -Verläufe jeder einzelnen Simulationsschicht ausgeführt, sondern über die Summe dieser Magnetisierungen aus allen Schichten zwischen der Wand und einer Schicht  $x$ . Das so gewählte Intervall  $[0, x]$  kann man als Dicke eines Wasserfilms auffassen, der einseitig von einer stark relaxiv wirkenden Oberfläche begrenzt wird. Das Ergebnis eines Fits über den gesamten Magnetisierungsabfall in diesem „Film“ ergibt dessen global gemessene Relaxationszeiten. Abhängig von der Intervallgrenze  $x$  ergibt sich so etwa die Abhängigkeit der Relaxationszeiten von der Dicke des Wasserfilms und damit vom Feuchtigkeitsgehalt. Abbildung (37) zeigt diese Abhängigkeit für sehr schnelle Relaxation an der Oberfläche bei  $x=0$  und intrinsischen Relaxationswerten der Flüssigkeit von  $T_1=1000\text{ms}$  und  $T_2=50\text{ms}$ . Der Unterschied zwischen langen und kurzen Relaxationszeiten bewirkt in diesem Modell, dass  $T_2$  bereits nach gut  $80\mu\text{m}$  einen relativ konstanten Wert erreicht,  $T_1$  jedoch über die  $400\mu\text{m}$  des Simulationsbereiches hinaus noch deutlich ansteigt. In [MJK90] wurde ein Zusammenhang zwischen  $T_1$  und dem prozentualen Wassergehalt von Sand gefunden. Anfangs steigt  $T_1$  mit dem Wassergehalt linear an und flacht sich bei höheren Werten langsam ab (472ms bei 5% bis 1265ms bei 25%)

Wassergehalt).  $T_2$  hingegen zeigte keine sichtbare Abhängigkeit vom Wassergehalt und bleibt konstant niedrig (zwischen 54ms und 76ms). Die Autoren bleiben eine Erklärung schuldig. Der Befund entspricht jedoch den in Abbildung (37) gezeigten Verläufen, wenn Relaxationszeiten in diesen Größenordnungen bei der Durchmischung durch Diffusion zu Grunde liegen. Möglicherweise ist also die mittlere Wasserfilmdicke auf den Sandkörnern verantwortlich für die von den Autoren gemessenen Variationen der Relaxationszeiten. Aufgrund des gezeigten Diffusionseffektes ergibt sich je nach Filmdicke ein anderes effektiv gemessenes mittleres  $T_1$ .

## 8.4 Diffusion und Ortsauflösung der Relaxation

In der Literatur wurde wiederholt festgestellt, dass bei funktionellen Änderungen  $T_1$  wesentlich stärker variiert und deutlicher physiologische Reaktionen der Pflanzen z.B. auf Stress wiedergibt als  $T_2$ , dieses jedoch einen deutlich besseren Gewebekontrast mit feiner aufgelösten Strukturen zeigt [RCC00, ZJ96]. In den vorigen Abschnitten wurde bereits gezeigt, wie die Diffusion zu einer „Verschmierung“ der Relaxationszeiten an den Kompartimentgrenzen führt. Es stellt sich die Frage, ob sich dieser Effekt nicht so grundlegend auswirkt, dass dadurch die räumliche Auflösung, mit der die Relaxationszeiten kleiner Objektstrukturen gemessen werden können, limitiert wird.

Betrachtet man die Größenordnung, in der Diffusionslängen liegen, wenn man als Diffusionsdauer übliche Relaxationszeiten einsetzt, so erhält man aus der Einstein-Smoluchowski-Gleichung im Dreidimensionalen:

$$\begin{aligned}\Delta x &= \sqrt{6D\Delta t} = 155\mu m \quad \text{für } \Delta t=T_1=2.0s \\ \Delta x &= \sqrt{6D\Delta t} = 35\mu m \quad \text{für } \Delta t=T_2=0.1s\end{aligned}$$

Man sieht, dass z.B. bereits relaxierte Magnetisierung über 0.15mm weit in ein Volumen mit  $T_1=2.0s$  hineindiffundieren kann, bevor die dortige Magnetisierung auf  $1/e$  ihrer Signalstärke relaxiert wäre. In üblichen NMR-Mikroskopie-Experimenten liegt dies deutlich in der Größenordnung mehrerer Pixel, so dass ein sichtbarer Effekt dieses diffusionsgetriebenen Inflows zu erwarten ist. Auf der Zeitskala einer deutlich kürzeren Relaxationsdauer, wie in Pflanzen bei  $T_2$  zu beobachten, erreicht die Diffusionslänge entsprechend kürzere Werte. Ein Inflow-Effekt, der zu einer Vermischung der Werte führt, hätte hier eine deutlich geringere Reichweite, die für  $T_2=0.1s$  z.B. nur noch einer Pixelbreite bei der in dieser Arbeit zumeist verwendeten Auflösung von  $39\mu m$  entspricht.

Die im Abschnitt 8.1 eingeführte Computersimulation wurde für die Simulation eines Übergangs zwischen Bereichen mit unterschiedlichem  $T_1$  herangezogen. Dafür wurden die 100 Schichten in die zwei Bereiche A mit  $0 \leq x \leq 33$  und B mit  $34 \leq x \leq 99$  aufgeteilt. Bei  $x=0$  und  $x=99$  wurde das Volumen hinsichtlich der Diffusion geschlossen, ohne gesonderte Vorgaben für die Relaxation (vgl. 8.1).  $T_2$

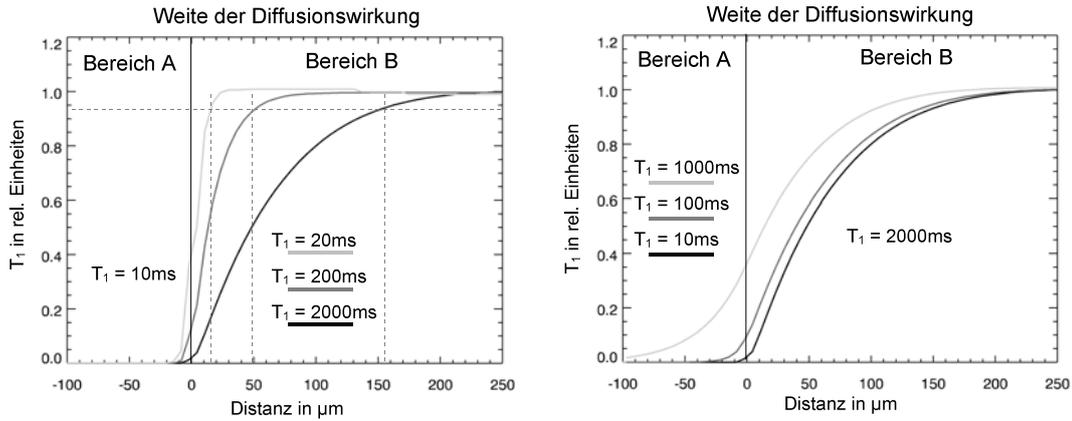


Abb. 38: Effektiv beobachtetes  $T_1$  an der Grenze zweier Bereiche mit unterschiedlichem  $T_1$ . Links bei Variation des  $T_1$  im Bereich B gegenüber einem sehr kurzen  $T_1$  in A. Rechts wird  $T_1$  im Bereich A gegenüber einem sehr langen  $T_1$  in B variiert.

wurde mit 10ms in A und 100ms in B stets konstant gehalten. Insgesamt wurden 5 Simulationsrechnungen durchgeführt. Dabei wurde einmal  $T_1$  im Bereich A über drei Größenordnungen variiert gegenüber einem stets gleichen, längeren  $T_1$  in Bereich B; und einmal  $T_1$  im Bereich B über drei Größenordnungen variiert gegenüber dem konstanten, kürzeren  $T_1$  in A. Die verwendeten Werte finden sich in Abbildung (38).

Nach der Simulation von 3000 Schritten wurde für jede Schicht durch Fit das effektiv beobachtbare  $T_1$  bestimmt. In Abbildung (38) ist das relative  $T_1$  abhängig vom Ort dargestellt. Relativ bedeutet, dass die Nulllinie jeweils dem niedrigeren  $T_1$  im Bereich A entspricht und die 1-Linie jeweils dem für den Bereich B gewählten höheren Wert von  $T_1$ . Deutlich ist in der linken Grafik zu erkennen, wie der Übergangsbereich in B um so breiter wird, je größer  $T_1$  im Bereich B ist. Der in Bereich A schnell relaxierten Magnetisierung steht während der langsamen Relaxation in B eine immer längere Zeit zur Verfügung, um nach B hineindiffundieren zu können. Setzt man die verwendeten  $T_1$ -Werte und die Diffusionskonstante ( $D=2.0 \cdot 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$  für Wasser) in die Einstein-Smoluchowski-Gleichung ein, erhält man als Diffusionsentfernungen  $\Delta x$ :

$T_1$ in ms	20	200	2000	10	100	1000
$\Delta x$ in $\mu\text{m}$	15.5	48.9	154.9	11.0	34.6	109.5

In der linken Grafik wurden die entsprechenden Diffusionsentfernungen als Distanzen im Bereich B eingezeichnet, bezogen auf die bei 0 gelegene Bereichsgrenze. Das jeweils beobachtete effektive  $T_1$  hat an diesen Positionen stets denselben Anteil (etwa 0.93) der Differenz zwischen den  $T_1$  der beiden Bereiche erreicht. Dieser Anteil bleibt natürlich nur solange gleich, wie  $T_1$  im anderen Bereich (A) unverändert bleibt. Würde der Übergangsbereich durch ein dort verändertes  $T_1$

weiter oder weniger weit nach A hineinreichen, würde sich die Steigung des Übergangs verändern und damit besagter Anteil. Zu erkennen ist dieser Fall in der rechten Grafik in Abbildung (38).

Wichtig ist, festzustellen, dass die Breite des Übergangs in einen Bereich hinein ausschließlich von dessen intrinsischem  $T_1$ -Wert abhängt, nicht vom Unterschied zwischen A und B. Deutlich wird das anhand der rechten Grafik. Betrachtet man hier den Verlauf des effektiven  $T_1$  im Bereich B, liegt er je nach  $T_1$  in A etwas höher oder niedriger, nähert sich aber stets auf dieselbe Weise und bei derselben Distanz seinem Endwert.

Bereiche mit unterschiedlichen Relaxationszeiten sind in biologischen Proben wie Pflanzen zumeist verschiedene Gewebetypen. Zu einem diffusiven Austausch zwischen solchen Bereichen und damit zu einer „Verschmierung“ der Relaxationszeiten kann es natürlich nur kommen, wenn ein Wasser- und damit Magnetisierungsaustausch möglich ist. Bei den in früheren Abschnitten zitierten Werten für die Wasserpermeabilität von Zellmembranen erscheinen diese kaum als Hindernis gegenüber der langreichweitigen freien Selbstdiffusion des Wassers. So kann es während der langen  $T_1$ -Zeiten zu einer deutlichen Durchmischung dieser Werte an den Grenzen der einzelnen Gewebe kommen. Wie gesehen, reicht die Breite eines solchen Übergangs leicht über mehrere Pixel hinweg, was eine deutliche Unschärfe in  $T_1$ -Karten bewirkt. Auf der anderen Seite können besonders scharfe Kanten in  $T_1$ -Karten daher auch als Diffusionsbarrieren interpretiert werden.

Im Rahmen der deutlich kürzeren  $T_2$ -Zeiten ist kaum eine solche Unschärfe möglich, die über einen Pixel hinausreicht. Zu sehen ist der Effekt z.B. im Vergleich von Abbildung (21) mit Abbildung (22) (Seiten 37 und 38). In der  $T_1$ -Karte erscheinen die Gewebegrenzen deutlich verwischt. Ein weiterer auf diesem Konzept basierender Effekt wird in 8.5 diskutiert.

Abschließend muss noch bemerkt werden, dass die Unschärfe durch diffusionsverschmierte Relaxationswerte nicht nur Karten der jeweiligen Relaxationszeit betrifft. Es handelt sich in den Übergangsbereichen um echte Relaxationsmittelwerte. Angetrieben durch Diffusion werden die angeregten Teilchen anteilig ihrer Aufenthaltsdauer dort den Relaxationsmechanismen beider benachbarter Bereiche ausgesetzt. Diese Mittelwerte gehen in jeden Bildkontrast mit ein. Aufgrund der Kombination mit anderen Bildkontrasten, die eine höhere Auflösung bieten, besonders der Spindichte, fällt dies jedoch normalerweise nicht auf. Liegen ausschließlich ein  $T_1$ -Kontrast mit langen  $T_1$ -Zeiten und ein  $T_2$ -Kontrast mit kurzen  $T_2$ -Zeiten vor, bedeutet das, dass feine Strukturen nur sichtbar sind, wenn sie sich ausreichend in  $T_2$ - oder ihrer Spindichte unterscheiden oder wenn Diffusionsbarrieren vorhanden sind. Bei entsprechend langem  $T_2$  würde für  $T_2$ -Karten und  $T_2$ -Kontrast dasselbe gelten.

## 8.5 Der weiße Ring

In NMR-Aufnahmen von Wurzeln, die sich in Nährmedium befinden, werden die Wurzeln i.d.R. von einem hellen Ring umgeben, wie in der Turbospinechoaufnahme in Abbildung (39-a) zu sehen ist. Bisher konnte dieser ringförmige Bildkontrast weder einem Teil der Wurzel zugeordnet noch durch ein bekanntes Phänomen erklärt werden. Mit Hilfe der theoretischen Überlegungen aus den vorangegangenen Abschnitten konnte im Rahmen dieser Arbeit die Ursache für diesen hellen Ring gefunden und durch verschiedene Messungen belegt werden [KSHJ08]. Im Folgenden wird diese Erklärung vorgestellt und gezeigt, dass der fragliche Bildkontrast auf einer Kombination von Diffusions- und Relaxationsprozessen beruht.

In Abbildung (39-c) ist das Profil der Signalstärke in der Wurzel als durchgehende schwarze Kurve dargestellt. Das Profil wurde mit dem in Abschnitt 6 beschriebenen Verfahren berechnet, beginnt also links mit dem Wurzelmittelpunkt und endet rechts mit dem Wert des umgebenden Nährmediums. Verfälschende Strukturen in der Nährlösung, wie Nebenwurzeln und Referenzkapillare, wurden vor der Profilberechnung wegsegmentiert. Deutlich ist hier der helle Ring als Maximum

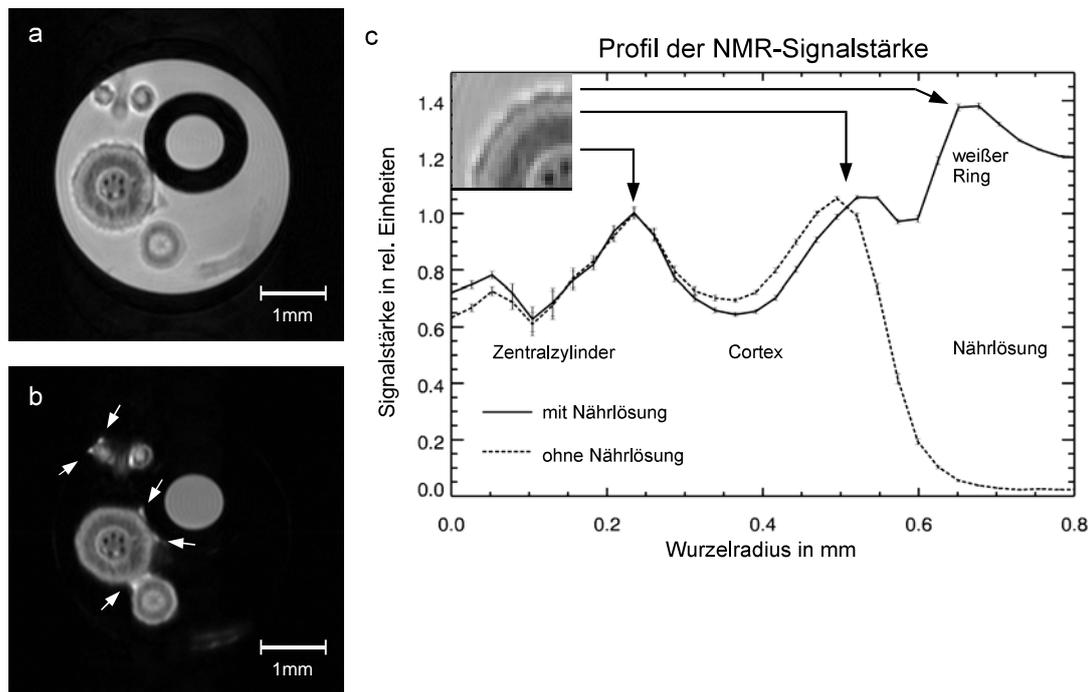


Abb. 39: (a) und (b) Turbospinechos einer Maiswurzel, 8 Echos mit  $T_E=T_{i,E}=9.1\text{ms}$ ,  $T_R=1.083\text{s}$ , Schichtdicke  $0.5\text{mm}$ ,  $\text{FOV}=5\text{mm} \times 5\text{mm}$ ,  $128\text{Pkt} \times 128\text{Pkt}$ . (a) mit Nährlösung, in (b) unmittelbar nach deren Entfernung. Die Pfeile zeigen auf Reste der Nährlösung. (c) Die Profile der Signalstärken aus den linken Bildern im Vergleich, radial für den Bildbereich der Hauptwurzel aufgetragen.

der Signalintensität bei  $r=0.66\text{mm}$  zu erkennen. Es ist vom Maximum des äußeren Cortex (bei  $r=0.53\text{mm}$ ) durch die Hypodermis mit geringerer Signalstärke getrennt.

Es wurden verschiedene Möglichkeiten diskutiert [HK03], um zu erklären, warum die Signalstärke in diesem hellen Ring über der des freien Umgebungsmediums liegt, das bereits die maximale Spindichte bieten würde. Eine mögliche Erklärung wäre eine verstärkte  $T_1$ -Relaxation, z.B. aufgrund einer Schleimschicht auf der Wurzel, wie sie sich aus den abgestorbenen Zellen der Wurzelkappe beim Wachstum bildet oder später gelegentlich aus Algen und Bakterien.

In Abbildung (39-b) wurde die Nährlösung entfernt. An den kapillar gehaltenen Flüssigkeitsresten (Pfeile in 39-b) zwischen Wurzeln, Referenzkapillare und Gefäßwand sieht man, dass der Bereich noch mit Feuchtigkeit gesättigt ist. Der weiße Ring ist hier jedoch verschwunden. Ganz deutlich ist dies am Verlauf des zugehörigen gestrichelten Profils in der Grafik rechts zu erkennen. Auf das Maximum im äußeren Cortex folgt ausschließlich ein Signalabfall. Die leichte Kontraktion in radialer Richtung wird durch das Eigengewicht der nun nicht mehr im Wasser „schwimmenden“ Wurzel bewirkt<sup>13</sup>.

Mit diesem Befund ist klar, dass der weiße Ring weder einem Teil der Wurzel zuzuordnen ist noch einer auf der Wurzel befindlichen Schicht, die die Feuchtigkeit halten würde. Das Signal kann nur aus der entfernten Nährlösung stammen und durch die direkte Nähe der Wurzel beeinflusst werden.

Ausschließen kann man dabei einen Effekt aufgrund von eingeschränkter Diffusion [PBS92], da er sonst an der Oberfläche der Referenzkapillare oder der Glaswand deutlich stärker sein müsste als an einer teils durchlässigen Oberfläche wie der der Wurzel [HL91]. An den anderen Oberflächen ist jedoch überhaupt kein verstärktes Signal nachweisbar.

Einen weiteren Hinweis auf den Ursprung des fraglichen Bildkontrastes zeigt Abbildung (40). Ohne zu berücksichtigen, dass aufgrund der Relaxation auch ein grundsätzlicher SNR-Verlust stattfindet, wurden verschiedenen  $T_1$  und  $T_2$  gewichtete Bilder aus den  $T_1$ -,  $T_2$ - und Spindichtekarten der Abbildungen (21), (22) und (23) (Seiten 37, 38 und 39) errechnet über

$$S(T_R, T_E) = S \cdot e^{-T_E/T_2} \cdot (1 - e^{-T_R/T_1})$$

Wie zu erkennen ist, tritt der helle Ring weder in dem nahezu ausschließlich Spindichte-gewichteten Bild rechts oben noch bei starker  $T_2$ -Gewichtung rechts unten auf. Der Ring ist somit ein reines  $T_1$ -Phänomen und wird unabhängig von der  $T_2$ -Wichtung in der Darstellung von rechts nach links stärker. Gäbe es eine physiologische Ursache an Ort und Stelle dieser Aufhellung, müsste nach den in Abschnitt (7.1) dargestellten Relaxationsmechanismen auch eine  $T_2$ -Änderung zu beobachten sein (siehe auch [HJW00]).

<sup>13</sup>Das Aerenchym wird durch die Streckung der Wurzel geringfügig zusammengedrückt, und folgerichtig ist auch die Signalstärke im Cortex leicht erhöht.

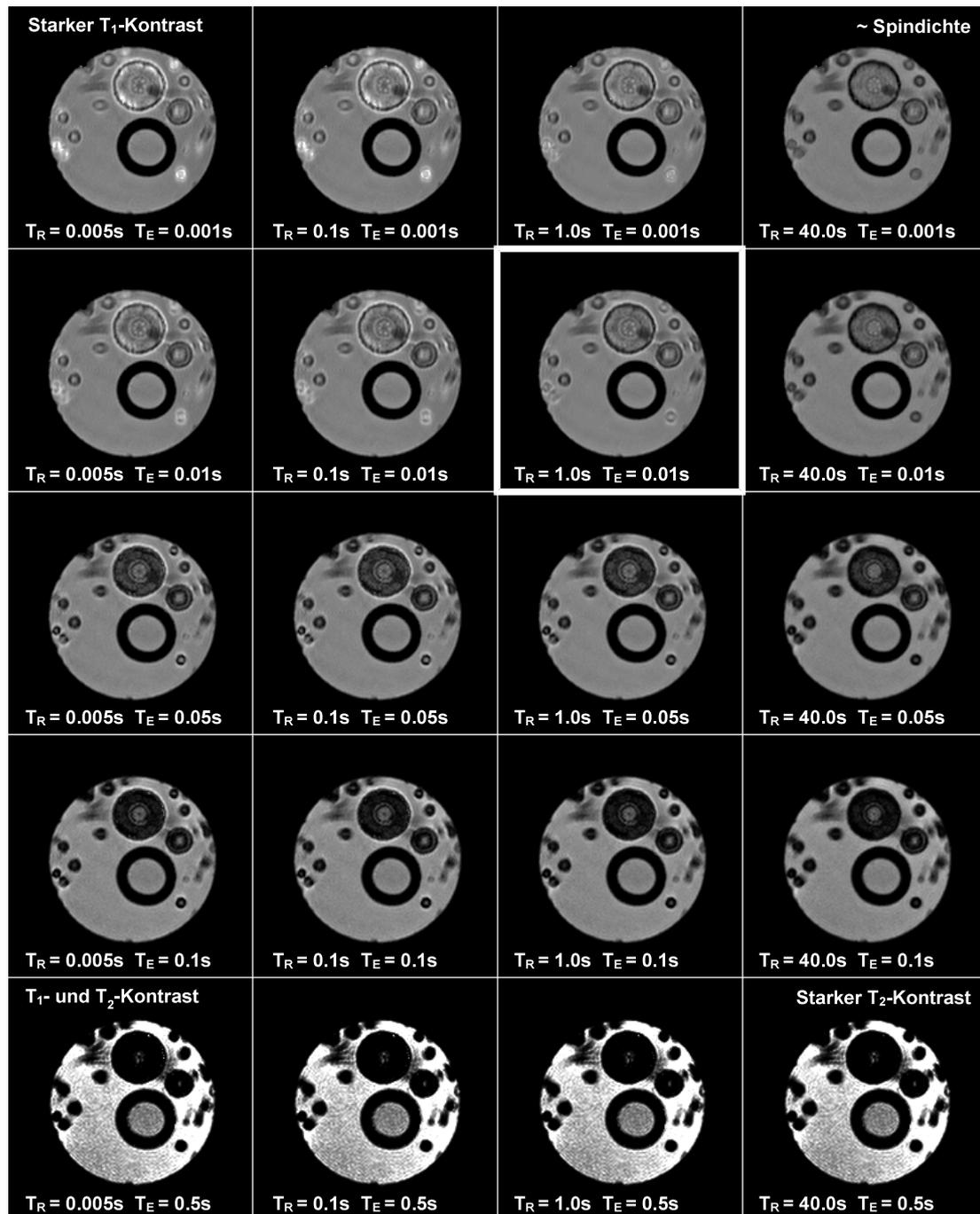


Abb. 40: Theoretische Spinechobilder einer Maiswurzel, die für verschiedene Echo- (oben–unten) und Repetitionszeiten (links–rechts) aus einer  $T_1$ - und  $T_2$ -Karte (vgl. Abbildung (21) und Abbildung (22)) berechnet wurden. Der starke SNR-Verlust durch kurzes  $T_R$  oder langes  $T_E$  aufgrund von  $T_1$ - bzw.  $T_2$ -Relaxation bleibt dabei unberücksichtigt, so dass nur der zu erwartende Bildkontrast (ohne Rauschen) erkennbar ist. Hervorgehoben ist das Bild, dessen Parameter der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Turbospinechosequenz entsprechen.

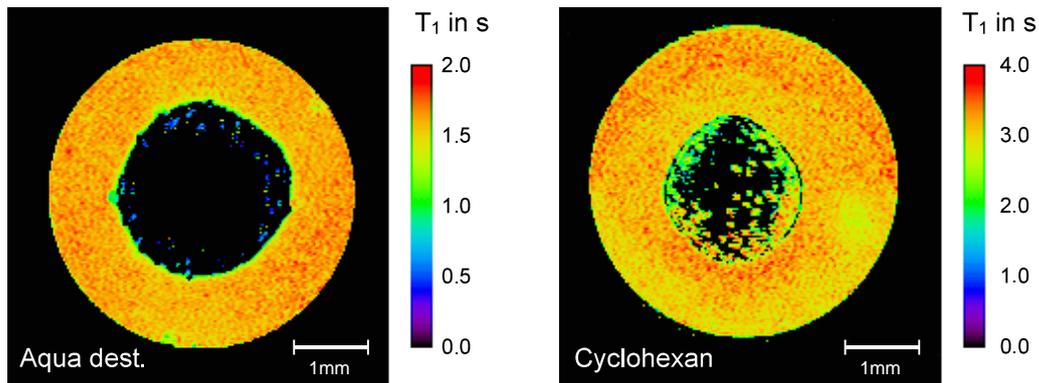


Abb. 41:  $T_1$ -Karten des Querschnitts eines Zahnstochers aus getrocknetem Birkenholz. Links in destilliertem Wasser, rechts in Cyclohexan. Der Ring-Effekt ist nur im Wasser zu beobachten. Auch bei der jeweils in die Holzzwischenräume eingedrungenen Flüssigkeit sieht man nur beim Wasser eine deutliche  $T_1$ -Reduktion.

Um weitere Eigenschaften und somit Ursachen dieses  $T_1$ -Effektes zu untersuchen, wurde nach einem Modellsystem gesucht, in welchem der Effekt ebenfalls zu beobachten ist. Die wichtigste Frage dabei war, ob der helle Ring die Folge eines aktiven Prozesses der Wurzeln darstellt. Daher wurden andere Proben auf das Auftreten dieses Bildkontrastes hin untersucht. Diese sollten ähnlich poröse, d.h. große, Oberflächen wie die Wurzeln besitzen, aus organischen Verbindungen aufgebaut sein, aber keine physiologische Aktivität aufweisen. Als möglichst unterschiedliche Proben mit diesen Eigenschaften wurden ausgewählt: ein Baumwollfaden, eine Nudel aus Hartweizengrieß, ein Stück Neoprenschlauch sowie ein Zahnstocher aus getrocknetem Birkenholz. Einzig die Holzprobe zeigte darunter den gesuchten Effekt. Damit ist jedoch bewiesen, dass die Ursache für den Signalanstieg nicht in einem aktiven Prozess der Wurzel zu suchen ist. In der linken  $T_1$ -Karte in Abbildung (41) ist deutlich der Bereich mit reduziertem  $T_1$  zu sehen, der den Zahnstocher in destilliertem Wasser umgibt. In den Poren des Holzes sieht man ebenfalls eingedrungene Flüssigkeit mit sehr geringem  $T_1$ . Im Bereich der anderen Proben (Baumwolle, Neopren, Nudel) zeigte sich keine offensichtliche Verkürzung der Relaxationszeit.

Um die Bedeutung des Mediums für den Effekt zu untersuchen, wurde Cyclohexan als Umgebungsmedium verwendet. Es war das einzige verfügbare Lösungsmittel, das, mit ausschließlich chemisch identischen Protonen, keine Chemical-Shift-Artefakte erzeugt. Diese haben z.B. bei Ethanol eine Beobachtung des Effektes verhindert. Cyclohexan besitzt mit  $D=1.345 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  [TLC+00] eine etwas niedrigere Diffusionskonstante als Wasser, die aber in vergleichbarer Größenordnung liegt. Die Pflanzenwurzeln wurden durch das Cyclohexan so schnell aufgelöst, dass diese Messung ausschließlich mit der Holzprobe durchgeführt werden konnte. An der rechten  $T_1$ -Karte in Abbildung (41) ist zu erkennen, dass das  $T_1$  von Cyclohexan bei gleicher Feldstärke und Temperatur als etwa doppelt so hoch ge-

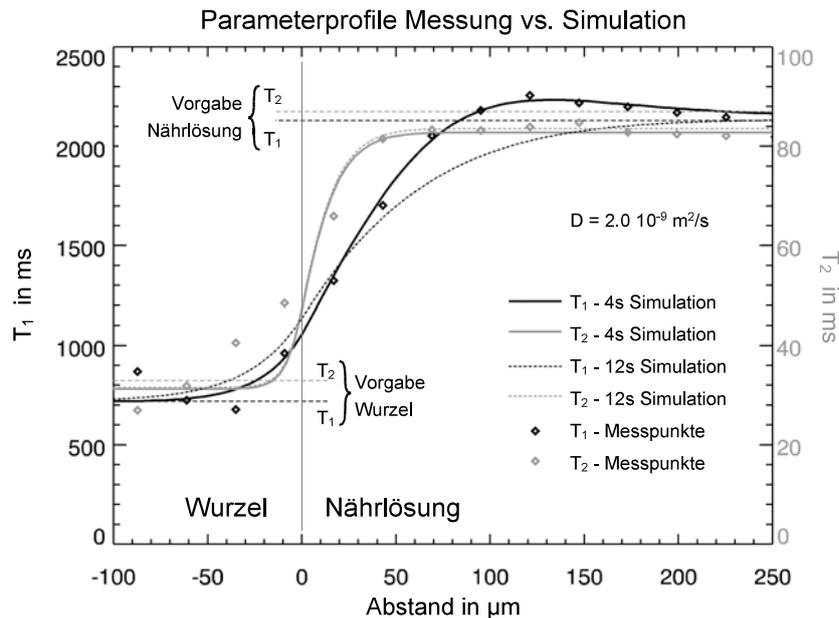


Abb. 42: Resultierende Relaxationszeiten bei der Simulation der Diffusion am Übergang zwischen der Wurzel mit effektiv  $T_1=720\text{ms}$  und  $T_2=33\text{ms}$  in das Umgebungsmedium mit  $T_1=2130\text{ms}$  und  $T_2=87\text{ms}$ . Zum Vergleich wurden aus den Abbildungen (21) und (22) bestimmte Messpunkte eingetragen. Für die punktierten Linien wurden die Relaxationszeiten durch einen Fit über 12s des Relaxationsverlaufs ermittelt, sonst basierend auf 4s Relaxationsverlauf wie bei der NMR-Messung.

messen wurde wie das des destillierten Wassers. Stärker noch als Wasser dringt es ins Holz ein, erfährt dort aber nahezu keine  $T_1$ -Reduktion. Ebenso fehlt der umgebende Ring mit reduziertem  $T_1$  um den Zahnstocher.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der weiße Ring

- im freien Medium um eine Probe entsteht,
- ausschließlich aufgrund einer  $T_1$ -Reduktion auftritt,
- in Zusammenhang mit einer  $T_1$ -Reduktion des Mediums in der Probe steht,
- unabhängig von aktiven Prozessen biologischer Proben ist.

Betrachtet man sich dazu die absoluten  $T_1$ - und  $T_2$ -Werte des Mediums in den Abbildungen (21) und (22) und vergleicht die entsprechenden Reichweiten des Effektes aus Abschnitt 8.4, wird klar, dass der dort beschriebene diffusionsgetriebene Inflow-Effekt (eigentlich eher „Outflow“) vorliegen muss.

Zum Beweis der Übereinstimmung mit der Theorie wurden aus den schon gezeigten  $T_1$ - und  $T_2$ -Karten einer Maiswurzel (vgl. Abbildungen (21) und (22)) Werte-Profile erstellt. In Abbildung (42) sind die erhaltenen Messpunkte aus diesen Profilen für den Grenzbereich zwischen Wurzel und Medium eingezeichnet. Deutlich ist zu erkennen, dass der Übergangsbereich von  $T_1$  wesentlich weiter in die Nährlösung hineinreicht als für  $T_2$ .

Das Computermodell für Übergänge zwischen Bereichen unterschiedlicher Relaxationszeiten aus Abschnitt 8.4 wurde wieder herangezogen. Das Volumen wurde auf 150 Schichten verlängert. In den ersten 50 wurde  $T_1=720\text{ms}$  und  $T_2=33\text{ms}$  gewählt, als Werte für die Hypodermis der Wurzel. In den restlichen 100 Schichten galt  $T_1=2130\text{ms}$  und  $T_2=87\text{ms}$ , wie im Nährmedium gemessen. Für diesen Übergang wurden die durch Diffusion resultierenden Relaxationszeit-Profile bestimmt. Das Ergebnis wurde als durchgezogene Linien ( $T_1$  schwarz und  $T_2$  grau) in die Grafik in Abbildung (42) eingezeichnet.

Außerhalb der Wurzel (positive Abstandswerte) stimmen die Kurven aus der Simulation perfekt mit den Messpunkten überein. Der überschießende Wert für  $T_1$  bei  $r=130\mu\text{m}$  resultiert aus einem Fitfehler der monoexponentiellen Relaxationskurve über einen nicht mehr rein exponentiellen zeitlichen Signalverlauf im Übergangsbereich. Dieser Fitfehler fällt jedoch nur ins Gewicht, wenn der Relaxationsverlauf nur zeitlich begrenzt abgetastet wird. Da die maximale Relaxationszeit (vgl.  $\delta t$  in Gleichung (7)) der NMR-Sequenz 4s betrug, wurde zur Vergleichbarkeit auch die Simulation nur für 4s der Systementwicklung durchgeführt. Als Ergebnis folgt selbst dieses Fit-Artefakt der Messdaten der theoretischen Vorhersage. Zum Vergleich wurde eine Simulation über 12s berechnet. Fittet man hier ebenfalls für jeden Ort die Relaxationsfunktionen an das Simulationsergebnis, erhält man die in Abbildung (42) gepunktet eingetragenen Verläufe. Für das gegenüber der ursprünglichen Simulationszeit von 4s bereits kurze  $T_2$  ergibt sich kaum eine Änderung. Der Verlauf von  $T_1$  enthält nun keinen „Überschwinger“ mehr und nähert sich erwartungsgemäß asymptotisch dem Wert der freien Lösung an.

Im äußeren Bereich des Wurzelgewebes (negative Abstandswerte in der Grafik) weicht der Verlauf der gemessenen Datenpunkte deutlich von denen der Simulationskurve ab. Das liegt daran, dass zu den gemessenen Relaxationszeiten hier Magnetisierung aus unterschiedlichen Zell- und Gewebekompartimenten beiträgt. Für den Diffusionseffekt spielen diese jedoch jeweils nur so weit eine Rolle, wie sie mit dem Umgebungsmedium in Austausch stehen. Die mittels Diffusion ins Außenmedium wirksamen effektiven Relaxationszeiten des Gewebes sind somit andere, als man als Mittelwert in den verschiedenen Gewebeschichten misst. Für die Simulation wurden iterativ diese effektiv wirksamen Relaxationszeiten bestimmt durch ein grobes Angleichen des unteren Kurvenverlaufs. Dieser ist für den Verlauf außerhalb, insbesondere für die Reichweite des Diffusionseffektes jedoch unerheblich, wie bereits in Abschnitt 8.4 gezeigt wurde.

Die Breite des Übergangsbereiches liegt für beide Relaxationszeiten wieder in der Größenordnung, die man erhält, wenn man die Zeiten des Umgebungsmediums in die Einstein-Smoluchowski-Gleichung einsetzt:  $160\mu\text{m}$  für  $T_1=2130\text{ms}$  und  $32\mu\text{m}$  für  $T_2=87\text{ms}$ . Für  $T_1$  wird dies durch den oben beschriebenen Fit-Überschwinger etwas verfälscht, passt aber zum Verlauf der punktierten Linie bei 12s Simulationszeit. Die Reichweite des Effektes für  $T_2$  liegt deutlich unter der für  $T_1$ , so

dass sich beide auch in einem zugleich  $T_1$ - und  $T_2$ -gewichteten Bild nicht kompensieren können. So resultiert eine effektive Signalerhöhung durch den diffusiv verteilten  $T_1$ -Kontrast.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, wie durch Diffusion zwischen Bereichen mit unterschiedlichen Relaxationszeiten ein Bildkontrast entsteht, der bisher in der Literatur nicht beschrieben worden ist. Die Reichweite der Wirkung der Diffusion auf die Relaxationszeit ist ausschließlich von der intrinsischen Relaxationszeit des Bereiches abhängig, in den hinein die Diffusion aus dem jeweils anderen Bereich bzw. Kompartiment erfolgt. Zum einen bewirkt dies eine prinzipielle Limitierung der Auflösung, mit der benachbarte Proben-Bereiche aufgrund ihres Relaxationskontrastes unterschieden werden können. Zum anderen ergibt sich dadurch zumeist ein völlig verschiedenes Verhalten von  $T_1$  und  $T_2$  hinsichtlich dieses Effektes einfach schon aufgrund der oft sehr großen Werteunterschiede von  $T_1$  und  $T_2$ . Wie gezeigt, kann auf dieser Grundlage z.B. die Abhängigkeit der Relaxationszeiten vom Feuchtigkeitsgehalt von Sand erklärt werden. Insbesondere liefert der Effekt jedoch eine Erklärung für den hellen Ring, der als bislang unverstandener Bildkontrast um Wurzeln und vergleichbare Proben in einem Umgebungsmedium in  $T_1$ -gewichteten NMR-Mikroskopien beobachtet wurde. Darüber hinaus sind weitere Anwendungen denkbar. So könnte beispielsweise der exakte Verlauf der Relaxationswerte an der Oberfläche von porösen Materialien herangezogen werden, um Rückschlüsse auf die Relaxationswerte im Inneren zu liefern, wenn diese nicht direkt messbar sind.

## 9 Anwendungen und biologische Ergebnisse

Das Ziel der bis hier vorgestellten Arbeiten, der entworfenen Hardware und entwickelten NMR-Methoden sowie der Analyse von Zusammenhängen zwischen NMR-Parametern, Bildkontrasten und physiologischen Eigenschaften von Pflanzengewebe ist deren Anwendung auf biologische Fragestellungen. Im Folgenden sollen die funktionellen Untersuchungen vorgestellt werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Pflanzen (-wurzeln) durchgeführt wurden, und welche Schlüsse sich aus den Ergebnissen ziehen lassen. Darüber hinaus werden weitere Möglichkeiten aufgezeigt, die die entwickelten Methoden bieten können, z.B. bei der Analyse dreidimensionaler Strukturen in Pflanzen. Durch Untersuchungen zur Aufnahme von NMR-Kontrastmittel in Wurzeln und die NMR-Eigenschaften von Sand als inhomogenem Umgebungssubstrat sollen außerdem die Grundlagen für die Planung zukünftiger Experimente an Pflanzenwurzeln erweitert werden.

### 9.1 Pflanzenwurzeln unter Trockenstress

Bei funktionellen Untersuchungen werden Erkenntnisse über physiologische Abläufe und Zusammenhänge ermittelt, indem die Änderung von physiologischen Größen über die Zeit verfolgt wird und damit z.B. Reaktionen auf äußere (definierte, künstliche) Reize beobachtet werden. Einer der wichtigsten methodischen Ansätze, um so etwas über den Wasserhaushalt und -transport von Pflanzen zu erfahren, sind Trockenstressexperimente. Dabei werden die Reaktionen der Pflanze auf mehr oder weniger starken bzw. lange andauernden Wasserentzug und auf die anschließende Wiederbewässerung gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Reaktionen in den Wurzeln von Maispflanzen auf Trockenstress und Wiederbewässerung untersucht. Mit den vorgestellten NMR-Methoden standen die Messung der Flussgeschwindigkeit in den Xylemgefäßen, die Spindichte sowie  $T_1$ - und  $T_2$ -Karten zur Verfügung. Die Spindichte entspricht dabei hauptsächlich der Wasserverteilung im Gewebe; die Relaxationszeiten geben Anhaltspunkte zur Konzentration gelöster Metabolite und Veränderungen der Kompartimentgrößen (Zelldurchmesser).

Ziel der im folgenden beschriebenen und diskutierten Messreihen war es, daraus auf die Funktion verschiedener Gewebe unter solchen Stressbedingungen zu schließen. Dabei konnte auch das Auftreten von Kavitationen in den Xylemgefäßen beobachtet werden sowie die Wiederbefüllung der so gasgefüllten Gefäße. Mittels Flussmessung konnte dabei auch erstmals der Nachweis erbracht werden, dass die wiederbefüllten Gefäße wieder voll funktionsfähig sind [KSTS<sup>+</sup>08].

#### 9.1.1 Experimentverlauf, Auswertung und Darstellung

Maispflanzen wurden unter den in Abschnitt 3.3 angeführten Bedingungen angezogen und in den Wurzelröhrchen in die Klimakammer des Probenkopfes überführt.

Je nach zur Verfügung stehender Messzeit wurden über 16h bis 24h (im Fall der gemeinsam vermessenen Pflanzen 16 und 17 über 37h)  $T_1$ - und Flussgeschwindigkeitskarten aufgenommen. Zugunsten der Zeitauflösung wurde auf  $T_2$ -Karten im Allgemeinen verzichtet. Es wurde bereits festgestellt, dass  $T_2$  bei funktionellen Beobachtungen oft nur geringe Variationen aufzeigt (Abschnitt 8.4). Um zu beurteilen, inwieweit die  $T_2$ -Gewichtung die Spindichte-Karten beeinflusst und ob sich aus den  $T_2$ -Werten doch Aussagen ergeben, wurde eine Messreihe (Pflanze 27) um eine  $T_2$ -Messung erweitert.

Vor dem Entfernen der Nährlösung wurde mindestens je eine Karte des Ausgangszustands aufgenommen. Die Nährlösung wurde aus den Wurzelröhrchen abgelassen, so dass eine gleichmäßig benetzende Menge Restflüssigkeit zurückblieb. Dadurch ist in den ersten Bildern jeder Messreihe häufig noch umgebende Nährlösung zu erkennen, die durch die Kapillarität zwischen den Röhrchen, Wurzeln und Seitenwurzeln gehalten wird. 3h bis 5h nach Beginn der Trockenstressphase wurde die Beleuchtung im Zuge des weitergeführten 'Tageszyklus' abgeschaltet. Bei zahlreichen Vorexperimenten hat sich für Maispflanzen des verwendeten Alters (7 Tage bis 15 Tage) und unter den genannten Bedingungen eine durchschnittliche Trockendauer von 6h als geeignet herausgestellt, um zum einen weitgehende Reaktionen beobachten zu können und zum anderen die Pflanzen nicht irreparabel zu schädigen. Die letzten 1h bis 3h dieser Trockenperiode fanden während der Dunkelphase statt, ebenso wie die Wiederbefüllung der Wurzelröhrchen mit Nährlösung. Während der restlichen Messdauer, die die restliche Dunkel- und die anschließende Tagphase umfasste, wurde die Regeneration verfolgt.

Neben den NMR-Karten wurden die Transpiration und die  $\text{CO}_2$ -Assimilation der Pflanzen mittels einer Gaswechsellmessanlage (vgl. Abschnitt 4.2) gemessen.

Zeitverläufe der NMR-Parameter, zusammen mit den Daten der Gaswechsellmessung, sind in Abbildung (43) gezeigt. In den Ausschnitten der Spindichtekarten dieser Messung (Abbildung (43-a)) sind neben der Hauptwurzel zwei kleine Seitenwurzeln zu sehen, sowie im ersten Bild verbliebene Nährlösung, die rechts die Innenwand des Probenröhrchens und links den Teilumriss einer Kapillaren zeigt. Diese an den Enden verschlossene Kapillare enthält Nährlösung als Signalreferenz. Jede Spindichtekarte wird auf den Mittelwert aus dieser Referenz normiert und Spindichtewerte darauf bezogen in relativen Einheiten (r.E.) angegeben. Die Zeitachse bzw. der Zeitindex aller Darstellungen bezieht sich auf die Uhrzeit des Tages, an dem die Messung gestartet wurde. Diese Angabe wurde, anstelle des willkürlichen Bezuges auf den Messungsbeginn, gewählt, um mögliche Tageszeiteffekte im Verhalten der Pflanzen erkennen zu können, die an den Tagesrhythmus der Aufzucht nach Abschnitt 3.3 gewöhnt waren.

Um die zeitliche Veränderung der Werte darzustellen, wurden, wie in Abschnitt 6 beschrieben, aus den Parameterkarten radiale Profile berechnet. Die Metaxy-

lemgefäße wurden bei dieser Berechnung ausgenommen und separat dargestellt (Abbildung (43) rechte Spalte). In den Höhenliniengrafiken in Abbildung (44-d) bis (-f) sind die Profile in zeitlicher Abfolge nebeneinander gelegt. Die Werte wurden farbkodiert. Nach oben ist der Radius der Wurzel aufgetragen, so dass von links nach rechts die zeitliche Entwicklung von Spindichte,  $T_1$  bzw.  $T_2$  sichtbar wird. Gleichzeitig lässt sich daran die Schrumpfung der Wurzel verfolgen. Die von links nach rechts verlaufenden weißen Linien zeigen den Radius des Zentralzylinders und den Außenradius der Wurzel an, wie er bei der Auswertung für die Profilermittlung nach Abschnitt 6 eingezeichnet wurde. An das Wurzelgewebe schließt sich oben in diesen Grafiken der luftgefüllte Raum der NMR-Küvetten an. Darüber wurde am oberen Rand der Darstellungen zum Vergleich der jeweilige Mittelwert aus der Referenzlösung eingetragen. Die durchgezogenen senkrechten Linien markieren den Anfang und das Ende der Trockenstressperiode, die gestrichelten Linien den Anfang und das Ende der Nachtphase.

Die Akquisitionsdauer einer NMR-Aufnahme betrug etwa 13 Minuten für die  $T_1$ -, 15 Minuten für die  $T_2$ - und 20 Minuten für die Fluss-Karte. Die in diesen Karten gemessenen Werte stellen damit Mittelwerte über diese Zeiträume dar. Eine Einzelmessung der im folgenden gezeigten Experimente bestand immer aus einem Kartensatz mit einer  $T_1$ -Karte und einer Fluss-Karte, im Fall von Pflanze 27 zusätzlich aus einer  $T_2$ -Karte. Als Zeitindex einer solchen Messung wurde die Startzeit der ersten Karte definiert.<sup>14</sup> Ein Messpunkt, der mit einer Änderung der Bedingungen (Licht an/aus, Bewässerung) zusammenfällt, zeigt oft bereits eine Reaktion auf diese Änderung, da seine Messzeit im Intervall zum nächsten eingezeichneten Punkt liegt.

---

<sup>14</sup>Genauer wäre es gewesen, als Zeitindex jeder Einzelkarte die Mitte ihrer Aufnahmedauer zu wählen. Da jedoch sowohl Flusskarten über  $T_1$ -Karten gelegt als auch  $T_1$ - und  $T_2$ -Karten als Grundlage für Spindichtekarten miteinander verrechnet wurden, musste ein Kartensatz als eine Einheit mit einem zugehörigen Zeitindex definiert werden.

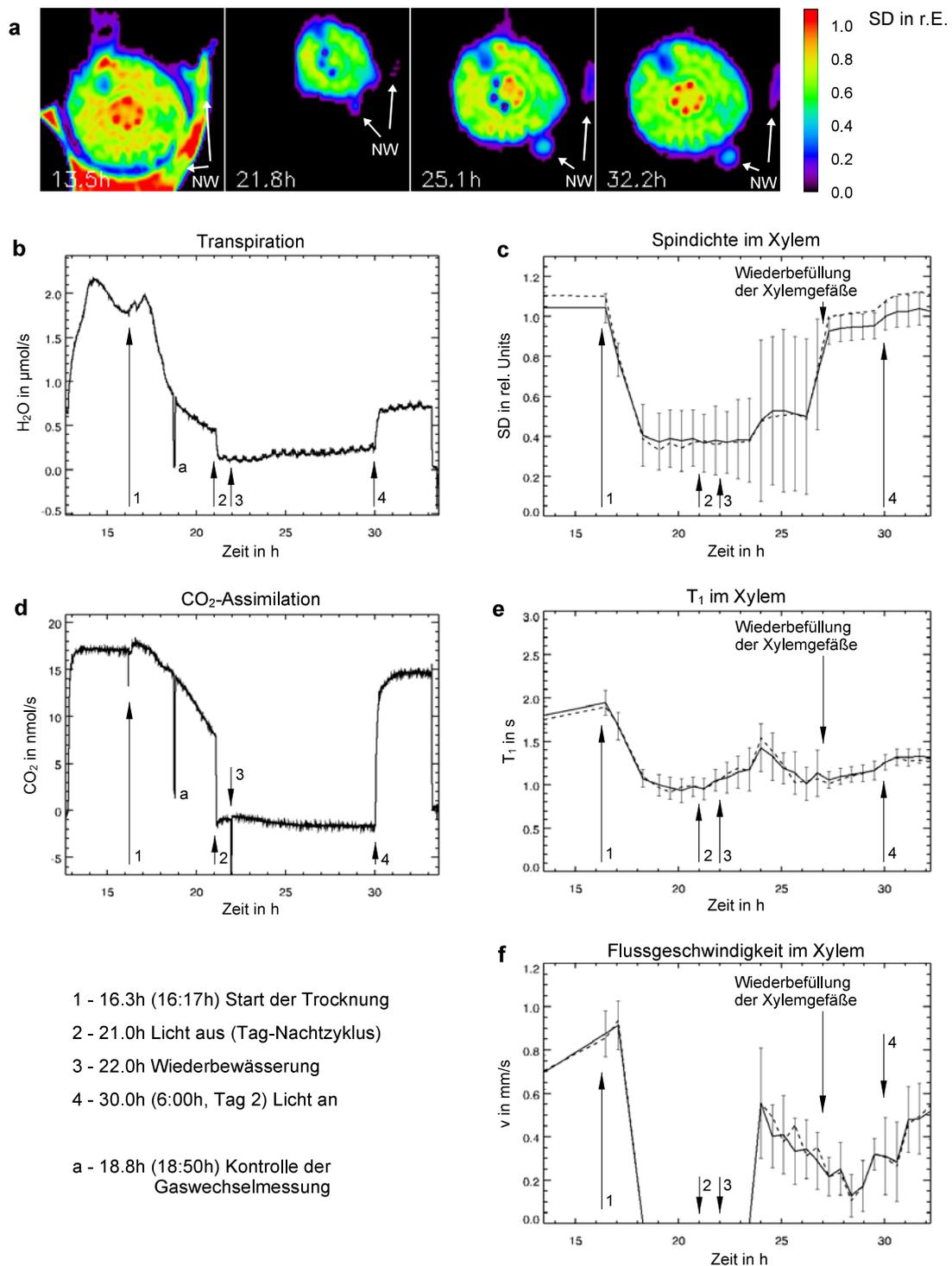


Abb. 43: Trockenstressreaktion von Pflanze 12. Die Ausschnitte aus den Spindichtekarten (a) zeigen den Schnitt durch die Hauptwurzel und zwei Nebenwurzeln (NW) vor und am Ende der Stressphase, während der Regeneration und am Ende der Messung. Darunter sind die Ergebnisse der Gaswechsellmessung (b und d) zu sehen und die zeitlichen Werteänderungen im Xylem der Pflanze, einschließlich der Flussgeschwindigkeit (c, e und f). Zum Zeitpunkt 24.3h werden die drei rechten eingefallenen und um 27.1h die linken leeren Xylemgefäße wiederbefüllt. In diesem Zeitintervall ergibt sich für den Mittelwert der Spindichte aller Xylemgefäße ein entsprechend großer Fehler. Die gestrichelten Linien zeigen den Werteverlauf in den mittleren Pixeln der Xylemgefäße, um mögliche „Partialvolume-Effekte“ mit dem umgebenden Gewebe zu beurteilen bzw. auszuschließen.

### 9.1.2 Normalwerte in Maiswurzeln

In den Spindichtebildern (Abbildung (43-a) aus dem  $T_1$ -Fit und Abbildung (44-a) einschließlich einer  $T_2$ -Korrektur) lassen sich die verschiedenen Gewebetypen klar unterscheiden. Tabelle (1) gibt einen Überblick über die gemessenen Werte. Die  $T_1$ -Karten lassen hingegen kaum eine Unterscheidung zwischen Zentralzylindergewebe und Xylem zu (Abbildung (44-b)). Vom Mittelpunkt mit 2.0s bis 2.5s zum Bereich des Vaskularrings mit 0.8s bis 1.5s fällt  $T_1$  nahezu linear ab (Abbildung (44-g), scharze Profillinie). Im inneren Bereich des Cortex' findet sich ein erneutes Maximum, je nach Pflanze zwischen 1.1s und 2.5s, dem ein weiterer Abfall nach außen bis auf 0.5s im Bereich der Wurzelrinde folgt.

Gewebe	Spindichte in r.E.	$T_1$ in s
Wurzelmittelpunkt	0.7 bis 0.8	2.0 bis 2.5
Metaxylemgefäße	1.0.	... monotoner
äußeres Zentralzylindergewebe	0.6	Abfall auf ...
Vaskularring	0.75 bis 0.9	0.8 bis 1.5
innerer Cortex	0.3 bis 0.6	1.1 bis 2.5
äußerer Cortex	0.5 bis 0.8	0.5

Tabelle 1: Übliche Spindichte- und  $T_1$ -Werte in verschiedenen Geweben der Maiswurzeln.

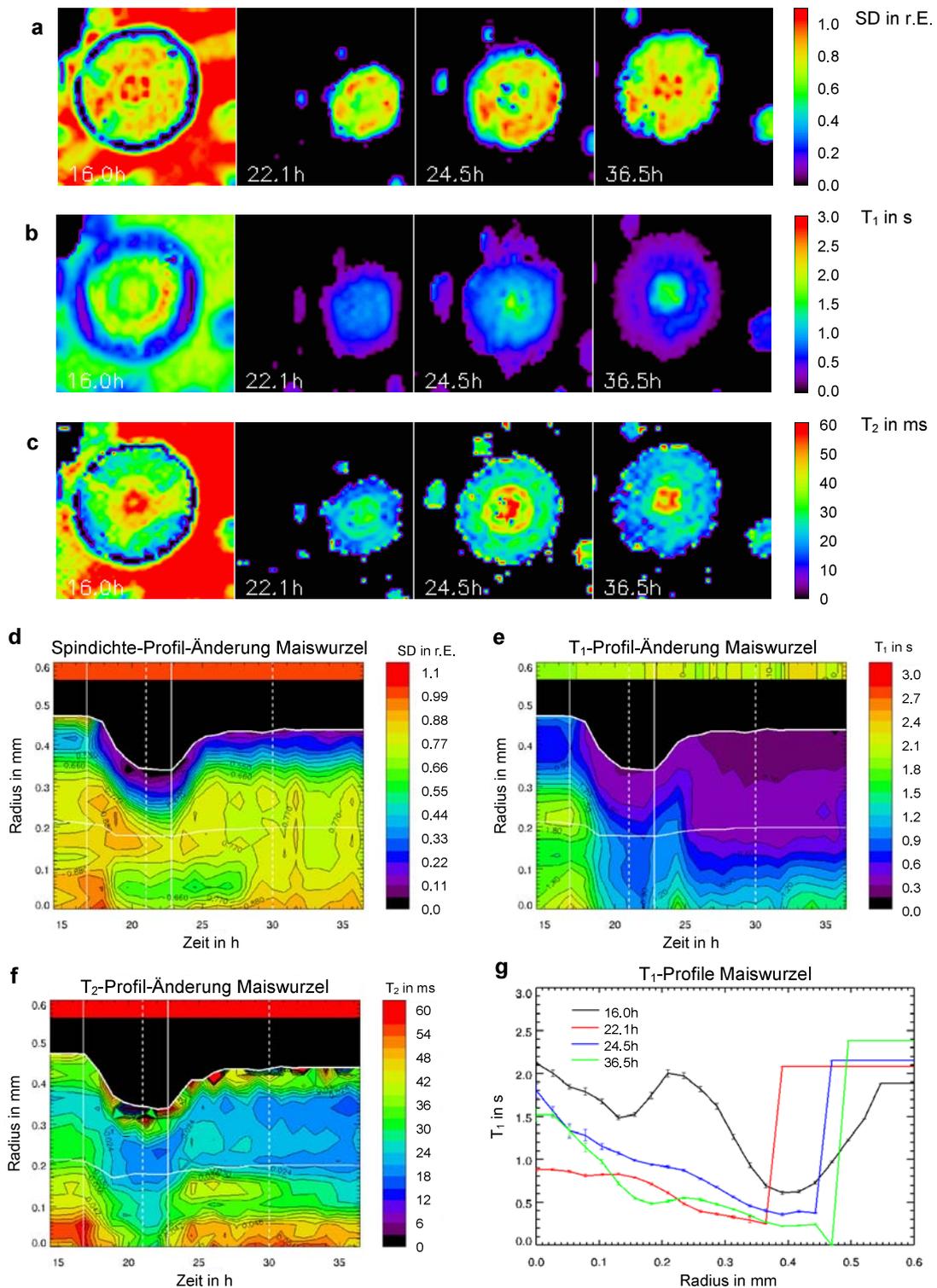


Abb. 44: Trockenstressreaktion von Pflanze 27. Die Ausschnitte aus den Parameterkarten (a bis c) zeigen den Schnitt durch die Hauptwurzel; von links nach rechts: bei Experimentbeginn, am Ende der Trockenphase, während der Regeneration, am Ende der Messung. In (d bis f) ist die zeitliche Entwicklung der Wertprofile zu sehen (Farbkodierung identisch zu den Parameterkarten; Werteverteilung ohne Xylem) sowie in (g) die Profile der vier oben gezeigten T<sub>1</sub>-Karten. Details im Text.

### 9.1.3 Reaktionen unter Trockenstress

Maximal eine Stunde nach Entfernung der Nährlösung ist die erste Veränderung der Wurzeln feststellbar. Grundsätzlich ist eine Reduktion der Spindichte-,  $T_2$ - und besonders der  $T_1$ -Werte in den Wurzeln beobachtbar. Die Abnahme des 'Wurzelradius' setzt spätestens 1.5h nach Trocknungsbeginn ein (vgl. Höhenlinienkarten Abbildung (44-d) bis (-f)).

#### Trocknung des Cortex

Einen auffälligen Unterschied in der Austrocknung des Cortex' gibt es zwischen Pflanzen mit viel und solchen mit wenig Aerenchym im Cortex. Zur Bestimmung des Aerenchymanteils wurden in den Spindichtekarten aus dem Cortex der Pflanzen die Regionen gleicher maximaler Intensität segmentiert. Der Spindichtemittelwert des kompletten Cortex' wurde auf den Mittelwert dieser als gasfrei interpretierten Bereiche bezogen, wodurch sich der Anteil des Aerenchym-freien Volumens in der gemessenen, 0.5mm dicken Schicht ergibt - unter einschließlicher Berücksichtigung von partial-Volume-Effekten. Tabelle (2) listet den so bestimmten Aerenchymanteil und zeigt, dass der Durchmesser des Cortex' um so stärker abnahm, je weniger Aerenchym vorhanden war. Die Pflanzen mit viel Aerenchym hatten eine deutlich geringere Ausgangs-Spindichte im Cortex, zeigten aber nur einen geringen Abfall dieses Wertes während des Trockenstresses. Erklären lassen sich beide Beobachtungen zum einen mit einem geringeren Ausgangswassergehalt, was zu einem geringeren absoluten Volumenverlust bei gleichem relativen Wasserverlust führt. Zum anderen unterbricht das Aerenchym die Wassertransportwege durch den Cortex, so dass hierdurch möglicherweise weniger Flüssigkeit aus dem Cortex in die Pflanze oder auch aus dem Zentralzylinder an die Umgebung abgegeben werden kann.

Im äußeren Cortex beginnen der Abfall von  $T_1$  und Spindichte nahezu zeitgleich, im inneren Cortex findet der Spindichteabfall um bis zu 3h verzögert statt (vgl.  $T_1$ -Höhenlinienkarte in Abbildung (44-d)). Besonders  $T_1$  zeigt die Tendenz, in Bereichen höherer Werte zuerst bzw. stärker abzufallen, so dass während der Trocknung eine homogenere Verteilung erreicht wird. In [VJK91] wurde für die SD- und  $T_1$ -Änderung bei Trockenstress in Farnstängeln ein ähnliches angleichendes Verhalten beschrieben. Geht man davon aus, dass beide Größen mit der Zellgröße und besonders  $T_1$  mit dem Wasserpotential [VJK91] des Gewebes korrelieren, zeigt dies, dass das Zell-Wasservolumen (in der Vakuole) der Pflanze als Reservoir dient. Einerseits verläuft die Ausschöpfung dieses Reservoirs von außen nach innen, um die funktionellen Teile der Wurzel zu schützen. Andererseits geben die großen Zellen des inneren Cortexbereiches mehr Flüssigkeit ab, da sich deren osmotischer Druck langsamer erhöht. Durch das größere Zellvolumen steigt bei gleicher absoluter Wasserabgabe die Konzentration der gelösten Substanzen langsamer an als in kleinen Zellen.

Zum Ende der Trockenperiode liegt  $T_1$  im gesamten Cortex unter 1s und fällt

Pflanze Nr.	11	12	13	14	15	16	17	27
Alter in Tagen	13	10	15	10	11	13	7	11
Wurzellänge in cm	40	28	40	25	33	26	14	25
Trockenstressdauer in h	7.0	6.0	6.0	6.5	6.5	5.8	5.8	6.0
$v_{Fluss}$ vor Stress in $\frac{mm}{s}$	1.0	0.9	0.9	0.6	0.8	0.8	–	0.6
$v_{Fluss}$ Stressbeginn in $\frac{mm}{s}$	1.0	0.9	1.1	0.8	0.9	0.8	–	0.5
Anteil Aerenchym im Cortex	34%	11%	23%	19%	15%	34%	35%	20%
Stärke Cortex trocken*	78%	62%	76%	68%	51%	72%	78%	63%
$\emptyset$ Zentralzylinder trocken*	88%	75%	99%	79%	91%	90%	90%	84%

Tabelle 2: Überblick über die Ergebnisse der Trockenstressexperimente. \*bezogen auf die Stärke bzw. den Durchmesser dieser Gewebeschicht im Ausgangszustand.

ebenso wie die Spindichte von innen nach außen monoton ab (vgl. Zeitindex 22.1h in den Höhenlinienkarten von Spindichte und  $T_1$  (Abbildung (44-d) und (-e), sowie die rote Profillinie in der  $T_1$ -Grafik in Abbildung (44-g)). Die aus anderen Gründen für die Darstellung gewählte Pflanze 27 zeigt eine extrem starke Reaktion auf den Trockenstress. In anderen Experimenten dieser Art ist die Angleichung an einen einheitlichen  $T_1$ -Wert im Cortex, bei insgesamt höherem Wert, deutlicher ausgeprägt. Als Übersicht über die verschiedenen Messreihen dient Tabelle (2).

### Trockenstressreaktionen im Zentralzylinder

Im Zentralzylinder ist lediglich im Vaskularring in allen Pflanzen eine vergleichbare Reduktion der Spindichte auf 80% bis 90% des Ausgangswertes zu beobachten. Im inneren Bereich des Zentralzylinders verlaufen die Reaktionen auf den Trockenstress häufig langsamer oder sind gar nicht zu beobachten oder aber durch Kavitationen in den Xylemgefäßen dominiert.

### Xylemfluss bei Trockenstress

Während der ersten 1h-2h der Trocknung bleibt der Fluss im Xylem erhalten (Abbildung (43-f)), bis er üblicherweise, besonders in Pflanzen mit mehreren kavitierten Gefäßen, innerhalb kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar ist. In den Pflanzen 13, 14 und 15, die später keine Kavitationen wiederbefüllten, stieg die Xylemflussgeschwindigkeit  $v_{Fluss}$  vor dem Abfall kurzfristig um 10% bis 20% an (vgl. Tabelle (2)). Diese Beobachtung teilt die untersuchten Pflanzen jedoch auf so kleine Gruppen auf, dass der Effekt nicht signifikant ist.

### 9.1.4 Regeneration nach Wiederbewässerung

Deutlich schneller als nach der Entfernung der Nährlösung erfolgt die Reaktion der Wurzelgewebe auf die Wiederbewässerung. Ohne nachweisbare Verzögerung setzt ein Anschwellen der Wurzel sowie Anstiege in den  $T_1$ - und Spindichtewerten aller Gewebe ein (vgl. Höhenlinienkarten in Abbildung (44-d) bis (-f)).

#### Reaktion des Xylems

Im Bereich der Metaxylemgefäße vieler Pflanzen durchläuft  $T_1$  ein Maximum und fällt dann wieder um 0.1s bis 0.3s, in zwei Fällen sogar um 0.5s und 0.8s ab. (siehe Abbildung (43-e)). Das Maximum dieses Überschingers liegt 1h bis 2.5h nach der Wiederbewässerung, kann aber zwischen 2h und 4h anhalten. Ihm folgt häufig eine schwächere und länger andauernde Erniedrigung des  $T_1$ -Wertes, bis sich allmählich ein Gleichgewicht einzustellen beginnt. Bei der einzigen  $T_2$ -Messreihe (Pflanze 27) wurde für  $T_2$  ein vergleichbarer Überschinger im Xylem gemessen.

Dieser überschießende  $T_1$ -Wert ist in kavitierten wie nicht kavitierten Gefäßen einer Pflanze gleichermaßen zu beobachten. Da im einen Fall das Umgebungsgewebe aufgrund des „partial Volume Effektes“, im anderen Fall der Saft im Gefäß den Messwert dominiert, bedeutet das, dass Xylemsaft und Xylem gemeinsam dieses Maximum durchlaufen. Offensichtlich spiegelt sich also darin eine Verdünnung der Ionenkonzentrationen und eine Weitung des Gewebes wider, die durch das schnell aufgenommene Wasser verursacht werden. Innerhalb von maximal 4h (über-) kompensiert die Pflanze diese Verdünnung durch eine Konzentrationserhöhung.

#### Reaktionen im Vaskularring

2h bis 3h nach der Wiederbewässerung erreicht die Spindichte im Vaskularring ein Maximum zwischen 85% und 95% des Ursprungswertes, das nach weiteren 3h bis 6h zumeist wieder abfällt (auf 75% bis 85% des Ursprungswertes).

Der Spindichtewert ist, aufgrund der dafür verwendeten  $T_1$ -Sequenz, leicht  $T_2$ -gewichtet. Der beschriebene SD-Überschwinger im Vaskularring ist der einzige beobachtete Effekt, bei dem diese  $T_2$ -Wichtung den funktionellen Verlauf der Spindichte maßgeblich beeinflusst. Sowohl in den  $T_2$ -Karten in Abbildung (44-c) als auch in der  $T_2$ -Höhenlinienkarte Abbildung (44-f) (beim Radiuswert von 0.15mm, zwischen Zeitindex 24h und 28h) ist der  $T_2$ -Anstieg im Bereich des Vaskularrings deutlich sichtbar. Aber auch nach einer  $T_2$ -Korrektur der SD-Karten ist dort der Überschinger noch vorhanden und beginnt sogar etwas früher als in  $T_2$ . Ein vergleichbarer  $T_1$ -Effekt fehlt im Vaskularring jedoch. In diesem Bereich liegt neben den „frühen“ Xylemgefäßen auch das Phloem, das hauptsächlich Metaboliten wie Zucker aus den Blättern transportiert. Gelöste organische Verbindungen wirken durch Protonenaustausch mit dem Wasser stark  $T_2$ -verkürzend. Ebenso wie kurz zuvor in den großen Metaxylemgefäßen scheint

hier eine vorübergehend überschießende Verdünnung des Saftes statt zu finden und/oder eine deutliche Weitung der Gefäße bzw. Zellkompartimente.

### Regeneration der Spindichte

In [VJK91] wurde bei der Wiederbewässerung von Farnen ein ähnlicher Überschwinger beobachtet, bei dem die Spindichte über den ganzen Stängelquerschnitt vorübergehend überschießend zunahm. Der oben beschriebene SD-Überschwinger, der im Vaskularring mit einem überschießenden  $T_2$  einhergeht, lässt sich in der Tat über den gesamten Wurzelquerschnitt beobachten. Deutlich wird das, wenn man die SD-Parameterkarten vergleicht, die während der Regenerationsphase und am Ende der Messung entstanden (Jeweils die beiden rechten Karten, der Reihen Abbildung (43-a) und Abbildung (44-a)).

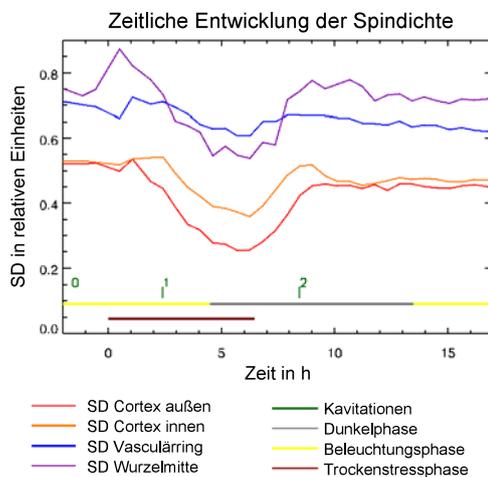


Abb. 45: Entwicklung der Spindichte in verschiedenen Gewebebereichen von Pflanze 15 mit Experimentverlauf.

mit dem SD-Maximum im Vaskularring, aber durchaus auch erst zeitgleich mit dem SD-Maximum im äußeren Cortex beobachtet.

Nach 6h war die Regeneration der Spindichte ebenso wie die des Wurzeldurchmessers weitestgehend abgeschlossen. Der Wurzeldurchmesser erreicht i.d.R. den Ausgangswert wieder, die Spindichte im Cortex etwa 90% des Ausgangswertes.

### Regeneration von $T_1$

Der Anstieg von  $T_1$  ist deutlich schwächer als sein Abfall, und auch auf lange Sicht (10h bis 20h) erreichte keine der Pflanzen im Cortex mehr als 70% ihrer Ausgangswerte wieder. Jedoch scheint die Regeneration dieses Wertes zum Ende der Messungen nicht abgeschlossen (vgl. Abbildung (46), der abweichende Verlauf von Pflanze 27 aus Abbildung (44-e) wird später erörtert). Im Zentralzylinder wurden 80% bis 90% des ursprünglichen  $T_1$  wieder erreicht.

Betrachtet man die SD-Regeneration in verschiedenen Gewebebereichen einzeln (Abbildung (45) oder auch Abbildung (44-d)), sieht man, dass der Anstieg und auch das Maximum für verschiedene Gewebe zu unterschiedlichen Zeiten liegen. Deutlich zeigt sich, dass zuerst ein Anstieg im Vaskularring erfolgt; danach ist er im inneren Cortex, mehr oder weniger verzögert im Wurzelmittelpunkt und deutlich später im äußeren Cortex zu beobachten. Diese Reihenfolge war bei allen untersuchten Pflanzen identisch. Das Maximum des oben beschriebenen Überschwingers im  $T_1$ -Wert des Xylemsaftes variiert in seinem Auftreten innerhalb dieser Reihe hingegen. Er wurde frühestens

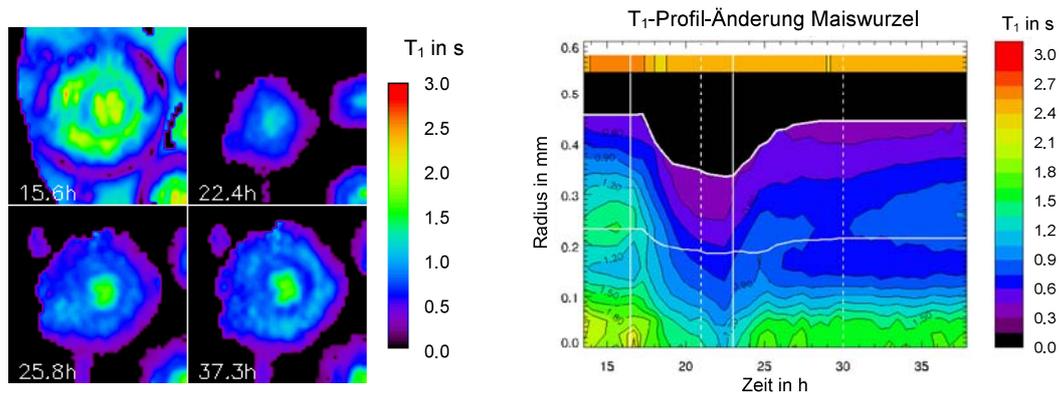


Abb. 46:  $T_1$ -Änderung der Trockenstressreaktion von Pflanze 14. Die Ausschnitte aus den Parameterkarten links zeigen den Schnitt durch die Hauptwurzel vor und am Ende der Stressphase, während der Regeneration und am Ende der Messung. Rechts ist die zeitliche Änderung des  $T_1$ -Profils zu sehen. Die durchgezogenen waagrechten Linien markieren den Radius des Zentralzylinders bzw. der gesamten Wurzel, die senkrechten durchgehenden Linien Beginn und Ende der Trockenstressphase und die senkrechten gestrichelten Beginn und Ende der Nachtphase.

### 9.1.5 Reaktionen auf erneute Beleuchtung

Während der Regenerationsphase, zwischen 6h und 8h nach der Wiederbewässerung, begann die nächste Beleuchtungsphase. Bei Beginn der Beleuchtung erhöht sich in den Pflanzen 11, 12 und 13, die zeitgleich eine deutliche Zunahme der Flussgeschwindigkeit zeigen,  $T_1$  im Xylem um 0.1s bis 0.3s (vgl. Tabelle (3)) und die SD um 0.03r.E. bis 0.08r.E. (siehe auch Abbildung (43-c), (-e) und (-f)). In den restlichen Pflanzen ist keine  $T_1$ -Erhöhung zu diesem Zeitpunkt festzustellen, in einzelnen eine leichte Zunahme des Flusses. Die Pflanzen 14, 15 und 16 sind dabei jene, in denen kavitierte Gefäße nicht wiederbefüllt werden (vgl. Abschnitt 9.1.7). Die junge Pflanze 17 besitzt noch kein aktives großes (sog. „spätes“) Metaxylem und weist Fluss ausschließlich im „frühen“ Metaxylem des Vaskularringes auf. In Pflanze 27 lässt sich der Beleuchtungsbeginn nicht eindeutig als Ursache dem Anstieg von  $T_1$  und Flussgeschwindigkeit zuordnen, da hier die Xylemwiederbefüllung erst während der letzten beiden Messungen davor stattfand. Der Anstieg des  $T_1$ -Wertes mit zunehmendem Fluss lässt sich als eine weitere Verdünnung des Xylemsaftes interpretieren, da die Pflanze nun deutlich mehr Wasser transportiert. Tabelle 3 zeigt den nach Gleichung (11) berechneten Verdünnungseffekt (eingetragen ist der reziproke Wert, der bei gleichbleibender gelöster Stoffmenge der Volumenzunahme entsprechen sollte). Dafür wird  $T_{1.intr.} = 4s \pm 1s$  geschätzt<sup>15</sup>.

<sup>15</sup>In diesem Bereich liegt unter den vorliegenden Bedingungen (Feldstärke, Temperatur) die  $T_1$ -Zeit von gereinigtem Wasser; der Fehler wird sehr groß angenommen, um zu zeigen, dass die aus den deutlich kleineren und genaueren Messwerten berechnete Konzentrationsänderung nur gering vom geschätzten  $T_{1.intr.}$  abhängt.

Pflanze Nr.	11	12	13
$T_{1.Xylem}$ Ende DP in s	0.93	1.15	1.22
$T_{1.Xylem}$ Beginn LP in s	1.08	1.32	1.50
$c_{EndeDP}/c_{BeginnLP}$	$1.22\pm 0.02$	$1.22\pm 0.03$	$1.37\pm 0.06$
$v_{Fluss}$ Ende DP in $\frac{mm}{s}$	$0.65\pm 0.10$	$0.35\pm 0.15$	$0.34\pm 0.15$
$v_{Fluss}$ Beginn LP in $\frac{mm}{s}$	$1.00\pm 0.40$	$0.52\pm 0.15$	$0.72\pm 0.20$
$V_{Fluss.BeginnLP}/V_{Fluss.EndeDP}$	$1.54\pm 0.66$	$1.49\pm 0.77$	$2.12\pm 1.10$

Tabelle 3: Verdünnung des Xylemsaftes bei Beginn der Beleuchtungsphase. Als Fehler der Flussgeschwindigkeiten werden die Standardabweichungen aus der Mittelwertbildung der Flusskarten angegeben. Über das Fehlerfortpflanzungsgesetz ergeben sich daraus die Fehler der Volumenflussänderung, die der Konzentrationsänderungen ergeben sich aus einem großzügig geschätzten  $\Delta T_{1.intr.} = \pm 1s$ . DP bezeichnet die Dunkel- und LP die Beleuchtungsphase.

Gleichzeitig nimmt die Xylemflussgeschwindigkeit zu, was zu einer Volumenfluss-erhöhung führt, wie in Tabelle 3 angeführt.

Die aus der Konzentrationsänderung bestimmte Verdünnung des Xylemsaftes liegt in allen drei Fällen deutlich unter der Verdünnung, die sich aus dem erhöhten Flussvolumen ergeben würde. Daraus lässt sich schließen, dass mit Beginn der Beleuchtung auch die Menge der transportierten Substanzen im Xylemsaft zunimmt, jedoch nicht in dem Maße wie das Flüssigkeitsvolumen.

### 9.1.6 Entstehung von Kavitationen

Unter Kavitationen versteht man das Abreißen der Flüssigkeitssäule in den Xylemgefäßen, woraufhin sich eine „Embolie“, ein gasgefüllter Xylembereich, bildet. Auslöser für Kavitationen können z.B. mechanische Beanspruchung der Pflanze, Kälteeinwirkung oder eben besonders Trockenstress sein. Die genauen Vorgänge, die zur Entstehung und insbesondere zur Regeneration von Kavitationen führen, sind nicht endgültig verstanden und werden stark diskutiert (siehe z.B. [ZH00, BSG<sup>+</sup>03, DSB<sup>+</sup>06]), da sie eine Schlüsselrolle beim Verständnis der Mechanismen des Wassertransportes in Pflanzen spielen. Die erfolgreiche Beobachtung von Kavitationen in Einzelgefäßen mittels NMR-Bildgebung wurde erst in vier Fällen beschrieben: in einer Weinpflanze bei Trockenstress [HABZ01], Lianen unter verschiedenen Bedingungen [CC03], jungen Kiefern aufgrund von Fadenwurmbefall [UFS05] sowie einer Gurkenpflanze nach Kälteeinwirkung auf die Wurzeln [SVHVA07]. In allen Fällen wurden die Messungen an den Pflanzenstängeln durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu Kavitationen und ihrer Wiederbefüllung, die bei den Trockenstressmessungen in den Wurzeln aufgetreten sind, sollen im Folgenden dargestellt und diskutiert werden.

Pflanze Nr.	11	12	13	14	15	16	17	27	52	53	54	55
Anz. Metaxylemgefäße	6	6	5	6	7	7	5	5	7	7	6	7
beob. Kavitationen	1	3	0	2	2	4	0	4	3	0	0	1
beob. Wiederbefüllungen	1	3	-	0	0	0	-	4	3	-	-	1
davon zeigten Fluss	1	1	-	-	-	-	-	4	3	-	-	0

Tabelle 4: Überblick über die Anzahl der großen „späten“ Metaxylemgefäße und den darin beobachteten Kavitationen und Wiederbefüllungen aufgrund von Trockenstress und Wiederbewässerung.

Tabelle (4) gibt einen Überblick über die Anzahl der großen Metaxylemgefäße jeder Pflanze, die mit der NMR-Mikroskopie zu erkennen waren. Für Pflanze 12 ist in den Spindichtekarten in Abbildung (43-a) sehr gut nachzuvollziehen, wie durch den Trockenstress in 3 der 6 Gefäße eine sichtbare Kavitation auftrat und nach der Wiederbewässerung wiederbefüllt wurde. Der zeitliche Verlauf ist auch deutlich im mittleren Spindichtewert der Xylemgefäße zu erkennen (Abbildung (43-c)).

Im gefüllten Xylem ist  $T_1$  mit 1.5s bis 2.0s mit dem  $T_1$ -Wert im Wurzelzentrum vergleichbar. Ein gefülltes Gefäß scheint in den  $T_1$ -Karten somit Teil des mittleren Bereiches des Zentralzylinders zu sein. Ein „leeres“ Metaxylemgefäß erscheint aufgrund des Partial-Volume-Effektes in der  $T_1$ -Karte mit dem mittleren  $T_1$ -Wert des Umgebungsgewebes, sofern das Signal für einen Fit ausreicht (vgl. Abbildung (44-b) und 48). Da  $T_1$  im Zentralzylindergewebe außerhalb des Ringes mit den großen Metaxylemgefäßen deutlich niedriger ist als im Zentrum, zeigt ein „leeres“ Xylemgefäß daher meist einen im Mittel etwas niedrigeren  $T_1$ -Wert als ein volles.

Die ersten Kavitationen traten in den Pflanzen 1.6h bis 3.8h nach dem Beginn des Trockenstresses auf. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle Kavitationen in einer Pflanze innerhalb von maximal 1h sichtbar. Ob sie zu genau diesen Zeiten stattfanden oder dann erst in der Messschicht „ankamen“, lässt sich nicht feststellen. Oft zogen sich die Gefäße während der Austrocknung stark zusammen bzw. schienen eingefallen zu sein, wie z.B. die rechten Gefäße in Pflanze 12 (vgl. zweites Bild (22.10h) in Abbildung (48), Seite 93). Solche Gefäße zeigten sich durch die Regeneration nach der Wiederbewässerung aber wieder unmittelbar als flüssigkeitsgefüllt. In zwei Fällen (Pflanzen 14 und 27) trat hier jedoch während des „Aufquellens“ der Wurzel eine neue Kavitation auf, möglicherweise dadurch bewirkt, dass die damit einhergehende Ausdehnung des eingefallenen Gefäßes schneller ablief, als Flüssigkeit in das Gefäß einströmen konnte. Den zeitlichen Verlauf der Kavitationsanzahlen in den verschiedenen Pflanzen zeigt Abbildung (47). Ob oder wie viele Kavitationen in einer Pflanze auftraten, war im Rahmen der Messreihe völlig zufällig, insbesondere mit keinem anderen beobachteten Parameter zu korrelieren. Zufällig war auch die Verteilung mehrerer

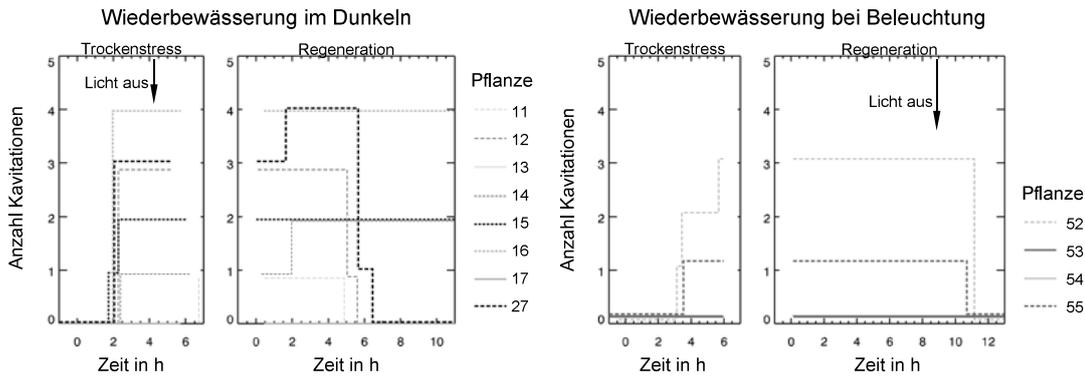


Abb. 47: Zeitlicher Verlauf der Kavitationsereignisse und deren Wiederbefüllung während der Trockenstressexperimente. Die Pflanzen der linken Grafik wurden während der Dunkelphase wiederbewässert, die der rechten Grafik während der Beleuchtungsphase, und hier wurde erst 9h später die Beleuchtung ausgeschaltet. Jeder Graph ist in zwei Zweige aufgeteilt, mit dem Beginn des Trockenstresses bzw. dem Wiederbewässerungszeitpunkt als Zeitindex 0h. Zur besseren Unterscheidbarkeit der Graphen-Verläufe wurde jeder mit einem leichten vertikalen Offset versehen.

Kavitationen innerhalb einer Wurzel, d.h. die Kavitation benachbarter Gefäße (wie zufällig in Pflanze 12, Abbildung (48)) trat nicht bevorzugt auf.

### 9.1.7 Wiederbefüllung von Gefäßen nach Kavitation

Die Dynamik der Wiederbefüllung einzelner kavittierter Xylemgefäßen ist in der Literatur praktisch nicht beschrieben. Neben der NMR ist kein anderes Verfahren bekannt, mit dem die Wiederbefüllung einzelner Gefäße überhaupt direkt beobachtet werden kann, und dies ist bislang erst in zwei weiteren Fällen veröffentlicht worden [HABZ01, SVHVA07]. Die erneute Funktionalität, d.h. erneuter Fluss in diesen wiederbefüllten Gefäßen, konnte von diesen jedoch nicht gezeigt werden. Andere Untersuchungsmethoden stützen sich auf indirekte Messungen. Wie viele Kavitationen auftreten, wird z.B. anhand der hydraulischen Leitfähigkeit des Xylems (z.B. [SLGDPZ96]) oder des Anteils gasgefüllter Gefäße bewertet. Einzelne Gefäße werden mit der sog. „Cryogenic scanning electron microscopy“ (kurz Cryo-SEM) untersucht (z.B. [MHL98]), bei der elektronenmikroskopisch die Querschnitte von in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Pflanzen betrachtet werden. Bei all diesen Methoden werden die Pflanzen jedoch in jedem Fall zerstört, und ob die invasive Behandlung der Pflanzen korrekte Ergebnisse für Kavitationen liefert, ist umstritten. Entstehung und Wiederbefüllung von Kavitationen über einen Experimentverlauf hinweg können so nur durch die statistische Auswertung vieler Pflanzen gewonnen werden. Der Zeitverlauf, insbesondere das Verschwinden der Kavitationen in einer Pflanze oder gar einem einzelnen Xylemgefäß, ist nur durch eine nichtinvasive Methode wie der NMR möglich. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Trockenstressexperimente im Hinblick auf

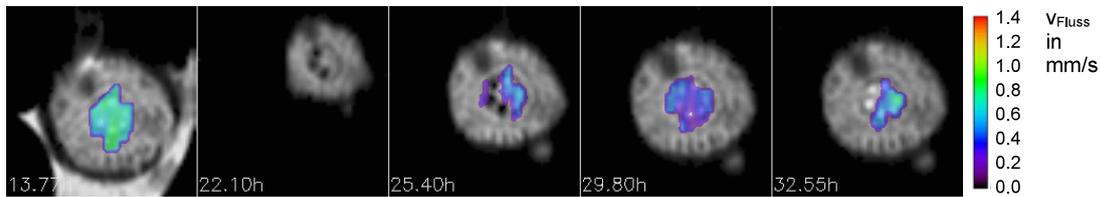


Abb. 48: Flusskarten für Pflanze 12 (128pkt x 32pkt, 4mm Schichtdicke) überlagert den entsprechenden Spindichte-Karten (128pkt x 128pkt, 0.5mm Schichtdicke, aus  $T_1$ -TSE,  $T_E=8.8$ ms). Für den Zeitverlauf vgl. Abbildung (43-f). Nach der Wiederbefüllung der Kavitationen ist wieder Fluss in diesen Gefäßen messbar, der jedoch in zweien davon später verschwindet (Diskussion im Text).

die beobachteten Wiederbefüllungen dargelegt werden. Insbesondere wurde auch eine neue Methode entwickelt, um zu messen, mit welcher Geschwindigkeit die Wiederbefüllung eines Einzelgefäßes abläuft.

### Zeitpunkt und Bedingungen für Xylem-Wiederbefüllung

In den Pflanzen 11, 12 und 27 fand die Wiederbefüllung des Xylems 5h bis 6h nach der Wiederbewässerung ausschließlich in der Dunkelphase statt und damit am Ende der früher beschriebenen Geweberegeneration (linke Grafik in Abbildung (47)). In den Pflanzen 14, 15 und 16, die ebenfalls Kavitationen aufwiesen, erfolgte während der Regenerationsphase in Dunkelheit keine Wiederbefüllung und konnte im Rahmen der Messdauer von weiteren 5h bis 10h unter Beleuchtung auch nicht beobachtet werden.

Eine hier nicht gezeigte Pflanze der Vorexperimente mit 5 (von 7) bereits bei Messungsbeginn vorhandenen Embolien wurde erst nach Beginn der Beleuchtungsphase wiederbewässert. Hier befüllte sich das Xylem erst weitere 9h später, in der ersten Stunde der nächsten Dunkelphase. Das Gleiche gilt für die im Folgenden beschriebenen Pflanzen 52 und 55. Diese wurden unter Beleuchtung wiederbewässert. Die Geweberegeneration (SD- und Durchmesserzunahme) verlief im üblichen Zeitrahmen. Erst 9h nach der Wiederbewässerung endete die Beleuchtungsphase. 1h bis 2h nach dem Beginn der Dunkelphase konnte die Wiederbefüllung der Embolien beobachtet werden (rechte Grafik in Abbildung (47)).

### Xylem-Wiederbefüllung und Flussmessung

Zum ersten Mal konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in wiederbefüllten Gefäßen Fluss nachweisbar ist, dass die Gefäße also nach einer Kavitation ihre Funktionalität wiedererlangen können.

Abbildung (48) zeigt Flusskarten von Pflanze 12 (vgl. auch Abbildung (43)). Zu erkennen ist deutlich der fehlende Fluss während der Trockenphase (22.10h) sowie in den kavitierten Gefäßen während der Regeneration (25.40h). Mit sichtbar wiedergefüllten Xylemgefäßen ist auch gleichzeitig wieder Fluss messbar (29.80h).

Dieser ist in der Dunkelphase in allen Gefäßen etwa gleich (niedrig) und steigt mit beginnender Beleuchtung deutlich an (vgl. auch Tabelle 3). In zwei der zuvor wiederbefüllten Xylemgefäße setzt der messbare Fluss jedoch zu diesem Zeitpunkt aus (32.55h). Zwei Erklärungen hierfür sind denkbar: Zum einen waren beide Gefäße möglicherweise nur scheinbar gefüllt und der zuvor gemessene Fluss stammt aus einer verhältnismäßig kurzen „Wassersäule“, die sich nach oben verschoben hat, darüber und darunter aber nach wie vor gasgefüllte Bereiche besaß. Dem widerspricht jedoch die zu hohe Geschwindigkeit des Flusses, die die im Folgenden gemessene Aufstiegsgeschwindigkeit in einem kavitierten Gefäß weit übersteigt, stattdessen aber der Geschwindigkeit in den durchgehend gefüllten Gefäßen entspricht. Wahrscheinlicher ist, dass bei beginnender Beleuchtung außerhalb der Messebene eine neue Kavitation aufgetreten ist. In jedem Fall sind beide Gefäße in ihrer Funktionalität gestört und tragen, entgegen dem dritten wiederbefüllten, nicht zum Wassertransport bei. In den anderen Parametern ( $T_1$ , Spindichte) unterschieden sich beide Gefäße jedoch nicht von den funktionellen. Überhaupt lässt sich weder in  $T_1$  noch in der einen  $T_2$ -Messung ein Unterschied zwischen wiederbefüllten und nichtkavitierten Gefäßen feststellen. Unmittelbar ab der Wiederbefüllung folgt der Verlauf der Relaxationszeiten in den vorab kavitierten Gefäßen dem in den nicht kavitierten.

Die diskutierte Messung konnte die Vorschläge aus [HABZ01] und Feststellung in [SVHVA07] bestätigen, dass eine Flussmessung in scheinbar wiederbefüllten Gefäßen notwendig ist, um die Funktionalität und damit eine tatsächlich Wiederbefüllung belegen zu können.

### **Aufstiegsgeschwindigkeit des Saftes**

Wie eingangs erwähnt, ist der zeitliche Verlauf der Wiederbefüllung von Embolien in Einzelgefäßen bislang praktisch nicht beschrieben. Daher ist es auch nahezu unbekannt, wie schnell ein kavitiertes Gefäß wieder mit Flüssigkeit aufgefüllt wird, bzw. ließen sich hierzu bislang erst aus zwei völlig unterschiedlichen Beobachtungen Anhaltspunkte finden, die später diskutiert werden sollen. Die in früheren Abschnitten gezeigten Spindichtekarten mit einer Zeitauflösung von 33min ließen für die Wiederbefüllung der Messschicht eine Größenordnung von wenigen Minuten erwarten. Um diese Dynamik genauer zu untersuchen, die für die bisher verwendeten NMR-Flussmessmethoden offensichtlich zu langsam abläuft, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neue Methode entwickelt.

Da die Befüllung eines Leerraumes gemessen werden sollte, lag der Ansatz nahe, dafür die zeitliche Zunahme des NMR-Signals heranzuziehen. Um eine höhere zeitliche Dynamik als mit den sonst verwendeten Parameterkarten zu erzielen, wurde dafür eine einfache Spinecho-Sequenz verwendet. Würde die Befüllung der Messschicht über mehrere Aufnahmen hinweg erfolgen, könnte so aus dem Anstieg der Signalstärke über die Zeitreihe hinweg die Befüllgeschwindigkeit be-

stimmt werden. Leider war zu erwarten, dass die Dauer für die Befüllung einer Messschicht von 0.5mm deutlich unterhalb der Aufnahmedauer eines Bildes liegen werde. Auch für eine deutlich dickere Schicht konnte dieses Problem nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Daher wurde als Ausgangspunkt für die Messung die gleichzeitige Aufnahme mehrerer transversaler Schichten durch die Wurzeln verwendet. Setzt man voraus, dass die Wiederbefüllung durch einen konstant ansteigenden Saftspiegel erfolgt, werden diese Schichten in einer eindeutigen Reihenfolge nacheinander befüllt. Selbst wenn dies während einer Messung für alle Schichten relativ kurz nacheinander geschieht, schlägt es sich in einem unterschiedlichen Gesamtsignal der jeweiligen Schicht nieder - abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt während der Messung sie befüllt wurde. Aus dieser Variation des Signals über die Schichten hinweg kann einerseits bestätigt werden, dass die Befüllung tatsächlich mittels eines ansteigenden Saftspiegels erfolgt. Andererseits kann daraus die Geschwindigkeit ermittelt werden.

Für diese Untersuchungen wurde das Avance500 herangezogen, das sonst wie in 4.1 beschriebene, mit einer neuen Konsole versehene AMX500. Mit einer Multislice-Spinocho-Sequenz wurden 3 transversale, 0.5mm dicke Schichten mit einem Abstand von 2.0mm aufgenommen (2.5mm Abstand von Schichtmitte zu Schichtmitte). Die Auflösung in der Bildebene ( $39\mu\text{m} \times 39\mu\text{m}$ ) und das FOV (5mm x 5mm) wurden analog zu den bisherigen Messungen gewählt. Die Repetitionszeit und Echozeit von  $T_R = 2.0\text{s}$  bzw.  $T_E = 7.3\text{ms}$  ergaben hauptsächlich Spindichtegewichtete Bilder. Mit zwei Mittelungen dauerte eine Aufnahme 8.9min.

Innerhalb einer Repetitionszeit wurde der jeweils gleiche Phasenschritt für alle drei Schichten mit einem Zeitversatz von 0.66s aufgenommen. Die Mittelung erfolgte zeilenweise, d.h. jeder Phasenschritt wurde unmittelbar nacheinander doppelt ausgeführt. Die Phasenkodierung erfolgte linear ansteigend und startete im negativen k-Raum, so dass die k-Raum-Mitte auch während der Mitte der Akquisitionszeit von 8.9min durchlaufen wurde.

Aus den aufgenommenen Zeitreihen der drei Schichten konnten die Geschwindigkeiten abgeschätzt werden, mit denen die Embolien wiederbefüllt wurden. Dafür wurde eine Funktion  $S(p,T)$  aufgestellt, die die Signalstärke in Abhängigkeit von der Schichtposition  $p$  und der Startzeit  $T$  einer NMR-Messung angibt. Da in Voxeln, die ausschließlich Xylemsaft (oder eben nichts) beinhalten, alle anderen Parameter konstant bleiben, ist die Signalstärke direkt proportional zur mittleren Befüllung des Bildvoxels.

Ausgangspunkt für diese Berechnung ist also der Anteil  $F(t_{rise})$  eines Bildvoxels im Xylem, der mit signalgebender Flüssigkeit gefüllt ist. Dabei ist  $t_{rise}$  der Zeitindex für die Beschreibung des Saftanstiegs innerhalb einer Schicht, mit  $t_{rise}=0$ , wenn der Saftspiegel die untere Grenze dieser Bildgebungsschicht erreicht.  $F(t_{rise})$  ist somit eine abschnittsweise definierte Funktion:

$$F(t_{rise}) = \begin{cases} 0 & \text{für } v_{rise} \cdot t_{rise} < 0 \\ v_{rise} \cdot \frac{t_{rise}}{d} & \text{für } 0 \leq v_{rise} \cdot t_{rise} \leq d \\ 1 & \text{für } d < v_{rise} \cdot t_{rise} \end{cases}$$

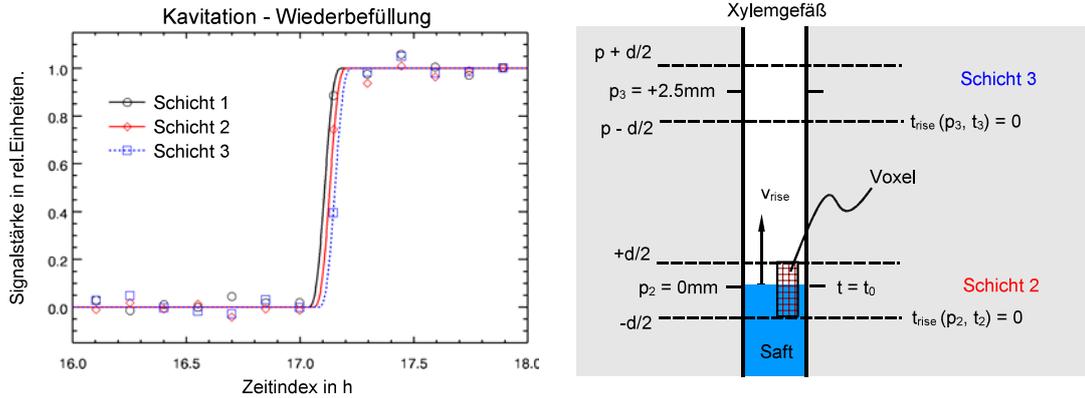


Abb. 49: Bestimmung der Aufstiegs geschwindigkeit des Saftspiegels im kavitierten Xylem von Pflanze 52, Kavitation 2 aus den Signalstärken. Zur Übersichtlichkeit sind im Schema rechts nur die mittlere und obere der drei Schichten dargestellt. Details im Text.

Wie auch rechts in Abbildung (49) zu sehen, ist  $d=0.5\text{mm}$  die Schichtdicke und  $v_{rise}$  die gesuchte Aufstiegs geschwindigkeit.

Ausgehend von drei verschiedenen Schichten an den Positionen  $p = \{-2.5\text{mm}, 0\text{mm}, +2.5\text{mm}\}$ , die der Reihe nach vom Saft gefüllt werden, kann man eine Zeittransformation zwischen dem  $t_{rise}$  jeder Schicht und einer allgemeinen Experimentzeit  $t$  angeben:

$$t_{rise}(p, t) = t - t_0 - \frac{p - d/2}{v_{rise}}$$

$t_0$  ist dabei als der Zeitpunkt der Experimentzeit  $t$  definiert, zu dem der Saftspiegel den Mittelpunkt der mittleren der drei Schichten erreicht.

Zusammen mit  $t_{rise}(p, t)$  beschreibt die obige Funktion  $F$  für jede Schicht den Füllzustand eines Xylemvoxels in Abhängigkeit von der Experimentzeit  $t$ . Wenn jedes aufgenommene Echo identisch zum Gesamtsignal beiträgt, wenn also die Empfindlichkeit der Messung über den gesamten Akquisitionszeitraum konstant bleibt, erhält man die gesuchte Funktion  $S(p, T)$  durch einfache Integration von  $F(p, t)$  über den Akquisitionszeitraum  $[T, T+\Delta t]$  mit  $T$  als Startzeitpunkt und  $\Delta t$  als Dauer (hier also 8.9min) eines einzelnen NMR-Experimentes:

$$S(p, T) = \int_T^{T+\Delta t} F(p, t) dt$$

Diese Annahme ist jedoch nur für Bildstrukturen korrekt, die aus einem Einzelpunkt bestehen, dessen Fouriertransformierte eine Konstante ist. Die Xylemgefäße besitzen jedoch einen Durchmesser von etwa 2 Bildpunkten und damit in Phasenkodierrichtung eine ebensolche Breite. Als Fouriertransformierte einer Bildstruktur aus 2 Punkten findet man das mittlere Maximum einer Sinc-Funktion. Eine solche muss daher als Gewichtungsfunktion  $G(k_y)$  für den Beitrag

der einzelnen  $k$ -Raumzeilen  $k_y$  zur Gesamtintensität dieser Bildstruktur berücksichtigt werden. Aufgrund der linearen Phasenkodierung (siehe oben) kann diese Gewichtungsfunktion direkt in Abhängigkeit von der Akquisitionszeit ausgedrückt werden  $G(t-T) = \text{Sinc}(2 \cdot (t-T)/\Delta t)$  für  $0 < t-T < \Delta t$ ,  $=0$  sonst. Für die Beschreibung der Signalstärke  $S(p, T)$  ergibt sich somit insgesamt als Integral über den Aquisitionszeitraum:

$$S(p, T) = \int_T^{T+\Delta t} F(p, t) G(t - T) dt \quad (18)$$

$S(p, T)$  beschreibt die NMR-Signalstärke, die man im Xylem während der Wiederbefüllung erhält, abhängig von der Schichtposition  $p$  und dem Startzeitpunkt  $T$  des Experimentes. Diese Funktion wird derart normiert, dass sie  $=1$  für durchgehend gefüllte und  $=0$  für durchgehend leere Voxel ergibt.

Mit dem Integralsinus als Stammfunktion ist die Sinc-Funktion nicht analytisch integrierbar. Die Akquisition einer  $k$ -Raumzeile dauert etwa 2.56ms und ist im Rahmen der Gesamtakquisitionsdauer von 8.9min ein diskretes Ereignis. Aus diesen beiden Gründen wird  $S(p, T)$  für die Auswertung nicht als vielfachabschnittsweise-definierte Funktion aufgestellt, sondern als numerische Summe über die Beiträge der 128  $k$ -Raumzeilen zum Gesamtsignal. Ein Fit dieser zweidimensionalen Funktion  $S$  über die gemessenen Signalintensitäten aller drei Schichten eines Xylemgefäßes (siehe Abbildung (49) links) liefert die gesuchte Steiggeschwindigkeit  $v_{rise}$  und den mittleren Wiederbefüllungszeitpunkt  $t_0$  für ein Xylemgefäß im Messbereich.

Grundsätzlich kann Signal aus den kavitierten Xylemgefäßen entsprechend einer Wiederbefüllung der Messschichten von unten nach oben wieder nachgewiesen werden. Die Befüllungsgeschwindigkeit ist so groß, dass lediglich während einer einzigen Messung innerhalb der Zeitreihe ein Unterschied zwischen den Signalstärken aus den drei Schichten festgestellt werden kann. Dieser resultiert aus dem Zeitversatz, mit dem der Saftspiegel die jeweilige Schicht während der Messung durchläuft. Bedenkt man zudem die Streuung der Signalstärken aus den Xylemgefäßen (vgl. Abweichungen der Messpunkte von den horizontalen Bereichen der Fitkurve), wird klar, dass es sich bei dem erhaltenen Fitwert für die Befüllgeschwindigkeit nur um eine gute Abschätzung handeln kann, die die Größenordnung wiedergibt.

Für weitere Messungen dieser Art wird daher vorgeschlagen, die Messdauer eines Einzelexperiments deutlich zu verkürzen, zum einen durch einen Verzicht auf eine Mittelung, zum anderen durch den Einsatz einer Mehrschicht-Turbospinechorequenz. Damit sollte es möglich sein, die Empfindlichkeit für den Zeitabstand der Befüllung der verschiedenen Bildschichten zu erhöhen oder sogar zu erreichen, dass der Saftspiegel die drei Schichten während unterschiedlicher Bildgebungsexperimenten erreicht. Außerdem erscheint es ratsam, die Phasenkodierschritte der Bildgebungssequenz so umzusortieren, dass eine gleichmäßigere Empfindlichkeit für xylemartige Bildstrukturen über den Akquisitionszeitraum gegeben ist.

Pflanze Nr.	52			53	54	55
Kavitation Nr.	1	2	3	-	-	1
Befüllungszeitpunkt in Std:Min	17:11	17:12	17:08	-	-	16:41
Aufstiegsgeschwindigkeit in mm/min	3.3	1.8	1.0	-	-	0.5

Tabelle 5: Zeitpunkt und Geschwindigkeit der Wiederbefüllung von Embolien in den Pflanzen 52 und 55. Der Zeitindex für den Wiederbefüllungszeitpunkt bezieht sich auf den Beginn des Trockenstresses als 0:00h, mit Wiederbewässerung bei 6:00h und Ende der Beleuchtung bei 15:00h.

Dadurch wird der Anstieg der Signalstärke flacher, im Idealfall linear (im Gegensatz zum hier gezeigten steilen Anstieg in der Mitte der S-förmigen Fitkurve in Abbildung (49) links).

Messungen mit der Multischicht-Spinecho-Sequenz wurden an vier Pflanzen (mit 52 bis 55 bezeichnet) durchgeführt. Der Trockenstressverlauf entsprach dabei den früher beschriebenen Messungen. Die Beleuchtung wurde jedoch erst 9h nach der Wiederbewässerung abgeschaltet. Tabelle (5) listet die Kavitationen, die in diesen Pflanzen beobachtet wurden, und die dazu ermittelten Werte.

### Diskussion der Wiederbefüllungsmessungen

Grundsätzlich wurde im Rahmen aller Trockenstressexperimente dieser Arbeit, in denen Kavitationen auftraten, festgestellt, dass eine Pflanze entweder alle der entstandenen Embolien oder keine während der Messzeit wiederbefüllte (vgl. Tabelle (4) und Abbildung (47)). Die Wiederbefüllung mehrerer Kavitationen fand dabei immer innerhalb eines Zeitraumes von maximal einer Stunde statt. Eine genauere Zeitauflösung erlaubt hier nur die Messung an Pflanze 52, deren drei Kavitationen in der gemessenen Schicht mit einer Zeitdifferenz von 4 Minuten wiederbefüllt wurden (siehe Tabelle (5)). Bei jeweils erheblich mehr vorhandenen, beobachtbaren Gefäßen beschrieben [SVHVA07] und [HABZ01] Wiederbefüllungen, die sich über eine Größenordnung von 10h verteilten.

In der Literatur wurde basierend auf Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit oder mittels Cryo-SEM vielfach beschrieben, dass auch unter Stressbedingungen Embolien wieder befüllt werden würden (vgl. z.B. [SLGDPZ96, MGM<sup>+</sup>01] und konkret für Maispflanzen [MHL98]). Bei den hier durchgeführten Messungen wurden Wiederbefüllungen kavitierter Gefäße mit NMR ausschließlich in Dunkelheit beobachtet. Das deckt sich mit den Aussagen in [HABZ01], wo an einer Weinrebe ebenfalls erst ab 1h nach dem Ausschalten der Beleuchtung Wiederbefüllungen der Xylemgefäße beschrieben wurden. Darüber hinaus beobachteten [SVHVA07] vier Wiederbefüllungen von Embolien im Stängel einer Gurkenpflanze, von denen drei während einer Dunkelphase der Messung und eine während der Beleuchtungsphase in der untersuchten Schicht einsetzten. Die von diesen Autoren ungerichtet bestimmte Wiederbefüllgeschwindigkeit ergibt sich aus einer 5h bis 14h

andauernden Spindichtezunahme innerhalb einer Schicht von 3mm. Sollte es sich hierbei tatsächlich um eine Wiederbefüllung durch einen fortschreitenden Saftspiegel handeln, würde bei gleichbleibender Geschwindigkeit die Befüllung eines Gefäßes auf ganzer Länge mehrere Tag-Nacht-Zyklen benötigen. Eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang zwischen Transpirationsstress und Embolie-wiederbefüllung kann hier also nicht gemacht werden. Vielleicht wurde in dieser Veröffentlichung ein anderer Ablauf, möglicherweise eine radiale oder abschnittsweise Befüllung beobachtet. Ob auch die NMR komplette Kavitationsbefüllung unter Stressbedingungen zeigt, ist somit noch ungeklärt. In jedem Fall konnten [SVHVA07] keinen neuen Fluss in den wiederbefüllten Gefäßen feststellen; der Nachweis funktioneller Gefäße nach der Wiederbefüllung einer Kavitation konnte in der vorliegenden Arbeit somit zum erstenmal geführt werden.

Die Aufstiegsgeschwindigkeiten in Pflanze 52 und 55 lagen in der Größenordnung um 1mm/min, unterschieden sich aber doch erheblich - zum Teil aufgrund der bereits diskutierten Ungenauigkeit bei der Geschwindigkeitsbestimmung. Die von [SVHVA07] beschriebene Auffüllgeschwindigkeit an der Gurkenpflanze liegt dagegen um gut zwei Größenordnungen unter der hier an Maiswurzeln gemessenen Aufstiegsgeschwindigkeit. Eher vergleichbar sind die hier vorgestellten Ergebnisse mit der Dynamik, die aus den Messungen von [HABZ01] am Stängel einer Weinrebe interpretiert werden können. Hier war die Befüllung im Vergleich mit der Zeitauflösung von 20min ein spontanes Ereignis.

Wie stark derartige Unterschiede von der Pflanzenspezies, vom Pflanzenteil (z.B. Wurzel versus Stängel), von Stressbedingungen oder weiteren Faktoren abhängen, dürfte in Zukunft interessante Erkenntnisse über die dahinterstehenden Mechanismen bringen.

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen lassen sich einzelne Hinweise zu diesen Mechanismen diskutieren. Z.B. lassen die identischen  $T_1$ -Werte und Zeitverläufe von wiederbefüllten und nicht kavitierten Gefäße darauf schließen, dass eine Konzentrationserhöhung von (paramagnetischen) Ionen oder Zucker im Xylem im vorliegenden Fall wenn überhaupt, dann nur sehr begrenzt für die Wiederbefüllung verantwortlich ist.

Bei einem Xylemdurchmesser in der Größenordnung von  $60\mu\text{m}$  und einem nach [ZH00] geschätzten Benetzungswinkel von  $45^\circ$  ergibt sich aufgrund der Kapillarität eine Steighöhe für Wasser von 35cm. Das übersteigt bei weitem die etwa 3cm, die die Messschicht an der Wurzel oberhalb des Nährlösungsspiegels nach der Wiederbewässerung liegt. Eine unmittelbare Wiederbefüllung in der Messschicht könnte demnach durch einen (wenn auch sehr geringen) Überdruck von mindestens 3.5kPa in der Gasphase der Kavitation verhindert worden sein. Das lässt möglicherweise zum einen darauf schließen, dass das kavitierte Gefäß nicht offen ist und zum anderen die Pflanze Flüssigkeit, die ggf. weiter oben im Gefäß vorhanden ist, auch nicht in den Spross abzieht, bevor das Gefäß ohne Transpirationsstress (im Dunkeln) gefüllt werden kann. Eine alternative Interpretation ist zu hoher osmotischer Druck im Wurzelgewebe und den funktionstüchtigen Xy-

Pflanze Nr.	11	12	13	14	15	16	17	27
sichtb. Cortexschädigung	?√	√	–	–	√	√	–	√
$T_{1.Cortex}$ Regener. in s	0.9	1.2	0.7	0.8	0.9	1.0	1.4	0.9
$T_{1.Cortex}$ Ende in s	0.5	0.9*	0.8	0.9	0.4	0.3	1.3	0.5

Tabelle 6:  $T_1$ -Werte im Cortex am Ende der Regenerationsphase und am Ende der Messung.  $T_1$  wurde am Maximum des  $T_1$ -Profils im inneren Cortex bestimmt, vgl. Werteprofil in Abbildung (44-g). Für Pflanze 11 war keine eindeutige Beurteilung einer sichtbaren Cortexschädigung möglich, die  $T_1$ -Karten deuten jedoch darauf hin. \*Bei Pflanze 12 war der aufgrund der Schädigung zu beobachtende  $T_1$ -Abfall innerhalb der Messzeit nicht abgeschlossen.

lemgefäßen, der verhindert, dass im unteren Wurzelbereich überhaupt Flüssigkeit radial in das kavitierte Gefäß einströmen kann. Die Kapillarität hätte in den Wurzeln also das Potential, an der Wiederbefüllung mitzuwirken, wird aber offensichtlich von anderen Mechanismen, die mit deutlich höheren Drücken einhergehen, dominiert. Für die gemessene Aufstiegeschwindigkeit ist nach der Hagen-Poiseulle-Gleichung ein Druckgradient von 130Pa/m notwendig, für den die Kapillarität im Wurzelxylem ebenso ausreichend wäre.

### 9.1.8 Wurzelschäden durch Trockenstress

Einzelne Pflanzen wiesen nach den Trockenstressexperimenten sichtbare Wurzelschäden auf (Tabelle (6)). Ihre Wurzelrinde erschien verschrumpelt, trotz Wieder-Aufquellens, und war dunkel, bräunlich verfärbt. Der Wurzelcortex dieser Pflanzen zeigte zuerst ebenfalls den erwarteten Anstieg des  $T_1$ -Wertes nach der Wiederbewässerung. Nach 1h bis 3h (in Pflanze 12 erst nach 5h) setzte jedoch ein plötzlicher, schneller Abfall von  $T_1$  ein (vgl.  $T_1$ -Höhenliniengrafik in Abbildung (44-e) ab Zeitindex 24.5h). Dieser ist im Wesentlichen bereits nach 1h bis 2h abgeschlossen. Die  $T_1$ -Zeiten gehen dabei im ganzen Cortex auf unter 0.5s zurück.

Die Spindichte ist von dieser Änderung nicht betroffen. Das nur in Pflanze 27 gemessene  $T_2$  folgt qualitativ, aber deutlich schwächer dem Verlauf der  $T_1$ -Änderung.

Bei einer vorliegenden Gewebeschädigung lässt sich dieser starke Abfall durch eine Vermischung des Zytoplasmas mit einer großen Flüssigkeitsmenge z.B. aus der Vakuole nach folgendem Szenario interpretieren:

Durch den mechanischen und osmotischen Stress bei der Austrocknung sind die Zellen strukturell geschädigt bzw. geschwächt. Der hohe osmotische Druck in den getrockneten Zellen bewirkt ein schnelles Einströmen von Flüssigkeit nach der Wiederbewässerung. Die strukturell geschädigten Zellen können dem sich aufbauenden hydraulischen Druck (Turgor) nicht standhalten. Baut sich ein solcher hoher Druck in der Vakuole auf, werden der Tonoplast und möglicherweise auch das Plasmalemma aufreißen. Der Inhalt von kleinen Kompartimenten mit sehr

kurzen Relaxationszeiten, das Zytoplasma oder der Apoplast, vermischen sich mit dem großen Volumen der Vakuole.

Für eine Modellrechnung werden Daten aus dem inneren Cortex herangezogen, dem Bereich mit den größten Zellen (vgl. Abbildung (56)). Dadurch ist der Einfluss der Kompartimentbegrenzung nach Gleichung (13) (Seite 56) gering, und das gemessene  $T_1$  wird von der Flüssigkeitszusammensetzung in der Vakuole dominiert. Aus den  $T_1$ -Karten der Wurzeln, deren Werte später abfielen, lässt sich für die Regenerationsphase ein Mittelwert von  $T_{1.reg}=1.0s\pm 0.1s$  bestimmen. Nach dem Einbruch des Wertes ergibt sich  $T_{1.end}=0.4s\pm 0.1s$  (vgl. Tabelle (6) ohne Pflanze 12). Diese  $T_1$ -Bereiche werden in Abbildung (50) durch die grauen Rechtecke markiert.

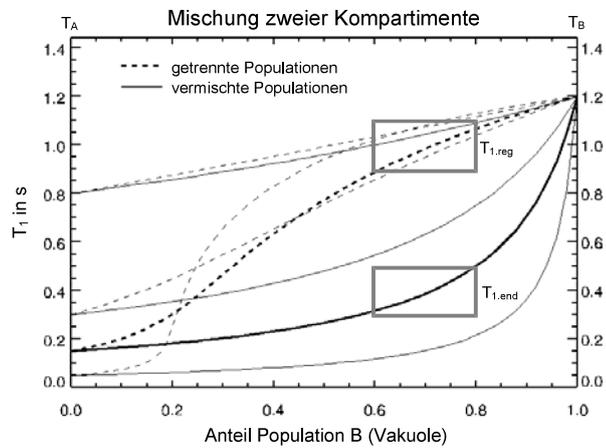


Abb. 50: Durch monoexponentiellen Fit erhaltener  $T_1$ -Wert in Abhängigkeit vom Volumenanteil zweier Populationen. Gestrichelt bei räumlich getrennten (nach Abschnitt 7.3.1), durchgezogen bei vermischten Populationen (nach Abschnitt 7.1). Dicke Linien für  $T_{1,A}=0.15s$  und  $T_{1,B}=1.20s$ , die Rechtecke markieren die Werteintervalle aus dem Text.

In dieser Grafik ist  $T_1$  über dem Anteil der Vakuole am Gesamtvolumen aufgetragen. In der NMR-Literatur werden für diesen Anteil üblicherweise 60% bis 80% angenommen [BR84, SVA92]. Diesen Bereich begrenzen die grauen Rechtecke in Richtung der Ordinate.

Solange die Populationen beider Kompartimente getrennt sind, ergibt ein monoexponentieller Fit einen gemeinsamen  $T_1$ -Wert, wie er von den gestrichelten Linien in Abbildung (50) gezeigt wird (vgl. Abschnitt 7.3.1). Durchmischen sich beide Populationen, so dass ein sehr schneller Austausch zwischen ihren ursprünglichen Komponenten möglich ist, ergibt sich nach Gleichung (10) (Abschnitt 7.1) der von den durchgezogenen Linien gezeigte  $T_1$ -Wert in Abhängigkeit vom Anteil der Vakuole.

Nimmt man für die Vakuole  $T_{1,B}=1.2s$  und für das umgebende Zytoplasma  $T_{1,A}=0.15s$  an, so verlaufen die zugehörigen Graphen (dicke Linien in Abbildung (50)) durch die markierten Bereiche  $T_{1.reg}$  und  $T_{1.end}$ .

Es zeigt sich, dass sich der rapide Abfall der  $T_1$ -Zeit damit erklären lässt, dass sich ein verhältnismäßig kleines Volumen mit sehr kurzen Relaxationszeiten, das zuvor kaum ins Gewicht fällt, mit einem großen Volumen durchmischt. Ohne Veränderung der Aussage können zum kleinen, schnell relaxierenden Volumen auch Zytoplasma und extrazelluläre Flüssigkeit zusammengefasst werden, gegenüber z.B. der Vakuole als großem Volumen mit einer langen Relaxationszeit. Eine detailliertere Beispielsrechnung dieses Modelles findet sich am Ende von Abschnitt 7.3.3. Eine Beeinträchtigung der Funktionalität im Zentralzylinder, besonders in den

Gefäßen, durch die Schädigung des Cortex im Messbereich konnte nicht festgestellt werden.

## 9.2 Volumenfluss, Exsudation und Wurzeldruck

Außer durch Transpiration aus den Spaltöffnungen der Blätter geben Pflanzen Wasser auch durch die sog. Guttation ab. Dabei bilden sich Wassertropfen an den Hydathoden, einem Porensystem, zumeist an den Blatträndern, das Xylemflüssigkeit direkt austreten lässt. Dieser Mechanismus erlaubt den Pflanzen einen Nettowassertransport in die Blätter z.B. auch bei 100% Luftfeuchtigkeit. Besonders bei Gräsern sind die Hydathoden passiv und die Guttation erfolgt nur aufgrund eines Überdruckes im Xylem, der von den Wurzeln aufgebaut wird (bei Bäumen kann ein solcher Überdruck auch im Stamm erzeugt werden, ebenso wie hier aktive Hydathoden gefunden werden) [SS91]. Unter anderem bei Mais wird Guttation auch bei geringen Luftfeuchtigkeiten, parallel zur Transpiration, beobachtet [MS92].

Der verantwortliche Wurzeldruck trägt mit zum Wassertransport in den Pflanzen bei und wird darüber hinaus als wichtiger Mechanismus bei der Wiederbefüllung kavierter Xylemgefäße diskutiert [ECT97]. Wird der Spross von einer Pflanze abgetrennt, so bewirkt der Wurzeldruck die sogenannte „Exsudation“, ein Austreten von Xylemsaft (Exsudat) aus der Schnittfläche an der verbliebenen Wurzel bzw. dem Sprosstumpf.

Um zu untersuchen, ob und welche Aussagen mit NMR-Mikroskopie über den Wurzeldruck und damit zusammenhängende Abläufe gemacht werden können, wurde der Spross einer Maispflanze während einer Messreihe abgetrennt (Abbildung (51)). So wird die mögliche Ursache gemessener funktioneller Vorgänge auf die Wurzel eingeschränkt.

Für das Abschneiden der Pflanze war ein Aus- und Einbau des Klimakammerprobenkopfes notwendig, was in etwa 10 Minuten dauerte. Da sich im Messbereich der Wurzeln dabei keine Änderung ergab und die Positionierung mit Hilfe von Markierungen sehr gut reproduzierbar war, konnte auf eine neue Justierung (insbesondere Shim sowie Pulswinkelbestimmung) des Gerätes hinterher verzichtet werden. Versuche, eine Abschneidevorrichtung in der Kammer zu konstruieren, um mit Hilfe eines reißfesten, dünnen Fadens (chirurgische Seide) die Pflanze zu kappen, scheiterten an der Zähigkeit der äußeren Pflanzenfasern. Der abgeschnittene Spross wurde in der Kammer belassen, die Beleuchtung blieb unverändert hoch.

Über mehrere Stunden wurden  $T_1$ - und Flusskarten aufgenommen. Innerhalb der Messdauer von bis zu 10h nach dem Abschneiden der Pflanze war in den Spindichte- und  $T_1$ -Karten keine Änderung feststellbar. Parallel zu den NMR-



Abb. 51: Abgeschnittene Maispflanze, mit Auffangschlauch.

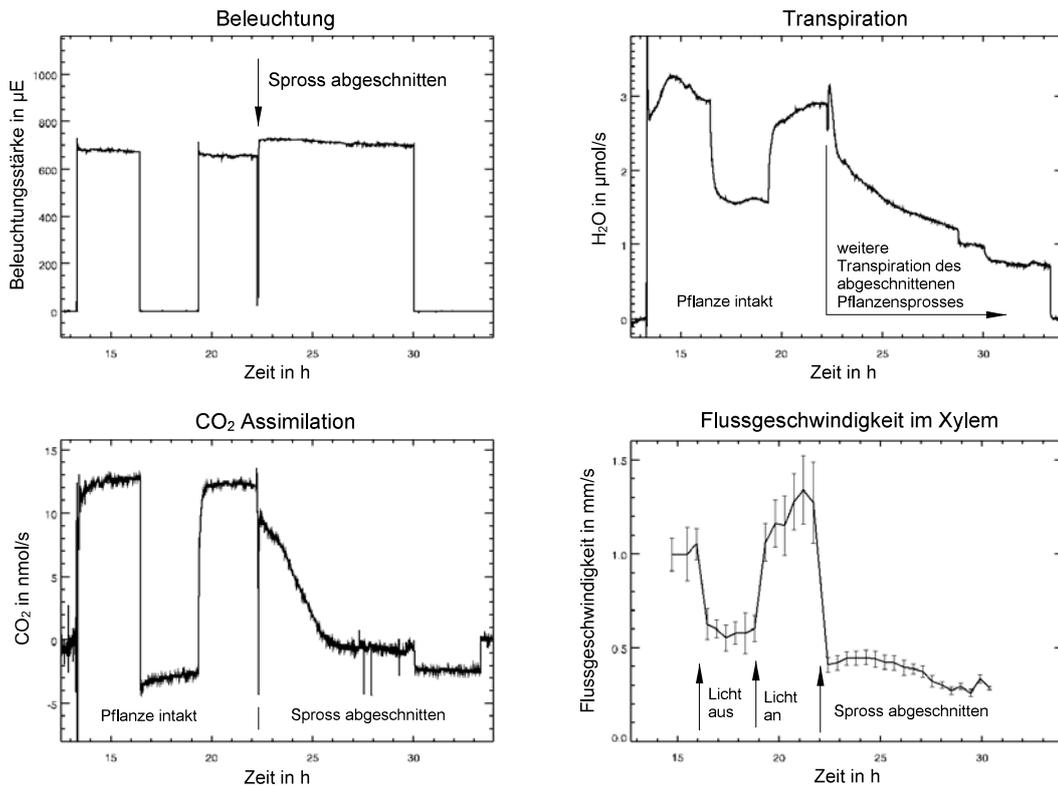


Abb. 52: Zeitverlauf der Messung an Maispflanze 22. Nach einer Hell-Dunkel-Hell Sequenz wurde der Pflanzenspross unmittelbar über dem Korn abgeschnitten, aber in der Klimakammer belassen. Ausgehend von der Beleuchtungsstärke sind hier die Transpirationsrate, die Assimilationsrate und die durchschnittliche Flussgeschwindigkeit im Xylem der Wurzel gezeigt. Die Flussgeschwindigkeit ergibt sich als Mittelwert aus den NMR-Flusskarten, die ca. 4cm unterhalb des Korns aufgenommen wurden. Die eingezeichneten Fehlerbalken sind die Standardabweichung des Mittelwertes aus den Bildpunkten mit Xylemfluss.

Daten wurden Transpiration und  $\text{CO}_2$ -Assimilation der Pflanze sowie die Umgebungsparameter in der Kammer gemessen.

Abbildung (52) zeigt den Verlauf der Messung. Um eine Vergleichsbasis für die Xylemflussgeschwindigkeit der abgeschnittenen Pflanze zu haben, wurde zuerst die Flussgeschwindigkeit der intakten Pflanze während eines Hell-Dunkel-Hell-Zyklus' gemessen. Jede Phase dauerte dabei knapp 3h, um der Pflanze ausreichend Zeit zur Adaption an die neuen Verhältnisse zu geben. Wie in Abbildung (52) zu sehen, erfolgt die Reaktion der Assimilation sehr schnell. Die Transpiration nähert sich etwas langsamer, leicht asymptotisch, einem neuen Wert an. Die Flussgeschwindigkeit wurde wie in früheren Kapiteln aus den NMR-Flusskarten als Mittelwert im Bereich des Zentralzylinders ermittelt. Als Fehler wird die Standardabweichung dieser Mittelwertbildung angegeben. Die Flussgeschwindigkeit folgt qualitativ sehr gut der Transpirationskurve.

Der Spross der Pflanzen wurde 0.5cm bis 2cm über dem Korn abgeschnitten. In einigen Fällen wuchs der innere Bereich des Maisstängels während der Messdauer um bis zu 0.5cm über die Schnittfläche hinaus weiter (vgl. Abbildung (55) links). Bei den in Abbildung (52) gezeigten Daten von Pflanze 22 sowie bei Pflanze 23 wurde der abgeschnittene Spross in der Klimakammer des Probenkopfes belassen. So sind Transpiration und Assimilation ohne „Nachschub“ aus der Wurzel beobachtbar. Der Fluss im Xylem der Wurzel bleibt auch nach dem Abschneiden der Pflanze deutlich messbar, fällt jedoch noch unter den Wert in Dunkelheit ab. Dieser Fluss wird alleine vom Wurzeldruck getrieben, muss nun jedoch nicht mehr gegen den Leitungswiderstand in der Pflanze, den Blättern und der Hydathoden arbeiten. In allen vier untersuchten Pflanzen war in den ersten 1-2 Stunden nach dem Abschneiden ein leichter Anstieg des Flusses um 0.03mm/s bis 0.08mm/s beobachtbar. In Pflanze 25 war dieser Anstieg am schwächsten und nach 2h bereits wieder abgeklungen. Nach 6 bis 9 Stunden fiel die Flussgeschwindigkeit in allen Pflanzen um 0.08mm/s bis 0.17mm/s deutlich ab (siehe Tabelle 7).

Pflanze Nr.	22	23	24	25
Fluss, Lichtphase 1 in mm/s	1.0	0.8	1.1	0.9
Fluss, Dunkelphase in mm/s	0.6	0.45	0.65	0.35
Fluss, Lichtphase 2 in mm/s	1.3	0.65	1.1	0.6
Fluss, direkt nach Abschneiden in mm/s	0.4	0.3	0.25	0.35
Fluss, 2h – 4h nach Abschneiden in mm/s	0.45	0.35	0.33	0.33
Fluss, 8h – 10h nach Abschneiden in mm/s	0.3	0.25	0.16	0.25*

Tabelle 7: Flussgeschwindigkeiten verschiedener Messreihen. \*Bei Pflanze 25 fiel die Flussgeschwindigkeit erst 12h nach dem Abschneiden ab.

Da für das Abschneiden der Pflanze ein Umbau sowieso notwendig war, bot es sich an, dabei den Pflanzenstumpf mit einem Schlauch zu umgeben (vgl. Abbildung (51)), um das Exsudat aufzufangen und seine Menge bestimmen zu können. Die Menge wurde gewogen, und für die beiden so durchgeführten Messungen ergaben sich 412mg in 17.75h (Pflanze 24) und 448mg in 18.5h (Pflanze 25). Zur Vereinheitlichung wird der Wasserumsatz im Folgenden stets wie bei der Transpirationmessung als Stoffmenge in Mol angegeben. Mit der molaren Masse von Wasser mit 18.015g/mol ergeben sich aus der Wiegung Mengen von 22.9mmol für Pflanze 24 und 24.9mmol für Pflanze 25. Aus der Transpirationmessung lässt sich durch Summation über den Zeitverlauf die transpierte Flüssigkeitsmenge ermitteln. Sie ist in Abbildung (54) als grauer Graf dargestellt. Addiert man die Exsudatmenge hinzu, ergibt sich als insgesamt umgesetzte Endmenge der rechts grau-gestrichelt angedeutete Wert.

Um die durch Transpiration und Exsudation umgesetzten Flüssigkeitsmengen mit der Aufnahme durch das Wurzelxylem vergleichen zu können, wird im Folgenden

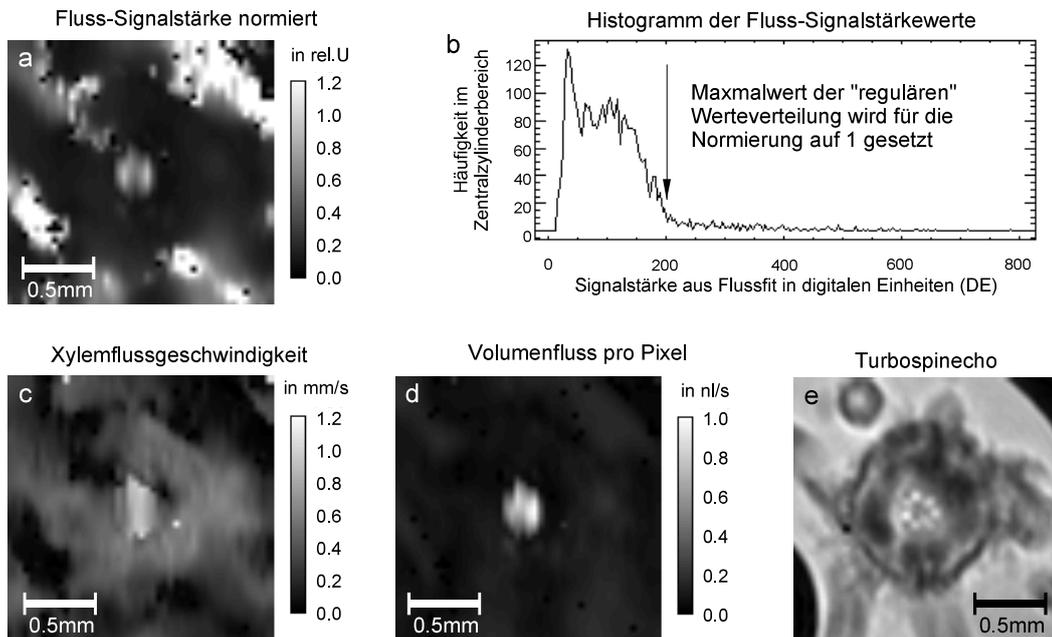


Abb. 53: (a) Bereich der Maiswurzel aus einer Fluss-Signalstärkenkarte von Pflanze 24. (b) Werteverteilung der Signalstärken aus dem Zentralzylinderbereich von 50 Flussdatensätzen. Das Signal in (a) wurde auf den Maximalwert des „Hauptfeldes“ der Werteverteilung normiert. (c) Flussgeschwindigkeitskarte. (d) Das Produkt von normierter Signalstärke, Flussgeschwindigkeit und Pixelfläche ergibt eine pixelbezogene Volumenflusskarte. (e) Gleicher Ausschnitt eines Turbospinechobildes der Wurzel.

aus den Flusskarten der Volumenfluss ermittelt.

Beim Fit der Funktion (9) von Seite 43 in einem Punkt eines Flussdatensatzes wird neben der Flussgeschwindigkeit  $v$  auch die Signalamplitude  $A$  ermittelt. Sie gibt das Maximum des sinusförmigen Signalverlaufes an und ist direkt proportional zum Volumenanteil der „fließenden“ Magnetisierung in einem Voxel – gegenüber dem stationären und durch die Flussesequenz unterdrückten Anteil. Als „Voxel“ wird dabei das Volumen bezeichnet, das sich aus Pixelfläche ( $39\mu\text{m} \times 39\mu\text{m}$  - nach „zero-filling“) und Schichtdicke (4.0mm) ergibt und dessen Gesamtsignal auf einen Pixel abgebildet wird. Der tatsächliche Zahlenwert (in DE – „digitale Einheiten“) der Signalstärke hängt von der Empfangskette des NMR-Gerätes, insbesondere vom Digitizer des Receivers ab. Der maximale Wert für die Signalamplitude der Flussmessung wird in den Datenpunkten erreicht, deren Signal aus einem Voxel herrührt, das vollständig in einem Xylemgefäß zu liegen kommt. Da die Pixelgröße von  $39\mu\text{m}$  nur wenig unter dem Durchmesser der großen Xylemgefäße von  $50\mu\text{m}$  bis  $70\mu\text{m}$  liegt, werden nur wenige Pixel diese Bedingung erfüllen, so dass die meisten eine geringere Signalstärke zeigen. Abbildung (53-a) zeigt eine solche Fluss-Signalstärkenkarte einer Maiswurzel.

In Grafik (b) ist ein Histogramm der Signalstärken im Zentralzylinderbereich von 50 zu einer Messreihe gehörigen Karten dieser Art zu sehen. Abgesehen von ein-

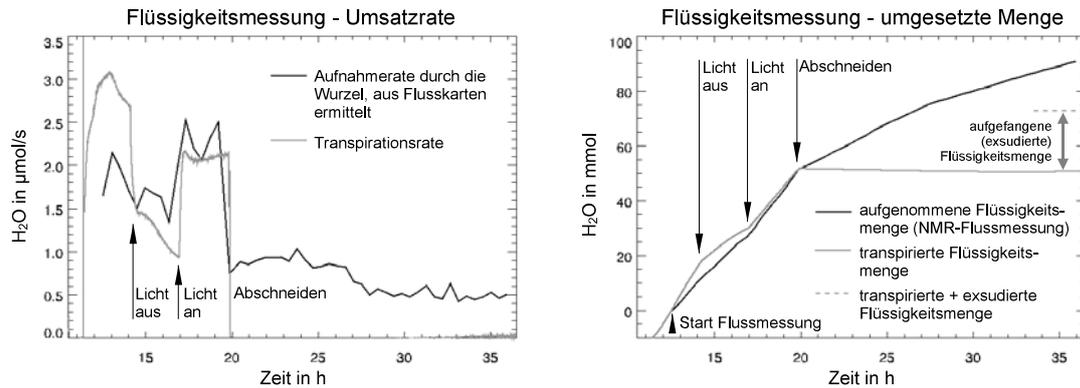


Abb. 54: Links: Vergleich der Transpirationsrate mit dem Volumenfluss durch das Wurzelxylem von Maispflanze 24. Rechts: Das Zeitintegral der Raten zeigt die umgesetzte Flüssigkeitsmenge. Das exakte Treffen beider Kurven zum Abschneidezeitpunkt ist im Rahmen der Messgenauigkeit zufällig entstanden. Die gestrichelte Linie gibt die zur Transpiration zusätzliche exsudierte Flüssigkeitsmenge an, die über der Schnittfläche an der Pflanzenbasis aufgefangen wurde.

zelen „Ausreißern“, die durch rauschbedingte Fitfehler zu hohe Werte ergaben, liegen die Signalstärken alle in einem deutlichen „Hauptfeld“ zwischen 20DE und 200DE zusammen. Aufgrund der vorangegangenen Überlegungen wird die obere Grenze dieses Hauptfeldes als eigentliche maximale Signalstärke identifiziert. Die Signalstärkekarte (a) wurde bereits mit diesem Wert normiert.

Aus der Multiplikation der Pixelfläche mit der normierten Signalstärke in jedem Bildpunkt erhält man die effektive Querschnittsfläche eines Bildpunktes, die zum Volumenfluss beiträgt. Pixelweise Multiplikation mit der Flussgeschwindigkeit führt zu der – noch pixelbezogenen – Volumenflusskarte (d) in Abbildung (53), die Summation über den ganzen Zentralzylinderbereich dieser Karte schließlich zum Volumenfluss in nl/s.

Bei der Darstellung von Flussgeschwindigkeitskarten werden üblicherweise Punkte mit großen Fitfehlern und zu kleinen Signalstärken verworfen, so dass Artefakte, wie in Abbildung (53) außerhalb der Wurzel zu sehen, wegfallen. Um für die Volumenflussberechnung auch den Beitrag von Pixeln mit sehr geringem Flussanteil zu berücksichtigen, die in üblichen Flussgeschwindigkeitskarten nicht mehr sichtbar wären, wird auf diese Diskriminierung hier verzichtet.

Durch das Rauschen in der Messung können für die ermittelte Signalstärke Fitfehler nach oben ebensowenig ausgeschlossen werden wie nach unten. Um für einen statistischen Ausgleich zu sorgen, wurden die Punkte, deren normierte Signalstärke über 1 lag, daher ebenfalls nicht verworfen.

Mit dem molaren Volumen von Wasser unter Standardbedingungen wurde aus dem Volumenfluss die Durchflussmenge bestimmt und das Ergebnis in Abbildung (54) als jeweils schwarze Linie eingetragen.

Zum Vergleich sieht man als grauen Grafen jeweils die Transpirationsrate (links) und die abgegebene Gesamtflüssigkeitsmenge (rechts). Vor dem Abschneiden der

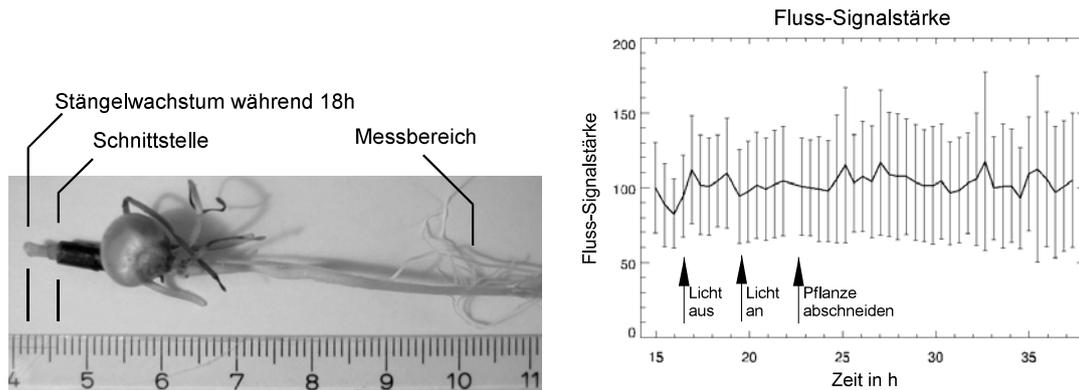


Abb. 55: Zur Diskussion der Volumenflussmenge. Links: 17.75h nach dem Abschneiden ist das Stängelzentrum weitergewachsen. Rechts: Gleichbleibende mittlere Fluss-Signalstärke während der Messung von Pflanze 25.

Pflanze ist die Transpiration nahezu deckungsgleich mit der ermittelten Durchflussmenge und das trotz eines Fehlers von schätzungsweise 10% bis 20% bei der Normierung der Signalstärke bzw. der Abschätzung deren Maximalwertes.

Nach dem Abschneiden zeigt der Volumenfluss qualitativ das gleiche Verhalten, das schon im Zusammenhang mit der Flussgeschwindigkeit aus Abbildung (52) diskutiert wurde. Die aufintegrierte durch das Xylem transportierte Flüssigkeitsmenge geht bei beiden Messungen (Pflanzen 24 und 25) jedoch um 18mmol bzw. 13mmol über die Exsudatmenge hinaus, die in 16h bzw. 14.5h über dem Pflanzenstumpf aufgefangen werden konnte. Geringe absolute Verluste beim Auffangen und Wiegen ließen sich zwar sicherlich nicht vermeiden, jedoch dürfte sich der relative Fehler bei gut 0.4ml erhaltener Flüssigkeitsmenge deutlich unter 10% bewegen – nicht vergleichbar mit der gemessenen Abweichung von nahezu 100%. Möglicherweise findet im Phloem, das hier jedoch nicht aufgelöst werden kann, ein weiterer nennenswerter Wassertransport nach unten statt. Ein solcher Transport kann bei Nacht durchaus die Hälfte des nach oben fließenden Volumens wieder in die Wurzel zurücktransportieren [WVVA]. Möglicherweise bewirken Störeffekte wie Rauschen eine konstant zu hoch berechnete Flussrate, was bei geringeren Flussgeschwindigkeiten stärker ins Gewicht fallen würde. Wie in Abbildung (55) rechts zu sehen ist, ist der zeitliche Verlauf der Fluss-Signalstärke im Rahmen der statistischen Fehler konstant. Da sich das Xylemvolumen und die Bildvoxel nicht ändern, ist das zu erwarten und als Fehlerquelle auszuschließen. Auch die Wasserspeicherung durch Wachstum im Bereich zwischen der Messebene in der Wurzel und der Schnittfläche kann vernachlässigt werden. Abbildung (55) zeigt links eine Pflanze, aus deren Stängelansatz die gerollten Blätter hervorgewachsen sind. Ihr geschätztes Volumen beträgt jedoch nur 0.012ml, die Lufträume zwischen den Blättern unberücksichtigt.

Auffällig, aber nur mit äußerster Vorsicht zu interpretieren ist noch, dass bei beiden Messungen die aufgefangene Exsudatmenge in etwa dem Flussvolumen

entspricht, das bis zum Abfallen der Flussgeschwindigkeit gemessen wurde, gut zu erkennen am Knick im schwarzen Kurvenverlauf der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge rechts in Abbildung (54).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Messung der Flussgeschwindigkeit in Wurzeln einen interessanten Beitrag zur Untersuchung des Wurzeldruckes und der Effekte, bei denen er eine Rolle spielt, leisten kann. Aus Flussgeschwindigkeitskarten lässt sich mit der vorgestellten Methode ein Volumenfluss ermitteln, der sehr gut mit der Transpiration übereinstimmt. Selbst bei Dunkelheit ist die Flussgeschwindigkeit in der intakten Pflanze höher als in der Wurzel ohne Spross. Das zeigt, dass der Spross verglichen mit der Wurzel stärker zum Wassertransport beiträgt als zum hydraulischen Widerstand der kompletten Pflanze. Der Wurzeldruck muss bei abgeschnittenem Spross nur noch den „Leitungswiderstand“ der Wurzel selber überwinden, erzeugt aber deutlich weniger Volumenfluss.

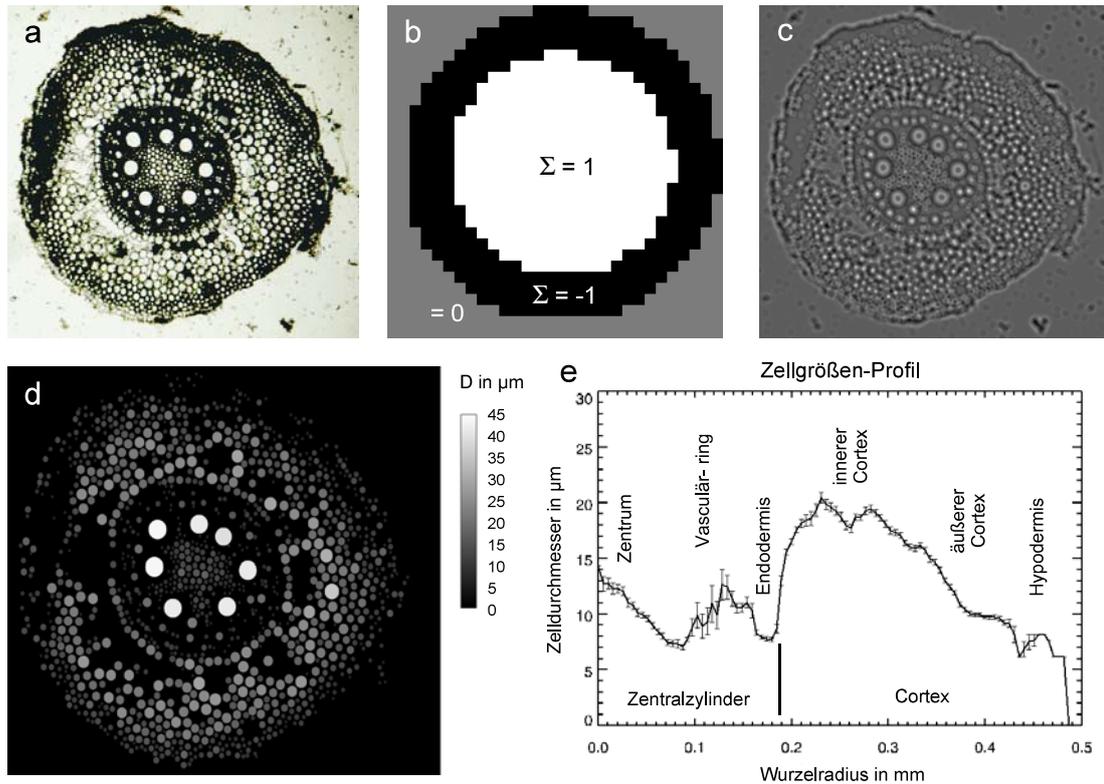


Abb. 56: Bestimmung der Zellgrößen in einer Maiswurzel. (a) Lichtmikroskopieschnitt. (b) Mustermatrix zur Suche von Kreisen (Zellen) mit 20 Pixeln ( $20.5\mu\text{m}$ ) Durchmesser. (c) Ergebnis der Faltung des Mikroskopiebildes mit der Mustermatrix. (d) Ermittelte Zellgrößen. (e) Zellgrößenprofil, das wie in Abschnitt 6 beschrieben aus (d) bestimmt wurde.

### 9.3 Relaxationszeiten und Zellgrößen

In früheren Abschnitten, z.B. in Abbildung (44), wurden Profile der Relaxationszeiten aus Maiswurzeln gezeigt. Aus der Literatur sind mit Gleichung (13) und Gleichung (16) Zusammenhänge zwischen Kompartimentgrößen und Relaxationszeiten bekannt. Zur Interpretation der Relaxationszeit-Profile stellt sich die Frage, ob sich die Variationen der Werte innerhalb eines Gewebes durch unterschiedliche Zellgrößen erklären lassen. Besonders der radiale  $T_1$ -Verlauf im ansonsten recht homogenen Cortex wirft diese Frage auf.

Um den Zusammenhang zwischen Maiswurzelzellen und den gemessenen Relaxationszeit-Profilen zu beurteilen, muss die Verteilung der Zelldurchmesser ermittelt werden. Dafür wurde ein Algorithmus implementiert, der bei geeignetem Kontrast und Auflösung in einem Lichtmikroskopiebild die Zellen auffindet und ihre Größe bestimmt.

Das Mikroskopiebild (Abbildung (56-a)) wird als Matrix behandelt, deren Einträge die Graustufenwerte der Bildpixel wiedergeben. Diese Matrix wird mit verschiedenen großen Mustermatrizen gefaltet, die dem Schema verschieden groß,

runder Zellen entsprechen (Abbildung (56-b)). Die Karte Abbildung (56-c) zeigt ein Beispiel einer der dabei entstehenden „Korrelationsmatrizen“, die die Größe der Bildmatrix besitzen. Je besser ein Bereich des Mikroskopiebildes mit dem Inhalt der Mustermatrix übereinstimmt, desto größer wird der Eintrag in der Korrelationsmatrix im Mittelpunkt dieses Bereiches.

Für alle zu erwartenden Zellgrößen wird eine Mustermatrix und damit eine Korrelationsmatrix erzeugt. Damit diese untereinander vergleichbar sind, wird die Summe aller Einträge der inneren Kreisfläche der Mustermatrizen auf 1 normiert und werden die Einträge und Fläche des umgebenden Ringes so gewählt, dass die Summe aller Elemente einer Mustermatrix 0 ergibt.

Alle erhaltenen Korrelationsmatrizen werden verglichen und jedem Bildpunkt der Zelldurchmesser zugeordnet, dessen Korrelationsmatrix den höchsten Wert an diesem Punkt enthält. Von allen Ergebnisbereichen, deren Korrelationswert einen vorgegebenen Schwellenwert überschreitet, wird der Mittelpunkt (entsprechend dem Pixel mit dem höchsten Korrelationswert) gesucht und als Zellmittelpunkt identifiziert.

Das Verfahren findet offensichtlich ausschließlich kreisförmige bzw. kreisähnliche Zellen, was, wie man im Mikroskopiebild Abbildung (56-a) sehen kann, eine gute Näherung der Zellform darstellt. Die Identifikation der „unförmigen“ Interzellularräumen, besonders des Aerenchyms, wird dabei vermieden. Man beachte, dass aufgrund des Mikroskopiebildes damit die Innendurchmesser der Vakuolen bestimmt werden, nicht die Außendurchmesser der Zellen, da Zytoplasma und Zellwände als dunkler Außenbereich die detektierbare Umrandung der hellen Vakuole bilden.

Abbildung (56-d) zeigt das Ergebnis der Zellgrößenbestimmung für den Lichtmikroskopieschnitt (a). Für jede gefundene Zelle ist ein Kreis in entsprechender Größe dargestellt, dessen Grauwert dem Zelldurchmesser entspricht.

Nach dem in Abschnitt 6 beschriebenen Verfahren wurden aus den Zellgrößenkarten von acht verschiedenen Mikroskopieschnitten Profile erstellt. Auch dabei wurden die großen Metaxylemgefäße ausgenommen. Die Grafik Abbildung (56-e) zeigt das Profil der nebenstehenden Zellgrößenkarte. Deutlich ist ein nahezu linearer Abfall des Radius' der Zellen im Zentralzylinder, vom Mittelpunkt bis zu den kleinen Parenchymzellen zwischen den Metaxylemgefäßen, zu erkennen. Als Mittelwert der acht ausgewerteten Profile ergibt sich für die Wurzelmitte ein Zelldurchmesser von  $14.9\mu\text{m} \pm 2.2\mu\text{m}$  und für das Ende des linearen Abfalls  $8.6\mu\text{m} \pm 1.4\mu\text{m}$ . Der nach außen anschließende, sehr uneinheitliche Verlauf entspricht dem äußeren Bereich des Zentralzylinders zwischen Metaxylem und Endodermis, der mit Phloem und „frühem“ Metaxylem sehr unterschiedlich große Zellen enthält. An die Endodermis mit sehr kleinen Zellradien schließt sich das Cortexgewebe an. Dessen Zelldurchmesser erreichen im inneren Cortexbereich ein Maximum mit durchschnittlich  $25.3\mu\text{m} \pm 3.9\mu\text{m}$  und fallen zur Wurzelrinde hin bis auf  $12.9\mu\text{m} \pm 2.5\mu\text{m}$  ab.

Einen qualitativ sehr ähnlichen Verlauf findet man für das  $T_1$ -Profil der Mais-

wurzel, wie z.B. in Abbildung (44-g) zu sehen (schwarze Kurve für ungestressten Zustand). Mit Gleichung (13) wurde daher ein theoretisches  $T_1$ -Profil aus den Zellengrößen ermittelt. Für das intrinsische  $T_1$  wurde dabei wie in 9.1.5 wieder 4s angenommen; es hat keinen maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis. In Abbildung (57) ist das so berechnete  $T_1$ -Profil für zwei verschiedene Werte der „surface sink strength“  $H$  dem gemessenen  $T_1$ -Profil von Pflanze 27 (vgl. Abbildung (44-g)) gegenübergestellt.

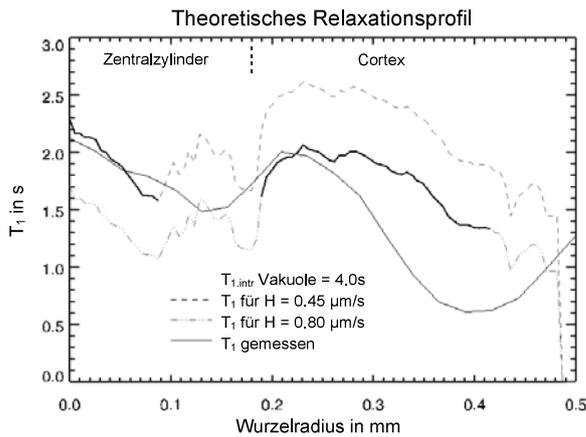


Abb. 57:  $T_1$ -Relaxationsprofil nach Gleichung (13) aus dem Zellgrößenprofil aus Abbildung (56) berechnet. Zum Vergleich ist als dünne durchgezogene Linie das  $T_1$ -Profil einer anderen Pflanze zu sehen.

Innerhalb des Zentralzylindergewebes gibt die Theorie den tatsächlichen Verlauf sehr gut wieder. Das Cortexgewebe zeigt ein nahezu doppelt so großes  $H$ , und hier folgt der theoretische Verlauf nur grob qualitativ dem realen  $T_1$ -Profil. Auch unter zusätzlicher Berücksichtigung des Anteils an extrazellulärer Flüssigkeit (mit niedrigerem  $T_1$ -Wert), der nach außen zwischen den kleiner werdenden Zellen zunimmt, ändert sich das Bild nur unerheblich. Mit einer theoretischen Berechnung des  $T_1$ -Wertes nach Gleichung (16) ergibt sich ein gleicher Verlauf, der den starken Abfall des  $T_1$ -Wertes zum Rand der Wurzel hin ebenfalls nicht erklären kann.

Es ist daher davon auszugehen, dass neben der Zellgröße zumindest ein weiterer Parameter im Cortex nicht konstant ist. Durch eine Zunahme der Konzentration verschiedener gelöster Substanzen von innen nach außen könnten entweder  $H$  zu- oder das  $T_{1, \text{intr}}$  kontinuierlich abnehmen.  $H$  würde in diesem Sinne einer Konzentrationsänderung im Zytoplasma,  $T_{1, \text{intr}}$  einer Änderung in der Vakuole folgen.

Wie in Abschnitt 9.1 beschrieben, nimmt während einer Trockenstressphase  $T_1$  im Cortex erheblich ab. Ein Teil dieser Abnahme ist mit Sicherheit durch die Verkleinerung der Zellen zu erklären. Eine Lichtmikroskopie der gestressten Pflanzen ist aufgrund der Empfindlichkeit des eingetrockneten Cortex nur schwer möglich, so dass die Zellgrößen in diesem Zustand nicht direkt bestimmt werden können. Aus der Abnahme des Wurzelradius lässt sich jedoch auf eine ungefähre Änderung der Zellvolumen und damit deren Durchmesser schließen. Der Vergleich dieser Werte der untersuchten Pflanzen über Gleichung (13) mit der beobachteten  $T_1$ -Änderung ergab jedoch außer der grundsätzlichen Abnahme beider Größen ( $T_1$  und Durchmesser) keinen sichtbaren Zusammenhang. Es ist davon auszuge-

---

hen, dass hier andere Relaxationsmechanismen wie die Konzentrationserhöhung eine wesentliche Rolle spielen, ebenso wie die Tatsache, dass die Volumenabnahme verschiedener Zellen und verschiedener Zellkompartimente äußerst inhomogen verläuft.

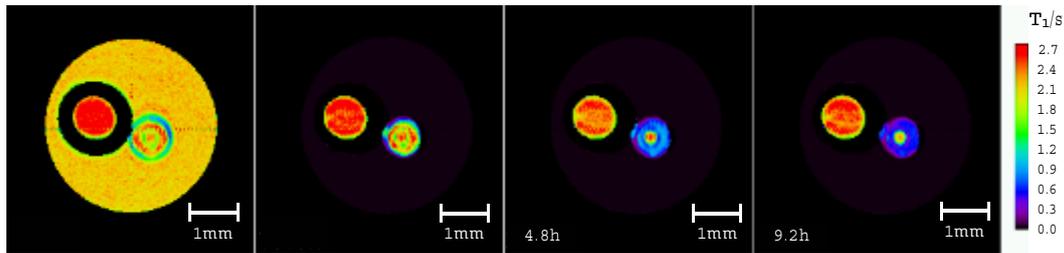


Abb. 58:  $T_1$ -Karten einer Maiswurzel, vor und direkt nach der Befüllung des Röhrchens mit 10mmol Gd-DTPA versetzter Nährlösung, sowie 4.8h und 9.2h später.

## 9.4 Kontrastmittelaufnahme von Wurzeln

Paramagnetische NMR-Kontrastmittel verkürzen die Relaxationszeiten und erzeugen so neue Bildkontraste, abhängig davon, wie schnell sie welche Gewebe- oder generell Probenbereiche erreichen können. In einzelnen Fällen wurden Kontrastmittel bereits für NMR-Studien an Wurzeln eingesetzt.

Mit Kupfersulfat als Kontrastmittel versetzte Nährlösung wurde z.B. genutzt, um die Wiederaufnahme von Wasser durch ein Wurzelsystem darzustellen [BRF86]; wobei sich die Frage stellt, ob das  $\text{CuSO}_4$  mit der gleichen Kinetik aufgenommen wird wie das Wasser.

Das biologisch weitestgehend inerte Gadolinium-DTPA (Gd-DTPA, auch unter dem Markennamen „Magnevist“<sup>16</sup> bekannt) wurde eingesetzt, um durch den verursachten Suszeptibilitätsshift extrazelluläre von intrazellulärer Flüssigkeit zu unterscheiden [ZLSH<sup>+</sup>00]. Die ungehinderte Aufnahme in den Apoplasten war dabei jedoch nur bei zerschnittenen Wurzeln möglich.

Letztere Aussage lässt darauf schließen, dass eine intakte Wurzel (-epidermis) das große Gd-DTPA-Molekül nicht oder nur gering passieren lässt. Die im folgenden beschriebene Messung der Aufnahme von Gd-DTPA durch eine Wurzel wurde mit zwei möglichen Zielen durchgeführt. Zum einen sollte untersucht werden, ob sich ggf. Diffusionsbarrieren für dieses Makromolekül erkennen lassen. Zum anderen könnte eine geringe oder unmögliche Aufnahme des Gd-DTPA durch die Wurzel dazu verwendet werden, die Wurzeln von Umgebungsmedien zu unterscheiden, die inhomogener oder in ihren Bildkontrasten dem Wurzelgewebe ähnlicher sind (vgl. Abschnitt 9.5) als eine rein wässrige Nährlösung.

Die Nährlösung einer 6 Tage alten Maispflanze wurde während einer Messreihe ausgetauscht. Nach der Aufnahme einer ersten  $T_1$ -Karte wurde Nährlösung mit 10mmol Gd-DTPA in das Röhrchen gefüllt. Durch die Akquisition von weiteren Karten über 10 Stunden hinweg wurde die Aufnahme des Gd-DTPA durch die Wurzel beobachtet.

In Abbildung (58) sind  $T_1$ -Karten zu verschiedenen Zeiten des Experimentes zu sehen. Deutlich nimmt im Laufe der Zeit der  $T_1$ -Wert im Cortex ab. Verglichen

<sup>16</sup>Schering AG

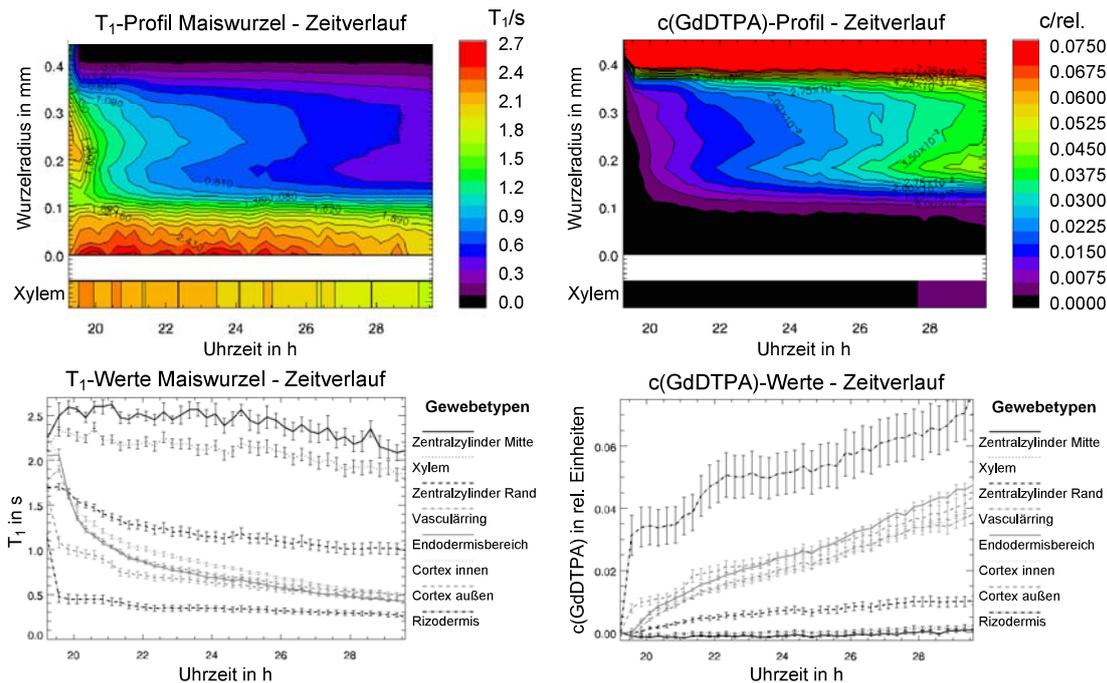


Abb. 59: Links ist  $T_1$ , rechts sind die daraus berechneten Gd-DTPA-Konzentrationen gezeigt, normiert auf den berechneten Wert im umgebenden Nährmedium. Oben ist der Zeitverlauf des jeweiligen Wertes als Profil der ganzen Maiswurzel zu sehen. Unten sind die Zeitverläufe spezieller Geweberegionen herausgegriffen. Bei der Mittelwertsberechnung aus der  $T_1$ -Karte ergeben sich die eingezeichneten Standardfehler und über das Fehlerfortpflanzungsgesetz daraus die Fehler der Konzentrationswerte der rechten Grafik.

mit dem  $T_1$  der Gd-DTPA versetzten Nährlösung von  $0.0247\text{s} \pm 0.0014\text{s}$  ist diese Abnahme jedoch unbedeutend. Das deutet auf eine nur geringe Aufnahme des Gd-DTPA durch die Wurzelepidermis hin.

Je höher die Konzentration des Gd-DTPA (z.B. innerhalb der Wurzel) ist, desto stärker erscheinen diese Bereiche im Bild nach rechts, in Ausleserichtung, verschoben. Die Ursache dafür ist die schon erwähnte Suszeptibilität des Kontrastmittels, die lokal die  $B_0$ -Feldstärke erhöht und so zum Lesegradienten beiträgt. Im schmalen Bereich zwischen Wurzel und Referenzröhrchen (das mit Kontrastmittel-freier Nährlösung gefüllt ist) ist dieser Effekt am auffälligsten. In der Überlagerung verschiedener Probenregionen führt dies zu Fitfehlern am rechten und linken Rand von Strukturen wie der Wurzel. Deshalb wurde für die Auswertung des radialen  $T_1$ -Profils (wie in Abschnitt 6 beschrieben) nur ein vertikaler Streifen der  $T_1$ -Karte in Breite des Zentralzylinders berücksichtigt.

In Abbildung (59) ist links die zeitliche Entwicklung der  $T_1$ -Werte dargestellt, beginnend mit der Einzelmessung vor der Gd-DTPA-Zugabe. Im Außenbereich, hier als Rizodermis bezeichnet, erfolgt eine spontane  $T_1$ -Änderung, die danach über die Zeit weitestgehend konstant erscheint. Wahrscheinlich resultiert die schnelle Reduktion aus einem Eindringen des Kontrastmittels in die Unebenheiten der

Wurzeloberfläche und somit aus einem Partial-Volume-Effekt, der ein mittleres  $T_1$  bewirkt. Hinzu kommt möglicherweise eine Diffusion relaxierter Magnetisierung in die Wurzel (vgl. Abschnitt 8.5).

Im äußeren Cortex fällt der Wert zuerst auch steiler ab, gleicht sich dann aber dem asymptotischen Verhalten des inneren Cortex' an. Erstaunlicherweise folgt der Verlauf für den Endodermisbereich und den Vaskularring, der bereits innerhalb des Caspary-Streifens liegen sollte, ebenfalls diesem  $T_1$ -Abfall. Erst der Bereich des Zentralzylinders zwischen Vaskularring und Metaxylem zeigt einen schwächeren Abfall. Im Zentrum ebenso wie im Metaxylem ist kaum ein Effekt des Kontrastmittels festzustellen.

Die Wirkung eines paramagnetischen Kontrastmittels wie Gd-DTPA auf  $T_1$  lässt sich nach Angabe aus der Literatur ([Pri94]) wie folgt durch die Konzentration  $c(\text{Gd-DTPA})$  im Medium beschreiben:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1,0}} - R \cdot c(\text{Gd-DTPA})$$

Dabei ist  $T_{1,0}$  der Ausgangswert für  $c(\text{Gd-DTPA})=0\text{mmol/l}$  und  $R$  die „Relaxivität“, eine Konstante, die abhängig von Kontrastmittel, Feldstärke, Temperatur etc. die Wirkung der Kontrastmittelkonzentration beschreibt.

Die rechte Seite von Abbildung (59) zeigt den Zeitverlauf der so berechneten Konzentrationen. Auffällig ist der zuerst sprunghafte Anstieg im Rizodermisbereich, der dann in einen nahezu linearen Anstieg, parallel zum Verlauf in Vascularring, Endodermis und Cortex, übergeht. Der „Sprung“ wird offensichtlich durch den direkten Kontakt mit dem ausgetauschten Medium bewirkt.

Der gleichmäßige Anstieg deutet auf eine relativ ungehinderte Verteilung des Kontrastmittels über den Cortex hinweg hin, wobei jedoch die Diffusion durch die Rizodermis stark reduziert ist. Im Zentralzylinder zeigt der Konzentrationswert nahezu keine Veränderung im Rahmen der Messdauer. Im Bereich der Endodermis liegt die Konzentrationserhöhung leicht über denen der benachbarten Bereiche, selbst über der des äußeren Cortex. Das gleiche Verhalten ist noch deutlicher im darüber dargestellten Profil-Zeitverlauf zu erkennen. Innerhalb der ersten Stunden findet der Anstieg der Konzentration von außen nach innen statt. Nach etwa 3 Stunden (ab Zeitindex 23h) übertrifft jedoch die Konzentration um  $r=0.18\text{mm}$  in der Wurzel die Konzentration der weiter außen liegenden Bereiche. Trotz weiterer Erhöhung in diesem Bereich bleibt der innere Zentralzylinder ohne nachweisbare Kontrastmittelkonzentration, was einen sichtbar zunehmenden Gradienten zwischen  $r=0.18\text{mm}$  und  $r=0.10\text{mm}$  zur Folge hat. Diese Beobachtungen lassen auf eine Diffusionsbarriere im äußeren Zentralzylinderbereich schließen, an der eine Akkumulation des Gd-DTPA stattfinden könnte. Aufgrund der Breite des Konzentrationsgradienten und seiner Lage in einem Bereich, der bereits dem Zentralzylinder zugeordnet werden kann, stellt sich jedoch die Frage, ob daran ausschließlich der Caspary-Streifen beteiligt ist.

Die als niedriger berechnete Konzentration im mittleren Cortexbereich lässt sich aber auch mit einem hier deutlich geringeren Anteil extrazellulärer Flüssigkeit deuten. Da zum einen die Zellen des Cortex' in diesem Bereich größer sind und zum anderen die Pflanze bereits sichtbar Aerenchym ausgebildet hat, liegt die Gd-DTPA-Menge pro Volumen hier ggf. deutlich unter der eigentlichen Konzentration in der Flüssigkeit. Dieser Konzentrationsdefekt führt im Mittel zu einem längeren beobachteten  $T_1$ . Im untersuchten Wurzelbereich (3cm unterhalb des Korns, 7cm von der Wurzelspitze entfernt) findet im allgemeinen keine nennenswerte Nährstoff- und Wasseraufnahme statt. Eine Transport-getriebene Gd-DTPA-Akkumulation ist somit als Erklärung für den „inversen“ Konzentrationsverlauf im inneren Cortex als eher unwahrscheinlich anzusehen.

Die vorliegende Messung war als Vorstudie konzipiert, um die Möglichkeiten zu bewerten, die sich mit dem Einsatz von Gd-DTPA oder ähnlichen makromolekularen Kontrastmitteln für NMR-Studien an Pflanzenwurzeln ergeben. Es konnte gezeigt werden, dass das Kontrastmittel auch von einer intakten Wurzel aufgenommen wird und durchaus erste Aussagen über mögliche Diffusionswege und -barrieren durch und im Apoplasten ermöglicht. Daneben kann festgestellt werden, dass die Kontrastmittelaufnahme sehr langsam abläuft – nach 10h sind im Cortex etwa 4% der Konzentration im Außenmedium erreicht. Daher erscheint eine Kontrastmittelzugabe ins Außenmedium als vielversprechender Ansatz, um die Wurzeln zumindest auf einer kurzen Zeitskala von diesem unterscheiden zu können.

## 9.5 Wurzeln in inhomogenen Umgebungsmedien

Üblicherweise befanden sich die in dieser Arbeit untersuchten Wurzeln in einer Nährlösung als Umgebungsmedium bzw. Substrat. Für die bisher gezeigten funktionellen Untersuchungen von Pflanzenwurzeln erwies sich dies in mehrerer Hinsicht als vorteilhaft:

- Es war eine kurzfristige kontrollierte Variation des Flüssigkeits- und Nährstoffangebotes möglich.
- Es traten keine Suszeptibilitätssprünge innerhalb des Umgebungsmediums auf, die zu Bildstörungen führen und besonders die Werte am Rand der Wurzel verfälschen könnten.
- Im einheitlichen Medium waren die Wurzeln eindeutig zu identifizieren und zu segmentieren.

Daneben wären jedoch auch viele Studien interessant, die sich gerade mit dem Umgebungsmedium beschäftigen. In Anlehnung an Abschnitt 9.6 könnte z.B. die Auswirkung des Substrates auf die dreidimensionale Struktur des Wurzelwachstums untersucht werden, wie [AJFK99] die Gravitationsorientierung des Wachstums durch verschieden feine Substrate untersucht haben. Auch NMR-Untersuchungen, die sich mit dem sog. „hydraulic lift“ beschäftigen, bei dem Pflanzen zur Nährstoffaufnahme Wasser aus tieferen Bodenschichten in höheren wieder abgeben (siehe z.B. [XB93]), wären auf variable Substrate angewiesen. Grundsätzlich sind viele Ansätze denkbar, die sich wie [MJK90] mit der Wasseraufnahme aus dem Boden beschäftigen und dafür unter anderem den lokalen Wassergehalt des Substrates um die Wurzeln messen.

Im Folgenden soll am Beispiel von Sand untersucht werden, wie sich Wurzeln in einem inhomogenen Umgebungsmedium darstellen. Anhand von Relaxationszeitkarten werden die Grundlagen für Bildkontraste ermittelt, um Aussagen zur Segmentierbarkeit der Wurzeln treffen zu können.

Für diesen Zweck wurde eine Maispflanze auf Silikatsand angezogen und Parameterkarten ihrer Wurzeln aufgenommen. In Abbildung (60) ist links oben eine Turbospinechoaufnahme aus dem innen 11mm durchmessenden, sandgefüllten Röhrchen zu sehen. Kennt man die Struktur einer Maiswurzel in solchen NMR-Bildern, findet man relativ leicht die drei Nebenwurzeln (A) am linken Rand unterhalb der Mitte. Etwas schwerer ist die flach durch die Bildebene verlaufende Hauptwurzel (B) links oberhalb der Bildmitte zu identifizieren. Eine weitere Wurzel am oberen Biltrand (C) findet sich leichter mit Hilfe der  $T_1$ -Karte (links unten in Abbildung (60)), da hier der Cortex mit einheitlich niedrigerem  $T_1$ -Wert von der Bildebene angeschnitten wird.

Grundsätzlich unterscheidet sich jedoch das Wurzelgewebe nicht in seinen Werten (weder  $T_1$ , Spindichte noch  $T_2$ ) von der Feuchtigkeit, die sich zwischen den Sandkörnern hält. Eine automatische Segmentation nur anhand dieser Karten erscheint kaum möglich.

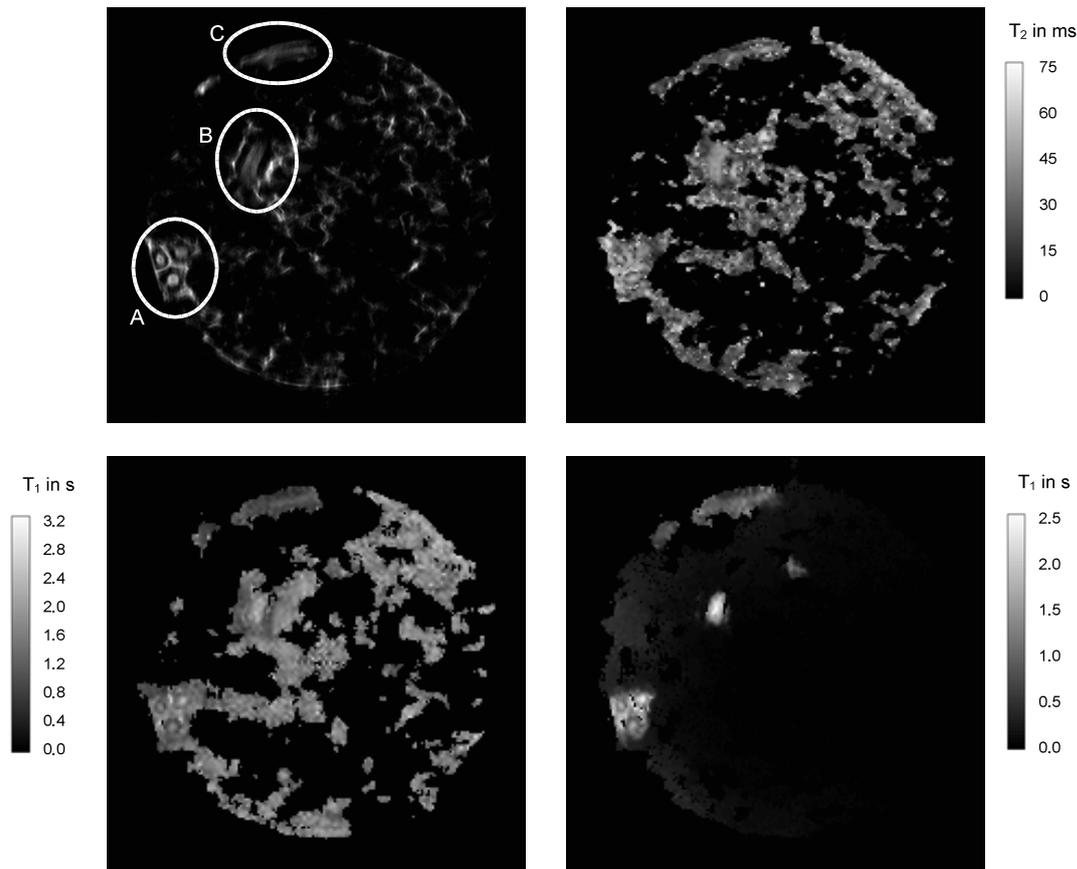


Abb. 60: Links oben: Turbospinecho einer Maiswurzel in feuchtem Sand, 4-Echozug, 256Pkt x 256Pkt,  $T_R=1s$ ,  $T_E=T_{Ei}=9.1ms$ , in den markierten Bereichen A - C finden sich Wurzeln in der Bildebene. Rechts oben:  $T_2$ -Karte derselben Schicht, 128Pkt x 128Pkt. Unten:  $T_1$ -Karten, 128Pkt x 128Pkt, links vor, rechts unmittelbar nach der Zugabe von Gd-DTPA ins Umgebungsmedium. Für alle 4 Bilder gilt: FOV=13.3mm x 13.3mm, Schichtdicke=0.5mm.

Der Flüssigkeit im Sand wurde Gd-DTPA als NMR-Kontrastmittel zugegeben, um die  $T_1$ -Zeit zu senken. In einer weiteren  $T_1$ -Karte (rechts unten in Abbildung (60)), die eine Viertelstunde nach der Zugabe entstand, sind die Wurzeln nun deutlich zu erkennen. In dieser Zeitspanne erfolgt nach den Ergebnissen aus Abschnitt 9.4 keine nennenswerte Aufnahme des Kontrastmittels durch die Wurzeln. Es zeigt sich, dass in der Mitte der oberen Bildhälfte eine weitere Seitenwurzel durch die Bildebene verläuft, die in der inhomogenen Struktur des feuchten Sandes vorher nicht zu erkennen war.

Um Strukturinformationen über ein Wurzelsystem in einem inhomogenen Medium wie Sand oder Erde zu gewinnen, erscheint ein Kontrastmittel als der einzige mögliche Weg. So lässt sich (zumindest für einige Stunden) das Wurzelgewebe von der Flüssigkeit im Substrat unterscheiden. Aus einer 3D-Aufnahme mit geeignetem Kontrastverhalten kann so wie in Abschnitt 9.6 das Wurzelsystem

automatisch segmentiert und seine Struktur rekonstruiert werden.

Als Hinweis für mögliche Alternativen sei noch angefügt, dass anstelle von bzw. zusätzlich zu  $T_1$  und  $T_2$  auch die Diffusion betrachtet werden kann. Die Aufnahmedauer einer entsprechenden 3D-Sequenz muss jedoch in einem zeitlichen Rahmen bleiben, in dem keine nennenswerten Änderungen, besonders durch das Wachstum der Wurzel, stattfinden.

Auch für funktionelle Studien, z.B. zur Wasseraufnahme, bei denen der Wassergehalt des Substrates gemessen werden soll, kann ein Kontrastmittel hilfreich sein. Ob ein solches bereits während der Messung eingesetzt werden kann, ohne dabei die Ergebnisse zu beeinflussen, muss im Einzelfall entschieden werden. Denkbar wäre jedoch in jedem Fall, nach Abschluss einer solchen Messreihe Kontrastmittel zur Flüssigkeit im Umgebungsmedium zuzusetzen, um die Lokalisation der Wurzeln zu verifizieren.

## 9.6 3D-Struktur von Wurzeln

Mit klassischen Methoden ist eine zerstörungsfreie Untersuchung des Wurzelsystems nur schwer möglich. Durch Ausgraben und Entfernen des Umgebungsmediums werden die Wurzeln nicht nur möglicherweise beschädigt, sondern vor allem wird ihre dreidimensionale Anordnung verändert. Die Information über Verzweigungswinkel und richtungsabhängige Ausbreitung des Wurzelsystems geht verloren. Die Pflanzenanzucht zwischen Glasplatten schafft nur eine bedingte Abhilfe, da damit das natürliche Wachstum des Wurzelsystems in seiner Geometrie beeinträchtigt wird.

Aus diesen und ähnlichen Gründen wurde bereits versucht, die dreidimensionale Struktur von Wurzeln mit Hilfe von NMR-Projektionsaufnahmen zu rekonstruieren [SJ92]. Auch in einzelnen anderen Arbeiten wurden in Projektion Wurzelsysteme und besonders ihre Wasserverteilung untersucht [BRF86, BRP93].

Will man jedoch auch (geometrische) Informationen über den inneren Aufbau eines Wurzelsystems erhalten, benötigt man wesentlich höhere Auflösungen in alle drei Raumrichtungen als in den genannten Arbeiten verwendet. Dabei muss man sich notwendigerweise auf einen Ausschnitt des Wurzelsystems beschränken.

Im Folgenden werden Ergebnisse der in 5.2.2 vorgestellten 3D-Turbospinecho-Sequenz gezeigt. Damit wurde ein  $(5\text{mm})^3$  großes Volumen des Wurzelsystems einer 11 Tage alten Maispflanze abgebildet [KWZH03]. Die angeregte Schicht lag senkrecht zum Verlauf des Probenröhrchens und der Wurzel, so dass Einfaltungen aus dem Bereich darunter und darüber durch eine Beschränkung der Anregungsbreite reduziert werden konnten. Durch restliche Einfaltungsartefakte und die zum Rand hin reduzierte Signalstärke können von den 5mm in Z-Richtung nur ca. 3.75mm ungestört dargestellt werden.

Abbildung (61) zeigt drei Schnitte durch das akquirierte Volumen. Neben der Haupt- und etlichen Seitenwurzeln ist auch eine Kunststoffkapillare als Kontrastreferenz zu sehen. In der Wurzel lassen sich deutlich Cortex und Zentralzylinder unterscheiden sowie innerhalb des Zentralzylinders die Xylemgefäße verfolgen. In sechs sequentiellen Einzelschnitten ist die innere Struktur der Abzweigung in eine Nebenwurzel gezeigt.

Um zu einer „echten“ dreidimensionalen Darstellung zu gelangen, wurde der Datensatz mit der Visualisierungssoftware AMIRA bearbeitet. Von Hand wurden dabei grob die Bereiche der Wurzeln und der Kapillare segmentiert, um störende Schmutzeffekte im Umgebungsmedium von der Rekonstruktion auszunehmen. Ein Helligkeitsschwellwert zwischen dem umgebenden hellen Ring und dem dunklen Bereich des äußeren Wurzelcortex' wurde vorgegeben. Für diesen Schwellwert berechnete AMIRA die Grenzfläche zwischen Wurzel und Nährmedium. Das Ergebnis ist in Abbildung (62) gezeigt.

Gut kann man den Verlauf der verschiedenen Wurzeln durch das Bildvolumen erkennen und auch die Abzweigungen der Seitenwurzeln an der Hauptwurzel. In der rechten Darstellung ist außerdem zu sehen, dass der gleiche Schwellwert auch

geeignet ist, die Grenzfläche zwischen Cortex und Zentralzylinder zu bestimmen. Selbst in den Seitenwurzeln lässt sich dieser verfolgen.

Mit diesen ersten 3D-NMR-Mikroskopiebildern einer Pflanzenwurzel konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, in praktikabler Zeit (70min) eine ausreichende Auflösung zu erzielen, um die äußere und innere Struktur eines Wurzelsystems nichtinvasiv darzustellen.

Bei halber räumlicher Auflösung, vorzugsweise entlang der Längsrichtung der Wurzel, und somit 35min Aufnahmedauer, wären auch funktionelle Studien mit dem Fokus auf dreidimensionale Veränderungen denkbar. Für eine Untersuchung von Wachstumsprozessen könnte man die Zeitauflösung zugunsten einer noch

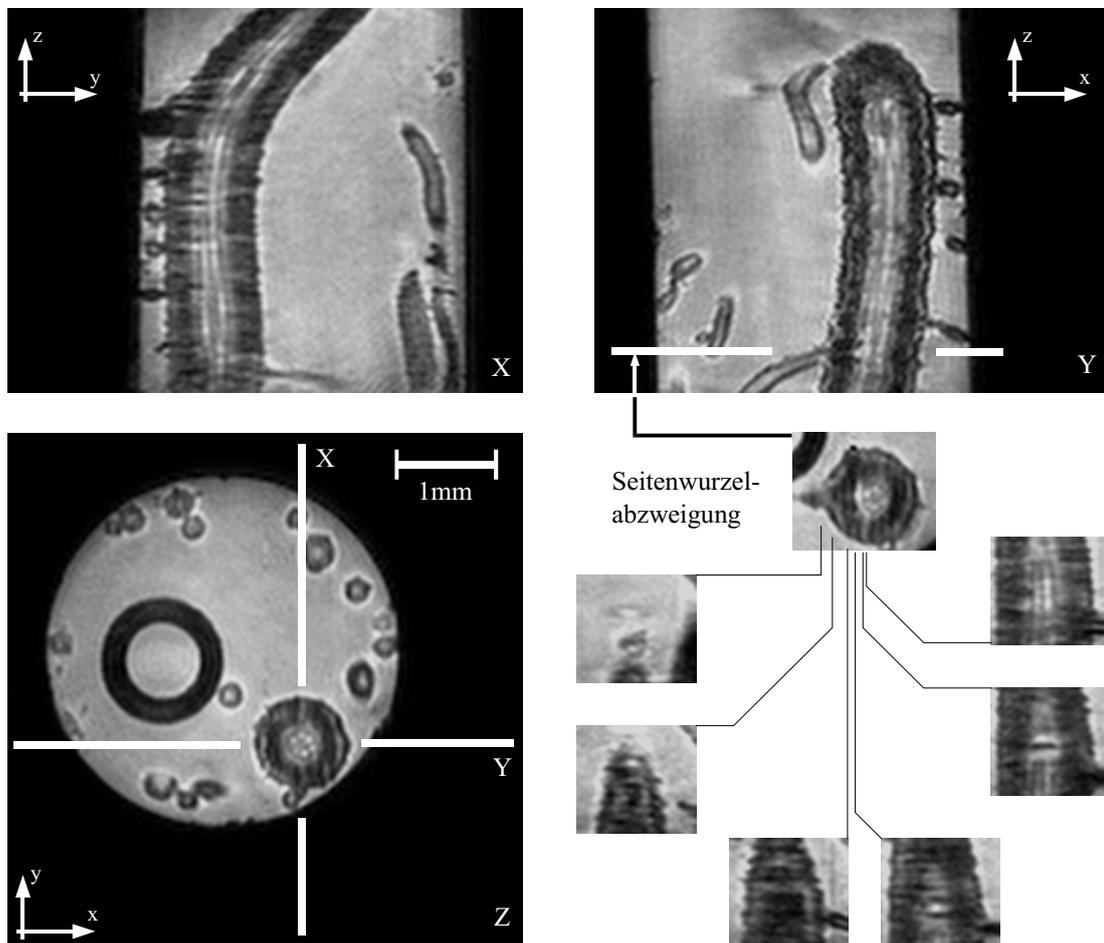


Abb. 61: Die Bilder X, Y und Z zeigen Schnitte durch den 3D-Datensatz von Haupt- und Nebenwurzeln einer 11 Tage alten Maispflanze. Für die drei Darstellungen wurde jeweils  $x$ ,  $y$  bzw.  $z$  als konstant gewählt. Die gewählten Schnittebenen von X und Y sind in der Z-Ebene eingezeichnet. Deutlich ist der Verlauf der Xylemgefäße im Zentralzylinder zu erkennen. Rechts unten ist in einer Schnittsequenz die Verzweigung in eine Nebenwurzel zu sehen. 3D-Turbospinecho,  $T_E=T_{i,E}=8.7\text{ms}$ ,  $T_R=1.1\text{s}$ ,  $(128\text{Pkt})^3$ , vom  $\text{FOV}=(5\text{mm})^3$  sind nur  $5\text{mm} \times 5\text{mm} \times 3.75\text{mm}$  gezeigt. Isotrope Auflösung:  $39\mu\text{m}$ .

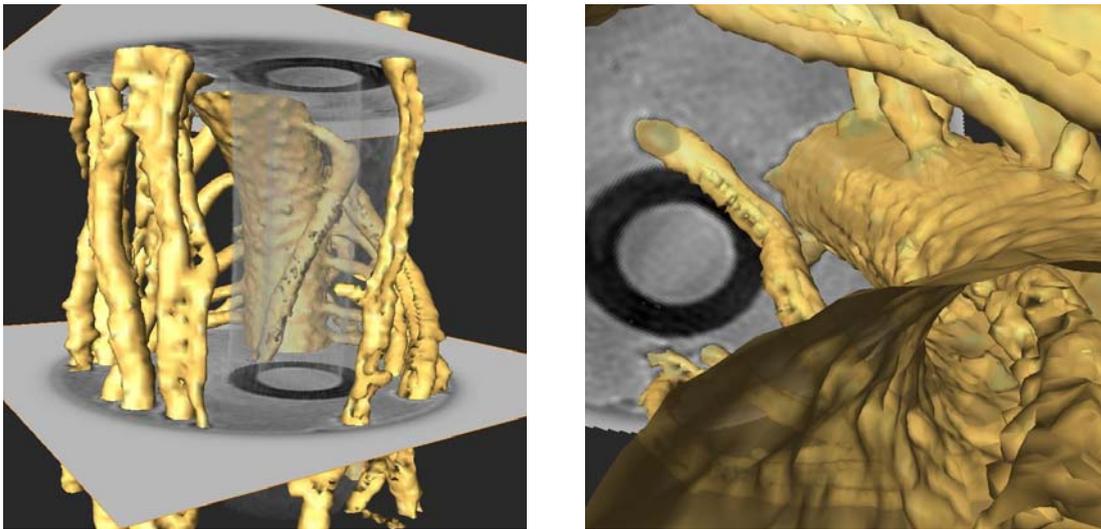


Abb. 62: Oberflächenrekonstruktion einer Maiswurzel mit Nebenwurzeln. Links ist transparent auch die Kunststoffkappillare zu erkennen. Rechts erkennt man beim „Blick“ in die Hauptwurzel den Zentralzylinder ebenso wie die Zentralzylinder der Nebenwurzeln in der halbtransparenten Darstellung.

höheren räumlichen Auflösung oder eines größeren Volumens auch reduzieren. Solche Anwendungsmöglichkeiten sollen jedoch nicht mehr Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein.

## 9.7 Messungen an *Phaseolus vulgaris*

Neben Messungen an *Zea mays* wurden die erarbeiteten Methoden auch für Untersuchungen an Wurzeln von Bohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris*) eingesetzt. Das Ziel waren dabei sogenannte „split-root“ Messungen [LOBS98], bei denen das Wurzelsystem einer Pflanze auf zwei unterschiedliche Nährlösungen aufgeteilt wird.

Abbildung (63) zeigt einen der Vorversuche zu diesen Studien. Hier entwickelten sich nach dem Abschneiden der primären Hauptwurzel einer Bohnenpflanze zwei neue Hauptwurzeln, beide im selben Medium. Die innere Struktur der linken Wurzel deutet darauf hin, dass diese bereits etwas weiter ausgebildet ist. In den verschiedenen Parameterkarten ( $T_1$ ,  $T_2$  und Spindichte) ist aber auch zu erkennen, dass sich beide Wurzeln hinsichtlich ihrer NMR-Eigenschaften identisch entwickelten. Auch zeigen beide bereits deutlichen Xylemfluss, wiederum die

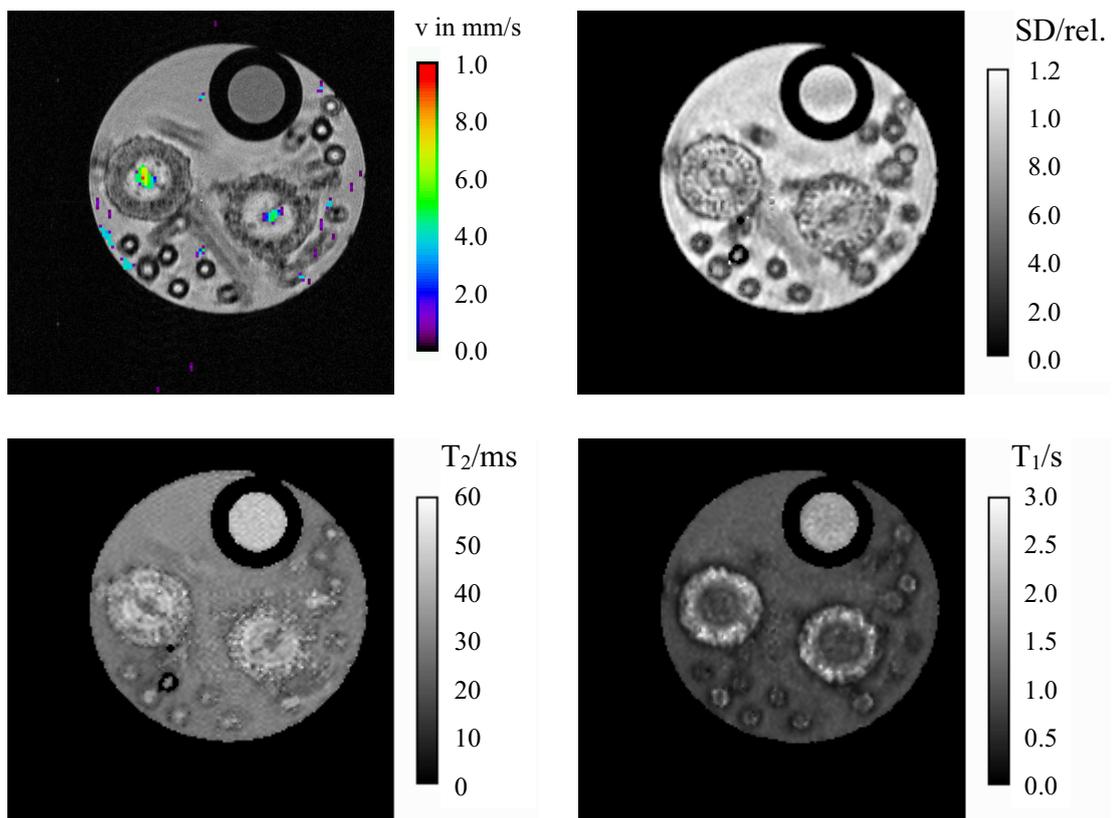


Abb. 63: Zwei Hauptwurzeln einer ca. 3 Wochen alten Bohne (split-root-Ansatz). FOV aller Darstellungen = 5mm x 5mm. Links-oben: Turbospinecho, 4-Echo-Zug, 256Pkt x 256Pkt,  $T_R=1s$ ,  $T_E=T_{i,E}=9.1ms$ , Schichtdicke 0.5mm, überlagert mit einer Geschwindigkeitskarte des Xylemflusses (128Pkt x 128Pkt, 4.0mm Schichtdicke). Links-unten:  $T_2$ -Karte. Rechts-unten:  $T_1$ -Karte. Rechts-oben: Spindichtekarte, die aus den  $T_1$ - und  $T_2$ -Daten berechnet wurde. Mit 128Pkt x 128Pkt gilt für alle Karten:  $39.5\mu m$  isotrope Auflösung bei 0.5mm Schichtdicke.

linke mit etwas höheren Geschwindigkeiten und über eine größere Querschnittsfläche. Die Entwicklung NMR-geeigneter Gefäße für eine split-root-Anzucht sowie weitere Messungen an diesem System wurden im Rahmen einer Diplomarbeit [Sch01, STKS<sup>+</sup>08] durchgeführt.

Die in Abbildung (63) vorgestellten Karten sollen hier nur die grundsätzliche Eignung der entwickelten Methoden für Untersuchungen an anderen Wurzelsystemen aufzeigen. Daneben bieten sie einen Vergleich mit den im übrigen behandelten Maiswurzeln, und man sieht, dass sich die NMR-Parameter  $T_1$  und  $T_2$  im selben Rahmen bewegen. In den Bohnenwurzeln ist ebenfalls eine eindeutige Unterscheidung zwischen Zentralzylinder und Cortex gegeben, und interne Strukturen sind klar unterteilt. Durch das Nachfüllen von Nährlösung unmittelbar vor der Messung besitzt das Umgebungsmedium etwas andere Werte als die Lösung in der Kapillaren. Auffällig ist auch die lange  $T_1$ -Zeit im Cortex der beiden Hauptwurzeln, die, wie auch bei den meisten Maiswurzeln, über dem Wert der Nährlösung liegt. Dies deutet auf große Zellvakuolen hin, in denen eine geringere Konzentration paramagnetischer Ionen vorliegt als im umgebenden Nährmedium (vgl. Anhang Seite 139).



## 10 Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es einerseits, Hardware und Methoden für die Kernspinresonanztomographie zu entwickeln, um damit nichtinvasive Untersuchungen an Pflanzenwurzeln durchzuführen zu können. Andererseits sollten erste Anwendungen der erarbeiteten Methodik insbesondere zum Verständnis der funktionalen Vorgänge in den Wurzeln beitragen und physikalische Phänomene im Zusammenhang mit der NMR an Wurzeln untersuchen.

Für die Handhabung und insbesondere die Einbringung und die Versorgung der Pflanzen im NMR-Tomograph wurden die in [Kau98] entworfenen Probenröhrchen optimiert, die einen Zugang der NMR-HF-Spule zu den Wurzeln gestatten. Für Anwendungen, die auch über den Bereich der Pflanzen-NMR hinaus reichen, wurde ein neues modulares Probenkopf-Konzept entworfen, umgesetzt und patentiert. Dieses Konzept gestattet die Nutzung von verschiedenen auf die gewünschten HF-Frequenzen optimierten Kanäle in Kombination mit derselben Zusatzhardware. Eine solche Zusatzhardware wäre im Sinne der vorliegenden Arbeit eine Klimakammer, die eine kontrollierte Versorgung der Pflanzen im NMR-Gerät erlaubt und darüber hinaus weitere zusätzliche Messgrößen wie Transpiration, Atmung, Temperatur, Beleuchtungsstärke, etc. liefert. Mit diesem Konzept ist es in Zukunft möglich, einen speziellen Probenkopf für Messungen von Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen aufzubauen, der nicht auf wenige, vorher festgelegte HF-Kanäle begrenzt ist. Nach Bedarf ist es möglich, HF-Kanäle für verschiedene Frequenzen und damit untersuchte Atomkerne einzusetzen.

Funktionelle Untersuchungen an Pflanzen erfordern zum einen NMR-Sequenzen, die in ausreichend kurzer Zeit die geforderten Daten liefern, um zeitliche Veränderungen in den Pflanzen verfolgen zu können. Wie gezeigt, sind zum anderen Sequenzen notwendig, die unempfindlich gegenüber Suszeptibilitätssprüngen in der Probe sind. Am besten erfüllen sog. Turbospinechos oder RARE-Experimente beide Bedingungen. Darauf basierende Sequenzen, besonders für die Messung von  $T_1$  und  $T_2$ , die am AMX implementiert wurden, konnten in zahlreichen Anwendungen ihre Eignung für die funktionelle NMR-Mikroskopie an Wurzeln zeigen. Mit einer entwickelten 3D-Mikroskopie-Turbospinechosequenz konnte zum ersten Mal die dreidimensionale Struktur eines Abschnittes einer Pflanzenwurzel mit ihren Verzweigungen dargestellt werden. Die isotrope Auflösung von  $39\mu\text{m}$  in  $128^3$  Bildpunkten erlaubt bei einer Messdauer von nur gut einer Stunde auch die Untersuchung zeitlicher Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur der Wurzeln.

Zum ersten Mal konnten im Rahmen dieser Arbeit Kavitationen in der Wassersäule der Xylemgefäße in Wurzeln sowie deren Wiederbefüllung beobachtet werden. Die Wiederbefüllung wurde systematisch untersucht, und mit einer Multi-Schicht Bildgebungssequenz gelang erstmals die Messung der Geschwindigkeit (etwa  $1\text{mm}/\text{min}$ ), mit der die Wassersäule von unten kommend den kavitierten Bereich befüllt. Der anschließend gemessene Fluss belegte ebenfalls erstmals,

dass ein kavitiertes Gefäß seine Funktionalität wiedererlangen kann. Diese Daten ergänzen die umfangreichen Untersuchungen, die zum Wasserhaushalt der Wurzeln unter Trockenstressbedingungen durchgeführt wurden. Neben der Messung der Flussgeschwindigkeit in den Gefäßen der Wurzeln waren für den Wasserhaushalt des Wurzelgewebes dabei besonders Größen wie die Relaxationszeiten und die Spindichte interessant. Diese Größen geben Aufschluss über physiologische Veränderungen. Eine umfangreiche Literaturrecherche zu bekannten Zusammenhängen zwischen physiologischen Werten und den NMR-Parametern wurde durch eigene Simulationsrechnungen ergänzt. Die daraus resultierende Zusammenstellung in dieser Arbeit diene als Grundlage für die Interpretation der gemessenen Werte. Es lässt sich damit verfolgen, wie aus den Zellen des Cortexgewebes während der Trocknung um so mehr Wasser entzogen wird, je mehr lokal gespeichert ist. Nach der Wiederbewässerung zeigt sich eine vorübergehende Verdünnung des Saftes in den Gefäßen der Wurzeln. Anschließend nimmt das Gewebe von innen nach außen wieder Feuchtigkeit auf.

Mit den Erkenntnissen aus den Arbeiten zu den Relaxationszeiten konnte weiterhin das Phänomen des hellen Ringes erklärt werden, der in den NMR-Bildern die Wurzeln umgibt. Die Diffusion von schnell relaxierter Magnetisierung hinein in Probenregionen mit langsamer Relaxation sorgt für einen  $T_1$ - oder  $T_2$ -Kontrast, ohne dass entsprechende Relaxationsmechanismen an Ort und Stelle vorliegen müssen. Die Reichweite dieses „inflow“-Effektes wird von der lokalen Relaxationskonstanten vorgegeben, die zeitlich die Diffusionsweite limitiert. Dieses im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebene Phänomen limitiert bei freier Diffusion zwischen verschiedenen Probenbereichen auch grundsätzlich die Auflösung von Relaxationskarten.

Basierend auf den Methoden und Ergebnissen dieser Arbeit können nun weitere biologische Fragestellungen zu Pflanzenwurzeln untersucht werden. Von Interesse wären hier z.B. die erwähnten Phänomene des „hydraulic lift“ oder der Symbiose mit Pilzen für den Wasserhaushalt der Wurzeln, besonders im Hinblick auf kritische Anbaubedingungen von Nutzpflanzen.

Daneben sollte aber auch das methodische Spektrum weiter untersucht werden und z.B. der Einsatz von SPRITE-Sequenzen für die schnelle Akquisition von Bildern betrachtet werden. Auch diese Sequenzen sind unempfindlich gegenüber Suszeptibilitätsstörungen und könnten zudem dazu dienen, auch sog. „gebundenes“ Wasser nachzuweisen.

---

# Anhang

---

## Zusammenfassung

Mit der direkten Nutzung des Sonnenlichtes bilden Pflanzen die energetische Grundlage für das Leben auf der Erde und damit auch die Nahrungsgrundlage für den Menschen. Trotz langjähriger Forschungen sind viele Fragen zu den funktionellen Abläufen, insbesondere dem Wassertransport, in den Pflanzen noch nicht endgültig geklärt. Als nicht-invasive Methode bietet die magnetische Kernspinresonanztomographie durch ihre Vielzahl an messbaren Größen wie Wassergehalt und Flussgeschwindigkeiten gute Voraussetzungen, um diese funktionellen Abläufe zu untersuchen. Damit sind diese Methoden auch gut geeignet, Pflanzenwurzeln in-vivo zusammen mit dem sie umgebenden Medium zu untersuchen. Dafür notwendige Hard- und Softwaremethoden wurden in dieser Arbeit entwickelt und angewendet.

Aufgrund der starken Suszeptibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Pflanzengeweben, der darin enthaltenen Luft und Umgebungsmedien wurden ausschließlich Spinechomethoden für die Anwendung an Wurzeln optimiert. Um für funktionelle Studien eine ausreichend schnelle Datenakquisition zu erzielen, wurden besonders Turbospinechomethoden (auch als RARE bekannt) für die Mikroskopie entwickelt. Auf dieser Basis wurden an einem 11.7T NMR-Mikroskopiesystem (Bruker AMX500)  $T_1$ -,  $T_2$ -,  $T_2^*$ -Sequenzen sowie eine 3D-Sequenz implementiert. Dabei wurden auch die Möglichkeiten sog. „Gradienten-Blibbs“ untersucht. Zu Lasten der Aufnahmedauer konnten die Artefakte dieser inkrementellen k-Raumabtastung durch Mittelung über geeignete Pulsphasenzyklen reduziert, aber nicht beseitigt werden. Als weitere wichtige Pulssequenz kam eine bereits etablierte Phasenkontrast-Flussmessmethode zur Anwendung.

Alle Messungen der Arbeit wurden an Wurzeln von Maispflanzen durchgeführt. Probenröhrchen, die speziell für die Messung an den Wurzeln darin aufgezogener Pflanzen entwickelt worden waren, wurden weiter verbessert, insbesondere im Hinblick auf die Anzucht der Pflanzen und die Nährlösungsversorgung während der Messungen. Im Rahmen einer betreuten Diplomarbeit wurde auch eine Variation dieser Probenröhrchen entwickelt, die aus zwei parallelen Kammern besteht. Diese Röhrchen wurden für sog. „split-root“ Messungen an Bohnenwurzeln eingesetzt.

Ein neues, inzwischen patentiertes, modulares Konzept für NMR-Probenköpfe wurde entwickelt. Es ermöglicht die Konstruktion von aufwändigeren Probenköpfen für Spezialanwendungen wie Pflanzen-Klimakammern, ohne dass man sich von vornherein auf feste Frequenzen für die HF-Zuleitungen und Ankoppelelektronik festlegen muss. Diese können nach Bedarf mit der Basis und der Spezialhardware kombiniert werden.

Der Querschnitt von Maiswurzeln zeigt eine konzentrisch angeordnete Abfolge verschiedener Gewebe. Um Mittelwerte und Standardabweichung der Messwerte aus den verschiedenen dünnen Gewebeschichten zu erhalten, wurde eine Software geschrieben, die Mittelwerte entlang geschlossener Pfade berechnen kann. Das

Ergebnis sind Profile, die vom Mittelpunkt bis zur Oberfläche der Wurzeln den Verlauf der Messwerte über die Gewebeschichten hinweg wiedergeben.

Als Grundlage für die Auswertung biologischer Aussagen der  $T_1$ -,  $T_2$ - und Spindichtekarten wurden aus einer umfangreichen Literaturrecherche die bekannten Zusammenhänge zwischen diesen Parametern und physiologischen Größen zusammengestellt. Besondere Bedeutung erhielt dabei die Verkürzung der  $T_1$ -Relaxationszeit durch erhöhte Ionenkonzentrationen sowie verkleinerte Zelldurchmesser. Mit Softwaremethoden aus der Mustererkennung wurde aus einem Lichtmikroskopiebild die radiale Verteilung der Zellgrößen über einen Wurzelquerschnitt bestimmt. Der Vergleich mit dem  $T_1$ -Profil aus einer intakten Wurzel zeigte, dass der Zusammenhang zwischen Zelldurchmesser und  $T_1$ -Wert innerhalb einer Gewebearte gut der Theorie folgt. Für verschiedene Zelltypen, insbesondere im Vergleich zwischen Zentralzylinder und Cortex, hängt  $T_1$  jedoch stärker von anderen Faktoren (wie den intrinsischen  $T_1$ -Werten verschiedener Zellkompartimente) als von den Zellgrößen ab.

Untersucht wurde zur Theorie auch das Ergebnis einer monoexponentiellen Beschreibung von mehr-Kompartimentsystemen. Eine Durchmischung solcher Kompartimente mit sehr unterschiedlichen ursprünglichen Relaxationszeiten kann sich dabei im Messergebnis erheblich vom ursprünglichen Gesamtsystem unterscheiden, bei dem nur ein begrenzter Magnetisierungs- (Wasser-) Austausch zwischen diesen Kompartimenten möglich war. Mit diesem Ergebnis bot sich eine mögliche Erklärung für den starken, irreversiblen  $T_1$ -Abfall, der in zerstörtem Pflanzengewebe beobachtet wurde.

Eine Computersimulation der Diffusion zwischen Volumenschichten mit unterschiedlichen Relaxationszeiten wurde implementiert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Reichweite der Durchmischung der messbaren Relaxationszeiten bei freier Diffusion abhängig ist von der Diffusionsweite, die nach der Einstein-Smoluchowski-Gleichung aus der jeweils lokalen Relaxationszeit resultiert. Damit ergibt sich eine grundsätzliche Limitierung der räumlichen Auflösung von Relaxationszeitkarten und auch des jeweiligen Relaxationszeitkontrastes in NMR-Bildern.

Basierend auf diesem Ergebnis konnte auch die Ursache für den hellen Ring gefunden werden, der in NMR-Bildern die Wurzeln in Nährlösung umgibt. Schnell relaxierte Magnetisierung diffundiert aus dem Wurzelgewebe heraus in das Medium und bewirkt dort einen  $T_1$ -Kontrast.

Die wichtigsten biologischen Ergebnisse der Arbeit betreffen die Reaktion der Pflanzenwurzeln auf Trockenstress. Aus der Angleichung der Spindichte- und  $T_1$ -Werte über den Wurzelquerschnitt hinweg konnte geschlossen werden, dass von Gewebe mit größeren Zellen, die mehr Flüssigkeit enthalten, bei Wassermangel auch mehr der gespeicherten Flüssigkeit abgegeben wird. Ein vorübergehendes Maximum im  $T_1$ -Wert der Xylemflüssigkeit nach der Wiederbewässerung deutet auf eine vorübergehende Verdünnung durch die schnelle Aufnahme von übermäßig viel Flüssigkeit hin. Es schließen sich auch Maxima in der Spindichte des Wurzel-

gewebes an, und zwar zeitlich versetzt von innen nach außen. Die Wiederbefüllung der Flüssigkeitsspeicher in den Zellen erfolgt im untersuchten basalen Bereich der Wurzel folglich von innen nach außen, gespeist aus dem Xylem. In Einzelfällen kam es während des Spindichtemaximums im Cortex zu einem plötzlichen Abfall der  $T_1$ -Werte, der sich im Rahmen der Messungen auch nicht wieder regenerierte. Aufgrund des optisch beurteilten schlechten Zustandes der Wurzelrinde nach der Messung wurde dies als irreversible Schädigung des Gewebes beim „Aufquellen“ interpretiert. Möglicherweise wurden durch zu plötzlichen zu hohen Druck Zellmembranen zerstört, was wie oben beschrieben zu einer Durchmischung verschiedener Kompartimente führte.

Erstmals konnten im Rahmen dieser Arbeit Kavitationen der Wassersäule im Xylem von Wurzeln sowie deren Wiederbefüllung beobachtet werden. Bei der systematischen Untersuchung zu Kavitationen gelang es auch, die bislang unbekannte Geschwindigkeit zu bestimmen (um 1mm/min), mit der die kavitierten Bereiche von unten mit einer neuen Wassersäule gefüllt werden. Neu ist weiterhin der Nachweis, dass kavitierte Gefäße nach der Wiederbefüllung Fluss zeigen, also ihre volle Funktionalität wiedererlangen können.

Um zu untersuchen, welchen Beitrag der Wurzeldruck gegenüber den Prozessen im Spross und der Transpiration an den Blättern beim Wassertransport hat, wurde der Fluss im Xylem von Wurzeln gemessen, vor und nachdem der Spross abgeschnitten wurde. Es zeigt sich, dass die Flussgeschwindigkeit zwar messbar bleibt, aber noch unter den Wert in der unbeleuchteten Pflanze abfällt. Zum Vergleich des Flusses durch die Wurzel mit den gleichzeitig gemessenen Transpirationsraten und dem nach dem Abschneiden über dem Pflanzenstumpf aufgefangenen Exsudat wurde eine Methode entwickelt, um aus den Daten der Flusskarten auch die Durchflussmenge bestimmen zu können. Für die Messung bei intakter Pflanze ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung der Durchflussmenge mit der Transpiration. Über die Ursache für die Messung eines gegenüber der Exsudatmenge annähernd doppelt so großen Flussvolumens nach dem Abschneiden der Pflanze konnte daher nur spekuliert werden.

Messungen zur Aufnahme des NMR-Kontrastmittels Gd-DTPA durch die Wurzeln zeigen das leichte Eindringen dieses Makromoleküls in den Wurzelkortex sowie das Vorhandensein einer Diffusionsbarriere zum Zentralzylinder. Allerdings erreicht auch nach 10h die Gd-DTPA-Konzentration im Cortex erst 4% der Konzentration in der verwendeten Nährlösung. Damit ergibt sich, wie im weiteren gezeigt wurde, eine gute Möglichkeit, Wurzeln auch von einem inhomogenen Umgebungsmedium, wie z.B. feuchtem Sand, zu unterscheiden.

Mit der implementierten 3D-Turbospinecho-Mikroskopiesequenz wurde erstmals eine hochaufgelöste NMR-3D-Darstellung eines Wurzelabschnittes ermöglicht (isotrop  $39\mu\text{m}$  bei  $128^3$  Voxeln). Darin kann z.B. auch die innere Struktur der Abzweigung einer Nebenwurzel von der Hauptwurzel verfolgt werden. Durch die mit 70min verhältnismäßig kurze Messdauer dieser 3D-Sequenz sind in Zukunft auch funktionelle Untersuchungen möglich, z.B. der Ausbildung dreidimensiona-

ler Wurzelstrukturen während des Wachstums.

Neben den bereits im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen biologischen Erkenntnissen stehen hiermit eine ganze Reihe erprobter Methoden für weitere Untersuchungen an Pflanzenwurzeln zur Verfügung.

## Summary

Because they can directly convert sunlight into useable energy, plants are the energetic basis for life on earth and the food supply of mankind. Despite intense research on the topic, there are still many open questions concerning functional processes in plants, especially the uptake and transport of water. MR imaging methods allow the non-invasive determination of values such as flow velocity and water content. Therefore, these methods provide a perfect means for the in-vivo examination of plants together with their surrounding medium. It was the aim of this PhD thesis to develop necessary hardware and software methods for functional studies on plant roots.

Because of the large susceptibility differences between different plant tissues, the surrounding medium, and air that could be enclosed within both, only spin echo methods were used and optimized for the examination of roots. To provide a sufficient time resolution for functional studies the development of microscopy methods was focused on RARE sequences (also known as "turbo spin echo sequences"). Different multi spin echo sequences were implemented at an 11.7T MR microscopy system (Bruker AMX500), including the acquisition of  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  maps, and a fast 3D sequence. The potential of "gradient blips" was examined for a RARE sequence. Artefacts caused by the incremental sampling of k-space could be reduced by the design of an appropriate pulse phase cycle. Nevertheless, the artefacts caused by the "blips" could not be eliminated completely and the duration of the necessary phase cycle significantly increased the total acquisition time. Another important pulse sequence used was an already established flow measurement method using phase contrast.

Corn plants were grown in specially designed glass tubes which provided a narrow part for the inclusion of an RF Helmholtz coil. During a diploma thesis, a spin-off of the work done here, a variation of those tubes was created consisting of two parallel chambers. These tubes were used for so called "split root" experiments on bean plants.

A new, patented concept for modular MR probes was designed. It allows the construction of probes that are adapted to the needs of certain samples (like climate chamber probes for plants) without the limitation caused by fixed frequencies for the RF channels. RF channels could be plugged in fitting to the needs of the later planned experiments.

A method to average values of tissues that are composed of concentric layers, like corn roots, or exhibit radial value gradients was implemented. By averaging along closed paths, this technique provides the mean values and standard deviations of thin tissue layers. This results in profiles which represent the course of the measured values from the centre of the root to the rind.

An intense literature research about the known dependency of  $T_1$  and  $T_2$  on physiologic aspects of plant tissue was performed, resulting in a compilation of relaxation influencing effects. This compilation serves as a basis for the inter-

pretation of the biological experiments. The most important dependency was the relation between the shortening of  $T_1$  and increased ion concentrations, increased membrane permeability, and reduced compartment sizes.

The radial distribution of cell sizes was determined by means of pattern recognition from the light microscopy of a root. It was compared to the  $T_1$ -profile of an intact plant root. Within individual root tissues (cortex or central cylinder) the correlation of cell sizes and  $T_1$ -values follow the theory found in the literature. Comparing especially the values of the central cylinder and the cortex, it is obvious that effects other than the cell size have major influence on the difference in  $T_1$  between those tissues (like the intrinsic  $T_1$  of different cell compartments). Further theoretical considerations dealt with the effect of a mono exponential description of the relaxation within multi compartment systems. Compartments that are comprised of very different relaxation rates may result in a global measured relaxation rate that differs greatly from the relaxation rate that is measured after mixing the contents of the compartments. This result led to a possible explanation of the irreversible  $T_1$  decay observed in damaged tissues.

A computer algorithm was implemented to simulate the free diffusion between volumes that exhibit different relaxation values. It could be shown that transition regions of "mixed" relaxation values occur on the edges of those volume regions. The width of these transition regions can be determined by the Einstein-Smoluchowski-Equation for the diffusion displacement, using the underlying relaxation values as the diffusion time. This effect is a fundamental limitation to the spatial resolution of relaxation maps and to the contrast that those relaxation values create in MR images.

Based on this finding, the cause for the bright ring that surrounds roots within nutrient solution in MR images could be explained. It results from the diffusion driven inflow of quickly relaxing magnetisation from the outer part of the roots into the free solution.

The most important biological results of this PhD thesis concern the reaction of plant roots to drought stress. During the desiccation phase, the  $T_1$  and spin density values within the root decreased more and more. This occurrence was more pronounced for high values of spin density and  $T_1$ , resulting in reduced radial variations for both values. That shows that bigger cells containing more water also dispense more of their stored humidity to the plant. When the plants were rehydrated, a temporal maximum in the  $T_1$  values of the xylem sap occurs, indicating a temporary dilution of the sap. This is assumed to be due to the fast water uptake. After the  $T_1$  maximum at the xylem, a temporary maximum of the spin density could be observed, beginning at the central cylinder and running to the outer cortex. The rehydration of the root tissue in the examination area located at the base of the root starts at the inner and extends to the outer tissues, fed by water that ascends through the xylem vessels. In the cortex of some corn roots, a sudden decrease in the  $T_1$  value was observed at the same time as the spin density maximum at the cortex. This  $T_1$  decrease did not recover during the

experiments and all roots affected showed a brownish discolouration of the cortex afterwards. Therefore, this decrease is interpreted as the result of damage to the tissue during swelling. It is hypothesized that the sudden increase of hydrostatic pressure disrupts the cell membranes and different cell compartments were mixed, as described above.

In the context of these drought stress experiments, cavitations of the sap in the xylem vessels on the roots could be observed for the first time using MR. In addition, the refilling of these cavitated vessels was monitored systematically. It was also possible to measure the velocity of the newly ascending sap level, which was calculated to be in the order of 1mm/min. Using flow imaging, it was possible to confirm the regained functionality of the refilled vessels for the first time.

The contribution of the root pressure to the water transport was also examined and compared to that of the transpiration at the leaves and processes within the shoot. In order to accomplish this, the xylem flow velocity in the root was measured before and after the shoot was cut off. With only the root and a small stub left, the velocity was still measurable, although its magnitude was less than that measured without illumination of the plant. A method was developed to calculate the absolute volume flow from the data derived by the flow velocity MR sequence. Therewith, it was possible to compare the flow through the root with the transpiration rate and with the amount of exsudat that was collected above the stub. Along with the still intact plant, the estimated volume flow matched the measured transpiration. Nevertheless, after cutting, the integrated volume of the xylem flow resulted in about twice the amount of liquid than the collected amount of exsudat.

Experiments on the uptake of the MR contrast agent Gd-DTPA by the roots were performed. The results showed a comparatively free infiltration of Gd-DTPA into the root cortex but also the existence of a diffusion barrier that hampers the infiltration into the central cylinder. Nevertheless, 10h after the start of the experiment, the concentration of Gd-DTPA in the cortex reached only 4% of the concentration in the surrounding medium. As shown in further experiments, this was a good pre-condition to use this contrast agent to distinguish between roots and an inhomogeneous surrounding medium like wet silica sand.

The implemented 3D RARE microscopy sequence was used to acquire the first high resolution MR dataset (39 $\mu$ m isotropic, 1283 voxels) of a section of an intact plant root in-vivo. This allows one to follow the inner structure of the branching of a side root. Because of the relatively short imaging time of 70 minutes, this sequence can also be used for functional studies, for instance, examining the formation of three dimensional root structures during growth.

Besides the biological results achieved in this work, a set of field-tested physical methods was provided which will allow further studies on plant roots dealing with different parameters and conditions.



## Nährlösung „Long Ashton“

Da die Aufnahme bzw. mögliche Einlagerung von Ionen in den Wurzeln erheblichen Einfluss auf die in dieser Arbeit gemessenen NMR-Parameter haben kann, wird im folgenden die genaue Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung [Hew66] angeführt:

### Stammlösung 1

333mM  $\text{KNO}_3$   
333mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

### Stammlösung 2

150mM  $\text{MgSO}_4$   
2mM  $\text{MnSO}_4$   
10mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
198 $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ <sup>17</sup>  
78 $\mu\text{M}$   $\text{CoSO}_4$   
194 $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$   
128 $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$   
10mM  $\text{FeCl}_3$   
10mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ <sup>18</sup>

### Stammlösung 3

1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

Auf einen Liter Nährlösung kommen 4.0ml Stammlösung 1, 4.0ml Stammlösung 2 und 0.3ml Stammlösung 3.

---

<sup>17</sup>da nicht verfügbar, wurde abweichend die gleiche Molarität an Molybdän mit  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  eingestellt

<sup>18</sup>EDTA = EthylenDiaminTetraAcetyl



## Veröffentlichungen

### Konferenzbeiträge, Poster

I. Kaufmann, L. Wegner, U. Zimmermann, A. Haase, Functional NMR-Imaging on Intact Plant-Roots, Jahrestagung der Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie der GDCh, MR PS2-004, Würzburg, Germany, 2001

I. Kaufmann, L. Wegner, U. Zimmermann, A. Haase, Functional Imaging of Intact Plant-Roots with Multi-Spinecho Methods, Proc. ICMRM, P-17, Nottingham, U.K., 2001

I. Kaufmann, L. Wegner, U. Zimmermann, A. Haase, Functional NMR microscopy of Intact Plant-Roots, Proc. ESMRMB, No. 431, Cannes, France, 2002 (MAGMA, 15(s):207f., 2002)

I. Kaufmann, L. Wegner, U. Zimmermann, A. Haase, Diffusion barriers for macromolecules in intact plant roots, Proc. ICMRM, P-66, Snowbird/Utah, USA, 2003

I. Kaufmann, A. Haase, Contour Averaging, Proc. ICMRM, P-65, Snowbird/Utah, USA, 2003

### Konferenzbeiträge, Postertalks

I. Kaufmann, M. Rokitta, A. Haase, Hard- and Software Methods for NMR-Flow-Measurements in Plant-Roots, 5th International Workshop on Measuring Sap Flow in Intact Plants, Florence, Italy, 2000

I. Kaufmann, L. Wegner, U. Zimmermann, A. Haase, NMR microscopy of hyper-stressed plant roots, Proc. ESMRMB, No. 74, Rotterdam, Netherlands, 2003 (MAGMA, 16(s):38, 2003)

### Konferenzbeiträge, Talks

I. Kaufmann, M. Rokitta, A. Haase, Eine Klimakammer für funktionelle NMR-Bildgebung an Pflanzen, Proc., Jahrestagung der Deutschen Sektion der ISMRM, No. 15, Freiburg, Germany, 1998

I. Kaufmann, L. Wegner, U. Zimmermann, A. Haase, 3D NMR microscopy of intact plant root systems, Proc. ICMRM, C-23, Snowbird/Utah, USA, 2003

V.C. Behr, I. Kaufmann, A. Haase, P. Jakob, A novel modular probe base for

multi-channel multi-nuclei MRI and MRS experiments, ICMRM, Utsunomiya, Japan, 2005

## Paper

V. C. Behr\*, I. Kaufmann\* (\*equal contribution), A. Haase, P. Jakob, A Novel Modular Probe Base Design, Concepts in Magnetic Resonance Part B: Engineering, Vol 33B(1), 55-61, 2008

I. Kaufmann, N. Seiberlich, A. Haase, P. Jakob, Diffusion generated  $T_1$ - and  $T_2$ -Contrast, J. Magn. Reson., Vol 192(1), pp 139-150, 2008

T. Schulze-Till, I. Kaufmann, B. Sattelmacher, P. Jakob, A. Haase, U. Zimmermann, S. Guo and L. Wegner, A  $^1\text{H}$  NMR study of water flow in *Phaseolus vulgaris* L. roots treated with nitrate or ammonium, Plant and Soil, submitted

I. Kaufmann, T. Schulze-Till, H. Schneider, U. Zimmermann, P. Jakob, L. Wegner, Functional repair of embolized vessels in maize roots after temporal drought stress as demonstrated by magnetic resonance imaging, New Phytologist, submitted

## Patente

I. Kaufmann, V. C. Behr, Modularer Probenkopf, DE 102005025012 A1, Mai 2005

## Literatur

- [AJFK99] Frank Antonsen, Anders Johnsson, Cecilia Futsaether, and Jostein Krane. Nuclear magnetic resonance imaging in studies of gravitropism in soil mixtures. *The New Phytologist*, 142:59–66, 1999.
- [And58] E. R. Andrew. *Nuclear Magnetic Resonance*. Cambridge University Press, London, 1958.
- [Ask95] E. Askenasy. Über das Saftsteigen. *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins Heidelberg N. F.*, 5:325–345, 1895.
- [BAK84] P. T. Beall, S. R. Amtey, and S. R. Kasturi. *NMR Data Handbook for Biomedical Applications*. Pergamon Press, New York, 1984.
- [BD91] D. Bourgeois and M. Decorps. Quantitative imaging of slow coherent motion by stimulated echos with suppression of stationary water signal. *J. Magn. Reson.*, 94:20–33, 1991.
- [Beh08] Volker C. Behr. *Entwicklung und Optimierung von Resonatoren und Detektionsverfahren in der magnetischen Kernspinresonanz*. PhD thesis, Physikalisches Institut, Universität Würzburg, 2008.
- [BHP46] F. Bloch, W.W. Hansen, and M. Packard. Nuclear Induction. *Physical Review*, 69:127, 1946.
- [BJK86] John M. Brown, G. Allan Johnson, and Paul J. Kramer. *In Vivo* Magnetic Resonance Microscopy of Changing Water Content in *Pelargonium hortorum* Roots. *Plant Physiology*, 82:1158–1160, 1986.
- [BKHJ08] Volker C. Behr, Ilja Kaufmann, Axel Haase, and Peter M. Jakob. A Novel Modular Probe Base Design. *Concepts in Magnetic Resonance Part B: Engineering*, 33B(1):55–61, 2008.
- [BM89] Gareth J. Barker and Thomas H. Mareci. Suppression of Artifacts in Multiple-Echo Magnetic Resonance. *Journal of Magnetic Resonance*, 83:11–28, 1989.
- [BR84] G. Bacic and S. Ratkovic. Water exchange in plant tissue studied by proton NMR in the presence of paramagnetic centers. *Biophys. J.*, 45:767–776, 1984.
- [BR85] P. S. Belton and R. G. Ratcliffe. NMR and compartmentation in biological tissues. *Prog. NMR Spectroscopy*, 17:241–279, 1985.

- [BRF86] Paul A. Bottomley, Hugo H. Rogers, and Thomas H. Foster. NMR imaging shows water distribution and transport in plant root systems in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:87–89, 1986.
- [BRP93] P. A. Bottomley, H. H. Rogers, and S. A. Prior. NMR imaging of root water distribution in intact *Vicia faba* L. plants in elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*, 16:335–338, 1993.
- [BSG<sup>+</sup>03] S.J. Bucci, F.G. Scholz, G. Goldstein, F.C. Meinzer, and L.D.A. S.L. Sternberg. Dynamic changes in hydraulic conductivity in petioles of two savanna tree species: factors and mechanisms contributing to the refilling of embolized vessels. *Plant, Cell and Environment*, 26:1633–1645, 2003.
- [BT79] K. R. Brownstein and C. E. Tarr. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Physical Review A.*, 19(6):2446–2453, 1979.
- [BZ90] A. Balling and U. Zimmermann. Comparative measurements of the xylem pressure of nicotiana plants by means of the pressure bomb and pressure probe. *Planta*, 182:325–338, 1990.
- [Can96] Daniel Canet. *Nuclear Magnetic Resonance: Concepts and Methods*. John Wiley & Sons, Chichester, 1996.
- [CBJ88] Gary P. Cofer, John M. Brown, and G. Allan Johnson. *In Vivo* Magnetic Resonance Microscopy at 5  $\mu$ m. *Journal of Magnetic Resonance*, 83:608–616, 1988.
- [CC03] M. J. Clearwater and C. J. Clark. *In vivo* magnetic resonance imaging of xylem vessels contents in woody lianas. *Plant, Cell and Environment*, 26:1205–1214, 2003.
- [CDM98] Christopher J. Clark, Lynley N. Drummond, and Janet S. MacFall. Quantitative NMR Imaging of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) during Growth and Ripening. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 78:349–358, 1998.
- [CF90] A. Caprihan and E. Fukishima. Flow measurements by NMR. *Phys. Reports*, 198:195–235, 1990.
- [CH89] C. N. Chen and D. I. Hoult. *Biomedical Magnetic Resonance Technology*. Adam Hilger, Bristol and New York, 1989.
- [CHSW97] J. A. Chudek, G. Hunter, J. I. Sprent, and G. Wurz. An application of NMR microimaging to investigate nitrogen fixing root nodules. *Magn. Reson. Imaging.*, 15(3):361–368, 1997.

- [CLL<sup>+</sup>87] A. Connelly, J. A. B. Lohman, B. C. Loughman, H. Quiquampoix, and R. G. Ratcliffe. High Resolution Imaging of Plant Tissues by NMR. *Journal of Experimental Botany*, 38(195):1713–1723, Oct 1987.
- [CP54] H.Y. Carr and E. M. Purcell. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical Review*, 94(3):630–638, 1954.
- [CTO<sup>+</sup>87] B. Chapman, R. Turner, R.J. Ordidge, M. Doyle, M. Cawley, R. Coxon, P. Glover, and P. Mansfield. Real-Time Movie Imaging from a Single Cardiac Cycle by NMR. *Magnetic Resonance in Medicine*, 5:246–254, 1987.
- [DJ94] H.H. Dixon and J. Joly. On the ascent of sap. *Annals of Botany, London*, 8:468–470, 1894.
- [DJ95] H.H. Dixon and J. Joly. On the Ascent of Sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 186:563–576, 1895.
- [DSB<sup>+</sup>06] J-C. Domec, F.G. Scholz, S.J. Bucci, F.C. Meinzer, G. Goldstein, and R. Villalobos-Vega. Diurnal and seasonal variation in root xylem embolism in neotropical savanna woody species: impact on stomatal control of plant water status. *Plant, Cell and Environment*, 29:26–35, 2006.
- [DTC<sup>+</sup>86] M. Doyle, R. Turner, M. Cawley, P. Glover, G.K. Morris, B. Chapman, R.J. Ordidge, R. Coxon, R.E. Coupland, B.S. Worthington, and P. Mansfield. Real-Time Cardiac Imaging of Adults at Video Frame Rates by Magnetic Resonance Imaging. *The Lancet*, 328(8508):682, Sept 1986.
- [EA83] J. L. Evelhoch and J. J. H. Ackerman. NMR  $T_1$  measurements in inhomogeneous  $B_1$  with surface coils. *Journal of Magnetic Resonance*, 53(1):52–64, 1983.
- [ECT97] Frank W. Ewers, Herve Cochard, and Melvin T. Tyree. A survey of root pressures in vines of a tropical lowland forest. *Oecologia*, 110(2):191–196, 1997.
- [EDDNZ00] L. Espen, M. Dell’Orto, P. De Nisi, and G. Zocchi. Metabolic responses in cucumber (*Cucumis sativus L.*) roots under Fe-deficiency: a  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance in-vivo study. *Planta*, 210(6):985–992, May 2000.

- [EVDVA98] Hommo T. Edzes, Dagmar Van Dusschoten, and Henk Van As. Quantitative  $T_2$  imaging of plant tissues by means of multi-echo MRI microscopy. *Magnetic Resonance Imaging*, 16(2):185–196, 1998.
- [FPD82] Gary D. Fullerton, Janet L. Potter, and N. Carol Dornbluth. NMR relaxation of protons in tissues and other macromolecular water solutions. *Magnetic Resonance Imaging*, 1(4):209–226, 1982.
- [Gad95] David G. Gadian. *NMR and its Application to Living Systems*. Oxford University Press Inc., New York, 2 edition, 1995.
- [GOS86] R. Graumann, A. Oppelt, and E. Stetter. Multiple-Spin-Echo Imaging with a 2D Fourier Method. *Magnetic Resonance in Medicine*, 3:707–721, 1986.
- [HABZ01] N. Michele Holbrook, Eric T. Ahrens, Michael J. Burns, and Maciej A. Zwieniecki. In Vivo Observation of Cavitation and Embolism Repair Using Magnetic Resonance Imaging. *Plant Physiology*, 126:27–31, May 2001.
- [Hah50] E. L. Hahn. Spin echoes. *Physical Review*, 80(4):580–594, 1950.
- [HBKL93] A. Haase, M. Brandl, E. Kuchenbrod, and A. Link. Magnetization-Prepared NMR Microscopy. *J. Magn. Res., Series A*, 105:230–233, 1993.
- [HD90] B. P. Hills and S. L. Duce. The influence of chemical and diffusive exchange on the water proton transverse relaxation in plant tissues. *Magnetic Resonance Imaging*, 8(3):321–331, 1990.
- [Hei90] Heinz Walz GmbH, Eichenring 6, D-91090 Effeltrich. *Zentraleinheit CMS 400 für das Kompakt Miniküvetten-System*, März 1990. 1.209 / 2.89.
- [Hen91] Jürgen Hennig. Echoes - How to Generate, Recognize, Use or Avoid Them in MR-Imaging Sequences - Part I. *Concepts in Magnetic Resonance*, 3:125–143, 1991.
- [Hew66] E. J. Hewitt. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical report, University of Bristol, Agric. Hort. Research Station, Long Ashton, Bristol, United Kingdom, 1966.
- [HFM<sup>+</sup>86] A. Haase, J. Frahm, D. Matthaei, W. Hänicke, and K. D. Merboldt. FLASH imaging: Rapid NMR imaging using low flip-angle pulses. *J. Magn. Reson.*, 67:258–266, 1986.

- [HJW00] P. J. Hore, J. A. Jones, and S. Wimperis. *NMR: The Toolkit*. Oxford Chemistry Primers. Oxford University Press Inc., New York, 2002 edition, 2000.
- [HK03] Axel Haase and Ilja Kaufmann. Persönliche Gespräche über Root-Imaging, 2000-2003.
- [HL91] W. Brian Hyslop and Paul C. Lauterbur. Effects of Restricted Diffusion on Microscopic NMR Imaging. *Journal of Magnetic Resonance*, 94:501–510, 1991.
- [HNF86] J. Hennig, A. Nauerth, and H. Friedburg. RARE Imaging: A fast Imaging Method for Clinical MR. *Magnetic Resonance in Medicine*, 3:823–833, 1986.
- [Hof79] Douglas R. Hofstadter. *Gödel Escher Bach*. Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 9, 2003 edition, 1979.
- [HSB<sup>+</sup>04] D. Haddad, F. Schaupp, R. Brandt, G. Manz, R. Menzel, and A. Haase. NMR imaging of the honeybee brain. *Journal of Insect Science*, 4(5), 2004.
- [IOM<sup>+</sup>96] M. Iwaya-Inoue, H. Okubo, E. Matsuo, K. Motooka, N. Ishida, M. Koizumi, and H. Kano. Characterizing chilling responses for tulip bulbs by <sup>1</sup>H-NMR imaging in relation to metabolic activity. *Cryo-Letters*, 17:241–248, 1996.
- [JBK87] Allan G. Johnson, John Brown, and Paul J. Kramer. Magnetic resonance microscopy of changes in water content in stems of transpiring plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:2752–2755, May 1987.
- [Kau98] Ilja Kaufmann. Aufbau einer Klimakammer für funktionelle NMR an Pflanzen, Diplomarbeit, November 1998.
- [KB05] Ilja Kaufmann and Volker C. Behr. Modularer Probenkopf. Patent Nr. DE 102005025012 A1, Mai 2005.
- [KGH94] B. Kiefer, J. Grässner, and R. Hausmann. Image Acquisition in a Second with Half-Fourier-Acquisition Single-Shot Turbo Spin Echo. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 4(P):86–87, 1994.
- [KHB<sup>+</sup>95] Erwin Kuchenbrod, Axel Haase, R. Benkert, Heike Schneider, and Ulrich Zimmermann. Quantitative NMR Microscopy on intact plants. *Magnetic Resonance Imaging*, 13(3):447–455, 1995.

- [KKT<sup>+</sup>98] Erwin Kuchenbrod, Elke Kahler, Frank Thürmer, Ralf Deichmann, Ulrich Zimmermann, and Axel Haase. Functional Magnetic resonance imaging in intact plants - quantitative observation of flow in plant vessels. *Magnetic Resonance Imaging*, 16(3):331–338, 1998.
- [KLT<sup>+</sup>96] Erwin Kuchenbrod, Matthias Landeck, Frank Thürmer, Axel Haase, and Ulrich Zimmermann. Measurement of water flow in the xylem vessels of intact maize plants using flow-sensitive NMR imaging. *Botanica Acta*, 109:184–186, 1996.
- [Köc01] Walter Köckenberger. Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments. *Trends in Plant Science*, 6(7), July 2001.
- [KRSD05] M. Khallouk, D. N. Rutledge, A. M. S. Silva, and I. Delgadillo. Study of the behaviour of amino acids in aqueous solution by time-domain NMR and high-resolution NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(4):309–315, 2005.
- [KRZ94] P. Kinchesh, E. W. Randall, and K. Zick. Magnetic susceptibility effects in imaging: distortion-free images of plant tissue in soil. *Magn Reson Imaging*, 12(2):305–307, 1994.
- [KSHJ08] Ilja Kaufmann, Nicole Seiberlich, Axel Haase, and Peter M. Jakob. Diffusion generated  $T_1$  and  $T_2$  contrast. *Journal of Magnetic Resonance*, 192(1):139–150, May 2008.
- [KSTS<sup>+</sup>08] Ilja Kaufmann, Thomas Schulze-Till, Heike Schneider, Ulrich Zimmermann, Peter Jakob, and Lars Wegner. Functional repair of embolized vessels in maize roots after temporal drought stress as demonstrated by magnetic resonance imaging. *New Phytologist*, submitted, 2008.
- [Kuc96] Erwin Kuchenbrod. *Hochaufgelöste quantitative NMR Bildgebung an Pflanzen*. PhD thesis, Physikalisches Institut, Universität Würzburg, 1996.
- [KWZH03] Ilja Kaufmann, Lars Wegner, Ulrich Zimmermann, and Axel Haase. 3D NMR microscopy of intact plant root systems. *Proceedings ICMRM*, pages C–23, 2003.
- [Lam94] Leslie Lamport. *Das LaTeX Handbuch*. Addison-Wesley, Bonn, 1995 edition, 1994.
- [LKB94] Ulrich Lüttge, Manfred Kluge, and Gabriela Bauer. *Botanik*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 2, 1. korrigierter Nachdruck 1997 edition, 1994.

- [LM64] Z. Luz and S. Meiboom. Proton Relaxation in Dilute Solutions of Cobalt(II) and Nickel(II) Ions in Methanol and the Rate of Methanol Exchange of the Solvation Sphere. *The Journal of Chemical Physics*, 40(9):2686–2692, May 1964.
- [LN03] Markku J. Lampinen and Tuula Noponen. Thermodynamic analysis of the interaction of the xylem water and phloem sugar solution and its significance for the cohesion theory. *J Theor Biol.*, 224(3):285–298, Oct 7 2003.
- [LOBS98] P. Lainé, A. Ourry, J. Boucaud, and J. Salette. Effects of a localized supply of nitrate on  $\text{NO}_3^-$  uptake rate and growth of roots in *Lolium multiflorum* Lam. *Plant and Soil*, 202(1):61–67, 1998.
- [Man77] P. Mansfield. Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 10(3):L55–L58, 1977.
- [MCG01] F. C. Meinzer, M. J. Clearwater, and G. Goldstein. Water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies. *Environ Exp Bot.*, 45(3):239–262, 2001.
- [MG58] S. Meiboom and D. Gill. Compensation for pulse imperfections in Carr–Purcell NMR experiments. *Review of Scientific Instruments*, 29:688.., 1958.
- [MGM<sup>+</sup>01] P.J. Melcher, G. Goldstein, F.C. Meinzer, D.E. Yount, T.J. Jones, N.M. Holbrook, and C.X. Huang. Water relations of coastal and estuarine *Rhizophora mangle*: xylem pressure potential and dynamics of embolism formation and repair. *Oecologia*, 126(2):182–192, Jan 2001.
- [MHL98] M.E. McCully, C.X. Huang, and L.E. Ling. Daily embolism and refilling of xylem vessels in the roots of field-grown maize. *New Phytologist*, 138:327–342, 1998.
- [MJK90] J.S. MacFall, G.A. Johnson, and P.J. Kramer. Observation of water-depletion region surrounding loblolly pine roots by magnetic resonance imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1203–1207, Feb 1990.
- [MJvK<sup>+</sup>97] M. Meininger, P. M. Jakob, M. von Kienlin, D. Koppler, G. Bringmann, and A. Haase. Radial Spectroscopic Imaging. *Journal of Magnetic Resonance*, 125(2):325–331, April 1997.

- [MPR<sup>+</sup>92] Janet S. MacFall, Philip E. Pfeffer, Dominique B. Rolin, James R. MacFall, and G. Allan Johnson. Observation of the Oxygen Diffusion Barrier in Soybean (*Glycine max*) Nodules with Magnetic Resonance Microscopy. *Plant Physiology*, 100:1691–1697, 1992.
- [MS92] Hans Mohr and Peter Schopfer. *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin, 4 edition, 1992.
- [MW89] Norio Murase and Tokuko Watanabe. Nuclear Magnetic Relaxation Studies of the Compartmentalized Water in Crosslinked Polymer Gels. *Magnetic Resonance in Medicine*, 9(1):1–7, 1989.
- [MWWJ90] R. V. Mulkern, S. T. S. Wong, C. Winalski, and F. A. Jolesz. Contrast manipulation and artifact assessment of 2D and 3D RARE sequences. *Magnetic Resonance Imaging*, 8:557–566, 1990.
- [Nob83] Park S. Nobel. *Biophysical Plant Physiology and Ecology*. W.H. Freeman and Company, New York, 1983.
- [NvDVA98] Eugene G. Novikov, Dagmar van Dusschoten, and Henk Van As. Modeling of Self-Diffusion and Relaxation Time NMR in Multi-Compartment Systems. *Journal of Magnetic Resonance*, 135:522–528, 1998.
- [Olt98] Silvia Olt. Hochauflösende <sup>23</sup>Na- und <sup>1</sup>H-NMR-Bildgebung an Pflanzen zur Untersuchung von Salzstreß *in vivo*, Diplomarbeit, September 1998.
- [PBS92] B. Pütz, D. Barsky, and K. Schulten. Edge enhancement by diffusion in microscopic magnetic resonance imaging. *J. Magn. Reson.*, 97:27–53, 1992.
- [PH92] Colin S. Poon and R. Mark Henkelman. Practical T<sub>2</sub> Quantification for Clinical Applications. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2:541–553, 1992.
- [Pri94] M.R. Prince. Gadolinium-enhanced MR aortography. *Radiology*, 191(1):155–164, 1994.
- [Rat94] R. G. Ratcliffe. In vivo NMR studies of higher plants and algae. *Advances in Botanical Research*, 20:43–123, 1994.
- [RCC00] A. Robinson, C. J. Clark, and J. Clemens. Using <sup>1</sup>H magnetic resonance imaging and complementary analytical techniques to characterize developmental changes in the *Zantedeschia* Spreng. tuber. *Journal of Experimental Botany*, 51(353):2009–2020, Dec 2000.

- [Ren25] O. Renner. Zum Nachweis negativer Drucke in Gefäßwasser bewurzelter Holzgewächse. *Flora*, 119:402–408, 1925.
- [RG00] R. G. Ratcliffe and J. Gerendas. Intracellular pH regulation in maize root tips exposed to ammonium at high external pH. *J. Exp. Bot.*, 51(343):207–219, Feb 2000.
- [Rok98] M. Rokitta. Persönliche Mitteilung, 1998.
- [RP87] Richard R. Rzedzian and Ian L. Pykett. Instant Images of the Human Heart Using a New, Whole-Body MR Imaging System. *American Journal of Roentgenology*, 149:245–250, Aug 1987.
- [RPZH99] Markus Rokitta, A. D. Peuke, Ulrich Zimmermann, and Axel Haase. Dynamic studies of phloem and xylem flow in fully differentiated plants using fast NMR microimaging. *Protoplasma*, 209:126–131, 1999.
- [RZH99a] M. Rokitta, U. Zimmermann, and A. Haase. Fast NMR Flow Measurements in Intakt Plants. *Journal Magnetic Resonance*, 137:29–32, 1999.
- [RZH99b] Markus Rokitta, Ulrich Zimmermann, and Axel Haase. Fast NMR flow measurements in plants using FLASH imaging. *Journal of Magnetic Resonance*, 137:29–32, 1999.
- [Sch01] Thomas Schulze. Hard- und Softwaremethoden für die funktionelle NMR an Split-Root-Systemen, Diplomarbeit, Dezember 2001.
- [SHHB64] P. F. Scholander, H. T. Hammel, E. A. Hemmingsen, and E. D. Bradstreet. Hydrostatic Pressure and Osmotic Potential in Leaves of Mangroves and Some Other Plants. *Proc. Natl. Academic Science USA*, 52:119–125, 1964.
- [SHPG96] Y. Shachar-Hill, P. E. Pfeffer, and M. W. Germann. Following plant metabolism *in vivo* and in extracts with heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.*, 243(1):110–118, Dec 1. 1996.
- [SJ92] Timothy E. Southon and Richard A. Jones. NMR imaging of roots: methodes for reducing the soil signal and for obtaining a 3-dimensional descripton of the roots. *Physiologia Plantarum*, 86:322–328, 1992.
- [SLGDPZ96] S. Salleo, M.A. Lo Gullo, D. De Paoli, and M. Zippo. Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: a possible mechanism. *New Phytologist*, 132:47–56, 1996.

- [SMJ92] Timothy E. Southon, Anders Mattsson, and Richard A. Jones. NMR imaging of roots: effects after root freezing of containerised conifer seedlings. *Physiologia Plantarum*, 86:329–334, 1992.
- [SS91] E. Strasburger and Peter Sitte. *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 33 edition, 1991.
- [SSBC78] Darryl G. Stout, Peter L. Steponkus, Larry D. Bustard, and Robert M. Cotts. Water Permeability of Chlorella Cell Membranes by Nuclear Magnetic Resonance: Measured Diffusion Coefficients and Relaxation Times. *Plant Physiology*, 62(1):146–151, Jul 1978.
- [ST65] E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1):288, Jan 1965.
- [Ste00] Ernst Steudle. Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 51(350):1531–1542, Sept 2000.
- [STKS<sup>+</sup>08] Thomas Schulze-Till, Ilja Kaufmann, Burkhard Sattelmacher, Peter Jakob, Axel Haase, Ulrich Zimmermann, Shiwei Guo, and Lars H. Wegner. A <sup>1</sup>H NMR study of water flow in *Phaseolus vulgaris* L. roots treated with nitrate or ammonium. *Plant and Soil*, submitted, 2008.
- [SVA92] J. E. M. Snaar and Henk Van As. Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by <sup>1</sup>H NMR relaxation measurements. *Biophysical Journal*, 63:1654–1658, 1992.
- [SVHVA07] T.W.J. Scheenen, F.J. Vergeldt, A.M. Heemskerk, and H. Van As. Intact Plant Magnetic Resonance Imaging to Study Dynamics in Long-Distance Sap Flow and Flow-Conducting Surface Area. *Plant Physiology*, 144:1157–1165, June 2007.
- [SZZ82] E. Steudle, U. Zimmermann, and J. Zilliken. Effect of cell turgor on hydraulic conductivity and elastic modulus of *Elodea* leaf cells. *Planta*, 154:371–380, 1982.
- [TLBC91] R. Turner, D. Le Bihan, and A. S. Chesnick. Echo-planar imaging of diffusion and perfusion. *Magnetic Resonance in Medicine*, 19(2):247–253, 1991.
- [TLC<sup>+</sup>00] P. S. Tofts, D. Lloyd, C. A. Clark, G. J. Barker, G. J. M. Parker, P. McConville, C. Baldock, and J. M. Pope. Test Liquids for Quantitative MRI Measurements of Self-Diffusion Coefficient *in Vivo*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 43:368–374, 2000.

- [UFS05] Shin Utsuzawa, Kenji Fukuda, and Daisuke Sakaue. Use of Magnetic Resonance Microscopy for the Nondestructive Observation of Xylem Cavitation Caused by Pine Wilt Disease. *Phytopathology*, 95(7):737–743, 2005.
- [VA07] Henk Van As. Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long-distance water transport. *Journal of Experimental Botany*, 68(4):743–756, 2007.
- [VARdJ<sup>+</sup>94] H. Van As, J.E.A. Reinders, P.A. de Jager, P.A.C.M. van de Sanden, and T.J. Schaafsma. *In situ* plant water balance studies using a portable NMR spectrometer. *Journal of Experimental Botany*, 45(270):61–67, Jan 1994.
- [vAS84] H. van As and T.J. Schaafsma. Noninvasive measurement of plant water flow by nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.*, 45(2):469–472, 1984.
- [vdWCR<sup>+</sup>01] Louise van der Weerd, Mireille M. A. E. Claessens, Tom Ruttik, Frank Vergeldt, Tjeerd J. Schaafsma, and Henk Van As. Quantitative NMR microscopy of osmotic stress responses in maize and pearl millet. *Journal of Experimental Botany*, 52(365):2333–2343, Dec 2001.
- [vdWMV<sup>+</sup>02] Louise van der Weerd, Sergey M. Melnikov, Frank J. Vergeldt, Eugene G. Novikov, and Henk Van As. Modelling of Self-diffusion and Relaxation Time NMR in Multicompartment Systems with Cylindrical Geometry. *Journal of Magnetic Resonance*, 156:213–221, 2002.
- [VJK91] John S. Veres, G. Allan Johnson, and Paul J. Kramer. In vivo Magnetic Resonance Imaging of Blechnum Ferns: Changes in  $T_1$  and  $N(H)$  during Dehydration and Rehydration. *American Journal of Botany*, 78(1):80–88, Jan 1991.
- [VKGV00] O. V. Volobuyeva, L. P. Khokhlova, G. R. GaniYeva, and G. A. Velikanov. Influence of inhibitors of cytoskeleton proteins on water exchange of wheat roots under the after-action of water stress. *Cell Biology International*, 24(6):383–391, 2000.
- [WRF90] Denys N. Wheatley, J. Ewen Rimmington, and Margaret A. Foster. Effects of osmotic manipulation of intracellular hydration of HeLa S-3 cells on their proton NMR relaxation times. *Magnetic Resonance Imaging*, 8:285–293, 1990.

- [WVVA] Carel Windt, Frank Vergelt, and Henk Van As. MR flow imaging in plants: Using new techniques to solve old questions. In *8th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy*, volume 8, Mibu, Japan. Dokkyo University School of Medicine.
- [XB93] Xudan Xu and William L. Bland. Reverse Water Flow in Sorghum Roots. *Agronomy journal*, 85:384–388, 1993.
- [ZH00] Maciej Zwieniecki and Noel Michele Holbrook. Bordered Pit Structure and Vessel Wall Surface Properties Implications for Embolism Repair. *Plant Physiology*, 123:1015–1020, 2000.
- [ZJ96] W. H. Zhang and G. P. Jones. Water permeability in wheat root protoplasts determined from nuclear magnetic resonance relaxation times. *Plant Science*, 118:97–106, 1996.
- [ZLSH<sup>+</sup>00] Kai Zhong, Xin Li, Yair Shachar-Hill, Francis Picart, Arnold Wischnia, and Charles S. Jr Springer. Magnetic susceptibility shift selected imaging (MESSI) and localized <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O spectroscopy in living plant tissues. *NMR in Biomedicine*, 13:392–397, 2000.
- [ZSWH04] Ulrich Zimmermann, Heike Schneider, Lars H. Wegner, and Axel Haase. Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytol*, 162(3):575–575, 2004.
- [ZWN91] Y. Zur, M.L. Wood, and L.J. Neuringer. Spoiling of Transverse Magnetization in Steady-State Sequences. *Magnetic Resonance in Medicin*, 21:251–263, 1991.

## mit allerbestem Dank an...

... Prof. Dr. A. Haase für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu diesem interessanten und vielfältigen Thema promovieren zu können, für alle Anregungen und Diskussionen sowie die notwendige Freiheit, um viele eigene Ideen in die Forschung mit einbringen zu können.

... Prof. Dr. P. Jakob für die nahtlose Übernahme der Betreuung der Arbeit, die dauerhafte Unterstützung auf dem Weg zu mehr Veröffentlichungen und für die Geduld, bis die Arbeit nach meinem Ortswechsel fertig wurde.

... Prof. Dr. U. Zimmermann für die Unterstützung und erfolgreiche Zusammenarbeit mit seinem Lehrstuhl und viele hilfreiche Diskussionen zu den Ergebnissen der Trockenstressexperimente und Wassertransportphänomene.

... Dr. Lars Wegener für die gute Zusammenarbeit bei den biologischen Fragestellungen und Messungen, für viele Stunden gemeinsamer Diskussionen über die Inhalte diverser Veröffentlichungen und das gemeinsame Schreiben derselbigen und für einen Beutel Saatgut, dessen Reste in einem B015a-Untermieter einen dankbaren Abnehmer fanden.

... PD Dr. Heike Schneider für Einsatz und Geduld beim gemeinsamen Paperschreiben, der Marathon-Exsudatmessung sowie für viele interessante Diskussionen, Anregungen und Hilfe.

... Thomas Schulze-Till für viele gemeinsame Messungen, Planungen, Diskussionen und dafür, dass er mit mir zusammen so lange unermüdlich das Pflanzen-NMR-Fähnchen bei EP5 hochgehalten hat!

... Volker Behr für die perfekte Zusammenarbeit bei der Konstruktion unseres Probenkopfes, beim wieder- und wieder-Neuformulieren des Patentes und seinem Einsatz für die resultierende Veröffentlichung; außerdem natürlich für Erinnerungen an den ultimativen Wild-West-Urlaub.

... Nicole Seiberlich für unermüdliche Korrekturen meines Englischen, und das nicht nur beim gemeinsamen Paperschreiben, sowie für wertvolle Diskussionen zur Diffusion.

... Markus "Rocky" Rokitta und Michael "Big Jim" Szimtenings, die mir einen guten Start in die Pflanzen-NMR ermöglicht haben und während ihrer Zeit bei EP5 immer ein offenes Ohr für Fragen hatten sowie Tipps aus einem unerschöpflichen Erfahrungsschatz zur Verfügung stellen konnten.

... die fleißigen Korrekturleser dieser Arbeit: Esra Lang, Lars Wegner, Volker Behr, Daniel Haddad, Markus Rokitta, Nicole Seiberlich, Cordula Hege und Jörg Hege.

... Sabine Voll und Elsbeth Fekete für die Hilfe bei allen Fragestellungen rund ums Laborequipment und überhaupt!

... Thomas Grünebaum aus der Mechanikwerkstatt des Physikalischen Institutes für den Bau des modularen Probenkopfes und fruchtbare Diskussionen zu Konstruktionsdetails.

... alle weiteren „Bewohner“ von Zimmer B015a, die dort während meiner langen Zeit Station gemacht haben. Wir hatten immer eine tolle Atmosphäre, viel Spaß bei der Arbeit und interessante Diskussionen zu NMR und Etymologie. In alphabetical order: Ralf Deichmann, Cornelius Faber, Caroline Heil, Volker Herold, Claudia Hillenbrand, Esra Kaufmann, Esra Lang, Matthias Müller, Mathias Nittka, Silvia Olt, Christine Preibisch, Alexandra Rauch, Nicole Seiberlich, Simon Weißnichmehr und Hendrik Zimmermann.

... alle Superuser für ihre Nerven bei der Instandhaltung des Rechnernetzes, allen voran Volker Behr, ohne den das irgendwie unvorstellbar ist.

... den ganzen „Verein“ EP5 für das geniale Arbeitsklima und besonders der EP5-Band für das gemeinsame Musizieren: Sabine Voll, Gabi Cocora, Matthias Weigel, Reza Kharrazian, ANdy Greiser, David Balla, Marco Parczyk, Daniel Weber.

... all' diejenigen, die es so lange ertragen haben, dass der größte Teil meiner Freizeit für diese Arbeit draufgegangen ist, allen voran Cordula Hege.

## Index

- $\alpha$ -Puls, 9
- $\gamma$ , 9
- $\lambda/4$ -Strecke, 24
- $k_B$ , 9
- B<sub>1</sub>-Feld
  - inhomogenes, 15
- B<sub>1</sub>-Feldinhomogenität, 31
- T<sub>1</sub>, 10
  - Karten, 36
  - Kontrast, 71
  - Einfluss d. Austauschzeiten, 60
  - freies Wasser, 61
  - funktionelle Beobachtungen, 69
  - Größenordnung in Pflanzen, 54
  - Pflanzen-NMR, 49
  - Relaxationsfunktion, 37
  - und Viskosität, 51
  - Unschärfe der Karten, 71
  - unter Trockenstress, 85
  - Wurzelgewebewerte, 83
- T<sub>1</sub>-Karten
  - zeigen Diffusionsbarrieren, 71
- T<sub>2</sub>, 10
  - Kontrast, 16
  - Einfluss d. Austauschzeiten, 60
  - Größenordnung in Pflanzen, 54
  - Pflanzen-NMR, 49
  - Relaxationsfunktion, 38
- T<sub>2</sub><sup>\*</sup>, 10
- 180°-Puls, 14
- 3D-Turbospinecho, 32
  
- Aerenchym, 30
  - Definition, 19
  - und Trockenstress, 85
  - Volumenanteil am Gewebe, 52
- Agilent, 27
- Akquisitionsdauer, 81
- AMX500, 21
- Ankoppelnetzwerk, 21, 24
- Anregungsprofil, 12, 32
- Anregungspuls, 10
  - Dauer, 32
- Apfel
  - Zellkompartimente, 54
- Apoplast, 17, 114
- Artefakte, 15
- Assimilation, 21
  - abgeschnittene Pflanze, 105
- Auflösung
  - erreichbar, 21
  - und Diffusion, 71
- Aufnahmedauer, 81
- Austauschzeit
  - Messmethoden, 57
- Austauschzeiten
  - Größenordnung, 60
  - Wirkung auf T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub>, 60
- backflux, 57
- Balancing Unit, 24
- Balun, 24
- Balunlänge Kalium, 24
- Bandbreite
  - HF-Puls, 12
- basal, 18
- Beladung
  - Spule, 22
- Benetzungswinkel im Xylem, 99
- BEPI, 34
- BEST, 34
- Bildkontrast
  - optimale Parameter, 32
  - synthetisch, 74
  - Verschmierung, 71
- Bildrekonstruktion, 13
- Bildverschiebung
  - durch Suszeptibilität, 115
- Birdcageresonator, 22
- blipped EPI, 34
- Blips, 33, 34
- Bloch-Gleichungen, 11
- Boltzmannkonstante, 9
- Boltzmannstatistik, 9
- Bruker, 21
  
- Carr, H.Y., 15
- Caspary-Streifen, 19, 116
- chemical exchange, 52
- Chemical-Shift-Artefakt, 75
- chemische Abschirmung
  - Anisotropie, 50
- chemische Verschiebung, 50, 52
- chemischer Austausch, 52
- Chlorophyl, 4
- chirurgische Seide, 103
- Computermodell, 63

- Cortex, 19, 30  
 CP-Sequenz, 15  
 CPMG-Sequenz, 15, 31  
 Cryo-SEM, 92  
 Cyanobakterien, 4  
 Cyclohexan  
   Diffusionskonstante, 75  
    $T_1$ -Wert, 75  
   und Wurzeln, 75  
 Datenmittelung, 45  
 Dauer  
   HF-Puls, 12  
 Diffusion  
   Simulation, 63  
   und Auflösung, 71  
   Verschiebungskadrat, 64  
   Weglänge, 65, 66  
 Diffusion durch Inhomogenitäten, 15  
 Diffusion und Relaxation  
   Computermodell, 63  
 Diffusionsabschwächung  
   Bildgebungsgradienten, 53  
 Diffusionsbarrieren, 71  
 Diffusionskonstante  
   von Cyclohexan, 75  
   von Wasser, 65  
 Diffusionssimulation, 64  
 digitale Einheiten, 106  
 Digitizer, 106  
 Dipole  
   als Relaxationsursachen, 49  
 Dipolwechselwirkung, 50  
 Drehimpuls, 9  
 Druck  
   hydraulischer, 100  
   osmotischer, 100  
 Druckgradient  
   Saftaufstieg, 100  
 Duty cycle, 30  
 Echo  
   -zug, Multiecho, 15  
   höheres, 15  
   stimuliertes, 15  
   vorgezogenens, 30  
 echo planar imaging, 34  
 Echozeit, 14, 15  
   effektive, 39  
 Echozug, 15  
 effektive Echozeit, 39  
 Einfaltungen  
   Schichtdicke, 32  
 Einstein-Smoluchowski-Gleichung, 65, 66, 69, 77  
 Embolie, 90  
   Wiederbefüllung, 92, 94  
 Empfangskette, 106  
 Endodermis, 19  
 EPI, 34  
 Exsudat, 103  
 Exsudation, 103  
   extrazellular, 114  
 Faltung, 64  
 fault location, 27  
 Feldinhomogenitäten, 15  
   und  $T_2^*$ , 14  
 Feldstärke, 21  
 ferromagnetische Störungen, 50  
 FID, 10  
 Fit  
   monoexponentiell, 55  
 Fitfehler, 77  
 Fitmethode, 55  
 FLASH, 29  
 Flipwinkel, 9, 14  
 Flussbildung, 43  
 Flussmessung  
   Signalamplitude, 106  
   Signalstärke, 106  
 Fouriertransformation, 13, 47  
   Bildeinfaltungen, 32  
 Fouriertransformierte  
   eines Punktes, 96  
   zweier Punkte, 96  
 frühes Metaxylem, 19  
 free induction decay, 10  
 freies Wasser  
    $T_1$ , 61  
 Frequenzlock, 24  
 Frequenzverschiebung, 22  
 funktionelle Untersuchungen, 79  
 Gadolinium-DTPA, 114  
 Gaswechsellösungsanlage, 21  
 Gauß Faltungskern  
   1D, 66  
   3D, 65  
 Gauß-Puls, 32  
 Gd-DTPA, 27, 114, 119  
 Gewebekontrast  
    $T_1$ -,  $T_2$ -Karten, 69  
 Gill, D., 15

- Gräser, 18  
Gradient, 11  
Gradientenecho, 14  
    EPI, 34  
Gradientenmoment, 11  
Gradientenpulse, 34  
Gradientenstärke, 21  
Gradientenstrom, 21  
Guttation, 103  
gyromagnetisches Verhältnis, 9
- H, 56  
höhere Echos, 15  
Heliumkühlung, 21  
Helmholtzspule, 22  
HF-Kanal, 24  
HF-Puls, 9  
    Bandbreite, 12  
    Dauer, 12  
    Einhüllende, 12  
HF-Resonator, 22  
HF-Schirm, 21  
HF-Wechselfeld, 9  
Histogramm  
    Signalstärke, 106  
Holz in Wasser, 75  
Hydathoden, 103  
hydraulic lift, 118  
hydraulische Leitfähigkeit, 92  
hydraulischer Druck, 100  
Hydrokultur  
    und Aerenchym, 19  
Hydroxylgruppen, 52
- Impedanz, 24  
Impedanzanpassung, 22  
Inflow-Effekt, 37  
Inhomogenitäten, 10  
Integralsinus, 97  
Interchozeit, 15  
Interpolation, 47  
Interzellularräume, 17  
Interzellularraum, 56  
intrazellular, 114  
intrinsische Relaxationszeit  
    Messung, 57  
inversion recovery, 37  
IR-Spektrometrie, 21  
Isochromat, 9  
Isochromaten, 10
- $k_x$ -Richtung, 13  
 $k_y$ -Richtung, 13  
k-Raum, 12  
    Punktspiegelung, 14  
Kalyptra, 18  
Kanal, 24  
Kanalmodul, 25  
Kapillare  
    Polyethylen, 42  
Kapillarität  
    im Wurzelxylem, 99  
Kavitation, 90  
    Wiederbefüllung, 92, 94  
    Wiederbefüllungsgeschwindigkeit, 99  
Keimungsbedingungen, 20  
Kernspin, 9  
Klimakammerprobenkopf, 21, 24  
    modular, 27  
Kohäsionstheorie, 4  
Kompartimente  
    Austauschzeiten, Messung, 59  
    Durchmischung, 60  
Kontrastmittel, 114  
    Pflanzen-NMR, 57  
    Relaxivität, 51  
    Wirkung, 116  
Konturlinien, 46  
Korrelationsmatrix, 111  
Kupfersulfat, 114
- Landé-Faktor, 9  
Langzeitmessung  
    und Nährlösung, 22  
Larmorfrequenz, 9  
least squares, 55  
Lesegradient, 11  
    Preread, 13  
Longitudinalmagnetisierung, 9  
Luftfeuchtigkeit  
    100%, 103
- Magnet  
    supraleitender, 21  
Magnetfeld  
    ortsabhängig, 11  
magnetisches Moment, 9  
    klassisch, 9  
Magnetisierung, 9  
Magnetisierungspräparation, 37  
Magnevist, 27, 114  
Makromolekül, Gd-DTPA, 114  
Mantelwellensperre, 24  
Match, 24

- MCX-Stecker, 27  
 Meiboom, S., 15  
 Membranpermeabilität, 56  
 Metaxylem  
   frühes, 19  
   spätes, 19, 89  
 Methode, 13  
 Mikroskopiegradient, 21  
 Mittelung  
   Parameterkarten, 45  
 mittleres Verschiebungsquadrat, 65  
 modulares Probenkopfdesign, 24  
 molare Masse von Wasser, 105  
 monoexponentieller Fit, 55  
 Monokotylen, 18  
 Morphing, 47  
 Multi-Spin-Echo, 15  
 Multiecho, 15  
 multiexponentielle Relaxation, 54  
  
 Nährlösung, 20  
   Vorteile, 118  
 Nährmedium,  $T_2^*$ -Effekte, 42  
 Network-Analyzer, 27  
 NMR, 5  
 NMR-Gerät, 106  
 NMR-Kontrastmittel, 114  
  
 O-Ring, 22  
 osmotischer Druck, 100  
  
 $P_d$ , 59  
 paramagnetische Störungen, 50  
 Parameterkarten  
    $T_1$ , 36  
 Partial-Volume-Effekt, 45, 91  
 Permeabilität, 56  
   Zellmembran, Bestimmung, 59  
 Pflanzen  
   Anzucht, 20  
 pH-Wert  
   und  $T_2$ , 52  
 phasegradient, 12  
 Phasengradient, 12  
   Diffusionsabschwächung, 53  
 Phasengradientenpulse, 34  
 Phasenzzyklus, 15  
 Phloem, 19, 87  
 Plasmalemma, 17  
 POM, 28  
 poröse Materialien, 78  
 Positionierung, 22  
  
 Präparationsgradient, 13  
 Prereadgradient, 13  
 Probenkopf  
   modularer, 24  
   Trägerrohr, 22  
 Probenröhrchen  
   Konzept, 22  
 Profil  
   radial, 45  
 Protonenaustausch, 52  
 Protonenaustauschrate, 52  
 Protonenfrequenz  
   AMX500, 21  
 Puls, 9  
    $90^\circ$ , 10  
    $180^\circ$ , 14  
 Pulsdauer, 32  
 Pulsphase, 15  
 Pulsphasenzzyklus, 15  
 Purcell, E.M., 15  
  
 Quadratur, 24  
 Quermagnetisierung, 10  
  
 radiales Profil, 45  
 RARE, 16  
 readgradient, 11  
 Receiver, 106  
 Referenzkapillare, 38  
 Refokussierungspuls  
   Dauer, 32  
 Rekonstruktion  
   des Bildes, 13  
 Relaxation  
    $T_2$  und Diffusion, 52  
   durch Kompartimentgrenzen, 56  
   monoexponentiell, 77  
   multiexponentiell, 54  
 Relaxation und Diffusion, 63  
   Computermodell, 63  
 Relaxationsfunktion  
    $T_1$ , 37  
    $T_2$ , 38  
 Relaxationsmechanismen, 10, 49–62  
 Relaxationszeit  
   intrinsische messen, 57  
 Relaxationszeiten  
   Kompartimentaufhebung, 60  
   und Sauerstoff, 51  
   und Spindichte, 61  
   und Viskosität, 51  
   und Wasserpotential, 61

- und Zellengröße, 56, 61
  - Wasser in Sand, 68
- Relaxationszeitkontrast
  - Verschmierung, 71
- Relaxivität, 50, 116
  - Kontrastmittel, 51
- RG178, 27
- Rizodermis, 18
- Sättigungspulse, 37
- Sand, 68, 118
- Sattelpule, 22
- saturation recovery, 37
- Sauerstoff, 50
  - und Relaxationszeiten, 51
- Schichtdicke, 12
- Schichtgradient, 12
  - Refokussierung, 12
- Schichtprofil, 12, 32
- Schimmelbildung, 23
- Schockgefrieren, 92
- Segmentation, 45
- Segmentierung, 31
- sekundäres Dickenwachstum, 18
- Selbstdiffusionskonstante, Wasser, 65
- Semi-Rigid-Kabel, 25
- Sequenz, 13
  - T<sub>1</sub>-Karte, 36
  - T<sub>2</sub>-Karte, 38
  - T<sub>2</sub><sup>\*</sup>-Karte, 39
  - 3D-TSE, 32
  - BEPI, 34
  - BEST, 34
  - CP, 15
  - CPMG, 15
  - EPI, 15, 34
  - FLASH, 29
  - Flussbildgebung, 43
  - Gradientenecho, 14
  - HASTE, 16
  - RARE, 16
  - Spinecho, 14
  - TSE, 16, 31
  - Turbospinecho, 16
- Signalamplitude
  - Flussmessung, 106
- Signalreferenz, 38
- Signalstärke
  - Flussmessung, 106
  - Histogramm, 106
- Silikatsand, 118
- Simulation
  - von Diffusion, 63
- Sin-Cos-Reihe, 46
- Sinc-Funktion, 96
- slicegradient, 12
- SNR-Verlust, 22
- Sonne, 4
- spätes Metaxylem, 19
- Spaltöffnungen, 103
- Spektrale Dichte, 49
- Spektrometer, 21
- Spin, 9
- Spin-Gitter-Relaxation, 10
  - Ursachen, 49
- Spin-Spin-Relaxation, 10
- Spindichte, 12
  - Fehler ohne T<sub>2</sub>-Korrektur, 39
  - Referenz, 38
  - und Relaxationszeiten, 61
  - unter Trockenstress, 85
  - Wurzelgewebewerte, 83
- Spindichtekarten, 38
- Spindichtevertelung, 13
- Spinecho, 14
- Spinecho-Sequenz, 14
- Spinensembel, 9
- split-root, 23, 124
- Spoiler, 32
- Spule
  - Beladung, 22
- Stärke, 52
- stimuliertes Echo, 15
- Substrat, 118
- surface sink strength density, 56
- Suszeptibilität, 52, 115
  - Verschiebung durch, 27
- Suszeptibilitätssprünge, 30
- Sweepweite, 30
- T<sub>E</sub>, 14
- T<sub>i,E</sub>, 15
- T<sub>1</sub>-Karte
  - Holz in Cyclohexan, 75
  - Holz in Wasser, 75
- Temperatur
  - und Relaxation, 50
- Tonoplastenmembran, 17
- Transpiration, 21, 103
  - abgeschnittene Pflanze, 105
- Transversalmagnetisierung, 10
- Trockenstress
  - an Farnstängeln, 61
  - Definition, 79

- in Wurzeln, 79
- TSE, 16
- Tune, 24
- Turbospinecho, 16
  - 3D, 32
- Turgor, 17, 100
  
- Umgebungsmedium, 118
- Unschärfe von  $T_1$ -Karten, 71
  
- Vakuole, 17
  - Volumenanteil Apfelzelle, 54
- Vaskularring, 19
  - Wiederbewässerung, 87
- Verschiebungsquadrat, 64, 65
- Viskosität
  - und Relaxationszeit, 51
- Volumenfluss, 106
- vorgezogenes Echo, 30
- Vorratsvolumen, 22
- Voxel, 106
  
- Walz GmbH, 21
- Wasser
  - molare Masse, 105
  - Selbstdiffusionskonstante, 65
- Wassergehalt
  - von Sand, 68
- Wasserpotential
  - und Relaxationszeiten, 61
  - und Trockenstress, 85
- Wasserreservoir der Wurzel, 85
- Wurzeldruck, 103
- Wurzelhaare, 18
- Wurzelhaube, 18
- Wurzeln
  - in Cyclohexan, 75
  - in Sand, 118
- Wurzelsystem, 114
  - homorhizes, 18
- Wurzelwachstum, 18
  
- XMS400, 21
- Xylem, 4
- Xylemfluss
  - abgeschnittene Pflanze, 105
  
- z-Magnetisierung, 9
- Zeitauflösung, 37
- Zellengröße
  - Bestimmung, 110
  - und Relaxationszeiten, 56, 61
  
- Zahlenwerte, 111
- Zellmembran, 17
- Zellschädigung, 100
- Zellwand
  - chem. Austausch, 52
- zentraler Grenzwertsatz, 65
- zero-filling, 44
- Zucker, 52
- Zytoplasma, 17, 56
  - Volumenanteil Apfelzelle, 55
- Zytoskelett, 17
  - und Permeabilität, 59
  - und Relaxationszeiten, 59

„Hofstadtersches Gesetz: Es braucht immer länger, als man erwartet, sogar dann, wenn man das Hofstadtersche Gesetz berücksichtigt.“

Douglas R. Hofstadter in [Hof79]

„Jedes nichtliterarische, lesenswerte Werk mit einem Umfang von mehr als zwanzig Seiten verdient einen Index.“

L. Lamport in [Lam94]

„Mais ist ein lebendes Suszeptibilitätsartefakt.“

M. Rokitta [Rok98]

