

# **Die Bedeutung von ABA-Konjugaten als hormonelles Langstreckensignal in Pflanzen**

**Dissertation**

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

**vorgelegt von  
Angela Sauter  
aus  
Würzburg**

**Würzburg, 2002**

Eingereicht am:	16. Mai 2002
Mitglieder der Prüfungskommission:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Hedrich
Gutachter:	Prof. Dr. W. Hartung
Gutachter:	Prof. Dr. K.-J. Dietz
Tag des Promotionskolloquiums:	16. September 2002
Doktorurkunde ausgehändigt am:	

---

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Langstreckenhormonsignal Abscisinsäure</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Transport von ABA-Konjugaten in den Fernleitungsbahnen</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Die Struktur der ABA-Konjugate</b>	<b>5</b>
<b>1.4 ABA-Glucoseester</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>8</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Pflanzenmaterial und Kulturmethoden</b>	<b>10</b>
2.1.1 Bestimmung der Oberfläche von Wurzelsystemen und Wurzelsegmenten	12
<b>2.2 Mikroskopie</b>	<b>12</b>
2.2.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	12
2.2.2 Sudan-III Färbung	13
2.2.3 Toluidinblau-Färbung	13
<b>2.3 Analytische Methoden</b>	<b>14</b>
2.3.1 Bestimmung von ABA mittels ELISA	14
2.3.1.1 Prinzip der Methode	14
2.3.1.2 Durchführung des ELISA-Testes	14
2.3.1.2.1 Beschichtung der Mikrottestplatten	14
2.3.1.2.2 Durchführung und Berechnung der Messung	14
2.3.1.3 Probenaufarbeitung	16
2.3.2 ICP-AE-Spektroskopie	17
<b>2.4 Untersuchung von Bodenproben</b>	<b>17</b>
2.4.1 Entnahme der Bodenproben	17
2.4.2 Beschreibung der Standorte	18
2.4.3 Bestimmung des pH-Wertes im Bodenwasser	18
2.4.4 Wasserkapazität und Wassergehalt des Bodens	20
2.4.5 Aufarbeitung der Bodenproben für den ELISA-ABA-Test	20

---

<b>2.5 Untersuchungen zum Trocken- und Salzstress bei Maispflanzen</b>	<b>20</b>
2.5.1 Austrocknungsexperiment	20
2.5.2 Einfluss von Salzstress auf das Maiswachstum	21
<b>2.6 Wasser- und Stoffflüsse durch Wurzelsysteme</b>	<b>21</b>
2.6.1 Theorie	21
2.6.2 Saugapparatur	23
2.6.3 Radialer Transport von ABA-GE und ABA	24
2.6.4 Die spezifische Wirkung verschiedener ABA-Analoga auf $J_{Vr}$	25
<b>2.7 Effluxexperimente mit Maiswurzelsegmenten</b>	<b>25</b>
2.7.1 Präparation der Wurzelstücke	25
2.7.2 Versuchsdurchführung	26
<b>2.8 Wasser- und Stoff-Flüsse durch Sprossabschnitte</b>	<b>27</b>
2.8.1 Bestimmung der inneren Oberfläche von Xylemgefäßen	27
2.8.2 Bestimmung der Wasserflüsse durch Xylemgefäße	28
2.8.3 Saugtechnik	28
<b>2.9 Hydrolyse von ABA-Glucoseester durch apoplastische Waschflüssigkeit aus Maiswurzeln</b>	<b>29</b>
2.9.1 Gewinnung apoplastischer Waschflüssigkeit	29
2.9.2 Bestimmung der Enzymaktivität der $\beta$ -D-Glucosidase	29
2.9.3 Hemmung der $\beta$ -D-Glucosidase durch ABA-Glucoseester	30
<b>2.10 Hydrolyse von ABA-Glucoseester mittels IWF aus Gerstenblättern</b>	<b>30</b>
2.10.1 Gewinnung apoplastischer Waschflüssigkeit	30
2.10.2 ABA- und ABA-GE-Gehalte in Xylem und IWF von Gerste	30
2.10.3 Hydrolyse von ABA-GE durch apoplastische Enzyme	31
2.10.4 Proteinbestimmung in Blattrohextrakt und IWF	31
<b>2.11 Charakterisierung der apoplastischen <math>\beta</math>-D-Glucosidase</b>	<b>32</b>
2.11.1 pH-Profil der Enzymaktivität	32
2.11.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration	32
2.11.3 Isoelektrischer Punkt der $\beta$ -D-Glucosidase	33
<b>2.12 Vorversuche zur Reinigung der <math>\beta</math>-D-Glucosidase</b>	<b>34</b>

---

2.12.1 Einfluss von Lösungsmitteln und anderen Substanzen auf die Stabilität der $\beta$ -D-Glucosidase	34
2.12.2 Säulenchromatografische Reinigung	35
2.12.2.1 Anionentauscherchromatografie	35
2.12.2.2 Batch-Verfahren zum raschen Testen von Chromatografiematerialien	37
2.12.2.2.1 Hydroxyapatit	37
2.12.2.2.2 Affinitätsbestimmung der $\beta$ -D-Glucosidase an Concanavalin A-Sepharose	38
2.12.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	39
2.12.3.1 Eindimensionale SDS-PAGE	39
2.12.3.2 Zweidimensionale PAGE	40
2.12.3.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen (nach Blum et al. 1987)	41
<b>2.13 Datenauswertung</b>	<b>42</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Untersuchungen zum Vorkommen und der Herkunft des ABA-GE</b>	<b>43</b>
3.1.1 Wurzeln und Blätter von <i>Zea mays</i>	43
3.1.1.1 Trockenstress	43
3.1.1.2 Salzstress	46
3.1.2 Einfluss von Salzstress auf Xylem-ABA- und ABA-GE-Gehalte in Gerste	51
3.1.3 Der ABA-GE-Gehalt in Bodenlösungen	52
<b>3.2. Transportstudien durch Wurzelsysteme</b>	<b>53</b>
3.2.1 Der radiale Transport von ABA-GE	53
3.2.2 Salzstress und der radiale Transport von ABA und ABA-GE	55
3.2.3 Die spezifische Wirkung von ABA-Vorstufen, -Metaboliten und -Analoga auf $J_{Vr}$	57
<b>3.3 Apoplastische <math>\beta</math>-D-Glucosidase-Aktivität in Maiswurzeln</b>	<b>63</b>
<b>3.4 Der Efflux von ABA-GE und ABA aus kortikalen und stelären Geweben der Wurzel</b>	<b>64</b>
<b>3.5 Langstreckentransport durch Sprossabschnitte</b>	<b>67</b>
3.5.1 Sprosswachstum und anatomische Parameter	68

---

3.5.2 Saugexperimente mit Maismesokotylsegmenten und ersten Bohneninternodien	70
<b>3.6 ABA-GE und die hydrolytische Aktivität in Gerstenblatt-IWF</b>	<b>75</b>
3.6.1 ABA- und ABA-GE-Gehalte in Xylemsaft und IWF von Gerstenkeimlingen	75
3.6.2 Hydrolyse von ABA-GE durch apoplastische Enzyme	76
3.6.3 Proteinbezogene $\beta$ -D-Glucosidase Aktivität in Blattrohextrakt und IWF	78
<b>3.7 Stabilität der <math>\beta</math>-D-Glucosidase</b>	<b>78</b>
3.7.1 Stabilitätstests mit Lösungsmitteln, Salzen und anderen Substanzen	78
3.7.1.1 Glucose	78
3.7.1.2 Pufferlösungen	79
3.7.1.3 Einwertige Alkohole	79
3.7.1.4.2 Zweiwertige Kationen	81
3.7.1.4.3 Die Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat	81
3.7.1.5 Protease-Inhibitoren	82
<b>3.8 Chromatografische Reinigung der <math>\beta</math>-D-Glucosidase</b>	<b>83</b>
3.8.1 Anionentauscherchromatografische Reinigungsverfahren	83
3.8.2 Kompetitive Hemmung der $\beta$ -D-Glucosidase in den aktivsten Fraktionen der Anionentauscherchromatographie	85
3.8.3 Test von Chromatografiematerialien im Batch-Verfahren	86
3.8.3.1 Hydroxyapatit	86
3.8.3.2 Adsorption der $\beta$ -D-Glucosidase an Concanavalin A-Sepharose	87
<b>3.9 Charakterisierung der apoplastischen <math>\beta</math>-D-Glucosidase</b>	<b>88</b>
3.9.1 pH-Profil	88
3.9.2 Abschätzung der molekularen Masse der $\beta$ -D-Glucosidase	88
3.9.3 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der $\beta$ -D-Glucosidase	89
3.9.4 Zweidimensionale Trennung der IWF-Proteine	90
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>92</b>
<b>4.1 Die Beteiligung des ABA-GE am Wurzel-Spross-Stresssignal</b>	<b>92</b>
4.1.1 Der radiale Transport des ABA-GE in der Wurzel	94
4.1.1.1 Herkunft des ABA-GE	94

---

4.1.1.2 Apoplastische Barrieren und ihr Einfluss auf den radialen Transport konjugierter ABA in der Wurzel	95
4.1.1.3 ABA-GE-Transportstudien durch dekapitierte Maiswurzelsysteme	96
4.1.1.4 Apoplastische $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität in Maiswurzeln	98
4.1.1.5 Xylembeladung mit ABA-GE	99
4.1.1.5.1 Effluxexperimente mit isolierten Wurzelrinden- und Wurzelstelensegmenten	100
4.1.1.5.2 Die Salztoleranz der Maissorte Helix	101
4.1.1.5.3 Perfusionsexperimente mit intakten Maiswurzelsystemen	102
4.1.1.5.4 Mechanismus der Xylembeladung mit ABA-GE	103
4.1.1.6 Radialer Transport verschiedener ABA-Analoga und ihr Einfluss auf $J_{Vr}$	105
4.1.2 Der ABA-GE-Transport im Spross	107
4.1.3 Das Schicksal des ABA-GE im Blatt	111
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>116</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>119</b>
<b>7 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>122</b>
<b>8 LITERATUR</b>	<b>124</b>

# 1 EINLEITUNG

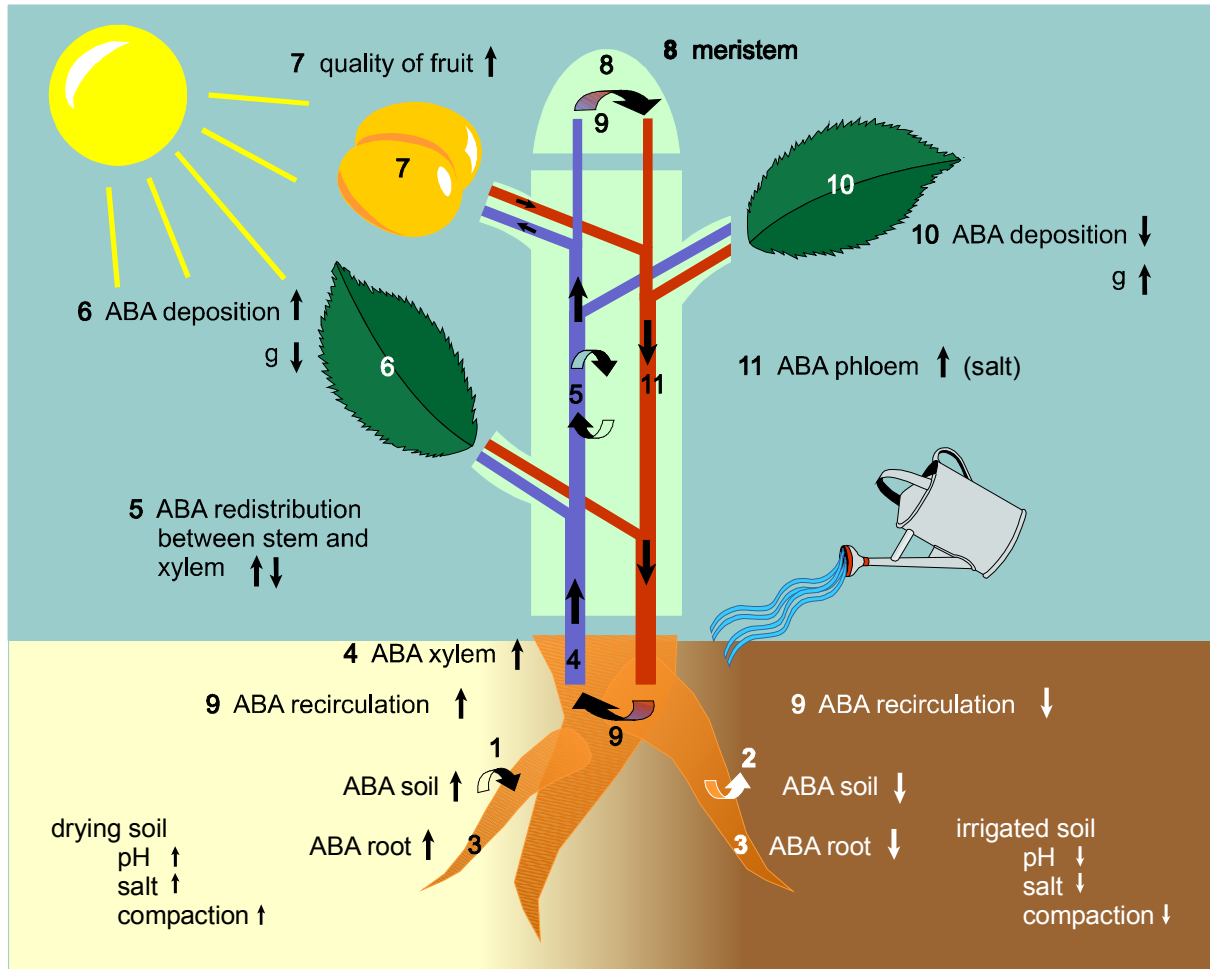
## 1.1 Das Langstreckenhormonsignal Abscisinsäure

Seit den frühen Achtzigerjahren ist bekannt, dass die Blattleitfähigkeit von Pflanzen durch stomatäre Schließreaktionen sogar dann verringert werden kann, wenn das Wasserpotential der Blätter nicht beeinflusst ist. Solche Situationen können bei einer beginnenden Stressreaktion, beispielsweise bei einem gerade eintrocknenden Boden, auftreten. Blackman und Davies (1985) konnten dies in „split-root“ Experimenten untersuchen. Hierbei wurde eine Wurzelhälfte gut bewässert, was zu einem hohen Blattwasserpotential führte, während die andere Wurzelhälfte Trockenstress ausgesetzt wurde. Solche Situationen treten am natürlichen Standort dann ein, wenn die oberen Bodenschichten einzutrocknen beginnen, jedoch tiefer gelegene Bereiche noch gut mit Wasser versorgt sind.

Davies und Mitarbeiter (Davies & Zhang 1991) konnten zeigen, dass ein chemischer Signalstoff im Xylem als Wurzel-Spross-Stresssignal transportiert wird und in den Zielzellen der oberirdischen Pflanzenorganen eine Wirkung hervorruft. Dieser Signalstoff wurde eindeutig als das pflanzliche Stresshormon Abscisinsäure (ABA) identifiziert. In weiterführenden Untersuchungen konnte die Rolle der ABA als Wurzel-Spross-Stresssignal vielfach bestätigt werden (Neales et al. 1989, Schurr et al. 1992, Hartung et al. 1999, Davies et al. 2000) und gilt heute als gesichert.

Abscisinsäure-Ströme werden in Pflanzen durch die unterschiedlichsten Umwelteinflüsse verstärkt oder abgeschwächt. Ein Überblick über die Faktoren, welche Bildung und Intensität des ABA-Langstreckensignals beeinflussen, gibt Abbildung 1. Die ABA-Biosynthese in den Wurzeln (3) kann sowohl durch Bodentrockenheit als auch Salzstress oder einem alkalischen Boden-pH verstärkt werden (Hartung & Jeschke 1999). ABA in der Bodenlösung (1) ist von Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Hormonhomöostase in der Wurzel (Slovik et al. 1995). Für den Langstreckentransport der ABA ist der ABA-Gehalt im parenchymatischen Gewebe des Sprosses (5) relevant. Eine ABA-Rezirkulation (9, Wolf et al. 1990) über das Phloem (10, Jeschke et al. 1997a) kann ebenfalls zu einer Anreicherung der ABA im Wurzelgewebe führen. Zu den stressrelevanten Umweltfaktoren zählen die Bodentrockenheit, der pH-Wert der Bodenlösung, die Bodenstruktur sowie pH-Gradienten zwischen dem Apoplasten und dem Symplasten in Wurzel, Spross und Blatt.





**Abb. 1-1** Schematische Darstellung der ABA-Ströme in einer gestressten Pflanze. Das Wurzelsystem dieser Modellpflanze ist zweigeteilt. Die linke Wurzelhälfte befindet sich in trockenem Boden, die rechte Wurzelhälfte ist ausreichend mit Wasser versorgt. Die Nummerierung weist auf die Faktoren hin, welche die Bildung und auch Intensität des ABA-Signal im Xylem sowie Phloem beeinflussen. Die Pfeile deuten an, wie sich die einzelnen Faktoren unter Trockenbelastung oder Wiederbewässerung verändern (↑ Zunahme, ↓ Abnahme). (g: Blattleitfähigkeit [ $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ])

## 1.2 Transport von ABA-Konjugaten in den Fernleitungsbahnen

In der Literatur der letzten 10 Jahre wurde immer häufiger berichtet, dass im Xylemsaft gestresster Pflanzen neben freier ABA auch ein erhöhter ABA-Konjugat-Gehalt nachweisbar ist (Tab. 1-1). Bano et al. (1993, 1994) fanden erstmals einen Anstieg konjugierter ABA im Xylemsaft trockengestresster Sonnenblumen und Reispflanzen. Der Konjugat-Gehalt war um das 5-fache bei den Reispflanzen und um das 2-fache bei den Sonnenblumen gegenüber der

freien ABA erhöht. Bano und Coautoren entdeckten ebenfalls konjugierte Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure im Xylemsaft gestresster Pflanzen.

**Tab.1-1** Der Gehalt an freier und gebundener ABA im Xylemsaft verschiedener Pflanzenspezies, die unterschiedlichen Stressbedingungen ausgesetzt waren. <sup>A</sup> Bano et al. 1993; <sup>B</sup> Bano et al. 1994; <sup>C</sup> Hartung & Jeschke 1999; <sup>D</sup> Jeschke et al. 1997a; <sup>E</sup> Fort et al. 1998.

Spezies	Stressbehandlung	freie ABA [nM]	gebundene ABA [nM]	Verhältnis ABA/ABA- Konjugat
Reis <sup>A</sup>	Kontrolle	7.2 ± 1	73 ± 7.5	0.1
	trockengestresst	92 ± 3	499 ± 75	0.2
	wiederbewässert	52 ± 12	87 ± 5.7	0.6
Sonnenblume <sup>B</sup>	Kontrolle	10 ± 0.6	120 ± 0.6	0.1
	trockengestresst	252 ± 7.5	546 ± 104	0.5
	wiederbewässert	32 ± 0.5	145 ± 2.2	0.2
Anastatica	Kontrolle	3.7	0.2	16.1
<i>hierochuntica</i> <sup>C</sup>	250mM NaCl + 40mM CaCl <sub>2</sub>	42.9	33.9	1.3
Mais <sup>D</sup>	Kontrolle	30.9 ± 6.1	0.4 ± 0.1	77
	single-rooted plants	4.1 ± 0.4	1.0 ± 0.2	4
Betula	Kontrolle	31 ± 17	15 ± 16	2.1
	<i>pendula</i> <sup>E</sup>	trockengestresst	829 ± 267	263 ± 63

Salzstress kann ebenfalls zu einem Anstieg der ABA-Konjugat-Konzentration im Xylemsaft führen. Eine beträchtliche Erhöhung der Xylem-ABA-GE-Konzentration wurde von Grimmer (1993; zitiert von Hartung & Jeschke 1999) in der winteranuellen Wüstenpflanze *Anastatica hierochuntica* nachgewiesen. *Anastatica*-Pflanzen wurden einem Salzstress ausgesetzt, wie er auch am natürlichen Standort im Boden besteht. Das Verhältnis freie ABA zu konjugierter ABA verringerte sich von 16.1 zu 1 in den Kontrollpflanzen auf 1.3 zu 1 in den salzbelasteten Pflanzen.

Ein erhöhter ABA-GE-Gehalt war auch im Xylemsaft von Maispflanzen nachweisbar, deren Versorgung nur über eine einzelne Hauptwurzel erfolgte (Jeschke et al. 1997b). Blätter dieser Pflanzen litten unter Wassermangel, obwohl ihre Wurzeln ausreichend mit Wasser versorgt

waren. Das Verhältnis ABA zu ABA-GE in den Kontrollpflanzen lag bei 77 zu 1. Bei den Pflanzen mit nur einer Hauptwurzel war das Verhältnis auf 4 zu 1 erniedrigt.

Fort et al. (1998) kultivierten Keimlinge von *Betula pendula* in einem „split-root“-System, wobei eine Wurzelhälfte bewässert, die andere einem Trockenstress ausgesetzt wurde. Wurden beide Wurzelhälften nicht bewässert, konnte neben dem Anstieg der freien ABA auch eine Zunahme der ABA-GE-Konzentration im Xylem beobachtet werden.

Jeschke et al. (1997a) gewannen sowohl Xylem- als auch Phloemsaft (Tab. 1-2) von *Ricinus communis* L., welcher nur unzureichend mit Phosphat versorgt wurde. Ein solcher Phosphatmangel ließ den ABA-GE-Gehalt im Xylem um den Faktor 3.1 ansteigen. Schon bei den Kontrollpflanzen enthielt der Phloemsaft einen 64-fach höheren ABA-GE-Gehalt im Vergleich zum Xylemsaft. Bei den Phosphatmangelpflanzen war die Phloem-ABA-Konzentration nochmals um das 1.8-fache angereichert.

Tab. 1-2 ABA- und ABA-GE-Konzentration im Xylem und Phloem von *Ricinus communis* L. unter Phosphatmangel (Jeschke et al. 1997b).

Behandlung	Xylem		Phloem	
	freie ABA [nM]	gebundene ABA [nM]	freie ABA [nM]	gebundene ABA [nM]
Kontrolle	180 ± 40	1.4 ± 0.3	1800 ± 100	90 ± 30
Phosphatmangel	1100 ± 800	4.4 ± 0.3	8300 ± 2300	160 ± 30

Ein erhöhter ABA-GE-Gehalt konnte auch im Xylem von Rizinuspflanzen bei ausschließlicher Blattdüngung beobachtet werden. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem stickstofffreien Medium, nur die Blätter wurden regelmäßig mit Ammonium oder Nitrat besprüht (Hartung et al. 1999). Es zeigte sich, dass nach einer Ammonium-Behandlung die ABA-GE-Konzentration im Xylem stärker anstieg als nach Besprühen mit Nitrat.

Diese Hinweise lassen auf eine weite Verbreitung der ABA-Konjugate im Xylemsaft verschiedener Pflanzen schließen. Sobald ein äußerer Stresstimulus auftritt, wird offensichtlich neben der ABA auch ihr Konjugat verstärkt im Xylem zu den oberirdischen Sprosssteilen transportiert.

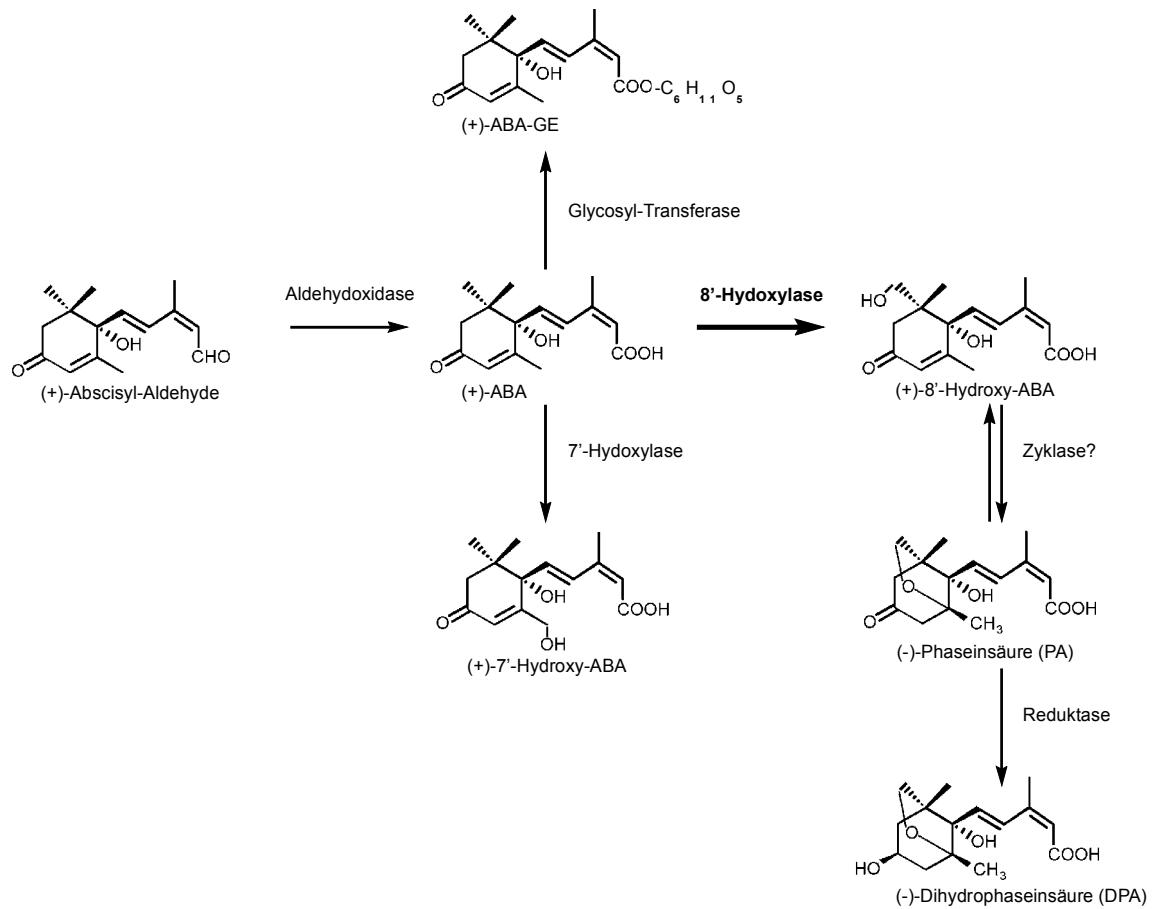
### 1.3 Die Struktur der ABA-Konjugate

Munns & King (1988) schlossen aus ihren Untersuchungen, dass freie ABA im Xylem trockengestresster Weizenpflanzen nicht als Wurzel-Sprosssignal in Frage kommt. Die von ihnen gefundene Xylem-ABA-Konzentration war zu gering, um die stomatäre Leitfähigkeit zu beeinflussen. Nachdem jedoch der Xylemsaft für einige Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagerte und dann abgeschnittenen Blättern appliziert wurde, konnte eine Hemmung der Transpiration beobachtet werden. Später entdeckten Munns et al. (1993) das gleiche Phänomen im Xylemsaft trockengestresster Gerstenpflanzen. Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass die Lagerung des Saftes zu einer Aggregation kleiner Moleküle mit geringer physiologischer Aktivität zu einer polymeren Komponente mit hoher Aktivität führt. Folglich wird ABA in den Fernleitungsbahnen nicht als einzelnes Molekül, sondern auch in einer komplexierten Form transportiert. Die chemische Natur dieses Komplexes ist bis heute unbekannt. ABA könnte an Zuckermolekülen gebunden sein oder an einer unbekanntem Komponente, wie sie Netting et al. (1992) in dem von ihm gefundenen „ABA-Addukt“ postulierte.

Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) untersuchten Hansen & Dörffling (1999) den Gehalt an ABA-Konjugaten im Xylemsaft trockengestresster Sonnenblumen. Der Xylemsaft von Kontrollpflanzen enthielt 5 ABA-Konjugate, der von salzgestressten Pflanzen noch ein sechstes. Einige dieser Konjugate ließen sich nicht durch eine alkalische Hydrolyse spalten, sondern nur enzymatisch mittels einer  $\beta$ -D-Glucosidase. Das am häufigsten im Xylem gestresster Sonnenblumen nachgewiesene Konjugat war der ABA-Glucoseester mit einer  $\beta$ -D-glucosidischen Bindung.

### 1.4 ABA-Glucoseester

Kurz nach der Entdeckung und Isolierung der freien ABA aus Baumwollfrüchten (Okhuma et al. 1963) wurden auch ihre Metabolite chemisch charakterisiert (Milborrow 1970). Der ABA-Glucoseester war das erste identifizierte Hormonkonjugat der ABA. In unreifen Lupinenfrüchten (Koshimizu et al. 1968) und später in Hagebutten konnte sein natürliches Vorkommen nachgewiesen werden.



**Abb. 1-2** Bildung und anschließender Katabolismus der Abscisinsäure in pflanzlichen Geweben. Der ABA-Metabolismus kann auf oxidativem Wege über die 8'-Hydroxy-ABA zur Bildung von Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure erfolgen. In geringem Maß wird auch die 7'-Hydroxy-ABA gebildet. Durch eine Konjugierung mit Glucose wird das Phytohormon ebenfalls inaktiviert.

Bildungsort der ABA in den höheren Pflanzen sind Wurzeln sowie das Mesophyll der Blätter. Reife Früchte und Samen sind ebenfalls Synthesorte der ABA. Ein Absinken des Gewebewasserpotenzials ist Stimulus für eine Neusynthese. Zwei Synthesewege stehen hier zur Diskussion. In der älteren Literatur wird der direkte Weg über den Terpenoid-Sekundärstoffwechsel als der Hauptweg beschrieben (Neill and Horgan 1984, Zeevaert und Creelman 1988). Aus Mevalonsäure über Isopentyl-Diphosphat wird ABA direkt hergestellt. Der zweite, indirekte Weg läuft über den Abbau der Carotinoide, wobei die Xanthophylle Violaxanthin und Xanthoxin als Vorstufen gelten (Milborrow 2001).

In beiden Synthesewegen ist der letzte Umwandlungsschritt die Oxidation des Abscisyl-Aldehyds, der unmittelbaren Vorstufe der ABA. Das hierfür notwendige Enzymsystem ist ein Molybdoenzym, die Aldehydoxidase (Abb. 1-2, Zimmer & Mendel 1999, Koshiba et al. 1996).

Für den ABA-Abbau bzw. ihre Inaktivierung sind ebenfalls verschiedene Wege bekannt (Abb. 1-2). Der oxidative Abbauweg beginnt mit der Einführung einer Hydroxylgruppe am C8'-Atom der S-(+)-ABA mit Hilfe des Enzyms ABA-8'-Hydroxylase, einem Mitglied der Familie der Cytochrom-P450-Monooxygenasen (Zeevaart und Creelman 1988, Cutler et al. 2000). Die entstandene 8'-Hydroxy-ABA ist ein instabiles Zwischenprodukt. Sehr schnell erfolgt der Ringschluss zwischen dem 8'- und 2'-Kohlenstoffatom, wobei das stabile Endprodukt Phaseinsäure entsteht. Die Phaseinsäure und die durch einen weiteren Reduktionsschritt gebildete Dihydrophaseinsäure sind die Hauptmetabolite des ABA-Abbaus vieler Pflanzen. Eine Hydroxylierung der Methylgruppe am C7'-Atom führt zur Bildung der weniger häufig auftretenden Nigellinsäure (7'-Hydroxy-ABA, Cutler et al. 2000). Durch die Konjugierung des ABA-Moleküls mit Glucose ist ebenfalls eine Inaktivierung möglich. Hierbei findet entweder eine Veresterung mit ihrer Carboxylgruppe statt (ABA-GE) oder der Zucker wird glycosidisch an das C1'-Atom gebunden (ABA-G, Boyer und Zeevaart 1982). Dieses C1'-Glucosid ist sehr instabil. Eine spontane Umwandlung zum ABA-GE konnte von Milborrow (1988) beobachtet werden. Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure können ebenso wie ABA mit Glucose konjugiert werden (Netting et al. 1992).

Die oxidative ABA-Metabolisierung findet im Cytoplasma unter der Beteiligung einer Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenase statt (Betz et al 1993, Krochko et al. 1998). Der synthetische Wachstumsverzögerer Tetcyclacis hemmt das Cytochrom-P450, das für die Hydroxylierung der ABA zur 8'-Hydroxy-ABA notwendig ist. Zeevaart et al. (1988) ließen abgeschnittene Xanthium-Blätter über ihre Xylemgefäße Tetcyclacis aufnehmen. Die Blätter wurden einer 5-stündigen Trockenperiode ausgesetzt und anschließend wiederbewässert. Tetcyclacis zeigte keinen Effekt auf die stressbedingte ABA-Akkumulation im Blattgewebe. Nach der Wiederbewässerung ging der ABA-Gehalt langsamer auf sein Ausgangsniveau zurück als in Blättern ohne Tetcyclacis-Vorbehandlung. Ebenso wurden nur geringe Mengen Phaseinsäure gefunden, dafür ein überraschend hoher Gehalt an ABA-GE. Tetcyclacis verlangsamt somit den oxidativen Abbau der ABA, wobei eine erhöhte Biosynthese der ABA ausreichend Substrat für die Konjugierung liefert.

Das an der Konjugatbildung des ABA-GE beteiligte Enzymsystem wurde von Lehmann und Schütte (1980) als eine Glycosyltransferase beschrieben. Erstmals konnte mit diesem Enzymsystem in Anwesenheit von UDP-Glucose konjugierte ABA gebildet werden.

Durch Konjugatbildung kann der Phytohormonspiegel in Pflanzen beeinflusst werden. Häufig unterscheiden sich Konjugat und freie Form durch eine veränderte, meist verminderte biologische Aktivität. Jedoch sind Konjugationsvorgänge ihrem Prinzip nach reversibel, was

bedeuten könnte, dass in Form von Hormonkonjugaten angelegte Reserven wieder mobilisierbar sind. Für die Phytohormonklassen Auxine, Cytokinine und Gibbereline gibt es Belege, die auf eine reversible Konjugatbildung hinweisen (Schliemann 1991, Sembdner et al. 1994). Der physiologisch als unwirksam geltende ABA-GE wird zum großen Teil in der Vakuole kompartimentiert (Kaiser et al. 1985, Lehmann und Glund 1986) und somit irreversibel aus dem ABA-GE-Pool entfernt. Stresseinwirkungen können offenbar keine ABA-Freisetzung aus vakuolär abgelagerten Konjugaten induzieren. Eine Spaltung des ABA-GE wäre aber im Apoplasten denkbar (Zeevaart und Boyer 1984).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aus der Tatsache, dass im Xylem verschiedener Pflanzen ein erhöhter ABA-GE-Transport unter Stressbedingungen stattfindet, leiten sich eine Reihe bislang unverstandener Fragen ab. Um zu klären, ob der ABA-GE als Wurzel-Spross-Stresssignal angesehen werden kann, wurden Untersuchungen an Wurzeln, Sprossen und Blättern von Mais-, Bohnen- sowie Gerstenpflanzen durchgeführt.

Ein verstärkter ABA-GE-Import ins Xylem muss nicht ausschließlich auf eine stressbedingte Neusynthese in der Wurzel zurückzuführen sein. Im Falle der freien ABA wurde durch Slovik et al. (1995) in einem mathematischen Modell errechnet und experimentell durch Hartung et al. (1996) bestätigt, dass zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Boden und Wurzelgewebe eine 1 nM ABA-Konzentration im Boden notwendig ist. Aus diesem Grund wurden Bodenproben in unmittelbarer Nähe der Wurzeln von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen untersucht. Damit sollte geklärt werden, ob ABA-GE tatsächlich in der Bodenlösung vorhanden ist und in welchem Konzentrationsbereich er vorliegt.

Hose et al. 2001 konnten für den Transport der freien ABA einen apoplastischen „Bypass“-Fluss durch den gesamten Zellwandapoplasten der Wurzel nachweisen. Da Hormonkonjugate meist hydrophiler und auch größer als die freie ABA sind, wäre es denkbar, dass lipophile Barrieren wie Wurzelexodermis bzw. -endodermis den Transport von ABA-GE zum Zentralzylinder beeinflussen. Mithilfe der von Freundl et al. (1998) beschriebenen Saugtechnik sollte dieser Transport an dekapitierten Maiswurzelsystemen erforscht werden.

Bei der Beladung des Xylems muss der im Wurzelsymplast gebildete ABA-GE in das Xylem und somit in den Apoplasten freigesetzt werden. Dieser Aspekt sollte durch Effluxexperimente mit isolierten Wurzelstelen und -rindensegmenten untersucht werden.

Bis heute ist noch wenig erforscht, ob sich die Intensität des ABA-Signals aus der Wurzel während der Passage durch das Sprossxylem verändert. Abscisinsäure ist eine schwache Säure, die sich in alkalischen Kompartimenten nach dem Anionenfallenprinzip anreichert (Daeter 1994, Slovik et al. 1995). Besitzt das Cytosol des Xylemparenchyms einen höheren pH-Wert als der Apoplast, wäre eine Umverteilung der freien ABA in das Parenchym des Sprosses denkbar. Dadurch könnte es zu einer Abschwächung des aus der Wurzel stammenden Signals kommen. Im Falle des ABA-GE erscheint dies eher unwahrscheinlich. Der experimentell ermittelte Permeabilitätskoeffizient ließ erkennen (Baier et al. 1990), dass Mesophyllmembranen nahezu impermeabel für den ABA-Glucoseester sind. Bei den Plasmamembranen des Wurzelkortex war dieser Koeffizient noch um den Faktor 10 geringer (Gratzer, 1993). Ein Perfusionsexperiment mit Bohneninternodien und Maismesokotylen sollte klären, ob ABA-GE tatsächlich verlustfrei im Xylem transportiert wird.

Mit Hilfe des Transpirationsstroms kann ABA-GE bis in den Blattapoplasten gelangen. Zwei verschiedene Mechanismen könnten hier wirksam werden, um einen ABA-GE-Anstau im Apoplast zu vermeiden. Einmal wäre es denkbar, dass spezifische Transporter im Plasmalemma der Mesophyllzellen einen Import des ABA-GE in den Symplasten ermöglichen. Somit wäre zwar die Aufnahme gewährleistet, aber die Frage nach der Funktion als Stresssignal bliebe ungeklärt. Schließlich werden einmal gebildete Konjugate in der Vakuole irreversibel kompartmentiert. Bekanntermaßen enthält der Blattapoplast neben Mineralien auch Proteine und Enzymsysteme (Dietz 1997). Zu diesen Enzymen zählen auch extrazelluläre Glucosidasen (Holden und Rohringer 1985), wovon schon einige in Gerste, Mais und Reis charakterisiert und isoliert wurden (Li et al. 1989, Nematollahi und Roux 1999, Akiyama et al. 1998). Durch eine Spaltung des ABA-Zuckeresters und der damit verbundenen Freisetzung der ABA wären zwei offene Fragen geklärt. Freie ABA kann im Gegensatz zu ihrem Konjugat Plasmamembranen gut passieren. Aus dem physiologisch unwirksamen Konjugat könnte so die aktive Form freigesetzt werden, die nun auf Stomata oder Meristeme wirkt. In Gerstenprimärblättern wurde von Wichert (1998) eine apoplastische Glucosidaseaktivität nachgewiesen. Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollte eine genauere Charakterisierung dieser extrazellulären  $\beta$ -D-Glucosidase erfolgen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Pflanzenmaterial und Kulturmethoden

*Zea mays* Karyopsen cv. Garant FAO 240 wurden von der Firma Asgrow (Bruchsal, FRG) bezogen. Von der Kleinwanzlebener Saatzucht (Einbeck, FRG) stammte die Sorte Helix. Das verwendete Gersten-Saatgut (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) ist eine Wintergerstensorte, die zwischen 1982 und 1988 in der Europäischen Union zugelassen war. Bei den verwendeten Bohnensamen handelte es sich um die Art *Phaseolus coccineus* L. (Weiße Riesen, FRG).

Gersten- sowie Maiskaryopsen wurden auf mit 0.5 mM  $\text{CaSO}_4$  angefeuchtetem Zellstoff 4-5 Tage im Dunkeln bei 25°C vorgekeimt. Die Maiskeimlinge entwickelten in dieser Zeit eine bis zu 10 cm lange Primärwurzel, die Koleoptilen waren im Mittel 3 cm lang. Die Gerstenkeimlinge wiesen etwas kürzere Koleoptilen auf und das Wurzelsystem bestand aus 3-4 gleichlangen Wurzeln von 5-7 cm Länge. Einige dieser Keimpflanzen wurden in belüfteter Hydrokultur oder Luftkultur für weitere 8 Tage angezogen. Die hierfür verwendete ungepufferte Nährlösung besaß einen pH-Wert von 5.5 und war bezüglich ihrer Nährelemente modifiziert nach Pirson und Seidel (1950):

Makronährelemente    1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                                  2.0 mM  $\text{KNO}_3$   
                                  1.0 mM  $\text{CaCl}_2$   
                                  1.0 mM  $\text{MgSO}_4$

Mikronährelemente    18  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA  
                                  8.1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$   
                                  1.5  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$

Die Keimlinge wurden auf 100 ml oder 1.8 l Hydrokulturtöpfe gesetzt. Beim Mais wurden die Keimlinge am Mesokotyl, bei der Gerste am unteren Ende der Koleoptile mit Schaumstoff umwickelt und in Bohrungen speziell angefertigter PVC-Abdeckungen befestigt. Die Pflanzen standen anschließend im Gewächshaus unter einer Quecksilberdampfampe (Osram, München, FRG), die zusätzlich zum Tageslicht 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  lieferte. Der Tag-Nacht-Rhythmus war auf 16 zu 8 h eingestellt, parallel dazu betrug der Temperaturwechsel 25°C und 17°C. Um Maiskeimlinge in Luftkultur anzuziehen, wurde ein 1 m<sup>3</sup> großer, abgedunkelter Behälter benötigt. In Bohrungen des Deckels konnten die Keimlinge mit Schaumstoff befestigt werden. Der Boden des Containers enthielt 20 l Nährlösung, die mittels eines

Zerstäubers (Defensor; Axair, Nürnberg, FRG) auf die Wurzel gesprüht wurde. Die Gesamtsprühzeit pro Tag umfasste 10 Stunden und war gleichmäßig auf 24 Stunden verteilt. Um die Salztoleranz der Maissorte Helix zu testen, wurden Maiskaryopsen in Quarzsandkultur unter verschiedenen Salzstressbedingungen 22 Tage im Gewächshaus kultiviert. Die Kontrollpflanzen wurden mit normaler Pirson & Seidel (P&S)-Nährlösung gegossen. Salzstress wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen appliziert (P&S plus 50 mM NaCl und P&S plus 100 mM NaCl). Des Weiteren wurden vorgekeimte Maispflanzen zunächst vier Tage in einem P&S-Medium mit 50 mM NaCl kultiviert. Anschließend wurde die Salzkonzentration auf 100 mM NaCl für weitere 4 Tage erhöht. Mit Gerstenkeimlingen, die ebenfalls einem Salzstress ausgesetzt werden sollten, wurde genauso verfahren.

Für Effluxexperimente mit Wurzelsegmenten wurden *Zea mays* Samen in großen Petrischalen auf mit 0.5 mM CaSO<sub>4</sub> durchtränktem Zellstoff ausgelegt. Sieben Tage befanden sich die Maissamen in einem abgedunkelten Klimaschrank, der einen Temperaturrhythmus von 12h / 21°C und 8h / 16°C vorgab. Jeden zweiten Tag wurde ein eventueller Feuchtigkeitsverlust durch Besprühen mit CaSO<sub>4</sub>-Lösung ausgeglichen.

Mais- als auch Bohnenpflanzen wurden für Untersuchungen an Sprosssegmenten benötigt. Maiskaryopsen (*Zea mays* L. cv. Helix, Kleinwanzlbener Saatzucht AG, Einbeck, FRG) wurden in mit Quarzsand gefüllten Töpfen ausgelegt, mit P&S-Nährlösung gegossen und für 5 Tage bei 25°C im Dunkeln kultiviert. Die Anzucht im Dunkeln rief eine Etoilierung hervor, was sich beim Mais in einem verstärkten Wachstum des Mesokotyls äußerte. Bevor diese vorgekeimten Pflanzen im Gewächshaus (Quecksilberdampf Lampe: 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; Tag/Nacht: 16 / 8 h und 25 / 17°C) für weitere 7 Tage wachsen konnten, mussten die Mesokotyle (6.0 ± 1.0 cm) mit Holzstäben stabilisiert werden. Bei den Mesokotylen war während dieser Anzuchtsperiode kein weiterer Längenzuwachs zu verzeichnen. Allerdings kam es zu einer Anthocyaneinlagerung, was die vormals weißen Mesokotyle rot verfärbte. Oberhalb des Mesokotyls entwickelten sich drei bis vier Folgeblätter. Bohnensamen (*Phaseolus coccineus* L., Weiße Riesen, FRG) wurden zunächst auf mit 0.5 mM CaSO<sub>4</sub> getränktem Zellstoff 4 Tage im Dunkeln bei 25°C vorgekeimt. Die Keimlinge entwickelten ca. 1 cm lange Hauptwurzeln. Sie wurden ebenfalls in Quarzsandkultur für 10 Tage im Gewächshaus angezogen. In dieser Zeit wuchsen die ersten Internodien bis zu einer Länge von 8.8 ± 1.5 cm. Einige Mais- und Bohnenkeimlinge wurden mit NaCl angereicherter P&S-Nährlösung gegossen (4-5 Tage 50 mM NaCl, danach 100 mM NaCl) und damit einem Salzstress ausgesetzt.

Interzelluläre Waschflüssigkeit (IWF oder apoplastische Waschflüssigkeit) konnte aus Primärblättern von Gerste gewonnen werden. Für die Anzucht wurden Gerstenkaryopsen auf Erde ausgelegt und 10 Tage regelmäßig mit Wasser gegossen. Durch Zugabe von NaCl (50 mM oder 100 mM) zum Gießwasser wurden Salzstressbedingungen simuliert.

### **2.1.1 Bestimmung der Oberfläche von Wurzelsystemen und Wurzelsegmenten**

Um Aussagen über Wasser- oder Stoffflüsse durch Pflanzenwurzeln zu treffen, muss die Wurzeloberfläche bekannt sein. Die Oberflächen konnten mittels eines computergesteuerten Videosystems ermittelt werden (DIAS: Delta-T Image Analysis System; Delta-T Devices; Cambridge, UK). Das dazugehörige Softwareprogramm bestimmte die Fläche der jeweiligen Objekte (= Anzahl der dunklen Pixel) durch den Vergleich mit dem hellen Hintergrund, also den Leuchttisch, auf dem das Objekt lag. Der Kontrast zwischen Wurzeln und Hintergrund konnte durch ein 1-minütiges Anfärben mit Methylviolett (0.25 mM, Sigma, Deisenhofen, FRG) verstärkt werden. Neben der Gerätekalibrierung wurde zusätzlich zu jeder Oberflächenbestimmung ein Draht mit bekannter Oberfläche mitbestimmt, um damit einen Korrekturfaktor zu erhalten (Ottmann und Timm 1984, Harris und Campbell 1989, Ebert et al. 1991). Aus der projizierten Fläche und der Annahme einer zylindrischen Gestalt ließ sich die Oberfläche der Wurzeln errechnen ( $2r \cdot l \cdot \pi$ ;  $r$  = Zylinderradius,  $l$  = Zylinderlänge).

Die Oberflächen von 3 cm langen Wurzelzentralzylinder- sowie Wurzelrindensegmenten sollte ebenfalls ermittelt werden. Der Kontrast zwischen Wurzelsegment und Hintergrund wurde durch ein 30-sekündiges Anfärben der Segmente mit Methylviolett erhöht. Die Oberfläche des Zentralzylinders errechnete sich ebenfalls unter Annahme einer zylindrischen Gestalt. Beim Wurzelrindensegment entspricht die innere Oberfläche die des Zentralzylinders, welche zu der gemessenen äußeren Oberfläche addiert wurde.

## **2.2 Mikroskopie**

### **2.2.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie**

Handquerschnitte von Maiswurzeln (Zentralzylinder und Rinde), Maismesokotylen sowie von ersten Bohneninternodien wurden licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Bei einem Axioplan-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) diente als Anregungsquelle eine Quecksilberdampfampe (HBO 50 W, Osram, München FRG), aus deren Linienspektrum durch vier verschiedene Filtersätze (Zeiss, Oberkochen, FRG) Anregungswellen von 365, 395-440, 450-490 und 546 nm wahlweise zur Verfügung standen. Durch weitere Long-Pass-Filter war es möglich, Fluoreszenzlicht ab 397, 470, 520 sowie 590 nm zu beobachten. Ein Bildaufzeichnungsgerät (Seescan; Intas, Göttingen) ermöglichte die Bildvisualisierung auf einem angeschlossenen Farbmonitor sowie die digitale Bildspeicherung.

Für die Durchlichtmikroskopie wurde ein Leitz Diaplan Mikroskop (Leitz, Wetzlar, FRG) verwendet. Mittels eines speziellen tubusförmigen Aufsatzes (Leitz Periplan, 10x / 18, TL 160 mm; Leitz, Wetzlar, FRG) konnte eine Spiegelreflexkamera montiert und somit Gewebeschnitte dokumentiert werden.

### **2.2.2 Sudan-III Färbung**

Der lipophile Farbstoff Sudan III (Merck, Darmstadt, FRG) eignet sich gut zum Sichtbarmachen von den auf Zellwänden gelagerten Suberinlamellen. Die Färbelösung wurde nach Gerlach (1984) hergestellt. Mit 92%igem Ethanol (v/v) wurde eine gesättigte Sudan-III-Lösung hergestellt, diese dann mit dem gleichen Volumen an Glycerin (AppliChem, Darmstadt, FRG) vermischt. Die Mischung wurde auf Handschnitte, die sich auf einem Objektträger befanden, getropft und für 10 min auf eine auf 70°C erhitzte Heizplatte gelegt. Vor der mikroskopischen Untersuchung wurden die Querschnitte gründlich mit Glycerin / Wasser (1:1, (v/v)) gewaschen.

### **2.2.3 Toluidinblau-Färbung**

Der basische Farbstoff Toluidin-Blau-O (Chroma Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart, FRG) färbt Zellwände pflanzlicher Gewebe in unterschiedliche Blautöne, wobei hellere bis türkise Blautöne bei stark verdickten Zellwänden auftreten. Vor allem Zellwände von Steinzellen, Sklerenchymzellen oder Xylemelementen treten dadurch markant zum Vorschein. Querschnitte wurden mit Toluidin-Blau-Lösung (0.5% (w / v)) auf Objektträgern für 5-7 min gefärbt, anschließend die überschüssige Färbechemikalie mit Wasser weggespült.

## 2.3 Analytische Methoden

### 2.3.1 Bestimmung von ABA mittels ELISA

#### 2.3.1.1 Prinzip der Methode

Die außerordentliche Spezifität von monoclonalen Antikörpern ist hervorragend geeignet, um ABA-Konzentrationen bis zu  $2 \cdot 10^{-16}$  mol (Harris and Outlaw, 1990) nachzuweisen. Diese Tatsache findet ihre Anwendung in einem spezifischen immunologischen Test namens ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assey; Weiler, 1986). Die Methode beruht auf einer kompetitiven Bindungsreaktion an einen monoklonalen ABA-Antikörper, der auf einer speziellen Testplatte gebunden ist. Der zu messende ABA enthaltende Extrakt wird zusammen mit einer definierten Menge Tracer (= Antigen: ABA gebunden an alkalische Phosphatase) in die Reaktionsgefäße einer Mikrottestplatte gegeben. In diesem Fall sind ABA und Tracer Antigene, die um Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Nach Zugabe von farblosem p-Nitrophenylphosphat (Substrat) entsteht durch die Phosphataseaktivität gelbgefärbtes p-Nitrophenol, welches fotometrisch bestimmt wird.

#### 2.3.1.2 Durchführung des ELISA-Testes

##### 2.3.1.2.1 Beschichtung der Mikrottestplatten

Die Vertiefungen der Testplatte wurden zuerst mit RAMIG (= Rabbit Anti Mouse Immuno Globulin; Sigma, Deisenhofen, FRG; 5mg in 20 ml 50 mM NaHCO<sub>3</sub>-Puffer, pH 9.6) beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 4°C wurde das restliche, nicht an der Platte haftende Immunglobulin abgegossen. Im nächsten Schritt kam es zur Überschichtung mit einem zweiten, für (+)-ABA spezifischen, monoklonalen Antikörper (0.5 mg in 20 ml 50 mM NaHCO<sub>3</sub>-Puffer, pH 9.6; Prof. Dr. E. Weiler, Universität Bochum, Weiler 1986). Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation bei 4°C wurde überschüssiger Antikörper abgegossen und anschließend die Platte zweimal mit Permutitwasser gewaschen.

##### 2.3.1.2.2 Durchführung und Berechnung der Messung

Auf die vorbeschichtete Testplatte wurden 50 µl Tris-Puffer pro Nöpfchen vorgelegt und darauf jeweils 100 µl der eventuell mit Tris-Puffer (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8;) verdünnten Proben, der Eichlösungen und Tris-Puffer (B<sub>0</sub>) nach folgendem Schema pipettiert:

**Tab. 2-1** Pipettierschema der MikrotestplattenB<sub>0</sub>: 100 µl Tris-Puffer

0.01; 0.02; 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2; 100 pmol ABA in 100 µl Tris-Puffer = Eichlösungen

1 – 32: 100 µl der zu messenden Proben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		0.2	1	9	17	25	1	9	17	25	B <sub>0</sub>	0.2	A
B	B <sub>0</sub>	0.5	2	10	18	26	2	10	18	26	B <sub>0</sub>	0.5	B
C	B <sub>0</sub>	1.0	3	11	19	27	3	11	19	27	B <sub>0</sub>	1.0	C
D	B <sub>0</sub>	2.0	4	12	20	28	4	12	20	28	B <sub>0</sub>	2.0	D
E	0.01	100	5	13	21	29	5	13	21	29	0.01	100	E
F	0.02	B <sub>0</sub>	6	14	22	30	6	14	22	30	0.02	B <sub>0</sub>	F
G	0.05	B <sub>0</sub>	7	15	23	31	7	15	23	31	0.05	B <sub>0</sub>	G
H	0.1	B <sub>0</sub>	8	16	24	32	8	16	24	32	0.1	B <sub>0</sub>	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4°C wurden 50 µl frisch angesetzte Tracer-Lösung (kovalent an ABA gebundene alkalische Phosphatase; 80 µl Tracer in 11.95 ml Tris-Puffer + 0.1% Gelatine; Prof. Dr. E. Weiler, Universität Bochum, Weiler 1986) in jede Vertiefung gegeben. Die Testplatte wurde weitere 3 h im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend zweimal mit Permutitwasser gewaschen. Nach Zugabe von farblosem p-Nitrophenylphosphat (200 µl pro Vertiefung; 58 mg / 58 ml 1M Diethanolaminpuffer pH 9.8 + 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) inkubierte die Testplatte 1 h bei 37°C, worauf die schon oben erwähnte Gelbfärbung entstand. Je intensiver diese Gelbfärbung auftrat, desto mehr Tracer war gebunden, umso weniger ABA befand sich in der Probe. Am Fotometer (405 nm, BIO-RAD Microplate Reader Model 550; BIO-RAD Laboratories GmbH, München, FRG) wurden die Extinktionen der Proben bestimmt. Aus den Extinktionswerten wurde zunächst die %-Bindung (= der prozentuale Anteil an gebundener ABA) errechnet.

$$\frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{NSB}}}{E_{\text{B}_0} - E_{\text{NSB}}} \cdot 100 = \% \text{ - Bindung}$$

$E_{\text{NSB}}$  = Extinktion der nicht spezifischen Bindung. Bei einer ABA-Konzentration von 100 pmol sollten alle ABA-Antikörper mit ABA besetzt sein. Der  $E_{\text{NSB}}$ -Wert ist ein Korrekturfaktor

$E_{\text{B}_0}$  = Extinktion in Anwesenheit des Tracers

$E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe bzw. der Eichlösung

Eine sigmoide Eichkurve ergab sich aus der Auftragung der ABA-Konzentration der Eichlösungen gegen ihre %-Bindungswerte und anschließender linearer Regression. Über die errechneten %-Bindungswerte konnte im linearen Teil der Eichkurve der jeweilige (+)-ABA-Gehalt der Probe ermittelt werden.

### 2.3.1.3 Probenaufarbeitung

Wässrige Extrakte wie im Falle der Bodenproben (2.4.5) oder Versuchsmedien (2.7.2) wurden mit 1 N HCl auf pH 3.0 angesäuert und dreimal gegen eine äquivalente Menge Ethylacetat (Applichem, Darmstadt, FRG) ausgeschüttelt. Da bei pH 3 fast alle ABA-Moleküle im protonierten Zustand vorliegen, gehen 99% aller Moleküle nach dreifachem Ausschütteln in die organische Phase über. Die vereinigten organischen Phasen konnten unter reduziertem Druck im Speed Vac Concentrator eingedampft werden. Der Rückstand wurde in 300 µl Tris-Puffer (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8) gelöst und bis zur ABA-Bestimmung bei -25°C gelagert.

Zur Bestimmung des Gehalts an gebundener ABA, also ABA-GE, wurden die wässrigen Phasen mit Natronlauge (Endkonzentration 1N NaOH, im Dunkeln, 1 h bei 25°C) versetzt. Hierbei erfolgte die Spaltung der β-glucosidischen Bindung, wobei ABA aus dem Glucoseester freigesetzt wurde. Den Abbruch der Reaktion erreichte man durch Zugabe von konzentrierter HCl, wobei der pH wieder auf 3 absank. Erneut wurde dreimal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt, dann bis zur Trockne eingeeengt und in 300 µl Tris-Puffer aufgenommen. Diese Proben wurden ebenfalls in Eppendorfgeläße bis zur ELISA-Messung im Gefrierschrank gelagert.

Gewebeproben (2.5.1, 2.5.2, 2.7.2, 2.8.2) wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und 24 h mit 1ml 80% Methanol (v/v) bei -25°C extrahiert. Nach der Zentrifugation (4000 Upm, 10 min) konnte der überstehende Extrakt leicht entfernt werden. Das Zentrifugat wurde erneut für eine 24-stündige Nachextraktion mit 1ml Methanol überschichtet. Die später vereinigten methanolischen Überstände wurden mit C<sub>18</sub>-Kartuschen (SEP-PAK C<sub>18</sub>-Cartridges; Millipore Corp., Milford, USA) gereinigt, um sie von störenden phenolischen Substanzen und Pigmenten zu befreien. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde die verbliebene wässrige Phase mit HCl auf pH 3 angesäuert und erneut, wie oben beschrieben, gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Als nächstes erfolgte das Ausschütteln gegen äquivalente Mengen Ethylacetat. Wurzelexudate bzw. Xylemsäfte sowie apoplastische Waschflüssigkeit wurden nicht aufgereinigt, sondern direkt mit Tris-Puffer auf ein Mindestvolumen von 120 µl

(Einzelmessung) oder 230  $\mu\text{l}$  (Doppelmessung) eingestellt. Zur Bestimmung des ABA-GE-Gehaltes wurden die Proben geteilt, eine Hälfte direkt für den Test verwendet, die andere einer alkalischen Hydrolyse unterzogen.

### **2.3.2 ICP-AE-Spektroskopie**

Für die Bestimmung der Gesamtgehalte vieler Elemente in pflanzlichen Geweben eignet sich die Atomemissionsspektroskopie (AES) mit einem induktiv gekoppelten Plasma (ICP) als Anregungsquelle. Blatt- und Wurzelproben von salzgestressten Maispflanzen aber auch Kontrollpflanzen wurden nach entsprechender Vorbehandlung (Trocknen, Mahlen) einer  $\text{HNO}_3$ -Nassveraschung unterworfen. Die Veraschung erfolgte bei  $170^\circ\text{C}$  für 10 h, wobei ca. 100 mg Probenmaterial mit 1 ml suprareiner Salpetersäure (65%) in Quarzgläser gegeben wurde, die in Teflonbehältern eingepasst waren (Schramel et al. 1980). Auf diese Weise aufgeschlossene Proben konnten anschließend mit einem ICP-Spektrometer (Jobin Yvon 70, Software Version 3.34, Jobin Yvon Instruments S.A. GmbH, Grasbrunn, FRG, mit angeschlossenen automatischen Probenwechsler Gilson 222, IBM-PC und Drucker) gemessen werden, wobei die Elemente entweder simultan oder nacheinander bestimmt wurden. Die Angaben der Elementgehalte erfolgte im ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$  Trockengewicht).

In Xylemsäften von salzgestressten Maispflanzen sollte der Natriumgehalt gemessen werden. Die Xylemsaftproben wurden in 2.5 ml 6%iger  $\text{HNO}_3$  aufgenommen.

## **2.4 Untersuchung von Bodenproben**

### **2.4.1 Entnahme der Bodenproben**

Mit Hilfe eines Pürckhauer-Erdbohrstocks wurden Bodenproben aus der unmittelbaren Nähe des Wurzelwerks von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen entnommen. Die Standorte wurden so gewählt, dass ein Vergleich zwischen zwei Bodentypen hinsichtlich ihres ABA- bzw. ABA-GE-Gehaltes, ihrer Wasserkapazität und ihrer Boden-pH-Werte möglich war. Die Gesamttiefe der entnommenen Bodenproben betrug 50 cm. Abschnitte von 5-10 cm Länge wurden bis zur Aufarbeitung im Labor in Kunststoffgefäßen bei  $-25^\circ\text{C}$  gelagert.



### **2.4.2 Beschreibung der Standorte**

Würzburg und seine nähere Umgebung werden geographisch dem Gäuland und somit dem Süddeutschen Schichtstufenland zugeordnet. Das Fränkische Gäuland stellt eine Beckenlandschaft dar, deren Umrahmung aus dem Spessart, der Rhön und dem Steigerwald besteht. Die Untergrundgesteine dieser Landschaften bildeten einstmals horizontale Schichten von Buntsandstein, Muschelkalk und Keuper (Gesteine der Trias), die bereits in der Jurazeit herausgeschoben, schräggestellt und teilweise abgetragen wurden. Daher ist der Boden der Ackerflächen an der B19 in Richtung Giebelstadt nebst seinem Lössgehalt auch durch den im Untergrund liegenden Muschelkalk geprägt. An diesem Standort wurden Bodenproben von einem Sonnenblumen-, Mais- und Roggenfeld entnommen (Abb. 2-1 A-C). Weitere Proben von einem Kartoffel-, Weizen- und Sonnenblumenfeld wurden in unmittelbarer Nähe zur Ortschaft Gambach im Landkreis Main-Spessart gesammelt (Abb. 2-1 D-F). Die Erde dieser Ackerfläche wies durch ihre rötliche Farbe auf einen höheren Anteil an Buntsandstein hin. Im hinteren Steinbachtal von Würzburg beginnt ein geschotterter Waldweg (Göckersgraben), der durch einen Eichen-Buchen-Mischwald führt. Vereinzelte Fichtenbestände durchsetzen das Waldbild. Der Boden eines solchen Bestandes wurde ebenfalls untersucht.

### **2.4.3 Bestimmung des pH-Wertes im Bodenwasser**

Da die pH-Wertbestimmung in einer Aufschlammung des Boden mit reinem Wasser weniger gut reproduzierbar ist, wurde eine 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung verwendet. Zwar liegen die Messungen im allgemeinen um 0.6 pH-Einheiten tiefer als jene mit reinem Wasser, jedoch werden so die Verhältnisse im Boden besser wiedergegeben (Gisi, 1990). Daher wurden 2g Boden in einem Zentrifugenglas mit der 2.5-fachen Menge an  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt und die Aufschlammung nach 10 min abzentrifugiert. Der pH-Wert der überstehenden Lösung konnte mit einer Mikro-pH-Electrode ermittelt werden.

**Abb. 2-1** Standorte der Bodenprobenentnahmen: A-C sind Abbildungen von Ackerflächen an der Bundesstraße 19 in Richtung Giebelstadt, D-E zeigen landwirtschaftliche Nutzflächen bei der Ortschaft Gambach im Landkreis Main-Spessart. (A: Sonnenblumen-, B: Mais-, C: Roggen-, D: Sonnenblumen-, E: Kartoffel-, F: Weizenfeld).



#### 2.4.4 Wasserkapazität und Wassergehalt des Bodens

Die Bestimmung der maximalen Wasserkapazität erfolgte mit 5g frischer Bodenprobe, die über Nacht im Trockenschrank bei 105°C eintrocknete. Nachdem die Probe im Exsikkator abgekühlt war, konnte das Trockengewicht bestimmt werden. Zur Ermittlung des Nassgewichts wurde die getrocknete Bodenprobe in einen Trichter mit feuchtem Filterpapier gegeben und mit Wasser aufgeschlämmt. Böden mit einem hohen Tonanteil drainieren nur sehr langsam, deshalb wurden, um Verdunstung zu vermeiden, der Trichter sowie das Becherglas, in das der Trichter gestellt wurde, mit Parafilm abgedeckt. Jeweils nach 24 Stunden wurde die Probe gewogen, bis kein weiterer Gewichtsverlust zu verzeichnen war. Die Wasserkapazität errechnet sich mit der Formel:

$$\frac{(\text{Frischgewicht} - \text{Trockengewicht})}{\text{Trockengewicht}} \cdot 100 = \text{Wasserkapazität in \%}$$

Den Wassergehalt des Bodens in % der maximalen Wasserkapazität erhält man aus dem Verhältnis:

$$\frac{(\text{Frischgewicht} - \text{Trockengewicht})}{(\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht})} \cdot 100 = \text{Wassergehalt in der maximalen Wasserkapazität}$$

#### 2.4.5 Aufarbeitung der Bodenproben für den ELISA-ABA-Test

Vor der Extraktion der Bodenproben wurden alle erkennbaren Wurzelsegmente entfernt. Eine in 5 ml 0.01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgeschlämmte Bodenprobe extrahierte über Nacht bei 4°C. Der wässrige Überstand wurde abdekantiert, die Probe nochmals mit 3 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und anschließend zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit dem vorherigen Überstand vereinigt und, wie unter 2.3.1.3 beschrieben, weiterverarbeitet. Da besonders der ABA-GE-Gehalt der Bodenproben von Interesse war, musste nach dem Ausschütteln der freien ABA eine alkalische Hydrolyse mit der wässrigen Phase durchgeführt werden.

### 2.5 Untersuchungen zum Trocken- und Salzstress bei Maispflanzen

#### 2.5.1 Austrocknungsexperiment

Intakte 11 Tage alte Maispflanzen, die je 7 Tage sowohl aeroponisch als auch hydroponisch angezogen waren, wurden in einen Klimaschrank (21°C, 30% Belüftung) zur Austrocknung

gehängt. Kontrollpflanzen wurden sofort geerntet, d.h. das Frischgewicht bestimmt und Wurzeln sowie Blätter separat tiefgefroren. Mit den für die Austrocknung bestimmten Pflanzen wurde nach bestimmten Zeitpunkten (30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h) genauso verfahren. Einige Pflanzen beider Kulturmethode wurden nach der 5 h anhaltenden Austrocknung wiederbewässert und nach weiteren 21 h geerntet. In den gefrorenen Gewebeproben konnte nach ihrer Aufarbeitung (2.3.1.3) der ABA-GE-Gehalt mittels ELISA bestimmt werden.

### **2.5.2 Einfluss von Salzstress auf das Maiswachstum**

Um die Salztoleranz der Maissorte Helix zu testen, wurden Maiskaryopsen in Quarzsandkultur unter verschiedenen Salzstressbedingungen 22 Tage im Gewächshaus kultiviert. Kontrollpflanzen wurden mit normaler P&S-Nährlösung gegossen. Salzstress wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen appliziert (P&S plus 50 mM NaCl und P&S plus 100 mM NaCl). Nach 8 Tagen wurde täglich der Sprosszuwachs gemessen und nach weiteren 14 Tagen fand die Pflanzenernte statt. Die vom Sand befreiten Wurzeln wurden nach dem Bestimmen ihres Gewichts und ihrer Gesamtlänge sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Beim Spross wurden die Etagen der Blätter abgezählt, die Blätter der Länge nach geteilt, eine Hälfte bis zur Gewichtskonstanz eingetrocknet und die andere Hälfte schockgefroren. Trockene Blattproben wurden einer ICP-Bestimmung (2.3.2) zugeführt, die schockgefrorenen Gewebeproben auf ihren ABA bzw. ABA-GE-Gehalt getestet (2.3.1.3).

## **2.6 Wasser- und Stoffflüsse durch Wurzelsysteme**

### **2.6.1 Theorie**

Wurzeln erfüllen neben der Verankerung der Pflanze die lebenswichtige Aufgabe der Wasser- und Nährstoffaufnahme, deren Selektion und anschließende Weiterleitung zu oberirdischen Pflanzenorganen. Hierbei spielen Wasser- und Stoffflüsse durch Zellmembranen und ganze Gewebe eine wichtige Rolle. Die treibende Kraft dieser Flüsse entsteht durch Druck- und Konzentrationsgradienten oder durch die Beteiligung aktiver Transportprozesse. Mit dem Wasserfluss werden im Wasser gelöste Nährstoffe zwangsweise durch den Massenfluss mitgerissen („solvent-drag“); umgekehrt kann aktiver Nährstofftransport einen Wasserfluss

nach sich ziehen. Folgende Flussgleichungen beschreiben zum einen den Wasserfluss über eine Barriere ( $J_{Vr}$ ), zum anderen den Teilchenfluss ( $J_s$ ) (Steudle und Tyerman 1983, Steudle 1993):

$$J_{Vr} = -\frac{dV}{Adt} = L_p(P - \sigma_s \Delta\pi) = L_p P - L_p \sigma_s RT(c_i^s - c_a^s) \quad (\text{Gleichung 1})$$

= hydraulischer – osmotischer Fluss

$$J_s = -\frac{dn_s}{Adt} = P_s(c_i^s - c_a^s) + (1 - \sigma_s)c_s J_V + J_s^* \quad (\text{Gleichung 2})$$

= Diffusionsfluss + solvent drag + aktive Komponente

Die Parameter:

$J_{Vr}$	$[m^3 m^{-2} s^{-1}]$	radialer Volumenfluss $\equiv$ Wasserfluss
$A$	$[m^2]$	Oberfläche des Kompartiments
$V$	$[m^3]$	Volumen des Kompartiments
$t$	$[s]$	Zeit
$L_p$	$[m s^{-1} MPa^{-1}]$	hydraulische Leitfähigkeit einer Barriere
$P$	$[MPa]$	hydrostatische Druckdifferenz = ( $P_{\text{innen}} - P_{\text{außen}}$ )
$\sigma_s$	$[1]$	Reflexionskoeffizient der Barriere ,s'
$R$	$[J mol^{-1} K^{-1}]$	allgemeine Gaskonstante
$T$	$[K]$	absolute Temperatur
$J_s$	$[mol m^{-2} s^{-1}]$	Teilchenfluss
$n_s$	$[mol]$	Stoffmenge des gelösten Stoffes ,s'
$P_s$	$[m s^{-1}]$	Permeabilitätskoeffizient der Barriere für ,s'
$c_{i,a}^s$	$[mol m^{-3}]$	Konzentration des Stoffes ,s' innen (Xylem) bzw. außen (Medium)
$c_s$	$[mol m^{-3}]$	Konzentration des Stoffes in der Barriere

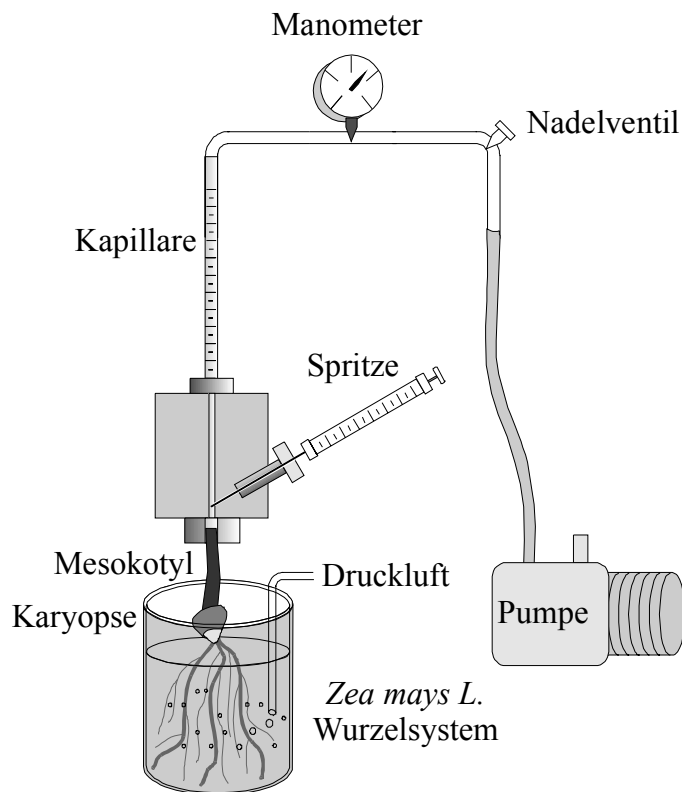
Den Volumenfluss bzw. Wasserfluss über Barrieren, z.B. Zellmembranen oder durch Zellwandstrukturen wie im Falle der Exo- oder Endodermis in der Wurzel, beschreibt Gleichung 1. Konventionsgemäß haben Flüsse aus Kompartimenten ein positives Vorzeichen. Den Volumenfluss erhält man nach Abzug der hydraulischen Druckkomponente vom osmotischen Fluss. Der Teilchenfluss (Gleichung 2) beinhaltet drei Komponenten, wobei der erste Term auf der rechten Seite den Diffusionsfluss (Fick'sches Diffusionsgesetz) darstellt.

Die Kopplung von Wasser- und Teilchenfluss wird auch „solvent drag“ genannt und beschreibt den zweiten Term. Ein dritter Beitrag zum Teilchenfluss hat seine Ursache in aktiven Transportvorgängen der Teilchen ‚s‘. Stoffe können auf diese Weise auch gegen einen Konzentrationsgradienten durch eine Barriere, z.B. mittels Carrier, transportiert werden.

### 2.6.2 Saugapparatur

Um Wasser- und Stofftransporte durch Wurzeln zu studieren, konnte durch die Erzeugung eines künstlichen Unterdrucks ein Transpirationssog durch ein dekapitiertes Wurzelsystem simuliert werden. Mit Hilfe einer Saugapparatur wurden Xylemsäfte von verschiedenen Pflanzen gewonnen und analysiert (Abb. 2-3).

Ein am Mesokotyl dekapitiertes Maiswurzelsystem wurde mit diesem Sprossabschnitt mittels einer Silicondichtung (Blend-a-scon; Blend-a-med Forschung, Schwalbach, FRG) und einer Schraube druckdicht an eine Kapillare in einem Plexiglasblock befestigt. Das Wurzelsystem befand sich während der gesamten Versuchsdauer in einem Becherglas mit definiertem Nährmedium. Um anaerobe Bedingungen zu vermeiden, wurde das Medium ständig vorsichtig durchlüftet. Mit Hilfe einer Membranpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, FRG) konnte in der Kapillare ein Unterdruck bis zu -0.1 MPa erzeugt werden. Durch ein Nadelventil und ein Manometer ließ sich dieser subatmosphärische Druck fein regeln. Da das dekapitierte Wurzelsystem in direktem Kontakt mit der Kapillare stand, setzte sich eine Sogwirkung bis in das Wurzelsystem fort. Auf diese Weise konnte ein Transpirationssog, vergleichbar dem unter natürlichen Bedingungen, simuliert werden, wobei Wasser durch die Wurzel in die Kapillare fließen konnte. So gewonnener Xylemsaft wurde mit einer 100 µl Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) nach bestimmten Zeitabschnitten geerntet, sofort gewogen und später auf seinen ABA- bzw. ABA-GE-Gehalt untersucht (2.1.1.3). Nur diejenigen Xylemsaftproben wurden in die Auswertung aufgenommen, die von einem konstanten Wasserfluss durch das Wurzelsystem stammten. Dies war nach 20 bis 30 min der Fall. Der Wasserfluss wurde aus dem Gewicht der Xylemsaftfraktion, dem Zeitintervall und der Wurzeloberfläche ermittelt (Gl. 1). Der Abscisinsäurefluss errechnete sich aus der transportierten ABA-Menge pro Zeiteinheit und Wurzeloberfläche (Gl. 2)



**Abb. 2-2** Schematische Darstellung einer Saugapparatur zur Gewinnung von Xylemsaft aus dekapitierten Maiswurzelsystemen.

### 2.6.3 Radialer Transport von ABA-GE und ABA

Für diesen Versuch mussten Maiskeimlinge aus der Luftkultur vorsichtig in 100 ml P&S-Nährlösung enthaltende Hydrokulturtöpfe umgesetzt werden. Kurz über dem Mesokotyl wurden die Sprosse abgetrennt und das verbliebene Mesokotyl an die oben beschriebene Saugapparatur befestigt. Die Wurzeln der aeroponischen sowie hydroponischen Kultur wurden während der gesamten Versuchsdauer (220 min) mit Druckluft umspült. Mit Hilfe des Manometers konnte der auf das abgeschnittene Wurzelsystem angelegte Unterdruck auf -0.045 MPa reguliert werden. Nach 20 min erreichte der Wasserfluss durch das Wurzelsystem einen konstanten Wert. Nun konnte der Xylemsaft in einem 20-minütigen Intervall gesammelt und gewogen werden. Eine Zugabe von 100 nM ABA-GE (Apex Organics, Honiton, UK) ins Außenmedium erfolgte 80 min nach Versuchsbeginn. Die Xylemsäfte wurden anschließend für die ABA- sowie ABA-GE-Bestimmung mit Tris-Puffer verdünnt und tiefgefroren.

Von salzgestressten und in Hydrokultur angezogenen Maispflanzen wurde ebenfalls der Xylemsaft gewonnen. Ein Vorversuch zeigte, dass die Wurzeln während des Experiments ein salzfreies Medium benötigten, da sonst die Xylemsaftausbeute zu gering war. Bei einigen

Pflanzen wurde vor Beginn des Experiments die Hauptwurzel entfernt. Dadurch war ein höherer Wassereinstrom in das Xylem der Wurzeln zu erwarten. Da aus der ICP-Bestimmung der Na-Gehalt im Xylemsaft von salzgestressten Maispflanzen im Durchschnitt 10 mM betrug, wurde in einem weiteren Versuch auch das Außenmedium mit 10 mM NaCl angereichert.

#### **2.6.4 Die spezifische Wirkung verschiedener ABA-Analoga auf $J_{Vr}$**

Um eine detailliertere Beschreibung der strukturellen Wirksamkeit der Abscisinsäure auf den radialen Wasserfluss ( $J_{Vr}$ ) durch Pflanzenwurzeln zu erhalten, wurden (+)- und (-)-ABA sowie neun ABA-Metabolite, -Vorstufen und am 8'-C-Atom modifizierte ABA-Derivate getestet (3.2.3, Tab 3-8). Als Pflanzenmaterial wurden 12 Tage alte hydroponische Maiswurzelsysteme verwendet. Die Pflanzen wurden mit dem Mesokotyl druckdicht an eine Saugapparatur fixiert (2.6.2). Die Wurzeln befanden sich während der gesamten Versuchsdauer in durchlüfteten und abgedunkelten 500 ml Bechergläsern. Bei einem Unterdruck von -0.06 MPa wurde der steady-state Wasserfluss für 1 h in 10-minütigen Abständen bestimmt und die entnommenen Xylemsaftproben für spätere ELISA-Messungen tiefgefroren. Anschließend wurde jeweils ein in Tabelle 3-8 aufgeführtes ABA-Analogon in einer Endkonzentration von 100 nM zur Nährlösung gegeben. In 10 min-Intervallen wurde der Xylemsaft so lange gesammelt, bis  $J_{Vr}$  wieder einen konstanten Wert annahm. Die Xylemsaftproben der Analoga, die den radialen Wasserfluss veränderten, wurden ebenfalls einer späteren ELISA-Bestimmung zugeführt.

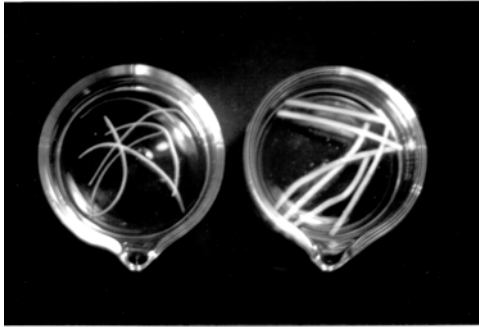
## **2.7 Effluxexperimente mit Maiswurzelsegmenten**

### **2.7.1 Präparation der Wurzelstücke**

Nach sieben Tagen besaßen die auf Zellstoff angezogenen Zea mays-Keimlinge eine Primärwurzellänge von 5-7 cm. Etwa 0.5 cm unter der Austrittsstelle der Wurzel aus dem Maiskorn wurde die Wurzel abgeschnitten und von dieser Stelle an abwärts das Wurzelrindengewebe vom Zentralzylinder durch Herausziehen des Zentralzylinders getrennt. Von der Wurzelrinde sowie vom Zentralzylinder wurden auf Höhe der Wurzelhaarzone 3 cm



lange Segmente abgeschnitten, die Wurzelspitze jeweils verworfen. Das Wurzelrindensegment wurde nochmals der Länge nach halbiert. Sechs auf diese Weise präparierte Wurzeln wurden pro Versuchsansatz verwendet.



**Abb. 2-3** Wurzelsegmente in Kristallisationschalen: In der linken Schale befinden sich Wurzelstelen, rechts Wurzelrindenparenchymzylinder.

### 2.7.2 Versuchsdurchführung

Die Segmente des Zentralzylinders und der Wurzelrinde wurden getrennt in 3 ml Waschpuffer (WP, Zusammensetzung siehe Tab. 2-2) enthaltene Kristallisationschalen überführt (Abb. 2-2). Um Zytoplasma und weiteres zerstörtes Pflanzenmaterial gründlich zu entfernen, wurde dreimal in 10-minütigem Abstand der Waschpuffer erneuert, dann mit 3 ml Versuchsmedium (VM, Zusammensetzung siehe Tab. 2-3) gespült. Dem Versuchsmedium wurde nun ABA, Tetcyclacis und NaCl in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen zugesetzt und 3 ml zu den jeweiligen Wurzelsegmenten pipettiert. Die Kristallisationschalen wurden mit Parafilm als Verdunstungsschutz abgedeckt und für 24 h im Klimaschrank bei 21°C im Dunkeln aufbewahrt.

**Tab. 2-2** Zusammensetzung des Waschpuffers (WP)

BSA	0,2% (w/v)
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
KCl	3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM
MES	25 mM
PVP 40	0,2% (w/v)

Der pH-Wert wurde mit 6N KOH auf 6.0 eingestellt. An jedem Versuchstag wird dem WP frisch Ascorbinsäure und Cystein in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt.

**Tab. 2-3** Zusammensetzung des Versuchsmediums (VM)

CaCl <sub>2</sub>	2 mM
KCl	6 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 mM
KNO <sub>3</sub>	1,5 mM
MES	25 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
Glucose	1 mM
Penicillin G	100 U/ml

Der pH-Wert wurde mit 6N KOH auf 6.0 eingestellt. Glucose wurde erst vor Versuchsbeginn dem Medium zugesetzt.

Nach dem Inkubieren im Klimaschrank wurde das ABA-enthaltende VM gegen ABA-freies VM ausgetauscht, wobei die Zusammensetzung des jeweiligen Versuchsansatzes berücksichtigt werden musste. Zunächst wurde dreimal mit je 3 ml ABA-freiem VM gespült, dann erneut 3 ml freies Medium hinzugefügt. Die mit Parafilm abgedeckte Schale wurde erneut über einen definierten Zeitabschnitt im Dunkeln bei 21°C aufbewahrt. Nach einer Dauer von 10, 20, 30, 50, 70, 90 und 120 Minuten wurden die Versuchsmedien jeweils in ein Reagenzglas überführt. Um an den Wurzeln haftende ABA oder ABA-GE nicht als Verlust verbuchen zu müssen, wurde jeweils mit 1 ml freiem Medium gespült und dieses ebenfalls gesammelt. Somit erhielt man pro Ansatz 4 ml Inkubationsmedium, das für einen ELISA-ABA-Test aufgearbeitet wurde. Neben der freien ABA sollte auch der Gehalt an gebundener ABA ermittelt werden. Ebenso wurden die getrennten Gewebesegmente auf ihren jeweiligen Gehalt an gebundener und freier ABA untersucht. Die dazu nötigen Aufarbeitungsschritte sind unter Punkt 2.3.1.3 zusammengefasst.

## 2.8 Wasser- und Stoff-Flüsse durch Sprossabschnitte

### 2.8.1 Bestimmung der inneren Oberfläche von Xylemgefäßen

Handquerschnitte von 20 Maismesokotylen und ersten Bohneninternodien wurden mit Toluidinblau gefärbt (2.2.3) und unter einem Lichtmikroskop vermessen. Mit Hilfe eines skalierten Okulars konnten alle Xylemgefäße, die einen Durchmesser größer als 6.3 µm besaßen, ausgezählt sowie der innere Durchmesser bestimmt werden. Um die innere Oberfläche einer Xylemkapillare zu berechnen, wurde eine zylindrische Form angenommen, wobei ihre Länge der des Mesokotyl bzw. Internodiums entsprach.

### 2.8.2 Bestimmung der Wasserflüsse durch Xylemgefäße

Mit Hilfe des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes kann annähernd der Wasserflusses ( $J_V$ ) durch Xylemgefäße in Sprossen beschrieben werden (Nobel 1991, Lambers et al. 1998):

$$J_V = \frac{\Delta V}{\Delta t} = - \left( \frac{\pi R^4}{8\eta l} \right) \Delta p \quad (\text{Gleichung 3})$$

Der Wasserfluss ist hierbei proportional zum Volumenanteil  $\Delta V$  pro Zeitintervall  $\Delta t$ . Dies wiederum entspricht der hydrostatischen Druckdifferenz ( $\Delta p$ ), dem Radius ( $R$ ) der Xylemkapillare in der vierten Potenz geteilt durch die Länge der Kapillare und der Viskosität der Flüssigkeit (für Wasser bei 20°C gilt  $\eta = 1,00 \text{ mPa s}^{-1}$ ). Geht man davon aus, dass die gesamte Innenfläche aller Xylemkapillaren zweier verschiedener Sprosse gleich ist, dann ist laut Gleichung 3 der Wasserfluss im Spross mit wenigen aber großen Xylemgefäßen wesentlich höher als bei einem Spross mit vielen kleinen Gefäßen.

### 2.8.3 Saugtechnik

Die verschiedenen Sprossabschnitte (Mesokotyl bzw. erstes Bohneninternodium) wurden mit einer Schnittfläche an der Saugapparatur (2.6.2) fixiert, die andere war in unbelüftete Anzuchtnährlösung getaucht. Beim Maismesokotyl konnte durch einen geringeren Unterdruck (-0.005 MPa) annähernd das gleiche Xylemsaftvolumen gewonnen werden wie beim ersten Bohneninternodium, das mit -0.02 MPa gesaugt wurde. Nach Erreichen des steady-state-Wasserflusses wurde der Xylemsaft für eine Stunde in Intervallen von 10 min gesammelt. Anschließend wurde das Außenmedium je nach Versuchsansatz:

- A) Kontrolle: die Nährlösung wurde nicht ausgetauscht
- B) 100 nM ABA, pH 5.8
- C) 100 nM ABA-GE, pH 5.8
- D) 100 nM ABA, 100 mM NaCl, pH 5.8
- E) 100 nM ABA,  $10^{-5}$  M tetracyclis, pH 5.8
- F) 100 nM ABA, pH 7.0 (10 mM MOPS/KOH-Puffer)
- G) 100 nM ABA,  $p = -0.02$  (nur Mesokotyl)
- H) 100 nM ABA,  $p = -0.04$  (nur Internodium)

durch eine veränderte P&S-Nährlösung ausgetauscht und für weitere 80 min durch den Sprossabschnitt gesaugt. Bei Versuchsansatz G) und H) wurde zusätzlich der Unterdruck erhöht. Die Xylemsäfte sowie die Gewebe wurden auf ihren ABA- bzw ABA-GE-Gehalt untersucht (2.3.1.3).

## 2.9 Hydrolyse von ABA-Glucoseester durch apoplastische Waschflüssigkeit aus Maiswurzeln

### 2.9.1 Gewinnung apoplastischer Waschflüssigkeit

Abgetrennte Wurzeln von in Hydrokultur angezogenen 11 Tage alten Maiskeimlingen wurden in Gaze (Maschenweite 0.7 mm) gewickelt, in ein Becherglas 1mM CaCl<sub>2</sub> überschichtet und in einen Exsikkator 20 min im Vakuum infiltriert. Die entgasten Interzellularen waren nun flüssigkeitsgefüllt. Die infiltrierten Wurzeln wurden gründlich mit Zellstoff getrocknet, locker in perforierte Plastikzentrifugeneinsätze (Zentrifugengläser mit Siebeinsatz) gegeben, um danach für 30 Minuten bei 2000 Upm und 4°C zu zentrifugieren. Durch die Zentrifugation kam es zur Entleerung der Interzellularen. Die so gewonnene apoplastische Waschflüssigkeit (intercellular washing fluid, IWF) sammelte sich unterhalb der Siebeinsätze und konnte hier entnommen werden.

### 2.9.2 Bestimmung der Enzymaktivität der $\beta$ -D-Glucosidase

$\beta$ -Glucosidasen sind Enzyme, die stereoselektiv  $\beta$ -verknüpfte Glucoside hydrolytisch spalten. Ihre Lokalisation in pflanzlichen Geweben kann sowohl intra- als auch extrazellulär sein. Als Standardnachweisagens diente das Substrat p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (p-NPG; Sigma, Deisenhofen, FRG). Die Aktivität der  $\beta$ -D-Glucosidase wird über die Freisetzung von p-Nitrophenol aus dem Substrat gemessen. Verwendete Lösungen:

Substratlösung	200 mg p-NPG in 1 ml Dimethylformamid
Reaktionslösung	1ml Substratlösung in 39 ml Citratpuffer (100 mM, pH 4.6)
Stopplösung	200 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Es wurden 10  $\mu$ l IWF verwendet, diese auf 400  $\mu$ l Reaktionsvolumen mit Reaktionslösung aufgefüllt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf Eis abgestoppt. Diese Alkalisierung inaktivierte das Enzym, und durch Deprotonierung des freigesetzten p-Nitrophenols entstand ein gelber Farbumschlag. Die Enzymaktivität konnte durch die Absorption der Lösung bei 405 nm fotometrisch bestimmt werden. Die Umrechnung der Extinktionsänderung in eine Substratumsatzrate erfolgte über den molaren Extinktionskoeffizienten für p-Nitrophenol:

$$\varepsilon_{p\text{-Nitrophenol}(405\text{nm})} = 18300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (\text{Del Campillo \& Shannon 1982})$$

### **2.9.3 Hemmung der $\beta$ -D-Glucosidase durch ABA-Glucoseester**

Die Beeinflussung der p-NPG-umsetzenden Aktivität der  $\beta$ -D-Glucosidase durch ABA-GE wurde durch eine kompetitive Hemmungsreaktion bestimmt, wobei die p-NPG-Konzentration (0.66 mM) während des Versuchs konstant gehalten, die ABA-GE-Konzentration hingegen verändert (0 - 5 mM) wurde. Für einen Reaktionsansatz wurden jeweils 370  $\mu$ l Reaktionslösung, 10  $\mu$ l IWF und ABA-GE (ABA-GE Stammlösung 0.1M: 0, 4, 8, 12, 16, 20  $\mu$ l) in 1.5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und mit 100 mM Citratpuffer, pH 4.6 auf ein Endvolumen von 400  $\mu$ l aufgefüllt. Die weitere Durchführung des Enzymtests erfolgte in Anlehnung an 2.8.2.

## **2.10 Hydrolyse von ABA-Glucoseester mittels IWF aus Gerstenblättern**

### **2.10.1 Gewinnung apoplastischer Waschflüssigkeit**

Für diesen Versuch wurden Gerstenkeimlinge (*Hordeum vulgare*, L. cv. Gerbel) einer zwischen 1982 und 1988 in der Europäischen Gemeinschaft zugelassenen Wintergerstenart verwendet. Die 10-tägige Anzucht der Samen im Gewächshaus geschah in mit Erde gefüllten Tontöpfen. Nur die Primärblätter der Gerstenkeimlinge mit einer Länge von 6 - 7 cm wurden zur Gewinnung der apoplastischen Waschflüssigkeit verwendet. Die Gewinnung erfolgte in der gleichen Weise wie schon bei den Maiswurzeln beschrieben (2.9.1). Der IWF wurde unmittelbar nach seiner Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.10.2 ABA- und ABA-GE-Gehalte in Xylem und IWF von Gerste**

Da unter Stressbedingungen neben der freien ABA auch ABA-GE in größeren Mengen im Xylem des Sprosses zu den Blättern transportiert wird (Bano et al. 1993, 1994), sollte in diesem Versuch der Gehalt beider Substanzen im Xylem mit dem im Blattapoplasten verglichen werden.

Für die Xylemsaftgewinnung wurde eine Anzucht der Gerstenkeimlinge in Hydrokultur durchgeführt. Salzstressbedingungen wurden durch Zusatz von 50 oder 100 mM NaCl im P&S-Nährmedium eingestellt. Im Alter von 11 Tagen wurden die Keimlinge mit ihrem dekapitierten Wurzelsystem in eine Saugapparatur eingespannt. Die einstündige Xylemsaftgewinnung erfolgte wie unter 2.8.2 dargestellt. Zur Apoplastensaftgewinnung

wurden Gerstenkaryopsen in Erdkultur für 10 Tage angezogen. Salz wurde in den oben genannten Konzentrationen dem Gießwasser zugefügt.

Gerste der Sorte Gerbel zeigte eine gute Salztoleranz, denn selbst eine Behandlung mit 100 mM NaCl rief keine gravierenden Wachstumshemmungen hervor.

### **2.10.3 Hydrolyse von ABA-GE durch apoplastische Enzyme**

IWF wurde zeitabhängig (0, 60, 240 min) mit ABA-GE bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Endkonzentration des Glucoseesters von  $10^{-6}$  M zu erhalten, wurden pro 100  $\mu$ l IWF 10  $\mu$ l ABA-GE ( $10^{-5}$  M) pipettiert. Die Inkubation wurde zunächst durch Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser gestoppt. Es folgte ein Ansäuern mit 0.1 N HCl auf pH 3.0 und anschließend dreimaliges Ausschütteln mit Ethylacetat. Die Ethylacetatphasen wurden für eine ABA-Bestimmung weiter verarbeitet (2.3.1.3).

Die Abhängigkeit der Hydrolyserate von der ABA-GE-Konzentration wurde ebenfalls getestet. Auf 100  $\mu$ l Apoplastensaft wurden ABA-GE in den Konzentrationen  $10^{-4}$  bis  $10^{-10}$  M pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Abbruch der Reaktion sowie die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte wie oben beschrieben.

Bei beiden Experimenten wurde der endogene ABA-Gehalt des Apoplastensaftes durch Kontrollansätze ohne Zugabe von ABA-GE ermittelt und später von den gemessenen Probenwerten subtrahiert.

### **2.10.4 Proteinbestimmung in Blattrohextrakt und IWF**

Der Proteingehalt wurde mit dem Bio-Rad Proteintest (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, FRG) bestimmt. Er beruht auf einer Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an basische und aromatische Aminosäuren, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Für den Mikroansatz wurden zu 200  $\mu$ l Biorad-Reagenz 10  $\mu$ l IWF oder 1  $\mu$ l Rohextrakt pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 21° C konnte die Absorption bei 595 nm am Spektralfotometer (Uvicon 830; Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn, FRG) abgelesen werden. Gleichzeitig erfolgte eine Standardisierung des Nachweises mit Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) in einer Konzentration zwischen 1 und 100  $\mu$ g pro Ansatz (Probenvolumen maximal 800  $\mu$ l). Mit

Hilfe dieser Standards wurde eine Eichgerade erstellt und aus dieser die Proteinkonzentration der Proben abgeleitet.

## **2.11 Charakterisierung der apoplastischen $\beta$ -D-Glucosidase**

### **2.11.1 pH-Profil der Enzymaktivität**

Um die pH-Abhängigkeit des Aktivitätsmaximums der  $\beta$ -D-Glucosidase zu ermitteln, wurden Kaliumphosphat-Pufferlösungen (250 mM) mit unterschiedlichen pH-Werten (3.5, 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0) benötigt. Je pH-Wert-Ansatz wurden 378  $\mu$ l Phosphatpuffer des entsprechenden pH-Werts mit 12  $\mu$ l IWF und 10  $\mu$ l Substratlösung in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß versetzt. Die für 1 h bei 37°C stattfindende Enzymreaktion wurde mit 1 ml Natriumcarbonat-Lösung (200 mM) auf Eis abgestoppt. Anschließend wurde der Substratumsatz fotometrisch bei 405 nm bestimmt.

### **2.11.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration**

Die Auftrennung der Proteine im Gersten-IWF erfolgte über eine Superose 12 HR 10/30 Gelfiltrationsäule (Pharmacia). Die verwendete „Fast Protein Liquid Chromatography,, (FPLC)-Anlage der Firma Pharmacia bestand aus folgenden Elementen: Pump P - 500, Single Path Monitor UV - 1 mit Control Unit und Optical Unit sowie Fraction Collector FRAC - 100.

Nachdem die Säule mit 30 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/Acetat-Puffer pH 7) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min äquilibriert war, wurde 0.5 ml reiner IWF geladen. Das Sammeln der in 30-sekündigem Abstand eluierten Fraktionen (0.25 ml) begann 15 min nach Probeninjektion. Um die Fraktion mit dem größten Gehalt an extrazellulärer Glucosidase zu bestimmen, wurde der unter 2.9.2 beschriebene Enzymtest verwendet. Da bei der Gelfiltrationsmethode eine Verdünnung um den Faktor 3 (Rehm 1996) auftritt, wurde das eingesetzte Probenvolumen auf 50  $\mu$ l erhöht.

Eine Eichung der Säule erfolgte mit den Standardproteinen: Myoglobin 17 kDa, Chymotrypsinogen 25 kDa, Albumin 47 kDa, Katalase 232 kDa, Ferritin 440 kDa, Thyroglobulin 670 kDa. Das Auftragen der logarithmierten molekularen Massen der Eichproteine gegen das durch drei FPLC-Läufe ermittelte Elutionsvolumen ergab eine

Eichgerade. Aus der resultierenden Geradengleichung konnte das Molekulargewicht der apoplastischen  $\beta$ -D-Glucosidase bestimmt werden. Zugrundegelegt wurde dabei das Elutionsvolumen bzw. diejenige Fraktionsnummer, in der die höchste  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität nachgewiesen werden konnte.

### 2.11.3 Isoelektrischer Punkt der $\beta$ -D-Glucosidase

Bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) erfolgt eine Trennung amphoterer Substanzen (Peptide, Proteine) im elektrischen Feld aufgrund ihrer verschiedenen isoelektrischen Punkte (pI-Werte). Zunächst wird zwischen zwei Elektroden ein stabiler pH-Gradient aufgebaut, wozu ein Gemisch aus niedermolekularen Trägerampholyten mit unterschiedlichen pI-Werten verwendet wird. Der pH-Gradient weist an der Anode sein saures Ende und an der Kathode sein alkalisches Ende auf. Wird ein Protein diesem System zugesetzt, wandert es im elektrischen Feld zu der Stelle im pH-Gradienten, an der seine Nettoladung Null ist. Somit konzentriert dieses Verfahren das Protein an seinem isoelektrischen Punkt, weshalb dieser Vorgang auch namensgebend für diese Methode ist. Unterschiede der pI-Werte von 0.01 pH-Einheiten reichen bereits zur Trennung aus (Kleber 1997).

Die früher üblichen Röhrengelge mit löslichen Ampholyten werden heute häufig durch das Immobiline-System (Pharmacia) ersetzt. Dieses System weist eine höhere Stabilität der pH-Gradienten auf, was durch eine in der Polyacrylamidmatrix (4%) kovalente Fixierung der Gradienten gewährleistet ist. Die „Immobiline Dry Strips“ (pH 3-10, Länge 18 cm; Pharmacia, Freiburg, FRG), bestehend aus einem Polyesterfilm und aufgebrachteter Polyacrylamidmatrix, sind zudem leichter in ihrer Handhabung als Röhrengelge. Diese weisen eine wesentlich höhere Fragilität bei der Beladung mit solubilisierten Proteinproben auf.

In der Regel werden Proteine aus pflanzlichen Geweben oder Säften vor einer Fokussierung mit wässrigem Phenol extrahiert sowie ethanolisch gefällt und somit aufkonzentriert. Dieser Vorgang wirkt denaturierend auf Proteine, was im Falle des IWF vermieden werden sollte, da sonst die Detektion der  $\beta$ -D-Glucosidase nicht mehr möglich ist. Aus diesem Grund wurde ebenfalls auf Harnstoffzusatz im Lyse- sowie Rehydrierungspuffer verzichtet.

Lysepuffer	14%	5.6 g CHAPS
	210 mM	1.358 g Tris
	40 ml	H <sub>2</sub> O (ultrapur)



Rehydrierungspuffer 14%    3.5 g CHAPS  
Spuren von Bromphenolblau  
25 ml H<sub>2</sub>O (ultrapur)

Zu 300 µl frisch gewonnenen IWF wurde 28 µl Lysepuffer, 20 µl Rehydrierungspuffer sowie 7 µl DTT (1M) und 1,75 „IPG-Buffer“ (Pharmacia) pipettiert. Die Probenapplikation auf den trockenen Immobilin-Strips erfolgte in Keramikschißchen, nachdem die Schutzfolie von den Strips entfernt und sie mit der Acrylamidschicht nach unten hineingelegt wurden. Die ca. 20 h währende Fokussierung erfolgte über Nacht bei 16°C im IPGphor (Pharmacia) nach einem automatisierten Protokoll:

12 h	Rehydrierung
1 h	500 V
1 h	1000 V
5 h 15'	8000 V

Die Vollständigkeit des Laufes war daran zu erkennen, dass sich das Bromphenolblau aus dem Gelstrip an der Anode konzentrierte. Sofort im Anschluss an die Fokussierung wurden die 18 cm langen Gelstrips in 0.5 cm Abschnitte geteilt und jeweils in 400 µl Reaktionslösung (2.9.2) für 1h bei 37°C eluiert. Nach Abstoppen der Reaktion auf Eis wurde die Enzymaktivität des Überstands bei 405 nm fotometrisch bestimmt. Jeder Abschnitt repräsentierte einen Teil des pH-Gradienten. Dem im Enzymtest einem fotometrisch ermittelten Aktivitätsmaximum konnte somit ein bestimmter pH-Wert, respektive pI-Wert, zugeordnet werden.

## 2.12 Vorversuche zur Reinigung der $\beta$ -D-Glucosidase

### 2.12.1 Einfluss von Lösungsmitteln und anderen Substanzen auf die Stabilität der $\beta$ -D-Glucosidase

Jedes Enzym besteht aus einer Polypeptidkette mit einer spezifischen Aminosäuresequenz, die zu einem kompakten dreidimensionalen Proteinmolekül gefaltet ist. Die Stabilität dieser dreidimensionalen Struktur kann durch Lösungsmittel und Salze beeinflusst werden. Einige Salze und Lösungsmittel fördern die Stabilität eines Enzyms, andere denaturieren dieses und wieder andere eignen sich besser, um Proteine von Chromatographiesäulen zu eluieren. Dieses Kenntnis ist wichtig bei der Entwicklung eines effizienten Reinigungsschemas für ein bestimmtes Enzym. Daher wurden die in Tabelle 2-4 aufgeführten Substanzen bezüglich ihrer

stabilisierenden Wirkung auf die apoplastische  $\beta$ -D-Glucosidase getestet. Als Standard-Enzymtest wurde der unter 2.9.2 beschriebene Enzymaktivitätstest verwendet.

**Tab. 2-4** Auflistung aller getesteten Substanzen bezüglich ihres stabilisierenden Einflusses auf die apoplastische  $\beta$ -D-Glucosidase.

Substanzen	Konzentration	Vorinkubation
Glucose	100, 200, 250 mM 50, 100 mM	- 30 min bei 37°C
Puffer:	Acetat: 0.2 M, Citrat/Phosphat: 0.1/0.2 M Succinat: 0.2 M, pH 3.8, 4.8, 5.8 Natriumacetat: 0.2 M, pH 5.4; Citrat- Phosphat: 0.1/0.2 M, pH 5.4; Kalium- phosphat 0.2 M, pH 5.4; Succinat: 0.2 M, pH 5.4; Citrat: 0.2 M, pH 4.6	- -
Einwertige Alkohole	Methanol: 1%, 2% Ethanol: 1%, 2%	30 min bei 37°C
Zweiwertige Kationen	MgCl <sub>2</sub> , CdCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CuAcetat: 0.5 mM	30 min bei 21°C
Anionen	KCl, KNO <sub>3</sub> , K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 50 mM KCl, KNO <sub>3</sub> , K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 100 mM CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> : 100 mM	1 h bei 21°C 1 h bei 37°C 1 h bei 37°C
NaCl	10, 20, 30, 40, 50, 100 mM	1 h bei 37°C
Protease-Inhibitoren	EDTA 5, 10 mM Pefabloc 5 mM	1 h bei 37°C -

## 2.12.2 Säulenchromatografische Reinigung

### 2.12.2.1 Anionentauscherchromatografie

Die hierfür verwendete Anlage (Biocad/Sprint) ist eine weiterentwickelte FPLC-Anlage und beruht auf der 1989 von PerSeptive Biosystems (Wiesbaden, FRG) eingeführten Perfusionschromatografie. Die sehr effiziente Trennung von nicht membrangebundenen Proteingemischen basiert im wesentlichen auf der Entwicklung von neuartigem Säulenmaterial. Die Matrixpartikel verfügen über diffusionszugängliche Poren, wodurch eine vergrößerte Oberfläche entsteht und die Interaktion von Protein und Lösungsmittel mit der Matrix erhöht wird. Durch die Automatisierung der Perfusionschromatografieanlage kann die Pufferzusammensetzung oder ein beliebiger Elutionsgradient softwaregesteuert moduliert werden. Die zur Proteinfractionierung verwendete Säule war eine 5ml HiTrap Q Säule (Pharmacia, Freiburg, FRG), die mit einer Matrix vom Typ Q Sepharose gepackt war. Dieser

Matrixtyp ist ein starker Anionenaustauscher, bedingt durch die positive Ladung  $[-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$  quartärer Aminogruppen, an die negativ geladene Proteine binden können.

Generell wird bei der Ionenaustauscherchromatografie (IC) die Wechselwirkung zwischen entgegengesetzt geladenen Partikeln ausgenutzt. Auf diese Weise können Proteine durch elektrostatische Wechselwirkung an eine Matrix binden. Diese Matrix kann positiv geladene (Anionenaustauscher) oder negativ geladene Gruppen (Kationenaustauscher) tragen. Ausmaß und Stärke der Bindung eines Proteins an einen Ionenaustauscher hängt von der Ionenstärke und dem pH des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladung auf der Matrix ab. Vorteile dieser Methode liegen darin, dass das geladene Probenvolumen ein Mehrfaches des Säulenvolumens betragen kann, der Reinigungsfaktor höher liegt als bei einer Gelfiltration und die geladene Probe aufkonzentriert wird. Bei mehrstufigen Reinigungen bietet es sich an, eine IC an den Anfang zu stellen, da hinterher die Probe in einem kleineren Volumen vorliegt und von störenden Extraktbestandteilen befreit ist.

Pufferlösung A: 20 mM Tris-Acetat, pH 8.1

Pufferlösung B: 20 mM Tris-Acetat, pH 8.1, 1 M NaCl

Die Flussrate betrug während der gesamten Fraktionierung 5 ml/min. Gleichzeitig bestimmte ein UV-Detektor den Proteingehalt der Proben bei 280 nm. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Pufferlösung A äquilibriert. Es folgte die Beladung der Säule mit IWF, der im Verhältnis 1:1 mit 40 mM Tris-Acetat-Puffer verdünnt wurde. Je nach eingesetztem IWF-Volumen (1, 5, 10 oder 15 ml) wurde die Dauer der Säulenbeladung angepasst (30 sec, 2, 4 oder 6 min). Proteine, die nicht an die Matrix banden oder nur schwach interagierten, wurden anschließend durch Waschen mit dem Bindepuffer (= Pufferlösung A, 10 ml) entfernt. Diejenigen Proteine, die am Matrixmaterial anhafteten, konnten mit einer 30 mM Salzstufe eluiert werden, wobei Pufferlösung B automatisch mit Pufferlösung A verdünnt wurde. Da Proteine unterschiedlich stark an die Matrix binden, bewegen sich Proteine mit geringerer Affinität schneller durch die Säule als solche mit höherer Affinität. Am Ende einer Fraktionierung muss das Säulenmaterial von jeglichen Proteinbestandteilen befreit werden, daher wurde der Salzgehalt auf 1 M erhöht und anschließend die Säule erneut mit Pufferlösung A beladen. Während der gesamten säulenchromatografischen Trennung wurden 0.5 ml-Fractionen in einem eiswassergekühlten Probensammler aufgefangen und mittels des in 2.9.2 beschriebenen Enzymtests auf  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität überprüft.

## 2.12.2.2 Batch-Verfahren zum raschen Testen von Chromatografiematerialien

### 2.12.2.2.1 Hydroxyapatit

Die Hydroxyapatit (HA) - Chromatografie zeigt bei sauren Proteinen gute Trenneigenschaften. Insbesondere gilt dies für über IC vorgereinigte Proteingemische. Die Chromatografie mit HA trennt saure Proteine nach anderen Prinzipien als ein Ionenaustauscher. Bei HA handelt es sich um ein Calciumphosphatmineral  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2]$ , das Proteine über zwei Mechanismen binden kann:

- (1) Bei basischen Proteinen kommt es zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Aminogruppen- $(\text{NH}_4^+)$ -Gruppen des Proteins und der negativen Oberflächenladung  $(-\text{PO}_4^{3-})$  des Minerals.
- (2) Saure Proteine bilden über ihre Carboxylgruppen  $(-\text{COO}^-)$  Komplexverbindungen mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen des Minerals.

Basische Proteine eluiert man entweder mit 0.1 - 0.3 M Lösungen von einwertigen Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ) oder mit niedrigen Konzentrationen (1-3 mM) zweiwertiger Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Im ersten Fall erfolgt die Elution wie bei einem Kationenaustauscher; im zweiten Fall kommt es zum Verdrängen der oberflächengebundenen Proteinaminogruppen durch das Binden der zweiwertigen Kationen an das Phosphat des Hydroxyapatits. Zur Elution von sauren Proteinen sind Fluorid- oder Phosphatsalzlösungen (0.05 - 0.15 M) notwendig, nicht aber  $\text{Cl}^-$  oder zweiwertige Kationen. Der Grund liegt darin, dass  $\text{F}^-$  oder Phosphat die Carboxylgruppen des Proteins vom Calcium des Minerals verdrängen. Zweiwertige Kationen verstärken sogar die Bindung saurer Proteine an Hydroxyapatit.

Äquilibrierungs-, Binde- bzw Waschpuffer: 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8  
Elutionspuffer:           100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8  
                                  200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8  
                                  300 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8  
                                  400 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8

Für das Batch-Verfahren wurden 250 mg pulverisiertes Hydroxyapatit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, FRG) mit 5 ml Äquilibrierungspuffer versetzt, geschüttelt und sedimentiert. Ein zweiter Äquilibrierungsschritt erfolgte durch die Zugabe von weiteren 5 ml Puffer. Nach erneuter Sedimentation und Verwerfen des Überstands wurde das Sediment im folgenden Bindschritt mit 0.25 ml IWF und 2.25 ml Phosphatpuffer (10 mM, pH 6.8) versetzt. Nach kräftigem Schütteln und 5-minütiger Sedimentbildung bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und Aliquots für eine Enzymbestimmung auf Eis gelagert. Der Rückstand wurde nun mit 2 ml Waschpuffer versetzt. Auch hier wurde nach dem

Sedimentieren ein Teil vom Überstand zur Enzymbestimmung zurückgehalten. Nun erfolgte die vierstufige Elution, wobei die Konzentration des Kaliumphosphatpuffers schrittweise erhöht wurde. Die Sedimentationsdauer betrug jeweils 5 min und von jedem Überstand wurden Proben auf Eis gelagert. Unmittelbar an die Fraktionierung schloss sich die Enzymaktivitätsbestimmung an (2.9.2, Probenvolumen 50  $\mu$ l). Dieses Verfahren erlaubte eine schnelle Aussage, ob das Protein tatsächlich an das Säulenmaterial band, die Bindung durch Waschen des HA gelöst wurde und bei welcher Phosphatpufferkonzentration das Protein eluierte. Die einzelnen Fraktionen wurden ebenfalls einer eindimensionalen SDS-PAGE zugeführt (2.12.3.1).

#### **2.12.2.2.2 Affinitätsbestimmung der $\beta$ -D-Glucosidase an Concanavalin A-Sepharose**

Das Lektin Concanavalin A (Con A, aus *Canavalia ensiformis*) ist ein Protein, das reversibel an  $\alpha$ -D-mannopyranosidische und  $\alpha$ -D-glucopyranosidische Zuckerreste von Glycoproteinen bindet. Bei neutralem pH-Wert liegt Con A als Tetramer vor, wobei jede Untereinheit eine Bindungsstelle für  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  besitzt. Die tetramere Struktur ist nur bei hoher Ionenstärke stabil, weshalb den Puffern bei chromatografischen Trennungen NaCl zugesetzt wird.

Das Lektin Con A ist kovalent an eine Sepharose-Matrix, bestehend aus Agarose, gebunden. Proteine, die an diese Con A-Sepharosematrix adsorbieren, können mit Methylmannose eluiert werden. Hierbei konkurriert der Zucker um die Bindungsstellen des Con A und verdrängt die gebundenen Glycoproteine.

Bindepuffer:	50 mM NaAcetat pH 5.2 500 mM NaCl 1 mM $MnCl_2$ 1 mM $CaCl_2$
Elutionspuffer:	50 mM NaAcetat pH 5.2 500mM NaCl 1 mM $MnCl_2$ 1 mM $CaCl_2$ 100, 200, 300, 400 oder 500 mM Methylmannose

Zur Affinitätsbestimmung der  $\beta$ -D-Glucosidase an Con A wurde 1 ml Con A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, FRG) mit 10 ml Bindepuffer in einem Reagenzglas versetzt. Nach dem Sedimentieren der Gelmatrix wurde der Überstand verworfen und erneut mit 10 ml Bindepuffer gewaschen. Zum äquilibrierten Gelmaterial (Sediment) wurden 500  $\mu$ l Bindepuffer gegeben, kräftig geschüttelt und anschließend 400  $\mu$ l dieses Gemisches mit 100  $\mu$ l IWF in einem eisgekühlten 1.5 ml Eppendorfgefäß gemischt. Wiederum wurde bis zur

Sedimentbildung gewartet und 50 µl vom Überstand auf β-D-Glucosidaseaktivität getestet (2.9.2). Bevor die Fraktionierung der an die Säulenmatrix gebundenen apoplastischen Proteine durchgeführt wurde, musste die Con A Sepharose mit 400 µl Bindepuffer gewaschen werden. Der Überstand wurde auf Enzymaktivität getestet und anschließend verworfen. Es folgte eine fünfstufige Elution, wobei nacheinander jeweils 400 µl Elutionspuffer (100, 200 und 500 mM Methylmannose) mit dem Gelsediment vermischt, kräftig geschüttelt und für einige Zeit stehen gelassen wurden. Unmittelbar im Anschluss an die Fraktionierung wurden die auf Eis gelagerten Überstände auf β-D-Glucosidaseaktivität geprüft.

### 2.12.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

#### 2.12.3.1 Eindimensionale SDS-PAGE

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine effiziente Methode, um Proteine entsprechend ihrer apparenten Größe zu trennen. Sie wurde zur Analyse der Proteinzusammensetzung der Fraktionen im Anschluss an die säulenchromatografische Trennung der apoplastischen Proteine sowie nach dem HA-Batch-Verfahren verwendet.

Das anionische Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet an hydrophobe Regionen der Proteine und versieht diese annähernd proportional zu ihrer Größe mit negativen Ladungen. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT, und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkung (Quartärstruktur). Bei der Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Während der Wanderung trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stockesschen Radius und damit nach ihrer apparenten molekularen Masse ( $M_r$ ) auf.

Zur Auftrennung der Proteine der chromatografischen Fraktionen wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffer verwendet (Laemmli 1970). Ein Sammelgel (6% Acrylamid, pH 6.8) überschichtet ein Trenngel (12% Acrylamid, pH 8.8). Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben im gleichen Volumen Probenpuffer gelöst und für 1 min auf 95°C erhitzt. Im Sammelgel wurden die Polypeptide auf eine enge Startzone konzentriert und anschließend im 12.5%igen Trenngel in einem diskontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem aufgetrennt. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde

jeweils parallel zu den Proben ein Standardpolypeptidgemisch (Molekulargewichtsmarker) mitgeführt.

Trenngel (12,5% (w/v) Acrylamid)  
12.16% (w/v) Acrylamid  
0.34% (w/v) Bisacrylamid  
25% (v/v) 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8  
0.03% (v/v) TEMED  
0.45% (v/v) AMPS (10% (w/v))

Sammelgel (6% (w/v) Acrylamid)  
5.84% (w/v) Acrylamid  
0.16% (w/v) Bisacrylamid  
25% (v/v) 1.5 M Tris-HCl, pH 6.8  
0.03% (v/v) TEMED  
1% (v/v) AMPS (10% (w/v))

Probenpuffer (2-fach)  
125 mM Tris-HCl, pH 6.8  
10 mM DTT  
2.3% (w/v) SDS  
10% (v/v) Glycin  
0.01% (w/v) Bromphenolblau

Reservoirpuffer  
14.4% (w/v) Glycin  
3% (w/v) Tris  
0.1% (w/v) SDS

Marker (Novex, Marker 12)

Myosin	200.0 kDa
$\beta$ -Galactosidase	116.3 kDa
Phosphorylase b	97.4 kDa
Albumin (Rind)	66.3 kDa
Glutamindehydrogenase	55.4 kDa
Lactat-Dehydrogenase	36.5 kDa
Carboanhydrase	31.0 kDa
Trypsininhibitor	21.5 kDa
Lysozyme	14.4 kDa
Aprotinin	6.0 kDa

### 2.12.3.2 Zweidimensionale PAGE

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese kommt neben der Auftrennung nach der apparenten molekularen Masse ( $M_r$ ) von Proteinen der isoelektrische Punkt als zweites Trennkriterium hinzu. Das Verfahren erlaubt damit die Analyse komplexer

Proteinmischungen, wodurch die Polypeptidzusammensetzung eines Gewebes noch deutlicher in hochdominante und mittelhäufige Proteine unterschieden werden kann.

In der 1. Dimension wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (2.10.3) fokussiert. In der unmittelbar darauffolgenden 2. Dimension konnten sich die fokussierten Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe auftrennen. Zunächst mussten die „Immobilin-Strips“ in SDS-Ladepuffer für 10 min äquilibriert werden. Slabgelkassetten, die bereits mit Trenngel (12%) gefüllt waren, wurden nun mit Sammelgel (6%) überschichtet. Anschließend wurde auf das Sammelgel der „Strip“ gelegt und durch Agarose-Lösung mit dem Gel verklebt. Das zur Elektrophorese verwendete ISO DALT-System wies die Besonderheit auf, dass die Slabgelkassetten vertikal inseriert werden konnten und die Elektrophorese über Nacht durchführbar war. Zweidimensionale Gele weisen im Gegensatz zu eindimensionalen keine Banden auf, sondern Proteinflecken, die ebenfalls mit Silberfärbung sichtbar wurden.

#### Äquilibrierungspuffer

- 50 mM Tris-HCl pH 6.8
- 6 M Harnstoff
- 30% (v/v) Glycerin
- 2% (w/v) SDS
- Spuren von Bromphenolblau
- 200 ml H<sub>2</sub>O dest.
- 1 mM DTT

#### Agarose-Lösung

- 25 mM Tris-HCl, pH 6.8
- 192 mM Glycin
- 2% SDS
- 0.5% (w/v) Agarose
- Spuren von Bromphenolblau
- 100 ml H<sub>2</sub>O dest.

### 2.12.3.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen (nach Blum et al. 1987)

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode (< 5 ng Protein), um Proteinbanden in Polyacrylamidgelen zu detektieren. Vor dem Färben wurden die Proteine im Gel fixiert, also denaturiert und ausgefällt. Dann erfolgte eine Sensibilisierung, wobei das in Spuren eingelagerte Thiosulfat den Kontrast der späteren Färbung verstärkt. Die eigentliche Färbung beruht auf einem Proteinnachweis mit Silbernitrat. Silberionen (Ag<sup>+</sup>) bilden hierbei Komplexe mit Glutaminsäure-, Asparaginsäure-, und Cystein-Resten der Proteine. Im anschließenden Entwicklungsschritt mit alkalischem Formaldehyd kommt es zur Reduktion der Ag<sup>+</sup>-Ionen zu elementarem Silber, wodurch die Proteinbanden im Gel sichtbar werden. Die chemischen



Feinheiten dieser Reaktion sind noch unbekannt. Die Intensität der Proteinbanden hängt dabei von der Proteinmenge sowie der Art des Proteins ab. Bei Eintritt der gewünschten Färbung wurde der Entwicklungsprozess durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Zum Abschluss wurde das Gel mit einer methanolischen (50%) Glycerinlösung (3%) behandelt, um beim Trocknen die Gefahr des Zerreißen zu verringern. Zwischen zwei Zellophanfolien gespannt konnte das Gel über Nacht trocknen.

Fixieren	50% (v/v) 12% (v/v) 0.02% (v/v)	Methanol Essigsäure Formaldehyd	1 x 15 min
Waschen	50% (v/v)	Ethanol	3 x 10 min
Sensibilisieren	0.02% (w/v)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	1 x 1 min
Waschen	H <sub>2</sub> O		3 x 20 sec
Färben	0.2% (w/v) 0.075% (v/v)	AgNO <sub>3</sub> Formaldehyd	1 x 15 min
Waschen	H <sub>2</sub> O		1 x 20 sec
Entwickeln	6% (w/v) 0.02% (v/v) 0.0004% (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Formaldehyd Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	bis zum Sichtbarwerden der Banden
Waschen	H <sub>2</sub> O		1 x 20 sec
Stoppen	50% (v/v) 12% (v/v)	Methanol Essigsäure	1 x 10 min
Trocknen	50% (v/v) 3% (v/v)	Methanol Glycerin	über Nacht

## 2.13 Datenauswertung

In der Regel wurden alle aufgeführten Experimente mindestens dreimal wiederholt. Das Stichprobenmittel sowie die jeweilige Standardabweichung der Stichprobe ( $\sigma_{n-1}$ ) wurde berechnet. Der Stichprobenumfang  $n$ , die Anzahl der Replikationen, ist in der Legende der jeweiligen Abbildung oder Tabelle angegeben

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Untersuchungen zum Vorkommen und der Herkunft des ABA-GE

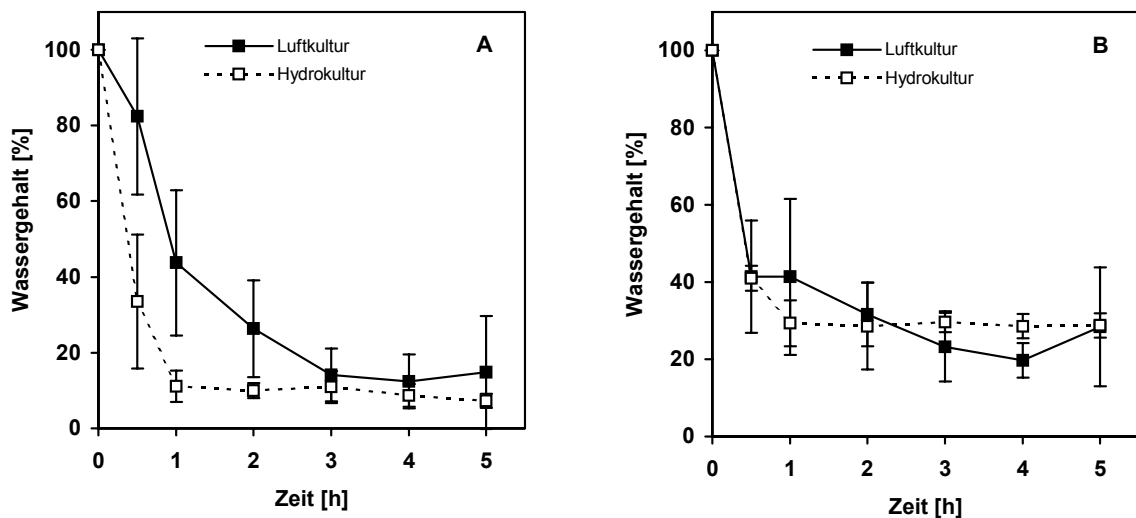
Salzstress kann ebenso wie Trockenheit eine ABA-Akkumulation in der Pflanze auslösen. Salze wirken aufgrund ihrer osmotischen Effekte im Außenmilieu (Bodenlösung) ähnlich wie eine physiologische Trockenheit (Munns 1993). Daher ist es naheliegend, dass bei der hormonellen Antwort auf diese Stressfaktoren das Hormon Abscisinsäure beteiligt ist. Hinweisen aus der Literatur zufolge (Bano et al. 1993, 1994) enthält das Stresssignal aus der Wurzel neben einem erhöhten Gehalt an freier ABA auch vermehrt das Hormonkonjugat ABA-Glucoseester. Für ABA konnten Hartung et al. (1996) zeigen, dass die ABA-Konzentration in der Bodenlösung einen wichtigen Beitrag zur Hormonhomöostase in der Wurzel leistet. Die Stärke des in Wurzeln gebildeten und via Xylem transportierten ABA-Signals kann somit durch die externe Bodenkonzentration aber auch durch Biosynthese beeinflusst werden. Ob der ABA-Glucoseester-Gehalt im Xylem ebenfalls von externer oder endogener Herkunft ist, sollen die im folgenden dargestellten Ergebnisse klären.

#### 3.1.1 Wurzeln und Blätter von *Zea mays*

##### 3.1.1.1 Trockenstress

Elf Tage alte intakte Maispflanzen aus Luftkultur sowie Hydrokultur wurden in einen Klimaschrank zur Austrocknung gehängt (2.5.1). Im Zeitraum zwischen 0 und 5 Stunden wurden die intakten Pflanzen geerntet, ihre Wurzeln und Blätter getrennt, gewogen, extrahiert und mittels ELISA der ABA-GE-Gehalt dieser Gewebe bestimmt.

Wurzelsysteme von hydroponischen Maispflanzen hatten bereits nach 1 h 90% ( $11 \pm 4\%$ ) ihres Gewebewassers verloren (Abb. 3-1). In den folgenden 4 h war keine weitere Abnahme zu verzeichnen. Wurzeln aus Luftkultur besaßen nach der 1-stündigen Austrocknung noch die Hälfte ihres Gewebewassers ( $44 \pm 19\%$ ). Insgesamt verlief die Wasserabgabe an die umgebende Raumluft langsamer, da erst nach 3 h das Niveau der hydroponischen Wurzeln erreicht wurde. Beim Vergleich der Gewebewasserverluste der Blätter war kein Unterschied zwischen beiden Anzuchtformen zu erkennen. In beiden Fällen sank nach 1 h der Gewebewassergehalt auf einen Wert, der auch in den folgenden 4 h zwischen 20 und 40% lag.

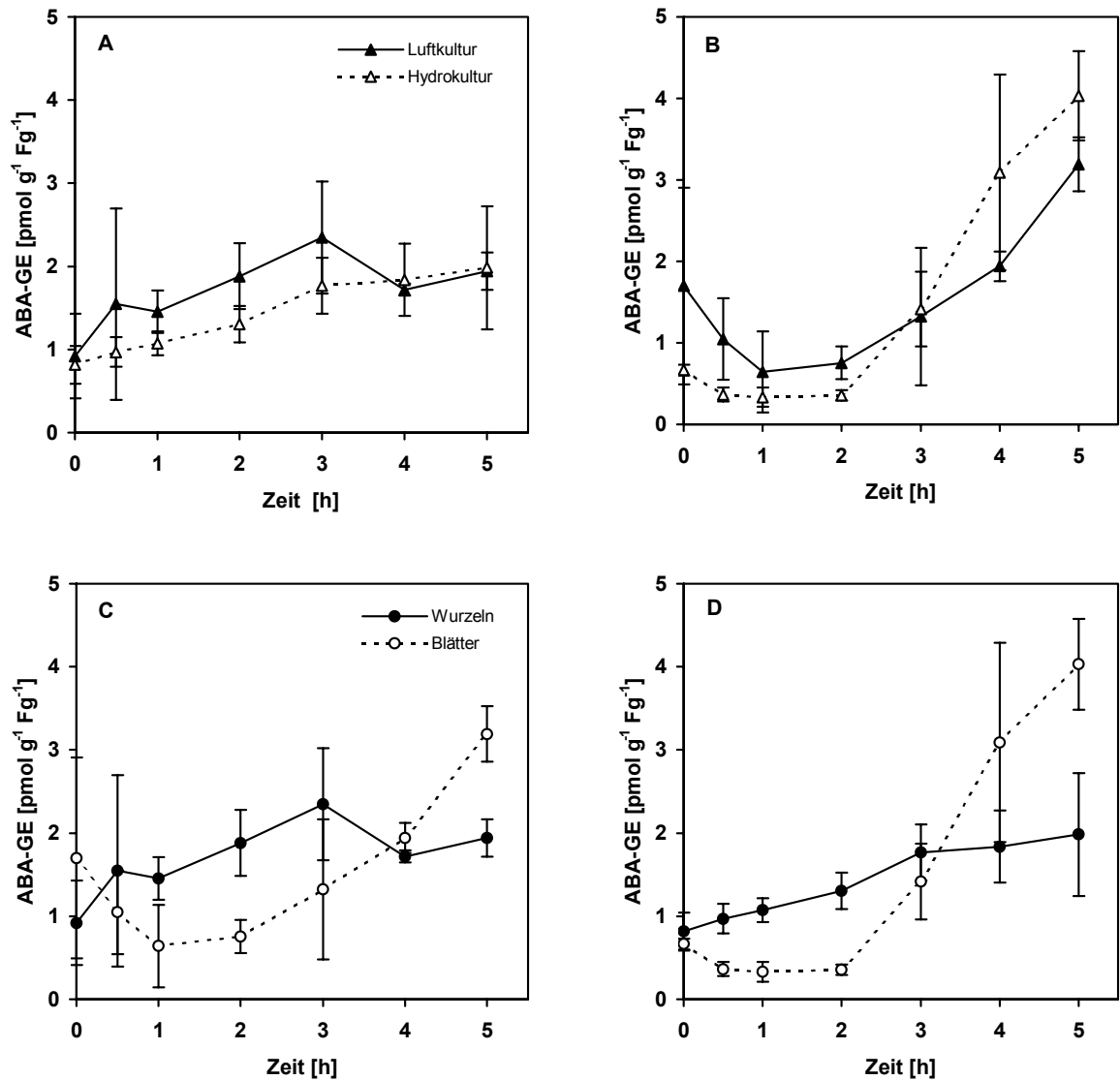


**Abb. 3-1** Vergleich der Wassergehalte von (A) Primärwurzeln und (B) Blättern von *Zea mays L.* aus Luftkultur und Hydrokultur nach einem bis zu 5 Stunden währenden Austrocknen. Zum Zeitpunkt 0 min wurden intakte Pflanzen in eine Klimakammer bei 21°C gehängt. Das Frischgewicht der turgescenzten Blätter und Wurzeln wurde als 100% angenommen. MW  $\pm$  SD, n = 3 Primärwurzeln bzw. Folgeblätter.

Um zu vermeiden, dass eine Zunahme der ABA-GE-Gehalte in Wurzeln sowie Blättern auf einen reinen Aufkonzentrierungseffekt zurückzuführen ist, wurde der jeweilige Wasserverlust bei der Berechnung der Gewebekonzentrationen mit einbezogen.

In Primärwurzeln beider Anzuchtmethoden stieg der ABA-GE-Gehalt gleichermaßen (Abb. 3-2 A). Nach der 5-stündigen Austrocknung war der Gehalt um den Faktor 2.1 bei Luftkultur und 2.4 bei Hydrokultur gegenüber dem Gehalt ungestresster Wurzeln ( $0.92 \pm 0.51$  Luftkultur;  $0.82 \pm 0.23$  Hydrokultur) erhöht. Bei Blättern beider Kulturen kam es zu einem deutlichen Anstieg ihres ABA-GE-Gehaltes nach der dritten Austrocknungsstunde (Abb. 3-2 B). Am Ende der fünften Stunde zeigten Blätter der Hydrokultur eine deutliche Erhöhung um den Faktor 6.0 gegenüber ungestressten Blättern. Aeroponische Blätter wiesen nur eine 1.9-fache Zunahme auf. Beim Vergleich der zeitlichen Zunahme von Wurzel-ABA-GE-Gehalten mit Blattgehalten (Abb. 3-2 C, D) war besonders bei der Hydrokultur zu erkennen, dass die Wurzelgehalte bis zur dritten Austrocknungsstunde über denen der Blätter lagen. Die Metabolisierung von ABA zu ABA-GE in Wurzeln verlief in dieser Zeitspanne somit schneller als in den Blättern. Nach 5 h Trockenstress war jedoch die Blatt-ABA-Konzentration gegenüber den Wurzeln um den Faktor 1.6 bei der Luftkultur und um den Faktor 2.0 bei der Hydrokultur erhöht. Dieser deutliche Anstieg könnte auf eine nun verstärkt

ablaufende Metabolisierung der freien ABA in den Blättern oder Deponierung von aus den Wurzeln stammenden ABA-GE herrühren.



**Abb. 3-2** Abscisinsäureglucoseester-Gehalte in Primärwurzeln sowie Blättern von *Zea mays* L. aus Luftkultur und Hydrokultur im Verlauf einer bis zu 5 h anhaltenden Austrocknung. Der ABA-GE-Gehalt der ungestressten Kontrollen ist zum Zeitpunkt 0 h angegeben. (A) Vergleich der trockengestressten Wurzeln beider Kulturmethoden. (B) Vergleich der trockengestressten Blätter beider Anzuchten. (C) Vergleich der gestressten Wurzeln mit Blättern aus Luftkultur. (D) Vergleich der gestressten Wurzeln mit Blättern aus Hydrokultur. MW  $\pm$  SD, n = 3 Primärwurzeln oder Folgeblätter.

Im Anschluss an die 5-stündige Austrocknung folgte eine 16 Stunden andauernde Wiederbewässerung. Nach dieser Bewässerung waren die Pflanzen so weit regeneriert, dass sie wieder ihr Ausgangsgewicht besaßen. Der ABA-GE-Gehalt in den Wurzeln beider Kulturmethoden sank auf den Gehalt der Kontrollpflanzen (Tab. 3-1). Bei den Blättern war

jedoch ein weiterer Anstieg der ABA-GE-Konzentration zu verzeichnen; gegenüber dem 5 h Niveau um das 4.8-fache bei Luftkultur und um das 5.2-fache bei Hydrokultur.

**Tab. 3-1** Abscisinsäureglucoseester-Gehalte in Primärwurzeln sowie Blättern von *Zea mays* L. aus Luftkultur und Hydrokultur. Zum Zeitpunkt Null sind die ungestressten Kontrollen aufgeführt. Mit zunehmender Dauer (5 h) des Trockenstresses steigen die Gewebegehalte. Im Anschluss an die 5-stündige Austrocknung erfolgte eine Wiederbewässerung. MW  $\pm$  SD, n = 3 Primärwurzeln oder Folgeblätter.

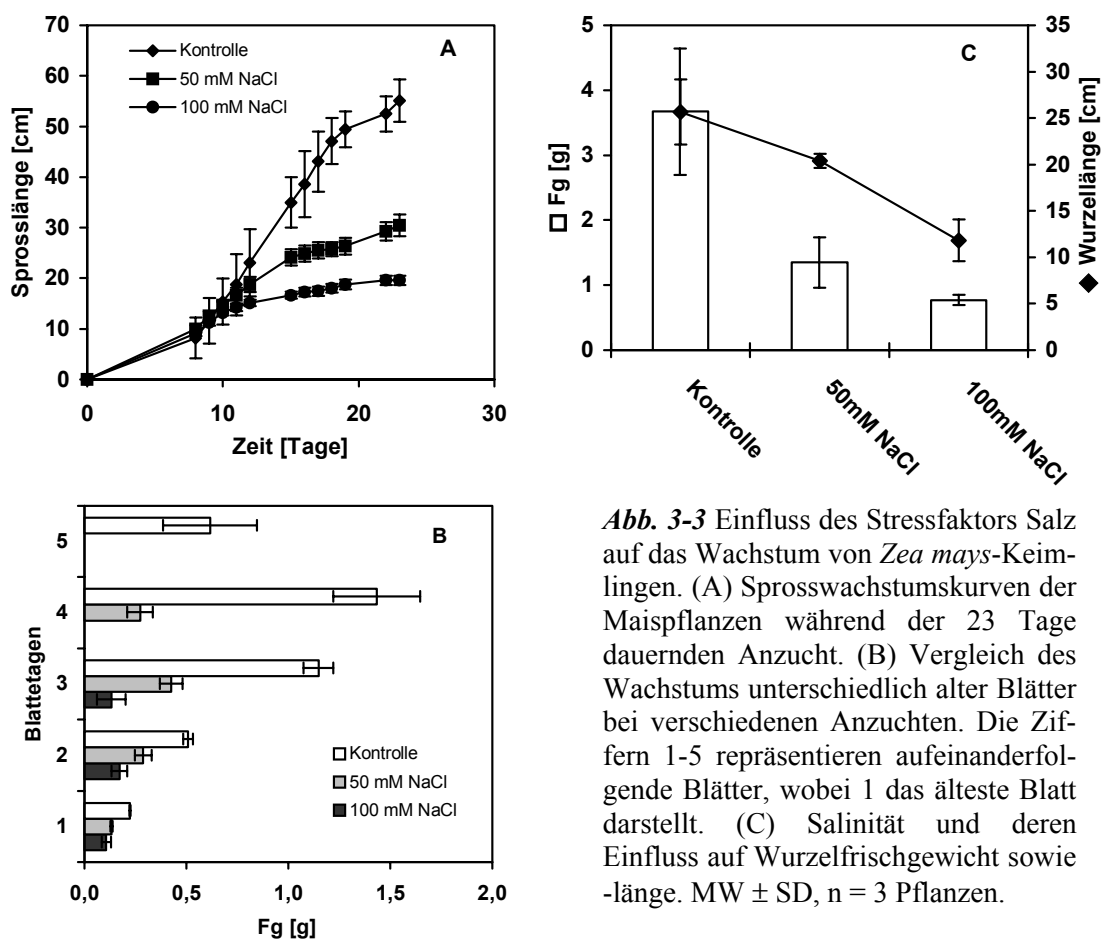
Austrocknungsdauer	Wurzeln		Blätter	
	Luftkultur [pmol g <sup>-1</sup> Fg <sup>-1</sup> ]	Hydrokultur [pmol g <sup>-1</sup> Fg <sup>-1</sup> ]	Luftkultur [pmol g <sup>-1</sup> Fg <sup>-1</sup> ]	Hydrokultur [pmol g <sup>-1</sup> Fg <sup>-1</sup> ]
0 h	0.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 1.2	0.7 $\pm$ 0.1
5 h	1.9 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.6
Wiederbewässerung				
16 h	0.6 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 6.8	21.0 $\pm$ 6.5

### 3.1.1.2 Salzstress

Aus der Literatur war ersichtlich, dass sich verschiedene Maisvarietäten stark in ihrer Salztoleranz unterscheiden. Bei der verwendeten Maissorte Helix lagen diesbezüglich keine Daten vor. Daher war es notwendig, den Einfluss des Stressfaktors Salz zu testen, um die Bedingungen für spätere Untersuchungen zu ermitteln.

Maispflanzen der Sorte Helix wurden in Sand kultiviert und täglich mit NaCl-haltiger Nährlösung (Kontrolle, 50 mM, 100mM) bewässert. Morphologische Veränderungen, die das Wurzel- bzw. Sprosswachstum betrafen, waren nach 23 Tagen Salzbehandlung deutlich zu erkennen. Ab dem 15. Tag nach Anzuchtsbeginn trat erstmals ein Unterschied im Sprosslängenwachstum auf (Abb. 3-3 A). Die ungestressten Maispflanzen waren bei Versuchsende gegenüber den salzbehandelten Pflanzen um den Faktor 1.8 (50 mM NaCl) bis 2.8 (100 mM NaCl) größer. Dieser Größenunterschied spiegelte sich auch in der Anzahl der Blatttagen wider. Die Kontrollpflanzen entwickelten innerhalb der Anzuchtsperiode fünf Blätter, 50 mM salzgestresste Pflanzen vier und bei 100 mM Salzstress wurden nur drei Blätter gebildet (Abb. 3-3 B). Somit war auch das Sprossfrischgewicht bei den Kontrollpflanzen (8.2  $\pm$  1.3 g) um das 3.2-fache gegenüber den 50 mM salzgestressten Maispflanzen (2.6  $\pm$  0.4 g) und um das 7.4-fache gegenüber den mit 100 mM NaCl behandelten Pflanzen (1.1  $\pm$  0.3 g) deutlich erhöht. Aus Abbildung 3-3 C wird ersichtlich,

dass sich bei den Wurzeln mit zunehmender Salzbelastung sowohl die Länge (Kontrolle:  $25.7 \pm 3.5$ ; 50 mM NaCl:  $20.4 \pm 0.8$ ; 100 mM NaCl:  $11.8 \pm 2.3$ ) als auch das Frischgewicht (Kontrolle:  $3.7 \pm 1.0$ ; 50 mM NaCl:  $1.4 \pm 0.4$ ; 100 mM NaCl:  $0.8 \pm 0.1$ ) verringerte. Im allgemeinen wird jedoch durch Salinität das Sprosswachstum stärker beeinträchtigt als das der Wurzel (Shalhevet et al. 1995). Eine Tatsache, die dieses Experiment bestätigte. Die Kontrollpflanzen wiesen ein Spross-/Wurzel-Verhältnis von 2.2/1 auf. Nach der Salzbelastung mit 100 mM NaCl sank das Verhältnis auf 1.3/1.



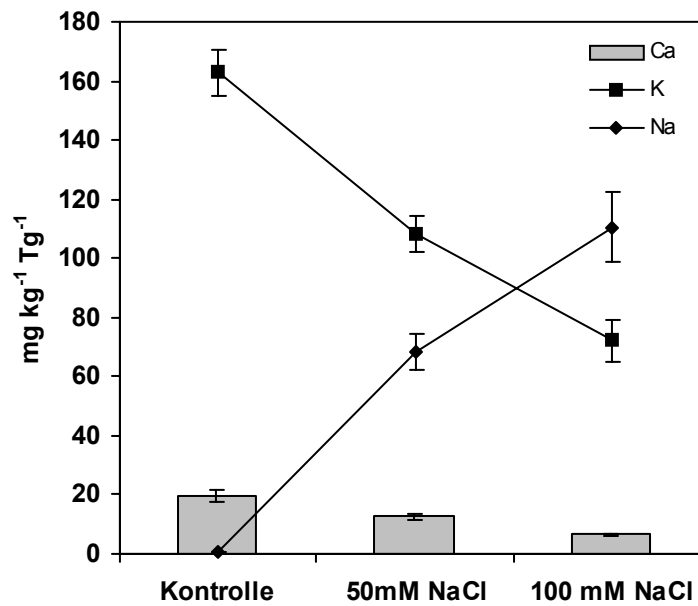
**Abb. 3-3** Einfluss des Stressfaktors Salz auf das Wachstum von *Zea mays*-Keimlingen. (A) Sprosswachstumskurven der Maispflanzen während der 23 Tage dauernden Anzucht. (B) Vergleich des Wachstums unterschiedlich alter Blätter bei verschiedenen Anzuchten. Die Ziffern 1-5 repräsentieren aufeinanderfolgende Blätter, wobei 1 das älteste Blatt darstellt. (C) Salinität und deren Einfluss auf Wurzelfrischgewicht sowie -länge. MW  $\pm$  SD, n = 3 Pflanzen.

Die mittels ICP gemessenen Elementgehalte der Blätter sind in Tab. 3-2 aufgeführt. Bei den Elementen S, Mg, Fe und Mn war eine deutliche Abnahme mit steigender Salzkonzentration in der Nährlösung zu beobachten. Der Phosphorgehalt der Blätter blieb in etwa gleich. Salzstress hatte somit keinen Phosphatmangel zur Folge. Der Borgehalt verdoppelte sich zunächst bei einer Salzkonzentration von 50 mM, fiel jedoch bei 100 mM NaCl unter den Wert der Kontrollpflanzen ab.

**Tab. 3-2** Elementgehalte der Blätter von 23 Tage alten Maispflanzen aus Sandkultur. Der P&S-Nährlösung wurde NaCl in zwei verschiedenen Konzentrationen (50 mM, 100 mM) zugefügt. Alle Angaben besitzen die Einheit  $\text{mg kg}^{-1}$  Trockengewicht. MW  $\pm$  SD, n = 3 Pflanzen.

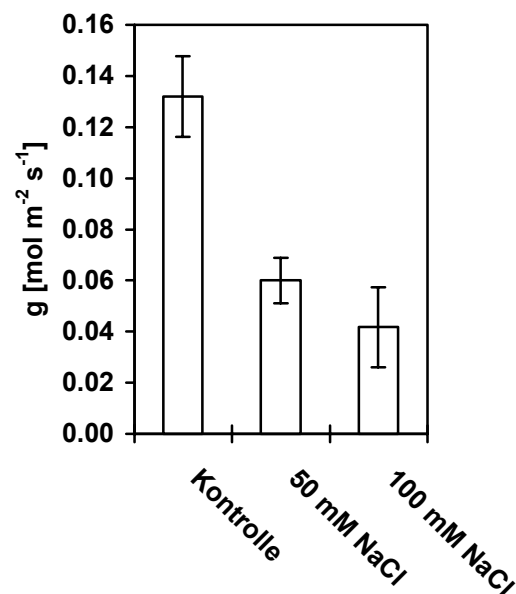
		Kontrolle	50 mM NaCl	100 mM NaCl
Makronelemente	S	12059.3 $\pm$ 470.8	12509.3 $\pm$ 561.9	764.3 $\pm$ 172.6
	P	13793.0 $\pm$ 424.7	15838.7 $\pm$ 467.6	13428.0 $\pm$ 371.6
Mikronelemente	Mg	8042.3 $\pm$ 186.28	7176.0 $\pm$ 541.2	4903.7 $\pm$ 628.2
	Ca	19780.6 $\pm$ 1917.3	12653.0 $\pm$ 984.0	6521.0 $\pm$ 410.0
	K	162966.7 $\pm$ 7694.4	108370.0 $\pm$ 6164.4	72080.0 $\pm$ 7375.2
	Fe	334.8 $\pm$ 29.79	257.5 $\pm$ 19.1	172.62 $\pm$ 14.7
Spurenelemente	Mn	486.5 $\pm$ 16.7	505.7 $\pm$ 15.0	242.0 $\pm$ 3.5
	Zn	103.8 $\pm$ 9.7	417.2 $\pm$ 14.7	223.0 $\pm$ 3.0
	B	68.8 $\pm$ 27.7	153.8 $\pm$ 26.8	18.3 $\pm$ 3.2
	Al	98.5 $\pm$ 7.7	189.5 $\pm$ 21.7	135.3 $\pm$ 14.2
Andere Elemente	Na	354.8 $\pm$ 18.6	68206.7 $\pm$ 6085.9	110415.0 $\pm$ 11945.0

Allgemein ist bekannt, dass eine steigende  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Außenmedium zu einer eingeschränkten  $\text{K}^+$ -Aufnahme bei Glycophyten führt. Salzstress löst somit einen Sekundärstress in Form von  $\text{K}^+$ -Mangel aus (Kreeb, 1996). Abbildung 3-4 lässt erkennen, dass der Natriumgehalt in den Blättern mit zunehmender Salzkonzentration um den Faktor 311 anstieg, gleichzeitig der Kaliumgehalt um das 2.2-fache sank. Kontrollpflanzen wiesen einen starken Gradienten bezüglich ihres  $\text{Na}^+$ -Gehaltes von den älteren zu den jüngeren Blättern auf, wobei beim jüngsten Blatt der  $\text{Na}^+$ -Gehalt auf 50% reduziert war. Die mit Salzstress belasteten Pflanzen enthielten in allen Blattetagen einen erhöhten  $\text{Na}^+$ -Gehalt. Der  $\text{K}^+$ -Gehalt wies nur bei den mit Salz behandelten Pflanzen einen Gradienten von alten zu jungen Blättern auf. Die ältesten Blätter enthielten etwa doppelt soviel  $\text{K}^+$  im Vergleich zu den jüngsten. Salzstress beeinträchtigt ebenfalls die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aus dem Boden (Cramer, 1994). Bei einer Salzkonzentration von 100 mM im Außenmedium entsprach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt nur noch ein Drittel von dem der Kontrollpflanzen. Bei den Kontrollen sowie bei den salzbelasteten Pflanzen war eine stete Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalte mit steigendem Blattalter zu finden.



**Abb. 3-4** Blattgehalte an Calcium, Kalium und Natrium von in Sand kultiviertem Mais. Salzstress wurde durch mit NaCl-angereicherte Nährlösung (50, 100 mM) appliziert. MW  $\pm$  SD, n = 3 Pflanzen.

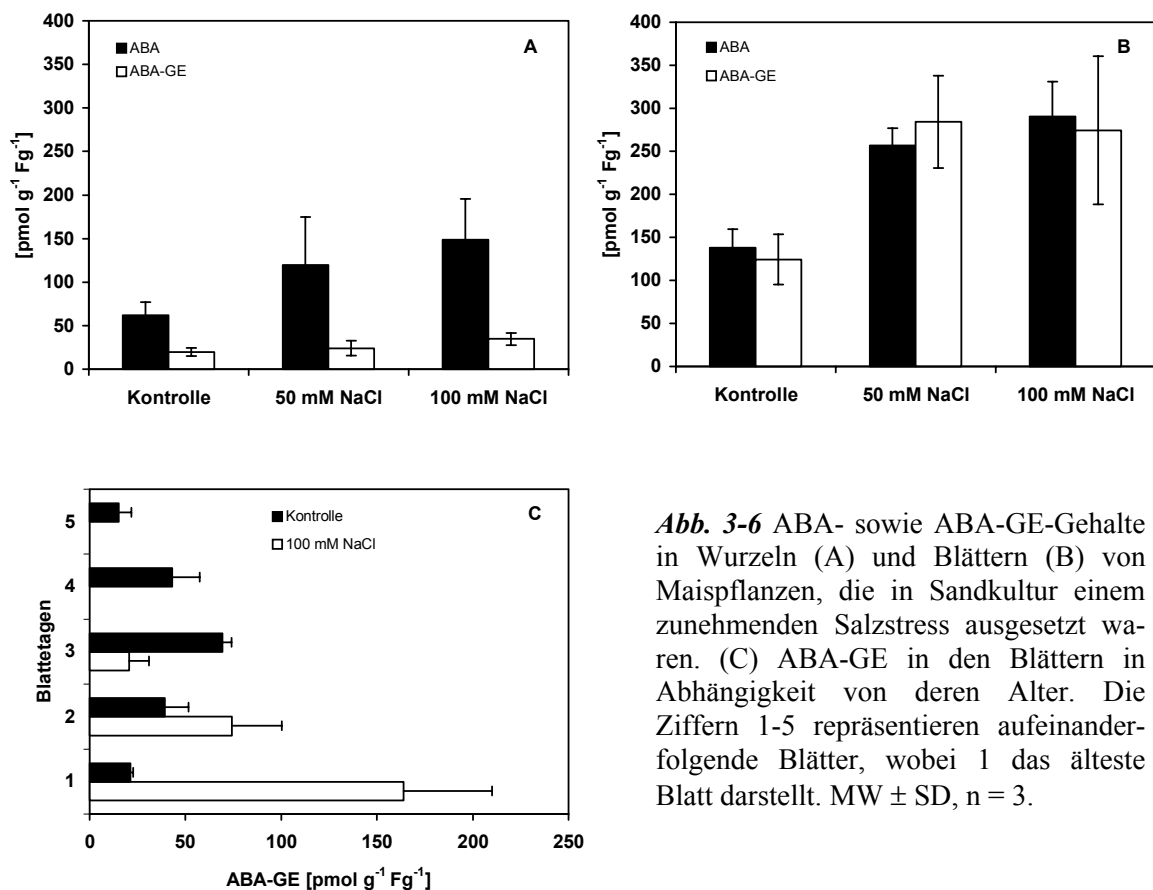
Unmittelbar vor der Pflanzenernte wurde die Blattleitfähigkeit mit einem Porometer bestimmt. Hier zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen reduzierter Blattleitfähigkeit und NaCl-Gaben in der Nährlösung (Abb. 3-5). Im Vergleich mit den Kontrollpflanzen betrug die Blattleitfähigkeit der salzgestressten Pflanzen nur die Hälfte.



**Abb. 3-5** Blattleitfähigkeit von Maispflanzen ohne und mit Salzstress. MW  $\pm$  SD, n = 3 Pflanzen.



Salzstress ist neben Trockenheit ein weiterer Faktor, welcher die ABA-Biosynthese beeinflusst (Lachno & Baker 1986; Wolf et al. 1990; Degenhardt et al. 2000). Aus Abbildung 3-6 A und B wird ersichtlich, dass ABA sowie ABA-GE in Wurzel- und Blattgewebe mit zunehmender Salzkonzentration im Gießwasser anstiegen. In den 100 mM salzgestressten Wurzeln war die ABA um den Faktor 2.4 und ABA-GE um den Faktor 1.8 erhöht. Stets war die ABA-Konzentration um den Faktor 3-5 höher als die des Glucoseesters. Bei den Blättern zeigte sich ein anderes ABA-ABA-GE-Verhältnis, denn in allen drei Ansätzen waren beide Gehalte in etwa gleich hoch. Schon 50 mM NaCl in der Bodenlösung ließ den ABA bzw. ABA-GE-Gehalt um 1.9 respektive 2.3 ansteigen. Bei der Erhöhung auf 100 mM NaCl kam es zu keinem weiteren Anstieg. Eine Verteilung des ABA-GE in den einzelnen Folgeblättern einer Maispflanze ist in Abbildung 3-6 C dargestellt. Bei den Kontrollpflanzen war der Gehalt im jüngsten und im ältesten Blatt am niedrigsten. Blätter mittleren Alters enthielten höhere ABA-GE-Konzentrationen. In salzgestressten (100mM) Maispflanzen nahm der ABA-GE-Gehalt von alten zu jungen Blättern ab. Der höchste ABA-GE-Gehalt war im ältesten Blatt feststellbar.



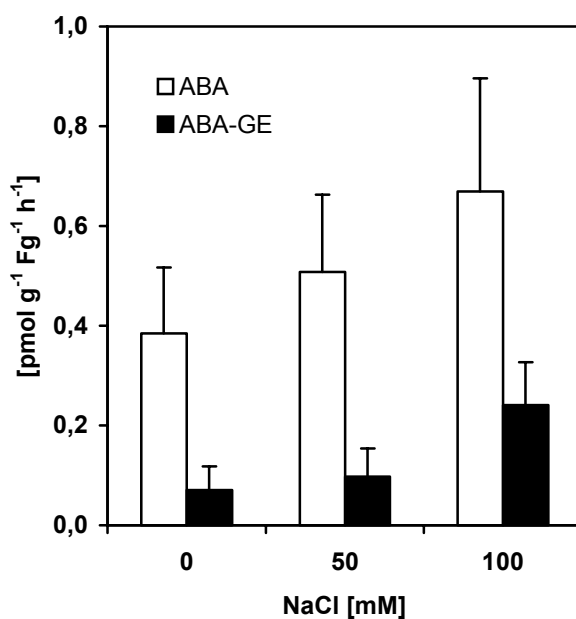
**Abb. 3-6** ABA- sowie ABA-GE-Gehalte in Wurzeln (A) und Blättern (B) von Maispflanzen, die in Sandkultur einem zunehmenden Salzstress ausgesetzt waren. (C) ABA-GE in den Blättern in Abhängigkeit von deren Alter. Die Ziffern 1-5 repräsentieren aufeinanderfolgende Blätter, wobei 1 das älteste Blatt darstellt. MW  $\pm$  SD, n = 3.

### 3.1.2. Einfluss von Salzstress auf Xylem-ABA- und ABA-GE-Gehalte in Gerste

Gerstenkeimlinge wurden in einem Hydrokulturmedium mit 50 und 100 mM NaCl kultiviert. Nach 11 Tagen war eine deutliche Wachstumshemmung der Wurzeln vor allem bei den 100 mM NaCl gestressten Gerstenpflanzen zu beobachten (Tab. 3-3). Mittels der in Material und Methoden (2.6.2) beschriebenen Saugtechnik konnte Xylemsaft von dekapitierten Wurzelsystemen dieser Pflanzen gewonnen werden ( $p = -0.045$  MPa, Saugdauer 2 h, Perfusionsmedium ohne NaCl). Der radiale Wasserfluss durch die Wurzelsysteme verringerte sich schon bei den mit 50 mM NaCl gestressten Wurzeln um den Faktor 2.2 (Tab. 3-3). Bestimmungen der ABA- bzw. ABA-GE-Gehalte in den jeweiligen Xylemsäften ließen erkennen, dass ihr Gehalt mit zunehmendem Salzstress anstieg. Die Behandlung mit 100 mM NaCl erhöhte die freie ABA nur um das 1.7-fache (Abb. 3-7). Die Freisetzung von ABA-GE aus dem Xylemparenchym ins Xylem stieg um das 3.4-fache.

**Tab. 3-3** Der Einfluss von Salzstress auf das Wurzelwachstum von Gerstenkeimlingen sowie auf den radialen Wasserfluss ( $J_V$ ). MW  $\pm$  SD, n = 5 Wurzelsysteme.

	Kontrolle	50 mM NaCl	100 mM NaCl
Fg [g]	0.23 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.02
Oberfläche [ $10^{-4}$ m <sup>2</sup> ]	15.9 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 2.2	9.5 $\pm$ 1.1
$J_V$ [ $10^{-9}$ m s <sup>-1</sup> ]	6.7 $\pm$ 2.3	3.1 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 1.3



**Abb. 3-7** Transport von ABA- und ABA-GE aus dem parenchymatischen Wurzelgewebe in das Xylem von Gerstenkeimlingen. Die Keimlinge wurden in Hydrokultur mit unterschiedlicher Salzbelastung angezogen. Bei einem subatmosphärischen Druck von  $-0.045$  MPa konnte Xylemsaft mittels einer Saugapparatur gewonnen werden. MW  $\pm$  SD, n = 4 Pflanzen.

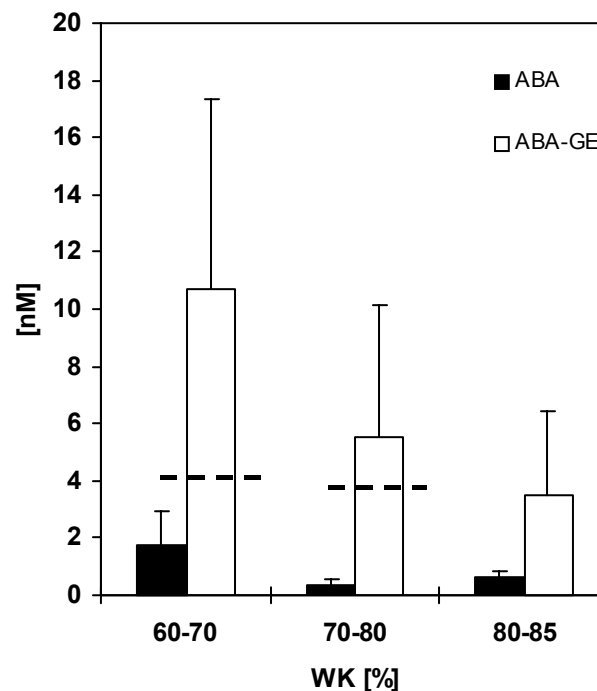
### 3.1.3 Der ABA-GE-Gehalt in Bodenlösungen

Wässrige Bodenextrakte (pH 7.1 - 7.8) von landwirtschaftlichen Flächen bei Würzburg wurden auf ihren ABA-GE- und ABA-Gehalt untersucht. Legt man die Annahme zugrunde, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme ABA-GE völlig gelöst in der Bodenlösung vorlag, so reichten die ABA-GE-Konzentrationen von 0.4 nM (unter Sonnenblume im kalkhaltigen Boden) bis zu 35 nM (unter Sonnenblume im buntsandsteinhaltigen Boden). Der ABA-GE-Gehalt der Bodenlösung lag immer über dem der freien ABA (Minimum: 0.1 nM, Maximum: 4.7 nM). Die einzige Ausnahme bildete der Boden des Fichtenbestandes, wo in der obersten Schicht 54 nM ABA detektiert wurde. Schon Hartung et al. (1996) belegten, dass saure Böden, wie im Fall des Standorts unter Fichten (pH 4), hohe ABA-Konzentrationen in der Bodenlösung enthalten. Ebenfalls in Übereinstimmung mit Hartung et al. (1996) konnte weder eine kontinuierliche Ab- noch Zunahme der freien ABA mit zunehmender Bodentiefe gefunden werden. Dagegen wurde eine abnehmende ABA-GE-Konzentration mit zunehmender Bodentiefe bei 5 von 6 Feldern beobachtet (Tab. 3-4).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich mit zunehmender Bodentrockenheit die ABA-GE-Konzentration in der Bodenlösung erhöhte (Abb. 3-4). Im Vergleich zur freien ABA stieg die ABA-GE-Konzentration um den Faktor 6 an. Die gestrichelten Linien in Abbildung 3-8 sollen aufzeigen, dass dieser Anstieg nicht auf einen reinen Aufkonzentrierungseffekt zurückzuführen ist.

**Tab. 3-4** ABA-GE-Konzentrationen (nM) in Bodenwasserproben zweier Bodentypen in Abhängigkeit zur Bodentiefe (cm). Kalkhaltiger Boden stammte von landwirtschaftlichen Nutzflächen an der Bundesstraße 19; rötlicher, buntsandsteinreicher Boden war von Feldern nahe der Ortschaft Gambach (Landkreis Main-Spessart) entnommen.

Bodentiefe [cm]	kalkhaltiger Boden			buntsandsteinhaltiger Boden		
	Sonnenblume	Mais	Roggen	Sonnenblume	Kartoffel	Weizen
2.5	0.7	5.2	0.9	34.9	16.1	5.4
25.0	0.5	4.0	1.1	14.1	13.7	3.6
45.0	0.4	2.8	0.6	3.0	0.52	10.3



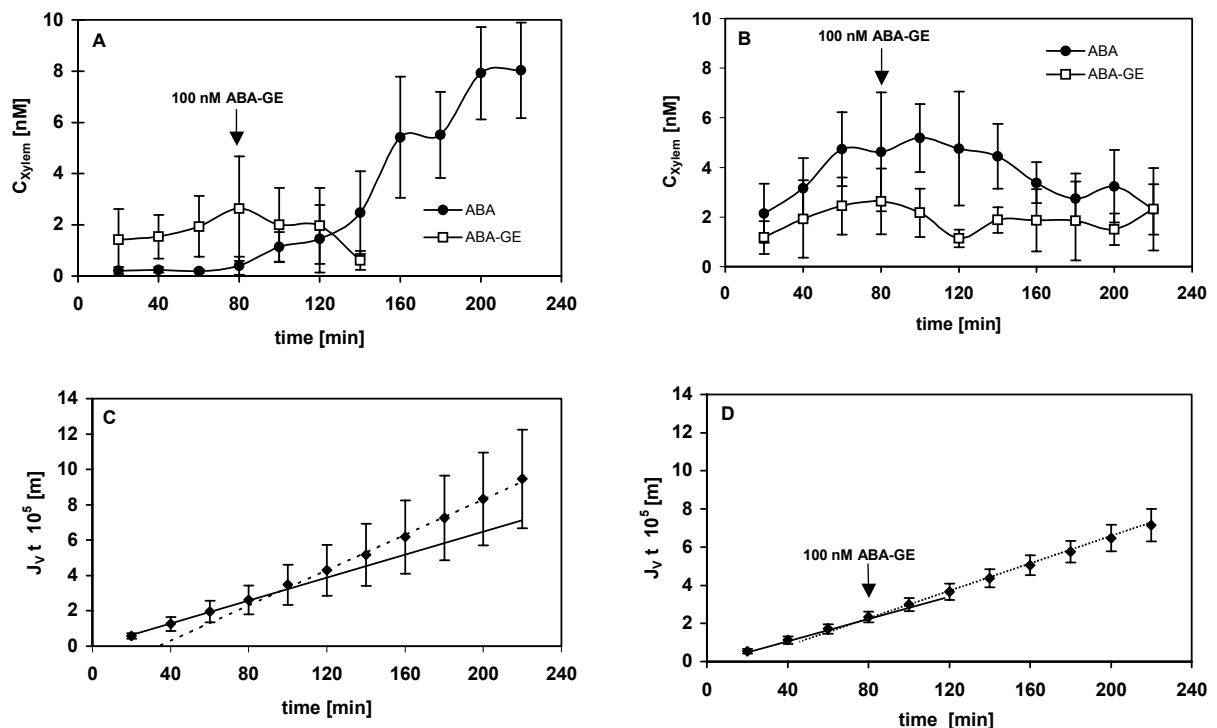
**Abb. 3-8** ABA- und ABA-GE-Konzentrationen in der Bodenlösung landwirtschaftlicher Felder bei Würzburg, aufgetragen als eine Funktion der Bodenwasserkapazität (WK [%]). Die gestrichelten Linien zeigen die berechnete Aufkonzentrierung von ABA-GE bedingt durch eine Verdunstung des Bodenwassers. MW  $\pm$  SD, n = 6 Bodenproben.

## 3.2. Transportstudien durch Wurzelsysteme

### 3.2.1 Der radiale Transport von ABA-GE

Der radiale Transport von gelösten Substanzen durch eine Wurzel wird insbesondere durch apoplastische Barrieren beeinflusst. Eine solche Barriere stellt beispielsweise die Endodermis dar, deren radiale und tangential Wände unterschiedlich starke Inkrustierungen (Suberin) sowie Auflagerungen (Cellulose) aufweisen können. Eine Exodermis ist eine Hypodermis, die durch Caspary'sche Bänder in ihren radialen Zellwänden gekennzeichnet ist (Enstone & Peterson 1998, Zimmermann & Steudle 1998). Um diese Barrierefunktionen genauer studieren zu können, wurden Maiswurzeln in zwei verschiedenen Anzuchtbedingungen kultiviert. Im Falle der aeroponischen Kultur entwickelten die Maiswurzeln (Freundl et al. 1998) sowohl eine Endodermis als auch eine Exodermis. Bei der Hydrokultur blieb die Exodermisbildung aus. Elf Tage alte Maispflanzen, die sieben Tage nach ihrem viertägigen Vorkeimen in Hydrokultur verbrachten, erreichten ein Frischgewicht von  $0.9 \pm 0.1$  g und eine Wurzeloberfläche von  $66.9 \pm 21.4$  cm<sup>2</sup> (MW  $\pm$  SD, n = 6). Gleichaltrige Pflanzen aus

Luftkultur wiesen ein Frischgewicht von  $1.0 \pm 0.4$  g auf und eine Wurzeloberfläche von  $93.6 \pm 32.4$  cm<sup>2</sup> (MW  $\pm$  SD, n = 6). Pflanzen beider Kulturmethode wurden am Mesokotyl dekapitiert und druckdicht an eine Saugapparatur (2.6.2) befestigt. Bei einem Unterdruck von -0.045 MPa wurde ein konstanter Wasserfluss vom umgebenden Medium in die Xylemgefäße und anschließend in die Kapillare der Apparatur induziert. Nach 80 min wurde dem Außenmedium ABA-GE in einer Konzentration von 100 nM zugefügt.



**Abb. 3-9** Radialer Transport von ABA-GE in 11 Tage alten Maiswurzeln, die (A) hydroponisch oder (B) aeroponisch angezogen wurden. Auf die dekapitierten Wurzelsysteme wurde mittels der Saugapparatur ein Unterdruck von -0.045 MPa ausgeübt und somit ein Xylemsaftfluss durch die Wurzeln hervorgerufen. In 20-minütigen Intervallen wurde dieser gesammelt und auf seinen ABA- sowie ABA-GE-Gehalt getestet. Den Wasserfluss durch beide Wurzelsysteme stellen die Grafiken (C) und (D) dar. MW  $\pm$  SD, n = 5 dekapitierte Wurzelsysteme.

Bei hydroponisch angezogenen Maispflanzen konnte ein endogener ABA-Gehalt im Xylemsaft von 0.2 bis 0.4 nM (Abb. 3-9 A) ermittelt werden. Obwohl 80 min nach Versuchsbeginn ABA-GE dem externen Medium appliziert wurde, trat eine Abnahme des Glucoseestergehalts in den nächsten 60 min auf. In der selben Zeitspanne war eine Zunahme der freien ABA-Konzentration im Xylem von 1.1 nM auf 8.0 nM zu verzeichnen, was einen Anstieg des ABA-Flusses ( $J_{\text{ABA}}$ ) um den Faktor  $2.2 \pm 0.3$  zur Folge hatte (Tab. 3-5). Freundl et al. (1998) wiesen nach, dass ein verstärkter radialer Transport von freier ABA ebenfalls Einfluss auf den radialen Wasserfluss in der Wurzel nimmt. Diese Korrelation war im Falle

der hydroponischen Wurzel auch deutlich sichtbar. Mit dem Anstieg der ABA-Konzentration im Xylem erfolgte gleichzeitig eine Zunahme des radialen Wasserflusses von  $5.7$  auf  $8.4 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ , also um den Faktor  $1.5 \pm 0.2$  (Abb. 3-9 C, Tab. 3-5).

**Tab. 3-5** Vergleich der ABA-Flüsse ( $J_{\text{ABA}}$  [ $10^{-15} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ]), ABA-GE-Flüsse ( $J_{\text{ABA-GE}}$  [ $10^{-15} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ]) und Wasserflüsse ( $J_{\text{Vr}}$  [ $10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ]) in Maiswurzeln aus Hydrokultur mit Luftkultur. Die Flüsse wurden vor und nach Zugabe von ABA-GE zum Außenmedium der dekapitierten Wurzelsysteme aus der ermittelten Konzentration im Xylem und dem Xylemsaftvolumen berechnet. MW  $\pm$  SD, n = 5 dekapitierte Wurzelsysteme.

	Hydrokultur			Luftkultur		
	$J_{\text{ABA}}$	$J_{\text{ABA-GE}}$	$J_{\text{Vr}}$	$J_{\text{ABA}}$	$J_{\text{ABA-GE}}$	$J_{\text{Vr}}$
vor Zugabe	$10.2 \pm 6.0$	$9.2 \pm 5.4$	$5.7 \pm 1.9$	$11.0 \pm 5.1$	$5.2 \pm 2.9$	$5.0 \pm 0.5$
nach Zugabe	$28.6 \pm 7.8$	-	$8.4 \pm 2.4$	$9.4 \pm 3.2$	$4.6 \pm 3.3$	$5.8 \pm 0.8$
Faktor der Zunahme	$2.2 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.5$	$1.5 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.5$	$1.0 \pm 0.5$	$1.0 \pm 0.5$

Zum Vergleich wurde dasselbe Experiment mit Maispflanzen aus Luftkultur durchgeführt. Die Wurzelsysteme dieser Pflanzen besaßen in ihrer Hypodermis Caspary'sche Bänder entlang der gesamten Wurzelhaarzone bis etwa 3 cm oberhalb der Wurzelspitze (Freundl et al., 2000). Die endogene ABA-Konzentration im Xylem ( $2.2 - 4.6 \text{ nM}$ , Abb. 3-9 B) war im Mittel um den Faktor 11 höher als bei Wurzeln aus Hydrokultur, die keine Exodermis aufwiesen. Nachdem ABA-GE zum Außenmedium gegeben wurde, konnte in den Xylemsaftproben keine signifikante Zunahme der freien ABA ( $2.3 - 5.2 \text{ nM}$ ) gemessen werden. Die Konzentration des ABA-GE schwankte zwischen  $1.1 - 2.6 \text{ nM}$ . Nach 100 min war eine leichte Abnahme des ABA-GE zu verzeichnen. Dennoch konnte das Hormonkonjugat während der gesamten Versuchsdauer im Xylemsaft nachgewiesen werden. Die Zugabe des Glucoseesters hatte bei aeroponischen Wurzeln keinen Einfluss auf den Wasserfluss (Abb. 3-9 D). Der  $J_{\text{ABA}}$  sowie  $J_{\text{ABA-GE}}$  blieb ebenfalls vor und nach der Zugabe des ABA-GE auf dem selben Niveau (Tab. 3-5).

### 3.2.2 Salzstress und der radiale Transport von ABA und ABA-GE

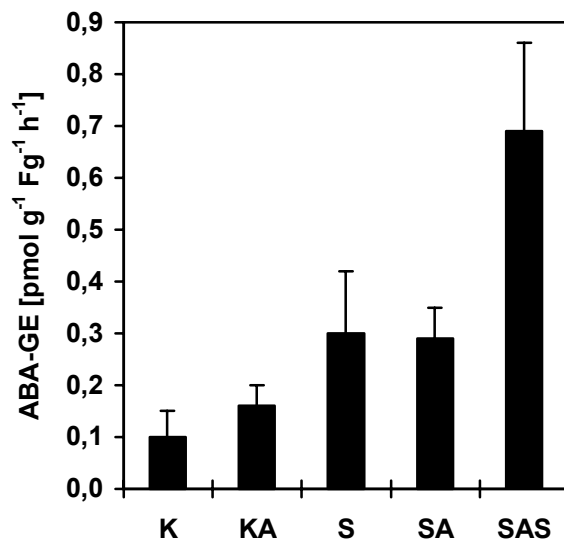
Elf Tage alte Maispflanzen, in Hydrokultur angezogen, waren einem Salzstress von  $100 \text{ mM NaCl}$  im Nährmedium ausgesetzt. Es sollte am intakten Wurzelsystem untersucht werden, ob diese Stressbelastung zu einem erhöhten Transport von ABA und dessen Konjugat aus dem Wurzelparenchym in das Xylem führt. Die salzbelasteten Pflanzen besaßen sowohl ein um

den Faktor 1.6 geringeres Frischgewicht (Kontrolle:  $1.0 \pm 0.2$  g; salzgestresste Pflanzen  $0.6 \pm 0.1$  g) als auch eine um diesen Faktor geringere Wurzeloberfläche (Kontrolle:  $89.9 \pm 16.2 \cdot 10^{-4}$  m<sup>2</sup>; salzgestresste Pflanzen  $55.3 \pm 7.1 \cdot 10^{-4}$  m<sup>2</sup>). Die dekapitierten Wurzelsysteme wurden an einer Saugapparatur befestigt. Die Xylemsaftgewinnung erfolgte bei einem subatmosphärischen Druck von -0.06 MPa. Bei einigen Kontroll- sowie salzgestressten Pflanzen wurde die Hauptwurzel entfernt. Um zu gewährleisten, dass die nach einer Stunde gewonnene Xylemsaftmenge der aus intakten Wurzelsystemen entsprach (Tab 3-6), musste der Unterdruck bei den abgeschnittenen Wurzelsystemen auf -0.03 MPa reduziert werden. Eine Ausnahme bildete der Versuchansatz mit salzgestressten Pflanzen, deren Hauptwurzel entfernt und zusätzlich das Perfusionsmedium mit 10 mM NaCl angereichert war (Tab. 3-6: SAS). Hier war das Xylemsaftvolumen im Vergleich mit allen anderen Versuchansätzen um den Faktor 2.4 niedriger. Unabhängig davon, ob Wurzelsysteme intakt oder dekapitiert waren, zeigten salzbelastete Wurzeln einen 3.9 bis 7.4-fach höheren ABA-Transport aus dem parenchymatischen Gewebe ins Xylem (Tab. 3-6).

Einen deutlich verstärkten ABA-GE-Transport wiesen die Wurzelsysteme auf, deren Hauptwurzel abgetrennt und das Perfusionsmedium mit 10 mM NaCl angereichert war (Abb. 3-10: SAS). Der Transport war hier um das 4.3-fache höher als bei Kontrollpflanzen, deren Hauptwurzel ebenfalls abgeschnitten waren (KA). Beim Vergleich der intakten Wurzelsysteme (K) ohne und mit Salzstress (S) wurde ABA-GE bei den salzbelasteten Wurzelsystemen um den Faktor 3 vermehrt ins Xylem transportiert. Bei Wurzelsystemen mit fehlender Hauptwurzel (KA, SA) war ein um 1.8-fach verstärkter ABA-GE-Transport ebenfalls bei denen mit Salzbelastung (SA) zu beobachten.

**Tab. 3-6** Mittels einer Saugapparatur gewonnener Xylemsaft aus dekapitierten Maiswurzelsystemen sowie dessen Gehalt an freier ABA bezogen auf das Frischgewicht der Wurzel und die Versuchsdauer. Die Versuchsdauer betrug 1 h, der angelegte Unterdruck war -0.06 MPa bei intakten Wurzelsystemen und -0.03 MPa bei solchen, deren Hauptwurzel entfernt wurde (\*). K = Kontrollpflanzen; KA = abgeschnittene Kontrollpflanzen; S = 100 mM salzgestresste Pflanzen; SA = salzgestresste (100 mM) Pflanzen mit abgetrennter Hauptwurzel; SAS = salzgestresste (100 mM) Pflanzen mit abgetrennter Hauptwurzel, die zusätzlich 10 mM NaCl im Perfusionsmedium enthielten. MW  $\pm$  SD, n = 4 Pflanzen.

	K	KA*	S	SA*	SAS*
Xylemsaft [ $\mu$ l]	$118.1 \pm 14.8$	$97.4 \pm 26.7$	$123.1 \pm 38.8$	$121.1 \pm 57.3$	$47.7 \pm 10.6$
ABA [ $\text{pmol g}^{-1} \text{Fg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]	$0.17 \pm 0.05$	$0.12 \pm 0.04$	$0.67 \pm 0.24$	$0.84 \pm 0.37$	$0.89 \pm 0.27$



**Abb. 3-10** Die ABA-GE-Effluxrate ins Xylem dekapitierter Wurzelsysteme. Der Xylemsaft wurde mit Hilfe einer Saugapparatur bei einem Unterdruck von -0,06 MPa (K, S) oder -0,03 MPa (KA, SA, SAS) nach 1 h gewonnen. K = Kontrollpflanzen; KA = abgeschnittene Kontrollpflanzen; S = 100 mM salzgestresste Pflanzen; SA = salzgestresste (100 mM) Pflanzen mit abgetrennter Hauptwurzelspitze; SAS = salzgestresste

### 3.2.3 Die spezifische Wirkung von ABA-Vorstufen, -Metaboliten und -Analoga auf $J_{Vr}$

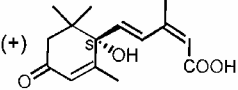
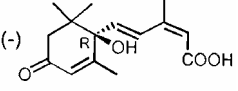
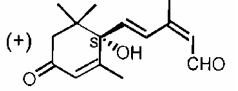
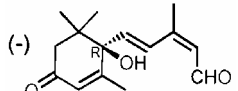
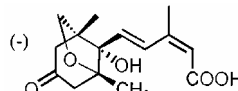
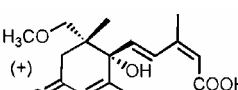
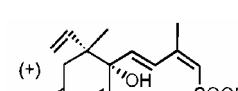
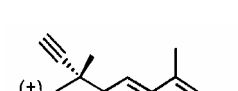
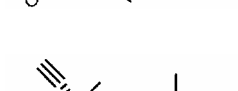
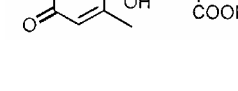
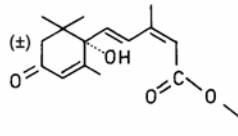
Mit Hilfe der in 2.8.2 beschriebenen Saugtechnik wurde der Einfluss einiger ABA-Vorstufen, -Metabolite und -Analoga auf den radialen Wasserfluss in Maiswurzelsystemen untersucht. Die getesteten Substanzen sind in Tabelle 3-8 aufgeführt. Neben dem natürlich vorkommenden (+)-Enantiomer der ABA wurde auch (-)-ABA getestet sowie die direkte Vorstufe der (+)-ABaldehyd und dessen (-)-Enantiomer. Die zweite Gruppe an Testsubstanzen bestand aus ABA-Metaboliten, wozu die (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA, die (-)-Phaseinsäure und das ABA-Konjugat ABA-Glucoseester zählt. Bei der (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA handelt es sich um ein stabiles Analogon der (+)-8'-Hydroxy-ABA, dem ersten ABA-Metaboliten des oxidativen Abbaus und direkte Vorstufe der Phaseinsäure. Die anderen Analoga zeichnen sich durch Modifikationen am 8'-C-Atom aus, wo Ethylen- sowie Acetylen-Gruppen eingeführt sind.

Alle Analoga, die einen Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel aufwiesen, wurden im ELISA auf eine Kreuzreaktion mit dem ABA-Antikörper getestet. Da der optimale Messbereich bei einer Konzentration von 1 nM liegt, wurden die Analoga entsprechend verdünnt. Eine Kreuzreaktion erfolgte ausschließlich mit 8'-Hydroxymethyl-ABA (25%ige Erkennung).

Die Wasser- und ABA-Flüsse vor und nach Zugabe der verschiedenen Analoga sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst.



**Tab. 3-8** ABA-Analoga, die auf ihre Wirkung auf  $J_{Vr}$  getestet wurden.

Analogon	Strukturformel	MW [g mol <sup>-1</sup> ]	Literatur
(+)-ABA		264.3	Dunstan et al. 1992 Freundl et al. 1998
(-)-ABA		264.3	Dunstan et al. 1992 Hose et al. 2000
(+)-Abscisyl-Aldehyd		248.3	Hays et al. 1996
(-)-Abscisyl-Aldehyd		248.3	Hays et al. 1996
(-)-Phaseinsäure		280.3	Balsevich et al. 1994
(+)-8'-Hydroxymethyl-ABA		294.3	Rose et al. 1997
(+)-8'-Methylen-ABA		276.3	Abrams et al. 1997
(+)-8'-Acetylen-ABA		274.3	Rose et al. 1997 Cutler et al. 2000
(±)-8'-Acetylen-ABA		274.3	Rose et al. 1997
(±)-8'-Acetylen-ABA-Methylester		288.3	Rose et al. 1997
(±)-ABA-Glucoseester		426.5	Hogge et al. 1993 Sauter und Hartung 2000

**Tab. 3-9** Das Verhältnis der Wasser- ( $J_V$ ) sowie ABA-Flüsse ( $J_{ABA}$ ) nach und vor Zugabe der ABA-Analoga, sowie der Zeitraum nachdem ein konstanter Wasserfluss erreicht wurde. (MW  $\pm$  SD, n = 4).

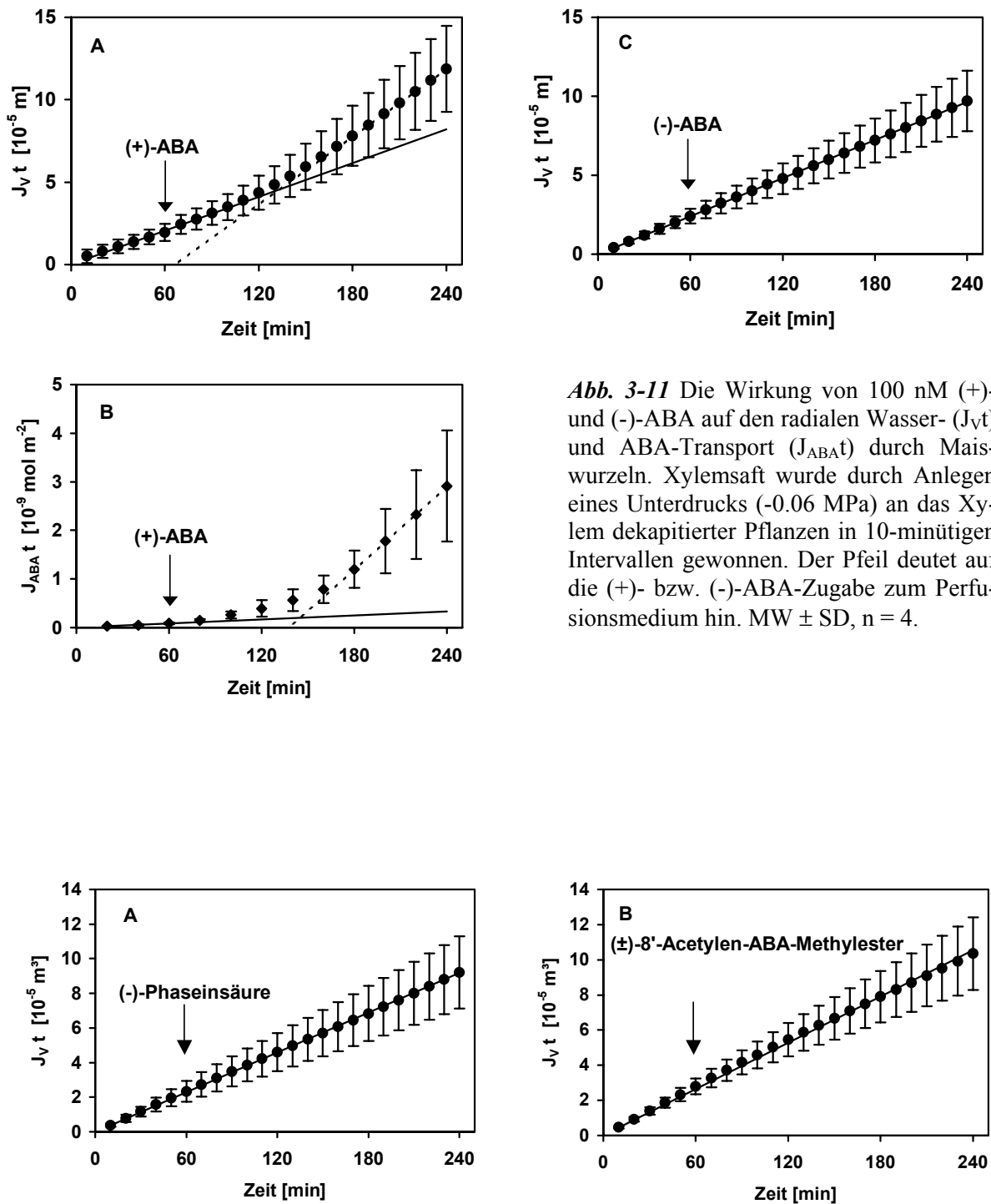
	$J_{Vnach} / J_{Vvor}$ Zugabe Analoga	steady-state $J_V$ der nach der Analoga [min]	$J_{ABAnach} / J_{ABAvor}$ Zugabe Analoga
(+)-ABA	2.2 $\pm$ 0.6	130	19.0 $\pm$ 7.4
(+)-Abscisyl-Aldehyd	2.5 $\pm$ 0.5	130	52.2 $\pm$ 19.3
(-)-Abscisyl-Aldehyd	3.3 $\pm$ 0.7	250	0.6 $\pm$ 0.4
(+)-8'-Hydroxymethyl-ABA	2.5 $\pm$ 0.7	130	1.2 $\pm$ 0.4
(+)-8'-Methylen-ABA	2.2 $\pm$ 0.3	130	12.4 $\pm$ 6.5
(+)-8'-Acetylen-ABA	2.8 $\pm$ 0.6	250	10.8 $\pm$ 3.8
( $\pm$ )-8'-Acetylen-ABA	2.9 $\pm$ 0.8	310	12.9 $\pm$ 6.6
( $\pm$ )-8'-Acetylen-ABA methyl ester	0.9 $\pm$ 0.1	-	-
(-)-Phaseinsäure	1.0 $\pm$ 0.0	-	-
(-)-ABA	1.0 $\pm$ 0.0	-	-
( $\pm$ )-ABA-Glucoseester	2.2 $\pm$ 0.6	250	6.8 $\pm$ 2.5

#### Der ABA-Effekt (Tab. 3-9, Abb. 3-11)

Die Zugabe von (+)-cis-trans-ABA erhöhte den Wasserfluss um den Faktor 2.2. Gleichzeitig konnte ein ABA-Einstrom ins Xylem beobachtet werden. Das künstliche Enantiomer (-)-cis-trans-ABA hatte keinen Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln.

#### ABA-Derivate, die keine spezifische Wirkung auf $J_V$ zeigten (Tab. 3-9, Abb. 3-12)

Ähnlich wie bei der (-)-ABA hatte die Zugabe von Phaseinsäure oder (+)-8'-Acetylen-ABA-Methylester keine Auswirkung auf den radialen Wasserfluss in der Maiswurzel

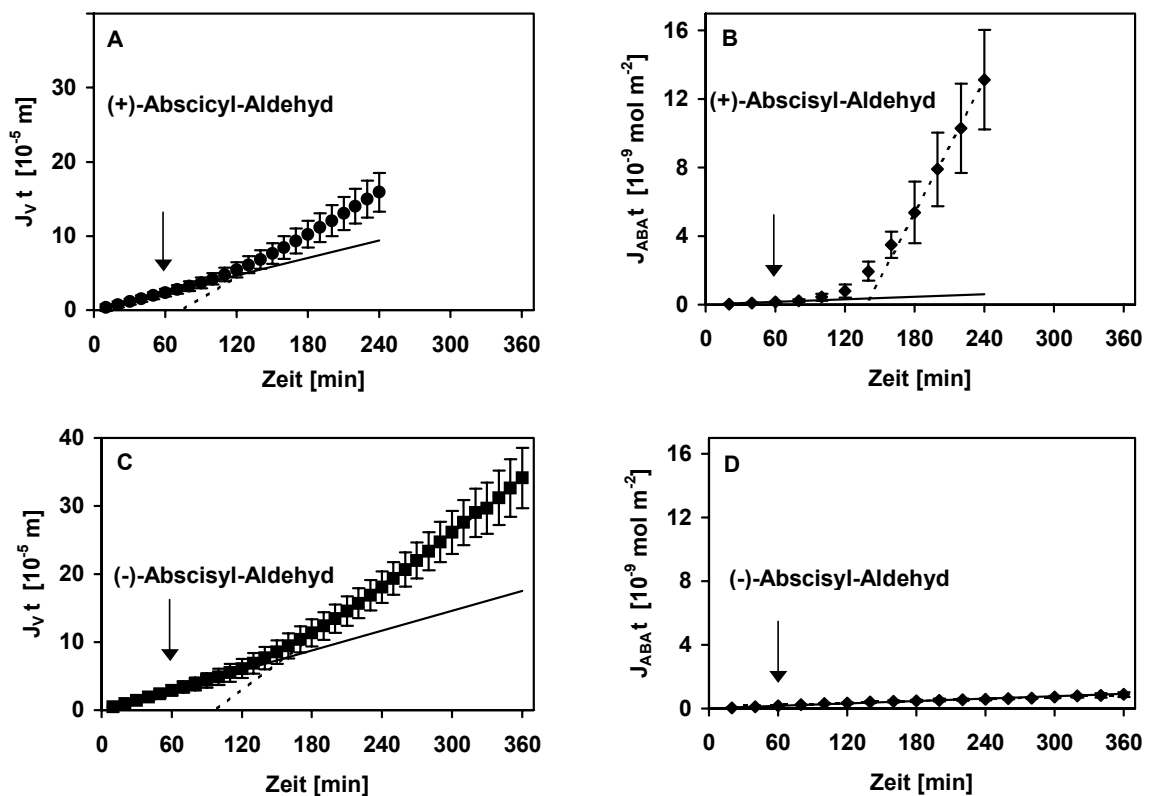


**Abb. 3-11** Die Wirkung von 100 nM (+)- und (-)-ABA auf den radialen Wasser- ( $J_v t$ ) und ABA-Transport ( $J_{ABA} t$ ) durch Maiswurzeln. Xylemsaft wurde durch Anlegen eines Unterdrucks (-0.06 MPa) an das Xylem dekapitierter Pflanzen in 10-minütigen Intervallen gewonnen. Der Pfeil deutet auf die (+)- bzw. (-)-ABA-Zugabe zum Perfusionsmedium hin. MW  $\pm$  SD, n = 4.

**Abb. 3-12** Der Einfluss von 100 nM Phaseinsäure sowie ( $\pm$ ) 8'-Acetylen-ABA-methylester auf den radialen Wassertransport in Maiswurzelsystemen getestet in einem Saugexperiment. Experimentelle Details sind in der Legende zu Abb. 3-11 beschrieben. MW  $\pm$  SD, n = 4.

### Der Effekt von (+)- und (-)-ABaldehyd (Tab. 3-9, Tab. 3-13)

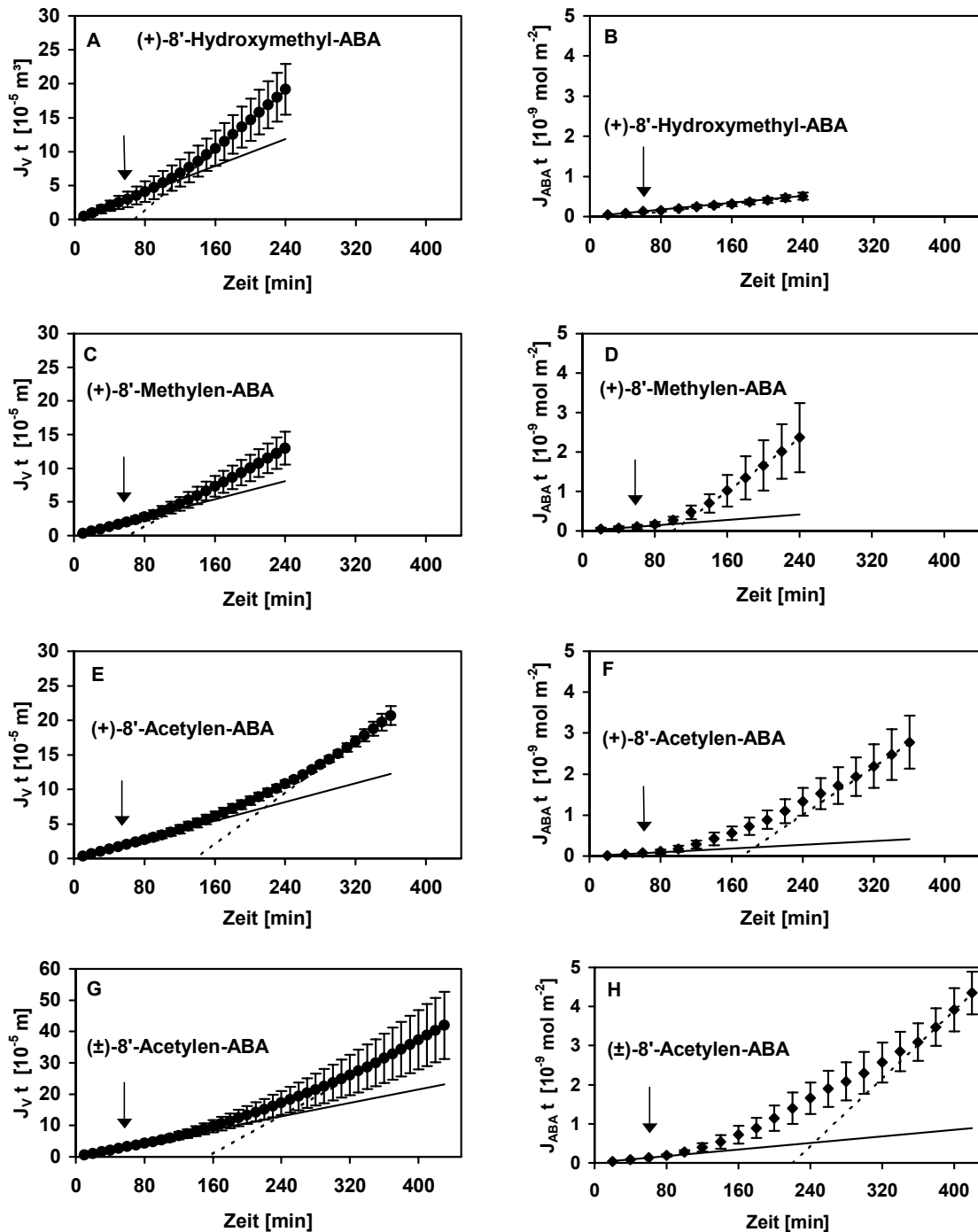
Beide Enantiomere stimulierten den radialen Wasserfluss. Im Falle des (+)-Abscisyl-Aldehyds war ein Anstieg um den Faktor  $2.5 \pm 0.5$  zu verzeichnen. Dieser Effekt sowie der zeitliche Verlauf war vergleichbar mit dem der (+)-ABA. Der (-)-ABaldehyd löste zwar einen Wasserflussanstieg um das  $3.3 \pm 0.7$ -fache aus, Gleichgewichtsbedingungen wurden aber erst 250 min nach Zugabe erreicht. Wurde (+)-Abscisyl-Aldehyd eingesetzt, konnte eine gleichzeitige Erhöhung der (+)-ABA-Konzentration im Xylem gemessen werden. Selbst 5 h nach Zugabe von (-)-Abscisyl-Aldehyd ins Medium blieb die (+)-ABA-Konzentration im Xylem unverändert.



**Abb. 3-13** Der Einfluss von 100 nM (+)- und (-)-ABaldehyd auf den radialen Wassertransport in dekapitierten Maiswurzelsystemen getestet in einem Saugexperiment durch Anlegen eines hydrostatischen Unterdrucks von  $-0.06 \text{ MPa}$ . MW  $\pm$  SD,  $n = 4$ .

**ABA-Analoga mit Modifikationen am 8'-C-Atom und ihr Einfluss auf  $J_v$**  (Tab. 3-9, Abb. 3-15 A-H). (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA erhöhte den radialen Wasserfluss um das 2.5-fache. Obwohl dieses Analogon zu 25% vom ABA-Antikörper erkannt wurde, war in den Xylemsaftproben kein signifikanter Anstieg von ABA-Äquivalenten zu verzeichnen. (+)-8'-

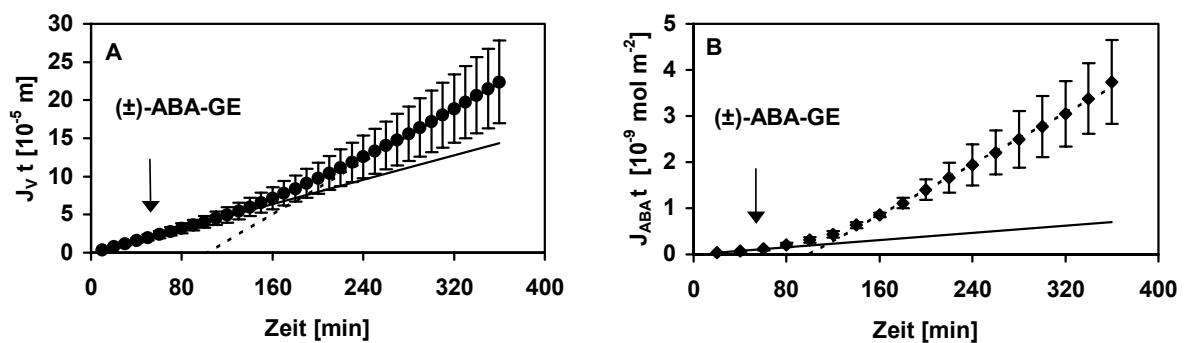
Acetylen-ABA förderte den radialen Wasserfluss über einen längeren Zeitraum (250 min) als (+)-8'-Methylen-ABA (130 min). Der Flussanstieg war nahezu gleich. Nach Zugabe beider Analoga zum Medium stieg die ABA-Konzentration im Xylem an. Das Racemat ( $\pm$ )-8'-Acetylen-ABA zeigte eine ähnliche physiologische Aktivität wie das (+)-Enantiomer.



**Abb. 3-15** ABA-Analoga modifiziert am 8'-C-Atom und ihr Einfluss auf den radialen Wassertransport (A,C,E,G).  $J_{ABA} t$  stellt den gleichzeitig auftretenden ABA-Fluss ins Xylem dar (B,D,F,H). MW  $\pm$  SD, n = 4.

### ABA-GE und sein Einfluss auf $J_V$ (Tab. 3-9, Abb. 3-14)

Wie schon unter 3.3.1 aufgezeigt, war auch bei diesem Versuch nach ABA-GE-Gabe ins Medium eine Förderung des radialen Wassertransportes (Anstieg um den Faktor: 2.2) und gleichzeitige Erhöhung der (+)-ABA-Konzentration im Xylem zu beobachten. Da sich der Anstieg über einen Zeitraum von 250 min erstreckte, kann die Wirksamkeit des ABA-GE mit der von (+)-8'-Acetylen-ABA verglichen werden.

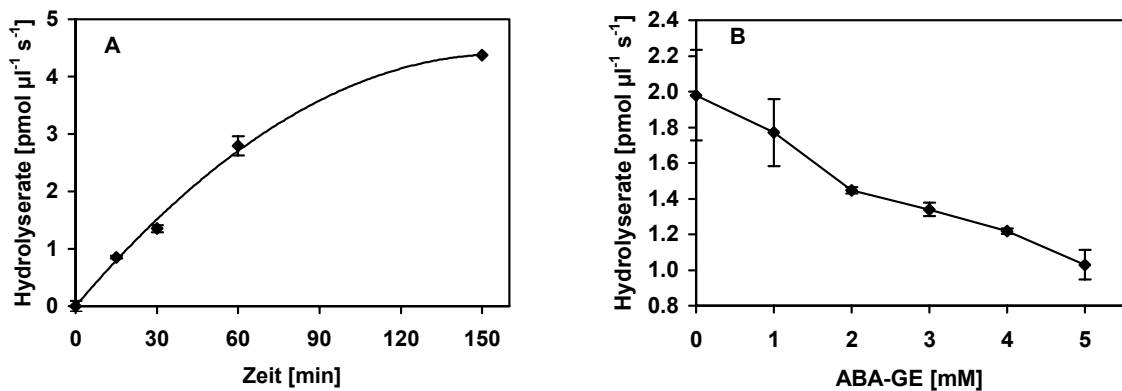


**Abb. 3-14** Der Einfluss von ABA-GE auf den radialen Wassertransport (A) in der Wurzel.  $J_{ABA} t$  stellt den gleichzeitig auftretenden ABA-Fluss ins Xylem dar (B). MW  $\pm$  SD, n = 4.

### 3.3 Apoplastische $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität in Maiswurzeln

Die interzelluläre Waschflüssigkeit (IWF) von in Hydrokultur angezogenen Maiswurzeln wurde mit Hilfe des Substrats p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (p-NPG) auf  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität getestet. Durch eine zeitabhängige Inkubation bei 37°C (Abb. 3-15 A) konnte eine Glucosidaseaktivität nachgewiesen werden, die innerhalb von 60 min kontinuierlich zunahm.

Abbildung 3-16 B stellt die Hemmung der Hydrolyseaktivität durch ABA-Glucoseester dar. Mit 5 mM ABA-GE wurde die Hydrolyse des Substrats p-NPG (0.66 mM) auf 52% reduziert.



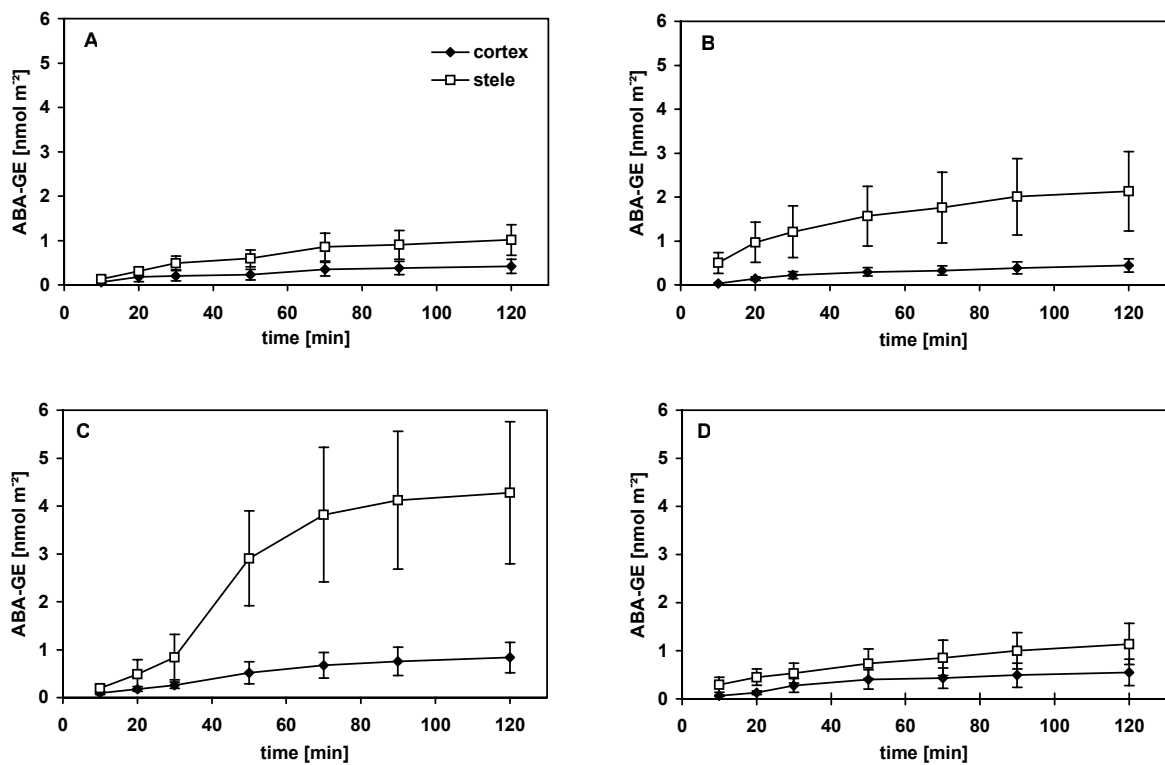
**Abb. 3-16** A) Zeitabhängigkeit der Hydrolyse von p-NPG. Zur Bestimmung der  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität in Abhängigkeit von der Zeit wurde jeweils 10  $\mu\text{l}$  IWF des Wurzelapoplasten 15, 30, 60 und 150 min mit dem Substrat p-NPG inkubiert. (MW  $\pm$  SD, n = 4). B) Kompetitive Hemmung der  $\beta$ -D-Glucosidase durch gleichzeitige Inkubation mit ABA-GE (0 – 5 mM) und dem Substrat p-NPG (0.66 mM). MW  $\pm$  SD, n = 3.

### 3.4 Der Efflux von ABA-GE und ABA aus kortikalen und stelären Geweben der Wurzel

Um ins Xylem zu gelangen, muss der im Wurzelsymplast gebildete Ester aus den Xylemparenchymzellen in den Apoplast freigesetzt werden. Dies wurde an 7 Tage alten und 3 cm langen Wurzelsegmenten, die in Wurzelkortex und Stele separiert waren, untersucht. Die Trennung der Gewebe erfolgte direkt an der Endodermis, welche meistens zerriss und partiell an Zentralzylinder und Kortexgewebe haften blieb. Aus Tabelle 3-10 wird ersichtlich, dass Rindensegmente ein größeres Frischgewicht sowie eine größere Oberfläche aufwiesen. Die Wurzelstelen besaßen dagegen einen höheren Anteil an Trockenmasse.

**Tab. 3-10** Vergleich von 3 cm langen Wurzelrinden- mit Zentralzylindersegmenten. Da jeweils sechs Segmente bei einem Versuchsansatz verwendet wurden, repräsentieren alle Daten immer die Summe aus diesen sechs Segmenten. MW  $\pm$  SD, n = 84 Versuchsansätze.

	FG [ $10^{-3}$ g]	TG [ $10^{-3}$ g]	FG/TG in %	Oberfläche [ $10^{-4}$ m <sup>2</sup> ]
Wurzelrindensegmente	146.3 $\pm$ 20.3	10.2 $\pm$ 2.6	7.0 $\pm$ 1.4	8.2 $\pm$ 1.0
Zentralzylindersegmente	27.2 $\pm$ 4.7	3.0 $\pm$ 0.6	11.5 $\pm$ 3.3	2.5 $\pm$ 0.4



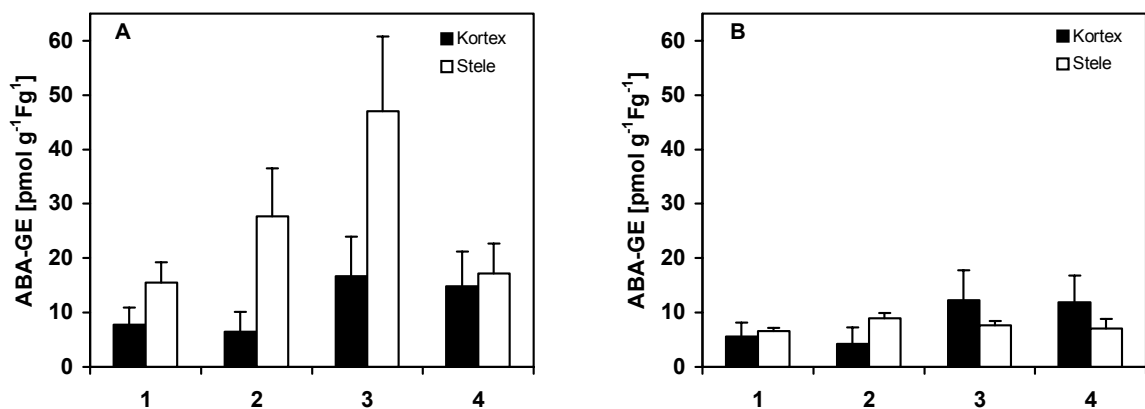
**Abb. 3-17** Freisetzung des ABA-Glucoseesters aus stelären und kortikalen Segmenten in ein hormonfreies Medium. Jeweils sechs Segmente wurden pro Versuchsansatz verwendet und für 24 h mit 5 nM ABA (A), 50 nM ABA (B), 50 nM ABA plus  $10^{-5}$  M Tetracyclis (C) und 50 nM ABA plus  $10^{-5}$  M Tetracyclis plus 100 mM NaCl (D) vorinkubiert und anschließend in ein hormonfreies Medium überführt. MW  $\pm$  SD, n = 3.

Wurzelrinden- und Stelensegmente wurden in getrennten Gefäßen 24 h mit 5 nM ABA, 50 nM ABA, 50 nM ABA plus Tetracyclis und 50 nM ABA plus Tetracyclis plus 100 mM NaCl inkubiert. Nach der anschließenden Überführung der Gewebe in hormonfreies Medium wurde der Efflux des Hormonkonjugats und der freien ABA aus dem Gewebe bestimmt. Abbildung 3-17 zeigt, dass ungeachtet der unterschiedlichen Behandlungen Stelensegmente mehr ABA-GE ans Medium abgaben als Rindensegmente. Dies war besonders deutlich bei der Vorinkubation mit  $10^{-5}$  M Tetracyclis, welches den oxidativen Abbau der ABA verringert und gleichzeitig die ABA-GE-Bildung fördert (Zeevaart et al., 1988). Überraschenderweise verringerte eine Behandlung mit 100 mM NaCl die Freisetzung von ABA-GE ins Medium.

In Abbildung 3-18 werden die endogenen ABA-GE-Spiegel vor und nach dem Effluxexperiment dargestellt. Nach der Vorinkubation mit ABA enthielten die Segmente des Zentralzylinders mehr ABA-GE als die der Wurzelrinde. Den höchsten ABA-GE-Gehalt besaßen steläre Segmente, die mit 50 nM ABA und Tetracyclis vorbehandelt waren. Dieses

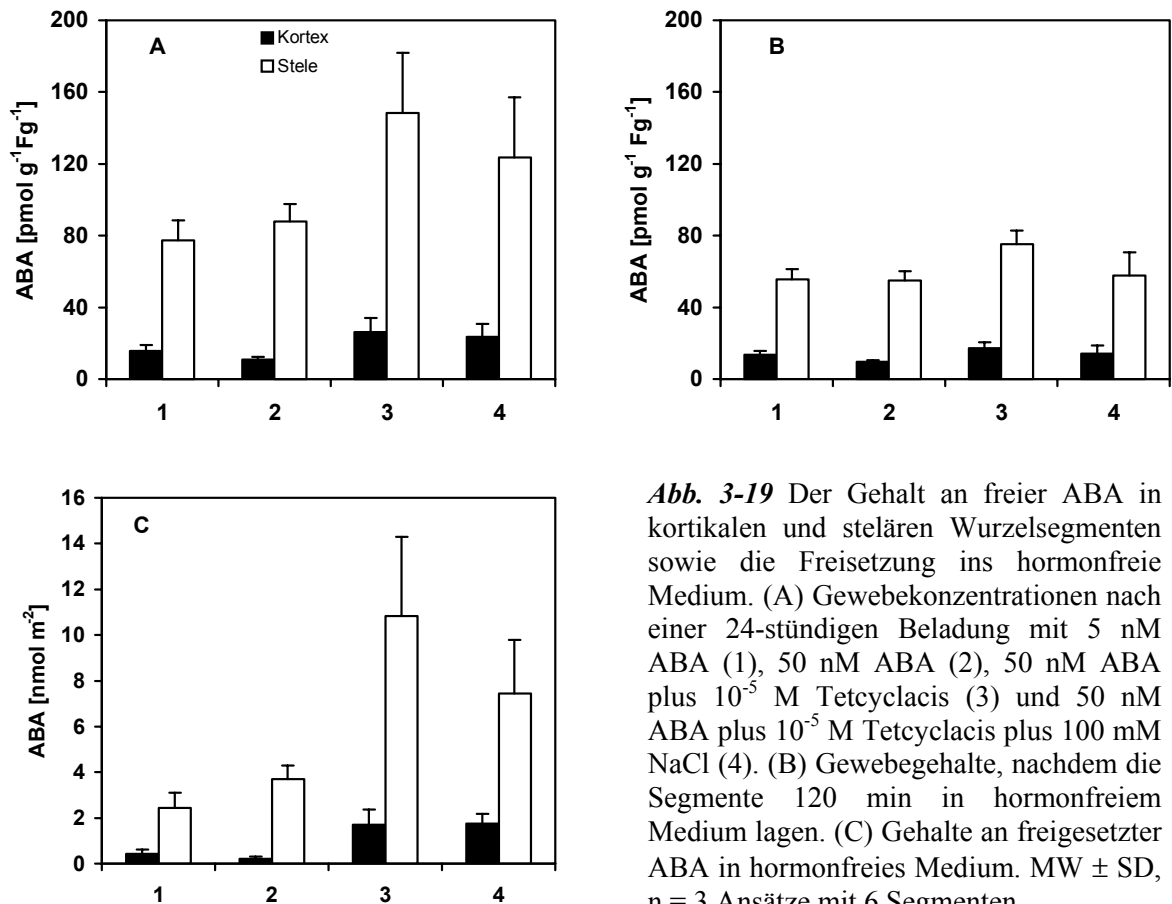


Ergebnis stimmt gut mit dem in Abbildung 3-17 dargestellten erhöhten Efflux ins hormonfreie Medium überein. Der geringe steläre ABA-GE-Gehalt nach der Vorbehandlung mit 100 mM NaCl, 50 nM ABA und Tetcyclacis (Abb 3-18 A) erklärt somit auch die niedrige Freisetzungsrate. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Beladung der Segmente mit ABA die Konjugatbildung förderte, besonders bei gleichzeitiger Hemmung des oxidativen Abbaus. Diese Konjugatbildung fand verstärkt im stelären Gewebe statt.



**Abb. 3-18** ABA-GE-Gehalte in kortikalen und stelären Gewebesegmenten vor (A) und nach (B) einem Effluxexperiment. (A) Nach einer 24-stündigen Beladung mit 5 nM ABA (1), 50 nM ABA (2), 50 nM ABA plus 10<sup>-5</sup> M Tetcyclacis (3) und 50 nM ABA plus 10<sup>-5</sup> M Tetcyclacis plus 100 mM NaCl (4). (B) Nach dem 120-minütigen Efflux in ein hormonfreies Medium.

Ein ähnliches Ergebnis findet man bei der Betrachtung der freien ABA im Gewebe sowie beim Efflux ins hormonfreie Medium. Aus Abbildung 3-19 wird ersichtlich, dass die Zentralzylinder sowohl verstärkt ABA aufnehmen als auch abgeben. Jedoch zeigte hier die Behandlung mit Salz einen deutlicheren Effekt auf den ABA-Efflux als beim ABA-GE.



**Abb. 3-19** Der Gehalt an freier ABA in kortikalen und stelären Wurzelsegmenten sowie die Freisetzung ins hormonfreie Medium. (A) Gewebekonzentrationen nach einer 24-stündigen Beladung mit 5 nM ABA (1), 50 nM ABA (2), 50 nM ABA plus  $10^{-5}$  M Tetcyclacis (3) und 50 nM ABA plus  $10^{-5}$  M Tetcyclacis plus 100 mM NaCl (4). (B) Gewebegehalte, nachdem die Segmente 120 min in hormonfreiem Medium lagen. (C) Gehalte an freigesetzter ABA in hormonfreies Medium. MW  $\pm$  SD, n = 3 Ansätze mit 6 Segmenten.

### 3.5 Langstreckentransport durch Sprossabschnitte

Es ist wenig darüber bekannt, ob die aus den Wurzeln stammende und im Xylem transportierte ABA sowie deren Konjugat verlustfrei durch den Spross weitergeleitet werden. Jeschke et al. (1997 a, b) als auch Jokhan et al. (1999) haben gezeigt, dass signifikante Mengen beider Botenstoffe aus dem Spross in die Blätter umverteilt werden können. Somit befindet sich im Xylem oberhalb eines Nodiums eine deutlich geringere Konzentration beider Botenstoffe. Um eine eventuelle Beteiligung des parenchymatischen Sprossgewebes an der Modulation des ABA- bzw. ABA-GE-Signals im Xylem aufzuzeigen, wurden Perfusionsexperimente (2.8.2) mit Bohneninternodien und Mesokotylsegmenten von etiolierten Maispflanzen durchgeführt. Hierbei wurde das verwendete Perfusionsmedium so verändert, dass verschiedene Stresssituationen simuliert werden konnten.

### 3.5.1 Sprosswachstum und anatomische Parameter

Um ABA-Flüsse aus dem umgebenden Parenchym in die Xylemgefäße bestimmen zu können, wurde die innere Oberfläche der leitenden Xylemgefäße benötigt. Die Leitfähigkeit der Sprosse und Mesokotyle hängt stark vom Radius der leitenden Gefäße ab. Eine detaillierte anatomische Untersuchung war deshalb notwendig.

Etiolierte Maiskaryopsen zeigten ein verstärktes Mesokotylwachstum. Nach fünf Tagen im Dunkeln erreichten die Mesokotyle im Mittel eine Länge von  $6.0 \pm 1.0$  cm, ein Frischgewicht von  $0.21 \pm 0.03$  g und ihr Durchmesser betrug ca. 2 mm (Tab. 3-11).

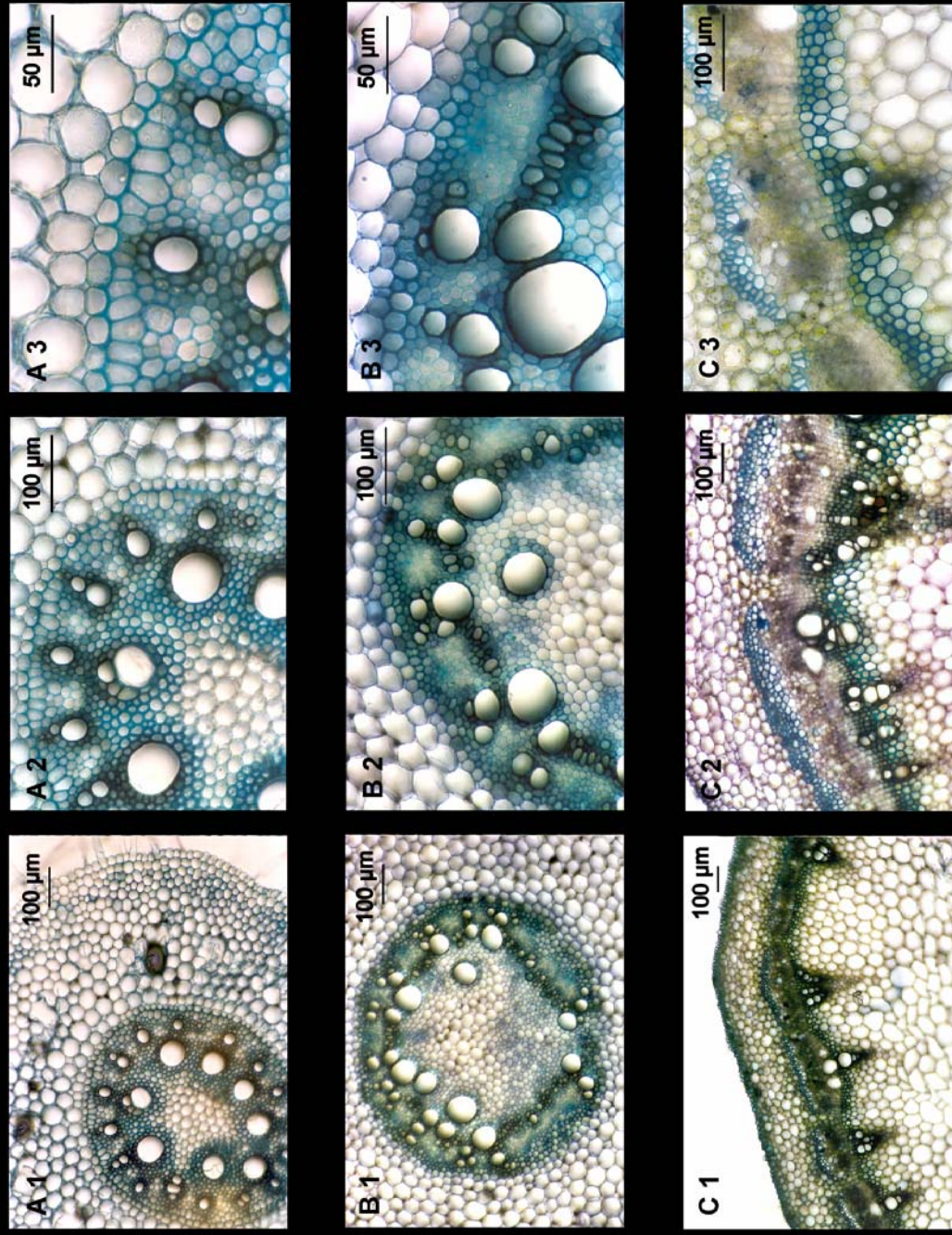
**Tab. 3-11** Vergleich von etiolierten Maismesokotylsegmenten mit ersten Bohneninternodien. MW  $\pm$  SD, n = 48 Mesokotylsegmente, n = 54 Internodien.

	Fg [g]	Länge [cm]	Durchmesser [cm]
Mesokotyl	$0.21 \pm 0.03$	$6.0 \pm 1.0$	$0.22 \pm 0.03$
Internodium	$0.72 \pm 0.18$	$8.8 \pm 1.5$	$0.30 \pm 0.04$

Die anatomische Struktur eines Mesokotylsegments ähnelte sehr stark der einer Maiswurzel. Obwohl es sich beim Mesokotyl um einen Sprossabschnitt handelte, war im Querschnitt ein Zentralzylinder erkennbar (Abb. 3-20 A und B) sowie eine sekundär suberinisierte Endodermis. Im Zentralzylinder entsprach die Anordnung von Phloem und Xylem ebenfalls der in einer Wurzel (Abb. 3-20 A2, B2). Allerdings konnte beim Mesokotyl verstärkt sklerenchymatisches Gewebe an der Peripherie des zentralen Markgewebes beobachtet werden und einige Lakunen.

Das erste Internodium der Bohnenpflanzen wurde ebenfalls verwendet. Dieses besaß nach der 10-tägigen Anzucht im Gewächshaus eine durchschnittliche Länge von  $8.8 \pm 1.5$  cm. Das Frischgewicht war um das 3.4-fache höher als das der Mesokotyle und auch der mittlere Durchmesser von 3 mm war um den Faktor 1.4 größer.

Querschnitte zeigten die typischen anatomischen Details eines Sprosses. So konnten im Mittel  $15 \pm 2$  ringförmig angeordnete Leitbündel bei 20 Internodien ausgezählt werden (Abb. 3-20 C). Es handelte sich dabei um kollateral offene Leitbündel. Phloem und Xylem wurden durch ein faszikuläres Kambium getrennt. Auch der Markstrahlenbereich, der oftmals nur sehr schmal ausgebildet war, wurde von einem sekundären interfaszikulären Kambium durchzogen, und somit war ein geschlossener Kambiumring vorhanden.



**Abb. 3-20** Handquerschnitte von A 1-3 : 11 Tage alten Maiswurzeln aus Hydrokultur kurz unterhalb der Karyopse, B 1-3: etiolierten Maismesokotylen und C 1-3: ersten Bohneninternodien. Die frischen Schnitte wurden mit Toluidin-Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop bei den Vergrößerungen 6.3 x, 10 x, 20x und 40x fotografisch dokumentiert.

Um die zelluläre Dimension des Xylems zu ermitteln, wurden die mit Toluidinblau angefärbten Sprossquerschnitte mikroskopisch ausgewertet. Gefäße, die kleiner als 6  $\mu\text{m}$  im Durchmesser waren und zudem keine deutliche Anfärbung ihrer Zellwände aufwiesen, wurden vernachlässigt. Die Bestimmung der Xylemgefäßradien war Voraussetzung für die Berechnung der inneren Oberfläche aller Gefäße sowie von deren Gesamtvolumen (Tab. 3-12).

**Tab. 3-12** Vergleich des Xylems von etiolierten Maismesokotylesegmenten mit ersten Bohneninternodien. Die Anzahl sowie Dimensionen der Xylemgefäße wurden mikroskopisch bestimmt. MW  $\pm$  SD, n = 20.

	Bohneninternodium	Maismesokotyl
Anzahl der Xylemgefäße	205 $\pm$ 46	61 $\pm$ 9
Anzahl kleinerer Gefäße	191 $\pm$ 40	51 $\pm$ 9
Radius: 6.3 – 21.3 $10^{-6}$ m		
Anzahl größerer Gefäße	14 $\pm$ 10	10 $\pm$ 1
Radius: 22.5 – 51.3 $10^{-6}$ m		
Durchschnittlicher Gefäßradius [m]	14.4 $\pm$ 1.4 $10^{-6}$ m	12.4 $\pm$ 1.3 $10^{-6}$ m
Gesamte innere Oberfläche der Gefäße [ $\text{m}^2$ ]	145.3 $\pm$ 50.6 $10^{-3}$ $\text{m}^2$	29.1 $\pm$ 3.1 $10^{-3}$ $\text{m}^2$
Gesamtvolumen der Gefäße [ $\text{m}^3$ ]	10.4 $\pm$ 4.5 $10^{-9}$ $\text{m}^3$	2.8 $\pm$ 0.4 $10^{-9}$ $\text{m}^3$

Die Anzahl der Xylemgefäße im Bohneninternodium überstieg die des Maismesokotyls. Andererseits war eine deutlich höhere Anzahl an Metaxylemgefäßen mit großen Durchmessern bei den Mesokotylen zu finden. Die gesamte innere Oberfläche aller Xylemgefäße der Mesokotylsegmente war um das 5-fache geringer als bei den Internodien. Das Gesamtvolumen der Xylemelemente der Internodien übertraf das der Mesokotyle um den Faktor 3.7.

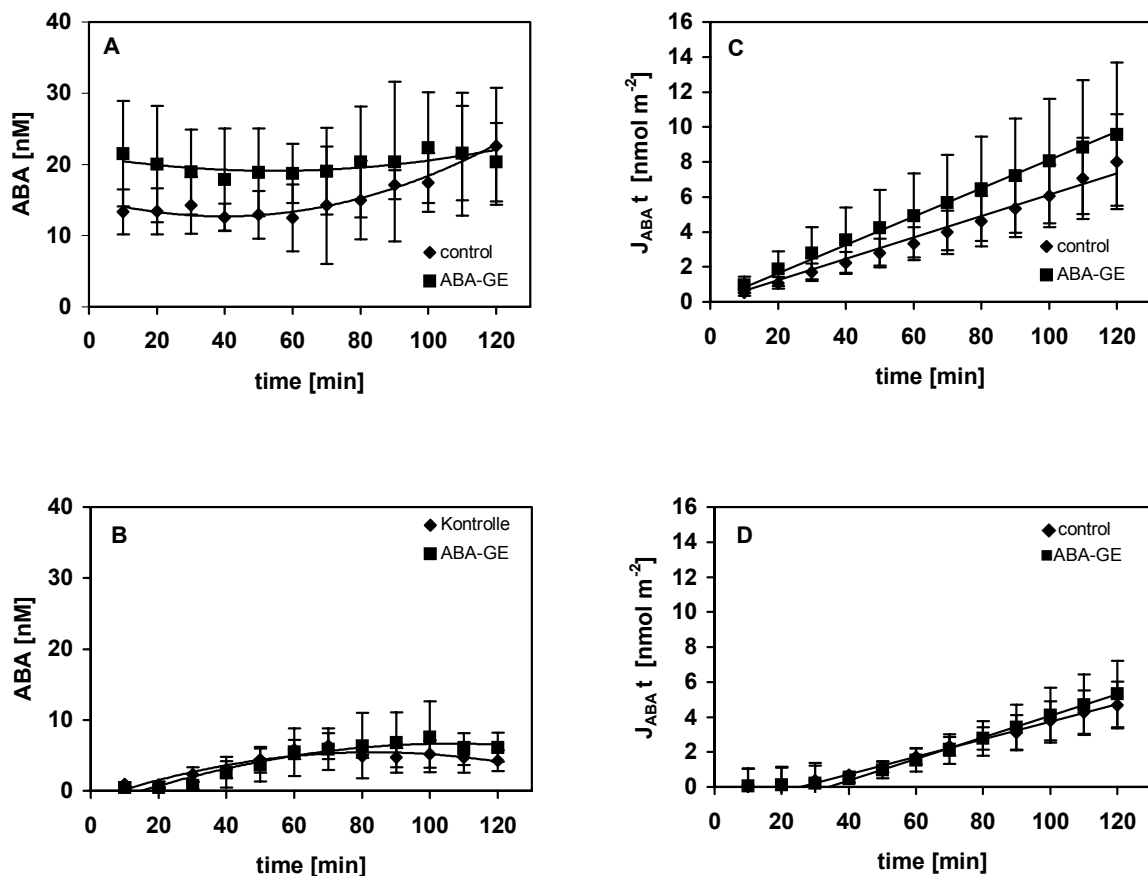
### 3.5.2 Saugexperimente mit Maismesokotylsegmenten und ersten Bohneninternodien

Bohneninternodien oder Maismesokotylsegmente wurden druckdicht an einer Saugapparatur befestigt. Während der Saugperiode wurde ein Unterdruck von -0.02 MPa beim Bohneninternodium und -0.005 MPa beim Mesokotylsegment angelegt. Dieser Unterdruck bewirkte einen longitudinalen Wasserfluss  $J_V$  durch das jeweilige Segment, wie er in einer transpirierenden Pflanze vorstellbar ist. Die jeweiligen Wasserflüsse der Kontrollen und von

Segmenten, die mit ABA-GE im Außenmedium gesaugt wurden, sind in Tabelle 3-13 aufgeführt.

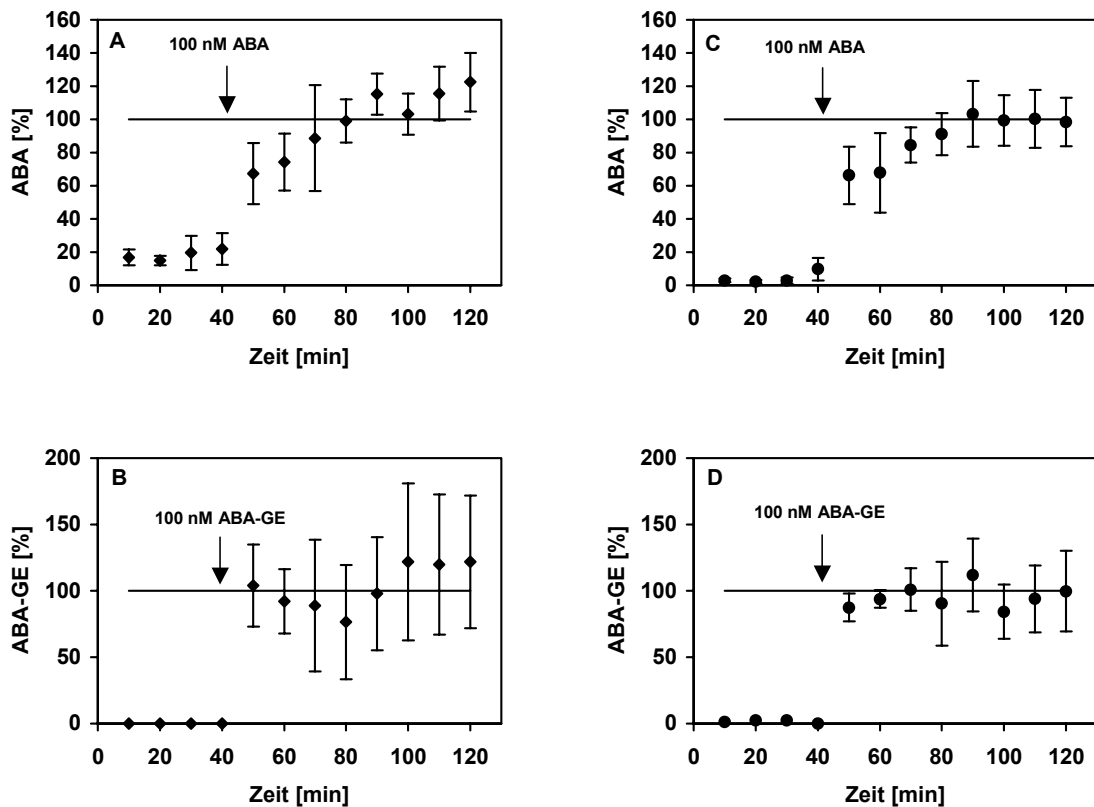
**Tab. 3-13** Abscisinsäurefluss ( $J_{ABA}$ ) aus dem Xylemparenchym in die Leitungsgefäße des Xylems sowie der Wasserfluss ( $J_V$ ) durch das erste Bohneninternodium und etiolierte Maismesokotylsegment. Durch beide Segmente wurde in zwei Versuchsansätzen über 120 min ein ABA-freies P&S-Nährmedium (pH 5.8) perfundiert. Beim zweiten Versuchsansatz wurden 40 min nach Beginn das Saugmedium auf 100 nM ABA-GE eingestellt. MW  $\pm$  SD (n= 6).

	Kontrolle		ABA-GE	
	$J_{ABA}$	$J_V$	$J_{ABA}$	$J_V$
	$[10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}]$	$[10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}]$	$[10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}]$	$[10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}]$
Bohne	$1.10 \pm 0.39$	$0.12 \pm 0.03$	$1.62 \pm 0.56$	$0.09 \pm 0.01$
Mais	$0.85 \pm 0.27$	$0.13 \pm 0.04$	$1.06 \pm 0.39$	$0.14 \pm 0.05$



**Abb. 3-21** Zeitlicher Verlauf der ABA-Konzentrationsänderung im Xylem (A, B) sowie ABA-Flüsse (C, D) aus dem parenchymatischen Sprossgewebe ins Xylem von 8.8 cm langen ersten Bohneninternodien (A, C) und 6.0 cm langen Maismesokotylen (B, D). Das Perfusionsmedium besaß einen pH-Wert von 5.8. In einem zweiten Ansatz wurde dem Medium ABA-GE bis zu einer Endkonzentration von 100 nM zugesetzt. MW  $\pm$  SD, n = 6.

Während der Passage von ABA-freiem Medium durch Sprosssegmente kam es zu einem ABA-Efflux aus dem umgebenden parenchymatischen Gewebe in das Perfusionsmedium. Dies resultierte in einer Xylem-ABA-Konzentration von  $3.9 \pm 1.8$  nM bei den Mesokotylsegmenten und  $15.3 \pm 3.4$  nM bei den Bohneninternodien. Wurde ABA-GE (100 nM) dem Perfusionsmedium zugefügt, konnte ebenfalls freie ABA im Xylem gemessen werden (Abb. 3-21 A, B). Der ABA-Fluss ( $J_{\text{ABA}}$ ) aus dem parenchymatischen Gewebe des Sprosses in das Xylem wurde berechnet aus der gemessenen ABA-Konzentration im Xylem, dem Xylemsaftvolumen, den Saugintervallen (in Sekunden) und der gesamten inneren Xylemgefäßoberfläche. Bei beiden Sprosstypen lag  $J_{\text{ABA}}$  im Mittel bei  $1 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Tab. 3-13, Abb. 3-21 C,D).



**Abb. 3-22** Änderung der ABA- bzw. ABA-GE-Konzentrationen während der Passage durch ein erstes Bohneninternodium (A, B) und etioliertes Maismesokotyl (B, D). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die externe Zugabe des jeweiligen Botenstoffes, wobei diese als 100% angenommen wurde. MW  $\pm$  SD, n = 5.

Eine Konzentration von 100 nM ABA konnte schon oftmals im Xylem trockengestresster Pflanzen nachgewiesen werden (Fort et al. 1998). Daher wurde 40 min nach Versuchsbeginn das Perfusionsmedium auf diese Konzentration eingestellt. Bei beiden Sprosssegmenttypen

war eine Verzögerung um 30 bis 40 min zu beobachten, bevor die ABA-Konzentration des Xylems die Konzentration des extern applizierten Mediums erreichte (Abb. 3-22 A, C). Nach Versuchsende konnte auch im parenchymatischen Gewebe des Bohneninternodiums eine Erhöhung des ABA-Gehaltes ( $47.8 \pm 8.6 \text{ pmol g}^{-1} \text{ Fg}^{-1}$ ) um den Faktor 3 gegenüber den Kontrollsegmenten ( $16.0 \pm 4.5 \text{ pmol g}^{-1} \text{ Fg}^{-1}$ ) gemessen werden. Wurde ABA-GE dem Außenmedium zugefügt (100 nM Endkonzentration), so erreichte der geerntete Xylemsaft schon innerhalb der ersten 10 min nach Zugabe die ABA-GE-Konzentrationen des Perfusionsmediums (Abb. 3-22 B, D).

Eine Tetcyclacisvorbehandlung der Segmente wurde gewählt, um den oxidativen Abbau der ABA, die möglicherweise während der Saugperiode in das das Xylem umgebende parenchymatische Gewebe übertritt, zu vermeiden (Daeter & Hartung 1990). Tatsächlich konnte in diesem Fall eine Erhöhung des Gewebe-ABA-Gehaltes ( $69.8 \pm 17.4 \text{ pmol g}^{-1} \text{ Fg}^{-1}$ ) um den Faktor 4.4 gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. In weiteren Versuchansätzen wurde Salzstress, eine Xylem-pH-Erhöhung (pH 7) und verstärkter Transpirationsstrom simuliert (Tab. 3-14). Bei all diesen Behandlungen konnte eine Zunahme des ABA-Flusses aus den parenchymatischen Zellen in die Xylemelemente beobachtet werden (Tetcyclacis: + 61%, 100mM NaCl: +109%, pH 7.0: +150 %, -0.04 MPa: +175%).

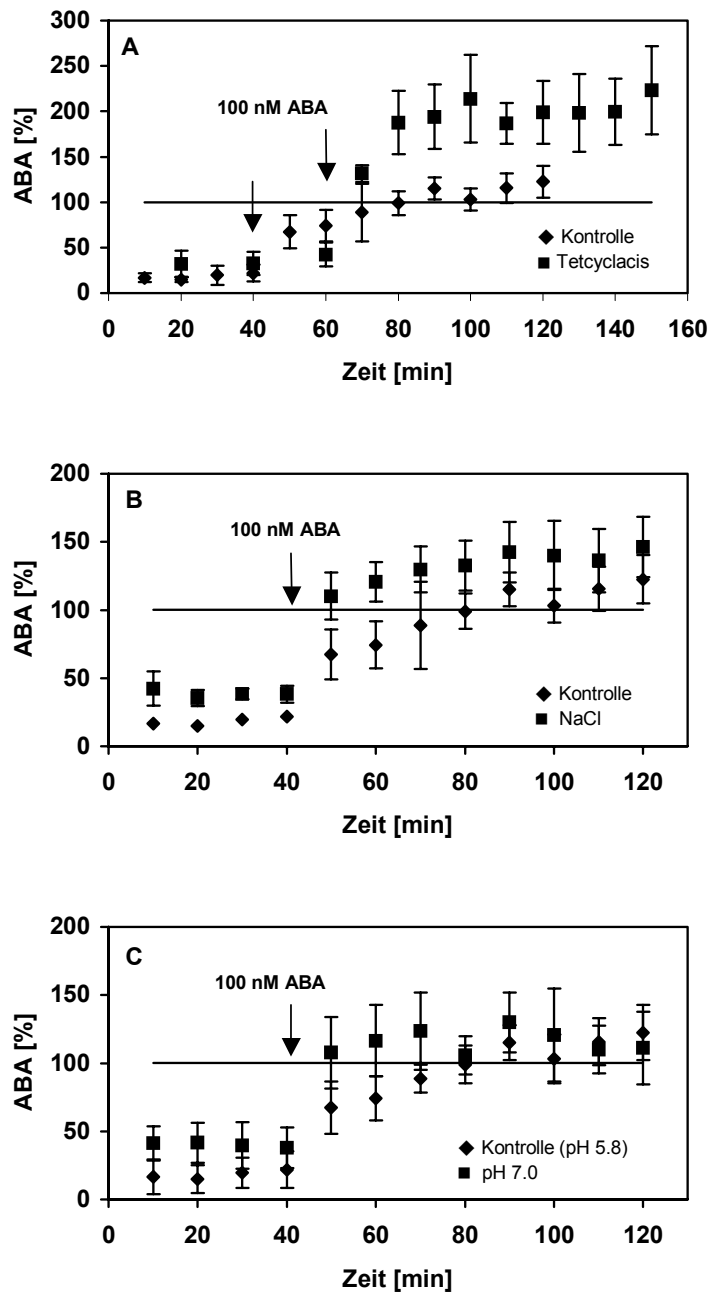
**Tab. 3-14** Abscisinsäure-Flüsse ( $J_{\text{ABA}}$ ) ins Xylem aus dem umgebenden Parenchym des ersten Bohneninternodiums sowie der longitudinale Wasserfluss  $J_{\text{V}}$  durch ein solches Segment. Subatmosphärische Drücke von -0.02 und -0.04 MPa wurden für 40 min angelegt. MW  $\pm$  SD, n = 5.

Perfusionsmedien	$J_{\text{V}}$ [ $10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ]	$J_{\text{ABA}}$ [ $10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ]	$J_{\text{ABA}}$ % Erhöhung
Kontrolle, pH 5.8	$0.12 \pm 0.03$	$1.03 \pm 0.42$	0
$10^{-5} \text{ M}$ Tetcyclacis, pH 5.8	$0.16 \pm 0.003$	$1.66 \pm 0.54$	61
100 mM NaCl, pH 5.8	$0.16 \pm 0.05$	$2.16 \pm 0.36$	109
pH 7.0	$0.16 \pm 0.003$	$2.58 \pm 0.37$	150
p -0.04, pH 5.8	$0.41 \pm 0.01$	$2.89 \pm 0.77$	181

Als Voraussetzung für die Kalkulation von  $J_{\text{ABA}}$  und  $J_{\text{V}}$  musste sowohl die Menge des durchgesaugten Mediums als auch die ABA-Konzentration konstant sein. Da dies innerhalb von 40 min nur bei den internodialen Segmenten der Fall war, wurde eine Berechnung von Transportparametern für die Maismesokotylsegmente nicht vorgenommen.



Wurde mit 100 nM ABA perfundiert, war eine zusätzliche Erhöhung des Xylemsaft-ABA-Gehaltes zu verzeichnen. Bei der Tetcyclacisbehandlung zeigte sich dieser Effekt besonders deutlich ( $+ 100 \pm 38\%$ ), während Salzstress, erhöhter pH sowie Wasserfluss weniger wirksam waren (100 mM NaCl:  $+ 32 \pm 20\%$ , pH 7.0:  $+ 16 \pm 20\%$ ; Abb. 3-23).



**Abb. 3-23** Der Einfluss von  $10^{-5}$  M Tetcyclacis, 100 mM NaCl und pH 7 auf die im Xylem von ersten Bohneninternodien transportierte ABA-Menge. Das Perfusionsmedium wies einen pH von 5.8 auf oder wurde durch Zugabe von MOPS-KOH-Puffer auf 7 erhöht. Vierzig Minuten nach Versuchsbeginn (im Fall von Tetcyclacis waren es 60 min) wurde das externe Medium auf 100 nM ABA eingestellt. Die Angaben erfolgen in % der externen ABA-Konzentration. MW  $\pm$  SD, n = 5.

### 3.6 ABA-GE und die hydrolytische Aktivität in Gerstenblatt-IWF

Untersuchungen von Hansen und Dörffling (2000) zufolge ist das häufigste ABA-Konjugat im Xylemsaft trockengestresster Sonnenblumen der ABA-Glucoseester. Ein verstärkter Xylemtransport dieses ABA-Konjugates lässt die Frage aufkommen, welche Funktion der aus den Wurzeln stammende ABA-GE im Blattapoplasten besitzt. Baier et al. (1990) konnten aufzeigen, dass der Permeabilitätskoeffizient des ABA-GE für Plasmamembranen des Mesophylls sehr gering ist ( $10^{-11} \text{ ms}^{-1}$ ) und somit eine direkte Aufnahme durch Diffusion unwahrscheinlich erscheint. Abscisinsäure-Glucoseester gilt als ein Endmetabolit der ABA (Kaiser et al. 1985), der keine physiologische Wirkung auf Stomata oder Meristeme besitzt. Holden und Rohringer (1985) wiesen durch 2-D-Elektrophorese extrazelluläre Glucosidasen im Apoplastensaft von Gerste nach. Diese Entdeckung ließ vermuten, dass durch eine apoplastische Glucosidaseaktivität ABA aus dem Konjugat freigesetzt werden könnte. Freie ABA gelangt schließlich in die Mesophyllzellen und kann dort physiologisch aktiv werden. In diesem und den folgenden Abschnitten 3.7 bis 3.9 werden die Versuchsergebnisse zu der oben dargelegten Fragestellung aufgezeigt.

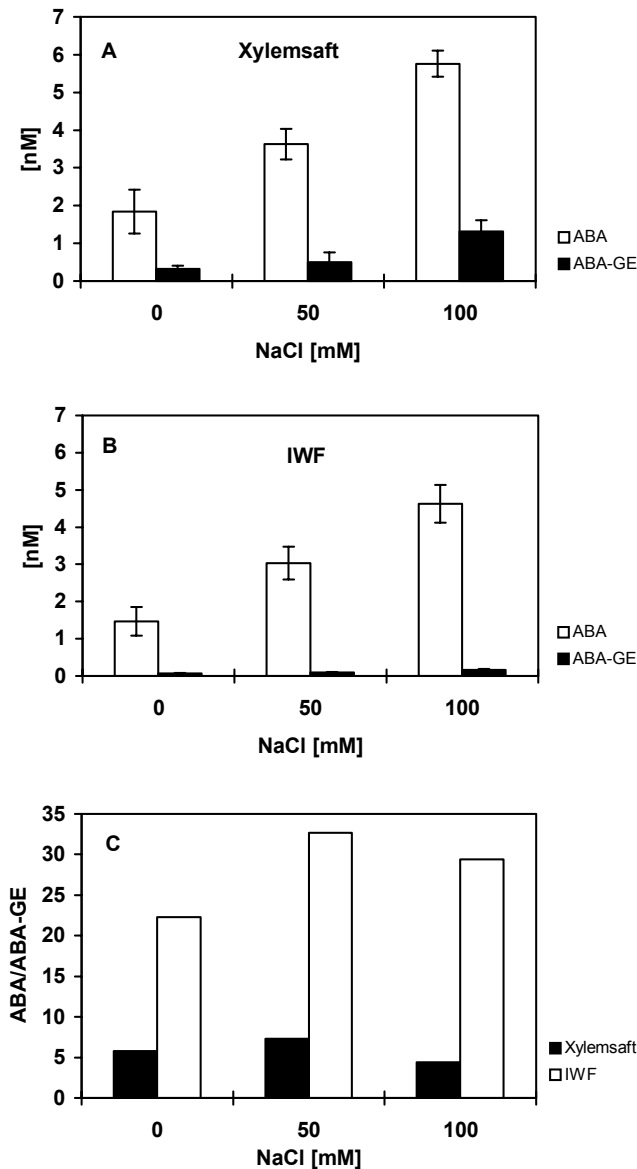
#### 3.6.1 ABA- und ABA-GE-Gehalte in Xylemsaft und IWF von Gerstenkeimlingen

Von dekapitierten Wurzelsystemen 11 Tage alter Gerstenkeimlinge, die ohne und mit einer Salzbelastung (50 mM, 100 mM NaCl) in Hydrokultur angezogen waren, wurde Xylemsaft gewonnen. Mittels ELISA konnte die ABA- sowie ABA-GE-Konzentration in den Xylemsäften ermittelt werden. Aus den erhaltenen Daten war abzulesen, dass der ABA-Transport im Xylem sowie der des Konjugats mit zunehmendem Salzstress anstieg (Abb. 3-24 A).

Freie ABA wurde im Konzentrationsbereich von  $1.8 \pm 0.6 \text{ nM}$  (Kontrolle) bis  $5.8 \pm 0.4 \text{ nM}$  (100 mM NaCl) nachgewiesen. Die gefundenen Konjugatkonzentrationen reichten von 0.3 nM (Kontrolle) bis 1.3 nM (100 mM NaCl). Daraus ergab sich ein ABA/ABA-Konjugat-Verhältnis von 4-7. Untersuchungen von Hansen und Dörffling (1999) bestätigten, dass ABA-GE den Hauptanteil der im Xylem transportierten ABA-Konjugate darstellt.

IWF aus Primärblättern von Gerstenkeimlingen, die unterschiedlicher Salzbelastung ausgesetzt waren, wies ähnliche ABA-Konzentrationen ( $1.5 \pm 0.4 \text{ nM}$  bis  $4.6 \pm 0.5 \text{ nM}$ , Abb. 3-24 B) auf wie der Xylemsaft. Obwohl Salzstress den ABA-GE-Gehalt im Xylem verstärkte,

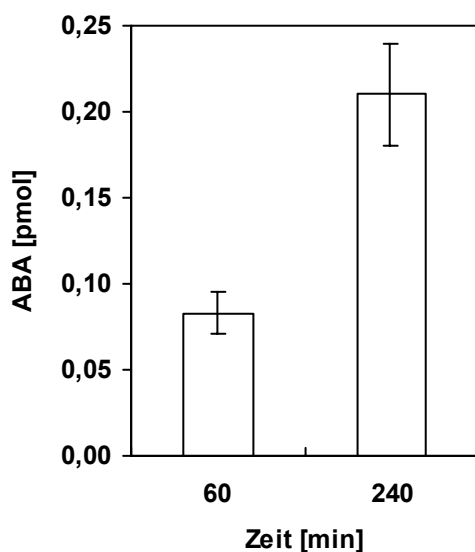
lag die extrazelluläre ABA-GE-Konzentration sogar bei einer Salzbelastung von 100 mM unter 0.2 nM. Das ABA/ABA-Konjugat-Verhältnis im Blattapoplasten lag somit bei 22-32 (Abb. 3-24 C).



**Abb. 3-24** ABA- und ABA-GE-Konzentrationen im Xylemsaft (A) sowie Blatt-IWF (B) von 11 Tage alten Gerstenkeimlingen, die mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen belastet wurden. (C) stellt das gefundene ABA/ABA-GE-Verhältnis im Xylemsaft sowie IWF dar. MW  $\pm$  SD, n = 5.

### 3.6.2 Hydrolyse von ABA-GE durch apoplastische Enzyme

Die Resultate des obigen Abschnittes lassen die Existenz einer hydrolytischen Enzymaktivität gegenüber dem ABA-Konjugat im Gerstenblatt-IWF vermuten. Aus diesem Grund wurde ABA-GE ( $10^{-6}$  M) mit IWF (pH 6.5) vermischt und für 1 h oder 4 h inkubiert. Abbildung 3-25 zeigt eindeutig, dass ABA-Glucoseester hydrolysiert wurde und ein Anstieg der freien ABA mit zunehmender Inkubationsdauer zu verzeichnen war.



**Abb. 3-25** Hydrolyse von ABA-GE durch IWF. Zu 100  $\mu$ l IWF wurde  $10^{-6}$  M ABA-GE gegeben. Nach der ein- oder vierstündigen Inkubation wurde die aus dem Konjugat freigesetzte ABA mittels ELISA detektiert. MW  $\pm$  SD, n = 5.

In welchem Ausmaß der ABA-GE-Gehalt im IWF einen Einfluss auf die Hydrolyserate der extrazellulären Glucosidase nimmt, konnte mit einer Konzentrationsreihe ausgetestet werden. Intrazelluläre Waschflüssigkeit wurde mit ABA-GE-Konzentrationen im Bereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-10}$  M inkubiert und anschließend die Freisetzung der ABA ermittelt. Ab dem nanomolaren Bereich, welcher die natürlich vorkommenden ABA-GE-Konzentrationen in einer Pflanze widerspiegelt, konnte bis zu 40% freigesetzte ABA nachgewiesen werden (Tab. 3-15).

**Tab. 3-15** Freisetzung von ABA aus ABA-GE mittels extrazellulärer Glucosidase. Intrazelluläre Waschflüssigkeit (100  $\mu$ l) wurde für 1 h mit unterschiedlichen ABA-GE-Konzentrationen inkubiert und anschließend die freie ABA analysiert. MW  $\pm$  SD, n = 3.

eingesetzter ABA-GE [mol l <sup>-1</sup> ]	ABA-GE [mol pro 100 $\mu$ l Versuchsansatz]	freigesetzte ABA [10 <sup>-13</sup> mol pro 100 $\mu$ l Versuchsansatz]	freigesetzte ABA in % der eingesetzten ABA-GE-Konzentration
$10^{-4}$	$10^{-8}$	2.61 $\pm$ 0.52	0.003 $\pm$ 0.001
$10^{-5}$	$10^{-9}$	2.60 $\pm$ 0,26	0.03 $\pm$ 0.00
$10^{-6}$	$10^{-10}$	0.99 $\pm$ 0,05	0.10 $\pm$ 0.00
$10^{-7}$	$10^{-11}$	0.23 $\pm$ 0,11	0.23 $\pm$ 0.11
$10^{-8}$	$10^{-12}$	0.16 $\pm$ 0,03	1.57 $\pm$ 0.29
$10^{-9}$	$10^{-13}$	0.03 $\pm$ 0.01	3.35 $\pm$ 1.34
$10^{-10}$	$10^{-14}$	0.04 $\pm$ 0.01	40.50 $\pm$ 14.46

### 3.6.3 Proteinbezogene $\beta$ -D-Glucosidase Aktivität in Blatthextrakt und IWF

Um zu zeigen, dass ein signifikanter Anteil der  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität des Gesamtblattes im Apoplast lokalisiert ist, wurde eine Protein- und Aktivitätsbestimmung mit Blatthextrakten sowie mit Blatt-IWF durchgeführt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit dem Standardtest (2.9.2, 0.66 mM p-NPG als Substrat), der Proteingehalt wurde mit dem Bio-Rad-Proteintest (2.10.4) bestimmt. Im IWF betrug die  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität  $5.77 \pm 0.73$  nmol  $\text{mg}^{-1}$  Protein $^{-1}$  s $^{-1}$  (MW  $\pm$  SD, n = 5), hingegen im Blatthextrakt nur  $0.36 \pm 0.02$  nmol  $\text{mg}^{-1}$  Protein $^{-1}$  s $^{-1}$  (MW  $\pm$  SD, n = 5). Daraus ergab sich eine 16-fache Anreicherung dieser spezifischen Aktivität im IWF gegenüber dem Blatthextrakt.

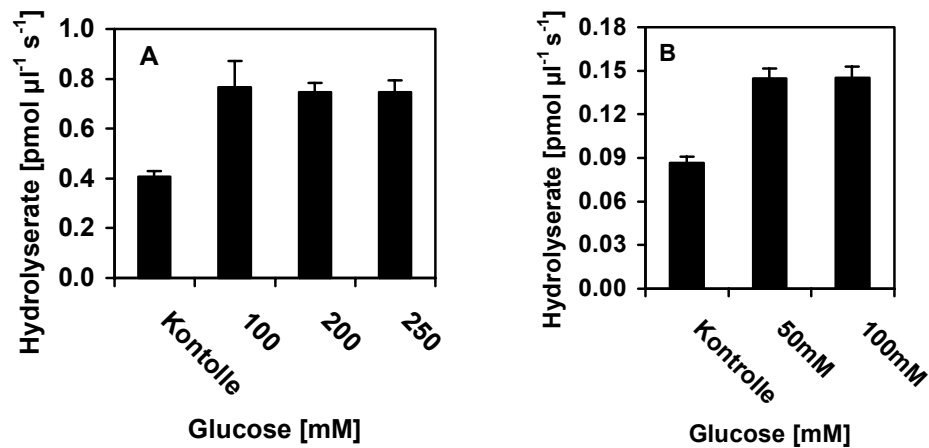
## 3.7 Stabilität der $\beta$ -D-Glucosidase

### 3.7.1 Stabilitätstests mit Lösungsmitteln, Salzen und anderen Substanzen

#### 3.7.1.1 Glucose

Polyhydrische Alkohole wie z.B. Zucker werden oftmals eingesetzt, um kältelabile Enzyme zu stabilisieren, aber auch zum Schutz gegen thermische Denaturierung. Um den Einfluss von Glucose auf die  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität zu ermitteln, wurde dem Standardenzymtest (2.9.2) 100, 200 und 250 mM Glucose zugesetzt. Schon bei 100 mM Glucose konnte eine Aktivitätssteigerung von 89% gegenüber der Kontrolle gemessen werden (Abb. 3-26 A).

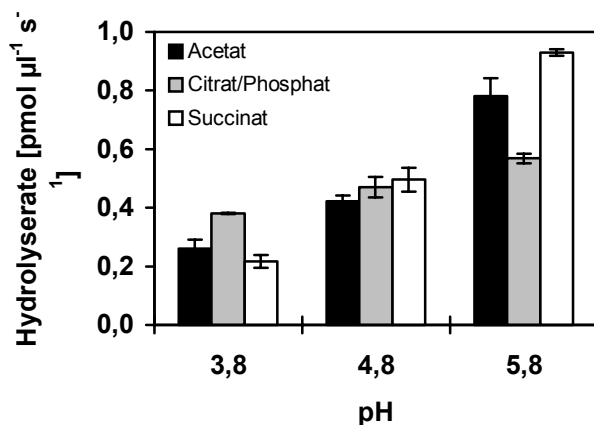
Der mögliche Schutz vor thermischer Destabilisierung wurde in einem weiteren Versuchsansatz durch eine 30-minütige Vorinkubation (37°C) getestet. Der vorinkubierte Kontrollansatz zeigte einen Aktivitätsverlust um 53% gegenüber der Kontrolle aus der Direktmessung. Dieser Verlust konnte durch Zugabe von Glucose (50 mM sowie 100 mM) auf 24 – 28% reduziert werden.



**Abb. 3-26** Einfluss des Zuckers Glucose auf  $\beta$ -D-Glukoseaktivität. A) Hydrolyserate bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (100, 200, 250 mM). B) Hydrolyserate, nach einer 30-minütigen Vorinkubation bei 37°C in Anwesenheit von 50 und 100 mM Glucose. MW  $\pm$  SD, n = 4.

### 3.7.1.2 Pufferlösungen

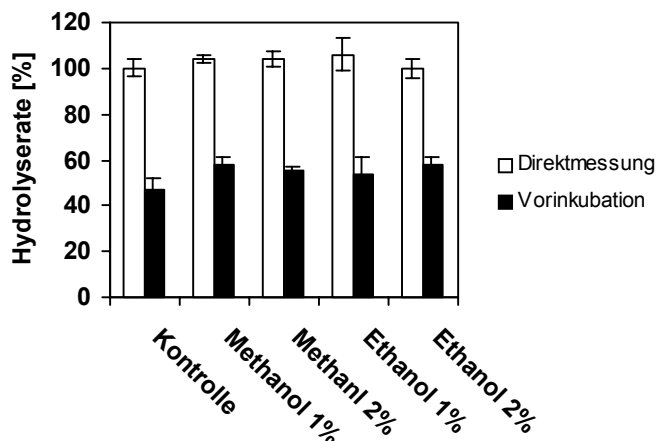
Der zur Standardbestimmung der Enzymhydrolyseraten verwendete Citrat-Puffer (pH 4.6, 0.2 M) wurde durch andere Puffer ersetzt (Abb. 3-27). Bei pH 5.8 konnte bei allen eingesetzten Pufferlösungen die größte Hydrolyseaktivität bestimmt werden.



**Abb. 3-27** Hydrolyserate der  $\beta$ -D-Glucosidase in Anwesenheit verschiedener Puffersubstanzen bei unterschiedlichen pH-Werten. MW  $\pm$  SD, n = 3.

### 3.7.1.3 Einwertige Alkohole

Niedrige Konzentrationen (unter 20%) einwertiger Alkohole werden ebenfalls häufig zur Stabilisierung von Proteinen eingesetzt. Andererseits dienen Alkohole auch als Lösungsmittel von Effektoren. Wurde zum Standardenzymtest zusätzlich Methanol und Ethanol (1 - 2%) pipettiert, konnte weder eine Erhöhung noch Erniedrigung der Hydrolyseaktivität beobachtet werden (Abb. 3-28). Eine Vorinkubation bei 37°C erbrachte dasselbe Ergebnis.



**Abb. 3-28** Hydrolyserate der  $\beta$ -D-Glucosidase in Anwesenheit der Alkohole Methanol und Ethanol. Bei der Direktmessung wurden die Alkohole sofort dem Enzymtest beigelegt. Nach einer 30-minütigen Vorinkubation ( $37^{\circ}\text{C}$ ) von IWF mit Alkohol folgte der

#### 3.7.1.4 Allgemeine Wirkung von Salzen auf Proteine

In Abhängigkeit von ihrer Konzentration beeinflussen Salze zunächst die elektrostatischen und die unpolaren Wechselwirkungen von Proteinen. Liegen die Konzentrationen unterhalb 0.1 M verändern Salze hauptsächlich die Art der Oberflächenladung. So ist es beispielsweise möglich, in einem Puffer von geringer Ionenstärke unlösliche Proteine durch Salzzugabe besser zu solubilisieren. In der Regel werden die elektrostatischen Kräfte durch den Zusatz von 0.1 - 0.2 M Salz neutralisiert. Höhere Salzkonzentrationen neutralisieren nicht nur die elektrostatischen Kräfte an der Proteinoberfläche. Sie wechselwirken auch mit Strukturelementen der Proteine, oder modifizieren die Struktur der Lösungsmittel, oder bewirken beides zusammen. Als Folge sind Struktur und Stabilität der Proteine stark beeinflusst.

##### 3.7.1.4.1 Natriumchlorid

Die Enzymaktivität der  $\beta$ -D-Glucosidase wurde in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen bestimmt. Zunächst erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  eine Vorinkubation der interzellulären Waschflüssigkeit mit NaCl-Konzentrationen von 10 bis 500 mM. Mit diesen Ansätzen wurde anschließend eine Bestimmung der Enzymaktivität durchgeführt. Aus Tabelle 3-16 wird ersichtlich, dass die Enzymaktivitäten unabhängig von den eingesetzten Salzkonzentrationen im Bereich des Kontrollansatzes (0 mM NaCl) lagen.

Wird NaCl in diesen Konzentrationen dem Elutionsmedium während einer Anionenaustauscher-Chromatografie zugefügt, sollte somit keine NaCl-vermittelte Inhibierung der  $\beta$ -D-Glucosidase auftreten.

**Tab. 3-16** Empfindlichkeit der  $\beta$ -D-Glucosidase gegenüber NaCl. 20  $\mu$ l-Ansätze mit je 10  $\mu$ l IWF und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen wurden zusammengegeben. Nach einer Stunde bei 37°C wurden die Ansätze mit 380  $\mu$ l Substrat-Lösung (0.66 mM p-NPG in Citratpuffer, 2.8.2) aufgefüllt und die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -D-Glucosidase bestimmt. Eine Normierung auf 100% erfolgte anhand der Kontrolle (0 mM NaCl). MW  $\pm$  SD, n = 3.

NaCl [mM]	0	10	20	30	40	50	100
Hydrolyseaktivität [%]	100 $\pm$ 5	102 $\pm$ 9	99 $\pm$ 5	94 $\pm$ 3	99 $\pm$ 5	93 $\pm$ 2	100 $\pm$ 9

### 3.7.1.4.2 Zweiwertige Kationen

Des Weiteren wurde die  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Kationen untersucht. Es zeigte sich, dass Cadmium (0.17  $\pm$  0.01 pmol  $\mu$ l<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) sowie Zink (0.17  $\pm$  0.08 pmol  $\mu$ l<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) die Aktivität auf etwa 55% des Kontrollwertes (0.32  $\pm$  0.01 pmol  $\mu$ l<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) reduzierten und Kupfer (0.12  $\pm$  0.01 pmol  $\mu$ l<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) die Aktivität auf 38% absinken ließ (Tab. 3-17).

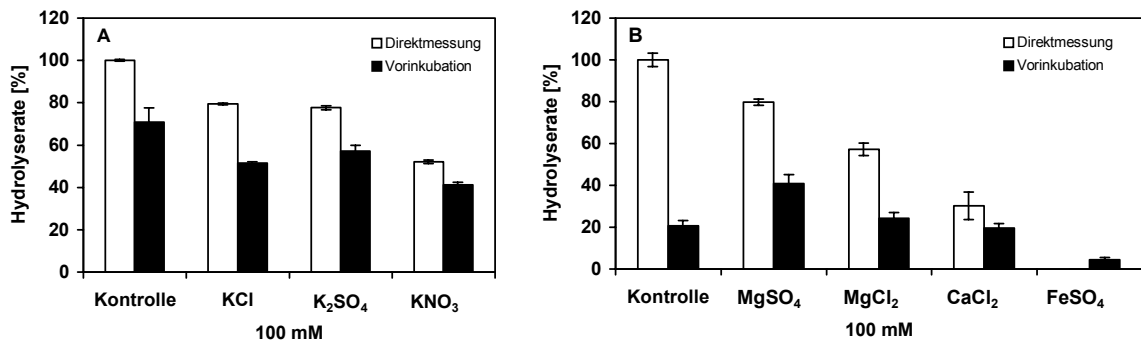
**Tab. 3-17** Einfluss zweiwertiger Kationen auf  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität. IWF (10  $\mu$ l) und 10  $\mu$ l der Chloridsalze der Kationen Magnesium, Cadmium, Mangan und Zink sowie Kupferacetat wurden zunächst 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 380  $\mu$ l Substratlösung zugefügt und die Hydrolyseaktivität der  $\beta$ -D-Glucosidase bestimmt. Eine Normierung auf 100% erfolgte anhand der Kontrolle. MW  $\pm$  SD, n = 3.

Kation <sup>2+</sup> [0.5 mM]	Kontrolle	Mg <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
Hydrolyseaktivität [%]	100 $\pm$ 2	93 $\pm$ 4	55 $\pm$ 3	95 $\pm$ 3	53 $\pm$ 2	38 $\pm$ 2

### 3.7.1.4.3 Die Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat

In einem weiteren Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob die Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat die Hydrolaseaktivität beeinflussen. Zunächst wurde der Standardenzymtest mit 50 mM Kaliumchlorid, Kaliumnitrat oder Kaliumsulfat angereichert. Die erhaltenen Aktivitätsraten waren im Bereich der Kontrolle ohne Salzzusatz angesiedelt. Eine 30-minütige Vorinkubation des IWF bei Raumtemperatur mit den oben genannten Salzen erbrachte in der anschließenden Aktivitätsbestimmung dasselbe Ergebnis. Wurde die Salzkonzentration auf 100 mM erhöht, war sowohl beim Versuchsansatz mit Salz als auch bei der einstündigen Vorinkubation bei 37°C eine Erniedrigung der Hydrolyserate gegenüber den Kontrollen zu beobachten (Abb. 3-29). Am stärksten beeinflusste Nitrat die Enzymaktivität. Es kam zu einer auf 40 – 50% erniedrigten Hydrolyserate (Abb. 3-29 A). Da Chlorid und Sulfat die Enzymaktivität annähernd in gleicher Weise herabsetzten, wurde ein weiterer Versuchsansatz mit diesen Anionen, aber variierenden Gegenionen, angesetzt.





**Abb. 3-29** Einfluss verschiedener Anionen auf die Hydrolase  $\beta$ -D-Glucosidase. A) IWF (10  $\mu$ l) wurden mit 10  $\mu$ l der Salze KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und KNO<sub>3</sub> in einer Endkonzentration von 100 mM versetzt und direkt dem Standardenzymtest zugeführt. Bei einem zweiten Ansatz inkubierte der IWF zunächst mit dem jeweiligen Salz für 1h bei 37°C. B) Unter Verwendung der Salze MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> und FeSO<sub>4</sub> wurden ebenfalls wie unter A) beschrieben zwei Versuchansätze durchgeführt. MW  $\pm$  SD, n = 3.

Aus diesem und dem vorhergehenden Versuchsansatz konnte geschlossen werden, dass bei den Chloriden die Hydrolyseaktivität in der Reihenfolge der Gegenionen K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> abnimmt. Bei den Sulfatsalzen war Magnesium ungefähr gleichzusetzen mit Kalium; Fe<sup>2+</sup>-Ionen führten zu einer fast kompletten Inhibierung der  $\beta$ -D-Glucosidase (Abb. 3-29 B). Bemerkenswertes zeigte das Ergebnis mit Magnesiumsulfat. Nach der Vorinkubation war der Salzansatz doppelt so aktiv verglichen mit der Kontrolle. Dies könnte auf eine thermische Stabilisierung der  $\beta$ -D-Glucosidase durch Magnesiumsulfat schließen lassen.

### 3.7.1.5 Protease-Inhibitoren

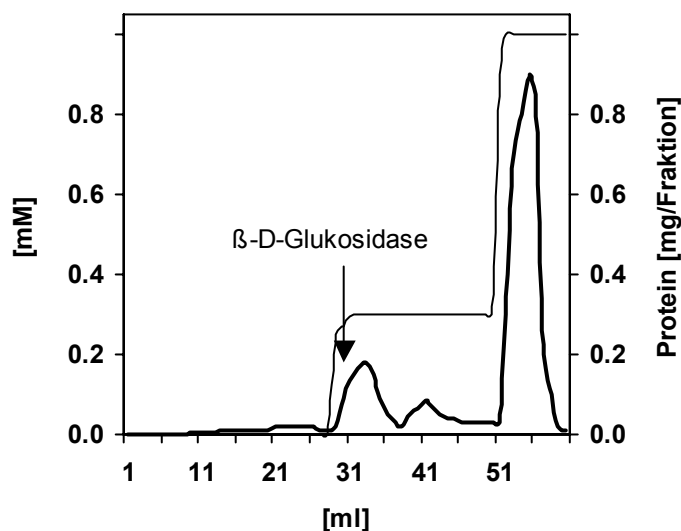
Zur Verhinderung der Proteolyse eines Enzyms während der Aufreinigung setzt man häufig Protease-Inhibitoren zu. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) eignet sich gut zur Verringerung der Aktivität von Metalloproteasen. Intrazelluläre Waschflüssigkeit wurde deshalb mit 5 und 10 mM EDTA versetzt, für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend eine Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Wurde der Kontrollansatz als 100% angenommen, so war beim Ansatz mit 5 mM EDTA keine Aktivität mehr zu finden, bei 10 mM EDTA noch 35%. EDTA inaktiviert somit die  $\beta$ -D-Glucosidase, was vermuten lässt, dass es sich bei der  $\beta$ -D-Glucosidase um ein Metallenzym, dessen Aktivität beispielsweise von Zn<sup>2+</sup> abhängig ist, handeln könnte (Suelter 1990). Als Serin-Protease-Inhibitor wurde Pefabloc in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Hierbei war ebenfalls eine leichte Inaktivierung von 13% gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen.

### 3.8 Chromatografische Reinigung der $\beta$ -D-Glucosidase

#### 3.8.1 Anionentauscherchromatografische Reinigungsverfahren

Bei diesem Chromatografie-Verfahren wurde mit einer Anionentauscher-Matrix (Q-Sepharose) gearbeitet, die eine Proteinfractionierung bei pH 8 ermöglichte (2.12.2.1). Da die isoelektrischen Punkte (pI) der  $\beta$ -D-Glucosidase im Bereich zwischen 6.4 und 7.4 lagen (3.9.3), war anzunehmen, dass bei pH 8 das Protein völlig deprotoniert vorlag. Der verwendete IWF wurde mit Tris-Acetat-Puffer (pH 8.1, 40 mM) im Verhältnis 1:1 verdünnt und über eine Ladeschleife auf die Säule gebracht. Mit 10 ml einer 20 mM Tris-Acetat-Pufferlösung wurde die Säule gewaschen und anschließend mit 30 mM NaCl-haltiger Pufferlösung eluiert, wobei die Flussrate 5 ml pro min betrug. Nach erfolgter Fraktionierung wurde der NaCl-Gehalt im Elutionspuffer auf 1 M erhöht, womit der Reinigungsvorgang endete. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte mittels eines eisgekühlten Kollektors. Vom 0.5 ml großen Probenvolumen wurden 50  $\mu$ l entnommen, um damit den Enzymaktivitätsnachweis zu führen (2.9.2.).

Es wurden vier Fraktionierungen mit jeweils unterschiedlichen Mengen IWF (1, 5, 11 und 16 ml) durchgeführt. Das Enzym band gut an den starken Anionenaustauscher Q-Sepharose und konnte schon früh im Salzgradienten beim Erreichen einer Salzkonzentration von etwa 30 mM NaCl (siehe Pfeil in Abb. 3-30) eluiert werden. Der Enzymtest erbrachte maximale Aktivitäten im Bereich der Fraktionen 36 bis 42 (Abb. 3-31).



**Abb. 3-30** Verlaufsprotokoll einer Perfusionschromatografie mit 5ml IWF am starken Anionenaustauscher Q-Sepharose. Ein UV-Detektor bestimmte den Proteingehalt der Fraktionen bei 280 nm. Der Pfeil soll den Elutionszeitpunkt der  $\beta$ -D-Glucosidase aufzeigen.

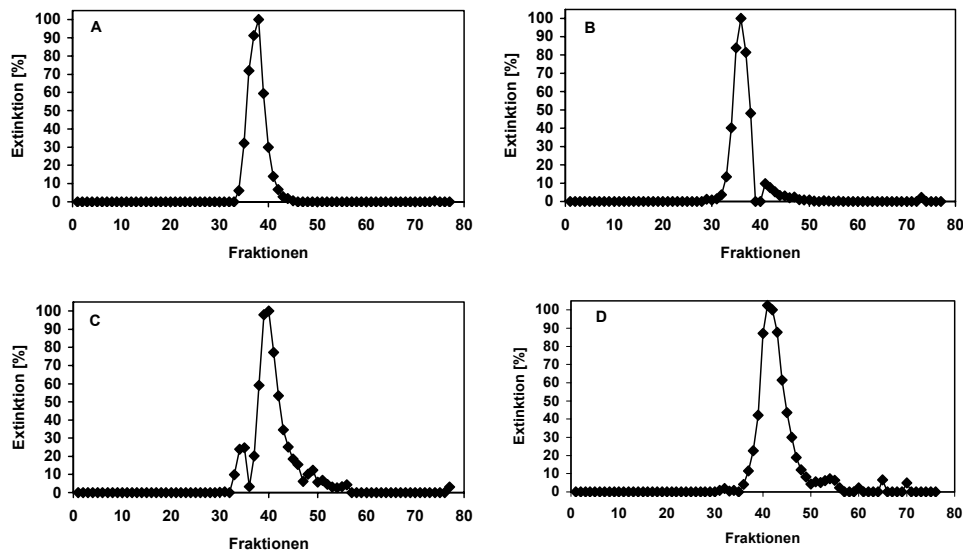


Abb. 3-31 Perfusionschromatografie mit vier verschiedenen IWF-Volumina (A: 1 ml, B: 5 ml, C: 11 ml, D: 16 ml). Die Extinktionsmessungen nach Inkubation der einzelnen Fraktionen mit p-NPG-Substrat zeigen Enzymaktivitätsmaxima in Fraktion A: 38, B: 36, C: 40 und D: 41.

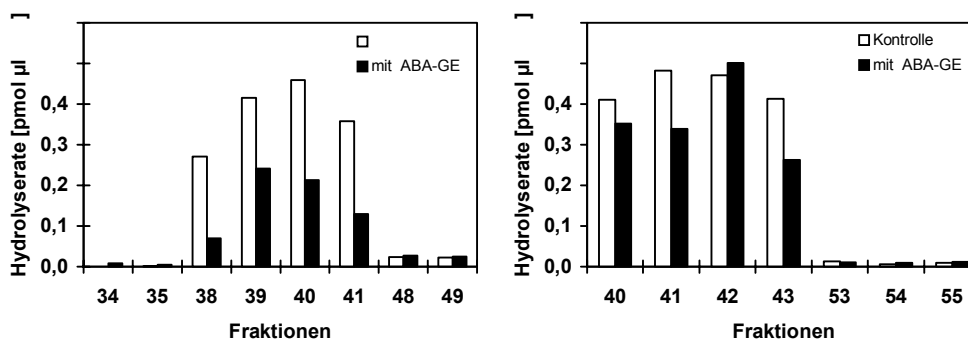
In der Regel wurden die Fraktionen, die das Aktivitätsmaximum enthielten (30 bis 55), und einige Fraktionen aus dem Bereich mit 1M NaCl einer denaturierenden Polyacrylamidgелеlektrophorese unterzogen. Anhand des im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (12 %) erkennbaren Proteinmusters sollte die  $\beta$ -D-Glukosidase einer spezifischen Bande zugeordnet werden. Dies war nicht möglich, da viele apolastische Proteine ähnliche apparente Molekulargewichte aufwiesen. Im Gel trat ein Reihe von relativ schwachen Banden im Bereich zwischen 50 bis 70 kDa auf. Aus diesem Grund wurde das anfänglich in die Fraktionierung eingesetzte IWF-Volumen von 1ml auf 5, 11 und später 16 ml erhöht. Trotzdem konnte keine eindeutige Identifizierung im Gel vorgenommen werden, was vermuten lässt, dass der Gehalt an  $\beta$ -D-Glukosidase im IWF sehr gering ist und vor der chromatografischen Reinigung eine Aufkonzentrierung des IWF erfolgen sollte. Der Aktivitätswert der einzelnen Fraktionen multipliziert mit dem Fraktionsvolumen und anschließender Aufsummierung aller Fraktionswerte ergab eine eluierte Gesamtaktivität. Wurden geringe Volumen IWF (1 ml und 5 ml) auf die Säule geladen, überstieg die eluierte Gesamtaktivität deutlich die eingesetzte Aktivität (1 ml IWF: 196%; 5 ml: 378%). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass inhibitorische Proteine oder kleinmolekulare Effektoren (z.B. anorganische Ionen) entweder früher als das Enzym von der Säule eluieren oder in späteren Fraktionen vorliegen. Erfolgte die Beladung mit IWF-Volumina von 11 und 16 ml, war die Wiederfindungsrate auf 11-20 % gesunken. Da eine Umpufferung des IWF nicht ohne großen Aktivitätsverlust möglich war, wurde IWF direkt auf die

Chromatographiesäule gebracht. Dabei wäre es denkbar, dass zu viele Fremdionen in das System eingeführt wurden und einen Teil der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen blockierten, was zum gemessenen Aktivitätsverlust führte.

Zusammenfassend kann dennoch gelten, dass die Anionenauscherschromatographie mit Q-Sephrose eine Möglichkeit zur Aufkonzentrierung und auch Teilreinigung des Enzyms darstellt. Das Enzym band reversibel an das Säulenmaterial. In reproduzierbarer Weise konnte ein Aktivitätsmaximum bei der Fraktionierung bestimmt werden.

### 3.8.2 Kompetitive Hemmung der $\beta$ -D-Glucosidase in den aktivsten Fraktionen der Anionenauscherschromatographie

Die anionenchromatografisch gewonnene  $\beta$ -D-Glucosidase sollte mittels eines kompetitiven Hemmungsexperiments auf ihre spezifische ABA-GE-Hydrolyseaktivität getestet werden. Dazu wurden Proben der relevanten Fraktionen von zwei säulenchromatografischen Auftrennungen (11 ml und 16 ml) zusammen mit 5 mM ABA-GE und 0.66 mM Substrat (p-NPG) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Parallel dazu erfolgte ein Kontrollansatz nur mit p-NPG. Anschließend wurde die Extinktion der Proben fotometrisch ermittelt. Eine Hemmung der Enzymaktivität durch das Hormonkonjugat ABA-GE konnte bei beiden Fraktionierungen beobachtet werden. Im Fall der Fraktionierung von 11 ml IWF (Abb. 3-32 A) lag die Inhibierung der Hydrolyserate zwischen 41.7 und 74.4%, wobei die stärkste Hemmung in Fraktion 38 gefunden wurde. Dies korrelierte allerdings nicht mit der maximalen Hydrolyseaktivität. Die Inhibierung der aktiven Fraktionen des 16 ml-Laufes (Abb. 3-32 B) war nur im Bereich zwischen 14.4 und 35.8% angesiedelt.

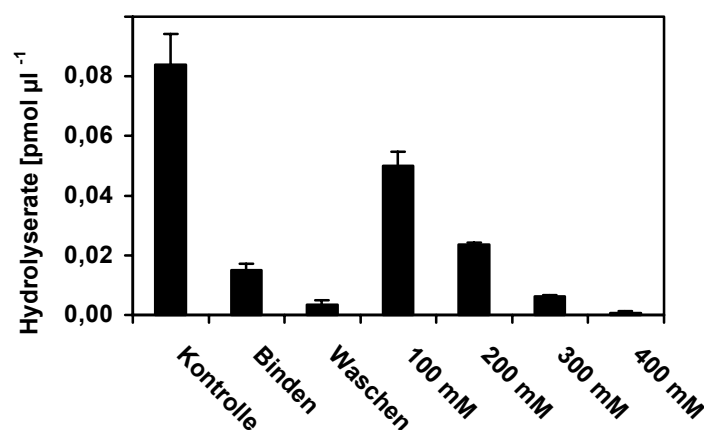


**Abb 3-32** Hemmung der partiell gereinigten  $\beta$ -D-Glucosidase durch ABA-GE. Von zwei verschiedenen Anionenauscher-Läufen mit 11 ml (A) und 16 ml (B) IWF wurden die aktivsten Fraktionen ausgewählt und durch gleichzeitiges Versetzen mit 5 mM ABA-GE und 0.66 mM p-Nitrophenol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (p-NPG) einem Test auf kompetitive Hemmbarkeit unterzogen. Als Kontrollansatz diente eine Inkubation nur mit Substrat p-NPG.

### 3.8.3 Test von Chromatografiematerialien im Batch-Verfahren

#### 3.8.3.1 Hydroxyapatit

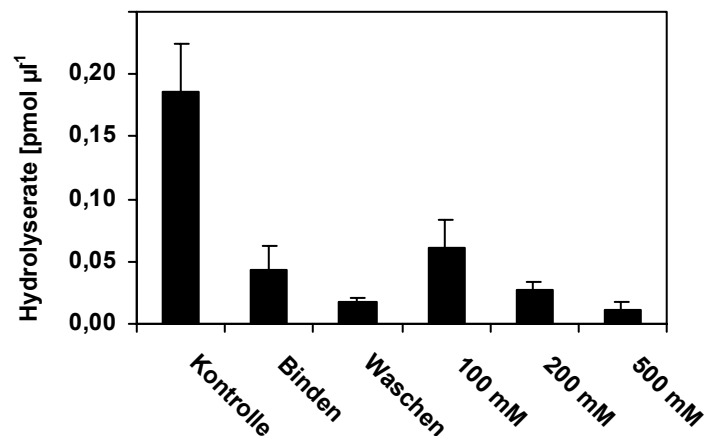
Mittels eines Batch-Verfahrens sollte ausgetestet werden, ob die im IWF enthaltene Glucosidase an das Trägermaterial Hydroxyapatit reversibel binden kann. Ein Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 6.8) diente zum Äquilibrieren des pulverisierten Hydroxyapatits. Danach erfolgte die Bindung der IWF-Proteine an das Trägermaterial und daran anschließend ein Waschschriff (2.12.2.2.1). Die Elution wurde mit Kaliumphosphatpuffer im Konzentrationsbereich zwischen 100 - 400 mM durchgeführt. Nach all den genannten Schritten wurden Proben für eine fotometrische Bestimmung der  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität entnommen. Aus Abbildung 3-33 wird ersichtlich, dass das apoplastische Enzym relativ gut an das Trägermaterial band, da auch beim Waschen kaum eine Ablösung erfolgte. Nach dem Eluieren mit 100 mM Kaliumphosphatpuffern konnten 60% der auf das Trägermaterial aufgetragenen Enzymaktivität erhalten werden, nach dem 200 mM Elutionsschritt waren es noch 28%. Die summierten Hydrolyseraten der Überstände des Waschvorgangs und der Elution ergaben in etwa die eingesetzte Enzymaktivität. Die Hydroxyapatit-Chromatografie könnte somit als ein möglicher Teilreinigungsschritt erachtet werden. Jedoch zeigte das anschließend durchgeführte eindimensionale SDS-Page, dass in den relevanten Fraktionen von 100 und 200 mM Kaliumphosphat neben dem gesuchten Enzym auch andere IWF-Proteine eluieren.



**Abb 3-33** Verteilung der  $\beta$ -D-Glucosidase bei der Fraktionierung an Hydroxyapatit. 250  $\mu\text{l}$  IWF wurden zusammen mit 2.25 ml Bindepuffer auf äquilibriertes Hydroxyapatit gegeben. Nach erfolgter Sedimentbildung wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit dem Substrat p-NPG inkubiert und die Hydrolyserate der  $\beta$ -D-Glucosidase bestimmt. Bei allen folgenden Schritten wie Waschen und Eluieren mit 100, 200, 300 und 400 mM Kaliumphosphatpuffer wurde genauso verfahren. Die Hydrolyseaktivitäten sind in relativer Einheit [ $\text{pmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ] angegeben. MW  $\pm$  SD, n = 6, zwei Versuche mit je drei Replikanten.

### 3.8.3.2 Adsorption der $\beta$ -D-Glucosidase an Concanavalin A-Sepharose

Bei der Affinitätschromatografie spielen Lektine eine wichtige Rolle. Kovalent an Matrizen (z.B. Sepharose) gekoppelte Lektine bilden eine Affinitätsmatrix, die in einem Batch-Verfahren auf ihre Tauglichkeit zur Adsorption eines gesuchten Proteins getestet werden kann. Concanavalin A (Con A) ist ein Lektin bzw. Protein, das reversibel Zuckerreste von Glucoproteinen bindet. Da apoplastische Proteine oftmals in glycosylierter Form vorliegen, wurde Con A-Sepharose auf ihre Eignung zur Reinigung der  $\beta$ -D-Glucosidase getestet.



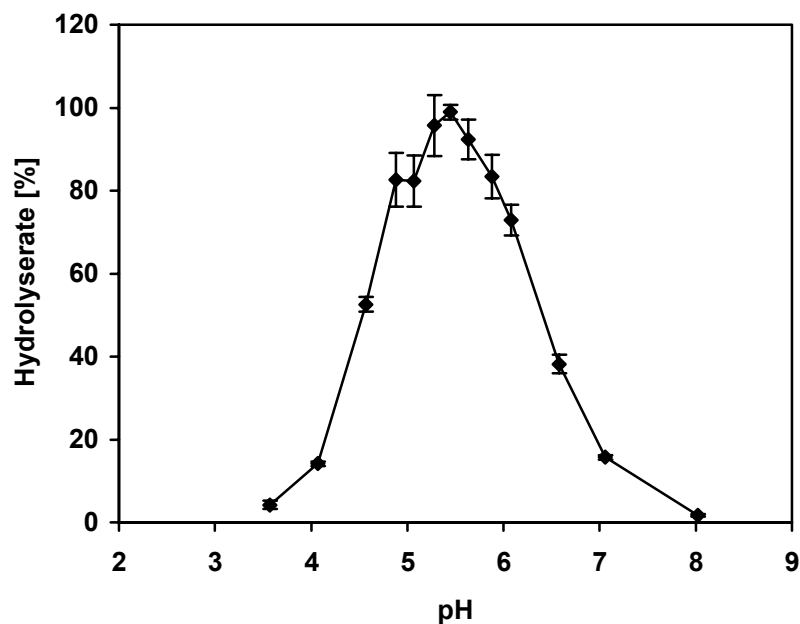
**Abb 3-34** Verteilung der  $\beta$ -D-Glucosidase bei der Fraktionierung an Con A-Sepharose. 100  $\mu\text{l}$  IWF wurden mit 400  $\mu\text{l}$  Bindepuffer äquilibrierter Con A-Sepharose gemischt (2.12.2.2.2). Nach erfolgter Sedimentbildung wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit dem Substrat p-NPG inkubiert und die Hydrolyserate der  $\beta$ -D-Glucosidase bestimmt. Bei allen folgenden Schritten wie Waschen und Eluieren mit 100, 200 und 500 mM Kaliumphosphatpuffer wurde genauso verfahren. Die Hydrolyseaktivitäten sind in relativer Einheit [ $\text{pmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ] angegeben. MW  $\pm$  SD, n = 6

In Abbildung 3-34 sind die einzelnen Schritte des Batch-Verfahrens zusammengefasst. Zu IWF wurde mit Bindepuffer äquilibrierte Con A-Sepharose gegeben und nach erfolgter Sedimentbildung der Überstand auf Enzymaktivität getestet. Im Überstand konnte eine Hydrolyseaktivität ( $0.043 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) detektiert werden (23 % der eingesetzten Aktivität:  $0.186 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1} = 100\%$ ), was auf eine unvollständige Adsorption des Enzyms schließen ließ. Nach dem anschließenden Waschen der Affinitätsmatrix konnten ebenfalls  $0.018 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (18 % der Ausgangsaktivität) im Überstand gemessen werden. Bei den Elutionsschritten mit Methylmannose löste sich bei 100 mM der größte Teil der Proteine ( $0.060 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1} = 32\%$ ), aber auch die Fraktionierungen mit 200 und 500 mM erbrachten positive Aktivitätsbestimmungen (200 mM: 15 %; 500 mM: 6 %). Die summierten Hydrolyseraten der Überstände des Waschvorgangs und der Elution ergaben wie beim Hydroxyapatit-Batch-Verfahren in etwa die eingesetzte Enzymaktivität. Als effizienter Reinigungsschritt ist die Affinitätschromatografie mit Con A-Sepharose eher ungeeignet.

### 3.9 Charakterisierung der apoplastischen $\beta$ -D-Glucosidase

#### 3.9.1 pH-Profil

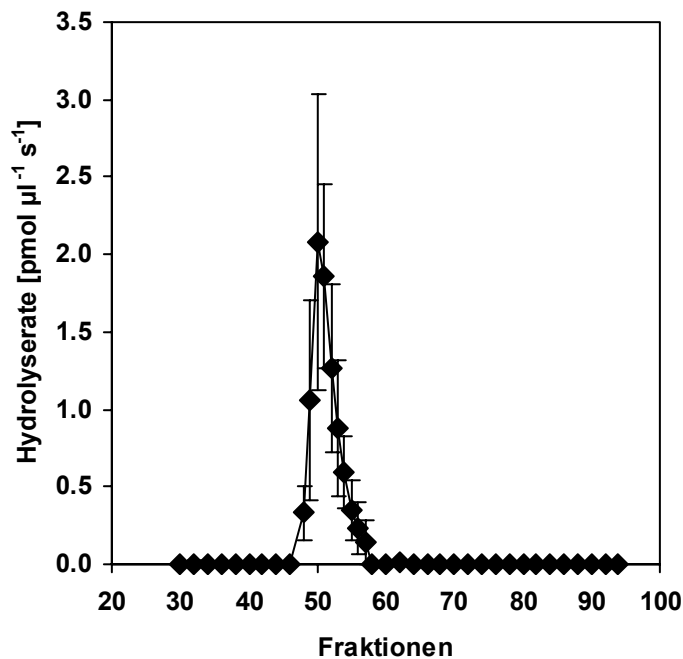
Die pH-Abhängigkeit  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität wurde in Kaliumphosphat-Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Abbildung 3-35 veranschaulicht eine typische Optimumskurve mit einem Maximum bei pH 5.5 und einer Schulter bei pH 5.



**Abb. 3-35** pH- Abhängigkeit der  $\beta$ -D-Glucosidase. IWF von 10 Tage alten Gerstenprimärblättern wurde mit dem Substrat p-NPG für 1 h bei unterschiedlichem pH-Wert inkubiert. Die höchste Aktivität konnte bei pH 5.5 nachgewiesen werden; sie wurde auf 100% gesetzt. MW  $\pm$  SD, n = 12.

#### 3.9.2 Abschätzung der molekularen Masse der $\beta$ -D-Glucosidase

Die Auftrennung apoplastischer Proteine nach ihrem apparenten Stockesschen Radius erfolgte mittels Gelfiltration mit anschließender Aktivitätsbestimmung (2.9.2) in den einzelnen Fraktionen. Auf diese Weise konnte diejenige Fraktion identifiziert werden, welche die größte Hydrolyseaktivität gegenüber dem Substrat p-NPG aufwies (Abb. 3-36). Insgesamt wurden 12 Gelfiltrationsläufe durchgeführt, wobei 1 mal Fraktion 49, 8 mal Fraktion 50 und 3 mal Fraktion 51 die Hauptaktivität enthielten. Da Fraktion 50 mit 67 % am häufigsten die höchste Aktivität zeigte, konnte über die mit Eichproteinen zuvor erstellte Eichgerade auf die apparente molekulare Masse ( $M_r$ ) von 51 kDa geschlossen werden.

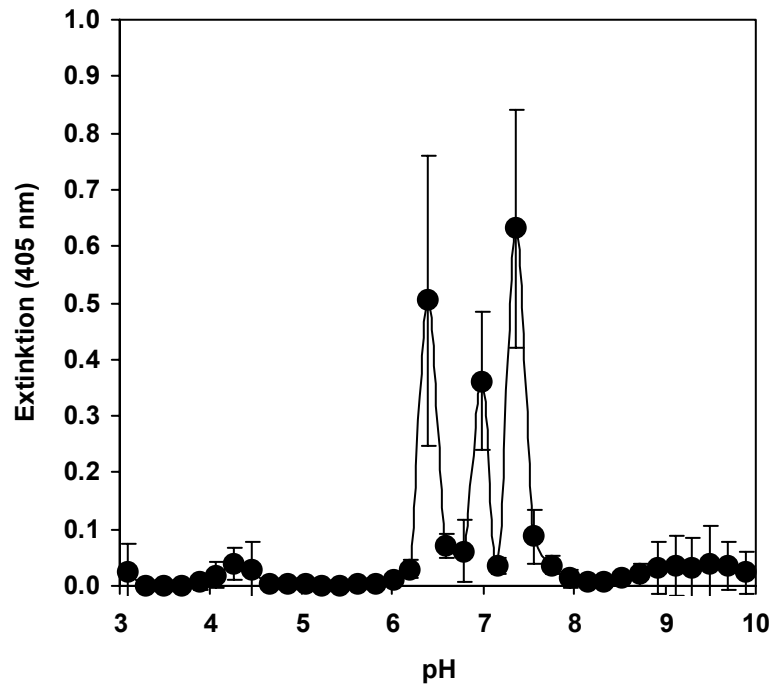


**Abb. 3-36** Trennung von 500 µl IWF über eine Superose-12-Gelfiltrationssäule mit anschließender Identifizierung der Enzymaktivität in den gewonnenen Fraktionen. MW ± SD, n = 12 Gelfiltrationsläufe.

### 3.9.3 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der β-D-Glucosidase

Die Kenntnis des isoelektrischen Punktes (pI) eines Enzyms gibt zum einen Richtlinien für die Anwendung der Ionenaustauscherchromatografie. Beispielsweise lassen sich die meisten Proteine mit einer Anionentauscher-Matrix bei pH-Werten oberhalb ihres pI fraktionieren. Zum anderen kann mit dieser Methode ermittelt werden, ob die extrazelluläre β-D-Glucosidase mehrere Isoformen aufweist. Ein Hinweis diesbezüglich war schon bei der Bestimmung des pH-Optimums ersichtlich, da eine zweite Schulter gefunden wurde (3.9.1). Abbildung 3-37 zeigt eindeutig, dass im isoelektrisch fokussierten IWF drei Isoformen der β-glucosidischen Hydrolase enthalten waren. Ihre pI-Werte konnten aufgrund der Kenntnis des im verwendeten Immobilon-Streifen enthaltenen pH-Gradienten (3-10) den pH-Werten 6.4, 7.0 und 7.4 zugeordnet werden.





**Abb. 3-37** Isoelektrische Fokussierung der extrazellulären  $\beta$ -D-Glucosidase in Gerstenprimärblättern. Die in 300  $\mu$ l IWF enthaltenen Proteine wurden auf einen Immobilon Dry Strip (Pharmacia, Uppsala) mit einem pH-Gradienten von 3 - 10 aufgebracht und für 18 h fokussiert. Anschließend wurde der Strip in 0.5 cm Stücke unterteilt und die Enzymaktivität mit dem Substrat p-Nitrophenol- $\beta$ -D-Glucopyranosid (p-NPG) bestimmt. MW  $\pm$  SD, n = 4.

### 3.9.4 Zweidimensionale Trennung der IWF-Proteine

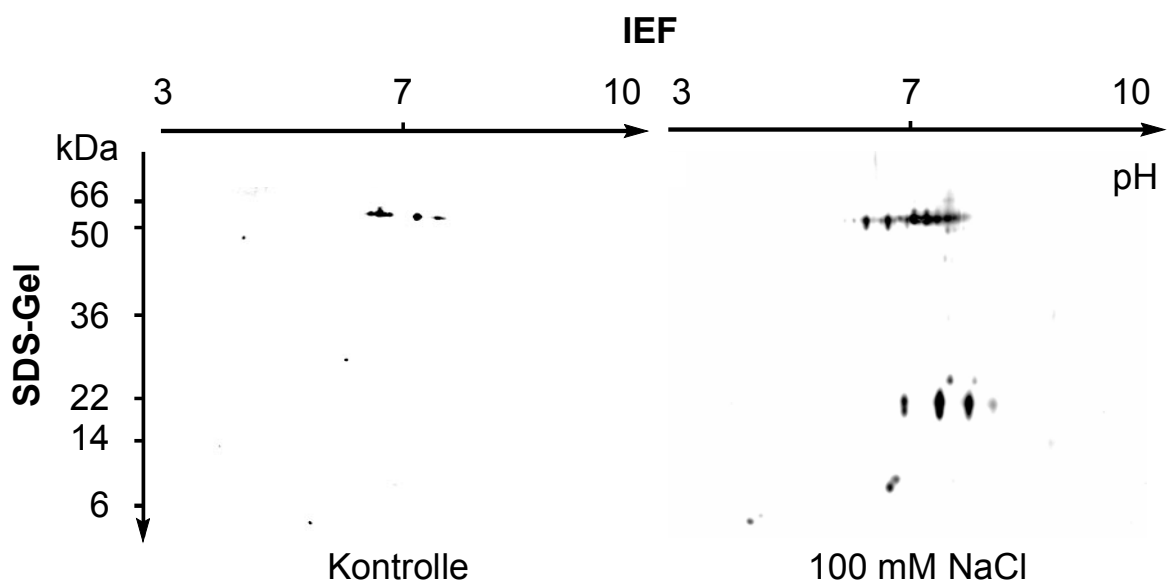
Die zweidimensionale Trennung von Proteinen ist eine Technik, die zur Analyse komplexer Proteingemische von O'Farrell 1975 entwickelt wurde. In der ersten Dimension (IEF) erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt, während in der zweiten Dimension (Diskelektrophorese, Laemmli 1970) eine Auftrennung nach der Molmasse geschieht.

Zunächst wurde eine Phenolfällung mit IWF-Proben (1 ml) von ungestresster und mit 100 mM NaCl-gestresster Gerste durchgeführt. Die auf Immobilon Dry Strips aufgebrauchten Präzipitate (2.11.3) waren nach einer 18-stündigen Fokussierung in den Streifen fixiert. Anschließend wurden die Streifen äquilibriert und mit einer Agarose-Lösung an ein 12%iges SDS-Gel geheftet. Es folgte eine Elektrophorese über Nacht. Mit einer Silberfärbung wurden die Proteinflecken im Gel sichtbar.

Zwei-D-Gele mit IWF von ungestressten Gerstenprimärblättern wiesen insgesamt nur sehr wenige Proteinflecken auf, wobei die meisten im pH-Bereich zwischen 6 und 8 anzutreffen waren. Da ein Marker zusammen mit den Streifen auf das Gel geladen wurde, konnte diesen Proteinflecken ein apparentes Molekulargewicht zwischen 50 und 66 kDa zugeordnet werden

(Abb. 3-29 Kontrolle). Dies bestätigte zum einen die Kenntnis, dass viele denaturierte IWF-Proteine ein Molekulargewicht zwischen 10 und 60 kDa aufweisen (Dietz 1997). Zum anderen sind die Proteinflecken an der Stelle im Gel lokalisiert, wo man das Enzym  $\beta$ -D-Glucosidase aufgrund ihres Molekulargewichts (51 kDa) und ihrer pI-Werte (6.4 - 7.4) erwarten würde. Eine genauere Identifizierung war jedoch noch nicht möglich.

Untersuchungen von Wichert (2000) zeigten, dass Salzstress die  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität im Blattapoplasten um das 7-fache ansteigen lässt. Dies könnte auf eine erhöhte Biosynthese des Enzyms hindeuten, was im 2-D-Gel größere Proteinflecken hervorrufen müsste. Alternativ könnte das vorhandene Enzym unter Salzstress eine deutliche Aktivierung erfahren. Beim Vergleich der 2-D-Gele von Kontroll-IWF mit dem salzgestresster Gerste war eine Verstärkung der Proteinflecken im Bereich zwischen 50 und 66 kDa erkennbar (Abb. 3-29). Zusätzlich traten weitere Proteinflecken im pH-Intervall 6.5 bis 8 mit einer Molmasse von ungefähr 20 kDa in Erscheinung. Allgemein führt Salzstress zu einer Erhöhung des Proteingehalts im Apoplast, insbesondere das Salzstressprotein Osmotin wird bei hohen NaCl-Konzentrationen akkumuliert (Dietz 1997, Kreeb 1996). Es liegt in verschiedenen Isoformen vor und seine molekulare Masse variiert von 25 bis 50 kDa. Eine salzbabhängige Steigerung der Enzymaktivität ließ sich auch bei verschiedenen sauren Hydrolasen und die gujacobabhängige Peroxidase feststellen (Ramanjulu et al. 1999).



**Abb. 3-38** Zweidimensionale Auftrennung von Blattapoplasten-Proteinen aus unbelasteten und mit 100 mM NaCl gestressten Gerstenpflanzen. Es wurde jeweils 1ml IWF mit Phenol gefällt und isoelektrisch fokussiert. In der anschließenden zweiten Dimension wurden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese nach ihrer apparenten molekularen Masse aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Silbernitrat.

## 4 DISKUSSION

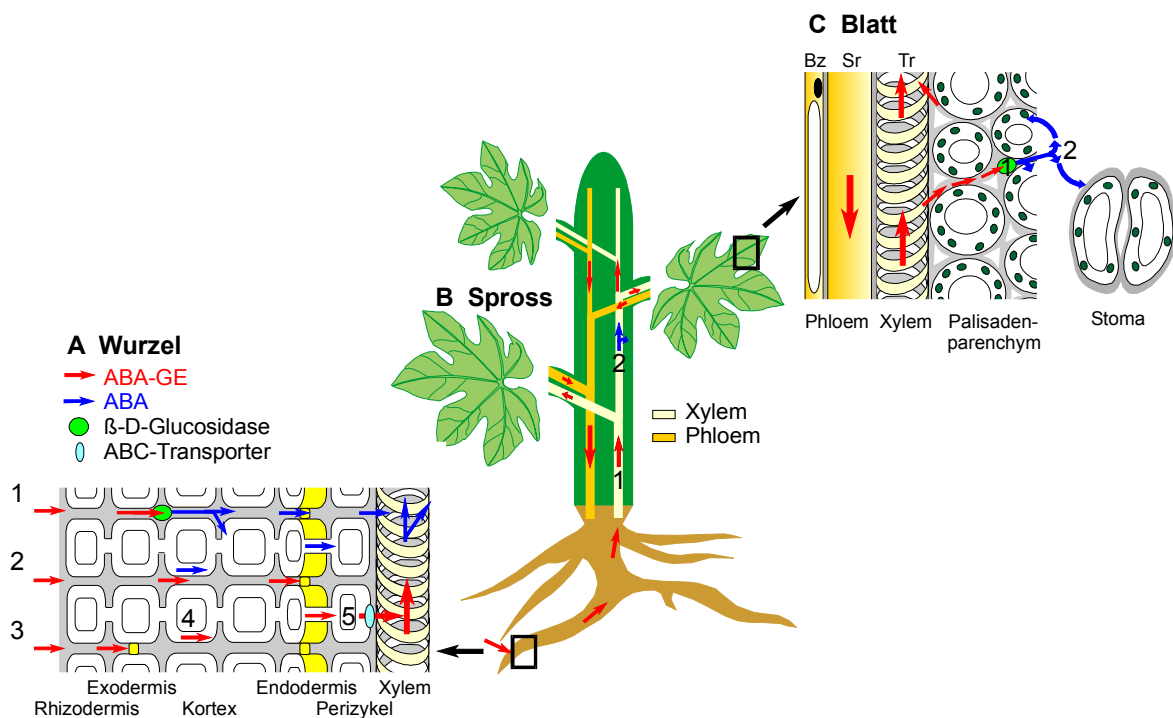
### 4.1 Die Beteiligung des ABA-GE am Wurzel-Spross-Stresssignal

Hormonkonjugate, wie ABA-Glucoseester, sind Produkte der Biotransformation von Phytohormonen in pflanzlichen Geweben. Diese Biotransformation ist ein wichtiger Mechanismus der Hormonhomöostase in pflanzlichen Zellen, die neben der Konjugation auch durch Transport und anschließender Metabolisierung aufrechterhalten wird. Der Katabolismus pflanzlicher Hormone kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Im Falle der Abscisinsäure können durch einen oxidativen Abbau die physiologisch unwirksamen Metabolite Phaseinsäure (PA) und Dihydrophaseinsäure (DPA) entstehen. Indoleessigsäure wird ebenfalls oxidativ in 3-Methylenoxindol umgewandelt. Durch chemische Veränderungen erfahren auch Gibberelline eine Umwandlung in physiologisch weniger aktive Formen. Adenosin wird durch eine oxidative Spaltung aus Zeatin freigesetzt. Einen alternativen Mechanismus der Biotransformation pflanzlicher Hormone stellt die kovalente Verknüpfung mit niedermolekularen Verbindungen wie Zucker, Aminosäuren und Peptide dar. Diese konjugierten Formen sind in der Regel physiologisch inaktiv. Sie werden in den Vakuolen der Pflanzenzellen angereichert, wo sie beachtliche Konzentrationen erreichen können. Einmal in der Vakuole deponiert, repräsentieren sie einen inaktiven Pool, da ihre hydrophilen Eigenschaften einen erneuten Transport über den Tonoplasten ins Cytoplasma der Zelle verhindern. Kaiser et al. (1985) konnten eine starke Kompartimentierung des ABA-GE und anderer noch nicht identifizierter alkalistabiler ABA-Konjugate in den Vakuolen des Mesophylls von Gerstenblättern aufzeigen. Diesbezügliche Untersuchungen mit Suspensionszellen von *Lycopersicon esculentum* bestätigten die stressinduzierte vakuoläre Anreicherung des ABA-GE (Lehmann und Glund 1986).

Phytohormonkonjugate dienen auch als Transportformen beim Langstreckentransport im Xylem. Als Haupttransportform der Cytokinine gilt das Zeatinribosid (Fusseder et al. 1992; Bano et al 1993, 1994; Kamboj et al. 1998). Gibberelline liegen hauptsächlich als Glucose-Konjugate vor und konnten in dieser Form im Blutungssaft von Bäumen (Dathe und Sembdner 1978; Dathe et al. 1982) nachgewiesen werden. Über eine Translokation von Auxin-Konjugaten im Xylem liegen keine Hinweise vor.

Da in den letzten 10 Jahren immer häufiger ABA-Konjugate im Xylemsaft gestresster Pflanzen nachgewiesen wurden (siehe 1.2), stellte sich die Frage, ob der ABA-GE

möglicherweise ein weiteres Wurzel-Spross-Stresssignal darstellt. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, woher der im Xylem auftretende ABA-GE stammt, ob externe oder interne Quellen hierbei eine Rolle spielen. Ebenso wenig war der radiale Transport innerhalb der Wurzel zu den Xylemelementen der Stele untersucht. Beim Transport innerhalb des Sprosses könnten mögliche Verluste ins angrenzende parenchymatische Gewebe auftreten. Darüber hinaus sollten Untersuchungen klären, welche Funktion der mit dem Xylemstrom in den Blattapoplasten gelangte ABA-GE besitzt. Anhand des Schemas in Abbildung 4-1 werden im Folgenden Faktoren, welche die Bildung und den Transport des ABA-GE in einer Pflanze beeinflussen können, aufgezeigt.



**Abb. 4-1** Eine schematische Darstellung der Herkunft, des Transportweges und des Schicksals des ABA-GE in einer vegetativen Pflanze. Die Pfeile verdeutlichen den Fluss des ABA-GE (rot) und freier ABA (blau) in der Wurzel (A), dem Spross (B) und dem Blatt (C). Im Text wird auf die Nummerierung in den einzelnen Ausschnitten Bezug genommen. Die extrazelluläre β-D-Glucosidaseaktivität ist durch einen hellgrünen Kreis dargestellt; den vermuteten ABC-Transporter in den Plasmamembranen des Xylem- und Palisadenparenchym kennzeichnet ein hellblaues Oval. Die Zellwandverdickungen der Exo- und Endodermis heben sich durch eine Gelbfärbung von den grauen Zellwänden ab. Im Blatt sind ausschnittsweise ein Leitbündel, ein Querschnitt durch das Palisadenparenchym und ein einzelnes Stoma abgebildet. Die Farbgebung entspricht der in der Wurzel. Gz : Geleitzelle; Sr: Siebröhre; Tr: Tracheide.

## 4.1.1 Der radiale Transport des ABA-GE in der Wurzel

### 4.1.1.1 Herkunft des ABA-GE

Für das Wurzelwachstum und ihre Entwicklung ist ein bestimmter Phytohormon-Gehalt in der Bodenlösung notwendig (Müller et al. 1989). Die Aufnahme externer Pflanzenhormone aus dem Boden und deren Transport zu oberirdischen Pflanzenteilen können das Sprosswachstum beeinflussen. Frankenberger und Arshad (1995) fassten solche aus dem Boden stammenden hormonellen Stimuli in einem detaillierten Überblick zusammen.

Im Xylemsaft detektierbarer ABA-GE kann aus externen, aber auch internen Quellen stammen. Freie ABA wurde schon durch Hartung et al. (1996) im Bodenwasser in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.8 bis 4.3 nM nachgewiesen. In Bodenproben, die unter verschiedenen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen entnommen wurden, war ebenfalls eine ABA-GE-Konzentration der Bodenlösung zwischen 0.4 nM bis zu 35 nM ermittelbar. Der ABA-GE-Gehalt lag immer über dem der freien ABA. Im Gegensatz zur freien ABA (Hartung et al. 1996) konnte eine Abnahme der ABA-GE-Konzentration mit zunehmender Bodentiefe und wachsendem Abstand von der Wurzel festgestellt werden. Der gleichzeitig beobachtete Anstieg des Bodenwassergehaltes könnte dieses Phänomen teilweise erklären (3.1.3).

Ob ABA-GE unter Stressbedingungen auch endogen verstärkt im Wurzelgewebe gebildet wird, sollte ein Austrocknungsexperiment zeigen (siehe 3.1.1.1). Intakte Maispflanzen aus Luftkultur und Hydrokultur wurden zu diesem Zweck in eine Klimakammer zum Austrocknen gehängt. In den Primärwurzeln beider Anzuchtmethoden stieg der ABA-GE-Gehalt mit zunehmender Austrocknungsdauer. Nach einer dreistündigen Austrocknungsdauer war der ABA-GE-Gehalt in den Primärwurzeln aus Luftkultur um den Faktor 2.6 bzw. 2.2 bei den Primärwurzeln aus Hydrokultur angestiegen. Daraus konnte geschlossen werden, dass ABA-GE<sub>xyl</sub> sowohl extern aus dem Boden stammt (Abb. 4-1: 1,2 und 3) als auch aus einer stressbedingten Neusynthese im Wurzelgewebe hervorgehen könnte (Abb. 4-1: 4).

In beiden Fällen stellte sich die Frage nach dem Transportweg zu den Fernleitungsbahnen im Zentralzylinder. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Glucoseesters erlauben im Gegensatz zur ABA keine freie Diffusion über Plasmamembranen (Baier et al. 1990). Wird ABA-GE aus dem Boden in den Wurzelapoplasten aufgenommen, dann müsste dieser auf apoplastischem Wege innerhalb der Wurzelrinde zur Stele transportiert werden.

#### **4.1.1.2 Apoplastische Barrieren und ihr Einfluss auf den radialen Transport konjugierter ABA in der Wurzel**

Exodermis und Endodermis gelten anatomisch als Abschlussgewebe. Die innerste Zellschicht des Wurzelkortex wird durch die Endodermis gebildet, die in ihren radialen Zellwänden „Casparij'sche Bänder“ aufweist (Casparij 1866). Ein solches Band beschränkt sich auf einen Teil der Zellwand (Primärwand) und besteht aus Lignin und Suberin. Bereits durch das Vorhandensein dieses Casparij'schen Bandes ist eine apoplastische Barriere in diesem Bereich voll ausgebildet (Peterson 1988). Es handelt sich dabei um eine Endodermis des primären Stadiums. Im sekundären Stadium wird der Zellwand dieser Zellen eine Suberinlamelle aufgelagert, der im tertiären Stadium weitere Celluloseschichten mit Inkrustierungen aus Suberin und Lignin folgen. Oftmals erscheinen Zellen des tertiären Stadiums im Querschnitt u-förmig, da die Celluloseauflagerung nicht allseitig stattfindet. Im äußeren Bereich des Wurzelkortex kann sich die unmittelbar an die Rhizodermis angrenzende Zellschicht zu einem weiteren Abschlussgewebe, der Hypodermis, umbilden. Eine Hypodermis, die ebenfalls in ihren radialen Wänden Casparij'sche Bänder aufweist, wird auch als Exodermis bezeichnet. Nur 9 % der über 200 untersuchten Angiospermenarten bilden keine Exodermis (Permulla et al. 1990, Peterson und Permulla 1990). Bereits wenige mm hinter dem Wurzelapex kann es zur Ausbildung von Exo- und Endodermis kommen, wobei sich häufig das exodermale vor dem endodermalen Band entwickelt (Enstone und Peterson 1992).

Eine Stimulation der Endo- und/oder Exodermisbildung kann durch Trockenheit oder niedrige Temperaturen ausgelöst werden (North und Nobel 1991, Clarkson et al. 1987). Bei der Luftkulturmethode wurden Maiswurzeln mit einem feinen Nährlösungs-aerosol besprüht, was die Bildung einer Exodermis stimulierte (Zimmermann und Steudle 1998). Maispflanzen aus Hydrokultur wiesen dagegen keine Suberinisierung der Hypodermis auf (Freundl et al. 1998). Wasser und auch Nährstoffe können in der Wurzel auf apoplastischem oder symplastischem Weg zu den Fernleitungsbahnen gelangen. Apoplastische Barrieren sind häufig physiologische Scheiden, wodurch die Aufnahme sowie Passage des Wassers und der darin gelösten Nährsalze kontrolliert werden können. Dies bedeutet aber keine völlige Impermeabilität der Barrieren; vor allem unter stark transpirierenden Bedingungen ist die Endodermis für Wasser durchlässig. Durch das Anlegen eines hydrostatischen Druckgradienten kann der Wasserfluss durch dekapitierte Maiswurzeln stimuliert werden (Steudle und Peterson 1998). Hydrostatische Druckgradienten sind in der Regel stärker als osmotische Gradienten. In diesem Fall erfolgt der Wassertransport hauptsächlich im

Wurzelapoplast, wogegen osmotische Gradienten einen symplastischen und in geringem Maße apoplastischen Transportweg bewirken (Steudle 1994).

Die Ionenaufnahme der Wurzel ist dagegen deutlich durch apoplastische Barrieren wie Exo- und Endodermis beeinflusst. Auf diese Weise ist eine gezielte Nährstoffaufnahme und der Ausschluss toxischer Substanzen möglich (Peterson 1987, Enstone und Peterson 1998). Liegt eine Exodermis vor, so gelangen Nährsalze früher in den Symplast als beim alleinigen Vorhandensein einer Endodermis. Hier ist ein apoplastischer Transport im Wurzelkortex bis zur Endodermis möglich. Ein ungekoppelter Wasser- und Teilchenfluss konnte für Nährelemente wiederholt nachgewiesen werden. Bei einem verstärkten radialen Wasserfluss durch die Wurzel entsteht eine Verdünnung der Nährstoffkonzentration im Xylem (Freundl 1998).

Das Pflanzenhormon Abscisinsäure ist in seiner protonierten Form lipophil. Dies erleichtert die Diffusion durch Plasmamembranen (Baier et al. 1990) und ermöglicht die Passage durch suberinisierte Barrieren mittels „solvent drag“ (Hose et al. 2001). Aufnahmeexperimente mit [<sup>14</sup>C]ABA ließen eine erniedrigte ABA-Aufnahme bei Maiswurzeln mit einer Exodermis erkennen (Freundl et al. 2000). Wurden transpirierende Bedingungen simuliert, konnte ABA beide apoplastische Barrieren mittels dem „solvent-drag“ des Wassers überwinden. Dieser apoplastische Bypass zeigte, dass der radiale ABA-Transport in der Wurzel anders als bei den Nährsalzen verläuft. Außerdem war keine Verdünnung der ABA trotz gesteigertem Wasserfluss im Xylem festzustellen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Autoren Jackson et al. (1996) und Else et al. (1994, 1995, 2001), die einen reinen symplastischen Transport der ABA postulieren. Ein solcher Transportweg hätte eine Verdünnung der ABA-Konzentration im Xylem nach steigenden Wasserflussraten zur Folge.

#### **4.1.1.3 ABA-GE-Transportstudien durch dekapitierte Maiswurzelsysteme**

Durch Anlegen eines Unterdrucks (2.6.2) können Wasser- und Teilchen-Flüsse durch dekapitierte Wurzelsysteme erzeugt werden. Verwendet man hierbei Wurzeln aus zwei verschiedenen Kulturmethode (Hydrokultur und Luftkultur), können eventuelle Barrierefunktionen beim apoplastischen Transportweg erkennbar werden.

Zunächst wurde ein subatmosphärischer Druck auf das Mesokotyl hydroponisch angezogener dekapitierter Maiswurzelsysteme angelegt, um, wie in einer transpirierenden Pflanze, einen radialen Wasserfluss ( $J_{Vr}$ ) durch die Wurzel ins Xylem zu erzeugen. Nach 80 min wurde das Außenmedium auf 100 mM ABA-GE eingestellt. Vor Zugabe des ABA-GE lag seine

Konzentration im Xylem zwischen 1.2 und 2.4 nM. Überraschenderweise fiel sie in den folgenden 60 min nach der Zugabe bis unter die Nachweisgrenze ab. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der freien ABA im Xylemsaft von 1.1 nM auf 8.0 nM gemessen werden. Der ABA-Fluss ( $J_{ABA}$ , 2.6.1) nahm nach Zugabe des ABA-GE um den Faktor 2.2 zu. Mit dem Anstieg der ABA-Konzentration im Xylem erfolgte gleichzeitig eine Zunahme des radialen  $J_{Vr}$  um den Faktor 1.5.

In der Literatur finden sich viele Belege, dass ABA die hydraulische Leitfähigkeit des Wurzelsystems ( $L_{Pr}$ ) verändert, wodurch der radiale Wasserfluss beeinflusst wird. In Publikationen wurde dieses Thema sehr häufig kontrovers diskutiert. Autoren wie Markhart et al. (1979) und Fiscus (1981) belegten eine reduzierte  $L_{Pr}$  bei hydrostatischen Drücken von 5 bar und hohen ABA-Konzentrationen (0.2 mM). Andererseits wurde eine stimulierte hydraulische Leitfähigkeit nach externer ABA-Applikation bei verschiedenen Pflanzenarten gefunden (Glinka 1977, Ludewig et al. 1988, Zhang et al. 1995, Freundl et al. 1998, 2000). Erklärbar ist dadurch die Zunahme des radialen Wasserflusses beim oben beschriebenen Experiment mit hydroponischen Wurzeln.

Dasselbe Experiment wurde ebenfalls mit Wurzelsystemen aus Luftkultur durchgeführt. Während der gesamten Versuchsdauer lag die ABA-Konzentration im Xylem zwischen 2.2 und 5.2 nM. Die ABA-GE-Zugabe nach 80 min hatte weder Einfluss auf die Konzentration der freien ABA noch auf die des ABA-GE (1.1 - 2.6 nM). Der radiale Wasserfluss ins Xylem blieb unbeeinflusst.

Bei den Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen beider Saugexperimente darf eine wichtige Eigenschaft des ABA-GE nicht außer Acht gelassen werden. Der Permeabilitätskoeffizient der Plasmamembranen für ABA-GE ist im Gegensatz zur freien ABA sehr gering (Baier et al. 1990). Im Falle der hydroponisch kultivierten Wurzelsysteme kann ABA-GE mit dem extrazellulär einströmenden Wasser in den Wurzelapoplasten gelangen (Abb. 4-1: A2). Der Symplast ist für das Konjugat aufgrund des niedrigen Permeabilitätskoeffizienten nicht zugänglich. Die Erhöhung der ABA im Xylem lässt auf eine enzymatische Spaltung des Konjugates schließen (Abb. 4-1: A1). Aus dem Konjugat freigesetzte ABA kann mit dem „solvent-drag“ des Wassers bis in die Fernleitungsbahnen gelangen. Die Konzentrationsabnahme des ABA-GE im Xylem zeigt zum einen, dass die Endodermis für das Konjugat eine apoplastische Barriere darstellt. Zum anderen deutet sie auf einen symplastischen Transport des in der Wurzel endogen vorhandenen ABA-GE hin (Abb. 4-1: A4). Die abnehmende ABA-GE-Konzentration kann durch einen Verdünnungs-Effekt, wie Jackson und Koautoren ihn postulieren, erklärt werden. Substanzen, die dem symplastischen



Transportweg folgen, werden bei verstärkter Transpiration verdünnt. Tatsächlich war ein Anstieg des radialen Wasserflusses nach der Freisetzung der ABA aus dem Konjugat zu beobachten.

Bei den Wurzeln aus Luftkultur konnte keine Erhöhung der  $ABA_{xyl}$  nach Glucoseesterzugabe zum Außenmedium gemessen werden. Aufgrund der apoplastischen Barriere Exodermis gelangte der ABA-GE nicht in den Wurzelapoplasten (Abb. 4-1: A3) und konnte durch extrazelluläre Glucosidase nicht gespalten werden. Die Verdünnung des  $ABA-GE_{xyl}$  trat nicht auf, da der radiale Wasserfluss während der gesamten Versuchsdauer unverändert blieb.

Diese Versuche machen deutlich, dass Exo- und Endodermis eine effektive Barriere für den hydrophilen ABA-GE darstellen. Aus der Gleichung des radialen ABA-Flusses (2.6.1) in der Wurzel lässt sich der Reflektionskoeffizient  $\sigma_s$  (Freundl et al. 1998) ableiten. Der Reflektionskoeffizient  $\sigma_s$  ist ein Maß für die selektive Permeabilität einer Barriere für Wasser und darin gelöste Stoffe. Maximal kann  $\sigma_s$  den Wert 1 annehmen. In diesem Fall wäre die Barriere ideal semipermeabel. Nur Wasser, nicht aber der gelöste Stoff, kann sie passieren. Dies trifft vor allem auf große, hydrophile oder geladene Moleküle (z.B. Salze und Zucker) zu. Auch der ABA-GE zeichnet sich durch solche Eigenschaften aus, weshalb ein  $\sigma_s$  von 1 angenommen werden kann. Da ABA-GE im Xylem unter Stressbedingungen ansteigt, muss endogen synthetisierter Glucoseester auf dem symplastischen Weg durch den Kortex in die Stele gelangen.

#### **4.1.1.4 Apoplastische $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität in Maiswurzeln**

Die Bezeichnung und das Konzept „Apoplast“ geht auf den Forstbotaniker Münch (1930) zurück, der in seiner Druckstromtheorie deutlich zwischen den Kompartimenten Symplast und Apoplast unterscheidet. Der Symplast bestand für ihn aus allen Protoplasten eines Gewebes, die durch Plasmamembranen vom „nicht-lebendigen“ Raum, oder Apoplast genannt, separiert sind. Canny (1995) untergliedert diesen extrazellulären Raum noch weiter in das Xylemlumen, den Zellwandapoplasten und den Interzellularraum. Dies ist notwendig, da beim Transport von Stoffen innerhalb dieser Räume unterschiedliche physikalische Parameter herrschen. Beispielsweise folgen Wasser- und Teilchenflüsse im Xylem dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz (2.8.2, 4.1.2), wogegen im Zellwandapoplasten und in den Interzellularräumen die Diffusion eine große Rolle spielt. Das spezifische Milieu des Apoplasts wird durch den Export von Stoffen aus dem Symplast sowie durch Umweltfaktoren

beeinflusst. Die Konzentration von anorganischen Ionen und Metaboliten wie Aminosäuren, Zuckern und organischen Säuren unterscheidet sich deutlich von der im Protoplast (Mimura et al. 1992; Dietz 1997). Der pH-Wert liegt zwischen 5-7, wobei Stressbedingungen wie Trockenheit (Wilkinson und Davies 1997), Salinität und ebenso Pflanzenhormone (z.B. IAA, Gibberelline: Aloni et al. 1988) Veränderungen hervorrufen. Auf dem sekretorischen Wege gelangen Proteine aus der Zelle in den Apoplasten. Dabei handelt es sich um lytische, z.T. essentielle Enzyme, die entweder völlig gelöst vorliegen oder ionisch und kovalent an die Zellwand gebunden sind (Dietz 1997). Extrazelluläre Glucosidasen zählen zu diesem Enzymtypus. Aus Gerste (Li et al. 1989), Reis (Akiyama et al. 1998), Mais (Nematollahi und Roux 1999) und reifen Kirschen (Gerardi et al. 2001) konnten sie isoliert und charakterisiert werden.

Da beim oben beschriebenen Saugexperiment eine ABA-Anreicherung im Xylem der dekapitierten Maiswurzeln nach Zugabe von ABA-GE zum Außenmedium gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, der Wurzelapoplast könnte Ort der enzymatischen Spaltung des ABA-GE sein. Um dies zu bestätigen, musste zunächst apoplastische Waschflüssigkeit aus hydroponischen Wurzeln gewonnen werden. Mit einem speziellen Enzymtest (2.9.2) konnte tatsächlich Glucosidaseaktivität in der interzellulären Waschflüssigkeit (IWF) nachgewiesen werden. Bei längeren Inkubationszeiten mit dem Substrat (p-NPG) war eine Zunahme der Hydrolyse zu beobachten. Ein kompetitives Hemmungsexperiment sollte nun zeigen, ob der ABA-GE selbst als Substrat dienen kann. In diesem Fall wurde Glucoseester zusammen mit dem für den Nachweis verwendeten Substrat zum IWF gegeben. Eine deutliche Hemmung auf 52% der Ausgangsaktivität trat bei einer allerdings hohen ABA-GE-Konzentration von 5 mM auf. Trotzdem lässt dieses Experiment auf eine gewisse Spezifität der im Wurzelapoplast lokalisierten Glucosidase für ABA-GE schließen.

#### **4.1.1.5 Xylembeladung mit ABA-GE**

Der Langstreckentransport von Assimilaten, Wasser, anderen Nährstoffen sowie vielen Phytohormonen erfolgt in den Fernleitungsbahnen des Phloems und Xylems. Die Beladung der Fernleitungsbahnen findet entweder in der Wurzel, wie im Falle des Xylems, oder den Blättern (Phloem) statt. Im Gegensatz zu den Siebelementen des Phloems stehen die Xylembahnen nicht über Plasmodesmen mit dem sie umgebenden Parenchym in Verbindung, wodurch eine Emboliegefahr verringert werden soll. Der eigentliche Beladungsmechanismus mit Ionen aus den Xylemparenchymzellen in die angrenzenden Gefäße ist noch nicht

eindeutig geklärt. Es ist denkbar, dass spezielle Xylemparenchymzellen, auch Transferzellen genannt, an diesem Beladungsvorgang beteiligt sind. Sie grenzen direkt an die toten Xylemelemente und weisen an den Kontaktstellen Zellwandprotuberanzen auf. Dabei handelt es sich um vielfältige Auswüchse der Zellwand gegen das Zellinnere, die mit dem Plasmalemma ausgekleidet sind. Auf diese Weise wird die zum Stoffaustausch befähigte Oberfläche beträchtlich vergrößert. Die Tatsache, dass durch Wurzeldruck der Fernleitungstransport auch ohne transpirierende Oberfläche möglich ist, macht aktive Transportvorgänge über die Plasmamembranen des Xylemparenchyms wahrscheinlich.

#### **4.1.1.5.1 Effluxexperimente mit isolierten Wurzelrinden- und Wurzelstelensegmenten**

Wird endogen gebildeter ABA-GE symplastisch innerhalb des Wurzelkortex bis zur Stele transportiert, muss dieser für die Beladung des Xylems in den Apoplasten freigesetzt werden. Mit isolierten Wurzelstelen und -kortexsegmenten sollte diese Freisetzung in Form von Effluxexperimenten getestet werden (2.7). Das umgebende Medium kann hierbei mit dem Wurzelapoplasten gleichgesetzt werden. In 4 verschiedenen Versuchsansätzen wurden die mit ABA vorbeladenen Segmente in hormonfreies Medium überführt und anschließend ihr ABA-GE-Efflux ins Medium bestimmt (3.4). Bei einer Vorinkubation mit 5 nM ABA gaben die Wurzelstelen mehr ABA-GE als Rindensegmente ans Medium ab. Die Vorinkubation mit 50 nM ABA ließ den Unterschied deutlicher hervortreten. In einem weiteren Versuchsansatz, wobei mit 50 nM ABA und Tetcyclacis inkubiert wurde, war der Efflux aus den stelären Segmenten am stärksten. Tetcyclacis hemmt den oxidativen Abbau der ABA, wobei gleichzeitig die Bildung des ABA-GE gefördert wird (Zeevaart et al. 1988). Überraschenderweise konnte durch eine zusätzliche Behandlung mit 100 mM NaCl kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gewebetypen gefunden werden. Eine Erklärung für diesen offensichtlichen Widerspruch folgt am Ende dieses Abschnittes. Ungeachtet des letzten Versuchsansatzes zeigte dieses Experiment, dass ein stärkerer ABA-GE-Efflux in den Apoplasten über die Membranen des Xylemparenchyms stattfindet.

Die Gehalte an freier ABA und ABA-GE im Gewebe der jeweiligen Segmenttypen lieferten eine Erklärung für den niedrigen ABA-GE-Efflux beim Versuchsansatz mit 100 mM NaCl. Nach der 24-stündigen Vorinkubation mit ABA enthielten alle Stelensegmente der 4 Versuchsansätze mehr ABA als die Wurzelrindensegmente. Deutlich erhöht war der ABA-Gehalt bei den Versuchsansätzen mit 50 nM ABA und Tetcyclacis sowie mit 50 nM ABA,

Tetacyclacis und 100 mM NaCl. In beiden Fällen war auch der Efflux an freier ABA ins hormonfreie Medium gegenüber den anderen Versuchsansätzen verstärkt.

Die ABA-GE-Gehalte beider Segmenttypen zeigten eine ähnliche Verteilung in den Geweben wie bei der freien ABA. Im Vergleich zu den Kortexsegmenten war ebenfalls eine Anreicherung mit ABA-GE in den stelären Segmenten zu finden. Die Inkubation der Segmente mit freier ABA lässt erkennen, dass die Konjugatbildung verstärkt in der Wurzelstele stattfindet. Eine Ausnahme bildete die Vorbehandlung mit 100 mM NaCl, 50 nM ABA und Tetacyclacis. Hier war der ABA-GE-Gehalt in den Stelen deutlich geringer, was auch den niedrigeren ABA-GE-Efflux ins hormonfreie Medium erklärt.

#### **4.1.1.5.2 Die Salztoleranz der Maissorte Helix**

Obiges Ergebnis führte zur Annahme, dass eine 100 mM NaCl-Konzentration, welche die ABA-GE-Glycosyltransferase (1.4) im stelären Gewebe offensichtlich hemmt, im intakten Wurzelgewebe nicht in die Xylemgefäße der Stele gelangt. Es ist bekannt, dass die meisten Getreidearten relativ salzsensitiv sind. Ihre Wurzeln besitzen Strategien, um hohe Salzkonzentrationen im Wurzelsymplasten zu vermeiden. Die Plasmamembranen der Wurzel verfügen über eine mehr oder weniger ausgeprägte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Selektivität, welche einen Ausschluss des Natriumions bewirkt. Membranen, die reich an Glycolipiden sind, weisen eine erhöhte Löslichkeit für das  $\text{Cl}^-$ -Ion in der Lipidschicht auf. Im Gegensatz dazu reduzieren Phosphatidylcholine den Chlorid-Influx über die Plasmamembran (Lambers et al. 1998). Durch einen verstärkten aktiven Transport können  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  wieder aus dem Cytoplasma entfernt werden. Die Synthese niedermolekularer, für die Zelle unschädlicher organischer Stoffe (z.B. Prolin) ermöglicht die Aufrechterhaltung des osmotischen Potentials trotz erhöhter apoplastischer NaCl-Konzentration. Osmotin, ein Salzschockprotein (26 kDa), wird verstärkt bei Salzbelastung gebildet und nach Beendigung des Salzstress schnell metabolisiert. Signalgeber für die Synthese ist das Pflanzenhormon ABA. Eine spezifische Isoform des Osmotins unterstützt die Salztoleranz der Pflanzenzelle (Kreeb 1996).

Da in der Literatur keine Angaben zur Verfügung standen, musste die Salztoleranz der verwendeten Maissorte Helix zunächst überprüft werden. In einem späteren Saugexperiment mit intakten Maiswurzeln sollte der ABA-GE-Efflux aus dem stelären Gewebe ins Xylem unter realistischen Salzstressbedingungen getestet werden.

Eine NaCl-Konzentration von 100 mM schränkte zwar das Wachstum der Maiskeimlinge ein, ließ aber keine äußerlichen Mangelsymptome oder Schäden erkennen (3.1.1.2). Diese

Wachstumshemmung kann durch verschiedene ineinandergreifende Faktoren ausgelöst werden. Beispielsweise wird ABA als Signalgeber für Abwehr- bzw. Toleranzmechanismen in der Wurzel verstärkt gebildet (Lachno und Baker 1986; Degenhardt et al. 2000). Schon eine Konzentration von 50 mM NaCl hatte einen klaren Anstieg der ABA und ihres Konjugats ABA-GE im Blatt zur Folge. Bei den Wurzeln war der ABA-Anstieg deutlicher als der des Konjugats, was durch einen schnelleren Abtransport im Xylem erklärt werden könnte. Unter Stressbedingungen kann der Gehalt an ABA-Konjugaten im Xylem den der freien ABA übersteigen (1.2). Eine weitere Erklärung für diesen Befund könnte eine verstärkte Metabolisierungsrate der ABA in den Blättern sein. Als Folge dieser ABA-Erhöhung war die Blattleitfähigkeit der salzbelasteten Pflanzen herabgesetzt, was Auswirkungen auf die CO<sub>2</sub>-Fixierung und das Wachstum hat. Betrachtet man den Mineralhaushalt, so traten bei den wichtigsten Kationen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> charakteristische Veränderungen auf, die schon häufig bei salzbelasteten Pflanzen nachgewiesen wurden (Cramer 1994; Fortmeier und Schubert 1995). Der Calcium- sowie Kaliumgehalt sank, während der Natriumgehalt mit zunehmender Salzbelastung in den Blättern anstieg. Als Indiz für die Natrium-Toxizität wird das Kalium/Natrium-Verhältnis herangezogen, da Natrium die Aktivität von Kalium-abhängigen Enzymen beeinträchtigt (Jeschke 1984). Das K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Verhältnis in Blättern war tatsächlich mit zunehmender Salzbelastung erhöht. Rodriguez et al. (1997) wiesen dies ebenfalls bei salzgestressten Maiswurzeln nach. Kontrovers sind die Meinungen, ob Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> schädlicher für den pflanzlichen Stoffwechsel ist. Eine Enzyminaktivierung durch Chlorid zeigen Untersuchungen von Levitt (1980) und Gimmler et al. (1984). Andererseits können hohe Na<sup>+</sup>-Konzentrationen Ca<sup>2+</sup>-Ionen an der Plasmamembran verdrängen (Rengel 1992; Fortmeier und Schubert 1995), was zu veränderten Permeabilitätseigenschaften der Membranen führt. Als Folge kann es zu Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Leckströmen in den Apoplasten kommen und somit ein Ionenungleichgewicht entstehen, welches ebenfalls das elektrochemische Membranpotential beeinträchtigt.

Für weitere Experimente wurde eine Anzucht mit einer 100 mM NaCl Salzbelastung im Hydrokulturmedium gewählt, da selbst bei dieser Salzkonzentration keine sichtbaren Mangelsymptome auftraten.

#### **4.1.1.5.3 Perfusionsexperimente mit intakten Maiswurzelsystemen**

Mit salzgestressten Maispflanzen sollte die Translokation des ABA-GE ins Xylem im intakten Wurzelsystem untersucht werden. Befanden sich die Wurzeln während des Versuchs

in ihrem NaCl-haltigen Anzuchtsmedium (100 mM), konnte kein Xylemsaft gewonnen werden. Die durch NaCl reduzierte hydraulische Wurzeleitfähigkeit bei Mais wurde von Azaizeh und Steudle (1991) und Azaizeh et al. (1992) sowohl auf der Ebene des Wurzelgewebes als auch zellulär untersucht. Sie fanden, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz zum Kulturmedium diesen Salzeffekt kompensieren kann. Der Austausch des Saugmediums gegen ein NaCl-freies Medium wurde dem obigen Verfahren vorgezogen. Allerdings konnten selbst unter diesen Bedingungen nur geringe Volumina an Xylemsaft geerntet und damit ausschließlich eine NaCl-Bestimmung durchgeführt werden. Bei den ungestressten Pflanzen lag der NaCl-Gehalt im Xylem bei 0.07 mM, bei den 100 mM salzgestressten Wurzelsystemen waren es 10 mM.

Um zusätzlich den ABA-GE-Gehalt im Xylem messen zu können, musste das obige Saugexperiment modifiziert werden. Eine Entfernung der Hauptwurzelspitze sollte das Xylem für das Perfusionsmedium besser zugänglich machen. Auf diese Weise konnte mit einem geringeren hydrostatischen Unterdruck ausreichend Xylemsaft gewonnen werden. Dem Perfusionsmedium wurde während der gesamten Versuchsdauer weder ABA noch ABA-GE zugefügt. Falls ABA-GE im gewonnenen Xylemsaft nachweisbar war, musste dieser aus dem Xylemparenchym stammen. Bei den Kontrollpflanzen konnte in etwa der gleiche Gehalt an ABA und ABA-GE gefunden werden. Die Vorbehandlung mit Salz ließ den ABA und ABA-GE-Efflux aus dem Gewebe ansteigen. Wurde das Perfusionsmedium zusätzlich mit 10 mM NaCl angereichert, also eine Konzentration, die im Xylem von mit 100 mM NaCl gestressten Maispflanzen nachweisbar war, konnte der ABA-GE-Efflux aus dem Gewebe nochmals um den Faktor 2.6 gesteigert werden. Damit wird deutlich, dass Salzstress tatsächlich den ABA-GE-Efflux aus dem Xylemparenchym ins Xylem stimuliert.

#### **4.1.1.5.4 Mechanismus der Xylembeladung mit ABA-GE**

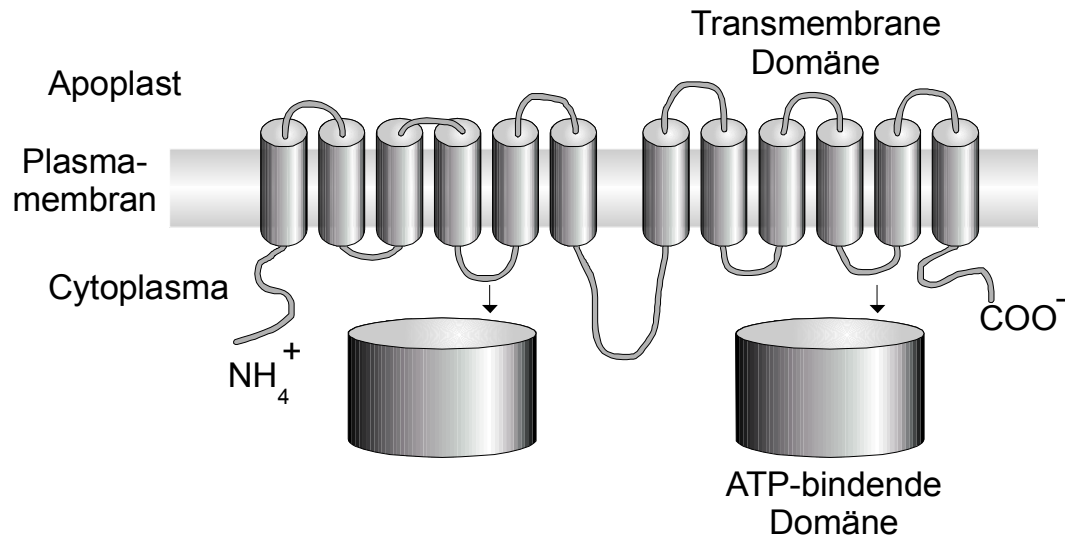
Der Mechanismus, der für einen solchen ABA-GE-Transport über das Plasmalemma der Xylemparenchymzellen verantwortlich ist, bleibt ungeklärt. Grundsätzlich kommen Diffusion und katalysierter Transport in Frage. Nachdem sich der Permeabilitätskoeffizient der Plasmamembran für ABA-GE als sehr gering erwies (Baier et al. 1990), erscheint ein diffusiver Transport eher unwahrscheinlich. Der verstärkte ABA-GE-Efflux aus stelärem Gewebe deutet auf eine höhere Permeabilität der Xylemparenchymmembranen für ABA-GE hin. Saugexperimente mit salzgestressten Maiswurzelsystemen stützen diese Hypothese. Natriumionen erhöhen ihrerseits die Permeabilität von Membranen in Maiswurzeln (Cramer

1994), was die verstärkte ABA-GE-Abgabe ins Xylem gegenüber den Kontrollen erklären würde.

Der alternativ spezifisch katalysierte Transport über die Membran könnte durch Vertreter der ABC-Transporter vermittelt werden (Abb. 4-1: A5). ABC-Transporter nutzen die freiwerdende Energie aus der ATP-Hydrolyse, um Stoffe gegen einen Konzentrationsgradienten über Membranen zu pumpen. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Transportprozessen, in denen Substanzen durch sekundär-aktiven Transport gegen einen Gradienten transportiert wurden, erfolgt hier ein ATP-getriebener primär-aktiver Transport. Charakteristisch ist die hohe Substratspezifität und entsprechend des transportierten Stoffes gibt es eine große Varietät an Transportern für Peptide, Zucker, Lipide, Schwermetalle, Alkaloide, Steroide und Glutathionkonjugate (Martinoia et al. 1993) u.s.w.. Einige Transporter sind auf den Import von Stoffen in den Symplasten spezialisiert, andere hingegen für den Export aus dem Cytoplasma in den Apoplasten oder das Vakuolenlumen verantwortlich (Theodoulou 2000). Abbildung 4-2 verdeutlicht den Aufbau eines ABC-Transporters.

Unterschieden wird zwischen einer transmembranen Domäne, die aus 12  $\alpha$ -Helices besteht, und der an der Peripherie zum Cytoplasma hin lokalisierten ATP-bindenden Domäne. Die  $\alpha$ -Helices sind für die Tunnelbildung und Substratspezifität verantwortlich. An der ATP-bindenden Domäne findet die energieliefernde ATP-Hydrolyse statt (Higgins 1992).

Wegen der Größe und Hydrophilie des ABA-GE ist die freie Diffusion über Membranen äußerst unwahrscheinlich. Da ABC-Transporter Glutathion-Xenobiotika-Konjugate durch Membranen schleusen können (Martinoia 1993, Heldt 1996), dürfte im Fall des ABA-GE die Molekülgröße keine Einschränkung bedeuten. Ebenso kann das Milieu innerhalb des Tunnels ausreichend hydrophil sein. Sidler et al. (1998) konnten belegen, dass der im Plasmalemma lokalisierte Transporter AtPGP1 in Wurzel und Spross von *Arabidopsis thaliana* an der hormonalen Regulation von Entwicklungsprozessen beteiligt ist. Ebenso scheint nach vorläufigen Untersuchungen von Enrico Martinoia (Neuchatel, CH, persönliche Mitteilung) der IAA-Aspartatkonjugat-Transport in den Apoplasten durch einen ABC-Transporter vermittelt zu werden.



**Abb. 4-2** Struktureller Aufbau eines typischen ABC-Transporters. Der transmembrane Teil besteht aus  $2 \times 6$  amphiphile  $\alpha$ -Helices. Die peripheren ATP-bindenden Domänen liegen an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Der Pfeil an dem Loop zwischen der jeweils 4. und 5.  $\alpha$ -Helix soll die noch nicht völlig geklärte Interaktion zwischen beiden ATP-bindenden Domänen markieren (nach Higgins 1992).

#### 4.1.1.6 Radialer Transport verschiedener ABA-Analoga und ihr Einfluss auf $J_{vr}$

Die regulatorische Funktion des Stresshormons Abscisinsäure auf den Wasserhaushalt der Pflanzen zeigt sich bei den Blättern auf stomatärem Niveau. Eine Erhöhung der hydraulischen Leitfähigkeit ( $L_{Pr}$ ) ließ sich für Wurzeln nachweisen (Glinka 1980; Zhang et al. 1995, Quintero et al. 1999). Hose et al. (2000) konnten mittels Zell- sowie Wurzeldrucksonde und Saugexperimenten darlegen, dass die Stimulierung der  $L_{Pr}$  sowohl auf Zell- als auch auf Wurzelebene spezifisch für ABA war. Andere Phytohormone wie Indoleessigsäure, Cytokinine oder Gibberelline hatten keinen Einfluss. Um die Spezifität dieses ABA-induzierten Phänomens noch detaillierter zu betrachten, wurden mittels der Saugtechnik ABA-Vorläufer, Metabolite (z.B. ABA-GE) und weitere Analoga mit ihren (+)- und (-)-Enantiomeren an dekapitierten Maiswurzelsystemen getestet (3.2.3).

Tatsächlich war das hochreine (-)-Enantiomer der ABA ohne jede Wirkung. Dagegen ließ (+)-ABA den radialen Wasserfluss durch das Wurzelsystem ansteigen. Dieser ausschließlich durch das (+)-Isomer hervorgerufene Effekt konnte schon bei der Keimung von Kressesamen (Gusta et al. 1992) und einigen Genexpressions-Assays (Walker-Simmons et al. 1992, Wilen et al. 1993) beobachtet werden.

Eine starke Stimulierung der  $L_{Pr}$  konnte ebenfalls nach Zugabe von (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA zum Außenmedium registriert werden. Bei diesem Analogon handelt es sich um ein



stabiles Derivat der (+)-8'-Hydroxy-ABA, dem ersten ABA-Abbauprodukt und Vorläufer der Phaseinsäure. Walker-Simmons et al. (1997) konnten zeigen, dass (+)-8'-Hydroxy-ABA die Bildung von LEA-Proteinen in Weizen stärker induzierte als (+)-ABA. Während der Reifung von *Brassica napus*-Embryonen konnte von Zou et al. (1995) eine ähnlich stimulierende Wirkung von (+)-ABA und (+)-8'-Hydroxy-ABA auf die Lipid- und Oleosin-Synthese nachgewiesen werden. Dies könnte zu der Annahme verleiten, dass nicht (+)-ABA, sondern deren erstes Abbauprodukt den eigentlichen physiologischen Stimulus darstellt. Gegen eine solche Annahme spricht der Befund von Hose et al. (2000), da nach einer Vorbehandlung der Maiswurzeln mit Tetcyclacis eine Verstärkung der ABA-Wirkung festzustellen war. Der Wachstumshemmstoff Tetcyclacis verhindert die Hydroxylierung der 8'-Methylgruppe der ABA (Daeter und Hartung 1990). Somit kann nur (+)-ABA als Effektor gelten. Beide Substanzen, (+)-ABA wie auch ihr Metabolit (+)-8'-Hydroxy-ABA, scheinen im Falle der  $L_{Pr}$  gleichermaßen physiologisch aktiv zu sein. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass nach (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA-Gabe zum Wurzelmedium kein (+)-ABA-Anstieg im Xylemsaft gefunden wurde.

Phaseinsäure gilt allgemein als physiologisch inaktiv (Walton 1983), und erwartungsgemäß blieb auch der radiale Wassertransport in der Wurzel unbeeinflusst. Als weiterer Metabolit der ABA wurde ABA-GE getestet. Wie schon früher gezeigt (4.1.1.3), steigt nach der ABA-GE-Gabe der ABA-Gehalt im Xylem und gleichzeitig erhöht sich  $L_{Pr}$ . Dieser Befund bestärkt die Annahme, dass eine enzymatische Spaltung während des radialen Transportes durch die Wurzel stattfindet und ABA aus dem Konjugat freigesetzt werden kann.

Als direkter Vorläufer der ABA wird der Abscisyl-Aldehyd in den letzten Jahren kontrovers diskutiert (Walker-Simmons 1989, Milborrow 2001). Einige Publikationen weisen Xanthoxal als Vorläufermolekül aus (Cowan 2000). Bei den Saugexperimenten mit (+)-Abscisyl-Aldehyd wurde neben der Stimulierung des  $J_{Vr}$  ein starker Anstieg der (+)-ABA im Xylem beobachtet. Dieser Anstieg könnte durch eine Oxidation des Aldehyds während der Passage durch das Kortextgewebe erklärt werden. Es ist bekannt, dass sich der Aldehyd sehr leicht, sogar durch Autooxidation, in ABA umwandeln kann (Willows und Milborrow 1992). Der im Xylem detektierbare ABA-Gehalt lag über der extern applizierten (+)-Abscisyl-Aldehyd-Konzentration. Endogen gebildeter (+)-Abscisyl-Aldehyd könnte möglicherweise zu (+)-ABA oxidiert werden und auf diese Weise der Xylem-(+)-ABA-Gehalt zusätzlich ansteigen. Dieses Saugexperiment klärte nicht eindeutig, ob der (+)-Abscisyl-Aldehyd selbst als direkter Stimulus gelten kann.

Überraschenderweise löste (-)-Abscisyl-Aldehyd ebenfalls eine  $J_{Vr}$ -Erhöhung aus, jedoch blieb der (+)-ABA-Gehalt im Xylem unbeeinflusst. Gusta et al. (1992) konnten bei der Keimung von Kressesamen keine Konvertierung von (-)-Abscisyl-Aldehyd zu (-)-ABA messen. Hätte diese Umwandlung tatsächlich stattgefunden, sollte dennoch  $J_{Vr}$  nicht ansteigen, da (-)-ABA keine Wirkung zeigte. Der Aldehyd selbst beeinflusst  $L_{Pr}$  und kann somit als physiologisch wirksam gelten.

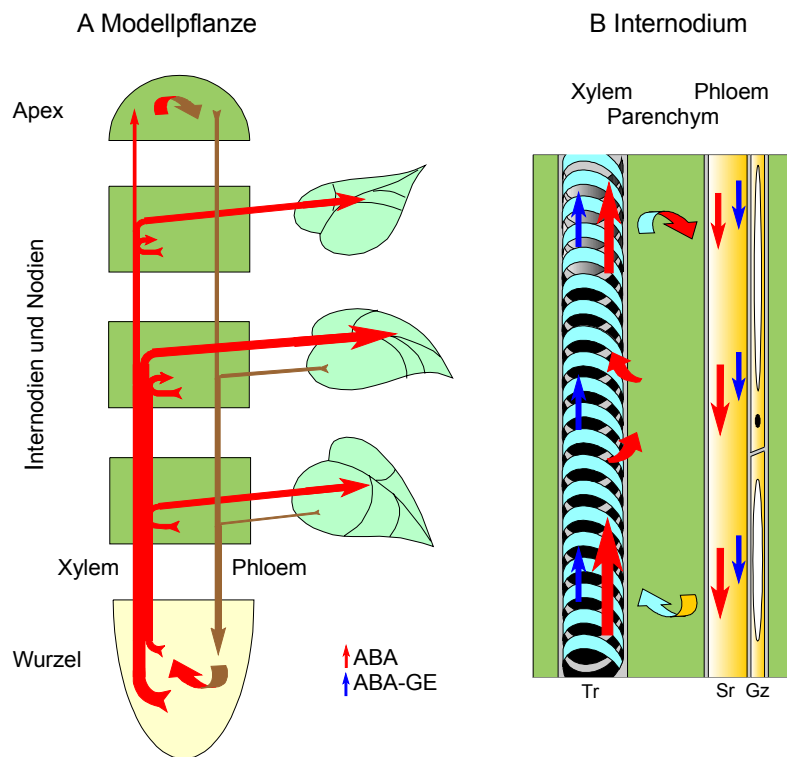
Weitere Substanzen, die auf diese Weise ausgetestet wurden, waren am 8'-C-Atom chemisch verändert. Die (+)-8'-Methylen-ABA, die ( $\pm$ )-/(+)-8'-Acetylen-ABA und der ( $\pm$ )-8'-Acetylen-ABA-Methylester finden als Wachstumsregulatoren praktische Anwendung (Abrams et al. 1997). Das modifizierte 8'-C-Atom jedes dieser Analoga behindert die Oxidation durch das Enzym ABA-8'-Hydroxylase. Das Analogon (+)-8'-Acetylen-ABA erwies sich sogar als irreversibler Inhibitor der ABA-8'-Hydroxylase (Cutler et al. 2000). Außer dem ( $\pm$ )-8'-Acetylen-ABA-Methylester stimulierten alle anderen 8'-Analoga den radialen Wassertransport und besaßen, im Vergleich zur (+)-ABA, eine über einen längeren Zeitraum anhaltende Wirksamkeit.

Wie auch schon andere durch ABA regulierte Prozesse zeigten, werden kleine Veränderungen der ABA-Molekülstruktur ohne Funktionsverlust toleriert. Ein Beleg hierfür sind die nicht natürlich vorkommenden am 8'-C-Atom modifizierten Analoga. Einen Hinweis auf die Rolle der Stereochemie gibt das ABA-Molekül selbst, denn nur das (+)-Enantiomer war effektiv. Die freie Säuregruppe am 1-C-Atom ist ebenfalls für die Signalgebung relevant. Die Veresterung mit Glucose (ABA-GE) oder eine Methylierung (( $\pm$ )-8'-Acetylen-ABA-Methylester) inaktivieren das ABA-Molekül.

#### 4.1.2 Der ABA-GE-Transport im Spross

Die physiologische Bedeutung der freien ABA als Wurzel-Spross-Stresssignal war Thema vieler Publikationen der letzten 15 Jahre (Wolf et al. 1990: *Lupinus albus*; Davies & Zhang 1991; Peuke et al. 1994: *Ricinus communis*; Asch et al. 1995: *Oryza sativa*; Jeschke et al. 1997b: *Zea mays*; Hartung und Jeschke 1999). Das ABA-Signal aus der Wurzel muss hierbei nicht ausschließlich auf eine Neusynthese zurückzuführen sein, sondern kann teilweise aus der Rezirkulation über das Phloem herrühren (Wolf et al. 1990, Zhong et al. 1996; Abb. 4-1:B; 4-3: A). Wurden Rizinuspflanzen unzureichend mit Phosphat versorgt (Jeschke et al.

1997a) oder Ammonium nur über eine Blattdüngung zugeführt (Hartung et al. 1999), dann war zusätzlich ein verstärkter ABA-GE-Phloemtransport zu beobachten.



**Abb. 4-3** Schematische Darstellung der ABA- (rot) sowie ABA-GE-Flüsse (blau) im gesamten Spross (A) und ausschnittsweise innerhalb eines Nodiums (B). Tr: Tracheide; Sr: Siebröhre; Gz: Geleitzelle.

Schon eine geringe Abnahme des Wasserpotentials im Boden kann von der Wurzelspitze erfasst werden (Zhang und Davies 1987, 1989; Hose et al. 2001), wodurch eine ABA-Neusynthese ausgelöst wird. Abscisinsäure kann anschließend über die Xylemleitgefäße zu Blättern und Meristemen gelangen, um dort eine entsprechende Stressreaktion hervorzurufen. Der radiale Transport innerhalb der Wurzel wurde kürzlich im Detail von Freundl et al. (1998, 2000) untersucht. Faktoren, die bei der ABA-Translokation sowie -Verteilung in den Blättern von Bedeutung sind, belegten die Autoren Daeter und Hartung (1990), Wilkinson und Davies (1997) und Hartung et al. (1998). Der ABA-Longstreckentransport innerhalb des Xylems ist dagegen noch wenig erforscht.

Jeschke und Hartung (2000) und Jokhan et al. (1999) konnten zeigen, dass sich das ABA-Signal oberhalb eines Nodiums abschwächte, da die Blätter als ABA-Senke wirken können (Abb. 4-3, A). Ob jedoch auch Verluste oder Schwankungen innerhalb des Internodiums entstehen, ist noch unbekannt. Dies sollten Perfusionsexperimente klären, wobei ABA- und ABA-GE-haltige Pufferlösungen durch Bohneninternodien und etoilierte Maismesokotyle gesaugt wurden. Bedingungen, wie sie unter Stress zu beobachten sind (erhöhte ABA-, ABA-

GE- und NaCl-Konzentration im Xylem sowie eine Alkalisierung des Xylemsafts), wurden zusätzlich simuliert.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass ABA innerhalb des internodialen Transportes in das umgebende Gewebe umverteilt wird, ABA-GE dagegen nicht (Abb. 4-3: B). Wurde ein hormonfreies Medium verwendet, konnte eine Freisetzung der ABA aus dem Parenchym ins Xylem beobachtet werden. Dies war auch dann der Fall, wenn das Perfusionsmedium mit 100 nM ABA angereichert war. Andererseits scheint beim Durchsaugen eines solchen Mediums ein nicht unerheblicher Teil in das Xylemparenchym der Bohneninternodien und Maismesokotyle überzutreten. Eine Verzögerung von 30 - 40 min war zu beobachten, bis die Xylem-ABA-Konzentration das externe Niveau erreichte. Während dieser Zeit war demzufolge ein 35-maliger Volumenaustausch in den Xylemgefäßen der Bohneninternodien und ein 106-maliger bei den Maismesokotylen zu beobachten. Die Perfusion freier ABA resultierte in einem um den Faktor 3 erhöhten ABA-Gewebegehalt. In diesem Fall stellen die Zellen des Xylemparenchyms eine Senke für ABA dar. Dagegen blieb der ABA-GE-Gehalt im Xylemparenchym unverändert, obgleich ABA-GE dem Perfusionsmedium zugesetzt wurde. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des ABA-GE und dem geringen Permeabilitätskoeffizienten (Baier et al. 1990) erfolgte der Transport im Xylem verlustfrei.

Ein verstärkter ABA-Efflux in das Xylem von Bohneninternodien und Mesokotylen konnte auch dann beobachtet werden, wenn ABA im angrenzenden Parenchym akkumulierte. Erreicht wurde dies durch die Behandlung mit dem Hemmstoff Tetcyclacis, der den oxidativen ABA-Abbau unterbindet. Beim Bohneninternodium konnte eine  $J_{ABA}$ -Erhöhung aus dem Gewebe in das Xylem von 61% gegenüber den Kontrollen beobachtet werden. Bei einer Vorbehandlung mit 100 mM NaCl war  $J_{ABA}$  um 109% angestiegen und eine Alkalisierung auf pH 7 führte zu einer 150%igen Erhöhung. Dass unter Stressbedingungen der apoplastische pH um mehr als eine pH-Einheit ansteigt, konnten Wilkinson und Davies (1997) und Bacon et al. (1998) zeigen. In Übereinstimmung mit dem „Anionenfallen-Prinzip“ (Hartung und Slovik 1991), wobei sich das ABA-Anion in alkalischen Kompartimenten anreichert, war der ABA-Efflux in das alkalisierte Milieu des Xylems verstärkt.

Wird durch eine Erhöhung des Unterdrucks auf die apikale Schnittfläche des Bohneninternodiums der Wasserfluss durch das Xylem erhöht, so war eine verstärkte Anreicherung von ABA im hormonfreien Perfusionsmedium zu beobachten ( $J_{ABA}$ -Anstieg um 181 % gegenüber den Kontrollen). Dies könnte bedeuten, dass niedrige Xylem-ABA-Konzentrationen teilweise durch ABA aus Sprossen respektive Internodien erhöht werden können.

Bei einer Perfusion von 100 mM ABA fand ein ABA-Efflux aus dem Gewebe ins Xylem nur bei gleichzeitiger Tetracyclisbehandlung statt. Die im Gewebe akkumulierte ABA scheint einen genügend steilen Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran der Xylemparenchymzelle aufzubauen. Salz oder ein alkalischer pH waren hier weniger wirksam. Mit diesen Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass die Xylemparenchymzellen der Bohneninternodien und Maismesokotyle an der Modulation des Wurzel-Spross-Stresssignals beteiligt sind. Bei der freien ABA konnte ein Austausch zwischen dem angrenzenden Xylemparenchym und den Fernleitungsbahnen aufgezeigt werden (Abb. 4-3: B).

Dieser ständige Wechsel von Import und Export über die Plasmamembranen der Xylemparenchymzellen wird durch einen hohen Permeabilitätskoeffizienten für ABAH erleichtert (Tab. 4-1). Im Gegensatz dazu verweilt der ABA-GE während des internodialen Langstreckentransportes in den Xylemgefäßen (Abb. 4-3: B). Da im Xylemsaft keine  $\beta$ -D-Glucosidase nachweisbar war, kann gefolgert werden, dass das ABA-GE-Signal aus der Wurzel unverändert zu den oberirdischen Pflanzenteilen gelangt.

**Tab. 4-1** Permeabilitätskoeffizienten des Plasmalemmas verschiedener Zelltypen für ABAH. Die Bestimmung der Koeffizienten erfolgte über eine Efflux-Kompartimentanalyse. <sup>A</sup>*Valerianella locusta*, Baier et al. (1988); <sup>B</sup>*Valerianella locusta*, Daeter und Hartung (1990); <sup>C</sup>, <sup>D</sup>*Zea mays*, Jovanovic et al. (1992); <sup>E</sup>*Phaseolus vulgaris*, Jovanovic et al. (1992); <sup>F</sup>*Zea mays*, Gratzer (1993); <sup>G</sup>*Phaseolus vulgaris*, Gratzer (1993); <sup>H</sup>*Plantago major*, Baier und Hartung (1991); <sup>I</sup>*Phaseolus coccineus*, Sauter 2001. Die Berechnung des  $P_s^{ABA}$  der Xylemparenchymplasmamembranen im Spross erfolgte aufgrund folgender Annahmen:  $J_{ABA} = 1.1 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , cytosolischer pH = 7.2; cytosolische ABAH-Konzentration:  $0.12 \text{ } \mu\text{mol m}^{-3}$ ; pH des Xylemsaftes = 5.8; ABA-Konzentration im Xylem:  $10 \text{ } \mu\text{mol m}^{-3}$ .

	Permeabilitätskoeffizient $P_s$ [ $10^{-9} \text{ ms}^{-1}$ ]
	Plasmalemma
Schließzelle	12.9 <sup>A</sup>
Mesophyllzelle	3.30 <sup>B</sup>
Wurzelrindenzelle	0.26 <sup>C</sup>
	0.78 <sup>D</sup>
	0.50 <sup>E</sup>
	0.70 <sup>F</sup>
	2.17 <sup>G</sup>
Siebröhre	90 <sup>H</sup>
Xylemparenchymzelle im Spross	1100 <sup>I</sup>

#### 4.1.3 Das Schicksal des ABA-GE im Blatt

ABA-Konjugate reichern sich in pflanzlichen Geweben mit zunehmendem Alter und während einer Stressperiode (3.1.1) überwiegend in den Vakuolen der Mesophyllzellen an und werden so irreversibel dem Stoffwechsel entzogen (1.2). Andererseits konnte eine Vielzahl publizierter Studien der letzten 10 Jahre aufzeigen, dass ABA-Konjugate ebenfalls im extrazellulären Kompartiment Xylem nachweisbar sind. Ein verstärkter Transport im Xylem wurde beispielweise bei Trockenstress beobachtet (Bano et al. 1993, 1994, Hansen und Dörffling 1999). Falls ABA-GE ein weiteres hormonales Stresssignal aus der Wurzel darstellt, dann müsste zunächst aus dem physiologisch inaktiven Glucoseester ABA freigesetzt werden. Eine enzymatische Spaltung kann nur im Blattapoplast stattfinden, denn wie bei der Wurzel ist eine Aufnahme des ABA-GE in den Symplast unwahrscheinlich (Abb. 4-1:C). Durch eine extrazelluläre  $\beta$ -D-Glucosidase könnte diese enzymatische Freisetzung katalysiert werden.

$\beta$ -Glucosidasen sind bei Prokaryonten sowie Eukaryonten weit verbreitet und werden mit mindestens drei verschiedenen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht. (1) Den Abbau toter Biomasse bewerkstelligen Bakterien und Pilze. Hierbei spielen Zellwandglucosidasen, die Zellulose hydrolisieren, eine wichtige Rolle. Während der Fruchtreife bewirken solche apoplastischen Hydrolasen auch einen Abbau der Zellwände (Gerardi et al. 2001). (2) Für die Pathogenabwehr der Pflanzen sind intrazelluläre Glucosidasen von Bedeutung. Kommt es bei einem Herbivorenbefall zu Gewebeverletzungen, wird in einigen Spezies ein toxischer sekundärer Pflanzenstoff aus nichttoxischen, glykosidisch gebundenen Vorstufen freigesetzt (Nikus und Jonsson 1999; Sue et al. 2000). (3) Eine weitere Gruppe von Glucosidasen ist an der Phytohormonhomöostase beteiligt, wobei aus unwirksamen Glycosiden erneut aktive Phytohormone entstehen (Brzobohaty et al. 1993; Sembdner et al. 1994; Kleczkowski und Schell 1995).

Ein erster Hinweis auf eine extrazelluläre ABA-GE-Glucosidase-Aktivität bezüglich ABA-GE ergab der Vergleich des ABA/ABA-GE-Verhältnisses im Xylemsaft (4-7) von Gerstenwurzeln und der interzellulären Waschflüssigkeit (22-23) aus Gerstenprimärblättern. Die ABA-GE Konzentration im IWF war um den Faktor 5-8 niedriger als im Xylemsaft (3.6.1). Wichert (1997) fand mit zunehmendem Salzstress im Kulturmedium von Gerstenpflanzen eine Erhöhung der extrazellulären Enzymaktivität um den Faktor 7. Hinweise auf die Substratspezifität der  $\beta$ -D-Glucosidase erbrachten kompetitive Hemmungsexperimente mit verschiedenen Hormonkonjugaten sowie unterschiedlichen ABA-GE-Konzentrationen. Im Vergleich zu anderen getesteten Hormonglycosiden erwies sich der

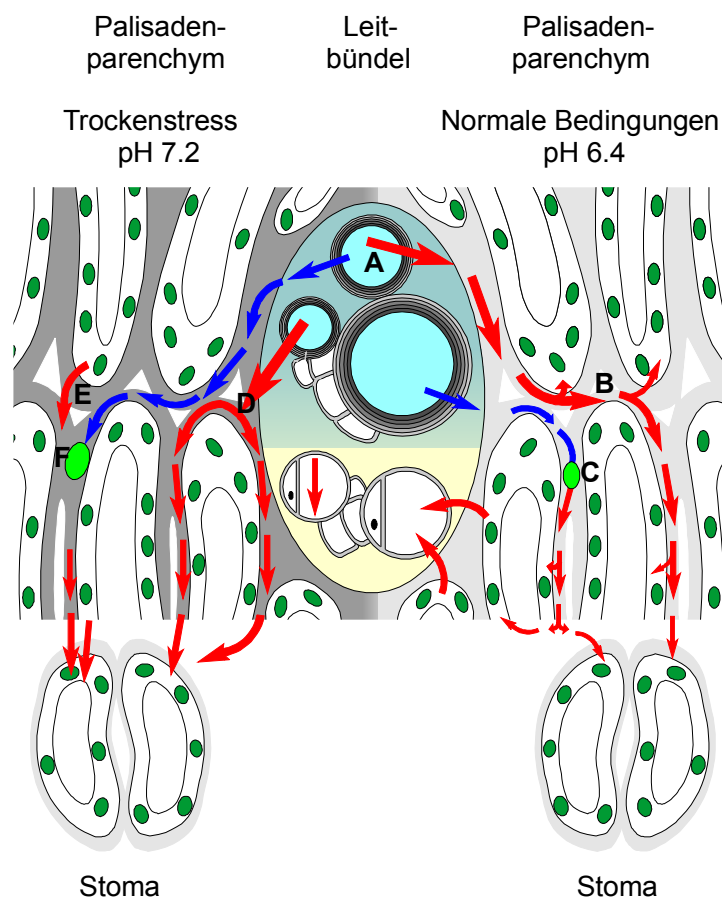
ABA-GE als stärkster Kompetitor. Mit 5 mM ABA-GE konnte die Enzymaktivität um 43-45% reduziert werden (Wichert, 1997). Nach einer Inkubation des IWF mit unterschiedlichen ABA-GE-Konzentrationen ( $10^{-4}$  -  $10^{-10}$  M) wurde die prozentuale Freisetzungsrates der ABA bestimmt. Eine Hydrolyserate bis zu 40% war im nanomolaren Bereich zu beobachten. Dieser Konzentrationsbereich spiegelt die physiologisch relevanten ABA-GE-Konzentrationen in einer Pflanze wider.

Pflanzliche  $\beta$ -Glucosidasen befinden sich in den unterschiedlichsten Zellkompartimenten. Proteinkörper bestimmter prokambialer Zellen von *Prunus serotina* enthalten eine Amygdalin-Hydrolase (Swain et al. 1992). Plastiden besitzen ebenfalls hydrolytische Aktivität (Nisius et al. 1988; Cicek und Esen 1998). Eine Linamarin-spezifische  $\beta$ -Glucosidase ist in den Zellwänden des Blattmesophylls von *Phaseolus lunatus* L. lokalisiert (Frehner und Conn 1987). Die Bestimmung der  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität bezogen auf den Gesamtproteingehalt in Blattrohextrakt und IWF von Gerste sollte die Frage nach ihrer Lokalisation im Apoplasten klären. Tatsächlich enthielt der IWF eine 16-fach höhere spezifische Aktivität im Vergleich zum Rohextrakt. Die schonende Methode (2.9.1) der IWF-Gewinnung reduziert cytosolische Verunreinigungen auf unter 0.5% (Mimura et al. 1990). Allgemein ist bekannt, dass interzelluläre Waschflüssigkeit eine Reihe von Glucosidasen enthält. Holden und Rohringer (1985) entdeckten 10 Proteinpositionen bei einer zweidimensionalen Gelelektrophorese mit Gerstenblatt-IWF, welche alle hydrolytische Aktivität gegenüber dem Substrat p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (p-NPG) zeigten.

Zur näheren Charakterisierung der  $\beta$ -D-Glucosidase aus dem Gerstenblattapoplasten wurde eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Im nativen Gel der ersten Dimension konnten mit dem Substrat p-NPG drei Isoformen nachgewiesen werden. Die isoelektrischen Punkte lagen zwischen 6.4 und 7.4. Leah und Mitarbeiter (1995) fanden in keimenden Gerstensamen ebenfalls drei Isoformen einer  $\beta$ -D-Glucosidase, die alle eine katalytische Wirksamkeit gegenüber kurzkettigen Oligosacchariden aufwiesen. Die apparente molekulare Masse ( $M_r$ ) dieser Glucosidase lag bei 60 kDa, im Falle der Gerstenblatt-IWF-Glucosidase waren es 52 kDa. Eine zellwandgebundene  $\beta$ -Glucosidase in Reiskeimlingen weist eine ähnliche  $M_r$  von 56 kDa und ein pH-Optimum bei 4.5 auf (Akiyama et al. 1988). Der optimale pH-Bereich für die apoplastische Glucosidase aus Gerste lag bei pH 5.5. Diese Daten weisen auf strukturelle Ähnlichkeiten innerhalb der großen Familie der Glucosidasen hin. Die Substratspezifität der einzelnen Hydrolasen ist in vielen Fällen noch unbekannt. Für die im Apoplast von Gerstenprimärblättern lokalisierte  $\beta$ -D-Glucosidase konnte gezeigt werden, dass der ABA-GE als Substrat dienen kann.

Welche Bedeutung dem aus der Wurzel stammende ABA-GE im Blatt zukommt, wird in Abbildung 4-4 dargestellt.

Eine Neusynthese der ABA beginnt in den Blättern erst, nachdem das Blattwasserpotential so weit gesunken ist, dass der Turgordruck dem Wert Null nahe kommt. Stomata reagieren jedoch bereits bei beginnender Bodenaustrocknung wenige Minuten nach Stressbeginn. In diesem Fall weist das Blattwasserpotential noch keine Veränderung auf (Henson et al. 1989, Davies und Gowing 1999). Bei milden Stressbedingungen ist daher der ABA-Import aus den Wurzeln von großer Bedeutung (Abb. 4-4: A). Über das Xylem, das in direkter Verbindung mit dem Blattapoplast steht, gelangt ABA zu den Schließzellen. Der primäre Wirkort der ABA scheint an der Außenseite der Schließzellenmembran lokalisiert zu sein (Hartung 1996, Wilkinson und Davies 1997).



**Abb. 4-4** Eine schematische Darstellung eines Blattquerschnitts mit Leitbündel, Parenchym und Stomata. Die Herkunft und der Transport von ABA und ABA-GE wird durch Pfeile gekennzeichnet (ABA-GE: blau, ABA: rot). Auf die Intensität der ABA bzw. ABA-GE-Flüsse deuten die unterschiedlichen Größen der Pfeile hin. Eine extrazelluläre Enzymaktivität ist durch einen hellgrünen Kreis dargestellt.



Aus der Wurzel stammende ABA wird nach einem Postulat von Slovik et al. (1995) während des apoplastischen Transportes im Blattmesophyllgewebe nach dem Anionenfallenprinzip umverteilt (Abb. 4-4 B). Dieser Intensitätsverlust des ABA-Signals an den Stomata könnte durch den ebenfalls in den Blattapoplast übergetretenen ABA-GE und dessen Hydrolyse (Abb. 4-4 C) abgeschwächt werden.

Bei Trockenstress kann es zu einer Alkalisierung des Extrazellularraumes um eine pH-Einheit kommen (Wilkinson 1999). Eine Umverteilung der freien ABA ist in diesem Fall erschwert (Abb. 4-4 D). Aus dem umliegenden Mesophyllgewebe kann ein zusätzlicher ABA-Efflux in den etwas alkalischeren Apoplast stattfinden (Abb. 4-4 E; Hartung et al. 1988; Bacon et al. 1998). Stresssituationen verstärken ebenfalls den ABA-GE-Import aus den Wurzeln (siehe 3.1.1.1 und 3.6.1). Für die apoplastische  $\beta$ -D-Glucosidase (Abb 4-4 F) bedeutet dies eine hohe Substratkonzentration. Allerdings verringert ein leicht alkalischer pH (7.2) die Hydrolyseaktivität, da das in vitro gefundene pH-Optimum der IWF- $\beta$ -Glucosidase bei pH 5.5 liegt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Enzym in vivo ein etwas verändertes pH-Optimum aufweist. Gerade bei mildem oder beginnendem Trockenstress könnte zusätzlicher ABA-GE aus der Wurzel die Signalwirkung unterstützen, denn die Biosynthese der freien ABA ist aufgrund des unveränderten Blattwasserpotenzials noch nicht gestartet. Ebenso dürfte die Alkalisierung des Blattapoplasts noch so schwach sein, dass die hydrolytische Spaltung des ABA-GE zunächst nicht beeinträchtigt ist.

Kriterien, die definitionsgemäß für ein Stresshormon gelten, sind eine stressinduzierte Neusynthese gefolgt von einer erhöhten Ausschüttung bzw. Anreicherung und dem anschließenden Auslösen von physiologischen sowie biochemischen Reaktionen in den jeweiligen Zielgeweben. Abscisinsäure erfüllt all diese Kriterien und kann somit als Stresshormon gelten. Ihr Einfluss auf die stomatäre Schließbewegung unter milden Stressbedingungen ist weitreichend untersucht und setzt voraus, dass das in der Wurzel gebildete ABA-Signal über das Xylem zu den Blättern transportiert wird. Der ABA-GE selbst wird als physiologisch inaktiv erachtet, wodurch das Kriterium der Wirksamkeit nicht erfüllt ist. Dennoch konnte eine erhöhte Bildung des ABA-GE in den Wurzeln bei Trocken- und auch Salzstress beobachtet werden (3.1.1.1 und 3.1.1.2). Der dadurch verstärkte Transport in den Fernleitungsbahnen (Bano et al. 1993, 1994; Jeschke und Hartung 1999) wurde auch in dieser Arbeit wiederholt bestätigt. Während der Translokation im Xylem des Sprosses treten im Gegensatz zur freien ABA (3.5.2) keine Leckströme in das umgebende Gewebe auf. Nachdem der ABA-GE den Blattapoplasten erreicht hat, muss zunächst durch die

extrazelluläre  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität die Freisetzung der ABA aus dem Konjugat gewährleistet sein. Erst dann kann eine physiologische Reaktion in den Zielzellen (z.B. Mesophyllzellen oder Stomata) ausgelöst werden.

Die eingangs gestellte Frage nach der Wurzel-Spross-Stresssignalwirkung des ABA-GE lässt sich nun wie folgt beantworten: Der unter Stressbedingungen im Xylem verstärkt transportierte ABA-GE kann in Kombination mit der extrazellulären  $\beta$ -D-Glucoseaktivität im Blatt das ABA-Langstreckensignal stabilisieren und auch intensivieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Xylemsaft gestresster Pflanzen ist neben freier ABA auch ein erhöhter ABA-GE-Gehalt nachweisbar. Hierbei ist von Bedeutung, ob externe oder interne Faktoren an der Bildung dieses ABA-GE-Signals beteiligt sind. Der Transportweg des ABA-GE durch Wurzeln und seine Freisetzung in das Xylem sollte ebenfalls durch Untersuchungen an isolierten Wurzelsystemen geklärt werden. Ferner ist ein Teil dieser Arbeit dem Langstreckentransport des ABA-GE im Sprossxylem und seinem Schicksal im Blattapoplast gewidmet.

- Trockenstress führt zu einer um den Faktor 1.8 bis 2.4 verstärkten ABA-GE-Synthese in Maiswurzeln. In der Bodenlösung unter verschiedenen Getreidearten war eine ABA-GE-Konzentration bis zu 35 nM nachweisbar.
- Transportstudien mit isolierten Wurzelsystemen lassen keinen lateralen Transport von externem ABA-GE in das Xylem erkennen. Dies gilt besonders für aeroponisch angezogene Maiswurzelsysteme, da die hydrophoben, apoplastischen Barrieren Exo- und Endodermis für den ABA-GE unpassierbar sind. Bei hydroponisch kultivierten Wurzelsystemen war eine Zunahme der freien ABA im Xylem von 1.1 nM auf 8.0 nM nach Zugabe von ABA-GE ins Außenmedium zu beobachten. Gleichzeitig mit dem Anstieg von ABA<sub>xyl</sub> erfolgte eine Zunahme des radialen Wasserflusses um den Faktor 1.5. Dies lässt vermuten, dass ABA-GE in den Apoplast der Wurzelrinde von hydroponisch angezogenen Wurzeln gelangen kann, dort jedoch von apoplastischen Enzymen hydrolisiert wird.
- Tatsächlich ist in IWF aus Maiswurzeln eine  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität nachweisbar. Sie kann durch ABA-GE auf fast 50% gehemmt werden, was auf eine gewisse Substratspezifität des Enzyms gegenüber ABA-GE hindeutet. Auf diese Weise freigesetzte ABA wird anschließend symplastisch sowie apoplastisch mit dem „solvent-drag“ des Wassers transportiert. Der Transport von endogen gebildetem ABA-GE kann daher nur auf symplastischem Weg erfolgen.
- Experimente mit isolierten Wurzelstelen- und Wurzelkortexsegmenten zeigten stärkere ABA-GE-Effluxraten aus stelärem im Vergleich zu kortikalem Gewebe. Die Bildung und eine um den Faktor 5 erhöhte Freisetzung des ABA-GE ist bei einer gleichzeitigen Hemmung des

oxidativen ABA-Baus am stärksten. Der eigentliche Transportmechanismus in die Xylemgefäße ist noch unbekannt. Eine Beteiligung von ABC-Transportern wäre denkbar.

- Die Stimulierung der hydraulischen Leitfähigkeit von Wurzeln ( $L_{Pr}$ ) ist für (+)-ABA spezifisch und wurde mit elf verschiedenen ABA-Analoga eingehender untersucht. (+)-ABA, (+)- und (-)-Abscisyl-Aldehyd, (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA, (+)-8'-Methylen-ABA sowie (+)-8'-Acetylen-ABA führten zu einer Stimulierung des radialen Wasserflusses durch hydroponisch angezogene Maiswurzelsysteme. (-)-ABA, Phaseinsäure und (+)-8'-Acetylen-AB-Methylester zeigten keinen Effekt. Wurde das externe Medium jeweils mit (+)-Abscisyl-Aldehyd, (+)-8'-Methylen-ABA, (+)-8'-Acetylen-ABA und ABA-GE angereichert, war eine  $ABA_{xyl}$ -Zunahme zu beobachten. Obwohl (+)-8'-Hydroxymethyl-ABA und (-)-Abscisyl-Aldehyd die  $L_{Pr}$  erhöhten, passierten sie die Wurzel ohne Veränderung der  $ABA_{xyl}$ -Konzentration. Wie bei anderen ABA-regulierten Prozessen scheint auch bei der  $L_{Pr}$  die Stereochemie eine Rolle zu spielen. Dennoch können kleine strukturelle Veränderungen am ABA-Molekül toleriert werden. Dies bewiesen die am 8'-C-Atom modifizierten Analoga.

- Über den Langstreckentransport des ABA-GE im Xylem des Sprosses ist bisher nur wenig bekannt. Deshalb wurde das Xylem von Bohneninternodien und etiolierten Maismesokotylen mit einem Medium perfundiert, das stressbedingte ABA- bzw. ABA-GE-Konzentrationen (100 nM) widerspiegelt. Der ABA-GE passierte beide Sprosssegmente ohne Veränderung. Innerhalb von 10 min erreichte die  $ABA-GE_{xyl}$ -Konzentration das Niveau des externen Mediums. Im Gegensatz dazu war eine Verzögerung von 30-40 min bei  $ABA_{xyl}$  zu beobachten.

Wurde ABA-freies Medium verwendet, konnte eine ABA-Freisetzung aus dem angrenzenden Parenchym in das Xylem nachgewiesen werden. Beim Bohneninternodium führte diese Freisetzung zu einem Anstieg von  $ABA_{xyl}$  auf 13 - 23 nM, beim Maismesokotyl waren es 1 - 6 nM. Der ABA-Fluss war bei beiden Segmenttypen etwa  $1 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Dieser Fluss wurde für eine Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{ABAH}$ ) für die Plasmamembranen des Sprossparenchyms benötigt. Die Plasmamembranen des Xylemparenchyms erwiesen sich als sehr gut permeabel für ABAH. Ihr  $P_{ABAH}$  ( $1.1 \cdot 10^{-6} \text{ ms}^{-1}$ ) ist der höchste aller bis heute untersuchten Membrantypen.

Der ABA-Efflux aus dem Parenchym beider Segmenttypen konnte gesteigert werden, wenn die Gewebe mit Tetracyclis, einem alkalischen Puffer oder 100 mM NaCl perfundiert wurden.

Eine anschließende Anreicherung des jeweiligen Perfusionsmediums mit 100 nM ABA beeinflusste obigen ABA-Efflux nur wenig.

- Die Bedeutung von extrazellulären Enzymen im Blattapoplast wird ersichtlich beim Vergleich des ABA-zu-Konjugat-Verhältnisses im Xylemsaft von Gerstenkeimlingen (4-7) und dem IWF aus den jeweiligen Primärblättern (22-32). Das Auffinden einer 16-fachen Anreicherung der spezifischen Aktivität im IWF gegenüber dem Blattrohextrakt untermauerte die extrazelluläre Lokalisation der  $\beta$ -D-Glucosidase. Die pH-Abhängigkeit des Enzyms zeigte ein Aktivitätsmaximum bei pH 5.5 und eine Schulter im pH-Bereich 5.0. Dies deutete auf mögliche Isoformen des Enzyms hin, die mittels einer isoelektrischen Fokussierung auch bestätigt wurden. Der IWF aus Gerstenprimärblättern enthielt mindestens drei Isoformen, deren isoelektrische Punkte im Bereich zwischen 6.4 und 7.4 lagen. Das durchschnittliche apparente Molekulargewicht von 51 kDa wurde mittels Gelfiltration bestimmt.

Abcisinsäure-Glucoseester kann nach diesen Untersuchungen nicht mehr ausschließlich als Endmetabolit der Abscisinsäure gelten. Der unter Stressbedingungen im Xylem verstärkt transportierte ABA-GE trägt in Kombination mit der extrazellulären  $\beta$ -D-Glucoseaktivität zu einer Stabilisierung und Intensivierung des ABA-Langstreckensignals bei.

## 6 SUMMARY

Under stress conditions ABA-GE concentration in the xylem can rise substantially to levels that are even higher than of free ABA. The clarification whether external or internal sources can amount for this ABA-GE-signal in the xylem was one objective of this present study. Another field of interest was to obtain knowledge about how ABA-GE is transported within the roots and released from the symplast to the xylem vessels. Furthermore the fate of ABA-GE during long distance translocation in the stem and after having arrived the leaf apoplast has also been investigated.

- Drought stress conditions increased ABA-GE-synthesis by 1.8- up to 2.4-fold in roots. The soil solution under different crops contained ABA-GE in concentrations up to 35 nM.
- Transport experiments with isolated maize root systems made it seem rather unlikely that the conjugate is translocated in significant amounts from the soil solution to the xylem elements. Especially in aeroponically grown maize roots external conjugated ABA cannot be dragged with the water flow across the hydrophobic exo- and endodermis. Both tissues seem to be good barriers for ABA-GE. Hydroponically grown maize roots showed a decline in ABA-GE<sub>xyl</sub> while a simultaneous increase of free ABA<sub>xyl</sub> from 1.1 nM up to 8.0 nM was detected. As soon as ABA<sub>xyl</sub> rose, the radial water flow ( $J_{Vr}$ ) through the root system increased by a factor of 1.5 suggesting that external ABA-GE can enter the apoplast and be cleaved by apoplastic enzymes.
- Indeed, intracellular washing fluid of maize roots contained a  $\beta$ -glucosidase activity, which could be inhibited by ABA-GE. The inhibition reached almost 50 % implying that ABA-GE can serve as a substrate of extracellular  $\beta$ -glucosidases in maize cortical tissues. The released free ABA can then be translocated symplastically as well as apoplastically by solvent drag. Hence, translocation of endogenous ABA-GE must occur in the symplast.
- Experiments with isolated cortical and stelar root segments revealed an up to 5-fold higher ABA-GE efflux rate from stelar than from cortical tissues. Formation and release of ABA-GE were highest under conditions that inhibited oxidative ABA degradation. The mechanism of

release into the xylem elements is still unknown; it may include the action of ABC-transporters.

- Transport experiments with eleven different ABA-analogues were performed to highlight the structural requirements for the hormonal regulation of root hydraulic conductivity ( $L_{Pr}$ ). (+)-ABA, (+)- and (-)-abscisyl aldehyde, (+)-8'-hydroxymethyl ABA, (+)-8'-methylene and (+)-8'-acetylene ABA stimulated radial water transport through hydroponically grown maize root systems. (-)-ABA, phaseic acid and (+)-8'-acetylene methyl ABA proved to be ineffective. When root systems were perfused with either (+)-abscisyl aldehyde, (+)-8'-methylene-, (+)-8'-acetylene-ABA or ABA-glucose ester an apparent increase of free ABA in the xylem sap was detected. The analogues (+)-8'-hydroxymethyl ABA and (-)-abscisyl aldehyde passed the cortex of maize roots without changing the  $ABA_{xyl}$ , however, stimulating  $L_{Pr}$ . As seen in other ABA-regulated processes stereochemistry is important. Concerning root  $L_{Pr}$  (-)-ABA proved to be ineffective. Nevertheless small alterations to the structure of ABA are tolerated. The unnatural analogues modified at the 8'-carbon atom can even stimulate longer lasting responses compared to (+)-ABA.

- Very little information is available about the fate of ABA and ABA-GE during its long distance xylem transport through stems. The xylem of first internode of runner bean and of etiolated maize mesocotyl segments was perfused with media containing abscisic acid (ABA) or abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in concentrations as they occur under stress conditions (100 nM). ABA-GE passed through the internode and mesocotyl segments unchanged. Within 10 min the concentration of  $ABA-GE_{xyl}$  rose to a level similar to that in the external perfusion medium. By contrast, 30 to 40 min passed before the concentration of  $ABA_{xyl}$  reached the external level.

When ABA-free media were used, ABA was released from the xylem parenchyma to the xylem vessels resulting in an  $ABA_{xyl}$  of 13 - 23 nM (runner bean internode) or 1 - 6 nM (maize mesocotyl). Calculation of the ABA flow to the xylem exposed to be  $1 \text{ pmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in both stem segments. This flow rate was used to estimate the permeability coefficient of stem parenchyma plasma membranes for undissociated ABAH. It turned out to be highest  $P_{ABAH}$  ( $1.1 \cdot 10^{-6} \text{ ms}^{-1}$ ) of all cell types investigated until present.

The ABA efflux from stem and mesocotyl parenchyma into the xylem could be increased when the tissues were treated with tetracyclacis but also by changing the pH from its normal

---

value of about pH 6 to pH 7 and by adding 100 mM NaCl to the perfusion medium. If 100 nM ABA was added to the perfusion medium the above treatments had only small effects on the ABA-efflux from the tissues into the xylem.

- The action of enzymes that cleave hormone conjugates in the leaf apoplast became evident comparing the ratios of free ABA/conjugated ABA in the xylem sap (4-7) of barley and intracellular washing fluids of barley leaves (22-32). The specific activity of the  $\beta$ -glucosidase was enriched 16-fold in IWF as compared to crude leaf extracts confirming its extracellular compartmentation. The pH-dependency of the enzyme revealed a maximum activity at pH 5.5 and a pronounced shoulder was seen at pH 5.0 indicating the existence of isoforms. Indeed, an isoelectric focusing confirmed the occurrence of at least three isoforms of  $\beta$ -glucoside hydrolases in intercellular washing fluid of barley leaves with isoelectric points between 6.4 and 7.4. The average apparent molecular mass of 51 kDA was determined by gel filtration.

In conclusion, the results presented in this study support the idea that ABA-GE can not be considered exclusively as a final metabolite of ABA. While stress conditions intensify the ABA-GE-concentration in the xylem, ABA-GE must be discussed as an additional stress signal that stabilises and intensifies the ABA long-distance signal.



## 7 ABKÜRZUNGEN

ABA	Abscisinsäure
ABA <sub>xyl</sub>	ABA im Xylem
ABA-GE	Abscisinsäure-β-D-Glucopyranosylester
ABA-GE <sub>xyl</sub>	ABA-GE im Xylem
Abb.	Abbildung
AMPS	Aminopersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fg	Frischgewicht
FPLC	fast protein liquid chromatography
h	Stunde
HA	Hydroxyapatit
IWF	Interzelluläre Waschflüssigkeit oder apoplastische Waschflüssigkeit
J <sub>ABA</sub>	Radialer ABA-Fluss durch eine Wurzel [ $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
J <sub>Vr</sub>	Radialer Wasserfluss durch eine Wurzel [ $\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
L <sub>Pr</sub>	Hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel [ $\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ ]
kDa	Kilodalton
M	Molarität
min	Minute
MOPS	3-(n-Morpholino-)propansulfonsäure
MW	Mittelwert
MPa	Megapascal = 0.1 bar
Mr	apparente molekulare Masse
mS	Millisiemens
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt

---

p-NPG	p-Nitrophenol- $\beta$ -D-Glucopyranosid
ppm	parts per million
s	Sekunde
SD	Standardabweichung $\sigma_{n-1}$
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetcyclacis
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
% v/v	Volumenprozent
% w/v	volumenbezogenes Gewichtsprozent

## 8 LITERATUR

- Abrams SR, Rose PA, Cutler AJ, Balsevich JJ, Lei B & Walker-Simmons MK (1997) 8'-Methylene abscisic acid. *Plant Physiology* 114: 89-97
- AKIYAMA T, KAKU H & SHIBUYA N (1998) A cell wall-bound  $\beta$ -glucosidase from germinated rice: purification and properties. *Phytochemistry* 48: 49-54
- ALONI B, DAIE J & WYSE RE (1988) Regulation of apoplastic pH in source leaves of *Vicia faba* by gibberellic acid. *Plant Physiology* 88: 367-369
- ASCH F, DÖRFFLING K & DINGKUHN M (1995) Response of rice varieties to soil salinity: a possible involvement of root-borne ABA. *Plant and Soil* 117: 11-19
- AZAIZEH H & STEUDLE E (1991) Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiology* 97: 1136-1145
- AZAIZEH H, GUNSE B & STEUDLE E (1992) Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiology* 99: 886-894
- BACON MA, WILKINSON S & DAVIES WJ (1998) pH-Regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiology* 118: 1507-1515
- BAIER M & HARTUNG W (1988) Movement of abscisic acid across the plasma lemma and the tonoplast of guard cells of *Valerianella locusta*. *Botanica Acta* 101: 332-337
- BAIER M & HARTUNG W (1991) Movement of abscisic acid across the plasma membrane of phloem elements of *Plantago major*. *Journal of Plant Physiology* 137: 297-300
- BAIER M, GIMMLER H & HARTUNG W (1990) Permeability of guard cell plasma membrane and tonoplast. *Journal of Experimental Botany* 41: 351-358

- BALSEVICH JJ, CUTLER AJ, LAMB N, FRIESEN L.J. KURZ EU, PERRAS MR & ABRAMS SR. (1994) Response of cultured maize cells to (+)-abscisic acid, (-)-abscisic acid, and their metabolites. *Plant Physiology* 106: 135-142.
- BANO A, DÖRFFLING K, BETTIN D & HAHN H (1993) Abscisic Acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 109-115
- BANO A, HANSEN H, DÖRFFLING K, HAHN H (1994) Changes in the content of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in the xylem sap of drought stressed sunflower plants. *Phytochemistry* 37: 345-347
- BETZ C; ULLRICH CI & HARTUNG W (1993) Tetracycline and abscisic acid-sensitive reduction of extracellular ferricyanide by mesophyll cells of *Valerianella locusta* and *Lemna gibba*. *Journal of Experimental Botany* 44: 35-39
- BLACKMAN PG & DAVIES WJ (1985) Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *Journal of Experimental Botany* 36: 39-48
- BLUM H, BEIER H. & GROSS HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- BOYER GL & ZEEVAART JAD (1982) Isolation and quantitation of  $\beta$ -D-glucopyranosyl abscisate from leaves of *Xanthium* and spinach. *Plant Physiology* 70: 227-231
- BRZOBOHATY B, MOORE I, KRISTOFFERSEN P, BAKO L, CAMPOS N, SHELL J & PALME K (1993) Release of active cytokinin by a  $\beta$ -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 262: 1051-1054
- CANNY MJ (1995) Apoplastic water and solute movement: new roles for an old space. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 215-236
- CASPARY R (1866) Bemerkungen über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahr wiss Bot* 4: 101-123

- CICEK M & ESEN A (1998) Structure and expression of a dhurrinase ( $\beta$ -glucosidase) from sorghum. *Plant Physiology* 116: 1469-1478
- CLARKSON DT, ROBARDS AW, STEPHENS JE & STARK M (1987) Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant Cell and Environment* 10: 83-93
- COWAN AK (2000) Is abscisic aldehyde really the immediate precursor to stress-induced ABA? *Trends in Plant Science* 5: 191-192
- CRAMER GR (1994) Response of maize (*Zea mays* L.) to salinity. In: Pessaraki (Editor) *Handbook of Plant and Crop Stresses*. Marcel Dekker, New York, 449-459
- CUTLER AJ, ROSE PA, SQUIRES TM, LOEWEN MK, SHAW AC, QUAIL JW, KROCHKO JE & ABRAMS SR (2000) Inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase. *Biochemistry* 39: 13614-13624
- DAETER W, HARTUNG W. (1990) Compartmentation and transport of abscisic acid in mesophyll cells of intact leaves of *Valerianella locusta*. *Plant Physiology* 136: 306-312
- DAETER W, SLOVIK S & HARTUNG W (1993) The pH gradients in the root system and the abscisic acid concentration in xylem and apoplastic saps. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London/B* 341: 49-56
- DAETER W (1994) Die stressphysiologische Bedeutung der Epidermis für den Transport und die Metabolisierung der Abscisinsäure im Blatt. Dissertation an der Universität Würzburg
- DATHE W & SEMBDNER G (1978) Gibberellins, abscisic acid, and related inhibitors in branches and bleeding sap of birch (*Betula pubescens* EHRH.). *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 173: 238-248

- DATHE W, SEMBDNER G, YAMAGUCHI I & TAKAHASHI N (1982) Gibberellins and growth inhibitors in spring bleeding sap, roots and branches of *Juglans regia* L.. *Plant and Cell Physiology* 23: 115-123
- DAVIES WJ & JONES HG (1991) Abscisic Acid: physiology and chemistry. Environmental Plant Biology, BIOS Scientific Publishers Limited, United Kingdom
- DAVIES WJ & ZHANG J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 42: 55-76
- DAVIES WJ & GOWING DJG (1999) Plant responses to small perturbations in soil water status. In: MC Press et al. (Editoren), *Physiological Plant Ecology*, Blackwells, Oxford, 67-89
- DAVIES WJ, BACON MA, THOMPSON DS, SOBEIGH W & RODRIGUEZ LG (2000) Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: exploitation of the plants' chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. *Journal of Experimental Botany* 51: 1617-1626
- DEGENHARDT B, GIMMLER H, HOSE E & HARTUNG W (2000) Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, distribution and transport in plant roots. *Plant and Soil* 25: 83-94
- DEL CAMPILLO E, SHANNON IM (1982) An  $\alpha$ -galactosidase with hemagglutinin properties from soybean seeds. *Plant Physiology* 69: 628-631.
- DIETZ KJ (1997) V. Function and responses of the leaf apoplast und stress. *Progress in Botany* 58; 221-254
- DUNSTAN DI, BOCK CA, ABRAMS GD & ABRAMS SR (1992) Metabolism of the (+)- and (-) abscisic acid by somatic embryo cultures of white spruce. *Phytochemistry* 31: 1451-1454.

- EBERT G, VÖLKER R & HAEHN K (1991) Optisches Verfahren zur nicht destruktiven Messung der Wurzeloberfläche. *Gartenbauwissenschaft* 56: 160-163
- ELSE MA, DAVIES WJ, WHITFORD PN, HALL KC & JACKSON MB (1994) Concentrations of abscisic acid and other solutes in xylem sap from root systems of tomato and castor-oil plants are distorted by wounding and variable sap flow rates. *Journal of Experimental Botany* 45: 317-323
- ELSE MA, HALL KC, ARNOLD GM, DAVIES WJ & JACKSON MB (1995) Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants. *Plant Physiology* 107: 377-384
- ELSE MA, COUPLAND D, DUTTON L & JACKSON MB (2001) Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum* 111: 46-54
- ENSTONE DE, PETERSON CA (1992) The apoplastic permeability of root apices. *Canadian Journal of Botany* 70: 1502-1512
- ENSTONE DE, PETERSON CA (1998) Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant, Cell and Environment* 21: 837-844
- FISCUS EL. (1981) Effects of abscisic acid on the hydraulic conductance of and the total ion transport through *Phaseolus* root systems. *Plant Physiology* 68: 1353-1355
- FORT C, MULLER F, LABEL P, GRANIER A & DREYER E (1998) Stomatal conductance, growth and root signalling in *Betula pendula* seedlings subjected to partial soil drying. *Tree Physiology* 18: 769-776
- FORTMEIER R & SCHUBERT S (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. *Plant, Cell and Environment* 18: 1041-1047

- FREHNER M & CONN EE (1987) The linamarin  $\beta$ -glucosidase in costa rican wild lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplastic. *Plant Physiology* 84: 1296-1300
- FREUNDL E, STEUDLE E, HARTUNG W (1998) Water uptake by roots of maize and sunflower affects the radial transport of abscisic acid and its concentration in the xylem. *Planta* 209: 8-19
- FREUNDL E, STEUDLE E, HARTUNG W (2000) Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* 210: 222-231
- FRANKENBERGER WT & ARSHAD M (1995) Phytohormones in soils. Marcel Dekker, New York, USA
- FUSSEDER A, WARTINGER A, HARTUNG W, SCHULZE E-D & HEILMEIER H (1992) Cytokinins in the xylem sap of desert-grown almond (*Prunus dulcis*) trees: daily courses and their possible interactions with abscisic acid and leaf conductance. *New Phytologist* 122: 45-52
- GERARDI C, BLANDO F, SANTINO A & ZACHEO G (2001) Purification and characterisation of a  $\beta$ -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science* 160: 795-805
- GERLACH D (1984) Botanische Mikrotechnik. Thieme Verlag, Stuttgart
- GIMMLER H, KAADER R, KIRCHNER U & WEYARD A (1984) The chloride sensitivity of *Dunaliella parva* enzymes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 114: 131-150
- GISI U, SCHENKER R, SCHULIN R, STADELMANN FX & STICHER H (1990) Bodenökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- GLINKA Z (1977) Effects of abscisic acid and hydrostatic pressure gradients on water movement through excised sunflower roots. *Plant Physiology* 59:933-935



- GRATZER B. (1993) Die Permeabilität des Plasmalemmas und des Tonoplasten von Wurzelparenchymzellen. Staatsexamensarbeit, Universität Würzburg
- GUSTA LV, EWAN B, REANEY MJT & ABRAMS SR (1992) The effect of abscisic acid and abscisic acid metabolites of the germination of cress seed. *Canadian Journal of Botany* 70: 1550-1555.
- HANSEN H, DÖRFFLING K (1999) Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 1599-1605
- HARRIS GA & CAMPBELL GC (1989) Automated quantification of roots using a simple image analyzer. *Agronomy Journal* 81: 935-938
- HARRIS MJ & OUTLAW WH (1990) Histochemical technique: a low-volume enzyme-amplified immunoassay with sub-fmol sensitivity. Application to measurement of abscisic acid in stomatal cells. *Physiologia Plantarum* 78 : 495-500.
- HARTUNG W, RADIN JW & HENDRIX DL (1988) Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. *Plant Physiology* 86: 908-913.
- HARTUNG W & SLOVIK S (1991) Physicochemical properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution: stomatal regulation by abscisic acid in leaves. *New Phytologist* 119: 361-382
- HARTUNG W. (1996) Trockenheit. In: Brunold C, Rüeeggsegger A, Brändle R (Editoren) Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. UTB, Bern, Stuttgart, Wien, Haupt, 119-132
- HARTUNG W, SAUTER A, TURNER NC, FILLERY I & HEILMEIER H (1996) Abscisic acid in soils: What is its function and which factors and mechanisms influence its concentration? *Plant and Soil* 184: 105-110

- HARTUNG W, WILKINSON S & DAVIES WJ (1998) Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of Experimental Botany* 49: 361-367
- HARTUNG W & JESCHKE WD (1999) Abscisic acid - a long distance stress signal in salt stressed plants. In: Lerner HR (Editor) Plant responses to environmental stresses: From phytohormone to genome reorganisation. Marcel Dekker, New York, 333-348
- HARTUNG W, PEUKE AD & DAVIES, WJ (1999) Abscisic acid – a hormonal long distance stress signal in plants under drought and salt stress. In: Pessarakli M (Editor) Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker New, York, 731-747
- HAYS DB, ROSE P, ABRAMS SR & MOLONEY MM (1996) Biological activity of optically pure C-1 altered abscisic acid analogs in *Brassica napus* microspore embryos. *Journal of Plant Growth Regulation* 15: 5-11
- HELDT HW (1996) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- HENSON IE, JENSON CR & TURNER NC (1989) Leaf gas exchange and water relations of lupins and wheat. I. Shoot responses to soil water deficits. *Australian Journal of Plant Physiology* 16: 401-413
- HIGGINS CF (1992) ABC transporters: from microorganism to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113
- HOGGE LR, BALSEVICH JJ, OLSON DJH, ABRAMS GD & JACQUES SL (1993) Improved methodology for liquid chromatography/continuous flow secondary-ion mass spectrometry: Quantitation of abscisic acid glucose ester using reaction monitoring. *Rapid Communication on Mass Spectroscopy* 7: 6-11
- HOLDEN DW & ROHRINGER R (1985) Peroxidases and glucosidases in intercellular fluids from noninoculated and rust-affected wheat leaves. *Plant Physiology* 79: 820-824

- HOSE E (2000) Untersuchungen zum radialen Abscisinsäure- und Wassertransport in Wurzeln von *Helianthus Annuus* L. und *Zea mays* L. Dissertation an der Universität Würzburg
- HOSE E, STEUDLE E & HARTUNG W (2000) Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a root cell- and pressure probe study. *Planta* 211: 874-882
- HOSE E, CLARKSON DT, STEUDLE E, SCHREIBER L, HARTUNG W (2001) The Exodermis – a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, in press
- JACKSON MB, DAVIES WJ & ELSE MA (1996) Pressure-flow relationships, xylem solutes and root hydraulic conductance in flooded tomato plants. *Annales of Botany* 77: 17-24
- JESCHKE WD (1984)  $K^+$ - $Na^+$ -exchange at cellular membranes, intercellular compartmentation of cations and salt tolerance. In: Staples RC, Toenniessen GH (Editoren) *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*. Wiley & Son, New York, 37-66
- JESCHKE WD, PEUKE AD, PATE JS & HARTUNG W. (1997a). Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *Journal of Experimental Botany* 48: 1737-1747
- JESCHKE WD, HOLOBRADA M & HARTUNG W (1997b). Growth of *Zea mays* L. plants with their seminal roots only. Effects on plant development, xylem transport, mineral nutrition and the flow and distribution of abscisic acid (ABA) as a possible shoot to root signal. *Journal of Experimental Botany* 48: 1229-1239
- JESCHKE WD & HARTUNG W (2000). Root-shoot interaction in mineral nutrition. *Plant and Soil* 226: 57-69
- JOKHAN AD, HARINK RJ & JACKSON MB. (1999) Concentration and delivery of abscisic acid in xylem sap are greater at the shoot base than at a target leaf nearer to the shoot apex. *Plant-Biology* 1: 253-260

- JOVANOVIC L, DAETER W & HARTUNG W (1992) Compartmental analysis of abscisic acid in root segments of two maize lines differing in drought susceptibility. *Journal of Experimental Botany* 43 (Supplement): 37
- KAISER W, WEILER EW & HARTUNG W (1985) The intercellular distribution of abscisic acid in mesophyll cells - the role of the vacuole. *Journal of Plant Physiology* 119: 237-245
- KAMBOJ JS, BLAKE PS & BAKER DA (1998) Cytokinins in the vascular saps of *Ricinus communis*. *Plant Growth Regulation* 25: 123-126.
- KLEBER HP, SCHLEE D & SCHÖPP W (1997) Biochemisches Praktikum – Methoden für Studium, Praxis, Forschung. 5. und erw. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm
- KLECZKOWSKI K & SCHELL J (1995) Phytohormone conjugates: nature and function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14: 283-298
- KOSHIBA T, SAITO E, ONO N, YAMAMONTO N & SATO M (1996) Purification and properties of flavin- and molybdenum containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiology* 110: 781-789
- KREEB KH (1996) Salzstress. In: Brunold C, Rüeeggesser A, Brändle R (Editoren) Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. UTB, Bern, Stuttgart, Wien, Haupt, 149-172
- KROCHKO JE, ABRAMS GD, LOEWEN MK, ABRAMS RS & CUTLER AJ (1998) (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiology* 118: 849-860
- KSHIMIZU K, FUKUI H & MITSUI T (1968) Isolation of (+)-abscisyl- $\beta$ -glucopyranoside from immature fruit of *Lupin luteus*. *Agricultural Journal of Biological Chemistry* 30: 941-943

- LACHNO DR & BAKER DA (1986) Stress induction of abscisic acid in maize roots. *Plant Physiology* 68: 215-221
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- LAMBERS H, STUART CHAPIN III F & PONS TL (1998) Plant water relations. In *Plant physiological ecology*. Springer Verlag, New York, 154-209
- LAMBERS H, STUART CHAPIN F & PONS TL (1998) Saline soils: An ever-increasing problem in agriculture. In: *Plant Physiological Ecology*. Springer Verlag, New York, 277-278
- LEAH R, KIGEL J, SVENDSEN I & MUNDY J (1995) Biochemical and molecular characterization of barley seed  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* 270:15789-15797
- LEHMANN H & SCHÜTTE HR (1980) Purification and characterisation of an abscisic acid glycosylating enzyme from cell suspension cultures of *Macleaya microcarpa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 96: 277-280
- LEHMANN H & GLUND K (1986) Abscisic acid metabolism - vacuolar/extravacuolar distribution of metabolites. *Planta* 168: 559-562
- LEVITT J (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses. Volume II, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, New York
- LI ZC, MCCLURE JW & HAGERMAN AE (1989) Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase,  $\beta$ -D-Glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaves. *Plant Physiology* 90: 185-190
- LUDEWIG M, DÖRFFLING K, SEIFERT H (1988) Abscisic acid and water transport in sunflowers. *Planta* 175: 325-333

- MARKHART AH, FISCUS EL, NAYLOR AW & KRAMER PJ. (1979) Effect of abscisic acid on root hydraulic conductivity. *Plant Physiology* 64: 611-614
- MARTINOIA E, GRILL E, TOMMASINI K, KREUZ K & AMRHEIN N (1993) An ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249
- MILBORROW BV (1970) The metabolism of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 21: 17-29
- MILBORROW BV (1988) Recent investigations of biochemistry of abscisic acid. In: Pharis RP, Rood SB (Editoren) *Plant growth substances*. Springer Verlag, Berlin, 241-253
- MILBORROW BV (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1145-1164
- MIMURA T, YIN Z-H, WIRTH E & DIETZ K-J (1992) Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. *Plant and Cell Physiology* 33: 563-568
- MÜLLER M, DEIGELE C & ZIEGLER H (1989) Hormonal interaction in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) and their effect on plant development. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152: 247-254
- MÜNCH E (1930) *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Fischer Verlag, Jena, 234
- MUNNS R & KING RW (1988) Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. *Plant Physiology* 88: 703-708
- MUNNS R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 16: 15-24

- MUNNS R, PASSIOURA JB, MILBORROW BV et al. (1993) Stored xylem sap from wheat and barley in drying soil contains a transpiration inhibitor with a large molecular size. *Plant, Cell and Environment* 16: 867-872
- NEALES TF, MASIA A, ZHANG J & DAVIES WJ (1989) The effects of partially drying part of the root system of *Helianthus annuus* on the Abscisic acid content of the roots, xylem sap and leaves. *Journal of Experimental Botany* 40: 1113-1120
- NEILL SJ & HORGAN R (1984) Biosynthesis of abscisic acid. In: Crozier A, Hillman JR (Editoren) The biosynthesis and metabolism of plant hormones. Cambridge University Press, Cambridge, 43-70
- NEMATOLLAHI WP & ROUX SJ (1999) A novel  $\beta$ -glucosidase from the cell wall of maize (*Zea mays* L.): rapid purification and partial characterization. *Journal of Plant Physiology* 155: 462-469
- NETTING AG, WILLOWS RD, MILBORROW BV (1992) The isolation and identification of the prosthetic group released from a bound form of abscisic acid. *Plant Growth Regulation* 11: 327-334
- NIKUS J & JONSSON LMV (1999) Tissue localisation of  $\beta$ -glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* 107: 373-378
- NISIUS A (1988) The stromacentre in *Avena* plastids: an aggregate of  $\beta$ -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* 173: 474-481
- NOBEL PS (1991) Physiochemical and environmental plant physiology. Academic Press, San Diego.
- NORTH GB & NOBEL PS (1991) Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave desertii* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 78: 906-915

- OKHUMA K, LYON JL, ADDICOTT FT & SMITH OE (1963) Abscission II, an accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142: 1592-1593
- OTTMANN MJ & TIMM H (1984) Measurement of variable plant roots with the image analyzing computer. *Agronomy Journal* 76: 1018-1020
- PETERSON CA (1988) Exodermal casparian bands: their significance for ion uptake by roots. *Planta* 72: 204-208
- PETERSON CA (1987) The exodermal casparian band of onion roots blocks the apoplastic movement of sulphate ions. *Journal of the Experimental Botany* 38: 2068-2081
- PETERSON CA & PERUMALLA CJ (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 113-125
- PERUMALLA CJ, PETERSON CA & ENSTONE DE (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 93-112
- PEUKE AD, JESCHKE WD & HARTUNG W (1994) The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. III. Long-distance transport of abscisic acid depending on nitrogen nutrition and salt stress. *Journal of Experimental Botany* 45: 741-747
- PIRSON A & SEIDEL F (1950) Zell- und stoffwechselfysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. *Planta* 38: 431-473
- QUINTERO JM, FOURNIER JM & BENLLOCH (1999) Water transport in sunflower root systems: effects of ABA, Ca<sup>2+</sup> status and HgCl<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* 50: 1607-1612



- RAMANJULU S, KAISER W & DIETZ K-J (1999) Salt and drought stress differentially affect the accumulation of extracellular proteins in barley. *Zeitschrift für Naturforschung* 54: 337
- REHM H (1996) *Der Experimentator: Proteinbiochemie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- RENGEL Z (1992) The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment* 15: 625-632
- RODRIGUEZ HG, ROBERTS JKM, JORDAN WR, DREW MC (1997) Growth, water relations and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology* 113: 881-893
- ROSE PA, CUTLER AJ, IRVINE NM, SHAW AC, SQUIRES TM, LOEWEN MK & ABRAMS SR (1997) 8'-acetylene ABA: an irreversible inhibitor of ABA 8'-hydroxylase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 7: 2543-2546
- SAUTER A (1994) Untersuchungen über die Herkunft von Abscisinsäure als Stresssignal aus pflanzlichen Wurzeln. Staatsexamensarbeit, Universität Würzburg
- SEMBDNER G, ATZORN R & SCHNEIDER G (1994) Plant hormone conjugation. *Plant Molecular Biology* 26: 1459-1481
- SCHALHEVET J, HUCK MG & SCHROEDER BP (1995) Root and shoot growth responses to salinity in maize and soybean. *Agronomy Journal* 87: 512-516
- SCHLIEMANN W (1991) Zum Konzept der reversiblen Konjugation bei Phytohormonen. *Naturwissenschaften* 78: 392-401
- SCHRAMMEL P, WOLF A, SEIF R & KLOSE BJ (1980) Eine neue Apparatur zur Druckveraschung von biologischem Material. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 302: 62-64

- SCHURR U, GOLLAN T & SCHULZE ED (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant, Cell and Environment* 15: 561-567
- SIDLER M, HASSA P, HASAN S, RINGLI C & DUDLER R (1998) Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *The Plant Cell* 10: 1623-1636
- SLOVIK S, DAETER W & HARTUNG W (1995) Compartmental redistribution and long-distance transport of abscisic acid (ABA) in plants as influenced by environmental changes in the rhizosphere - a biomathematical model. *Journal of Experimental Botany* 46: 881-894
- STEUDLE E & TYERMAN SD (1983) Determination of permeability coefficients, reflection coefficients and hydraulic conductivity of *Chara corallina* using the pressure probe: effects of solute concentrations. *Journal of Membrane Biology* 75: 85-96
- STEUDLE E (1993) Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level. In: Smith JAC, Griffith H (Editoren) Water deficits: plant responses from cell to community. Bios Scientific Publishers, Oxford, 5-36
- STEUDLE E (1994) The regulation of plant water at the cell, tissue, and organ level: role of active processes and of compartmentation. In: Schulze ED (Editor) Flux control in biological systems. From the enzymes to populations and ecosystems. Academic Press, San Diego, 237-299
- STEUDLE E & PETERSON CA (1998) How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49: 775-788
- STRASBURGER E, NOLL F, SCHENK H & SCHIMPER awf (1991) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York

- SUE M, ISHIHARA A & IWAMURA H (2000) Purification and characterisation of a  $\beta$ -Glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant Science* 155: 67-74
- SUELTER CH (1990) Experimentelle Enzymologie – Grundlagen für die Laborpraxis. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York
- SWAIN E, PING LI C, & POULTON JE (1992) Tissue and subcellular localisation of enzymes catabolising (R)-amygdalin in mature *Prunus serotina* seeds. *Plant Physiology* 100: 291-300
- THEODOULOU FL (2000) Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 79-103
- WALKER-SIMMONS MK, KUDRNA DA & WARNER RL (1989) Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofaktor mutant of barley. *Plant Physiology* 90: 728-733
- WALKER-SIMMONS MK, ANDERBERG RJ, ROSE PA & ABRAMS SR (1992) Optically pure abscisic acid analogs -tools for relating germination inhibition and gene expression in wheat embryos. *Plant Physiology* 99: 501-507
- WALKER-SIMMONS MK, HOLAPPA LD, ABRAMS GD & ABRAMS SR (1997) ABA metabolites induce group 3 LEA mRNA and inhibit germination in wheat. *Physiologia Plantarum* 100: 474-480
- WALTON DC (1983). Structure-activity relationships of abscisic acid analogs and metabolites. In: Addicott I., Fredrick T (Editoren) *Abscisic acid*. Praeger Publishers, New York, 113-146
- WEILER EW (1986) Plant hormone immunoasseys based on monoclonal and polyclonal antibodies. In: Linskens HF, Jackson JF (Editoren) *Modern methods of plant analysis* 4. Springer Verlag, Berlin, 1-17

- WICHERT K (1998) Physiologische und biochemische Charakterisierung der Abscisinsäure-Glucopyranosylester-sensitiven  $\beta$ -D-Glycosidase der höheren Pflanzen. Diplomarbeit, Universität Würzburg
- WILKINSON S (1999) PH as a stress signal. *Plant Growth Regulation* 29: 87-99
- WILKINSON S & DAVIES WJ (1997) Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology* 113: 559-573
- WILEN RW, HAYS DB, MANDEL RM, ABRAMS SR & MOLONEY MM (1993) Competitive inhibition of abscisic acid-regulated gene expression by stereoisomeric acetylenic analogs of abscisic acid. *Plant Physiology* 101: 469-476
- WILLOWS RD & MILBORROW (1992) Abscisic aldehyde: a new synthesis, isotopic labelling, exchange reactions and oxidation. *Phytochemistry* 31: 2649-2653
- WOLF O, JESCHKE WD & HARTUNG W (1990) Long distance transport of abscisic acid in NaCl-treated intact plants of *Lupinus albus*. *Journal of Experimental Botany* 41: 593-600
- ZHANG J & DAVIES WJ (1987) Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. *Journal of Experimental Botany* 38: 2015-2023
- ZHANG J & DAVIES WJ (1989) Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell and Environment* 12: 73-81
- ZHANG J, ZHANG X & LIANG J (1995) Exudation rate and hydraulic conductivity of maize are enhanced by drying soil and abscisic acid treatment. *New Phytologist* 131: 329-336

- ZHONG W, HARTUNG W, KOMOR E & SCHOBERT C (1996) Phloem transport of abscisic acid in *Ricinus communis* L. seedlings. *Plant, Cell and Environment* 19: 471-477
- ZEEVAART JAD & BOYER GL (1984) Accumulation and transport of abscisic acid and its metabolites in *Ricinus* and *Xanthium*. *Plant Physiology* 74: 934-939
- ZEEVAART JAD & CREELMAN (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-473
- ZEEVAART JAD, GAGE DA & CREELMAN RA (1988). Recent studies of the metabolism of abscisic acid. In: Pharis RP, Rood SB (Editoren) *Plant growth substances*. Springer Verlag, Berlin, 133-240
- ZIMMER W & Mendel R (1999) Molybdenum metabolism in plants. *Plant Biology* 1: 160-168
- ZIMMERMANN H & STEUDLE E (1998) Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206: 7-19
- ZOU J, ABRAMS GD, BARTON DL, TAYLOR DC, POMEROY MK & ABRAMS SR (1995) Induction of lipid and oleosin biosynthesis by (+)-abscisic acid and its metabolites in microspore derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. Biological responses in the presence of 8'-hydroxy abscisic acid. *Plant Physiology* 108: 563-571

## PUBLIKATIONSLISTE

### PUBLIKATIONEN

HARTUNG W, SAUTER A, TURNER NC, FILLERY I & HEILMEIER H. (1996) Abscisic acid in soils: What is its function and which factors and mechanisms influence its concentration? *Plant and Soil* 184: 105-110

SAUTER A & HARTUNG W (2000) Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: its implication for long distance stress signals. *Journal of Experimental Botany* 51: 929-935

DIETZ K-J, SAUTER A, WICHERT K, MESSDAGHI D & HARTUNG W (2000) Extracellular  $\beta$ -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany* 51: 937-944

HOSE E, SAUTER A & HARTUNG W (2001) Abscisic Acid in roots – Biochemistry and Physiology. In: Eshel A, Waisel Y, Kafkafi U ed. *The Hidden Half*. New York: Marcel Dekker Inc., 435-448

SAUTER A, DAVIES WJ & HARTUNG W (2001) The long distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from the root to shoot. *Journal of Experimental Botany* 52: 1991-1997

SAUTER A, DIETZ KJ & HARTUNG W (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell and Environment* 25: 223-228

HARTUNG W, SAUTER A & HOSE E (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany* 53: 27-32

SAUTER A & HARTUNG W (2002) The contribution of internode and mesocotyl tissues to root-to-shoot signalling of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 53: 297-302

SAUTER A, ABRAMS SR & HARTUNG W (2002) Structural requirements of abscisic acid (ABA) and its impact on water flow during radial transport of ABA analogues through maize roots. *Journal of Plant Growth Regulation*: online

HARTUNG W, LEPORT L, RATCLIFFE RG, SAUTER A, DUDA R & TURNER NC (2002) Abscisic acid concentration, root pH and anatomy do not explain growth differences of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) on acid and alkaline soils. *Plant and Soil*: im Druck

## **VERÖFFENTLICHTE KONFERENZBEITRÄGE**

### **POSTERPRÄSENTATIONEN**

SAUTER A, WICHERT K, HARTUNG W & DIETZ K-J (1999) Abscisic acid conjugates – do they play a role as long distance stress signals in the xylem? *Journal of Experimental Botany* 50 (Supplement): 40

SAUTER A, MESSDAGHI D, HARTUNG W & DIETZ K-J (2000) Characterisation of an extracellular -glucosidase involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany* 51 (Supplement): 47

### **VORTRÄGE**

SAUTER A, HOSE E & HARTUNG W (2000) Factors that influence the intensity of the ABA stress signal in the xylem. *Journal of Experimental Botany* 51 (Supplement): 6

DAVIES WJ, WILKINSON S, SAUTER A & HARTUNG W (2001) Hormones and water stress. *Journal of Experimental Botany* 52 (Supplement): 5

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name Angela Stephanie Sauter  
Anschrift Erthalstr. 13, 97074 Würzburg  
Geburtsdatum 23.10.1966  
Geburtsort Schweinfurt  
Familienstand verheiratet  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schul Ausbildung

1974-1977 Grundschule Dittelbrunn  
1977-1987 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Schweinfurt  
1987 Allgemeine Hochschulreife  
1983-1984 Auslandsaufenthalt in den USA; Detroit, Michigan  
1984 Erwerb des Highschool-Diploms

### Hochschulstudium

1987 Beginn des Biologie-Studiums an der Rheinisch-Westfälischen  
Technischen Hochschule Aachen  
1988 Studienplatzwechsel an die Bayerische Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
1990 Wechsel des Studiengangs auf Biologie/Chemie für Lehramt an Gymnasien  
1993-1994 Zulassungsarbeit am Lehrstuhl für Botanik I bei Prof. Dr. W.Hartung, Julius-von-  
Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg  
1995 Erstes Staatsexamen  
1998-2001 Promotionsstudium bei Prof. Dr. W. Hartung am Lehrstuhl für Botanik I, Julius-  
von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 251  
und 567 der Deutschen Forschungsgemeinschaft

### Studienreferendariat

1995-1997 Studienseminar am Röntgen-Gymnasium in Würzburg  
1996 Zweigschuleinsatz am Franz-Ludwig-von-Erthal-Gymnasium in Lohr am Main  
1996-1997 Zweigschuleinsatz am Gymnasium Albertinum in Coburg  
1997 Zweites Staatsexamen

### Berufliche Tätigkeit

September 2001 Lehramtsassessorin am Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt  
November 2001 Studienrätin z.A. am Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt

### Sonstige Fortbildungen

1993-1995 Fortbildung in Chinesischer Heilgymnastik mit Abschluss als Taiji-Lehrer  
1998-2002 Fortbildung in Feldenkrais-Pädagogik mit Abschluss als Feldenkraispädagoge

Würzburg, 2002



## DANKSAGUNG

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei all denen recht herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Hartung für die Vergabe des interessanten und vielfältigen Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und für die angenehme und freie Arbeitsatmosphäre. Die gemeinsamen Ausflüge werden mir neben der abwechslungsreichen wissenschaftlichen Tätigkeit in sehr guter Erinnerung bleiben.

Für die tatkräftige Unterstützung von Frau Barbara Dierich und die immerwährende Diskussionsbereitschaft von Frau Elenore Hose möchte ich mich ebenfalls bedanken. Das gemeinsame Arbeiten im Labor war immer sehr kollegial und die Arbeitsatmosphäre oft heiter, was viel zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Herrn Prof. K.-J. Dietz möchte ich danken für die schönen und fruchtbaren Aufenthalte in seinem Labor und seiner steten Bereitschaft, mir auch telefonisch mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Insbesondere bin ich Herrn David Messdaghi und Frau Martina Holt für ihre praktische Einführung in die Proteinbiochemie dankbar. Den anderen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank für die vielen schönen Stunden auch außerhalb des Instituts aussprechen.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gimmler für die jederzeit mögliche Bestimmung der Wurzeloberflächen und der entgegengebrachten Hilfsbereitschaft von Birgit Degenhart, Astrit Boots und Markus Woitke. Für die prompte Überlassung seines Laptops bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Gimmler.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. S.R. Abrams (Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Canada) für die Bereitstellung der hochreinen ABA-Analoga bedanken.

Herrn Prof. Dr. L. Schreiber gilt mein Dank für die Benutzung des Fluoreszenzmikroskops.

Bei Elfriede Reisberg möchte ich mich für sorgfältige ICP-Bestimmung bedanken.

Bei dem gesamten Personal des Botanischen Gartens, allen voran dem Gartenmeister M. Erhard und seinem Nachfolger P. Schmitt bedanke ich mich für die Pflege meiner Versuchspflanzen.

Herrn Prof. Dr. E. Weiler danke ich für die Überlassung von Immuno-Chemikalien.

Herrn Dr. W. Rademacher möchte ich meinen Dank für die Überlassung von Tetcyclacis aussprechen.

Meiner Mutter danke ich für die ständige Bereitschaft zur Korrekturlesung.

Herrn STD Dr. U. Grießer danke ich ebenfalls für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Jürgen möchte ich mich für die ausdauernde Unterstützung bedanken, besonders in der Endphase dieser Arbeit.

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Würzburg, 2002

---

Angela Sauter