

STRUKTUR, FUNKTION UND CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG
SUBERINISIERTER TRANSPORTBARRIEREN IM APOPLASTEN
HÖHERER PFLANZEN

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

vorgelegt von

Klaus Dieter Hartmann

aus Weilburg

Würzburg, 2002

Eingereicht am: 23. August 2002

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hartung

Tag des Promotionskolloquiums: 18. Dezember 2002

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Back to the roots !!!

Abkürzungsverzeichnis

Neben SI- und IUPAC-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ABA	Abcisinsäure
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CP/MAS	<i>Cross Polarisation Magic Angle Spinning</i> (NMR)
CX	Cortexgewebe
EPZW	epidermale (rhizodermale) Zellwände
EZW	endodermale Zellwände
EZW _k	endodermale Zellwände der Knöllchen
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier Transform Infrarot (Spektroskopie)
FY	Fluorol Yellow 088
G	Guaiacyl
GC	Gaschromatographie
H	<i>p</i> -Hydroxyphenyl
ICP	<i>inductively coupled plasma</i> Emissionsspektroskopie
IR	Infrarot
L _p	hydraulische Leitfähigkeit
L _{p,r}	hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel auf Oberfläche bezogen
Me	Methyl
MeOH	Methanol
mKl	mittlere Kettenlänge
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OES	<i>Optical Emission Spectroscopy</i>
P	Leitwert
P _{ex}	Leitwert extrahierter Gewebe
REM	Rasterelektronenmikroskop
RH	relative Luftfeuchte
RHZW	rhizodermale und hypodermale Zellwände
S	Syringyl
StabWN	Standardabweichung vom Mittelwert
TMS	Trimethylsilyl
UV	Ultraviolett
w.f.	wasserfrei

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Kenntnisstand	1
1.1	Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	6
2	Materialien und Methoden	7
2.1	Anzucht und Isolation von Pflanzenmaterial	7
2.1.1	Verwendete Arten und Anzuchtbedingungen	7
2.1.1.1	Hydroponische Kultur	8
2.1.1.2	Aeroponische Kultur	9
2.1.1.3	Mais	9
2.1.1.4	Rizinus	9
2.1.1.5	Ackerbohne	10
2.1.1.6	Kartoffel	10
2.1.1.7	Eiche, Buche, Fichte	11
2.1.1.8	Rohrkolben	11
2.1.2	Isolation und Reinigung der Zellwandmaterialien	12
2.1.2.1	Wurzelmaterial	12
2.1.2.2	Ermittlung der Bezugsgrößen	13
2.1.2.3	Kartoffelperiderm	13
2.2	Mikroskopische Untersuchungen	14
2.2.1	Lichtmikroskopie	14
2.2.1.1	Färbung mit Sudan III	15
2.2.1.2	Färbung mit Fluorol Yellow 088	15
2.2.1.3	Färbereaktion mit Phloroglucin/Salzsäure	16
2.2.1.4	Färbung mit Berberinchlorid/Anilinblau	16
2.2.2	Rasterelektronenmikroskopie	17
2.3	Untersuchung von Zellwandextrakten	17
2.4	Depolymerisationsreaktionen	18
2.4.1	Suberinabbaureaktionen	18
2.4.1.1	Umesterungsreaktion mit Bortrifluorid	19
2.4.1.2	Umesterungsreaktion mit Natriummethanolat	19
2.4.2	Ligninabbaureaktion	19
2.4.2.1	Thioacidolyse	19
2.5	Chemisch/physikalische Analytik	21

2.5.1	Gaschromatographie.....	21
2.5.1.1	Gaschromatogramm von Suberinmonomeren.....	23
2.5.1.2	Gaschromatogramm von Ligninmonomeren	24
2.5.2	Massenspektroskopie	25
2.5.3	IR-Spektroskopie.....	26
2.5.4	ICP-Ionenemissionsspektralanalyse.....	27
2.6	Experimente zur Funktion der Zellwand als Barriere für Stoffflüsse.....	28
2.6.1	Diffusion von Wasser durch Kartoffelperiderm.....	28
2.6.2	Aufnahme von Rubidium-Ionen durch die Pflanzenwurzel.....	30
2.6.3	Transpirationmessungen.....	31
2.6.4	Wurzeldruckmessungen	31
3	Chemische Zusammensetzung und mikroskopische Feinstruktur von Zellwänden der Wurzel und Wurzelknöllchen bei <i>Vicia faba</i> L.....	33
3.1	Mikroskopische Feinstruktur von <i>V. faba</i> Zellwänden der Wurzel und Wurzelknöllchen	34
3.2	Chemische Charakterisierung der Zellwände von <i>V. faba</i> Wurzel und Wurzelknöllchen	36
3.2.1	Analyse der Lösungsmittlextrakte <i>V. faba</i>	37
3.2.2	Suberinanalysen <i>V. faba</i>	38
3.2.3	Ligninanalysen <i>V. faba</i>	42
3.3	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu <i>V. faba</i> Wurzel und Wurzelknöllchen	43
4	Chemische Zusammensetzung und Mikroskopische Feinstruktur von Zellwänden der Rhizome und Wurzel von <i>Typha glauca</i> Godr.....	45
4.1	Lichtmikroskopische Betrachtung der Rhizome und Wurzeln von <i>T. glauca</i>	45
4.2	Chemische Charakterisierung der Zellwandisolate von <i>T. glauca</i>	47
4.2.1	Analyse der Lösungsmittlextrakte <i>T. glauca</i>	48
4.2.2	Suberinanalysen <i>T. glauca</i>	50
4.2.2.1	Konnektivität <i>T. glauca</i>	52
4.2.3	Ligninanalysen <i>T. glauca</i>	53
4.3	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu <i>T. glauca</i> Rhizomen und Wurzeln	
	54	
5	Chemische Zusammensetzung von Wurzelperidermen der Arten: <i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl., <i>Fagus sylvatica</i> L., <i>Picea abies</i> (L.) Karst.	56

5.1	Anatomische Betrachtung der Wurzelperiderme von Eiche, Buche und Fichte.....	56
5.2	Extrakte aus Baumwurzelperiderm.....	57
5.3	Analyse der Biopolymere im Baumwurzelperiderm.....	58
5.3.1	Suberinmengen im Baumwurzelperiderm.....	58
5.3.2	Ligninmengen im Baumwurzelperiderm.....	59
5.3.3	Suberinzusammensetzung von Baumwurzelperiderm.....	59
5.3.4	Ligninzusammensetzung von Baumwurzelperiderm.....	62
5.4	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu Baumwurzelperiderm.....	63
6	Suberingehalt, Ionentransport und mikroskopische Betrachtung in apoplastischen Barrieren von <i>Ricinus communis</i> L. Wurzeln unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	66
6.1	Untersuchung der Wurzelanatomie von <i>R. communis</i>	66
6.1.1	Mikroskopische Untersuchungen an <i>R. communis</i>	67
6.2	Veränderungen der Suberinmengen und der Suberin-Zusammensetzung apoplastischer Wurzelbarrieren in <i>R. communis</i> unter Nitratmangel und Salzstress.....	69
6.2.1	Suberinzusammensetzung in <i>R. communis</i>	71
6.2.1.1	Suberinzusammensetzung in RHW von <i>R. communis</i>	71
6.2.1.2	Suberinzusammensetzung EZW von <i>R. communis</i>	72
6.2.1.3	Mittlere Kettenlängenverteilung im <i>R. communis</i> -Suberin.....	73
6.2.1.4	Konnektivität in <i>R. communis</i>	75
6.3	Beeinflussung der Rb^+ -Aufnahme durch die Kulturbedingungen von <i>R. communis</i>	76
6.4	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu <i>R. communis</i> Wurzeln.....	79
7	Chemische Zusammensetzung, mikroskopische Betrachtung und Transportuntersuchungen für Wasser und Ionen in apoplastischen Barrieren von Wurzeln dreier Genotypen von <i>Zea mays</i> L. unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	82
7.1	Mikroskopische Untersuchungen an <i>Z. mays</i>	82
7.2	Suberinanalysen der Rhizodermis/Hypodermis der Wurzeln von <i>Z. mays</i>	86
7.2.1	Suberinanalysen der Endodermis von <i>Z. mays</i>	93
7.3	Vergleich Nebelkultur-Hydrokultur; Einfluss der Exodermis auf die radiale hydraulische Leitfähigkeit von <i>Z. mays</i> der Sorte Helix.....	99
7.3.1	Mikroskopische Untersuchungen an <i>Z. mays</i> , Helix.....	100
7.3.2	Polymerzusammensetzung in <i>Z. mays</i> , Helix.....	101
7.3.2.1	Suberinzusammensetzung in <i>Z. mays</i> , Helix.....	101
7.3.2.2	Ligninzusammensetzung in <i>Z. mays</i> , Helix.....	102
7.3.3	Wassertransportmessungen an Wurzeln von <i>Z. mays</i> , Helix.....	104

7.4	Beeinflussung der Ionenaufnahme über die Wurzel durch die Einwirkung von Abscisinsäure und Salzstress bei <i>Z. mays</i> , Helix.	105
7.4.1	Anatomische Veränderungen durch hohe NaCl und ABA Konzentrationen an Wurzeln von <i>Z. mays</i> , Helix.	105
7.4.2	Aufnahme von Rb ⁺ über die Wurzel von <i>Z. mays</i> , Helix.	108
7.5	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu apoplastischen Barrieren in Wurzeln von <i>Z. mays</i>	110
7.5.1	Vergleich der Sorten Across 8023, Helix und Pioneer 3906.	110
7.5.2	Milder Wasserstress bei Helix, Nebelkultur im Vergleich mit hydroponischer Kultur	113
7.5.3	Einfluss der apoplastischen Barrieren auf den Transport von Ionen in den Spross von <i>Z. mays</i> , Helix.	115
8	Kartoffelperiderm als Modellgewebe für apoplastische Transportprozesse durch suberinisierte Gewebe.	117
8.1	Mikroskopische Untersuchungen.	117
8.2	IR-Absorbtion.	122
8.3	Ergebnisse chemischer Analysen.	125
8.3.1	Extrakte: Vergleich Wund und bei 50% Luftfeuchte gewachsenes natürliches Kartoffelperiderm.	125
8.3.2	Extraktzusammensetzung der Kartoffelperiderme.	126
8.3.2.1	Ferulasäureester.	127
8.3.2.2	Substanzklassenverteilung im Extrakt von Kartoffelperiderm.	130
8.3.2.3	Kettenlängenverteilung der Wachse im Kartoffelperiderm.	132
8.4	Suberin; Vergleich Wund- und natürliches Periderm 50% RH.	133
8.4.1	Suberinzusammensetzung.	134
8.4.1.1	Substanzklassenverteilung.	135
8.4.1.2	Kettenlängenverteilung.	137
8.4.1.3	Konnektivität im Suberin.	138
8.5	Unterschiede im Wachs und Suberingehalt bei Lagerung in unterschiedlicher Raumluftfeuchte.	139
8.5.1	Wachsgehalt.	139
8.5.2	Extraktzusammensetzung.	141
8.5.2.1	Substanzklassenverteilung.	141
8.5.2.2	Kettenlängenverteilung der Wachse.	142

8.5.3	Suberin in Kartoffelperidermen unterschiedlicher Lagerungsluftfeuchte.....	145
8.5.3.1	Substanzklassenverteilung im Suberin.....	146
8.5.3.2	Kettenlängenverteilung im Suberin.....	147
8.5.3.3	Konnektivität im Suberin	149
8.6	Wundperiderm bei verschiedenen Luftfeuchten	149
8.6.1	Wachsgehalt	149
8.6.2	Extraktzusammensetzung.....	150
8.6.3	Suberin	151
8.6.4	Suberinzusammensetzung	152
8.7	Permeationsexperimente	153
8.7.1	Natürliches Periderm.....	153
8.7.2	Leitwerte von Wundperiderm	155
8.7.2.1	Beeinflussung der Leitfähigkeit und der Peridermchemie durch die Wirkung des Elongasehemmstoffes Ethofumesat.....	156
8.8	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu <i>S. tuberosum</i> Sprossknollenperiderm.....	160
8.8.1	Natürliches Periderm.....	160
8.8.2	Wundperiderm.....	164
8.8.3	Suberin aus Kartoffel als Modell für die Suberinstruktur	167
8.8.4	Bedeutung des Kartoffelperiderms als Modellgewebe für die Leitfähigkeit von suberinisierten Barrieren im Apoplasten.....	170
8.8.4.1	Modellrechnungen.....	171
9	Zusammenfassende Diskussion.....	175
9.1	Suberin, Bedeutung, Struktur und Funktion.....	175
9.2	Transporte von Wasser und Ionen durch apoplastische Barrieren in den Wurzel verschiedener Pflanzenarten.....	180
10	Ausblick	185
11	Zusammenfassung.....	191
12	Summary: “Structur, Function and Chemical Composition of Suberized Transport Barriers in the Apoplast of Higher Plants”.....	197
13	Literatur.....	199

1 Einleitung und Kenntnisstand

Bei der Eroberung des Festlandes als Lebensraum passten sich die Grenzflächen der Höheren Pflanzen an die Erfordernisse einer Gasatmosphäre an. Aus schon in Zellwänden von Algen nachweisbaren hydrophoben Vorläufermolekülen (ALLARD und TEMPLIER, 2001), entwickelten die oberirdischen Pflanzenteile in über 400 Millionen Jahren Evolution einen heute nahezu perfekten Transpirationsschutz durch die Ausbildung einer mit Wachsen imprägnierten Kutikula der Blätter (RIEDERER und SCHREIBER, 2001), und einer wachs- und suberinhaltigen Borke. Zur Verankerung im Bodensubstrat und zur Aufnahme des lebensnotwendigen Wassers und der meisten für das Leben der Pflanze notwendigen darin gelösten Nährstoffe (MARSCHNER, 1995) entwickelten sich Wurzeln, deren Länge schon vor etwa 375 Millionen Jahren bis zu einem Meter erreichten (RAVEN und EDWARDS, 2001).

Wurzeln sind die meist unterirdisch wachsenden Organe der Landpflanzen, ausgestattet mit einer ebenso komplexen wie speziebedingten vielseitigen Anatomie und Morphologie, die den vielfältigen Aufgaben dieser Organe Rechnung trägt (ESAU, 1977). Neben der schon erwähnten mechanischen Stabilität zur Verankerung im Bodensubstrat oder, im Falle von Epiphyten auf anderen Pflanzen und der Versorgung des Sprosses mit Wasser und darin gelösten Nährstoffen, muss die Wurzel gleichzeitig vermeiden potentiell toxische Stoffe aufzunehmen oder pathogenen Bodenorganismen Zugang zu bieten. Bei Bodentrockenheit sollte dagegen Wasserverlust verhindert werden. Außerdem tragen die Wurzeln dazu bei, ausreichend Sauerstoff zu den wachsenden Zellen der Wurzelspitze zu liefern (z.B.: Mangroven, Reis, Rohrkolben) (DE SIMONE *et al.*, 2002; ARMSTRONG *et al.*, 2000; COLMER *et al.*, 1998), oder im Bodenmilieu vorhandene toxische Metall-Ionen durch Oxidation mit austretendem Sauerstoff unschädlich zu machen (KOZLOWSKI, 1984; ARMSTRONG und ARMSTRONG, 1999; ČÍŽKOVÁ *et al.*, 1999). Wurzeln sind zudem in der Lage ihre Umgebung, die Rhizosphäre, positiv für die Aufnahme von Nährstoffen zu beeinflussen (z.B.: durch Ausscheiden von organischen Säuren um den pH-Wert zu erniedrigen), und nicht zuletzt dienen sie als Speicherorgane der Pflanzen für in den Blättern produzierte Stoffe (z.B.: Maniok, Süßkartoffel Rettich, Zuckerrübe). Bei durch Trockenheit hervorgerufenen Wasserstress sind sie überdies in der Lage Signalstoffe (z.B.: ABA) zu produzieren, welche im Transpirationsstrom mitgenommen schon in winzigen Mengen dem Spross mitteilen die Transpiration der Blätter einzuschränken (BANO *et al.*, 1993; DAVIES *et al.*, 1994; MUNNS und SHARP, 1994). Ferner ist die Wurzel in der Lage die Erdanziehungskraft zur Orientierung während des Wachstums zu nutzen (SIEVERS und SCHRÖTER, 1971).

Wasser und Nährstoffe des Bodensubstrates müssen die Wurzel radial durchqueren und dabei mehrere Barrieren über verschiedene Wege passieren. Pflanzliche Gewebe werden aufgeteilt in den belebten Symplast mit von Plasmamembranen umgebenen Zellen und den unbelebten Apoplast (MÜNCH, 1930), der die Zellwände und Leitbündel, welche als Speicher und

Langstreckentransportraum für Wasser und den darin gelösten Substanzen dienen, umfasst (SATTELMACHER *et al.*, 1998). Apoplastische Barrieren bilden Grenzsichten für den Stofftransport über die Zellwände. Die äußerste Grenzsicht wird durch die Rhizodermis (oder Wurzelepidermis) gebildet die oft Wurzelhaare zur Vergrößerung der Oberfläche trägt und unter natürlichen Bedingungen schon früh durch eine darunterliegende oft mehrlagige Hypodermis ersetzt wird. Eine weitere Barriere besteht in der nur eine Zellschicht starken Endodermis, die den Zentralzylinder mit den Leitelementen (Xylem, Phloem) von der Wurzelrinde (Cortex) abtrennt. Die Endodermis kann nach KROEMER (1903) drei verschiedene Reifestadien erreichen. Man differenziert zwischen einem primären Entwicklungsstadium mit einem ausgebildeten CASPARY-Streifen (CASPARY, 1866), der eine Einlagerung lipophiler und aromatischer Substanzen in die Radialwände der Endodermiszellen darstellt, einem sekundären Zustand, den eine auf die Innenwand der Zellen aufgelagerte lipophile Schicht charakterisiert, sowie ein tertiäres Entwicklungsstadium wobei zusätzliche u-förmige Auflagerungen beobachtet werden.

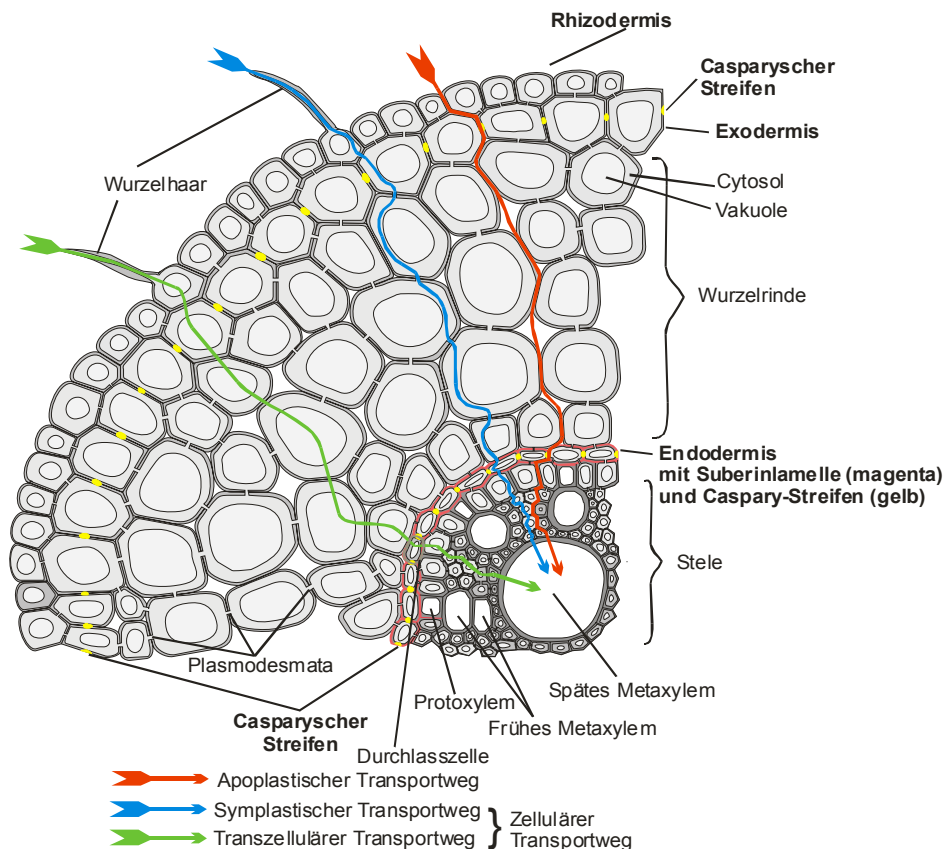


Abb. 1.1: Transportwege durch die Wurzel für Wasser und gelöste Stoffe (verändert nach STEUDLE *et al.*, 1998; ZIMMERMANN 2001). Der Wurzelquerschnitt zeigt eine Wurzel im Übergang vom primären in das sekundäre Stadium der Endodermisentwicklung; Flüsse über den apoplastischen Transportweg (rot) gehen durch Zellwände, die an Exo- und Endodermis durch CASPARYsche Streifen oder Suberineinlagerungen gekennzeichnet sind, und durch Interzellularräume. Stofftransport über den symplastischen Transportweg (blau) geschieht über Plasmodesmata und das Cytosol der Zellen. Der dritte Transportweg ist der Transzelluläre (grün), der über Zellmembranen und durch Zellwände hindurch vor allem für den Wassertransport eine Rolle spielt. Es ist nicht möglich symplastischen und transzellulären Weg experimentell zu unterscheiden (ZIMMERMANN 2001).

Um zu den Leitelementen zu gelangen, stehen aufgrund der geschilderten anatomischen Gegebenheiten prinzipiell drei Wege zur Verfügung, ein apoplastischer Weg, über die Zellwände und Interzellularen, und zwei zelluläre Wege, ein symplastischer und ein transzellulärer Pfad (STEUDLE *et al.*, 1998, STEUDLE und PETERSON, 1998). Der symplastische Weg verläuft, nachdem die Zellwände der Wurzelhaare passiert sind, über Plasmodesmata durch das Kontinuum der lebenden Zellen, während der Stofftransport des transzellulären Weges über die Zellmembranen und Zellwände erfolgt (Abb. 1.1). Experimentell sind die Stoffflüsse der beiden zellulären Wege nicht zu trennen.

Unter dem Begriff apoplastische Barriere wurde lange Zeit vor allem die Endodermis mit dem nach ihrem Entdecker benannten CASPARYschen Streifen behandelt (CASPARY, 1866), und die chemische Zusammensetzung wurde schon 1892 von SIEDLER als eine Mischung von Suberin und Lignin beschrieben (SIEDLER, 1892), mit histochemischen Methoden kam VAN WISSELINGH (1926) zu einer ähnlichen Schlussfolgerung die PRIESTLEY und Mitarbeiter (PRIESTLEY und NORTH, 1922; PRIESTLEY und RHODES, 1926) durch Solulubilisierungsexperimente bestätigten. In unserer Arbeitsgruppe gelang es Anfang der 1990er Jahre erstmals die Polymere im CASPARY-Streifen als Lignin (Holzstoff) und Suberin (Korkstoff) durch gaschromatographische Untersuchung eindeutig zu identifizieren und ihre Mengen in der Endodermis zu bestimmen. Zudem fanden KARAHARA und SHIBAOKA (1992) große Mengen endodermispezifische Zellwandproteine, die den hohen Stickstoffgehalt bei in der Vergangenheit angefertigten Elementaranalysen des CASPARYstreifens erklärten.

Eine Endodermis wird von jeder höheren Pflanze in der Wurzel ausgebildet (PETERSON, 1992) und ist einer ontogenetischen Entwicklung unterworfen. Die Entwicklungsstadien lassen sich in eine initiale Proendodermis (VAN FLEET, 1961) und die drei bereits erwähnten weiteren Reifestadien unterteilen, welche mit histochemischen Methoden von KROEMER (1903) nachgewiesen wurden. In Maispflanzen (*Zea mays* L.) fanden sich alle drei Stadien in einer Wurzel. Im apicalen seitenwurzelfreien Bereich ist nur ein CASPARY-Streifen sichtbar, in der Seitenwurzelzone wurden zusätzlich Suberinlamellen beobachtet und in der tertiären basalen Zone, dicke Zellwandauflagerungen. Die mit histochemischen Beobachtungen festgestellten zunehmenden Suberineinlagerungen konnten bei Maispflanzen durch Polymeranalysen gestützt werden (ZEIER, 1998).

Eine erst in jüngerer Zeit wieder entdeckte, jedoch von KROEMER (1906) bereits beschriebene apoplastische Barriere stellt die unmittelbar an die Rhizodermis angrenzende Zellschicht der Hypodermis dar, die ebenfalls einen CASPARYschen Streifen ausbilden kann und in diesem Stadium als Exodermis bezeichnet wird (PETERSON, 1988). Das CASPARYsche Band der Exodermis belegt meist die gesamte antiklinale Zellwand, während in der Endodermis meist nur kleine Bereiche der radialen Zellwand zusätzlich die charakteristischen Polymere enthalten. Unter den Angiospermenarten bilden über 90% eine Exodermis aus, zum Teil schon dicht hinter der Wurzelspitze (WILSON *et al.*, 1983, PERUMALLA *et al.*, 1990, PETERSON und PERUMALLA, 1990). Aber auch eine Hypodermis ohne CASPARY-Streifen weist im

späteren Entwicklungsstadien Suberineinlagerungen auf. Durch äußere Einflüsse wie Wassermangel oder Ionenstress kann die Bildung dieser äußersten apoplastischen Barriere gezielt induziert werden (JUPP und NEUMANN, 1987; NORTH und NOBEL, 1991; CRUZ *et al.*, 1992; ENSTONE und PETERSON, 1998; ZIMMERMANN und STEUDLE, 1998; SCHREIBER *et al.*, 1999, ZIMMERMANN *et al.*, 2000). Die Zusammensetzung der Zellwandpolymere endodermaler wie exodermaler Zellwände kann inzwischen routiniert mit chemisch/physikalischer Analyse nach dem in Abb. 1.2 vorgestellten Schema durchgeführt werden. Es wurde bereits eine Anzahl Wurzelgewebe monokotyler und dikotyler Arten nach dieser Methode analysiert. (ZEIER, 1998; ZEIER *et al.*, 1999a; SCHREIBER *et al.*, 1999)

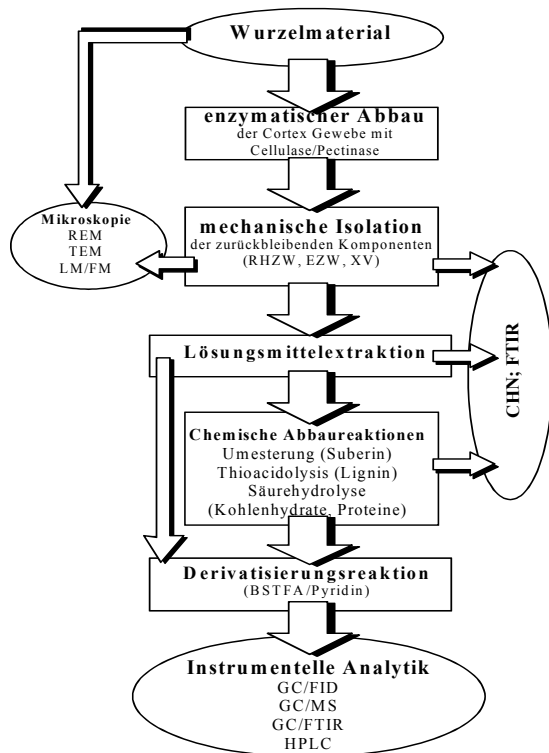


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur Aufklärung der Polymerzusammensetzung in Wurzelgeweben (nach SCHREIBER *et al.*, 1999)

Der diffusive apoplastische Transport in den Zellwänden und Zellzwischenräumen in Wurzeln wird durch lipophile Barrieren in Hypodermis und Endodermis gesteuert. Bei Transportexperimenten mit organischen Farbstoffmolekülen, radioaktiven und stabilen Isotope stellte sich heraus, dass eine primäre Endodermis aber auch eine Hypodermis mit CASPARY-Streifen eine wirkungsvolle Barriere für in Wasser gelöste Ionen und organische Moleküle darstellt, aber durchaus auch je nach Pflanzenart zu einem gewissen Grade immer noch durchlässig sein kann (HÜLSBRUCH, 1944; ROBARDS *et al.*, 1973; NAGASHI *et al.*, 1974; 1974; CLARKSON und ROBARDS, 1975; DU PONT und LEONARD, 1977; PETERSON *et al.*, 1980; PETERSON, 1987, 1988, 1989; SANDERSON, 1983; MOON *et al.*, 1986; PERUMALLA *et al.*, 1990; ENSTONE und PETERSON, 1992, 1998; FRENSCH *et al.*, 1996; WATT *et al.*, 1996; ALONI *et al.*, 1998; ZIMMERMANN und STEUDLE, 1998; GIERTH *et al.*, 1999). Die Existenz eines CASPARY-Streifens bedeutet nicht automatisch, dass die mit Suberin inkrustierten Zellwandbereiche

vollkommen undurchlässig sein müssen (ZIMMERMANN *et al.*, 2000). Eine Wirkung apoplastischer Barrieren auf den Transport von Wasser wurde entdeckt, als in Wurzeln nach Trocken- oder Salzstress der Widerstand für den Wassertransport deutlich zunahm, und in den Wurzeln verstärkte apoplastische Barrieren in Endo- und vor allem Exodermis u.a. mit histochemischen Methoden nachgewiesen wurden (AZAIZEH *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 1992; STEUDLE, 1993; NORTH und NOBEL, 1995, 1996; PEYRANO *et al.*, 1997; HOSE *et al.*, 2001). Auch der Einfluss von Mangelernährung auf die Ausbildung der Barrieren konnte festgestellt werden, so wurden in unter Magnesium-Ionenmangel leidenden Maiswurzeln größere Mengen für Suberin typische Moleküle entdeckt als in Kontrollen (ESPELIE und KOLATTUKUDY, 1979). Zusätzlich zu der Funktion der Endodermis in Wurzeln als Barriere gibt es Hinweise auf eine Funktion der Endodermis im Hypocotyl als Ort der Rezeption der Schwerkraft, wobei bestimmte Zellwandproteine eine Rolle zu spielen scheinen (FUKAKI *et al.*, 1998)

Der nichtapoplastische zelluläre Transport von Stoffen unterliegt der physiologischen Kontrolle durch die lebenden Zellen, die vor allem durch Ionenkanäle und weitere Transportproteine eine regulierte Aufnahme von Wasser und darin gelösten Substanzen ermöglicht. Auf dieser Ebene können sich Pflanzen schnell an Umweltveränderungen anpassen, so dass experimentelle Befunde durch die Komplexität und Vielzahl der Parameter von symplastischen und apoplastischen Transportprozessen immer vorsichtig zu bewerten sind. Der Wassertransport durch die Wurzel wird vermutlich am Besten durch ein Kompositmodell beschrieben, das den Transport von Wasser über die Zellmembranen und darin eingelagerte Aquaporine (VAN OS *et al.*, 1994, MAUREL, 1997; SCHÄFFNER, 1998, HENZLER *et al.*, 1999; CLARKSON *et al.*, 2000; HENZLER und STEUDLE, 2000) ebenso einschließt wie den passiven vom Transpirationsstrom getriebenen Fluss von Wasser über den Apoplasten (STEUDLE *et al.*, 1987; STEUDLE *et al.*, 1993; STEUDLE, 1994, 1997; STEUDLE und FRENSCH, 1996; STEUDLE, 2001).

Hydrophobe, suberinisierte Barrieren greifen in den radialen Stofffluss ein, sodass es von großem Interesse, deren Zusammensetzung und Struktur zu kennen, um die Bedeutsamkeit des lipophilen Polymers für die Nahrungsaufnahme der Pflanzen abzuschätzen. Eingebaute aromatische Komponenten wie Lignin und veresterte Zimtsäurederivate stärken dagegen vermutlich die Barrierewirkung der imprägnierten Zellwand im Sinne eines vorgeformten Wundperidermes gegen Pathogenbefall.

Ein Fernziel der Forschung an apoplastischen Barrieren in Zukunft könnte sein, diese Barrieren gezielt unter Zuhilfenahme gentechnischer Methoden so zu verändern, dass Nutzpflanzen an extreme Umwelteinflüsse besser angepasst sind. Erste Schritte auf diesem Weg sind mit der Entdeckung von Fettsäurelongasen und Hydroxylasen in Wurzeln verbunden (DOMEREGUE *et al.*, 1998; SCHREIBER *et al.*, 2000), jedoch sollte die Vielzahl pflanzlicher Überlebensstrategien und die damit verbundenen Schwierigkeiten nicht unbeachtet bleiben. Die Anpassung der ganzen Pflanze und ihrer Wurzeln hängt von den

jeweils herrschenden Standortbedingungen stark ab und beruht auf Veränderungen anatomischer und physiologischer Parameter.

1.1 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Apoplastische Barrieren spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation von radialen Stoffflüssen in der Wurzel. Bislang ist es nur bei wenigen Arten gelungen, die chemische Zusammensetzung dieser Barrierepolymere quantitativ und qualitativ aufzuklären (SCHREIBER *et al.*, 1999; ZEIER, 1998). Gegenstand dieser Arbeit sollte daher die chemische Charakterisierung der Biopolymere, vor allem die des hydrophoben Suberins, in apoplastischen Barrieregeweben der Wurzeln weiterer Arten mit etablierten und weiterentwickelten Methoden der chemisch-instrumentellen Analytik sein. Hierbei sollte nach Möglichkeit darauf geachtet werden, eine Flächenbelegung der Zellwände mit den Barrierepolymeren als Bezugsgröße zu erhalten, um einen Bezug zum Diffusionswiderstand zu ermöglichen. Die Pflanzen sollten nach Möglichkeit in hydroponischer Kultur in Klimakammer- oder Gewächshausexperimenten angezogen werden, um eine Beeinflussung durch Bodenorganismen oder Mykhorisierung auszuschließen. Neben diesen „künstlichen“ Systemen, die zum Beispiel an krautigen Pflanzen und Keimlingen von Rizinus, Mais, Ackerbohne und Rohrkolben angewandt wurden, sollten auch Wurzeln aus dem Freiland, zum Beispiel von über hundertjährigen Eichen, Buchen und Fichten untersucht werden.

Neben der Aufzucht der Pflanzen unter optimal-Bedingungen, war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit die Erforschung des Einfluss von Umweltfaktoren wie Salzstress oder Nährstoffmangel auf diese Barrieregewebe in Bezug auf die chemische Zusammensetzung des Suberins und Lignins zu ergründen. Die Relevanz dieser Änderungen für die Pflanze und die Nährstoffaufnahme sollte ergründet werden und für monocotyle wie dicotyle Arten gezeigt werden. Dabei sollten neben der chemisch-analytischen Arbeit auch die anatomischen Veränderungen mit lichtmikroskopischen und histochemischen Untersuchungen dokumentiert werden.

Ferner sollte im Rahmen dieser Dissertation mit der Verwendung von suberinisiertem Kartoffelperiderm ein allgemeines Modellsystem für suberinisierte Barrieren etabliert werden. Hiermit konnten Transportstudien leicht durchgeführt und die Variation der chemischen Zusammensetzung einfach durchgeführt, und analytisch problemlos verfolgt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Anzucht und Isolation von Pflanzenmaterial

Grosse Teile des Pflanzenmaterials für die mikroskopischen und analytischen Arbeiten konnten im Botanischen Garten der Universität Würzburg in Gewächshäusern oder Klimakammern angezogen werden, Teile des Materials wurde dem Freiland entnommen oder von Kooperationspartnern in Gießen (D), Göttingen (D), Bayreuth (D) und Oswego (USA) gestellt (Tab. 2.1). Die mechanische Isolation der Zellwände für die Polymeranalysen wurde in Würzburg durchgeführt.

2.1.1 Verwendete Arten und Anzuchtbedingungen

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden 8 höheren Pflanzenarten und verschiedene Zuchtformen bestimmter Arten (Mais, Rizinus, Ackerbohne; Kartoffel) verwendet um Barrieregewebe aus den Wurzeln zu isolieren (Tab. 2.1). Mit Mais (*Zea mays* L.) und Rizinus (*Ricinus communis* L.), sowie mit den drei Baumarten, wurden Transportexperimente für Wasser oder Ionen durchgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Arten, Sorten und Herkunft des Saatgutes oder Wurzelmaterials

Monocotyle Arten:	Art	Sorte	Herkunft
	<i>Typha glauca</i> Godr.	Wildtyp	Freiland ^{a)}
	<i>Typha angustifolia</i> L.	Wildtyp	Bot. Garten Würzburg
	<i>Zea mays</i> L.	Helix	KWS ^{b)}
	<i>Zea mays</i> L.	Pioneer 3906	AGS ^{c)}
	<i>Zea mays</i> L.	Across 8023	CIMMYT ^{d)}
Dicotyle Arten:			
	<i>Fagus sylvatica</i> L.		Freiland ^{e)}
	<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.		Freiland ^{e)}
	<i>Ricinus communis</i> L.	Sanguines	KWS
	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Desirée	Wochenmarkt Würzburg
	<i>Vicia faba</i> L.	Troy	NWS ^{f)}
Gymnosperme Art:			
	<i>Picea abies</i> (L.) Karst.		Freiland ^{e)}

a) Freiland: Broadway Road Marschland ,Wolcott, Cayuga County, Staat New York, USA b) KWS= Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Einbeck, Deutschland; c) AGS = Arbeitsgruppe Prof. S. Schubert, Universität Gießen, Ursprung des Saatgutes: Pioneer Hi-Breed International Inc. Johnston, USA; d) CIMMYT = International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico City, Mexico; e) Lüneburger Heide 52°45'N,10°30'O; f) NWS= Nordwestdeutsche Saatzucht, Holtsee, Deutschland

Die Anzucht einer Mehrzahl der für die Experimente benötigten Pflanzen fand unter kontrollierten Gewächshaus- oder Klimakammerbedingungen statt. Änderungen der Bedingungen zur Anwendung von Stressoren (z.B. Salzstress, Nährstoffmangel) wurden lediglich durch Austausch des Nährmediums hervorgerufen, Licht oder Temperaturverhältnisse blieben unverändert.

Wurzeln der drei Baumarten, wurden im Freiland geerntet. *Typha glauca* Godr. Rhizome wurden dem Freiland entnommen und die Wurzeln in einem hydroponischen System angezogen.

Zur Anzucht der Pflanzen in hydroponischen und aeroponischen Systemen wurde eine Nährlösung mit gleicher Zusammensetzung verwendet. Die Lösung wurde jeweils kurz vor der Verwendung aus drei konzentrierten Einzellösungen durch Verdünnung von je 0.01 L in 10.0 L Wasser hergestellt (Tab 2.2).

Tab. 2.2: Zusammensetzung der verwendeten konzentrierten Nährstofflösungen

	gelöste Substanz	Konzentration [mol L ⁻¹]
Lösung I (Mikronährstoffe)	H ₃ BO ₃	1.00·10 ⁻³
	CuSO ₄	0.20·10 ⁻³
	MnSO ₄	0.50·10 ⁻³
	NaFe(III)EDTA	0.20
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.01·10 ⁻³
	ZnSO ₄	0.50·10 ⁻³
Lösung II (Makronährstoffe I)	Ca(NO ₃) ₂	2.00
	KCl	0.10
Lösung III (Makronährstoffe II)	KH ₂ PO ₄	0.10
	K ₂ SO ₄	0.70
	MgSO ₄	0.50

(Empfehlung der DFG für das Schwerpunktprogramm „Der Apoplast der höheren Pflanze“ http://www.uni-kiel.de/plantnutrition_soilscience/plantnut/apostnd.htm)

Für Experimente zur Simulation von Nährstoffmangel wurde Calciumnitrat in Lösung II durch äquimolare Mengen Calciumsulfat (Nitratmangel) ersetzt.

2.1.1.1 Hydroponische Kultur

Die Anzucht von Pflanzen in Hydroponischer Kultur erfolgte in undurchsichtigen PVC-Töpfen mit 1.80 L Fassungsvermögen. Die Bepflanzung der Töpfe wurde durch Bohrungen (Ø = 7.00 mm) in einer Abdeckung aus PVC vorgenommen, sodass die Primärwurzel unterhalb, und der Kern oberhalb der Abdeckung lag. Vorhandene Sekundärwurzeln wurden entfernt und die Wurzel in der Bohrung mit Schaumstoff fixiert. Bis zu 9 Maispflanzen wurden auf einen Topf gesetzt, bei Rizinus maximal 4 Pflanzen.

Die Nährlösung wurde durch Ausströmersteine ständig mit Druckluft durchspült und alle 4-6 Tage ausgewechselt. Die Anzucht erfolgte in Klimakammern mit einer Lichtmenge von 500-600 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei einer relative Luftfeuchte von 70 % und einer Temperatur von 22 °C in der Hellphase (16 h) und 18 °C in der Dunkelphase (8 h).

2.1.1.2 Aeroponische Kultur

Das Anzuchtsystem für Aeroponische Kultur (Nebelkultur) bestand aus einem 1 m³ fassenden lichtundurchlässigen PVC Kasten. Auf dem Grund des Kastens befand sich ein Luftbefeuchter (Defensor, Barth&Stöcklein, Garching (D)) verbunden mit einem 20.0 L fassenden Nährlösungsreservoir. Durch die Aktivität des Luftbefeuchters wurde die Nährlösung im Kasteninneren zu einem feinen Nebel zerstäubt. Die Abdeckung des Kastens bestand aus einer PVC Platte mit ca. 30 Bohrungen ($\varnothing = 25.0 \text{ mm}$) durch welche die Bepflanzung ermöglicht wurde. Die Pflanzen wurden wie in 2.1.1.1 beschrieben eingesetzt und fixiert.

Nebelkulturpflanzen wurden an der Universität Bayreuth angezogen, mit Lichtintensitäten von ca. 500 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, und relativen Luftfeuchten von 88% bei 20 °C in der Hellphase (14 h) und 100% relative Luftfeuchte und 17 °C in der Dunkelphase (10 h)

2.1.1.3 Mais

Für die Experimente wurden Maispflanzen (*Zea mays* L.) der drei Genotypen mit den Sortenbezeichnungen Helix, Pioneer 3906 und Across 8023 verwandt. Die Karyopsen keimten 3-4 Tage in Petrischalen mit feuchten Vermiculit oder auf Filterpapier in der Dunkelheit bei 25 °C. Anschließend wurden die Keimlinge auf die jeweiligen Anzuchtsysteme (Hydro- oder Nebelkultur) gesetzt. Nach 8-10 Tagen konnten die Primärwurzeln der Pflanzen geerntet werden.

2.1.1.4 Rizinus

Zur Anzucht von *Ricinus communis* L. der Sorte Sanguines wurden die Samen 1 Tag in Leitungswasser gequollen und anschließend im Dunkeln bei 25 °C in feuchten Vermiculit gekeimt. Nach 15-18 Tagen wurden jeweils 4 Keimlinge auf ein Hydrokultursystem gesetzt und die Wurzeln mit Schaumstoff fixiert. Nach 30-33 Tagen konnten die Wurzeln geerntet werden.

2.1.1.5 Ackerbohne

Die Aufzucht der Ackerbohne (*Vicia faba* L. Sorte: Troy) an der Universität Gießen erfolgte nach Oberflächensterilisation der Samen mit 5% NaOCl, und Keimung (7 Tage) auf feuchtem Filterpapier, in einem mit Ausströmersteinen belüfteten Hydrokultursystem. Die Nährlösung (Tab. 2.3) wurde während des Wachstums automatisch auf pH 6.00 (± 0.25) reguliert. Nach dem 1. Tag wurden die Wurzeln mit *Rhizobium leguminosarum* Bakterien vom Stamm 6044 *viceae* (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) inokkuliert. Die Ernte der Sekundärwurzeln und Wurzelknöllchen fand nach 50-55 Tagen Wachstum im Gewächshaus statt.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung für die Hydrokulturanzucht von *Vicia faba* (L.).

	gelöste Substanz	Konzentration [mol/L]
Mikronährstoffe	H ₃ BO ₃	5.00·10 ⁻⁶
	CoCl ₂	0.25·10 ⁻⁶
	CuSO ₄	0.10·10 ⁻⁶
	MnSO ₄	0.25·10 ⁻⁶
	NiSO ₄	0.05·10 ⁻⁷
	Fe(II)EDTA	15.0·10 ⁻⁶
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.25·10 ⁻⁷
	ZnSO ₄	0.25·10 ⁻⁶
Makronährstoffe	CaSO ₄	1.00·10 ⁻³
	KCl	0.10·10 ⁻³
	KH ₂ PO ₄	0.05·10 ⁻³
	K ₂ HPO ₄	0.05·10 ⁻³
	K ₂ SO ₄	0.50·10 ⁻³
	MgSO ₄	0.25·10 ⁻³

2.1.1.6 Kartoffel

Kartoffelpflanzen der Sorte Desirée wurden aus Sprossknollen des Würzburger Wochenmarktes in mit Norm-Erde des Botanischen Gartens Würzburg gefüllten ca. 40 cm Durchmesser messenden Töpfen im Gewächshaus angezogen. Die täglich gewässerten Pflanzen wurden 2x wöchentlich mit Komplettdünger gedüngt. Die Minimal-Temperaturen im Gewächshaus wurden auf 15 °C nachts und 19 °C tagsüber reguliert, zusätzlich wurde mit Natriumdampflampen bestrahlt (ca. 400 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 7-19 Uhr). Die Pflanzen wurden nach 4 Monaten geerntet, wobei Knollen mit einem Durchmesser von 4-8 cm und einer Länge von 4-12 cm für die Experimente Verwendung fanden.

Nach dem sorgfältigen Waschen mit deionisiertem Wasser lagerten die Sprossknollen in dicht schließenden Polyethylengefäßen (PE) auf Aluminiumgittern, bei verschiedenen Luftfeuchten und 25 °C, oder bei Raumluftfeuchte im Dunkeln (Tab. 2.4). Die Einstellung der relativen Luftfeuchten wurde durch verschiedene Wasser/Glycerin Gemische erhalten. Zur Anzucht von Wundperiderm wurde das Kartoffelperiderm direkt nach dem Waschen mit

behandschuhten Händen vollständig abgezogen und Peridermreste unter fließendem deionisiertem Wasser entfernt, anschließend entsprechend Tab. 2.4 in PE-Gefäßen gelagert.

Tab. 2.4: Lagerungsbedingungen für Kartoffelprossknollen und Wundperidermanzucht.

Peridermart	rel. Luftfeuchte [%]	Temperatur [°C]	Wasser/Glycerin [g/g]
Intaktes Periderm	100	25	100/00
	90	25	70/30
	73	25	50/50
	65 ^{a)}	20-23	--
	45	25	25/75
	0 ^{b)}	25	--
Wundperiderm	100	25	--
	65 ^{a)}	20-23	--
	0 ^{b)}	25	100/00

a) Lagerung bei Raumluftfeuchte in einem geschlossenen Schrank, gemessen mit digitalen Hygrometer (Hygromer HP100 A2, Rotronic, Ettlingen, Deutschland); b) ca. 0% rel. Luftfeuchte wurde durch Lagerung über P₄O₁₀ und 2x täglichen Wechsel des Trockenmittels erreicht.

2.1.1.7 Eiche, Buche, Fichte

Feinwurzeln von Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Lieb.), Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) und Rotfichte (*Picea abies* (L.) Karst.) wurden im sandigen Endmoränenboden der Lüneburger Heide (52°45'N, 10°30'E bei Unterlüß) in ca. 40 cm Tiefe geerntet und nach Durchmesser in drei Größenklassen eingeteilt. I) < 0.5 mm; II) 0.5-1.0 mm III) 1.0-2.0 mm. Eine detaillierte Standortbeschreibung findet sich bei Leuschner et. al 2001. Das Alter der Eichen betrug 180-200 Jahre, das der Buchen 90-100 Jahre und das der Fichten 80-100 Jahre (CONERS, 2001).

2.1.1.8 Rohrkolben

Rhizome des Rohrkolbens *Typha glauca* Godr. wurden in einem Sumpfgebiet in Broadway Road Marschland, Wolcott, Cayuga County, Staat New York, USA gesammelt. Die gereinigten und von alten Wurzeln befreiten Rhizome wurden in einer hydroponischen Kultur auf Drahtnetzen in einer Nährlösung kultiviert (25 °C, 14 h; 20 °C, 10 h 75% rel. Luftfeuchte). Neugebildete Wurzeln wurden nach 24-26 Tagen geerntet, neue Rhizomabschnitte nach 35-40 Tagen. Ursprungsrhizom, neues Rhizom und Wurzeln wurden mechanisch in Rhizodermis mit Hypodermis und Endodermis getrennt, wobei ein Teil der Cortezellen und Leitbündel im Gewebe erhalten blieb. Das getrocknete Wurzelmaterial wurde anschließend enzymatisch behandelt weitere Isolationsschritte wurden nicht durchgeführt.

2.1.2 Isolation und Reinigung der Zellwandmaterialien

2.1.2.1 Wurzelmaterial

Zur Vorbereitung auf die analytischen Arbeiten mussten reine Endodermis-, Rhizodermis/Hypodermis- und Xylemzellwände (ECW, RHCW bzw. XV) gewonnen werden. Die Wurzelproben wurden dafür mit Leitungswasser gewaschen und in Stücke von 3 bis 5 cm Länge geschnitten. Der obere, nicht direkt mit Nährlösung in Kontakt gewesene Teil (ca. 1.5 cm) wurde hierbei verworfen, da hier Anatomieänderungen, wie Aerenchymbildung und zusätzliche Zellwandauflagerungen beschrieben wurden (ENSTONE und PETERSON 1998). Die Wurzelabschnitte wurden in eine Cellulase, Pectinase und Hemicellulase (Onozuka R-10 und Macerozym R-10, Serva, Heidelberg, Deutschland) enthaltenden 10^{-2} M Acetatpufferlösung (10.0 mmol L⁻¹ KAc, pH 4.5) vakuumfiltriert und bei 25 °C auf dem Schütteltisch inkubiert. Um das Wachstum von Bakterien und Pilzen zu vermeiden, wurde der Enzymlösung 2.0 mL L⁻¹ einer 1N NaN₃ Lösung zugefügt.

Die Bewegung auf dem Schütteltisch erreichte, dass die Mehrzahl der Seitenwurzeln während der Inkubationszeit abbrach und so die mechanische Isolation vereinfachte. Während der Mazerationszeit von vier bis acht Wochen wurde die Enzymlösung ca. alle 5 Tage ausgewechselt um einen zügigen Verdau der Cortezellen zu erreichen. Anschließend konnten die nicht verdauten endodermalen, rhizo-/hypodermalen Zellwände sowie die Xylemstränge mit Hilfe eines Binokulars (Olympus SZ 30, Olympus, Hamburg) und zweier Präzisionspinzetten voneinander getrennt werden (Abb. 2.1). Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Zellwände des Wurzelcortexes vollständig verdaut waren, Gewebeteile mit nichtverdauten Cortezellen wurden zum vollständigen Abbau zurück in die Enzymlösung gegeben.

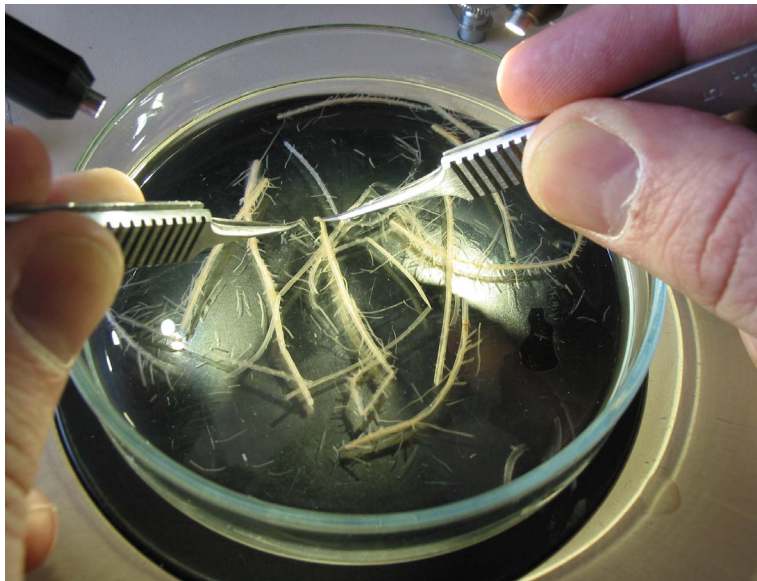


Abb. 2.1: Mechanische Isolation von Mais-RHZW unter dem Binokular mit Präzisions-Pinzetten.

Die Zellwandisolate wurden mit 3×10^{-2} M Boraxlösung ($10.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9.0) und 3x deionisiertem Wasser gewaschen. Eine feine Filtergaze aus Nylon verhinderte Materialverluste beim Waschen. Anschließend wurden die Isolate bei 60°C im Wärmeschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und über P_4O_{10} im Exsikkator aufbewahrt.

2.1.2.2 Ermittlung der Bezugsgrößen

Für die Depolymerisierungsreaktionen wurde das Trockengewicht der verwendeten Gewebe bestimmt. Nach Möglichkeit wurde bei der Isolation der Zellwände versucht, von Wurzelstücken mit genau definierter Länge die kompletten Gewebestrukturen von RHZW und EZW zu isolieren und separat zu trocknen. Nach der Trockengewichtsbestimmung dieser Wurzelabschnitte, war es möglich, ein Längenäquivalent für die in den Reaktionen verwandten Trockengewichte der untersuchten Wurzelgewebe anzugeben. Durch die Lichtmikroskopische Ermittlung der Radien der isolierten Gewebe und unter der Annahme einer zylindrischen Anatomie, konnte die Oberfläche der isolierten Gewebe berechnet werden. Ein Oberflächenbezug zum Trockengewicht der analysierten Gewebe ist für die Diskussion der Funktion apoplastischer Barrieren notwendig. Aufgrund der anatomischen Besonderheiten konnte für die Knöllchen von *V. faba* kein Oberflächenbezug hergestellt werden, die Ergebnisse der Analysen für *T. glauca* beziehen sich ebenfalls nur auf das Trockengewicht. Die Wurzeloberfläche der einzelnen Fraktionen der Baumwurzeln wurde mittels eines digitalen Bildauswertungssystem (WinRhizo, Régent, Quebec, Kanada) ermittelt in Göttingen ermittelt.

Die Oberflächen der Wurzeln bei Experimenten zur Ionenaufnahme wurden wie folgt bestimmt: Die Wurzel wurde zur Kontrasterhöhung mit gesättigter Kristallviolettlösung (Hexa-*N*-methylparafuchsinchlorid, Fluka) blauviolett eingefärbt und mit einem elektronischen Bildabtaster (Scan Jet 6100C, Hewlett Packard) digitalisiert. Mittels eines Bildauswertungsprogrammes (Adobe Photoshop Version 6.0, Adobe Systems Incorporate, Minnesota, USA) wurden die Projektionsflächen der Wurzeln nach drei verschiedenen Durchmesserklassen sortiert, bestimmt. Unter der Annahme, dass die Wurzeln zylindrische Körper darstellen, wurde für jede Durchmesserklasse die Projektionsfläche eines zylindrischen Körpers mit bekannter Oberfläche ermittelt. Mit dem daraus berechneten Faktor für die Anzahl Bildpunkte pro cm^2 Oberfläche konnte aus den Projektionsflächen der Wurzeln deren Oberfläche näherungsweise berechnet werden (HARRIS und CAMPBELL, 1989; OTTMANN und TIMM, 1984).

2.1.2.3 Kartoffelperiderm

Zur Gewinnung von Kartoffelperiderm wurde nach dem Waschen mit deionisiertem Wasser und Lagerung bei unterschiedlichen Luftfeuchten mit einem Korkbohrer ($\varnothing 13.0$ und 14.0

mm) ein Stück aus der Sprossknolle herausgestochen. Überflüssiges Cortexgewebe der so gewonnenen Scheibe wurde mit einer Rasierklinge entfernt und die Peridermscheibe wie unter 2.1.2.1 beschriebenen mit Enzymlösung vakuumfiltriert. Für die ca. 2 Wochen dauernde Mazeration wurde die Enzymlösung alle 3 Tage ausgetauscht, und die Aufbewahrungsgefäße aus Glas bei 25 °C verschlossen auf einer Rollbank gerollt. Intaktes Kartoffelperiderm wurde jeweils am Erntetag, und an mehreren darauf folgenden Tagen gewonnen (Tag 1, 3, 7, 14, 21, 28, 30). Nach dem Verdau des Cortexgewebes wurden die verbleibenden Peridermscheiben mit 3×10^{-2} M Boraxlösung ($10.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9.0) und 3x deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Scheiben mithilfe einer Federstahlpinzette auf Teflonfolie überführt und bei 60 °C zur Gewichtskonstanz getrocknet und über P_4O_{10} im Exsikkator bis zur weiteren Verwendung gelagert. Sorgfältig wurde darauf geachtet, die Peridermscheiben im trockenen Zustand nicht zu knicken oder zu verletzen, da sie sonst für Diffusionsmessungen unbrauchbar würden.

Wundperiderm der Knolle konnte über das oben beschriebene Verfahren isoliert werden, jedoch war es, mit Ausnahme der bei 0% Luftfeuchte gelagerten Kartoffelknollen, erst ab dem dritten Tag nach der Ernte möglich ausreichend Material für die Analysen zu gewinnen.

2.2 Mikroskopische Untersuchungen

Um die anatomischen Gegebenheiten der Barrieregewebe zu untersuchen wurden licht- und elektronenmikroskopische Verfahren angewendet. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden, in Würzburg und Bonn angefertigt, elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Universität Bonn durchgeführt.

2.2.1 Lichtmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Analysen des Zellwandmaterials wurden mit einem Axioplan Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Als im UV emittierende Lichtquelle stand eine Quecksilberdampf Lampe (HBO 50 W, Osram, Deutschland) zur Verfügung, deren Spektrum durch vier verschiedene Filtersätze (Zeiss) zu Anregungswellenlängen von 365, 395-440, 450-490 und 546 nm selektiv ausgewählt werden konnte. Durch die parallel verwendeten Long-Pass-Filter wurden Fluoreszenzwellenlängen ab 397, 470, 520 bzw. 590 nm durchgelassen. Die gewonnen Bilder wurden entweder mit einer digitalen Videokamera (XC 003, Sony, Tokyo, Japan) mit Bildaufzeichnungssystem (Seescan, Intas, Göttingen, Deutschland) oder einer digitalen Kamera (DXM1200, Nikon, Tokyo Japan) aufgezeichnet.

Zur Probenvorbereitung wurden 5-10 mm lange Wurzelstücke für 48 h in einer Lösung von 4% Paraformaldehyd in PBS-Puffer (10 mM, Phosphat Buffered Saline, Sigma PBS Tablett, pH 7.2) fixiert. Anschließend auf einen Objektisch von Einbettmedium (Gefriermedium

358100, Microm Laborgeräte, Walldorf, Deutschland) umgeben, und darin mittels einer Gefriervorrichtung des Kryomikrotoms (Cryostat H 500 M, Microm) auf $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Mit Hilfe des Kryomikrotoms wurden $14\text{-}18\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte der Wurzelproben bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt. Die Schnitte wurden für histochemische Analysen direkt auf den warmen (ca. $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) Glasobjektträger aufgebracht, oder für Fluoreszenzanalysen in, auf dem Objektträger haftende Tropfen eines Glycerin/Wasser (1:1) Gemisches eingebettet.

2.2.1.1 Färbung mit Sudan III

Eine Lösung des lipophilen Farbstoffes Sudan III (Abb. 2.2, Merck) in 92% Ethanol wurde nach GERLACH (1984) 1:1 mit Glycerin (w.f. Fluka) gemischt, und einige Tropfen dieser Mischung auf die auf einem Objektträger befindlichen Dünnschnitte gegeben. Nach dem Erhitzen für ca. 0.5 min. auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Heizplatte) wurde 2x mit Glycerin/Wasser (1:1) gewaschen.

Färbungen von lipophilen Zellwandbestandteilen mit Sudan III erschienen im Durchlichtmikroskop intensiv rot.

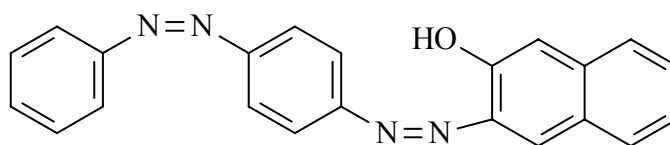


Abb. 2.2: Strukturformel von Sudan III, 1-[[4-(phenylazo)phenyl]azo]-2-Naphthalenol.

2.2.1.2 Färbung mit Fluorol Yellow 088

Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff Fluorol Yellow 088 (FY; Abb. 2.3, Sigma) wurde nach einer veränderten Vorschrift von BRUNDRETT *et al.* (1991) angewendet. Eine Lösung von ca. 5% Farbstoff in 92% Ethanol wurde 1:1 mit Glycerin gemischt. Die mikroskopischen Dünnschnitte wurden auf dem Objektträger mit einigen Tropfen der Farbstofflösung benetzt und ca. 15 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Objektträger ca. 0.5 min. auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Heizplatte) erhitzt und die Schnitte mit 2x Glycerin/Wasser (1:1) gewaschen. Bei Einlagerung in lipophile Zellwandbestandteile und einer Anregungswellenlänge von $395\text{-}440\text{ nm}$ emittieren mit dem Farbstoff gefärbte Zellwände ein leuchtend gelbes Fluoreszenzlicht.

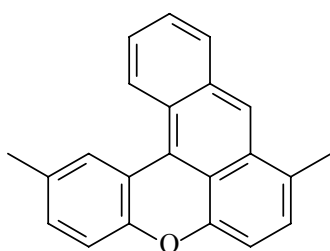


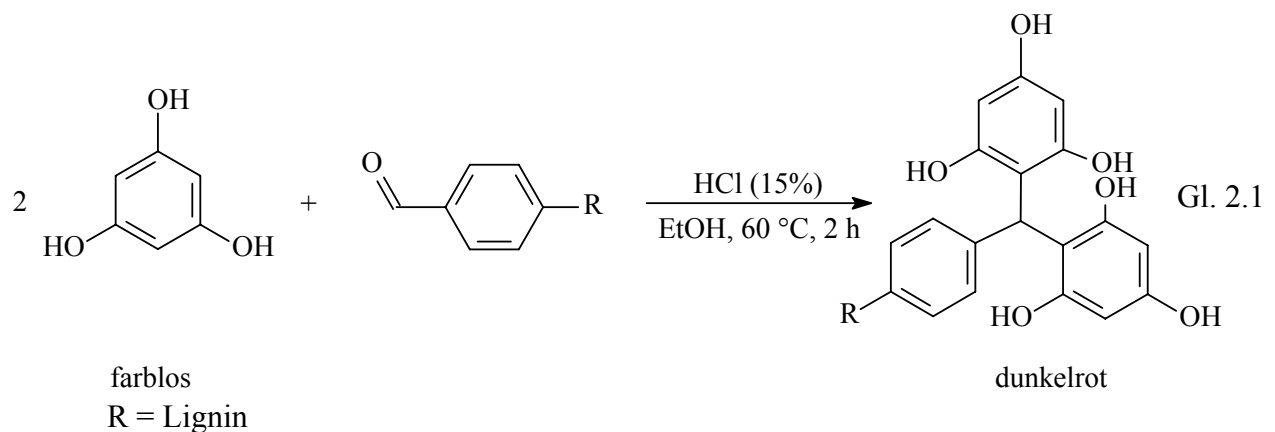
Abb. 2.3: Strukturformel Fluorol Yellow 088, 2,8-dimethylnaphthol[3,2,1-kl]Xanthen

2.2.1.2.1 Färbung mit Fluorol-Yellow und Kristallviolett

Analog zu den Methoden in BRUNDRETT *et al.* (1988) wurde eine partielle Fluoreszenzlöschung der Fluorol Yellow 088 Färbung mit Kristallviolett (Hexa-*N*-methylparafuchsinchlorid, Fluka) durchgeführt. Die analog zu 2.2.1.2 gefärbten Wurzelquerschnitte wurden anschließend 5 min mit einer 0.05 % Lösung von Kristallviolett in Wasser inkubiert, sorgfältig gewaschen und in Glycerin/Wasser (1:1) aufgenommen.

2.2.1.3 Färbereaktion mit Phloroglucin/Salzsäure

Zum Nachweis von Lignin wurde die Färbereaktion mit Phloroglucin/Salzsäure nach GERLACH (1984) verwendet. Eine gesättigte Lösung von Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol) (Fluka) in 92% Ethanol wurde auf die Pflanzenschnitte getropft und nach ca. 5 min. Einwirkzeit bei Raumtemperatur ein Tropfen 6 N HCl dazugegeben. Nach dem Waschen mit Glycerin/Wasser (1:1) konnten lignifizierte Gewebebestandteile an ihrer rotviolettten Färbung identifiziert werden, die eine Folge der HCl katalysierten Reaktion von Phloroglucin mit Aldehydfunktionen des Lignins ist (Gl. 2.1, SEELKOPF *et al.*, 1952).



2.2.1.4 Färbung mit Berberinchlorid/Anilinblau

Zur Identifizierung von CASPARYSchen Streifen wurde von BRUNDRETT *et al.* (1988) eine Färbesequenz mit dem lipophilen Farbstoff Berberinsulfat (**1**) (Sigma) und Gegenfärbung mit Anilinblau (**2**) (Fluka) vorgeschlagen (Abb. 2.4). Die Färbung der Wurzelquerschnitte erfolgte durch Inkubation von jeweils 1 h in 0.1% Berberinchlorid in Wasser und 0.5% Anilinblau in Wasser. Zwischen den Färbegängen wurde mit Wasser gespült. Um eine stabile Fluoreszenz zu erhalten, wurden die Querschnitte in 0.1% FeCl₃ in Glycerin/Wasser (1:1) aufgenommen und bei 365 nm Anregungswellenlänge untersucht.

Der Mechanismus dieser Färbung/Gegenfärbung ist bislang nicht wirklich verstanden, sind CASPARYSche Streifen vorhanden, so zeigten sie und andere lipophile Zellwandstrukturen eine gelb-grüne Fluoreszenz, lignifizierte und nicht lipophile Strukturen emittieren eine schwach-blaue Fluoreszenz. Die Methode wurde bislang erfolgreich an zahlreichen

Pflanzenarten angewandt (PEIRSON und DUMBROFF 1969, MOON *et al.*, 1983, WILSON und PETERSON 1983, BRUNDRETT *et al.*, 1988, PETERSON, 1992).

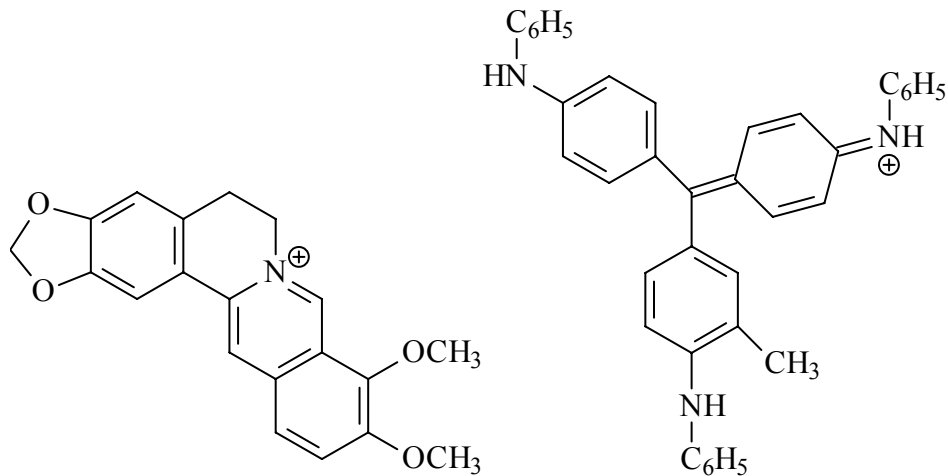


Abb. 2.4: Strukturformeln von Berberin (1) und Anilinblau (2), Gegenionen sind nicht abgebildet.

Das lipophilere Berberin lagert sich in die suberinhaltigen Gewebe ein, und färbt diese intensiv. Die hydrophilere Substanz Anilinblau lagert sich vermutlich anschließend nur an solche Bereiche an, die geringere Mengen Suberin enthalten, also hydrophiler sind, und löscht dort die Fluoreszenz des Berberins. Wo sich kein Anilinblau anlagern kann, ist die Fluoreszenz des Berberins weiterhin gut sichtbar, dies sind vermutlich die Orte höherer Suberinkonzentration (z.B. CASPARY-Streifen).

2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (REM) wurden enzymatisch isolierte Pflanzenteile in 2.5% Glutaraldehyd Lösung in PIPES Puffer (50 mM, Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure), Merck, Darmstadt, Deutschland, pH 7.2) fixiert. Zur Vorbereitung auf eine Kritischpunkt-Trocknung bei -80 °C (CPD 020, Balzers Union, Wiesbaden, Deutschland), wurde in einer Methanol-Wasserserie entwässert. Die getrockneten Proben wurden mit doppelseitigen Klebeband (Tesafix, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) auf Probenteller aus Aluminium befestigt und mit einer Goldschicht von ca. 25 nm Dicke beschichtet (SCD 040, Balzers Union). Anschließend wurden die Proben im Rasterelektronenmikroskop (LEO 440i, Leica, Bensheim, Deutschland) untersucht und die erhaltenen Oberflächenstrukturen digital aufgezeichnet

2.3 Untersuchung von Zellwandextrakten

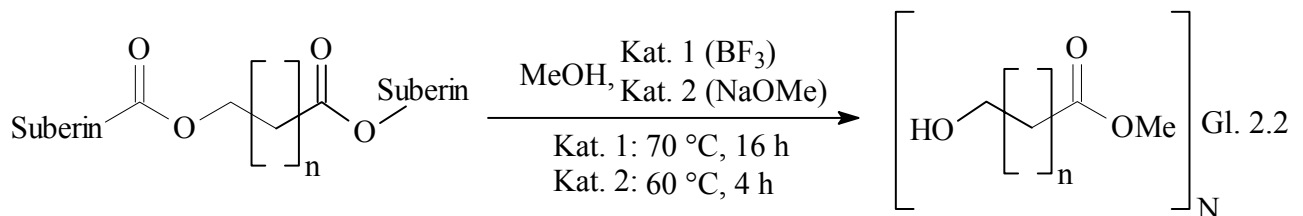
Alle isolierten Zellwandproben wurden nach dem Waschen mit Wasser und anschließendem Trocknen einer Lösungsmittelextraktion unterworfen, um lösliche Zellwandkomponenten

oder anhaftende Substanzen (z.B.: aliphatische Wachskomponenten, Triterpene, Steroide) zu entfernen. Hierzu wurden die Proben in geeignete Glasflaschen eingewogen (5-20 mL Fassungsvermögen abhängig von der Probenmenge) und mit einer entsprechenden Menge MeOH/CHCl₃ (1:1) versetzt. Das mit einer Teflondichtung verschlossene Gefäß wurde anschließend ca. 24 h bei 60 °C gelagert und regelmäßig geschüttelt. Das noch warme Lösungsmittelgemisch wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und durch frisches Lösungsmittelgemisch ersetzt. Nach 3 h bei Raumtemperatur auf einer Rollbank, wurden die zweite Lösungsmittelfraktion mit der Ersten vereinigt, 20 µg (59.1 nmol) Tetracosan (Sigma) als interner Standard für die Gaschromatographie gelöst in einer Standardlösung (0.20 g L⁻¹; 59.1 mmol L⁻¹ CHCl₃) hinzugefügt, und auf dem Heizblock (Pierce, Rockford, IL, USA) im leichten Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockne eingedampft. Das extrahierte Zellwandmaterial wurde auf Teflonfolie im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet und mit den getrockneten Lösungsmittelextrakten bis zur weiteren Verwendung im Exsikkator über P₄O₁₀ gelagert.

2.4 Depolymerisationsreaktionen

2.4.1 Suberinabbaureaktionen

Das Suberin-Polyester besteht aus miteinander veresterten Alkoholen, gesättigten und ungesättigten Monocarbonsäuren, ω-Hydroxysäuren, α,ω-Disäuren, 2-Hydroxysäuren und aromatischen Zimtsäurederivaten wie Ferulasäure, Cumarsäure oder Kaffeesäure. Um die Monomeren zu erhalten wurde das Zellwandmaterial mit Methanol umgeestert. Gleichung 2.2 zeigt exemplarisch die Umesterung eines ω-OH-Säureesters aus dem Polymer. Hierbei wurden zwei verschiedene Katalysatoren eingesetzt, in der Mehrzahl der Untersuchungen Bortrifluorid (Kat. 1) (SCHREIBER *et al.*, 1994) als Lewis-sauren Katalysator, sowie Natriummethanolat (Kat. 2) (GRAÇA und PEREIRA, 1997) als basischen Katalysator.



Der Vorteil der Umesterung mit Natriummethanolat ist eine vereinfachte, nichtwässrige Aufarbeitung (2.4.1.2), welche die quantitative Bestimmung von Glycerin direkt in den Umesterungsprodukten ermöglicht (GRAÇA und PEREIRA, 1997).

Eine nahezu quantitative Umesterung des Suberins mit dieser Methode konnte mittels IR-Spektroskopie gezeigt werden (Abb. 2.8), Charakteristische Banden im Wellenzahlenbereich der Ester und Methylenschwingungen fehlten im umgeesterten Material.

2.4.1.1 Umesterungsreaktion mit Bortrifluorid

0.5-1.5 mg der extrahierten Zellwandisolate wurden in einem 1 mL Reaktionsgefäß mit 1 mL 10% BF₃ in Methanol (1.47 µmol, Fluka) versetzt und mit einem Teflon-gedichteten Schraubverschluss fest verschlossen. Nach dem Erhitzen auf 70 °C über 16 h wurde die Reaktionslösung auf 2.00 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben, 20 µg (44.3 µmol) Dotriacontan als internen Standard für die Gaschromatographie hinzugefügt (100 µL aus einer Standardlösung von 20 µg/100µL CHCl₃) und mit 3x1 mL CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1x2 mL Wasser gewaschen und über w.f. Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom bis auf ca. 50 µL eingengt und die Probe bis zur weiteren Verwendung verschlossen bei -18 °C gelagert.

Zum Nachweis von Glycerin wurden die vereinigten wässrigen Phasen bei 60 °C im Trockenschrank eingedampft, und der Rückstand mit 3x2 mL CHCl₃/MeOH (1:1) extrahiert. Nach der Lösungsmittelveaporation auf ca. 50 µL konnte der Extrakt bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.4.1.2 Umesterungsreaktion mit Natriummethanolat

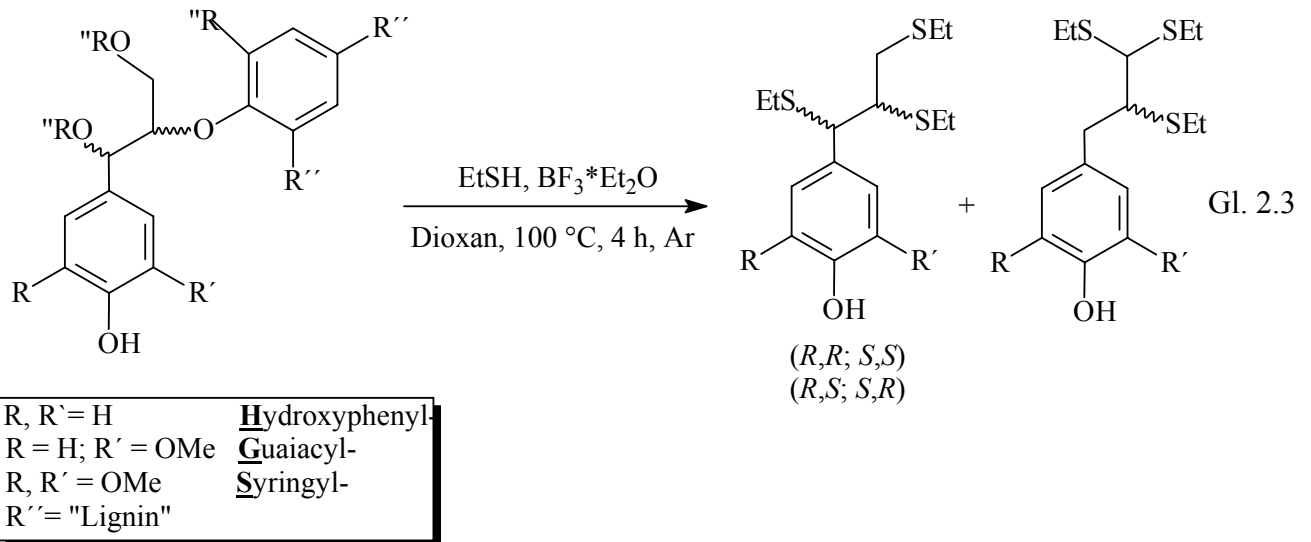
Zur Basenkatalysierten Umesterung mit Methanol wurden 0.5-1.5 mg Zellwandisolat mit 1.0 mL einer frisch zubereiteten Lösung aus 5.00 mg (0.22 mmol) Natrium in 10.0 mL Methanol (w.f.) versetzt und 3 h auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen, wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt, und der Rückstand mit 2x0.5 mL wasserfreien Methanol gewaschen. Die vereinigten Lösungsmittelextrakte wurden im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und gut verschlossen bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert.

2.4.2 Ligninabbaureaktion

2.4.2.1 Thioacidolyse

Das Ethanthiol-Reagenz (LAPIERRE *et al.*, 1986; ROLANDO *et al.*, 1992) wurde jeweils frisch angesetzt. Aus praktischen Gründen für ca. 9 Ansätze ausreichend. Im mehrfach ausgeheizten und mit Argon (Reinheit: 5.0, Messer Griesheim, Deutschland) belüfteten Druck-Schlenk-Rohr wurden in 3.50 mL w.f. Dioxan (Merck) unter Rühren 1.60 mL (25.8 µmol) Ethanthiol (Fluka) und 0.40 mL 46% BF₃ in Diethylether (Merck) gelöst.

Das Zellwandisolat wurde im Druck-Schlenk-Rohr mehrfach ausgeheizt und mit Argon belüftet. Anschließend wurden 1.10 mL w.f. Dioxan zugegeben und die Suspension mit 0.60 mL des Ethanthiol-Reagenz im Argon-Gegenstrom versetzt. Das mit einer Teflondichtung versehene Druck-Schlenk-Rohr wurde fest verschlossen und unter Rühren 4 h auf 100 °C erhitzt (Gl. 2.3).



Nach dem Abkühlen auf Eis, wurden die Reaktionslösung mit 2.00 mL Wasser versetzt und 20 µg (44.3 µmol) Dotriacontan als internen Standard für die Gaschromatographie zugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit mindestens 3x2 mL Trichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1x2 mL Wasser gewaschen und über w.f. Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom bis auf ca. 50 µL eingengt.

Mechanistisch stellt man sich diese Reaktion als eine säurekatalysierte Umetherung der Aryl und Alkyl-Ether des Lignins zu Thioethern vor (Abb. 2.5). Das BF₃ polarisiert den Sauerstoff der Ether Bindung und ermöglicht den Angriff auf die labilste Sauerstoff-Kohlenstoff Bindung am α-C-Atom. Der Sauerstoff wird dann durch das weiche Schwefel-Nukleophil Ethanthiol substituiert (GRABBER *et al.*, 1996), anschließend wird am intermediären Kation des β-Kohlenstoffes erneut substituiert. Als Hauptprodukt entsteht der Trithioether in einem Diastereomerengemisch von 1:1 *R,R;S,S* oder *R,S;S,R*.

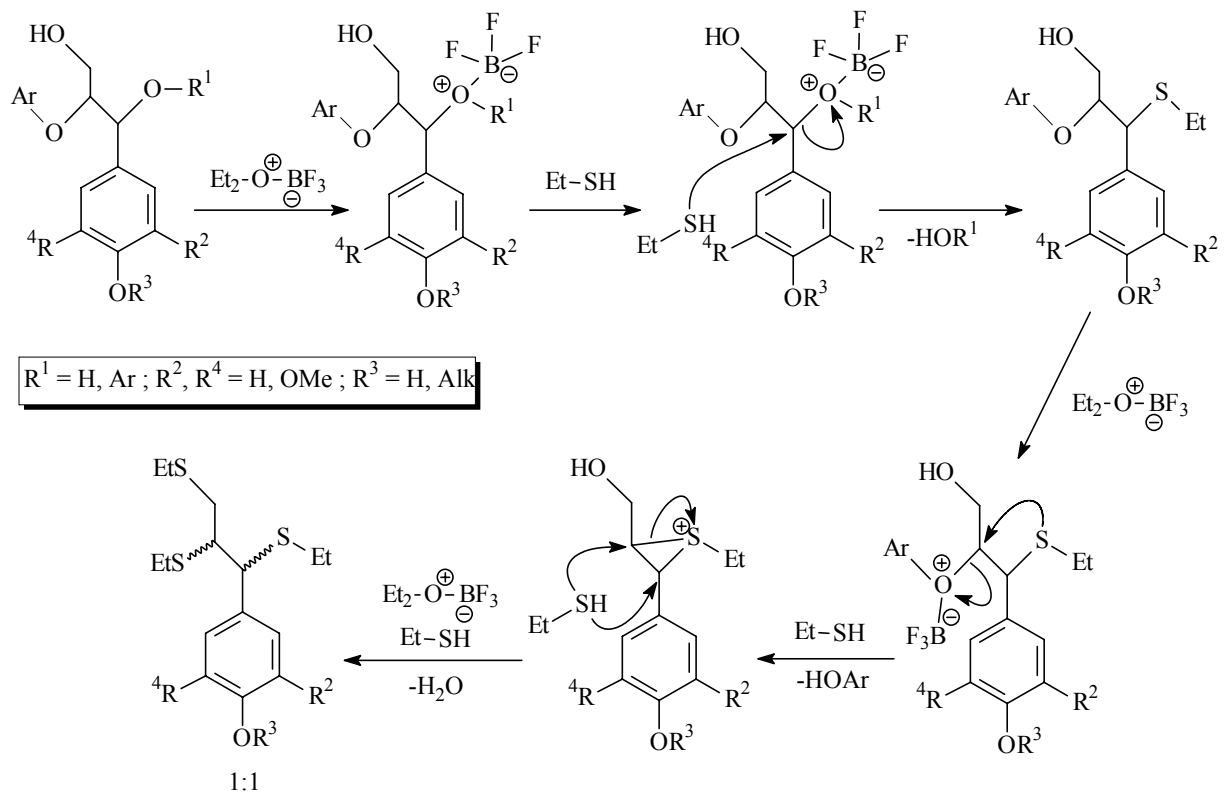


Abb. 2.5: Reaktionsmechanismus der Thioacidolyse.

Dieser Reaktion waren auch die über Ether und glycosidischen Bindungen verknüpften Kohlenhydratpolymere unterworfen, was im Chromatogramm (Abb. 2.7) durch zusätzliche starke Signale deutlich sichtbar wurde.

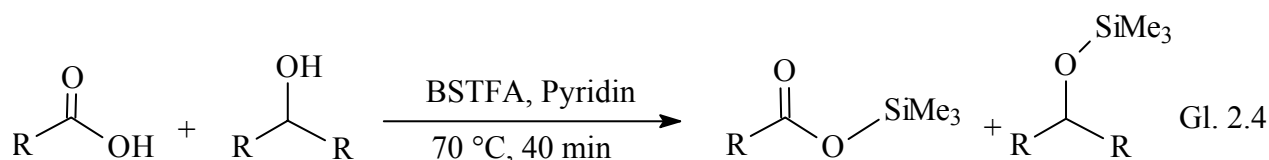
Der Ligninabbau mittels Thioacidolyse ist nicht quantitativ möglich, durch eine Entschwefelungsreaktion mit RANEY-Nickel (LAPIERRE *et al.*, 1991; ZEIER *et al.*, 1999a) ließen sich zusätzlich Dimere Reaktionsprodukte feststellen. Es wird in der Regel davon ausgegangen, dass lediglich 20-40% des vorhandenen Lignins mit dieser Methode erfasst werden können (BERNARDS, 2002), die Monomerenverteilung lässt sich mit dieser Methode jedoch sehr gut erfassen.

2.5 Chemisch/physikalische Analytik

2.5.1 Gaschromatographie

Um die Flüchtigkeit und Trennbarkeit gelöster Extrakte oder der Abbauprodukte aus den Depolymerisationsreaktionen für die Gaschromatographie (GC) zu erhöhen, und ihre Reaktivität mit der Säulenbeschichtung zu verringern, wurde der Rückstand der Abbaureaktionen in 20 μL w.f. Pyridin (Merck) aufgenommen, und zur Trimethylsilylierung freier Hydroxy- und Carboxyfunktionen 20 μL (19.5 μg , 75.6 nmol) BSTFA (*N,O*-

Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, Macherey-Nagel, Darmstadt) zugegeben. Das mit Schraubdeckel und einer Teflondichtung verschlossene Reaktionsgefäß wurde anschließend 40 min auf 70 °C erhitzt (Gl. 2.4). Zur weiteren Verwendung wurde die Reaktionslösung auf 200 µL mit CHCl₃ verdünnt.



1 µL der trimethylsilylierten Proben wurden zur gaschromatographischen Trennung direkt auf die Kapillarsäule (DB-1, Fused-Silica, Länge 30 m, Innendurchmesser 0.32 mm Filmschichtdicke 0.10 µm aus 100% Polymetylsiloxan, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) eines druck- und temperaturgesteuerten Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5890 Series II, CA, USA) mittels einer Kapillarspritze gegeben (*on column*-Injektion). Die quantitative Analyse der getrennten Substanzen erfolgte durch einen Flammenionisationsdetektor (FID), als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Die Detektorsignale (in mA) wurden digitalisiert und von einem Computer aufgezeichnet. Mit Hilfe eines im Auswertungsprogramm (GC/FID: HP-Chemstation, GC/MS: Version A.06.03 [273]) vorhandenen Integrationsalgorithmus konnten die Flächen der Einzelsubstanzsignale berechnet werden und so die Stoffmengen in Relation zur Fläche des internen Standardsignales (Dotriacontan oder Tetracosan) ermittelt werden (Gl. 2.5).

$$\frac{A_{\text{ST}}}{A_{\text{SU}}} \cdot \frac{m_{\text{ST}}}{m\text{A}} = m \quad \text{Gl. 2.5}$$

Mit: A_{ST} = Fläche des Standard-Signales im Gaschromatogramm [m²]
 A_{SU} = Fläche des Substanz-Signales im Gaschromatogramm [m²]
 m_{ST} = zugegebene Stoffmenge/Masse der Standardsubstanz [nmol];[g]
 m = Stoffmenge/Masse Substanz pro Bezugsgröße [nmol m⁻²];[nmol g⁻¹];[µg g⁻¹];[µg m⁻²]
 $m\text{A}$ = Einwaage bzw. berechnete Oberfläche des Zellwandmaterials [g];[m⁻²]

Für die Berechnung der Stoffmengen wurden die Molmassen der derivatisierten jeweiligen Monomere verwendet.

Für die Berechnung mittlerer Kettenlängen wurde die ermittelte Stoffmenge einer Substanz mit der Kettenlänge des jeweiligen Moleküls multipliziert. Die Summe dieses Wertes aller Substanzen in dieser Substanzklasse wurde gebildet. Das Ergebnis wurde durch die Summe der Gesamt-Stoffmenge dieser Substanzklasse geteilt.

Konnektivitäten des Suberin-Polymers wurden aus der Differenz der Summe der Stoffmengen von Carboxygruppen zu Hydroxygruppen berechnet.

Die Druck und Temperaturprogramme der GC/FID-Analysen sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Zur Überwachung der Säulenqualität wurde in regelmäßigen Abständen die Signalstärke eines

Triacontansäure Signals mit einem Alkan (Tetracosan) verglichen, bei einem Verhältnis schlechter als 1.3 wurde die Säule abgeschnitten und erneut überprüft.

Tab. 2.5: Druck und Temperaturprogramme GC/FID

	Temperaturprogramm		Druckprogramm	
	T [°C]	t [min]	p [bar]	t [min]
Lösungsmittlextrakte	50	2	50	47
	40/min	4		
	200	1		
	3/min	40		
	320	30	10/min 150 bar	10 10
Umesterungsprodukte	50	2	50	70
	10/min	10		
	150	1		
	3/min	57		
	320	20	10/min 150	10 10
Thioacidolyseprodukte	160	2	50	35
	3/min	23		
	230	1	10/min	10
	10/min	9		
	320	20	150	10

2.5.1.1 Gaschromatogramm von Suberinmonomeren

Die derivatisierten Suberinmonomeren konnten durch die gewählten Druck und Temperaturprogramme sehr gut getrennt werden. Abb. 2.6 zeigt ein typisches Chromatogramm einer BF_3 -Methanol-Umesterung eines Endodermisisolates von Mais. Besonders markiert ist in dieser Abbildung eine homologe Reihe von ω -Hydroxysäuren (hohle Pfeile) und die ungesättigten C-18 ω -OH-Säuren und 1, ω -Disäuren (gefüllte Pfeile). Auffällig ist der hohe Gehalt an *p*-Cumarsäure und Ferulasäure, die als E/Z (=cis/trans)-Isomeren im Chromatogramm erscheinen. Ebenfalls lassen sich Spuren von Glycerin nachweisen, mit der Anwendung der Natriummethanolat-katalysierten Umesterung konnten bei gleicher Retentionszeit die Mengen an dreifach trimethylsilyliertem Glycerin quantitativ nachgewiesen werden.

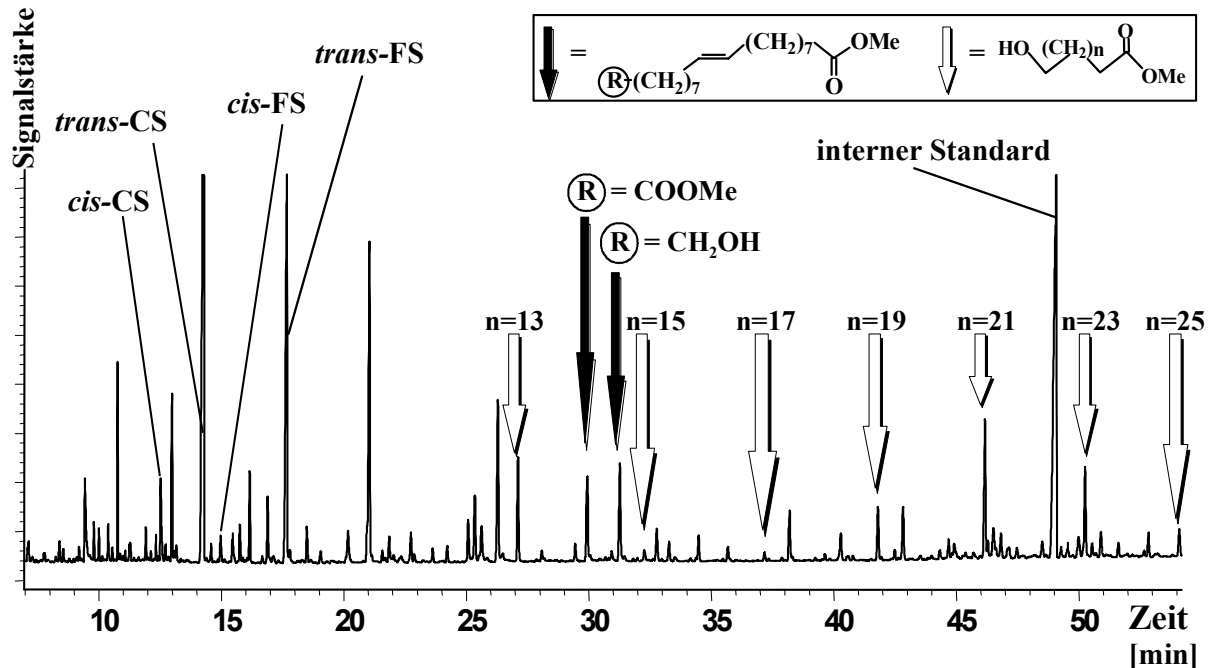


Abb. 2.6: Beispiel-Chromatogramm des CHCl_3 Extraktes einer BF_3 -MeOH Umesterungsreaktion von *Z. mays* (Helix) EZW. Besonders hervorgehoben ist eine homologe Reihe von gesättigten ω -Hydroxysäuren (leere Pfeile) und die C_{18} -ungesättigte Di- und ω -Hydroxysäure (gefüllte Pfeile); CS = Cumarsäure; FS = Ferulasäure, interner Standard = Dotriacontan.

Pro Chromatogramm ließen sich zum Teil über 50 verschiedene Suberinmonomere quantitativ und eindeutig zuordnen.

2.5.1.2 Gaschromatogramm von Ligninmonomeren

Ein typisches Gaschromatogramm der derivatisierten Produkte einer Thioacidolyse von Maiswurzelzellwänden (EZW) zeigt Abb. 2.7. Die Retentionszeiten der drei Hauptmonomeren H, G und S des Lignins unterscheiden sich deutlich. Charakteristische Doppelsignale jeden Monomers, resultierend aus der Bildung von Diastereomeren während der Thioacidolysereaktion (Gl. 2.3), sind deutlich erkennbar. Die Diastereomeren wurden nicht zugeordnet, da eine eindeutige Stereoselektivität der Reaktion nicht festzustellen war. Dominiert wurden die Chromatogramme jedoch von denen mit Stern gekennzeichneten Signalen der Thioester und -ether von Kohlenhydratmonomeren, die nicht genauer zugeordnet wurden. Neben den Doppelsignalen der Diastereomeren Ligninmonomeren fand sich meist noch ein weiteres Signal, meist als Schulter des zweiten Diastereomers. Hierbei handelte es sich um γ -disubstituierte Ligninmonomeren.

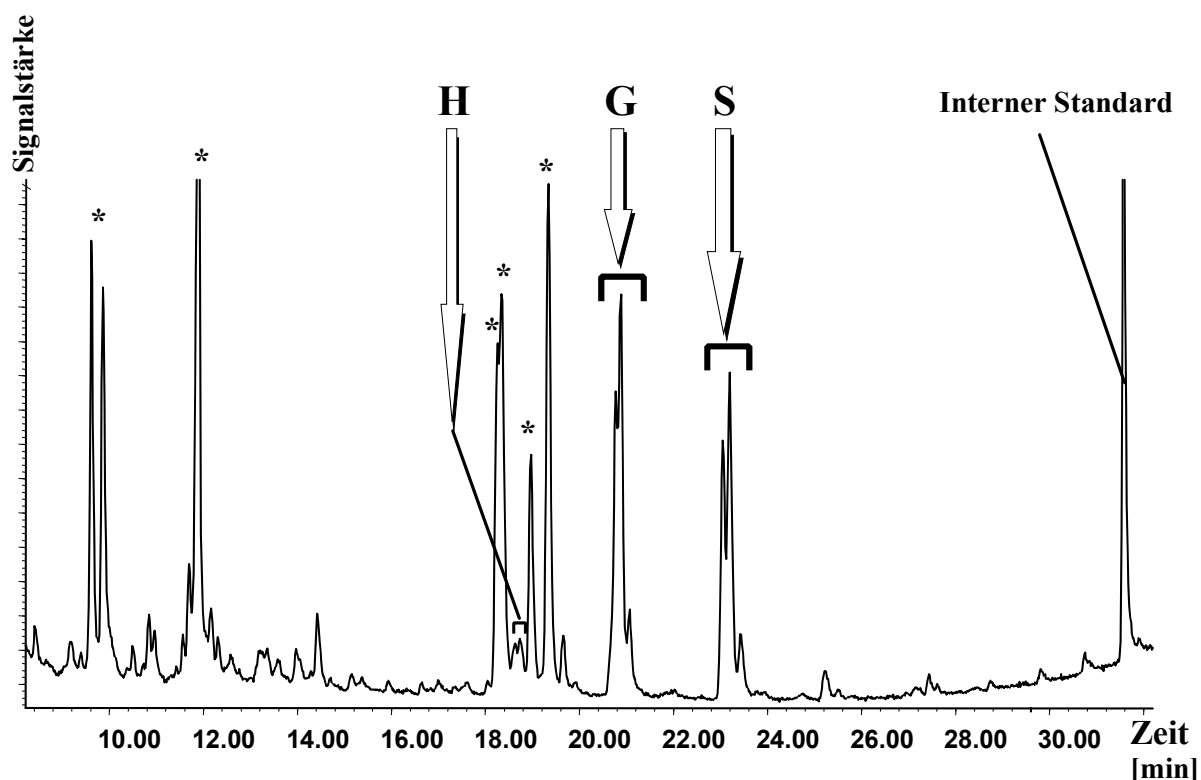


Abb. 2.7: Gaschromatogramm der TMS-derivatisierten Reaktionsprodukte einer Thioacidolyse von *Z. mays* (Helix) EZW. H = Hydroxyphenyl; G = Guaiacyl; S = Siringyl-Monomeren; interner Standard: Dotriacontan; * = Kohlenhydratmonomer.

Das Chromatogramm zeigt, dass die Zusammensetzung des Mais-EZW-Lignins von G und S Monomeren beherrscht wird. In Gymnospermen-Lignin von *picea abies* dominierten H und G-Monomeren.

2.5.2 Massenspektroskopie

Zur qualitativen Analyse wurde ein GC mit angeschlossenen Quadrupol-Massenspektrometer (GC/MS; Hewlett-Packard 5971A) verwendet. 1 μL des gelösten Analyten wurde über eine DB 1 Kapillarsäule (30 m, Innendurchmesser 0.32 mm, 0.10 μm Beschichtung mit 100% Polymethylsiloxan) aufgetrennt und bei 70 eV Beschleunigungsspannung die Massenbereiche von 35 bis 550 U in Intervallen von 1.2 sec. gemessen, und die gewonnenen Spektren auf einem Digitalrechner (Computer) gespeichert. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit einem Auswertungsprogramm (Enhanced ChemStation G1701 AA Version A.03.00, Hewlett Packard) durch den Vergleich der Massenspektren mit Literaturdaten (z.B.: EGLINTON *et al.*, 1968) oder Spektren authentischen Substanz-Proben. Trägergas bei GC/MS Analysen war Helium, daher wurden gegenüber dem GC/FID modifizierte Druck- und Temperaturprogramme verwendet (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Druck und Temperaturprogramme GC/MS.

	Temperaturprogramm		Druckprogramm	
	T [°C]	t [min]	p [bar]	t [min]
Lösungsmittelextrakte	50	2	10	41
	40/min	4		
	200	1		
	3/min	34		
	300	30	10/min	10
		100 bar	10	
Umesterungsprodukte	50	2	10	63
	10/min	10		
	150	1		
	3/min	50		
	300	20	10/min	10
		100	10	
Thioacidolyseprodukte	160	2	10	33
	3/min	23		
	230	1	10/min	10
	10/min	7		
	300	20	100	10

2.5.3 IR-Spektroskopie

Infrarotspektren der isolierten Zellwandgewebe wurden mit einem Fourier-Transform-IR (FTIR, Bio-Rad FTS 165, Biorad, Krefeld) aufgezeichnet und die digitalisierten Daten mit einem Auswertungsprogramm (Win-IR 3.0, Hewlett Packard) auf einem Computer bearbeitet und gespeichert. Die Proben wurden mit KBr (Aldrich) fein vermahlen und mit 10 kt cm⁻² zu Presslingen versintert. Die IR-Absorbtion der KBr-Presslinge wurden in getrockneter Luft (Whatman purge gas generator type 75-45; Balston, Haverhill, Mass., USA) unter standardisierten Bedingungen gemessen (4000-680 cm⁻¹, Auflösung 2 cm⁻¹, 60 Abtastungen). Um eine Vergleichbarkeit der Spektren zu erreichen, wurde eine Mehrfachbasislinienkorrektur durchgeführt, als Fixpunkte wurden die lokalen Minima bei 4000, 3700, 3000, 2700, 2330, 1775, 1700, 1485, 1190, 760 und 680 cm⁻¹ verwendet. Abb. 2.8 zeigt ein typisches IR-Spektrum von Zellwänden 14 Tage alten Kartoffelperiderms, getrocknet, extrahiert und nach einer Umesterungsreaktion.

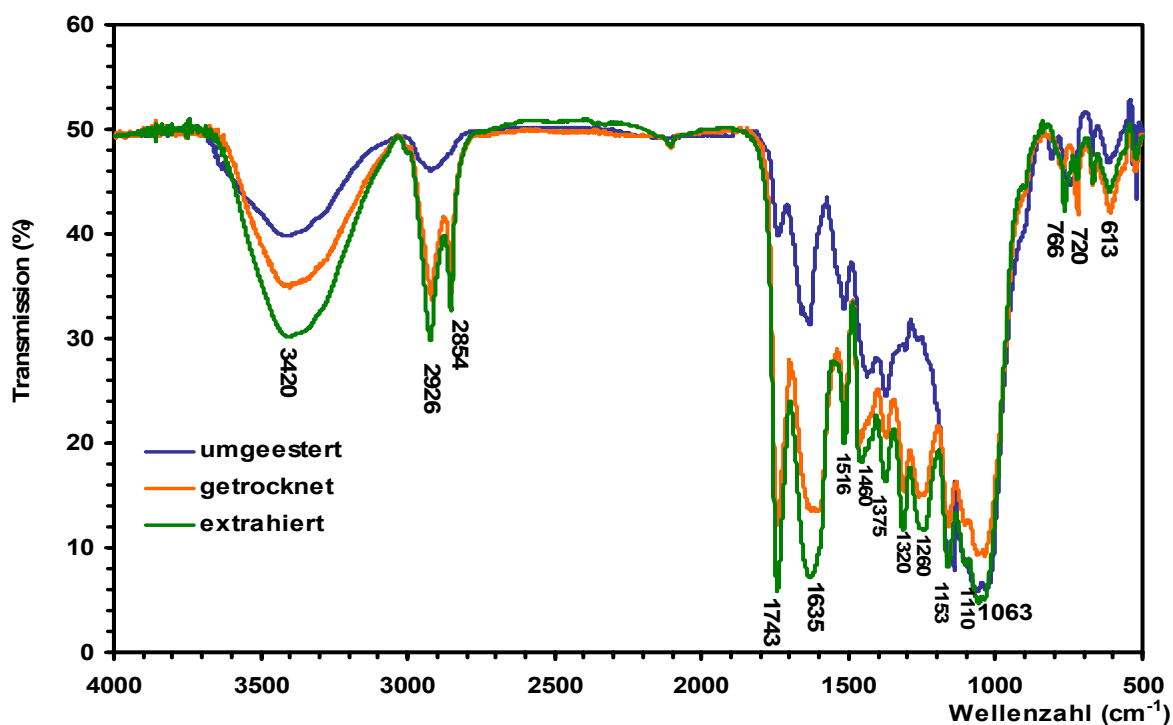


Abb. 2.8: IR-Spektrum (basislinienkorrigiert) von enzymatisch isolierten natürlichen Kartoffelperidermen in KBr am Erntetag, getrocknet (rot), extrahiert (grün) und umgeestert mit BF_3/MeOH (blau); wichtige Schwingungsbanden sind beschriftet.

Deutlich sichtbar war die Intensitätsabnahme im umgeesterten Periderm bei den für Suberintypischen Esterbanden im Bereich von 1700-1800 Wellenzahlen, sowie im Bereich der Methylen-Schwingungsbanden zwischen 2700 und 2900 cm^{-1} . Dies bestätigt die quantitative Umesterung des enthaltenen Suberins. Für Kohlenhydrat-typische Esterbindungen um 1100 Wellenzahlen wurde keine signifikante Änderung nach der Umesterung festgestellt.

2.5.4 ICP-Ionenemissionsspektroanalyse

Für die Analyse des Ionengehaltes von Pflanzenmaterial wurde ein ICP Ionenchromatograph (Jobin Yvon 70 PLUS, Software Version 3.34, Jobin Yvon Instruments S. A. GmbH, Grasbrunn, Deutschland, mit automatischen Probenwechsler Gilson 222) verwendet. Die getrockneten Proben wurden nach dem Trocknen in Teflongefäßen eines Mikro-Dismembrators (Dismembrator II, B. Braun, Melsungen, Deutschland) durch eine Stahlkugel fein zermahlen. 50-100 mg des Pulvers wurden in Quarzglasreagenzgläsern mit 1.0 ml 65% HNO_3 (Suprapur, Merck) bei 10 bar und 160-170 °C aufgeschlossen (10 h) (Apparatur: Seif, Unterschleißheim, Deutschland) und mit 10 ml Reinstwasser (Widerstand: 18.2 M Ω) verdünnt. Zur Analyse der wässrigen Lösung wurde diese automatisiert in einem Argon-Plasma (ICP-OES) zerstäubt (Cross-Flow Zerstäuber), und die entstehenden Spektrallinien qualitativ und quantitativ (nach Kalibrierung durch authentische Standardsubstanzen)

ausgewertet. Von jeder Probe wurden jeweils drei Analysen durchgeführt, und der Mittelwert zur Berechnung der Standardabweichung herangezogen.

2.6 Experimente zur Funktion der Zellwand als Barriere für Stoffflüsse

Die Barriereigenschaften der Zellwand wurden mit direkten und indirekten Methoden untersucht. Direkte Diffusionsmessungen wurden durch Messung von physikalischen Parametern an ganzen Wurzeln oder isolierten Geweben durchgeführt. Indirekte Messungen wurden durch die Messung von Effekten oder Stoffmengen der über die Wurzel aufgenommenen Substanzen in oberirdischen Pflanzenteilen (Blättern und Sprossachsen) durchgeführt.

2.6.1 Diffusion von Wasser durch Kartoffelperiderm

Zur Messung der Wasserpermeabilität isolierter pflanzlicher Membranen wurde ein Transpirationskammersystem entwickelt (SCHÖNHERR und LENDZIAN, 1981; GEYER und SCHÖNHERR, 1990) (Abb. 2.9). Hierbei wird die isolierte Membran über eine mit Wasser gefüllte Edelstahlkammer gespannt und fixiert. Um Undichtigkeiten zu vermeiden werden die Kontaktstellen der Membran mit dem Metall sorgfältig mit Silikonfett (Wacker, Burghausen, Deutschland) abgedichtet.

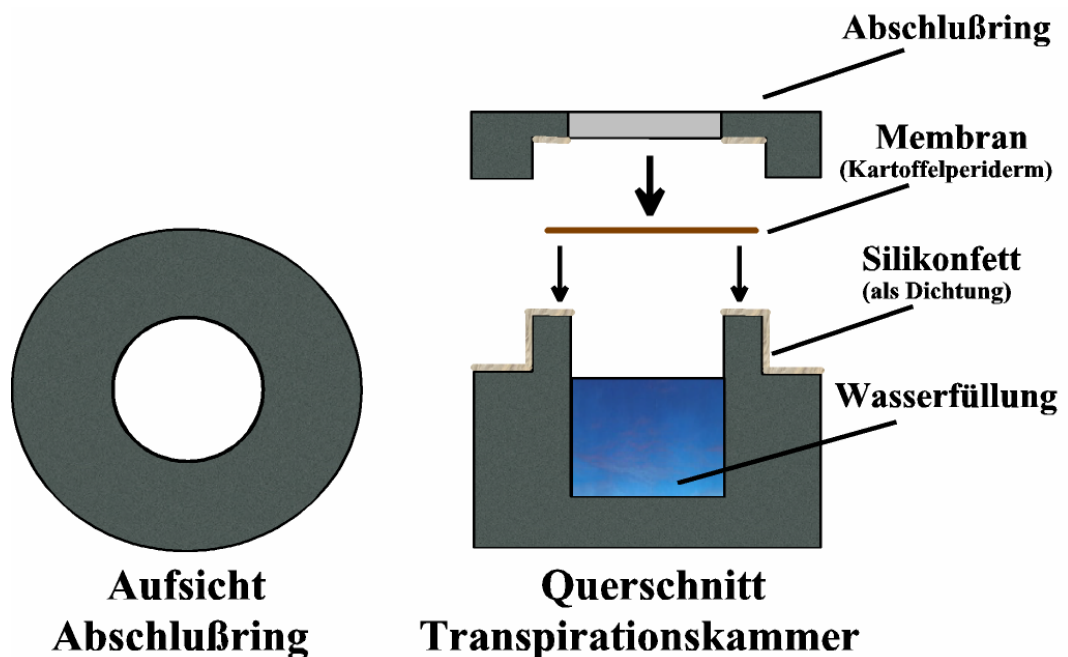


Abb. 2.9 : Transpirationskammer für die Diffusion von Wasser durch isoliertes Kartoffelperiderm.

Angetrieben durch einen Luftfeuchtigkeitsgradienten erfolgt über die Membran ein Materiefluss F (in $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ oder $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). F ist der treibenden Kraft (Δc) proportional, sie entspricht der Differenz zwischen Sender- (*Donor*) und Empfängerkonzentration (*Receiver*). Die Proportionalitätskonstante für die Beziehung (Gl. 2.6)

$$F \approx \Delta c \quad \text{Gl. 2.6}$$

bezeichnet man als Leitwert (P), woraus aus Gl. 2.6, Gl. 2.7 resultiert.

$$F = P \cdot \Delta c \quad \text{Gl. 2.7}$$

Bestimmt man F bei einer konstanten treibenden Kraft Δc so lässt sich mit Gl. 2.8 der Leitwert bei einer bestimmten Temperatur berechnen, wenn man die Fläche A (in m^2) der Membran kennt.

$$P = \frac{F}{A \cdot \Delta c} \quad \text{Gl. 2.8}$$

Da die Konzentration (c) von Wasser über Blaugel praktisch null ist, und die Aktivierungsenergie in Wasser einheitlich, kann man Δc gleichsetzen mit der Dichte von Wasser (δ in $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ oder $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ (GEYER und SCHÖNHERR 1990). Dann wird aus P mit $\delta = 1$ ein systemunabhängiger Wert mit der Dimension $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Die verwendeten Edelstahltranspirationskammern wurden mit $200\ \mu\text{L}$ Wasser befüllt und besaßen nach dem Einbau der Membran eine wasserpermeable Oberfläche von $28,3\cdot 10^{-6}\ \text{m}^2$ (Bohrung des Abschlussringes). Die Kammern wurden bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Klimaschrank, Memmert, Schwabach, Deutschland) in luftdichten Polyethylenboxen auf dem Kopf stehend über Blaugel aufbewahrt. Der Wasserverlust jeder einzelnen Kammer wurde durch regelmäßiges Wiegen auf einer Analysenwaage (SBA 31, ScalTec, Heiligenstadt, Deutschland) ermittelt. Die Gewichtsverluste der Transpirationskammer gegen die Zeit aufgetragen ergeben eine Gerade, deren Steigung gleich dem Fluss F über die Membran ist. Eingesetzt in Gl 2.8 lässt sich somit der Leitwert jeder Membran bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ berechnen.

Der Einbau der Periderme erfolgte unter großer Sorgfalt, um die Entstehung von Rissen oder Löchern zu vermeiden. Ebenso wurde streng darauf geachtet, keine Membranen mit Lentizellen einzubauen, da dies einen Wasserfluss durch gasgefüllte Poren an der suberinisierten Barriere vorbei erlauben würde (VOGT *et al.*, 1983). Abbildung 2.10 zeigt ein typisches Diagramm des Wasserflusses über extrahiertes Kartoffelperiderm und die Standardabweichung von sechs Parallellproben.

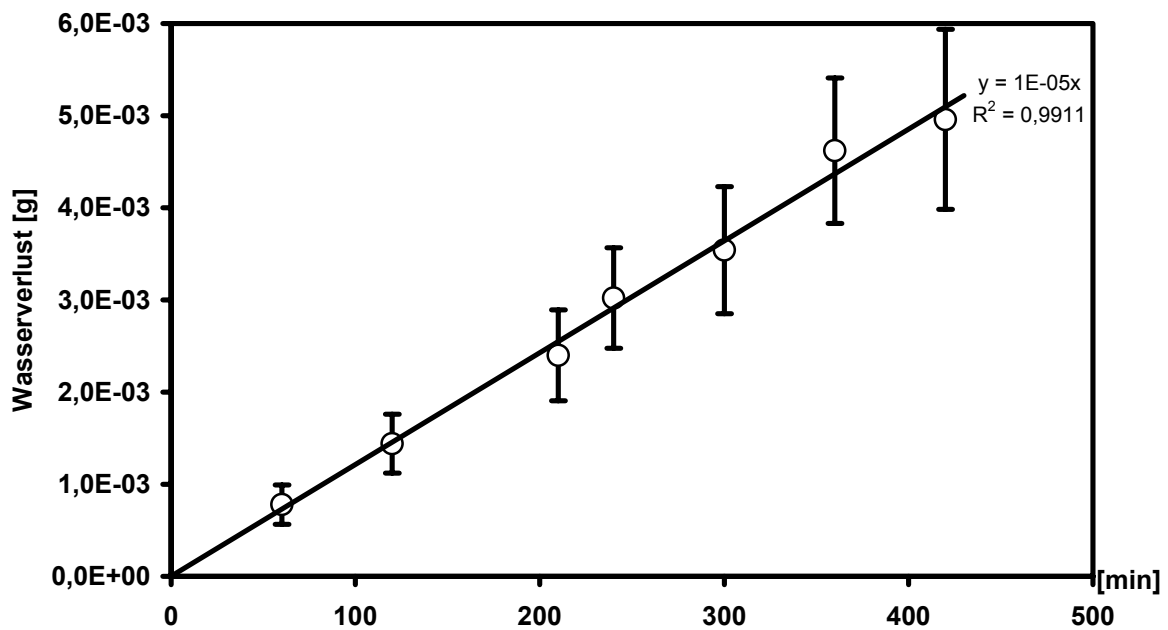


Abb. 2.10: Transpiration von extrahiertem Kartoffelperiderm (Fehlerbalken = StabWN; N=6)

2.6.2 Aufnahme von Rubidium-Ionen durch die Pflanzenwurzel

Die Aufnahme von Rubidium Ionen über das Wurzelsystem wurde durch Zugabe von 302.9 mg (1.80 mmol) Rubidiumchlorid in jedes Hydrokultursystem (mit 1.80 L Nährlösung gefüllt) induziert (Konzentration in der Lösung 1.00 mM RbCl). Für die Versuche wurden acht Tage alte Maispflanzen und 30 Tage alte Rizinuspflanzen verwendet. Die Pflanzen waren zuvor mit unterschiedlichen Nährlösungen zur Induktion oder Reduktion der Suberinisierung angezogen worden (100 μ M Abscisinsäure (ABA); 100 mM NaCl oder ohne NO_3^- -Ionen). Nach Zugabe des RbCl wurden die oberirdischen Pflanzenteile periodisch geerntet und sorgfältig mit deionisiertem Wasser gewaschen. In denselben Zeitabständen wurde die kutikuläre Transpiration mithilfe eines Porometers (AP4, Delta-T Devices, Cambridge, England) bestimmt. Die geernteten Sprosssteile und Blätter wurden in Papiertüten 48 h im Trockenschrank bei 60 °C sowie 48 h über P_4O_{10} und bei Raumtemperatur im Exsikkator zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Sprosssteile für die ICP (siehe 2.5.4) vorbereitet.

Um den apoplastischen Anteil des Rubidium-Ionentransportes durch die Wurzel in den Spross zu bestimmen, wurde versucht Kaliumkanäle der Zellmembranen (welche auch das Rubidiumion transportieren) durch die Zugabe von 1.00, 5.00 10.0 mM CsCl ca. 1 h vor der RbCl-Applikation irreversibel zu blockieren (BECKER *et al.*, 1996; MÜLLER-RÖBER *et al.*, 1995). Anschließend wurden die Pflanzen in bestimmten Zeitabständen geerntet, und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.6.3 Transpirationsmessungen

Messungen der kutikulären Transpiration (stomatäre Leitfähigkeit) wurden mit einem tragbaren Porometer (AP4, Delta-T Devices, Cambridge, England) durchgeführt. Vor jeder Messreihe wurde das Gerät stets neu kalibriert.

2.6.4 Wurzeldruckmessungen

Die Messungen der Wasserleitfähigkeit der gesamten Wurzel wurde mit einer Wurzel-Druckmesssonde nach STEUDLE (1993, STEUDLE *et al.*, 1993) an der Universität Bayreuth durchgeführt (Abb. 2.12). Hierzu wurde das seitenwurzelfreie Endsegment einer Maiswurzel (ca. 108-170 mm Länge, \varnothing 0.65-1.10 mm) in einen Probenkopf eingespannt und sorgfältig mit Silicon (Xantopren, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) abgedichtet. Die Wurzel wurde zur Messung mit Nährlösung umspült um ungerührte Schichten an der Oberfläche zu vermeiden.

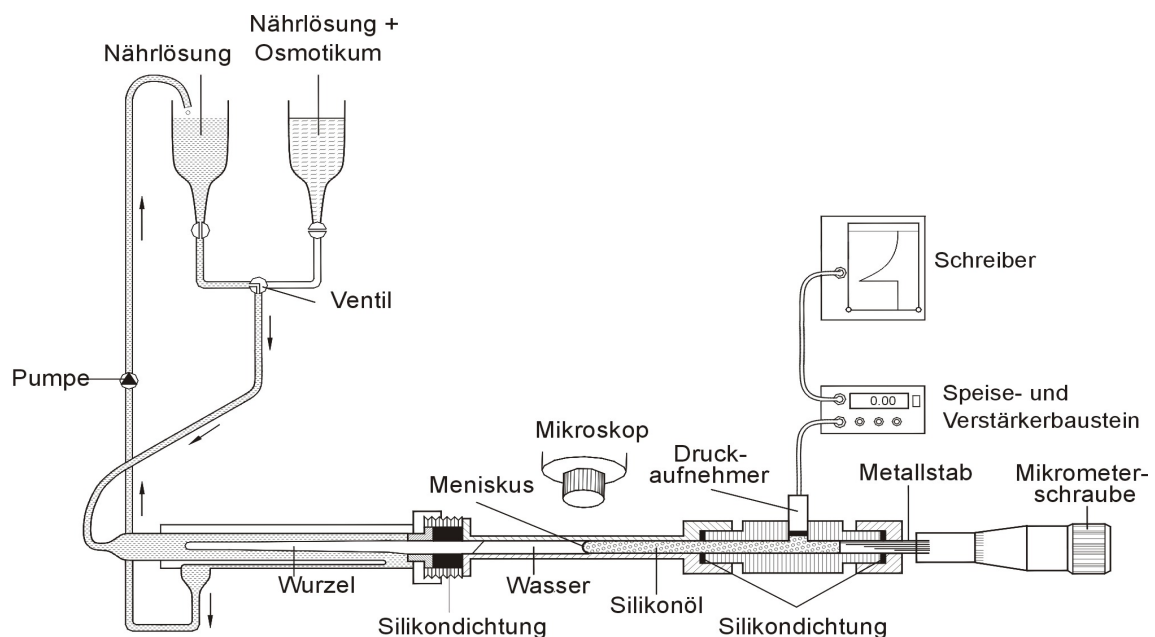


Abb. 2.11: Wurzeldruckmessapparatur (Zeichnung nach: Zimmermann 2001), Druckänderungen können über das Mikroskop, leicht abgelesen werden, auf dem Schreiber oder einem angeschlossenen Elektronenrechner können die Druckverläufe dokumentiert und ausgewertet werden. Die Mikrometerschraube diente zur Erzeugung hydrostatischer Druckänderungen, über die Zusammensetzung des die Wurzel umspülenden Nährmediums können osmotische Druckveränderungen hervorgerufen werden.

Vor der Veränderung der Druckverhältnisse im System, wurde eine Gleichgewichtseinstellung des von einem Druckwandler gemessenen Wurzeldruckes (P_r [MPa]) abgewartet (1-3 h). Die Druckverhältnisse konnten mit 2 Methoden verändert werden, zum einen durch erhöhen des Xylem-Druckes mittels einer Schraube an der Druckmesssonde,

oder durch Veränderung des osmotischen Druckes der die Wurzel umgebenden Nährlösung. Die Druckveränderungen wurden aufgezeichnet und die Relaxationszeiten des Systems abgewartet. Aus der Halbwertszeit der Relaxationszeit ($T_{1/2r}^W$) konnte nun nach Gl. 2.10 die hydraulische Leitfähigkeit Lp_r berechnet werden (STEUDLE, 1993).

$$\frac{\ln(2)}{T_{1/2r}^W} = A_r \frac{\Delta P_r}{\Delta V_s} Lp_r \quad \text{Gl. 2.9}$$

Mit: $\Delta P_r/\Delta V_s$ = Elastizitätskoeffizient des Messsystems [MPa·m⁻³]
 P_r = Wurzelndruck [MPa]
 V_s = Volumen des Wurzelsystems [m³]
 A_r = aktive Wurzeloberfläche [m²]
 Lp_r = hydraulische Leitfähigkeit bezogen auf Oberfläche [m s⁻¹ MPa⁻¹]

Zur Veränderung des osmotischen Druckes wurde der Nährlösung 20-40 mM NaCl zugefügt ($\approx 40-80 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ das entspricht ca. 0.10-0.20 MPa).

Um die ermittelten Lp_r in Permeabilitäten umzurechnen, wurde angelehnt an die allgemeine Gasgleichung folgende Formel verwendet (DAINTY, 1963)(Gl. 2.11):

$$P = \frac{Lp_r RT}{\bar{V}_w} \quad \text{Gl. 2.10}$$

Mit: P = Leitwert (Permeabilitätskoeffizient) [m s⁻¹]
 \bar{V}_w = partielles Molvolumen von Wasser [cm³ mol⁻¹]
 Lp_r = hydraulische Leitfähigkeit bezogen auf Oberfläche [m s⁻¹ MPa⁻¹]
 R = allgemeine Gaskonstante [J K⁻¹ mol⁻¹]
 T = Temperatur [K]

3 Chemische Zusammensetzung und mikroskopische Feinstruktur von Zellwänden der Wurzel und Wurzelknöllchen bei *Vicia faba* L.

Die Zellwände der Wurzeln und Knöllchen von Ackerbohnen (*Vicia faba* L.) wurden licht und rasterelektronenmikroskopisch untersucht und nach dem enzymatischen Verdau für die chemische Analyse isoliert.

Die Knöllchen dieser Leguminosenart sind nicht determiniert und wachsen ständig an ihrer Spitze weiter. Die Spitze des Knöllchens ist daher geöffnet und lediglich durch Cortextgewebe abgedeckt. Abb. 3.1 **A** zeigt ein Knöllchen auf einer Wurzel, nach enzymatischen Verdau und Entfernung des Cortextgewebes, Abb. 3.1 **B** ein intaktes Knöllchen im Querschnitt, vor dem Verdau.

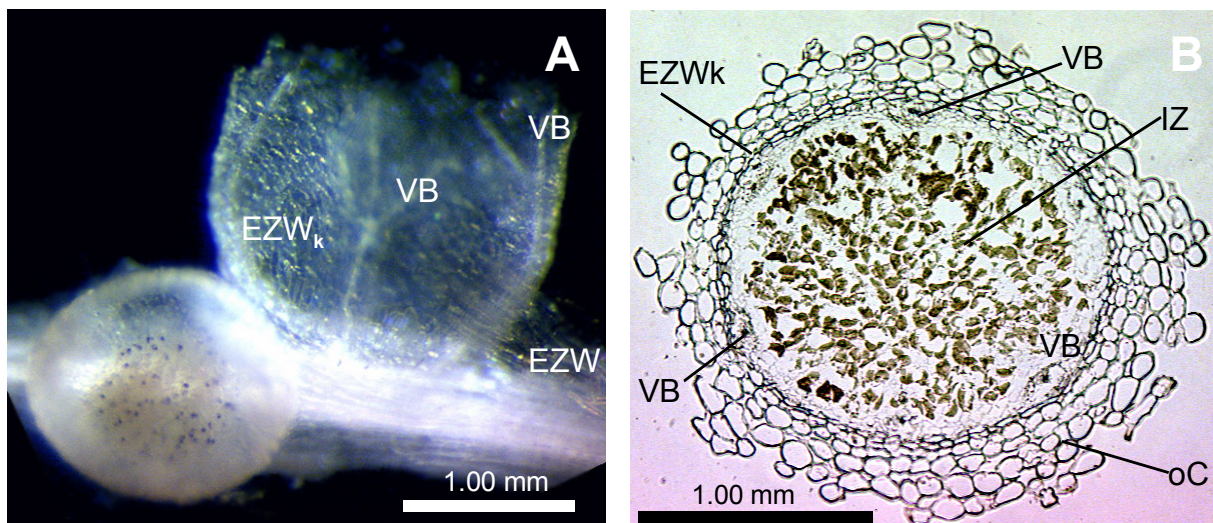


Abb. 3.1: *V. faba* Knöllchen an einer Wurzel nach Enzymbehandlung, Cortex mechanisch entfernt. **A** Lupe; VB=Vaskularstrang; EZW_k=endodermale Zellwände Knöllchen; EZW= endodermale Zellwände Wurzel; **B** mikroskopischer Querschnitt durch ein intaktes Knöllchen, Übersicht, oC = äußerer Cortex; IZ = infizierte Zone).

Abb. 3.1 **A** zeigt deutlich die verzweigten Vaskularstränge (VB) auf der Innenseite der Knöllchenendodermis (EZW_k). In Abb. 3.1 **B** erkennt man die vom äußeren Cortex (oC) umgebene Knöllchenendodermis, und die davon eingeschlossene Zone mit infizierten Zellen (IZ). Auf der Innenseite der EZW_k liegen die Leitbündel (VB) zur Ver- und Entsorgung der Zellen in der infizierten Zone.

Die verwendeten Knöllchen hatten einen Durchmesser von etwa 2-3 mm und konnten bei der mechanischen Isolation in zwei Fraktionen getrennt werden, zum Einen in Zellwände des

äußeren Cortexgewebes (CX) zum Anderen in die Zellwände der Knöllchenendodermis (EZW_k).

Von den Wurzeln, welche nur etwa 1 mm im Durchmesser maßen, konnten nur geringe Mengen an Material gewonnen werden, die Mengen an isolierten endodermalen Zellwänden (EZW) reichte nur für Einzelbestimmungen bei der chemischen Analyse. Epidermale Zellwände (EPZW) konnten in ausreichender Menge gewonnen werden.

3.1 Mikroskopische Feinstruktur von *V. faba* Zellwänden der Wurzel und Wurzelknöllchen

Die untersuchten Querschnitte von Sekundärwurzeln der Ackerbohne wiesen im UV-Licht nur eine geringe Autofluoreszenz auf. Durch Färbung mit dem lipophilen Farbstoff Fluorol Yellow 088 konnte in der Endodermis ein CASPARY-Streifen (CS) sichtbar gemacht werden (Abb. 3.2 A). In älteren Wurzelabschnitten wurde vereinzelt eine Suberinlamelle festgestellt (Abb. 3.2 B). Die Endodermis der Ackerbohne befand sich demnach in Entwicklungsstufe I bis II, wobei Stadium I (CS) deutlich überwog. Die epidermalen Zellwände (EPZW) zeigten kaum Autofluoreszenz und waren auch mit dem Farbstoff nicht signifikant färbbar, lipophile Substanzen schienen nicht vorhanden zu sein, weshalb diese Spezies in der Literatur als nicht-exodermale Art bezeichnet wurde (PETERSON und LEFCOURT, 1990).

Im Querschnitt der Wurzelknöllchen ließen sich verschiedene Strukturen im UV-Licht anhand ihrer Autofluoreszenz, oder Farbstoffabsorption unterscheiden. Das Knöllchen war gefüllt mit Cortexzellen, die teilweise mit Knöllchenbakterien infiziert (*Rhizobium leguminosarum* Stamm: *viceae*) waren, hierbei ließen sich je nach Nähe zur Wurzel verschiedene Zonen im Längsschnitt erkennen (ABD-ALLA *et al.*, 2000). Den Abschluss des Knöllcheninneren bildete eine sehr gut mit aliphatischen Farbstoffen färbbare Zellschicht, die Knöllchenendodermis. Fertigte man Serienschnitte von der meristematischen Spitze, bis in den basalen Bereich des Knöllchens an, so konnte eine durchgehend komplette Suberinlamelle an den Zellwänden der Endodermis nachgewiesen werden (Abb. 3.2 C-O)

Auf der Innenseite der Knöllchenendodermis befanden sich die von einer vaskulären Endodermis (EZW_v) eingeschlossenen Leitbündel (VB). Serienschnitte zeigten deutlich unterschiedliche Entwicklungsstufen der vaskulären Endodermis, im basalen Bereich Stadium II, und im Spitzenbereich lediglich Entwicklungsstadium I (CS) (Abb. 3.2 E-L).

Nach außen schloss sich an die Knöllchenendodermis ein lockeres großlumiges Cortexgewebe an (CX), das mit den verwendeten histochemischen Färbetechniken keine Reaktion zeigte (Abb. 3.2 C-N).

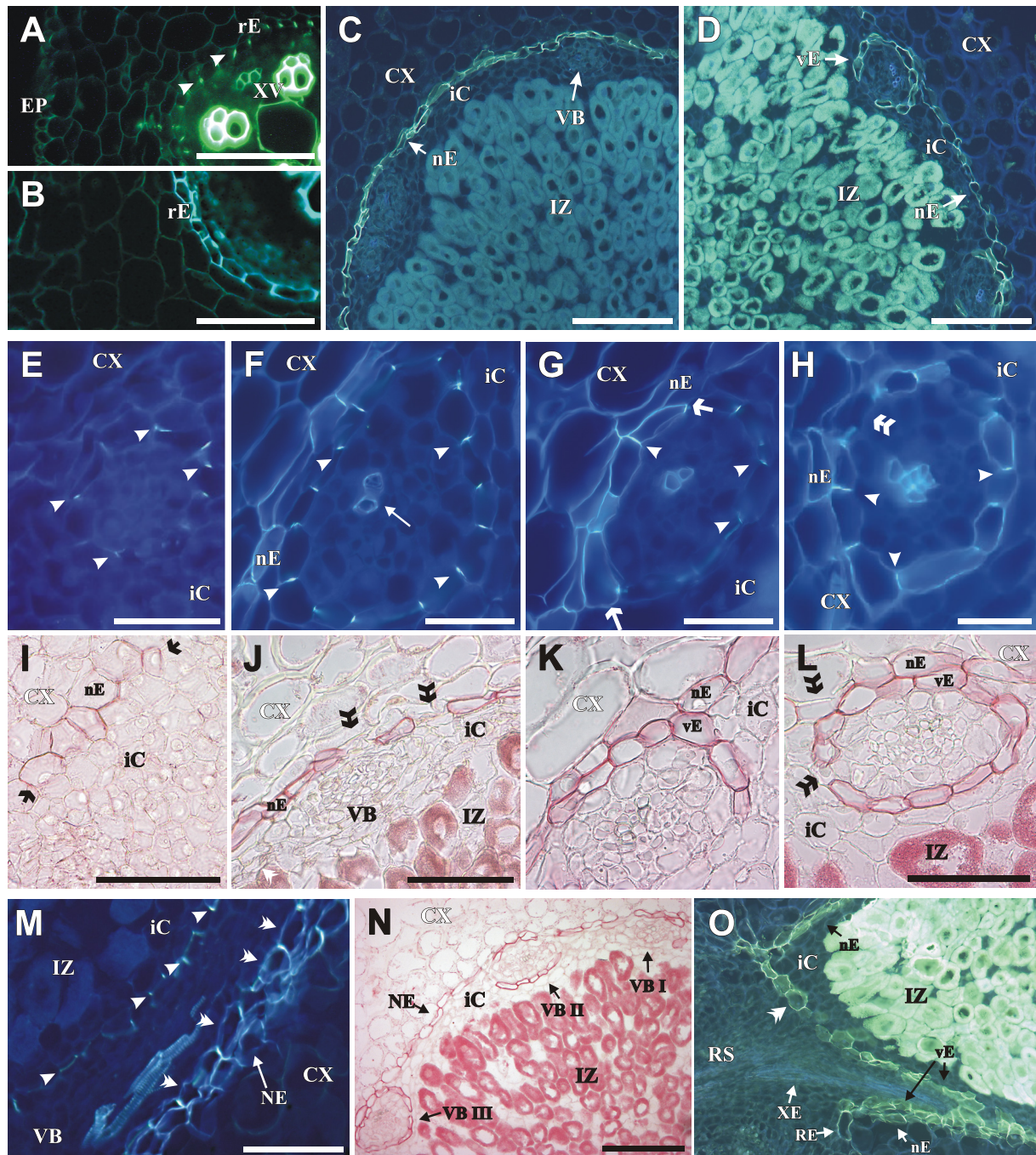


Abb. 3.2: **A, B** Querschnitt im UV von *V. faba* Sekundärwurzeln Balken: 200 μ m. **A** Schnitt gefärbt mit Fluorol yellow 088. Xylem-Elemente (XV) und CASPARY-Streifen (Pfeil) der Wurzelendodermis (rE) zeigen starke, die Epidermis (EP) sehr schwache Fluoreszenz. **B** Autofluoreszenzbild eines älteren Wurzelabschnitts mit sekundärer Endodermis (Suberinlamelle). **C, D** Querschnitt von 6-Wochen alten *V. faba* Knöllchen, gefärbt mit Fluorol yellow 088. Balken 200 μ m. **C** Schnitt, ca. 1.0 mm unterhalb der Knöllchenspitze. Die infizierte Zone (IZ) im Zentrum des Knöllchen ist umgeben von Kortex-Gewebe (iC), abgeschlossen durch eine Knöllchenendodermis (nE) die umgeben ist von äußerem Kortex (CX). Leitbündel (VB) verteilen sich im inneren Kortex auf der Innenseite von nE. **D** Schnitt ca. 3 mm unterhalb der Spitze (Basisregion). Die vaskuläre Endodermis (vE) enthält partiell ebenfalls eine Suberinlamelle. **E-H** Serienquerschnitte durch ein 6-Wochen altes Knöllchen von *V. faba* gefärbt mit Berberin and Anilin blau. Balken 50 μ m. **E** Schnitt ca. 0.5 mm unterhalb der Spitze, CASPARY-Streifen (Pfeile) der vE, aber noch keine lignifizierte Leitelemente enthalten. **F** Weiter in Richtung Basis sieht man deutlich gelb fluoreszierende CASPARY-Streifen und autofluoreszierende Leitstränge. **G** Ca. 2.0 mm unterhalb der Spitze erkennt man neben

CASPARY-Streifen (Pfeilspitzen), vE in der Nähe der nE die Ausbildung von Suberinlamellen (Pfeile). **H** Ca. 3.0 mm unterhalb der Spitze. Bis auf wenige Zellen (doppelte Pfeilspitze) besitzen alle Zellen eine fluoreszierende Lamelle. **I-L** Serienquerschnitte durch 6-Wochen alte *V. faba* Knöllchen, angefärbt mit Sudan III. Balken: 100 μm . **I** 0.5 mm unterhalb der Spitze. nE (Pfeile), erscheint schwach rot gefärbt bevor Leitbündel und infizierte Zellen sichtbar werden. **J** Etwa 1.0 mm unterhalb der Spitze erscheinen infizierte Zellen rot aufgrund des hohen lipophilen Anteils von bakteriellen und peribakteriellen Membranen. Durchlasszellen (Pfeile) sind sichtbar. **K**. Ca. 2.0 mm unterhalb der Spitze erkennt man Suberinlamellen. **L** Ca. 3.0 mm (Basisregion) bis auf Durchlasszellen (Doppelpfeilspitze) komplette Suberinlamelle auf vE. **M** Längsschnitt durch ein Leitbündel des Knöllchens mit Berberin und Anilin blau gefärbt, ca. 2.0 mm unterhalb der Spitze zeigt ein unsymmetrisches Wachstum CASPARY-Streifen (Pfeilspitzen) auf Seite der infizierten Zone, Suberinlamelle auf Seite der nE (Doppelpfeilspitzen). Balken: 200 μm . **N** Querschnitt durch den Basisbereich (ca. 3.0 mm unterhalb der Spitze) einige Leitbündel besitzen noch CASPARY-Streifen (VB I), die meisten aber im sekundären Zustand (VB II, III). Balken: 200 μm . **O** Längsschnitt durch ein *V. faba* Knöllchen gefärbt mit Fluorol yellow 088. Knöllcheninneres (IZ, iC) Wurzelcentralzylinder (RS) sind durch eine Endodermis (vE) mit Stadium II (doppelte Pfeilspitze) getrennt. nE, vE, und Wurzelendodermis (rE) verschmelzen an der Knöllchenbasis. (XE=Xylem-Elemente der Wurzel). Balken: 200 μm .

Betrachtete man die enzymatisch isolierten Knöllchen unter dem Rasterelektronenmikroskop, so wurden die Befunde der Lichtmikroskopie bestätigt. Abb. 3.3 **A** zeigt, die unverdauten mit einer Suberinlamelle geschützten Zellwände der Knöllchenendodermis (helle Pfeile), auf deren Innenseite sich ein Geflecht aus, von einer vaskulären Endodermis umhüllten, Leitsträngen befinden (dunkle Pfeile). Bei höherer Vergrößerung sah man das durch die CASPARY-Streifen gebildete Gitter der unverdauten radialen Zellwände (gefüllter Pfeil) und darunter die dunklen Strukturen der lignifizierten Xylemelemente (Abb. 3.3 **B** hohler Pfeil).

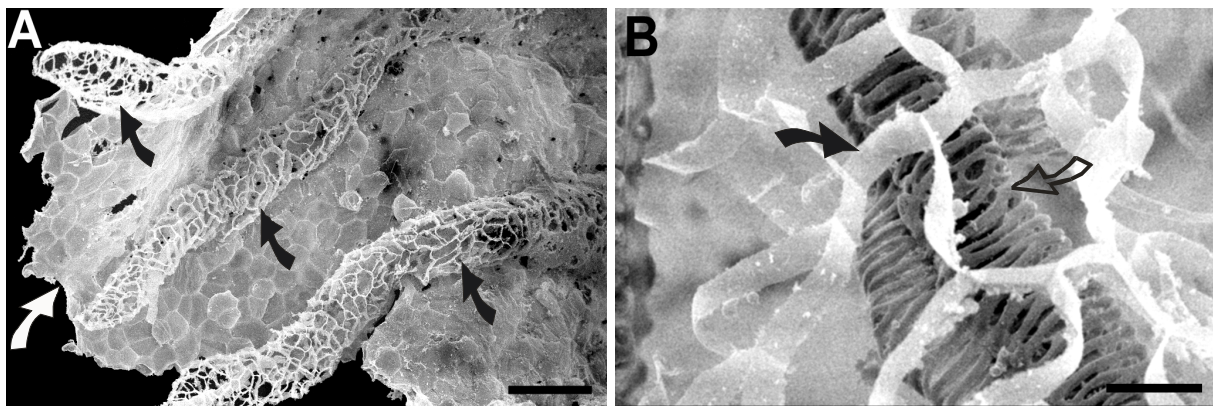


Abb. 3.3: REM von isolierten *V. faba* Knöllchen, **A** Innenseite der Knöllchenendodermis (sekundäre Endodermis, weißer Pfeil) mit aufgelagerten Leitbündeln (primäre Endodermis; schwarzer Pfeil), Balken 100 μm ; **B** CASPARY-Streifen der vaskulären Endodermis (schwarzer Pfeil) mit eingeschlossenen Xylemelementen (weißer Pfeil), Balken 10 μm .

3.2 Chemische Charakterisierung der Zellwände von *V. faba* Wurzel und Wurzelknöllchen

Die Zellwandisolate wurden den bereits beschriebenen Extraktionsschritten und Abbaureaktionen unterzogen. Die hierbei ermittelten Stoffmengen an Extraktkomponenten,

Suberinmonomeren und Ligninmonomeren nach der GC-Analyse sind in Tabelle 3.1.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der quantitativen Analysen von Zellwandisolaten der *V. faba* Wurzel und Knöllchen.

	EZW _k [nmol mg ⁻¹]	EZW [nmol mg ⁻¹]	CX [nmol mg ⁻¹]	EPZW [nmol mg ⁻¹]
CHCl ₃ /MeOH Extrakt	87.9 (±5.71)	19.4 ^{a)}	75.4 ^{a)}	23.9 ^{a)}
Suberinmonomere	273.6 (±21.2)	122.5 ^{a)}	19.8 (±7.93)	7.29 (±2.51)
Ligninmonomere	77.9 (±11.2)	-- ^{b)}	8.29 (±0.15)	3.27 ^{a)}

a) Einzelbestimmung; b) unzureichende Materialmengen.

3.2.1 Analyse der Lösungsmittelextrakte *V. faba*

Nach Isolation und anschließender Trocknung wurden die Zellwandisolate extrahiert und der trimethylsilylierte Extrakt mittels GC/MS analysiert. Die Extrakte wiesen deutliche Unterschiede in Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe zwischen den vier Gewebearten (CX, EZW_k, EPZW, EZW) auf (Abb. 3.4).

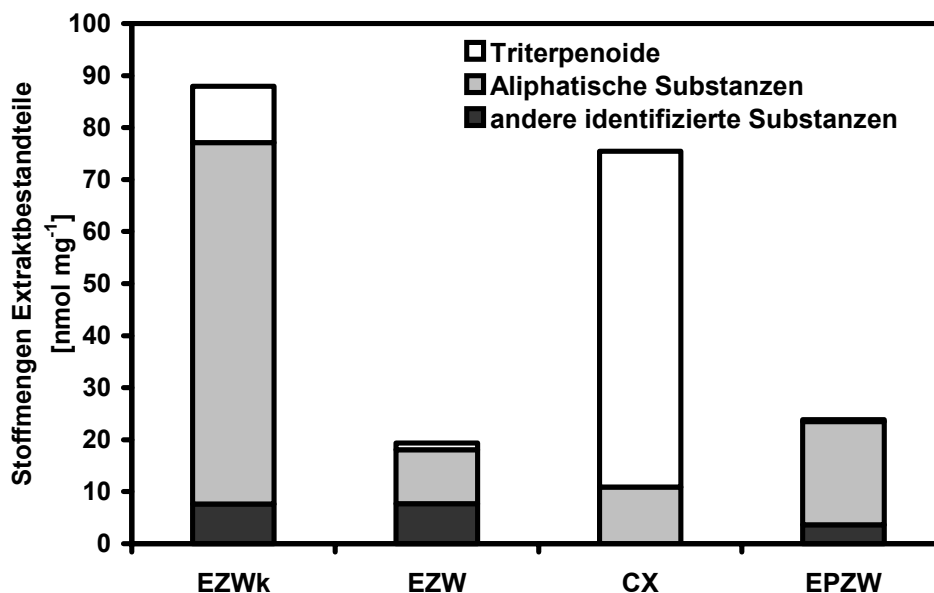


Abb. 3.4: Zusammensetzung der organischen Lösungsmittel-extrakte von *V. faba* Zellwandisolaten; Analysen aus der Extraktion Gesamtmenge des isolierten Materials; Angaben in nmol mg⁻¹ Trockengewicht.

Die größte Extraktmenge wurde in der Knöllchenendodermis gefunden (87.9 nmol mg⁻¹ (30.1 µg mg⁻¹) Trockengewicht) während die Wurzelendodermis mit 19.3 nmol mg⁻¹ (6.73 µg mg⁻¹) die geringste Menge an extrahierbaren Substanzen enthält. Im großlumigen Gewebe des äußeren Cortex (CX) konnten 75.5 nmol mg⁻¹ (31.6 µg mg⁻¹) Trockengewicht extrahiert werden und die epidermalen Zellwände enthielten lediglich 23.8 nmol mg⁻¹ (7.41 µg mg⁻¹) extrahierbare Substanzen (Abb. 3.4).

Die Extrakte setzten sich aus mehreren Stoffgruppen zusammen, langkettigen aliphatischen Monocarbonsäuren und 2-Hydroxysäuren mit Kettenlängen von 16 bis 28 Kohlenstoffatomen sowie pflanzliche Steroide, welche bereits von KNIGHTS *et al.* (1977) aus *V. faba* als Gesamtextrakt extrahiert und beschrieben wurden. Dies waren Campesterol und β -Sitosterol, sowie Cumarsäureester mit Kettenlängen von 18-24 Kohlenstoffatomen welche unter „andere identifizierbare Substanzen“ zusammengefasst wurden. Die letzte Stoffgruppe bilden Triterpene vom Lupeol Typ (Abb.3.5 **A** Betulin; **B** Lupeol; **C** β -Amyrin).

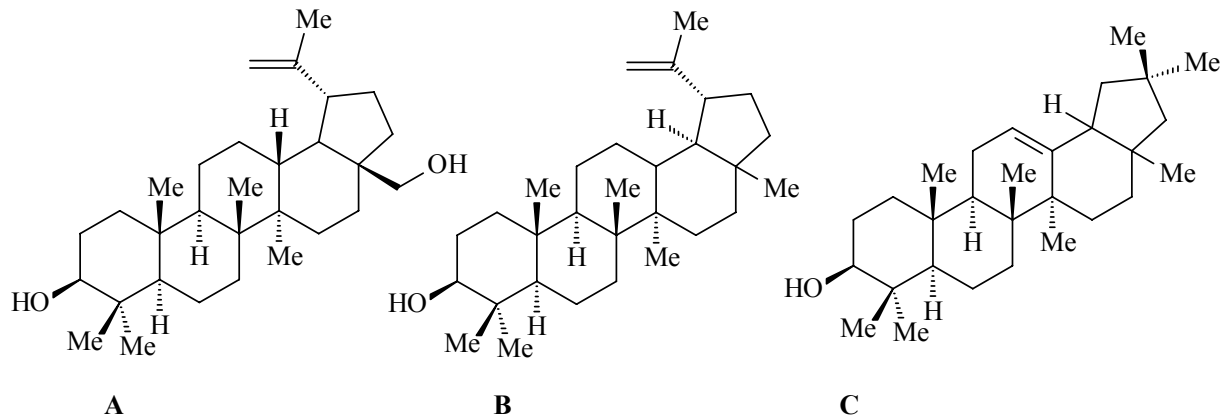


Abb. 3.5: typische Triterpene in *V. faba* Extrakten: A = Betulin; B = Lupeol; C = β -Amyrin

Während EZW, EPZW und EZW_k nur geringe Mengen an Triterpenen aufwiesen (Abb. 3.4), bestand die Stoffmenge des CX-Extraktes zu 86% aus Triterpenen, davon waren 79% Betulin (über 90% Triterpene bezogen auf Gewichtsverhältnisse). In allen anderen Geweben fanden sich langkettigen aliphatischen Säuren und Hydroxysäuren als Hauptfraktion, hierbei konnte für die EZW_k die größte mittlere Kettenlänge von 22.2 mit maximal 28 Kohlenstoffatomen ermittelt werden, während bei CX (18.2), EPZW (18.3) und EZW (18.5) mit durchschnittlich 18 Kohlenstoffatomen deutlich kürzere mittlere Kettenlängen festgestellt wurden. Die mengenmäßig kleinste Fraktion bildeten die unter „andere...“ zusammengefassten Steroide und Cumarsäureester, allerdings mit anteilmäßig hohem Gewicht (40%) im Extrakt der Endodermis (EZW) die absoluten Mengen waren mit 7.67 nmol mg⁻¹ (3.14 μ g mg⁻¹) jedoch sehr gering. EZW_k enthielt mit 7.65 nmol mg⁻¹ (3.39 μ g mg⁻¹) fast die identische Menge und in EPZW fanden sich mit 3.63 nmol mg⁻¹ (1.49 μ g mg⁻¹) die geringste Menge dieser Fraktion, in CX konnten keine Substanzen dieser Stoffklassen detektiert werden.

3.2.2 Suberinanalysen *V. faba*

Nach den Umesterungsreaktionen mit BF₃/Methanol konnten bei allen Zellwandisolaten von *V. faba* Suberinmonomere nachgewiesen werden. Die Summen aliphatischer und estergebundener aromatischer Monomeren wurden in Abb. 3.6 zusammengestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Gesamtsuberinmenge. EZW Mengen stammen aus einer Einfachbestimmung.

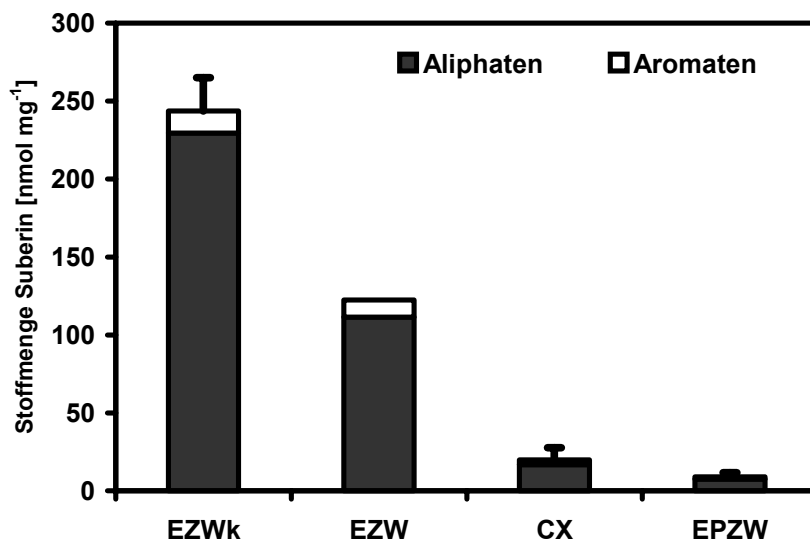


Abb. 3.6: Summen der Suberinmonomere in Zellwänden von *V. faba*, Angaben in nmol mg^{-1} ; (Fehlerbalken = StabWN).

EZW_k enthielt mit $243.7 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($72.4 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) Trockengewicht die größte Menge an Suberin, fast

doppelt so viel wie die EZW-Fraktion ($122.5 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($35.5 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$)). Die Summe der isolierten Monomeren in CX und EPZW war mit 19.8 nmol/mg ($5.36 \text{ } \mu\text{g/mg}$) und $7.29 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($2.57 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) sehr gering. Der Anteil estergebundener aromatischer Verbindungen (Ferulasäure, Cumarsäure) war in den äußeren Geweben mit 14-20% (CX und EPZW) etwas höher als in den darunterliegenden EZW_k (6%) und EZW (9%) (Tab. 3.2).

Die Monomerenzusammensetzung des Suberins in Knöllchengewebe unterschied sich von der in Wurzelgewebe. EZW und EPZW enthielten 2-OH-Säuren, die Knöllchengewebe nicht. Im EPZW-Suberin fanden sich jedoch keine Disäuren (Abb. 3.7). Die Verteilung der übrigen Substanzklassen ist weitgehend homogen und zeigt, dass gesättigte und ungesättigte ω -Hydroxysäuren bei EZW_k und EZW den größten Anteil an den Suberinpolymeren bilden, gefolgt von den gesättigten und ungesättigten Disäuren. CX und EPZW werden stärker durch Monocarbonsäuren sowie gesättigte ω -Hydroxy-säuren dominiert.

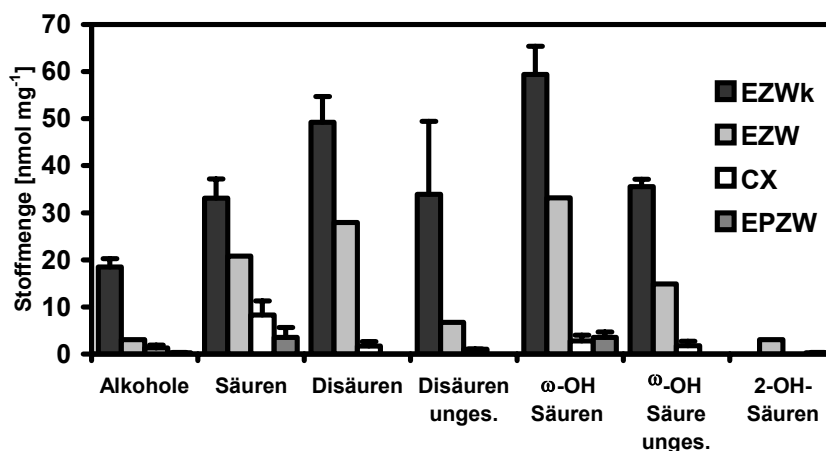


Abb. 3.7: Substanzklassenverteilung in *V. faba* Suberin, Angaben in nmol mg^{-1} Trockengewicht, (Fehlerbalken = StabWN).

Tabelle 3.2 zeigt die prozentuale Zusammensetzung der Suberin-Substanzklassen und eine genaue Auflistung der gefundenen Komponenten.

Tabelle 3.2: prozentuale Zusammensetzung des Suberins von *V. faba* Zellwänden der Wurzel und Knöllchen. Fettgedruckt wurde die Summe der Einzelkomponenten der jeweiligen Substanzklasse. Die Standardabweichung dreier Wiederholungen ist in Klammern angegeben.

	EZW _k	EZW ^{a)}	CX	EPZW
	%	%	%	%
Aromaten	5.87 (±1.05)	8.95	14.4 (±2.60)	19.8 (±6.49)
<i>cis</i> Cumarsäure	0.44 (±0.06)	n.d. ^{b)}	n.d.	n.d.
<i>trans</i> Cumarsäure	0.79 (±0.08)	1.01	n.d.	2.01 (±0.65)
<i>cis</i> Ferulasäure	0.50 (±0.14)	1.91	3.83 (±0.19)	n.d.
<i>trans</i> Ferulasäure	3.40 (±0.85)	6.03	11.1 (±2.6)	17.9 (±5.9)
1-Alkohole	7.69 (±1.31)	2.49	6.18 (±1.10)	3.90 (±0.24)
C ₁₆	1.88 (±0.13)	n.d.	2.36 (±0.99)	n.d.
C ₁₈	2.44 (±0.39)	1.71	4.22 (±0.19)	3.90 (±0.24)
C ₂₀	1.94 (±0.79)	0.77	n.d.	n.d.
C ₂₂	0.32 (±0.02)	n.d.	n.d.	n.d.
C ₂₄	0.15 (±0.03)	n.d.	n.d.	n.d.
1-Monocarbonsäuren	13.8 (±2.7)	16.9	26.4 (±2.9)	44.4 (±12.1)
C ₁₆	0.89 (±0.27)	6.21	21.1 (±2.7)	18.75 (±3.88)
C ₁₈	0.91 (±0.27)	2.57	15.3 (±4.9)	21.52 (±9.22)
C ₂₀	2.05 (±0.43)	5.11	2.32 (±0.15)	1.09 (±0.15)
C ₂₂	6.22 (±1.39)	2.59	3.84 (±0.35)	1.61 (±0.43)
C ₂₃	0.35 (±0.04)	n.d.	n.d.	n.d.
C ₂₄	1.53 (±0.34)	0.49	n.d.	1.42 (±0.41)
C ₂₆	0.11 (±0.03)	n.d.	n.d.	n.d.
α,ω-Dicarbonsäuren	33.6 (±5.2)	28.3	14.1 (±2.9)	n.d.
C ₁₆	14.1 (±1.6)	16.1	7.03 (±2.18)	n.d.
C _{18-9-en}	12.4 (±4.9)	5.52	5.10 (±3.56)	n.d.
C ₁₈	2.01 (±0.29)	2.67	1.50 (±0.22)	n.d.
C ₂₀	1.25 (±0.46)	3.26	n.d.	n.d.
C ₂₂	0.66 (±0.38)	0.81	n.d.	n.d.
ω-Hydroxysäuren	38.9 (±0.9)	39.2	22.2 (±1.8)	49.2 (±6.5)
C ₁₆	11.9 (±2.5)	14.4	8.04 (±1.10)	n.d.
C _{18-9-en}	12.9 (±0.6)	12.1	8.88 (±1.84)	n.d.
C ₁₈	1.47 (±0.03)	2.08	0.77 (±0.17)	22.1 (±3.1)
C ₂₀	3.79 (±0.73)	7.75	2.92 (±0.28)	21.4 (±2.8)
C ₂₂	4.34 (±0.38)	2.86	2.38 (±0.21)	5.69 (±0.94)
C ₂₄	0.21 (±0.03)	n.d.	n.d.	n.d.
2-Hydroxysäuren	n.d.	2.48	n.d.	4.13 (±0.72)
C ₁₈	n.d.	1.26	n.d.	n.d.
C ₂₂	n.d.	0.78	n.d.	2.02 (±0.84)
C ₂₄	n.d.	0.44	n.d.	2.11 (±0.18)

a) Einfachbestimmung b) n.d. = nicht detektiert

Die Kettenlängenverteilung zeigte, dass der Mittelwert der mittleren EPZW und der EZW_k Kettenlängen (mKl) über alle Substanzklassen (Abb. 3.8, Mittelwerte Aliphaten) deutlich

höher war, als bei den übrigen Geweben. Vor allem 2-OH-Säuren erreichten sehr hohe Kettenlängen, es dominierten hier Kettenlängen von 22 und 24 Kohlenstoffatomen. Überdurchschnittlich hoch war auch das Molekulargewicht von Monocarbonsäuren in EZW_k der mKI-Wert von über 21 C-Atomen war um 2-3 C-Atome höher als bei allen übrigen Geweben. Die ungesättigten Di- und ω -OH-Säuren wurden nicht in Abb. 3.1.8 integriert, da es sich jeweils um eine Einzelverbindung mit der Kettenlänge 18 handelte (9-Octadecen-1,18-disäure und 18-OH-9-Octadecensäure), also keine Unterschiede in der Länge der Kette bestanden.

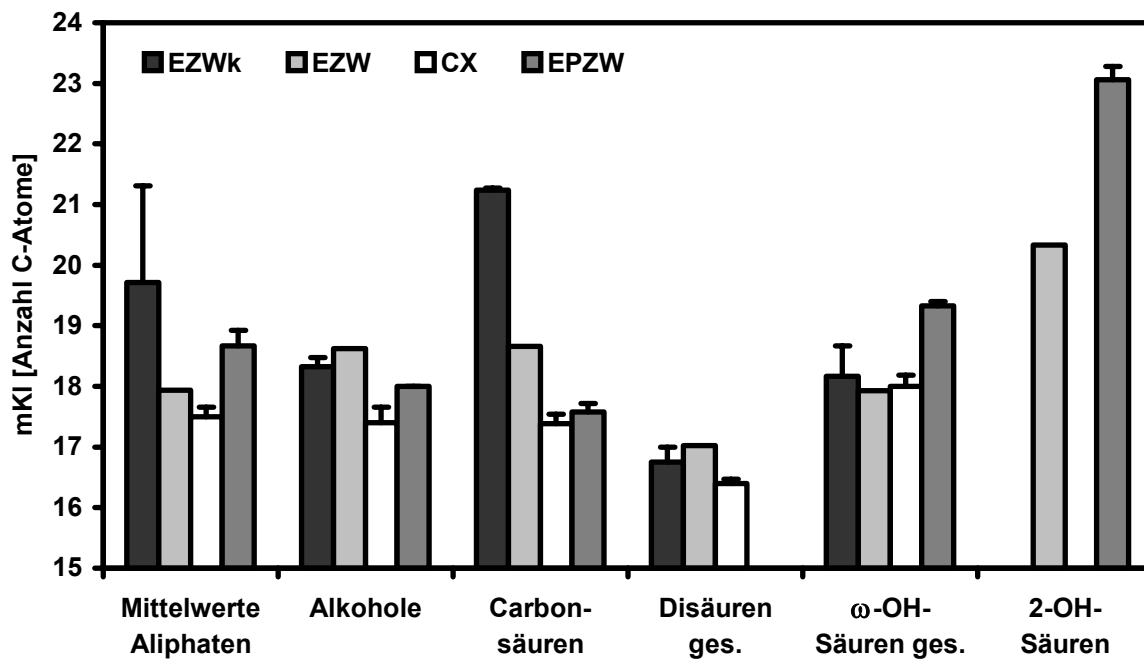


Abb. 3.8: Verteilung der mittleren Kettenlängen in Suberin-Substanzklassen von *V. faba* Wurzeln und Knöllchen. (Fehlerbalken = StabWN).

Die Berechnung der freien Carboxygruppen im Polymer als ein Gradmesser für die Konnektivität des Suberins ergab für die Zellen des äußeren Cortex 68% nicht veresterte Säuregruppen, im EPZW die höchste Konnektivität mit 44% freien Carboxygruppen, beide EZW enthielten 62% nicht verknüpfte Säuregruppen.

3.2.3 Ligninanalysen *V. faba*

Ligningehalte von EZW_k, CX und EPZW wurden nach einer Thioacidolyse gaschromatographisch bestimmt, EZW standen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um eine Analyse durchzuführen. Das Verhältnis der Monomerenverteilung von Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G) und Syringyl (S) Einheiten von 1:5:2 (H:G:S) entsprach dem in anderen dicotylen Pflanzen festgestelltem Verhältnis (ZEIER *et al.*, 1999a). Der höchste Ligningehalt konnte bei EZW_k zu 77.9 nmol mg⁻¹ (27.3 µg mg⁻¹) bestimmt werden. Die Ligninmengen in CX (8.29 nmol mg⁻¹; 2.95 µg mg⁻¹) und EPZW (3.27 nmol mg⁻¹; 1.14 µg mg⁻¹) lagen schon nahe der Nachweisgrenze für diese Substanzen (Abb. 3.9). Für EPZW konnte keine Wiederholungsmessung durchgeführt werden, da nicht ausreichend Substanz isoliert werden konnte.

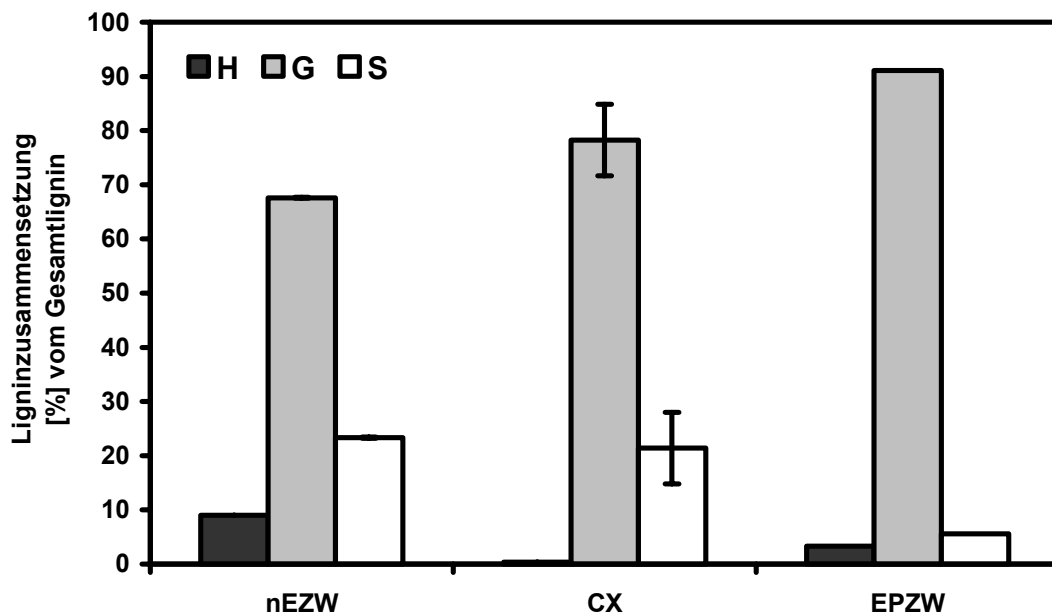


Abb. 3.9: Anteile der Ligninmonomere H, G und S nach einer Thioacidolyse in *V. faba* Zellwandisolaten von nEZW, CX und EPZW; Angaben in Prozent vom Gesamtignin; (Fehlerbalken = StabWN).

3.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu *V. faba* Wurzel und Wurzelknöllchen

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit über Feinstruktur und chemische Zusammensetzung von *V. faba* L. wurden bereits publiziert und ausführlich diskutiert (HARTMANN *et al.*, 2001). *V. faba* Knöllchen standen bei den Untersuchungen im Vordergrund, da das Verständnis der Funktion der Symbiose von Pflanze und Stickstofffixierenden Bakterien von großem, auch wirtschaftlichem, Interesse ist. Der Symbiont benötigt für die Reduktion des Luftstickstoffes zu Ammonium-Ionen Energie und eine möglichst sauerstoffarme Umgebung. Diese muss von der Pflanze erzeugt werden. Nährstoffe (Zucker) für die Bakterien werden über die auf der Innenseite der Endodermis liegenden Leitbündel angeliefert, und die Stoffwechselprodukte der Bakterien (NH_4^+) abtransportiert. Zur Regulation des apoplastischen Stofftransportes besitzen die Zellen der Leitbündel eine Endodermis (vaskuläre Endodermis) in zwei Entwicklungsstadien, ähnlich der Wurzelendodermis. Primäre Endodermis (CASPARY-Streifen) findet man in der Spitze, bis fast zur Basis, wo man einen sekundären Entwicklungszustand feststellen kann (Suberinlamelle) (Abb. 3.2 E-L). Da die Strukturen für eine mechanische Isolation zu klein waren, konnte keine differenzierte chemische Analyse durchgeführt werden, alle Werte der nachgewiesenen Monomeren stammen aus der Summe von vaskulärer und Knöllchenendodermis. Die Knöllchenendodermis dagegen befand sich ausschließlich in sekundären Zustand (Abb. 3.2 C-O), wie durch Licht und Rasterelektronenmikroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 3.2, 3.3). Die Aufgabe der Knöllchenendodermis scheint daher darin zu bestehen, den Verlust von Wasser und gelösten Bestandteilen aus dem Knöllchen zu minimieren, und eine Barriere für eintretende Gase zu bilden. Wie JACOBSEN *et al.* (1998) mit Joddampf zeigten, breiten sich gasförmige Substanzen nur von der nicht durch eine Endodermis geschützten Spitze in das Knöllchen aus. Die Knöllchenendodermis scheint daher als stark suberinisierte Barriere (mehr als doppelt soviel Suberin wie der Gehalt der Wurzelendodermis) die Bakterien vor unkontrollierten Sauerstoffzutritt und vor dem Verlust von gelösten Nährstoffen zu schützen. Bei den chemischen Analysen der Zellwandpolymere von EZW_k, wurde auch ein sehr hoher Anteil an Lignin festgestellt. hier muss man allerdings annehmen, dass der hohe Wert durch die nicht abtrennbaren stark lignifizierten Siebzellen der Leitbündel zustande kommt.

Das lockere äußere Cortexgewebe, welches das Knöllchen zum Bodensubstrat abgrenzt, besaß keine starke Suberinisierung der Zellwände, jedoch konnte im Lösungsmittel-extrakt eine große Menge an Triterpenen (86% des Extrakts) nachgewiesen werden. Triterpenen werden antimikrobielle Wirkungen zugeschrieben (HAYEK *et al.*, 1989), so dass es sich hier vermutlich um eine Barriere gegen eindringende Pilze und unerwünschte Bakterien handeln könnte. In anderen Gewebeextrakten konnten nur sehr geringe Mengen an Triterpenen nachgewiesen werden, so dass dem CX eine Sonderrolle zukommt.

Die in den EZW und EPZW gefundenen Mengen an Suberin und Lignin sind gut mit Literaturwerten von *Pisum sativum* vergleichbar (ZEIER *et al.*, 1999a). Bei EPZW konnte man deutlich die Grenzen der histochemischen Methoden erkennen. Da die Zellwände keine deutliche Färbung oder Fluoreszenz zeigten (Abb. 3.2 **A**, **B**) wurde *V. faba* als nicht exodermale Spezies eingestuft (PETERSON und LEFCOURT, 1990) mithilfe der chemischen Analyse kann man jedoch noch Suberin und auch geringe Mengen an Lignin nachweisen. Das EPZW Suberin wies sogar eine höhere durchschnittliche mittlere Kettenlänge und einen höheren Aromatenanteil auf, als die anderen Gewebe der Ackerbohnenwurzel. EZW wurden hauptsächlich im primären Zustand isoliert werden, in älteren Wurzelabschnitten wurde auch eine sekundäre Endodermis festgestellt. Obwohl die Knöllchenendodermis aus der Wurzelendodermis hervorgeht, konnten in EZW nur die Hälfte der Suberinmengen und ein Bruchteil der Ligninmengen nachgewiesen werden. Das scheint die Bedeutung einer Barriere im Knöllchen noch zu betonen, auch wenn die Ligninmengen zum Teil als Artefakt der Isolation angesehen werden können.

Leider konnten die Daten aufgrund der kleinen Dimensionen des Materials nicht auf eine Oberflächenbasis bezogen werden. Dies würde erst einen guten Ansatz für weitere Experimente bilden, um mehr über die Funktion apoplastischer Barrieren im Wurzelknöllchen zu erfahren.

4 Chemische Zusammensetzung und Mikroskopische Feinstruktur von Zellwänden der Rhizome und Wurzel von *Typha glauca* Godr.

Im Rahmen einer Kooperation mit DR. JAMES L. SEAGO JR. von der Universität New York in Oswego wurden Zellwandproben unterirdischer Pflanzenteile von *T. glauca* auf ihren Gehalt an den Biopolymeren Suberin und Lignin untersucht. Ein Bezug auf die Oberfläche der isolierten Zellwände konnte hier nicht durchgeführt werden.

4.1 Lichtmikroskopische Betrachtung der Rhizome und Wurzeln von *T. glauca*

Die von dem Kooperationspartner in Oswego angefertigten mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.1 A, B, H) reichten zur Dokumentation nicht aus, daher wurden die lichtmikroskopischen Untersuchungen mit einer nahe verwandten und wurzelanatomisch sehr ähnlichen Art (SEAGO *et al.*, 1999), *Typha angustifolia* L. in Würzburg durchgeführt. *T. glauca* stand hier nicht zur Verfügung. Die Pflanzen wurden aus einer Anpflanzung des Botanischen Gartens Würzburg entnommen. Bei *T. glauca* handelt es sich um eine Hybride aus *T. angustifolia* × *T. latifolia* (KUEHN und WHITE, 1999) und unterscheidet sich in der Wurzel von *T. angustifolia* durch eine erhöhte Anzahl von Zelllagen in der Hypodermis und ein langsames Wurzelwachstum (SEAGO *et al.*, 1999). Die Rhizodermis bei Rhizom (Abb. 4.1 A-F, H) und Wurzel (Abb. 4.1 G, I-N) emittierte eine starke Autofluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht (Abb. 4.1 I, C).

Die mehrschichtige (3-8 Schichten) Hypodermis der Wurzel besaß in der am weitesten von der Rhizodermis (Abb. 4.1 G, hohler Pfeil) entfernten Zone einen CASPARY-Streifen (SEAGO *et al.*, 1999, Abb. 4.1 I, J). An die Zellen der Hypodermis schloss sich bei den hier untersuchten ausgereiften Wurzeln ein Cortextgewebe mit ausgeprägten Aerenchym an (Abb. 4.1 G). Die Stele ist umgeben von einer Endodermis (Abb. 4.1 G gefüllter Pfeil), die je nach ontogenetischem Entwicklungszustand primären, sekundären oder tertiären Entwicklungszustand zeigen kann (SEAGO *et al.*, 1999). Abbildung 4.1 L, M, N (Pfeil) zeigt eine Endodermis im sekundären Zustand, mit vollständig ausgebildeter Suberinlamelle. CASPARY Streifen wurden in Abb. 4.1 M durch Berberinchlorid/Kristallviolett färbung hervorgehoben. Die Rhizodermis der Wurzel (Abb. 4.1 I-K) zeigte eine sehr starke Autofluoreszenz (Abb. 4.1 I) und einen durch Berberinchlorid/Kristallviolett färbung hervorgehobenen CASPARY-Streifen in der zweiten Zellschicht der Hypodermis (Abb. 4.1 J, Pfeil).

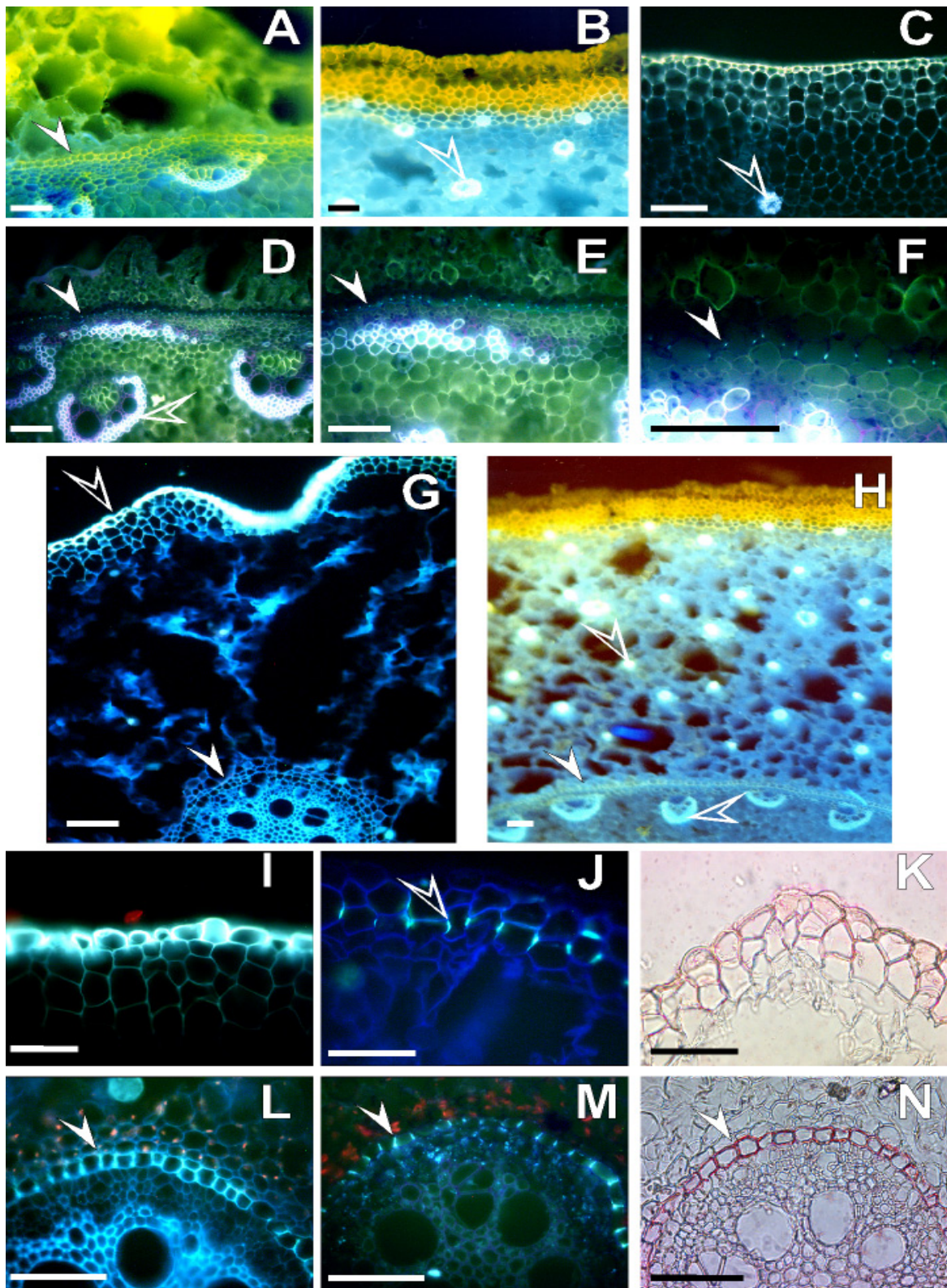


Abb. 4.1: **A, B** Querschnitt im UV von *T. glauca* Rhizom Balken: 100 μ m. **A** Schnitt gefärbt mit Berberinchlorid, Endodermis durchgehend gefärbt (Pfeil)(Bild: JAMES L. SEAGO, Oswego, New York, USA) **B** Autofluoreszenz und Berberinfärbung in RHZW, Berberin diffundiert nur bis zur Zelllage mit Suberin-Barriere (CASPARY-Streifen)(Bild: JAMES L. SEAGO, Oswego, New York, USA). **C** Querschnitt durch *T. angustifolia* Rhizom, UV 395nm, RHZW emittiert starke Autofluoreszenz, vor allem die Rhizodermis, Leitbündel ebenfalls (hohler Pfeil), Balken: 100 μ m **D-F** Querschnitt durch *T. angustifolia* Rhizom, Zentralzylinder. Berberinchlorid/Kristallviolett-Färbung, UV 395 nm, CASPARY-Streifen in der Endodermis

deutlich sichtbar (gefüllter Pfeil), Balken 100 µm. **G** Übersichtsbild, Querschnitt durch eine *T. angustifolia* Wurzel, UV 495 nm, starke Autofluoreszenz der Rhizodermis (hohler Pfeil) schwächere Autofluoreszenz der Endodermis (gefüllter Pfeil), Balken 100 µm. **H** Übersichtsbild, Querschnitt durch ein *T. glauca* Rhizom mit Berberinfärbung in der Rhizodermis Hypodermis und Autofluoreszenz der Leitbündel (hohle Pfeile) sowie der Endodermis (gefüllter Pfeil) Balken 100 µm (Bild verändert nach: JAMES L. SEAGO, Oswego, New York, USA). **I-N** Querschnitte durch eine *T. angustifolia* Wurzel. **I-K** RHZW. **I** Autofluoreszenzbild der RHZW, UV 395 nm, sehr starke Fluoreszenz der Rhizodermis, Balken: 100 µm **J** Berberinchlorid/Kristallviolett-Färbung, UV 395 nm, CASPARY-Streifen in der zweiten Zellschicht der Hypodermis, teilweise H-förmig (hohler Pfeil), Balken: 50 µm. **K** Sudan III Färbung der RHZW, nur schwache Färbung sichtbar, Balken: 50 µm. **L-N**: Zentralzylinder, Balken: 50 µm. **L** Autofluoreszenzbild des Zentralzylinders, UV 395 nm, die Endodermis zeigt starke Fluoreszenz (gefüllter Pfeil). **M** Berberinchlorid/Kristallviolett-Färbung, UV 395 nm, CASPARY-Streifen in der Endodermis sichtbar (gefüllter Pfeil). **N** Sudan III-Färbung, die Endodermis zeigt eine durchgehend gefärbte Suberinlamelle.

Nach PETERSON (1989) kann man die Hypodermis demnach als Exodermis bezeichnen. Eine Färbung mit Sudan III zeigte in den rhizodermalen und hypodermalen Zellwänden keine starke Färbung (Abb. 4.1 **K**).

Der Querschnitt durch ein Rhizom (Abb. 4.1 **A-F**, **H**) zeigte eine vielschichtige Hypodermis (3-10 Schichten) und ein Schwammparenchym mit zahlreichen luftgefüllten Kanälen durchzogen von Leitbündeln (Abb. 4.1 **B**, **C**, **D**, **H**, hohle Pfeile). Der Zentralzylinder ist durch eine Endodermis abgetrennt (Abb. 4.1 **A**, **D**, **E**, **F**, **H**, gefüllter Pfeil), die mit Berberin färbbar ist (Abb. 4.1 **A**, **H**) und eine Suberinlamelle zeigt. Ein ebenfalls vorhandener CASPARY-Streifen wurde durch Berberinchlorid/Kristallviolett-Färbung hervorgehoben (Abb. 4.1 **D-E**).

4.2 Chemische Charakterisierung der Zellwandisolate von *T. glauca*

Die Zellwände wurden in Oswego ohne enzymatische Behandlung manuell separiert, getrocknet und anschließend in Würzburg einer enzymatischen Behandlung unterzogen. Die Depolymerisationsreaktionen wurden ohne weitere Isolationsschritte durchgeführt. Die Zellwandextrakte enthielten als Hauptkomponenten Phytosterine (Campesterol, Stigmasterol, β -Sitosterol), weitere in geringen Mengen detektierte Substanzen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Ergebnisse der quantitativen Analysen von Zellwandisolaten bei *T. glauca* Wurzel und Rhizomen.

	Wurzel		junges Rhizom		altes Rhizom	
	RHZW	EZW ^{a)}	RHZW	EZW	RHZW	EZW
	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]
LM.-Extrakt	47.5 ^{a)}	11.3	63.4 (±13.3)	21.3 (± 3.3)	60.5 (± 6.4)	56.3 (± 4.9)
aliph. Suberin	56.7 (± 8.5)	5.5	40.7 (± 4.4)	17.1 (± 7.2)	33.8 (± 3.3)	9.9 (± 1.7)
arom. Suberin	85.2 (± 8.3)	8.8	42.4 (± 2.2)	26.7 (± 2.3)	53.8 (±16.0)	19.4 (±10.1)
Lignin	30.9 (±12.9)	69.3	38.9 (±12.9)	22.6 (±14.0)	50.6 (±19.7)	17.8 (±11.2)

a) Einzelbestimmung.

4.2.1 Analyse der Lösungsmittelextrakte *T. glauca*

Nach einer Extraktion des Zellwandmaterials mit CHCl₃/MeOH wurden drei dominierende Signale in den Chromatogrammen gefunden. Durch GC-MS konnten die Phytosterine Campesterol (Abb. 4.2 B), Stigmasterol (Abb. 4.2 C) sowie als Hauptkomponente β -Sitosterol (Abb. 4.2 A) identifiziert werden.

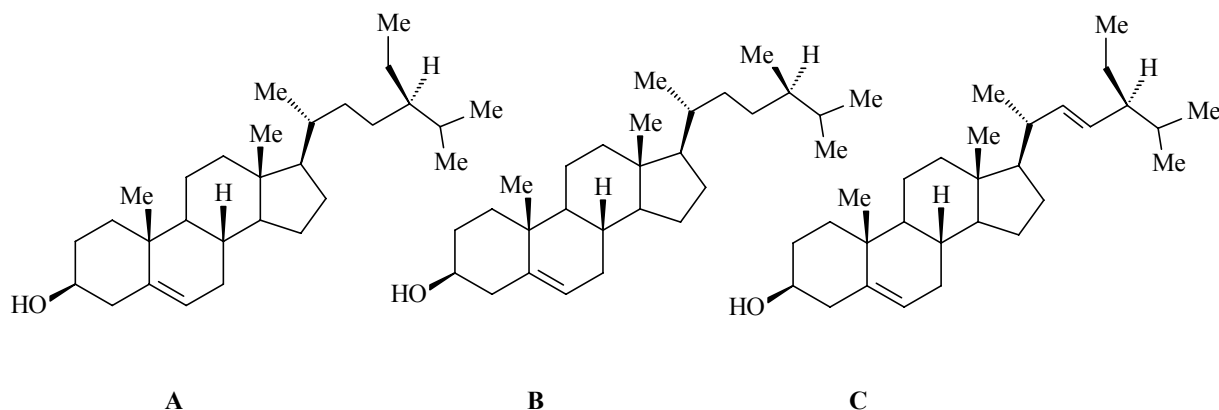


Abb. 4.2: Die Hauptkomponenten der Lösungsmittelextrakte von *T. glauca* Zellwänden, die Phytosterine: A = β -Sitosterol, B = Campesterol; C = Stigmasterol

Weitere schwache Signale in den Chromatogrammen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, ausgeschlossen wurden aliphatische Wachskomponenten. Die größten Mengen Extrakt fanden sich in RHZW der Rhizome mit 63.4 und 60.5 nmol mg⁻¹ (26.1 bzw. 24.9 μ g mg⁻¹) sowie der Wurzel (47.5 nmol mg⁻¹; 19.5 μ g mg⁻¹). Im EZW fanden sich bei jungem Rhizom und in der Wurzel geringere Mengen (21.3 und 11.3 nmol mg⁻¹; 8.77, 4.67 μ g mg⁻¹), bei altem Rhizom aber, mit 56.3 nmol mg⁻¹ (23.2 μ g mg⁻¹), den RHZW äquivalente Mengen an Phytosterinen (Abb. 4.3).

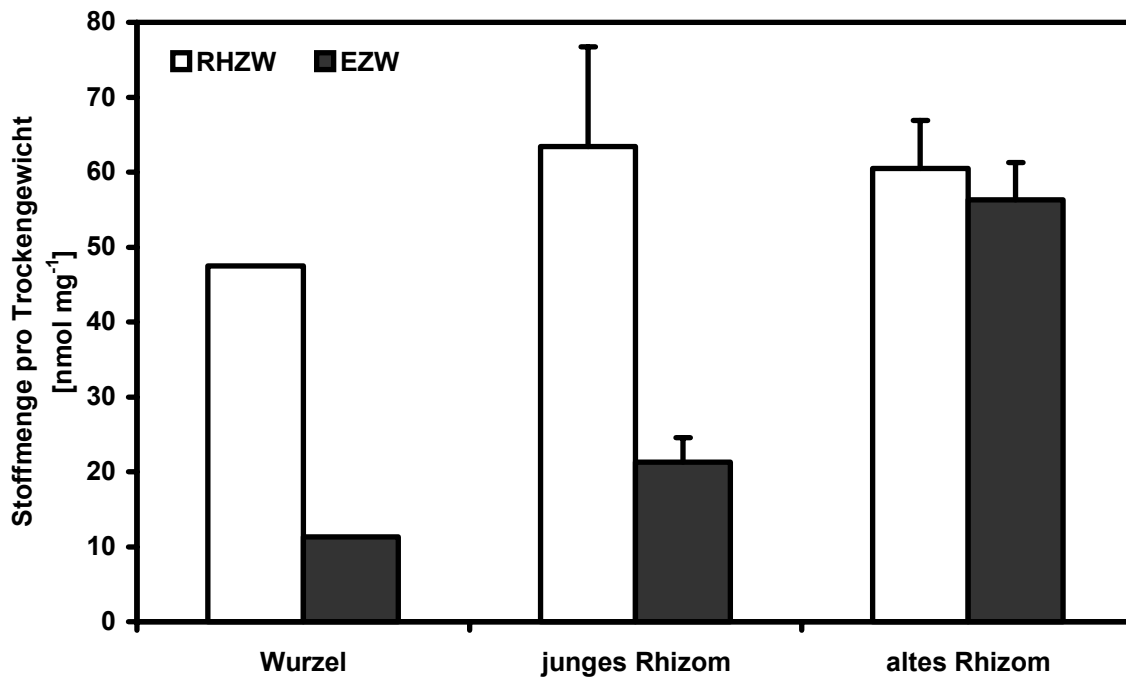


Abb. 4.3: Summen der Lösungsmittelextrakte in *T. glauca* Zellwandisolaten (Fehlerbalken = STABWN; N = 4; Wurzel = Einzelbestimmung)

Als dominierende Substanz konnte in allen Fällen β -Sitosterol festgestellt werden, mit 56-81% der identifizierten Extraktkomponenten. In den Wurzelgeweben ist der β -Sitosterol-Anteil am geringsten (RHZW 56% und 70% in EZW), in den EZW der Rhizomen fand sich am meisten (>80%) (Tab. 4.2). Das Verhältnis von Campesterol zu Stigmasterol ist bei Wurzeln und Rhizomen in etwa umgekehrt, in Wurzelzellwänden dominiert Stigmasterol (18-26%) über Campesterol (11-17%), in Rhizomen findet sich im Verhältnis mehr Campesterol (11-17% bei 7-13% Stigmasterol) (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Lösungsmittelextrakte von *T. glauca* Zellwandisolaten. Werte in Klammern geben die Standardabweichung (mit N = 4) an.

Phytosterin	Wurzel		junges Rhizom		altes Rhizom	
	RHZW ^{a)}	EZW ^{a)}	RHZW	EZW	RHZW	EZW
	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]	[nmol mg ⁻¹]
Campesterol	8.2	1.3	10.7 (\pm 2.8)	2.55 (\pm 0.4)	7.8 (\pm 1.9)	6.5 (\pm 0.3)
Stigmasterol	12.5	2.1	5.3 (\pm 3.9)	1.52 (\pm 0.3)	7.9 (\pm 1.3)	4.6 (\pm 0.7)
β -Sitosterol	26.7	7.9	47.5 (\pm 6.6)	17.2 (\pm 3.1)	44.8 (\pm 3.2)	45.2 (\pm 5.9)

a) Einzelbestimmung.

4.2.2 Suberinanalysen *T. glauca*

Der Gehalt an aliphatischen Suberinmonomeren in rhizodermalen und hypodermalen Zellwänden der Wurzel und der RHZW in jungen und alten Rhizomen unterschied sich im Rahmen der Fehlergrenzen (STABWN mit $N = 4$) nur gering (Abb. 4.4 A). Bei den RHZW der Rhizomen wurden näherungsweise gleiche Werte um 40 nmol mg^{-1} ($40.6 \text{ nmol mg}^{-1}$ und $33.9 \text{ nmol mg}^{-1} = 13.2 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$, $10.8 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) gemessen. Die RHZW der Wurzeln enthielten mit $56.7 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($17.9 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) geringfügig mehr aliphatische Suberinkomponenten jedoch mit einer hohen Standardabweichung. In allen Geweben fanden sich mehr aromatische Suberinbausteine (Ferulasäure und Cumarsäure) als aliphatische Monomeren. Das Verhältnis von (*cis/trans*) Cumarsäure zu (*cis/trans*)Ferulasäure betrug bei allen *T. glauca* RHZW etwa 60:40. In RHZW der Wurzel konnten mit $85.2 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($15.1 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$), mehr aromatische Komponenten als in den Zellwänden der Rhizome ($42.4 \text{ nmol mg}^{-1}$ bzw. $53.9 \text{ nmol mg}^{-1} = 7.56 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ und $10.1 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) nachgewiesen werden.

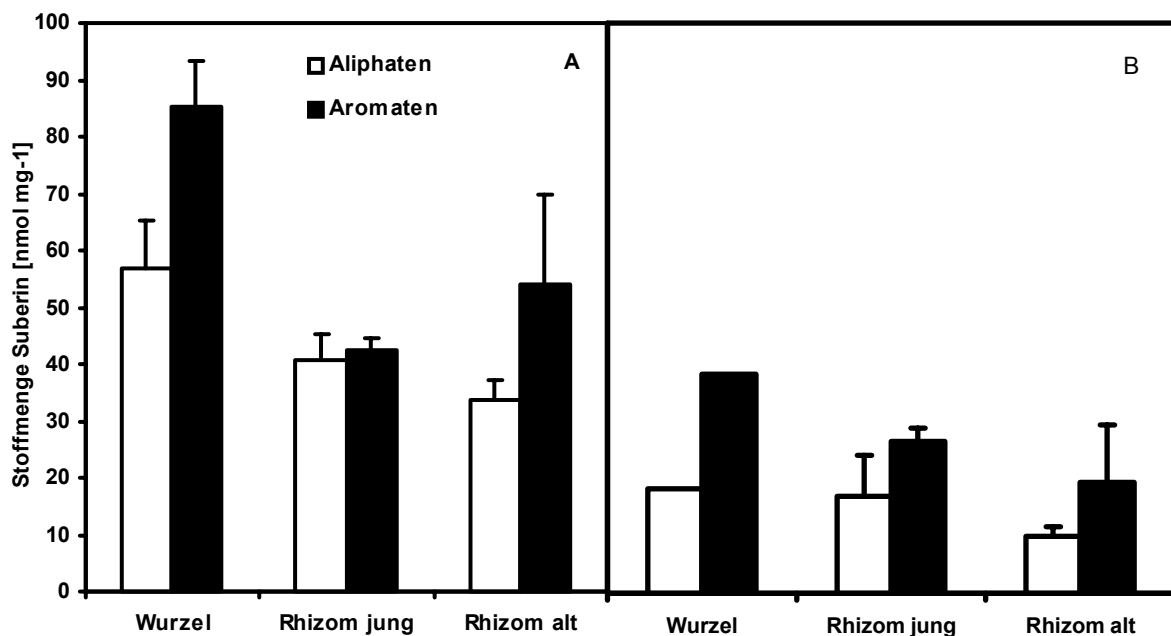


Abb. 4.4: Suberingehalt in *T. glauca* Geweben; Stoffmengen aromatischer und aliphatischer Bestandteile pro Trockengewicht [nmol mg^{-1}]; A = RHZW B = EZW. (Fehlerbalken = StabWN)

Endodermale Zellwände der untersuchten Organe enthielten weniger Suberinmonomeren als die RHZW. In der Wurzel fand sich mit $18.3 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($5.48 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) die größte Menge aliphatischer Bestandteile. $17.1 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($5.02 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) aliphatische Monomeren enthielten EZW des jungen Rhizoms, und das alte Rhizom mit $9.99 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($2.97 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) Aliphatengehalt die geringste Menge. Wie in den RHZW überwog der aromatische Anteil bei allen estergebundenen Zellwandbestandteilen. Über 69% ($38.4 \text{ nmol mg}^{-1}$; $8.81 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) des Wurzel-EZW-Suberins, 61% ($26.6 \text{ nmol mg}^{-1}$; $5.03 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) der jungen Rhizom-EZW, und

über 66% ($19.4 \text{ nmol mg}^{-1}$; $3.56 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) der alten Rhizom-EZW, bestanden aus aromatischen estergebundenen Bestandteilen (Abb. 4.4 B).

Die Monomerenzusammensetzung des aliphatischen Suberins in RHZW der untersuchten Organe wich nur wenig voneinander ab. Es dominierten gesättigte und ungesättigte ω -OH-Säuren (ca. 40%), neben ungesättigten Disäuren (13-19%). Der Gehalt an Monocarbonsäuren betrug bei allen RHZW-Fractionen ca. 13% (Abb. 4.5).

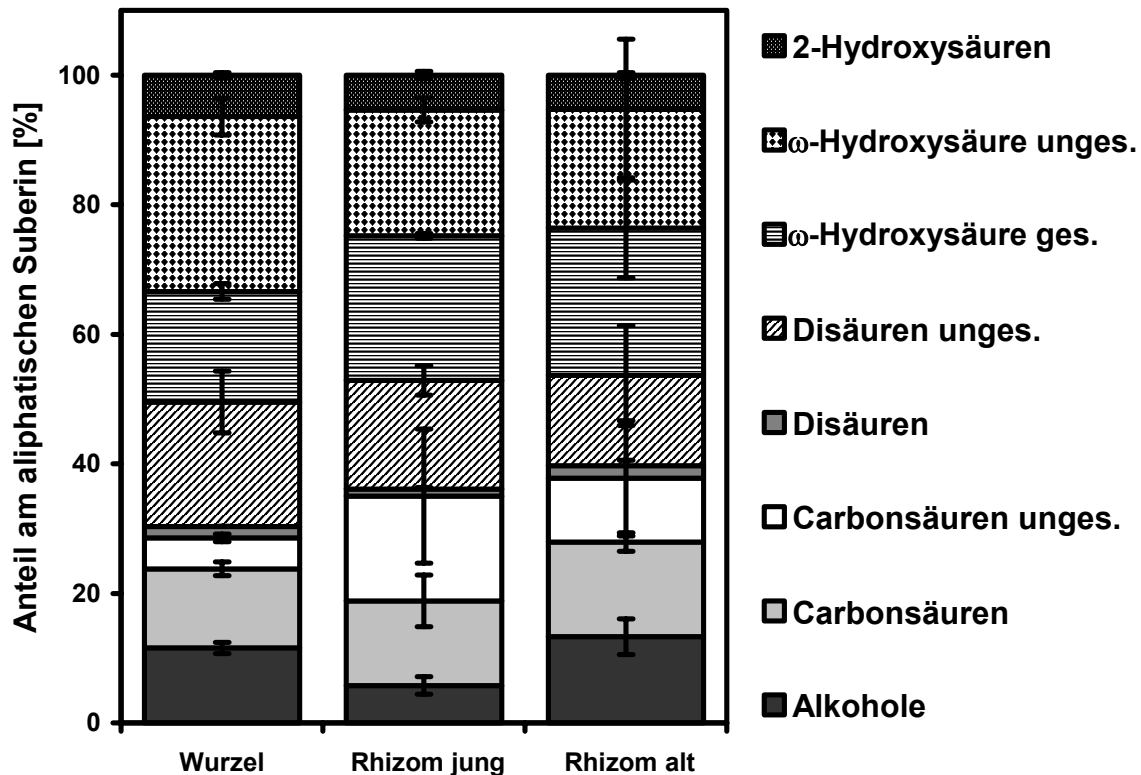


Abb. 4.5: Substanzklassenverteilung der aliphatischen Suberinbestandteile in *T. glauca* RHZW in Prozent der Summe aliphatischen Suberins; (Fehlerbalken = StabWN).

Die aufgeführten Substanzklassen wurden in Kettenlängen von 16-28 Kohlenstoffatomen nachgewiesen. C-18 Monocarbonsäure konnte als gesättigtes, einfach und zweifach ungesättigtes Isomer detektiert werden. Die Mittlere Kettenlängen (mKl) der einzelnen Gewebe unterschied sich nicht voneinander, Säuren und ω -OH-Säuren erreichten eine mKl von 23 C-Atomen, 2-OH-Säuren 22-C-Atome. Bei allen anderen Substanzklassen erreichten die Kettenlängen weniger als 19 C-Atomen.

Die Monomerenzusammensetzung des EZW-Suberins der Wurzel unterschied sich von der der Rhizome. Das Suberin der Wurzel-EZW ähnelte in seiner Zusammensetzung der des RHZW. In EZW der Rhizome konnten in der aliphatischen Suberinfraction nur gesättigte und ungesättigte Monocarbonsäuren, sowie 2-Hydroxysäuren nachgewiesen werden (Abb. 4.6). In

EZW-Suberin konnten Kettenlängen von 16-26 Kohlenstoffatomen nachgewiesen werden, C₁₈-Säure wurde, analog der RHZW-Fraktion, in den drei Isomeren Formen gefunden.

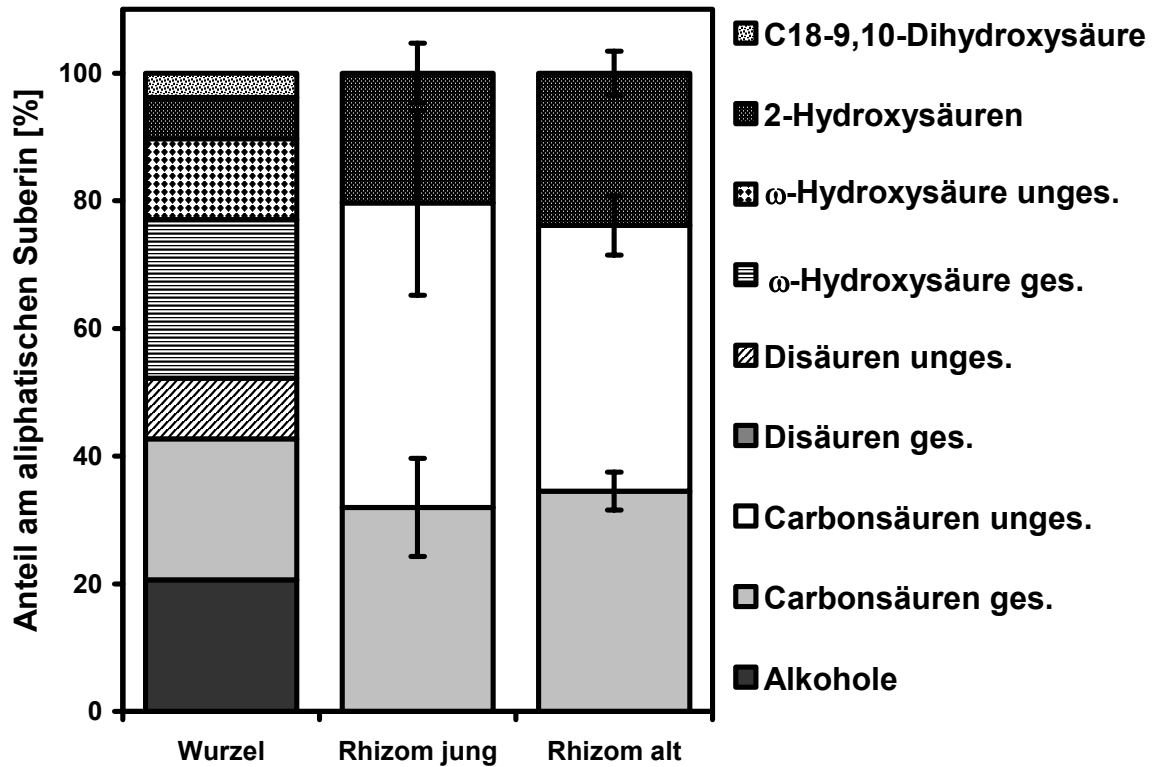


Abb. 4.6: Substanzklassenverteilung der aliphatischen Suberinbestandteile in *T. glauca* EZW in Prozent der Summe aliphatischen Suberins; (Fehlerbalken = StabWN).

Die mittlere Kettenlänge des EZW-Suberins erreichte nur bei 2-OH-Säuren im Wurzelgewebe 23 C-Atome, im Rhizomgewebe 21. Die mKl aller weiteren Substanzklassen überschritt nicht die Anzahl von 19 C-Atomen.

4.2.2.1 Konnektivität *T. glauca*

Die Berechnung der Konnektivität des Suberins, ergab bei Wurzelgeweben einen Überschuss von 18% Carboxygruppen, in RHZW von jungem Rhizom 27% freie Säuregruppen und im alten Rhizom mit 20% freien Carboxygruppen einen etwas höheren Verknüpfungsgrad.

Für die Verknüpfung in Wurzel-EZW wurden 24% freie Carboxygruppen, für junges Rhizom-EZW-Suberin 84% freie Säuregruppen berechnet. Alte Rhizom-EZW enthielten 76% freie, nicht mit Suberin-Hydroxygruppen veresterte Säuren.

4.2.3 Ligninanalysen *T. glauca*

Die Ergebnisse der Thioacidolysen zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den RHZW der einzelnen Fraktionen (Abb. 4.7). Ein leicht steigender Trend von Wurzel RHZW ($30.9 \text{ nmol mg}^{-1}$, $12.9 \mu\text{g mg}^{-1}$), über junges Rhizom ($38.9 \text{ nmol mg}^{-1}$, $12.9 \mu\text{g mg}^{-1}$) zu altem Rhizom ($50.5 \text{ nmol mg}^{-1}$, $19.7 \mu\text{g mg}^{-1}$) ließ sich feststellen, jedoch konnten keine signifikanten Steigerungen festgestellt werden.

Der Ligningehalt in EZW war bei den Rhizomen in etwa gleich hoch ($22.6 \text{ nmol mg}^{-1}$ bzw. $17.8 \text{ nmol mg}^{-1} = 14.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ und $11.2 \mu\text{g mg}^{-1}$). Wurzel-EZW enthielt mit $69.3 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($25.3 \mu\text{g mg}^{-1}$) die dreifache Menge an Lignin in EZW und damit auch deutlich mehr als in den RHZW gefunden wurde.

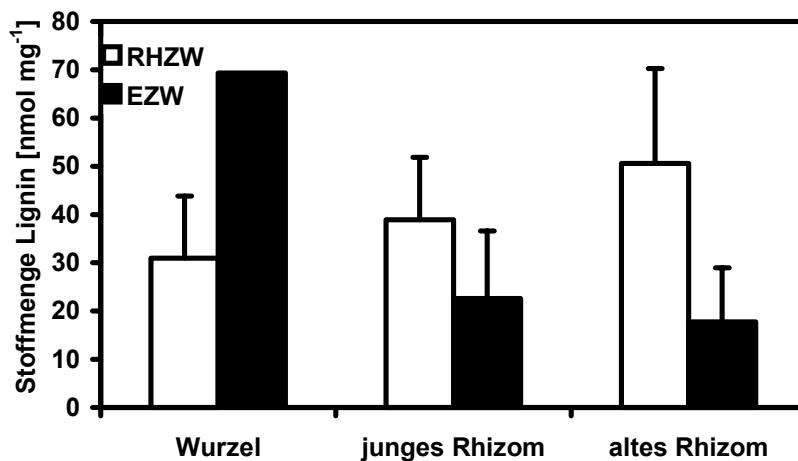


Abb. 4.7: Stoffmenge Lignin in *T. glauca* Zellwandisolaten, Wurzel EZW = Einfachbestimmung; (Fehlerbalken = STABWN, N = 4).

Die Monomerenzusammensetzung im Lignin unterschied sich nicht zwischen den Geweben, Alle drei Ligninmonomeren konnten nachgewiesen werden, gezeigt wird daher nur die Monomerenverteilung in rhizodermalen-hypodermalen Zellwänden (Abb. 4.8).

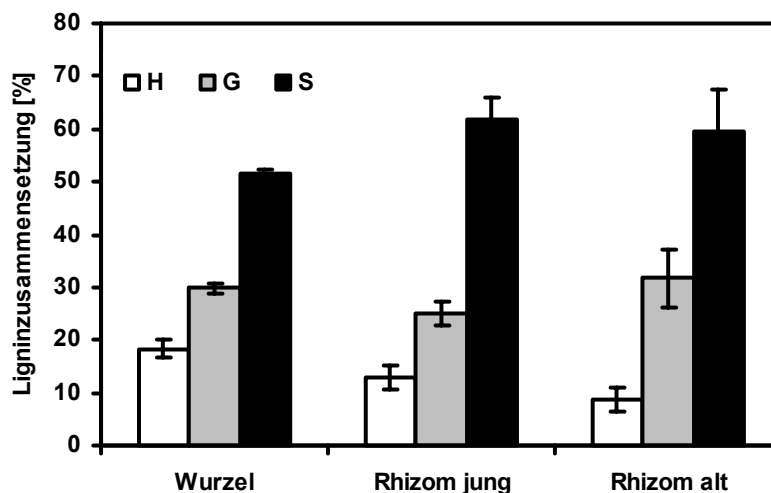


Abb. 4.8: Monomerenverteilung von Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyleinheiten im Lignin von RHZW in *T. glauca*; (Fehlerbalken = STABWN, N = 4).

4.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu *T. glauca* Rhizomen und Wurzeln

Pflanzen der Gattung *Typha* wachsen in sumpfigen und häufig überfluteten Gelände. Die Wurzeln und Rhizome müssen daher in besonderer Weise diesem Lebensraum Rechnung tragen. Nicht nur die Wasseraufnahme muss reguliert werden, um unkontrolliertes Auswaschen von Zellinhaltsstoffen zu vermeiden, auch den beinahe anaeroben Bedingungen unter stehendem Wasser oder im Schlamm muss Rechnung getragen werden, indem die Wurzeln aus der Luft mit Sauerstoff versorgt werden müssen. Hierzu bildet die Pflanze longitudinale luftgefüllte Interzellularen im Cortexgewebe zwischen Hypodermis und Endodermis aus (JACKSON UND ARMSTRONG, 1999). Um zu vermeiden, dass die Interzellularen voll Wasser laufen, müssen diese gegen Luftverlust und eindringendes Wasser abgedichtet sein. Daher war zu vermuten, dass die Zellwände der submersen Barrieregewebe bei diesen Spezies besonders stark hydrophobisiert sind. Bislang wurden allerdings lediglich fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um diese Hypothese zu untermauern (SEAGO *et al.*, 1999, 1994).

Mit den hier gezeigten Suberin, und Ligninanalysen isolierter RHZW und EZW konnten die mikroskopischen Suberin-Befunde erstmals quantifiziert werden. Dabei konnte herausgestellt werden, dass die Suberin und Ligninmengen niedriger lagen, als erwartet. Im Vergleich mit anderen monocotylen Arten lagen die ermittelten Werte für aliphatische Suberinkomponenten bei RHZW und EZW in der unteren Hälfte der bei früheren Untersuchungen gefundenen Suberinmengen für monocotyle Pflanzenwurzeln (ZEIER und SCHREIBER, 1998a). Die Ligninmengen im RHZW von *T. glauca* waren jedoch höher als bislang an anderen Spezies festgestellte Werte. Dies lässt sich hier aber vermutlich als Artefakt der Präparation zurückführen, die Pflanzenteile wurden ohne vorherige enzymatische Behandlung manuell getrennt und getrocknet, und erst später einer Enzymbehandlung ausgesetzt, der aber keine weitere mechanische Isolation folgte.

Da vor allem bei den Rhizomen evtl. anheftendes Cortexgewebe von stark lignifizierten Leitbündeln (Abb. 4.1, **H**, hohle Pfeile) durchzogen war, kann man davon ausgehen, dass die hohen Ligninwerte durch diese Artefakte beeinflusst waren. Unter diesem Gesichtspunkt waren auch die Lignin-Werte für die EZW zu beurteilen, so dass ausgehend vom Ligningehalt keine Aussage über eine Funktion getroffen werden kann.

Da die gefundenen Stoffmengen lediglich auf das Trockengewicht der Gewebeteile bezogen werden konnten, war die Herstellung eines Struktur-Funktionszusammenhanges nicht möglich. Durch verbesserte Präparation und dadurch den Ausschluss von Artefakten, wäre es denkbar, dass man höhere Konzentrationen an Suberin feststellt, bedingt durch die großen Durchmesser der Organe, würde sich möglicherweise bei einer Flächenbelegung der Gehalt an Suberin erniedrigen.

Dennoch lässt sich ein Trend erkennen, insofern, dass RHZW der vergleichsweise nur kleine luftgefüllte Hohlräume aufweisenden Rhizome weniger Suberin enthalten als die RHZW der Wurzeln, die meist ein ausgeprägtes Aerenchym zeigen. Es wäre daher möglich, dass die Pflanze in den Wurzeln eine höhere Rückhaltekapazität für Sauerstoff entwickelt hat als im Rhizom, da die luftgefüllten Hohlräume zudem noch in dicke Cortexschichten eingebunden sind, und nicht bis an die RHZW heranreichen. Weitergehend kann man aber auch vermuten, dass der im allgemeinen Vergleich niedrigere Suberingehalt der submersen Pflanzen eine Anpassung an das anoxische reduktive Milieu in den schlammigen Substraten ist, in denen diese Arten wachsen. Durch austretenden Sauerstoff ist es der Wurzel möglich die Rhizosphärenchemie zu beeinflussen, indem potentiell toxische Metall-Ionen zu Wasserunlöslichen und ungiftigen Oxidationsstufen aufoxidiert werden (ARMSTRONG und ARMSTRONG, 1999). Hinweise auf diese Strategie bieten Untersuchungen mit Sauerstoffmikroelektroden an amazonischen Baumwurzeln in Überflutungswäldern (DE SIMONE *et al.*, 2002).

5 Chemische Zusammensetzung von Wurzelperidermen der Arten: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Fagus sylvatica* L., *Picea abies* (L.) Karst.

In Kooperation mit DR. HEINZ CONERS (Kassel/Göttingen), wurden die Baumwurzeln im Freiland gewonnen, nachdem die radiale und axiale Leitfähigkeit mithilfe von Miniatur-Saftflusssensoren ermittelt war. Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Wurzelperiderme enzymatisch behandelt und mechanisch isoliert.

5.1 Anatomische Betrachtung der Wurzelperiderme von Eiche, Buche und Fichte

Alle untersuchten Wurzeln waren von der Spitze an mykorrhiziert und befanden sich im sekundären Stadium des Dickenwachstums. Eine Endodermis konnte daher nicht isoliert werden. Eine Zählung der Jahresringe bei 1.0 mm dicken Wurzeln ergab ein Alter von ca. fünf Jahren bei allen untersuchten Arten.

Die Periderme wurden in Größenklassen eingeteilt und lichtmikroskopisch untersucht, um die Anzahl der Peridermzellschichten zu ermitteln. Mit zunehmenden Durchmesser wurde eine steigende Anzahl Zellschichten gefunden, bei Eiche 4-22, bei Buche 2-9 und bei Fichte 1-3 Peridermschichten (Abb. 5.1).

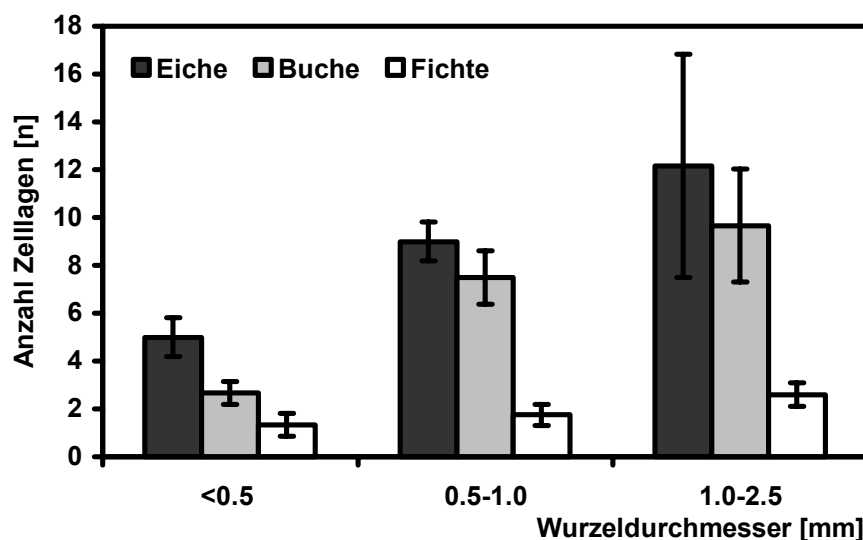


Abb. 5.1: Anzahl der Zellschichten in Eichen-, Buchen- und Fichten-Wurzelperiderm aufgeteilt nach Größenklassen (Abb. nach CONERS, 2001); (Fehlerbalken = StabWN).

Die Anzahl der Peridermschichten nahm nicht linear mit dem Durchmesser zu (CONERS, 2001). Nach der Bestimmung der Anzahl der Peridermschichten wurde die Oberfläche von 2-4 cm langen Wurzelsegmenten bestimmt. Die Oberflächenbelegung nicht-extrahierter Buchenwurzelsolarte erreichte mit einer Steigerung von 1.1 mg cm^{-2} auf 8.3 mg cm^{-2} den größten Zuwachs, gefolgt von Eichenwurzelperiderm mit 1.6 mg cm^{-2} auf 5.3 mg cm^{-2} und Fichtenwurzelperiderm, die mit 2.6 mg cm^{-2} auf 2.7 mg cm^{-2} kaum an Gewicht zunahmten, jedoch bereits ein hohes Ausgangsgewicht besaßen (Abb. 5.2). Nach einer Extraktion mit MeOH/CHCl₃ verloren isolierte Periderme der Wurzeln mit einem Durchmesser von $<0.5 \text{ mm}$ im Mittel 7% an Gewicht, bei 0.5-1 mm Durchmesser 4-23% (Fichte 4% Buche 8%, Eiche 23%) und bei 1-2 mm dicken Wurzeln wurde ein mittlerer Gewichtsverlust von 14% bei allen drei Arten festgestellt.

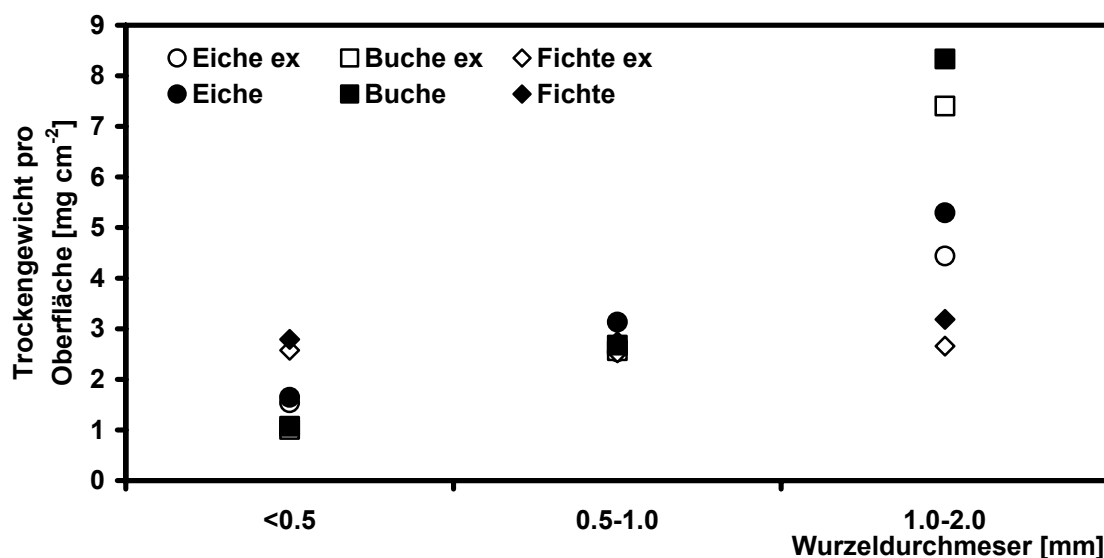


Abb. 5.2: Trockengewicht der Baumwurzelperiderme nach der enzymatischen Isolation vor und nach Extraktion mit MeOH/CHCl₃ aufgeteilt nach Größenklassen des Wurzelradius. Die Werte stellen die Mittelwerte aus allen gemeinsam gewogenen Peridermen einer Durchmessergrößenklasse dar.

5.2 Extrakte aus Baumwurzelperiderm

Alle Peridermartentypen verloren durch Lösungsmittelextraktion mit MeOH/CHCl₃ signifikant an Gewicht, Tab. 5.1 zeigt die Gewichtsverluste durch Extraktion, die über alle Arten bei den dicksten Wurzeln am größten war (11-16%), mit Ausnahme des 0.5-1.0 mm dicken Eichenwurzelperidermes, welches fast 19% seines Gewichtes durch Extraktion verlor.

Die von allen drei Arten gewonnenen Extrakte enthielten keine substantiellen Mengen an langkettigen aliphatischen Verbindungen, in Eiche und Buche konnten homologe *n*-Alkohole mit 20-26 C-Atomen in geringen Mengen nachgewiesen werden. Grosse Mengen verschiedener Triterpene und Phytosterine dominierten in allen Peridermextrakten. Da eine

exakte Zuordnung dieser Substanzen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, wurde keine Quantifizierung der Extraktkomponenten durchgeführt.

Tab. 5.1: Extraktmassen der Wurzelperiderme von Eiche, Buche und Fichte.

Durchmesser:	<0.5 mm		0.5-1.0 mm		1.0-2.0 mm	
	[mg cm ⁻²] ^{a)}	[%] ^{b)}	[mg cm ⁻²]	[%]	[mg cm ⁻²]	[%]
Eiche	0.11	6.4	0.59	18.8	0.85	16.1
Buche	0.06	7.6	0.11	8.2	0.93	16.6
Fichte	0.21	5.8	0.22	4.1	0.53	11.1

a) Extraktmasse aus allen gemeinsam extrahierten Peridermstücken einer Art und Durchmesserklasse; b) Prozentualer Anteil an der Gesamtmasse vor der Extraktion.

5.3 Analyse der Biopolymere im Baumwurzelperiderm

Die enzymatisch isolierten und extrahierten Wurzelperiderme wurden depolymerisiert und der Anteil von Suberin und Lignin gaschromatographisch bestimmt. Die erhaltenen Stoffmengen der Monomeren wurden auf die Oberfläche der isolierten Wurzelfragmente bezogen.

5.3.1 Suberinmengen im Baumwurzelperiderm

Die Suberinmengen der Wurzelperiderme stiegen bei Eiche von 437 nmol cm⁻² auf 1805 nmol cm⁻² (Faktor 4.1), sowie bei und Buche von 212 nmol cm⁻² auf 1034 nmol cm⁻² (Faktor 4.8) mit zunehmendem Durchmesser stark an. Fichtensuberin konnte mit dem geringsten Anfangswert von 120 nmol cm⁻² nur 14% zusätzliches Suberin bei größerem Durchmesser aufweisen und enthielt mit 137 nmol cm⁻² ebenfalls die geringsten Mengen in dieser Größenklasse (Abb. 5.3).

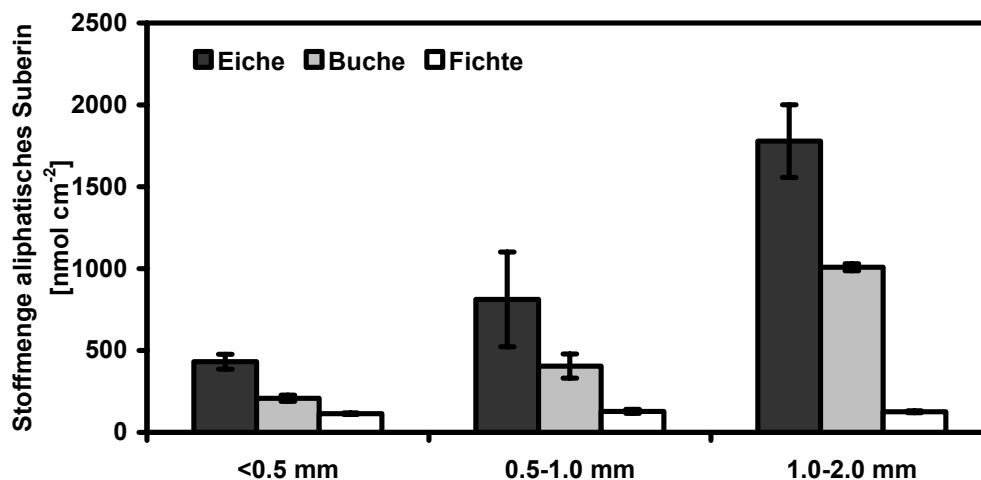


Abb. 5.3: Stoffmengen aliphatischen Suberins in Wurzeln von Eiche, Buche, Fichte aufgeteilt nach Durchmesserklasse; Angaben in nmol cm⁻² Wurzeloberfläche, (Fehlerbalken = StabWN).

5.3.2 Ligninmengen im Baumwurzelperiderm

Der Ligningehalt von Eichenperiderm stieg signifikant um 89% von 98.2 nmol cm⁻² in der kleinsten Durchmesserklasse auf 185 nmol cm⁻² in der nächst Größeren, aber nur noch unwesentlich auf 190 nmol cm⁻² zum größten untersuchten Durchmesser. Einen signifikanten Anstieg der Ligninmengen in Buchenperiderm ließ sich erst von der zweiten zur dritten Größenklasse um den Faktor 4 von 60.8 nmol cm⁻² auf 242 nmol cm⁻² feststellen. Der Ligningehalt der untersuchten Fichtenwurzelperiderme schwankte innerhalb der drei Durchmesserklassen nur wenig um den Mittelwert von 163 nmol cm⁻².

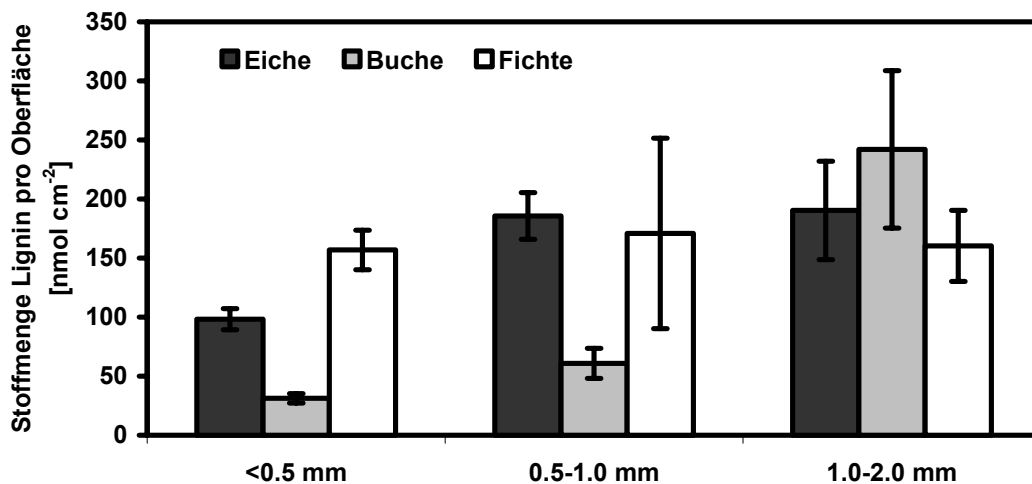


Abb. 5.4: Stoffmenge Lignin in Wurzelperiderm von Eiche, Buche und Fichte, Angaben in nmol cm⁻²; sortiert nach Wurzelradius; (Fehlerbalken = StabWN).

5.3.3 Suberinzusammensetzung von Baumwurzelperiderm

Die Suberinzusammensetzung von Eichenwurzelperiderm unterschied sich in den unterschiedlichen Wurzelradiuskategorien nur geringfügig (Abb. 5.5 A). Die Hauptkomponente bildeten ω -Hydroxysäuren mit im Durchschnitt 82% Anteil vom Gesamtsuberin. Davon entfielen im Mittel 34% auf die ungesättigte C₁₈- ω -Hydroxysäure, 14% auf gesättigte und weitere 34% auf Phloionolsäure (9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure). Weitere Bestandteile waren gesättigte Dicarbonsäuren mit durchschnittlich 5% Anteil, und ungesättigte Dicarbonsäuren mit im Mittel 2% Anteil am Gesamtsuberin. Etwa zu einem Prozent konnten Monocarbonsäuren detektiert werden und zu durchschnittlich 6% waren Alkohole enthalten. Der Anteil identifizierter Aromaten lag bei 2% im Mittel aller Durchmessergruppen. 2-OH-Säuren wurden nicht nachgewiesen.

Buchenperiderm (Abb. 5.5 B) unterschied sich von Eichenperiderm vor allem in einem niedrigeren Anteil von durchschnittlich 26% an ungesättigter C₁₈- ω -Hydroxysäure, auch der Mittelwert aller ω -OH-Säuren erreichte nur 72% vom Gesamtsuberin. Die Zusammensetzung

innerhalb der drei Durchmesserklassen zeigte bei der mittleren Klasse der 0.5-1.0 mm messenden Wurzeln einen stark erhöhten Anteil an Phloionolsäure (42%), der aber nur mit 27% Anteil bei dickeren Wurzeln wieder gefunden wurde. Ungesättigte Disäuren waren mit durchschnittlich 5% doppelt so häufig wie in Eichenwurzeln. Der Alkoholanteil war mit 6% dem des Eichenwurzelperiderm äquivalent, ebenso der Aromatenanteil mit 2%. 2-OH-Säuren wurden in sehr geringen Mengen unter 1% identifiziert.

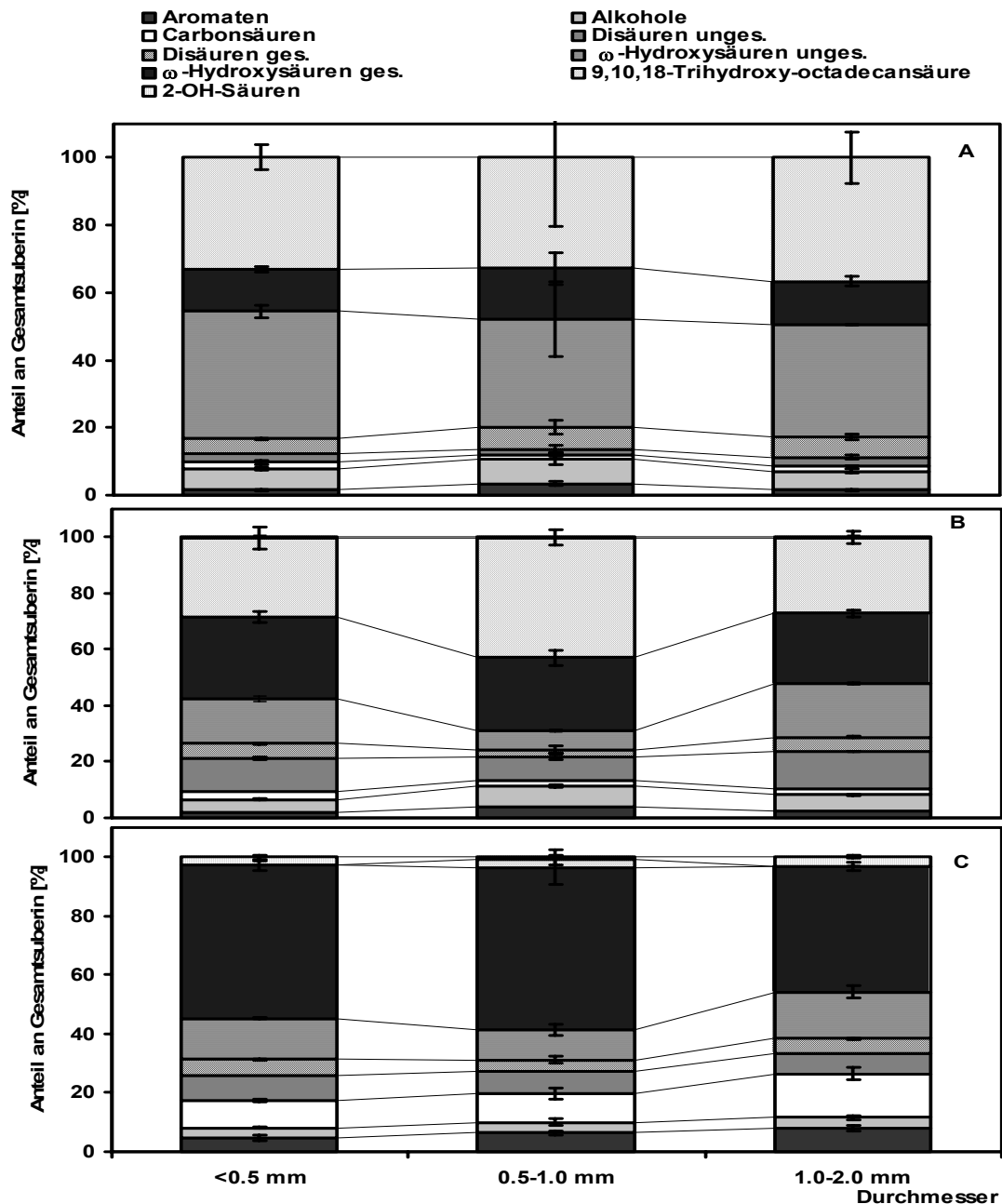


Abb. 5.5: Substanzklassenverteilung im Suberin von **A** Eichenwurzelperiderm; **B** Buchenwurzelperiderm; **C** Fichtenwurzelperiderm unterschiedlichen Durchmessers, Werte in Prozent der Gesamtsuberin-Stoffmenge; (Fehlerbalken = StabWN).

Suberin im Periderm der Fichtenwurzel (Abb. 5.5 C) unterschied sich von den anderen Arten vor allem durch einen sehr geringen Anteil von maximal 2% an Phloionolsäure. Ein entsprechend größerer Anteil an ungesättigter C₁₈- ω -Hydroxysäuren (50%) wurde in den Fichtenwurzelperidermen gefunden. ω -Hydroxysäuren bildeten im Mittel 62% der Stoffmenge des Suberins. Innerhalb der Größenkategorien konnte man von den 0.5-1.0 mm im Durchmesser messenden Wurzeln zu den 1.0-2.0 mm Wurzeln einen Anstieg des Säuregehaltes von 10% auf 15% Anteil vom Gesamtsuberin beobachten. Auch der Aromatenanteil stieg geringfügig von 5% auf 8%. Gesättigte Disäuren blieben unverändert bei 7% im Mittelwert und Alkohole bei 4% im Mittel aller drei Größenklassen. Der Anteil an 2-OH-Säuren war mit durchschnittlich 3% deutlich höher als in den anderen untersuchten Arten.

Der Anteil ungebundener Säuregruppen der Wurzelperidermen von Eiche betrug durchschnittlich 8%, bei Buchenwurzeln 5%, und bei Fichtenwurzeln 56%.

Die Verteilung der mittleren Kettenlängen zwischen den Arten und Durchmesserklassen variierte nur wenig. Fichtenperiderm zeigte in allen Durchmesserklassen die längste durchschnittliche Kettenlänge errechnet aus der Summe aller aliphatischen Komponenten, Buchenperiderm durchschnittlich die Kürzesten (Abb. 5.6). Buchenperiderm enthielt aber die längsten mittlere Kettenlängen einzelner Substanzklassen, Alkohole erreichten durchschnittlich 22 C-Atome, 2-OH-Säuren sogar durchschnittlich 24 C-Atome, bei Fichte erreichten die Disäuren maximal 21 C-Atome und in Eichenperiderm wurden nur Alkohole mit mehr als 20 C-Atomen gefunden, alle anderen Substanzklassen erreichten durchschnittlich nur etwa 18-18.5 C-Atome.

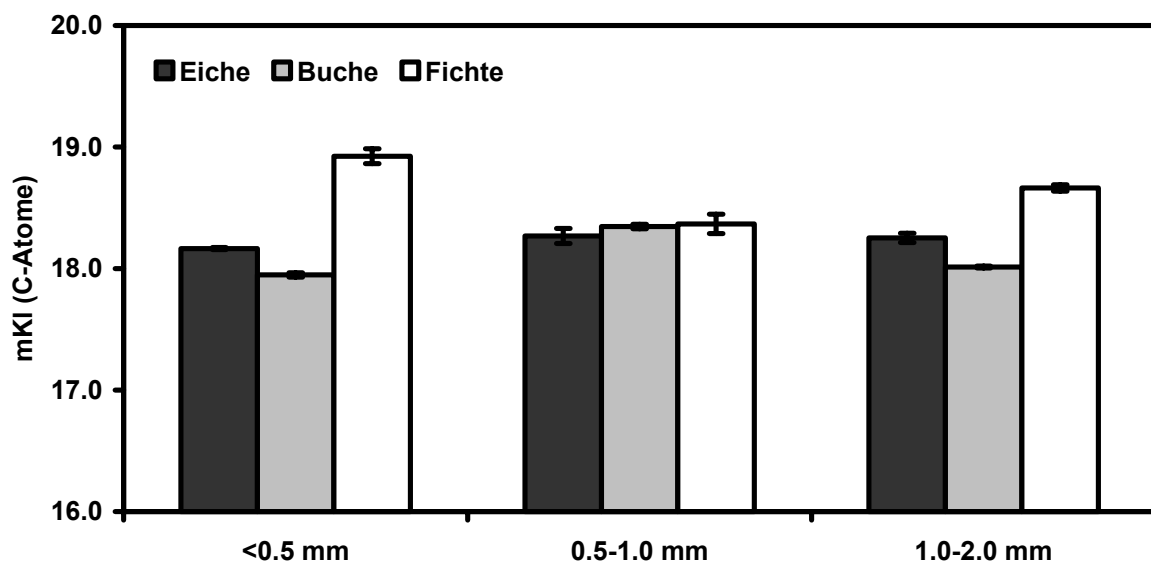


Abb. 5.6: mittlere Kettenlänge des aliphatischen Suberins der Wurzelperiderme dreier Durchmesserklassen von Eiche, Buche und Fichte. (Fehlerbalken = StabWN).

5.3.4 Ligninzusammensetzung von Baumwurzelperiderm

Die Anteile der Ligninmonomere nach einer Thioacidolysereaktion zeigten im Wurzelperiderm der Eiche (Abb. 5.7 A) zu durchschnittlich 72% Guaiacyl-Einheiten in den kleinen Durchmesser-Größenklassen, und 85% in der größten Kategorie. Der Anteil an Syringyl-Einheiten betrug etwa 28% bzw. 15%, nach dem der Anteil an Hydroxyphenyl-Einheiten im Durchschnitt kleiner als ein Prozent war.

Buchenwurzelperiderm setzt sich ähnlich zusammen jedoch mit durchschnittlich 88% Guaiacyl-Einheiten und nur etwa 12% Syringyl-Monomer im Mittel aller Größenkategorien (Abb. 5.7 B). Hydroxyphenyl Einheiten wurden nur in Spuren detektiert.

Abweichend von den anderen Arten konnten in Fichtenwurzelperidermlignin durchschnittlich 15% Hydroxyphenyl-Monomere nachgewiesen werden. Hauptisomer war aber auch bei diesen Peridermen der Guaiacyl-Baustein mit im Mittel 85% Gehalt bei allen Größenkategorien (Abb. 5.7 C).

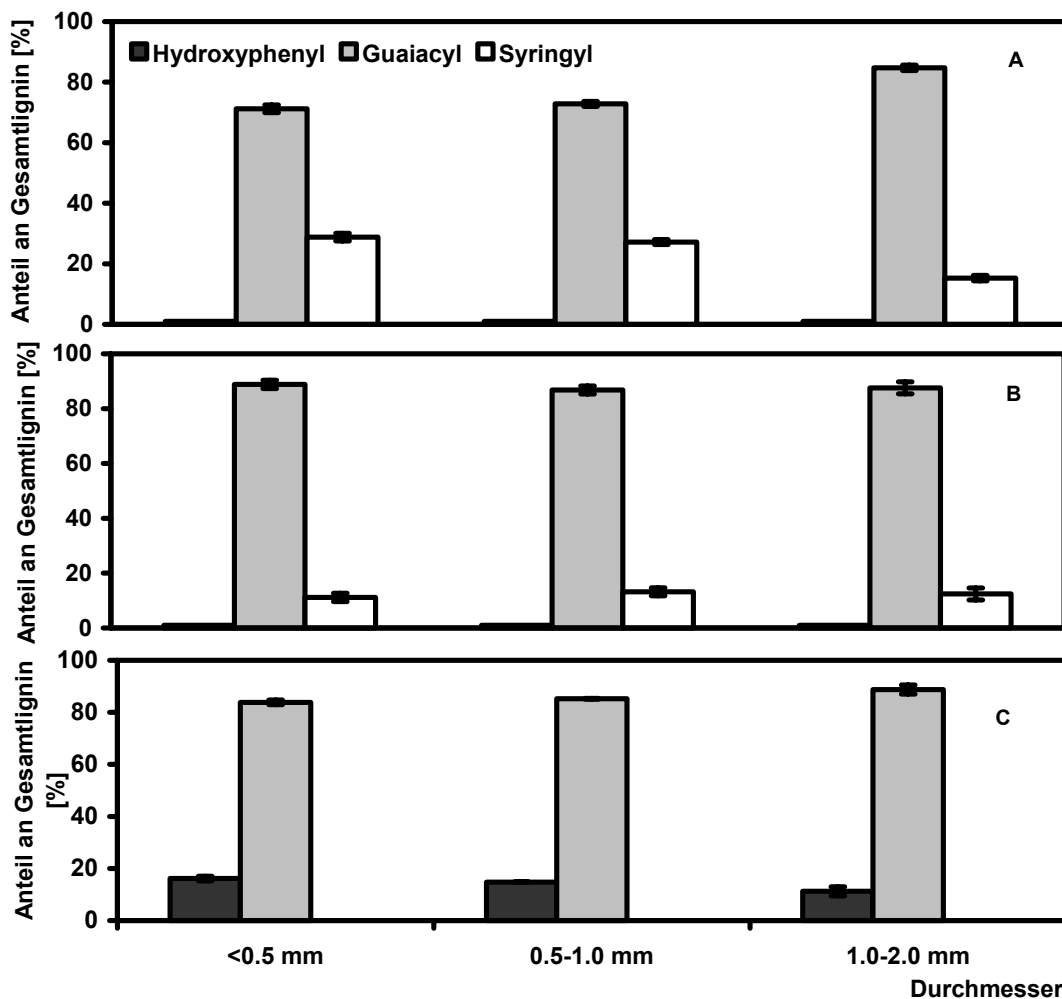


Abb. 5.7: Ligninzusammensetzung der Wurzelperidermen von A Eiche; B Buche; C Fichte; Angaben in % von der Gesamtlignin-Stoffmenge; (Fehlerbalken = StabWN).

5.4 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu Baumwurzelperiderm

In dieser Arbeit wurde erstmals kombiniert die Suberin und Ligninzusammensetzung von Wurzelperidermen der Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Lieb.) und Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.), sowie von Fichtenwurzelperidermen (*Picea abies* (L.) Karst.) untersucht. Hierbei konnte für die Stoffmengen an Suberin eine Mengenreihenfolge von Eiche>Buche>>Fichte über alle Wurzeldurchmesser und für die Ligninmengen eine Reihenfolge von Fichte>Eiche>>Buche bei Wurzeldurchmessern von <0.5-1.0 mm festgestellt werden. Ligninmengen in Wurzeln mit 1.0-2.0 mm Durchmesser unterschieden sich nicht. Die Stoffmenge Suberin pro Peridermschicht unterschied sich nur in der größten Durchmesserklasse (1.0-2.0 mm) signifikant (Abb. 5.8).

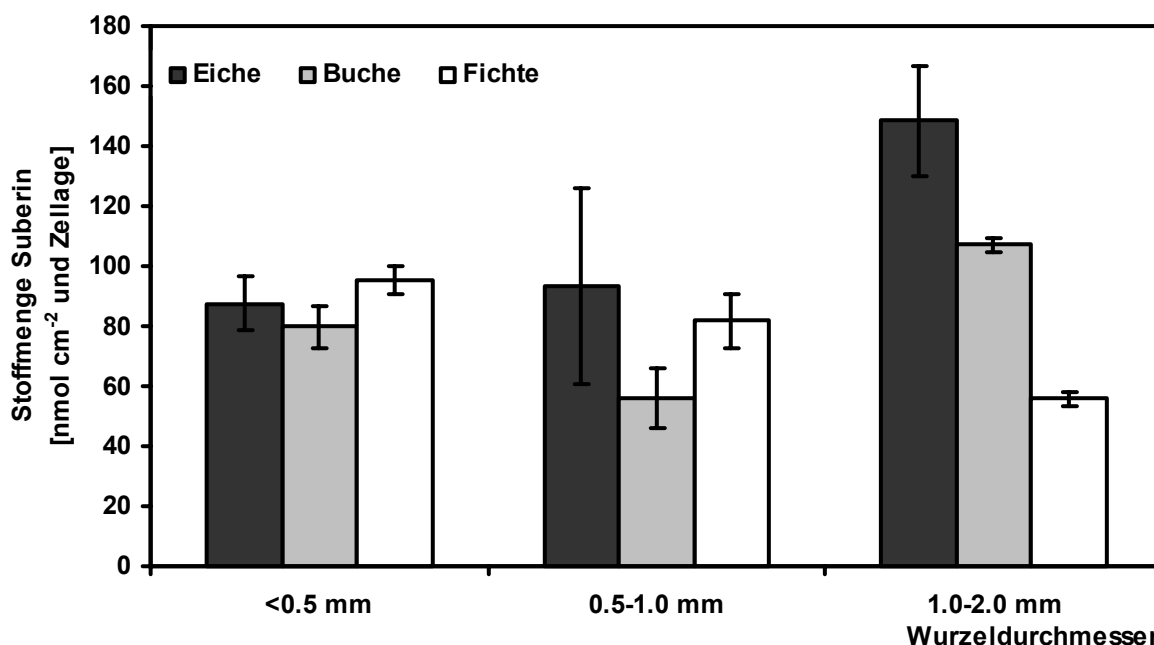


Abb. 5.8: Stoffmenge Suberin in einzelnen Zellschichten von Baumwurzelperiderm; Angaben in nmol cm^{-2} und Zellschicht^{-1} ; (Fehlerbalken = StabWN).

Alle drei untersuchten Baumarten besitzen artspezifische Unterschiede in der Suberinzusammensetzung der Wurzelperidermis (Periderm). Innerhalb einer Art gab es bei keiner der drei untersuchten Durchmessergruppen große Unterschiede in der Zusammensetzung mit der Ausnahme von Buchenperiderm mit 0.5-1.0 mm Durchmesser. Hier wurde ein gegenüber den anderen Isolaten dieser Art erhöhter Anteil an 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure und ein niedrigerer Anteil an 18-Hydroxy-9-encarbonsäure festgestellt (Abb. 5.5 B).

Suberin in Fichtenwurzelperiderm unterschied sich stark von den Peridermen der Laubbaumarten, durch einen sehr geringen Anteil an 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure, welcher durch einen entsprechend hohen Anteil an ungesättigter C₁₈- ω -Hydroxysäure ausgeglichen wurde. Hieraus ließ sich eine Erklärung für den hohen Anteil ungebundener Carboxyfunktionen von nahezu 56% ableiten. Da die Trihydroxysäure drei Hydroxyfunktionen zur Veresterung mit gleichfalls detektierten Monomeren Säuren beisteuert, war die Anzahl freier Säuregruppen in den Peridermen mit hohem Phloionolsäuregehalt niedriger, als in den Fichtenperidermen mit sehr geringem Anteil an dieser Verbindung. Suberin in Fichtenperidermen besitzt daher geringere Möglichkeiten zur Quervernetzung als das Suberin der anderen Arten. Zudem konnte in Fichtenperidermen ein hoher Anteil an Monocarbonsäuren festgestellt werden, der weit über den bei den Laubbaumarten detektierten Werten lag.

Der Suberingehalt in Fichtenwurzelperiderm zeigte gute Übereinstimmung mit Literaturdaten (MATZKE und RIEDERER, 1991) von Fichtenwurzeln mit einem Durchmesser von 7.0-10 mm wurden 593 mg m⁻² Suberinmonomere isoliert. Im Rahmen dieser Dissertation wurden in Wurzelperiderm von 1.0-2.0 mm Durchmesser messenden Wurzeln 420 mg m⁻² (1.38 mmol m⁻²) Suberinmonomere gefunden. Die prozentuale Suberinzusammensetzung der Substanzklassen entsprach ebenfalls den in der Literatur genannten Werten, mit der Ausnahme, dass in dieser Arbeit zusätzlich aliphatische Alkohole und aromatische Bestandteile detektiert und quantifiziert wurden.

Wurzelperiderme der anderen Arten wurden bislang noch nicht analysiert, hier verwendete Vergleichswerte wurden von HOLLOWAY (1983) mit der Zusammensetzung der Borke von Eiche und Buche ermittelt. Wie in den meisten oberirdischen Abschlussgeweben, fanden sich in der Borke große Anteile an epoxidierten Molekülen der ungesättigten C₁₈- ω -Hydroxysäure (23-28%), die in den Wurzeln nicht gefunden wurde, allerdings entsprechend große Mengen an der nicht epoxidierten Form. Große Mengen der Phloionolsäure (25-26%) wurden ebenfalls in der Borke von Eiche und Buche gefunden. Der hohe Anteil an gesättigten ω -Hydroxysäuren in den Wurzelperidermen konnte durch die Messungen an der Borke bestätigt werden, auch die Kettenlängenverteilung ist vergleichbar, wenn auch in der Borke etwas höhere Anteile längere Kettenlängen festgestellt wurden, jedoch wurde bei diesen Untersuchungen nicht die gewichtete (auf die Stoffmenge bezogene) Kettenlänge ermittelt, wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt, sondern lediglich der prozentuale Anteil der jeweiligen Kettenlängen am Gesamtsuberin. Die Gesamtmenge Suberin ließ sich aus der Literatur nur auf bereits extrahierte Borkenperiderme bezogen ausrechnen, die Suberinmenge für Buchenperiderm wurde dort zu 483 $\mu\text{g mg}^{-1}$ der Trockengewichts-Masse berechnet und Eichenperiderm enthielt 397 $\mu\text{g mg}^{-1}$ Suberinmonomer. Verglichen mit der bei den Wurzeln festgestellten Masse von maximal 135 $\mu\text{g mg}^{-1}$ in Eiche und 44.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ in Buche scheint die Borke ein Vielfaches des Suberins der Wurzeln zu enthalten.

Funktionale Aspekte zur Wasseraufnahme der Wurzeln wurden mittels Miniatur-Saftflussmessungen der identischen Wurzeln am Standort der Bäume in der Lüneburger Heide ermittelt (CONERS *et al.*, 2002; CONERS und LEUSCHNER, 2001; SENOCK und LEUSCHNER, 1999). Dabei konnte eine Wasseraufnahme der Wurzeln von 201 g m⁻² Bodenoberfläche und m² Wurzeloberfläche und Tag bei Eiche, 588 g m⁻² bei Buche und 346 g m⁻² bei Fichte gefunden werden (CONERS, 2001). Es ergab sich also eine Reihenfolge in der Wasseraufnahme von Buche>Fichte>Eiche. Die Werte waren jedoch großen Schwankungen unterworfen, und nicht signifikant, an der Hälfte der Messtage ergab sich vielmehr die Reihenfolge Fichte>Buche>Eiche. Eine Umrechnung der Wasseraufnahmewerte in radiale Wasserleitfähigkeiten (L_{pr}) ergab Werte zwischen $0.82 \cdot 10^{-8} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $3.94 \cdot 10^{-8} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CONERS, 2001). Diese Werte lagen in der gleichen Größenordnung, wie sie bereits an Wurzeln von Keimlingen verschiedener Baumarten mit der Wurzeldruckmesssondentechnik ermittelt wurden. $0.35\text{-}1.6 \cdot 10^{-8} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Buchenwurzeln, $0.5\text{-}1.1 \cdot 10^{-8} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Eichenwurzeln und $6.4 \cdot 10^{-8} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei Fichtenwurzeln (STEUDLE und HEYDT 1997; STEUDLE und MESHCHERYAKOV, 1996; RÜDINGER *et al.*, 1994).

Die für die radiale Leitfähigkeit gefundenen Werte korrespondieren gut mit den ermittelten Suberinmengen. Für Fichte wurden die mit Abstand niedrigsten Suberinwerte ermittelt, und für Eiche die höchsten, woraus auf einen niedrigen bzw. hohen Widerstand für die radiale Leitfähigkeit von Wasser geschlossen werden kann. Auch ökologische Beobachtungen zur Trockenresistenz der untersuchten Baumarten unterstützen diese These. Bei Messungen am gleichen und anderen Standorten konnte ermittelt werden, dass Eichen die höchste, und Fichten die niedrigste Resistenz gegen Bodentrockenheit zeigten (LEUSCHNER *et al.*, 2001; BACKES und LEUSCHNER, 1999; ELLENBERG, 1996; VON WILPERT, 1990). Eine starke Suberinisierung der Wurzeln scheint der Pflanze zu helfen den Wasserverlust zu minimieren.

6 Suberingehalt, Ionentransport und mikroskopische Betrachtung in apoplastischen Barrieren von *Ricinus communis* L. Wurzeln unter verschiedenen Kulturbedingungen

Apoplastische Wurzelbarrieren der dicotylen Art *Ricinus communis* L. der Sorte Sanguines, wurden anatomisch charakterisiert und der Suberingehalt dieser Gewebe analysiert. Erstmals wurde in dieser Arbeit dabei der Suberingehalt unterschiedlicher Wurzelzonen getrennt untersucht. Es wurden Experimente zur Aufnahme von Rubidium-Ionen über die gesamte Wurzel unter Mangel-Stressbedingungen (Nitratmangel) gegenüber normal ernährten Kontrollpflanzen durchgeführt.

Die Pflanzen wurden in unterschiedlichen Zusammensetzungen des Hydrokulturmediums, normal ernährte Kontrollen, 100 mmol L⁻¹ NaCl-Gehalt und Abwesenheit von Nitrat, 30 Tage lang unter Klimakammerbedingungen herangezogen. Die Samen wurden einen Tag in Calciumsulfatlösung vorgequollen und 8-10 Tage im Dunkel auf feuchten Vermiculit vorgekeimt. Für anatomische Untersuchungen wurden die geernteten Wurzeln in Formalinlösung (4% in 10 mM PBS) fixiert.

Die geernteten Wurzeln wurden separat für jede Kultur in drei gleichlange Zonen eingeteilt und zur Isolation der apoplastischen Barrieren in Enzymlösung gegeben. Zone I entsprach hierbei dem Spitzenbereich, Zone II dem mittleren Bereich und Zone III dem basalem Bereich. Die isolierten Gewebe von RHZW und EZW der drei Zonen wurden nach dem Trocknen mit MeOH/CHCl₃ extrahiert. Die Extrakte enthielten jedoch keine signifikanten Mengen aliphatischer oder aromatischer Bestandteile und wurden daher verworfen. Aliphatische und aromatische Suberinbestandteile wurden nach Umesterung mit BF₃/Methanol bestimmt. Ligninanalysen wurden nicht durchgeführt. Für die isolierten Gewebe von RHZW und EZW konnte die Oberfläche berechnet werden und die Ergebnisse der Analysen damit in Beziehung gestellt werden.

6.1 Untersuchung der Wurzelanatomie von *R. communis*.

Die Wurzellängen der geernteten Pflanzen unterschieden sich deutlich (Tab. 6.1). Nach 30 Tagen entwickelten unter Nitrat-Mangel angezogenen Pflanzen mit bis zu 82 cm Länge, die längsten Wurzeln. Kontrollpflanzen erreichten ca. 60 cm und mit 100 mmol L⁻¹ NaCl-gestresste Pflanzen maximal 33 cm Wurzellänge.

Tab. 6.1: Wurzel- und Sprosslängen in Rizinus Pflanzen verschiedener Kultur nach 30 Tagen Wachstum. Zoneneinteilung der Wurzel für die Zellwandanalysen (gemessen von der Spitze); Verhältnis Spross/Wurzel; Fehler (\pm) = StabWN mit $N > 4$.

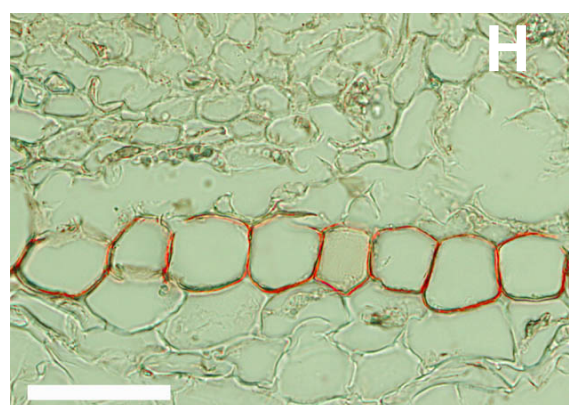
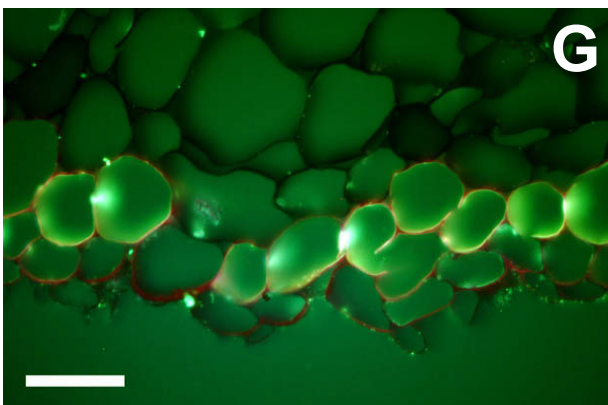
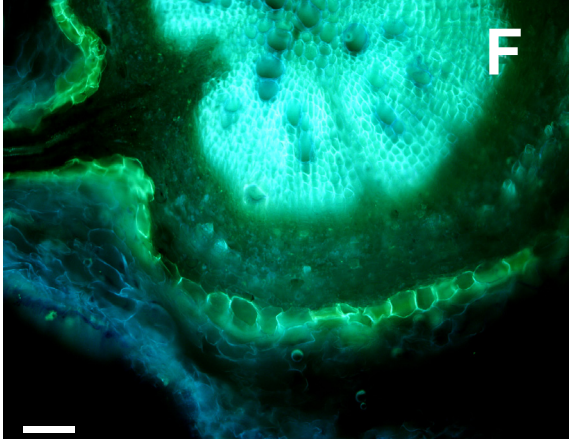
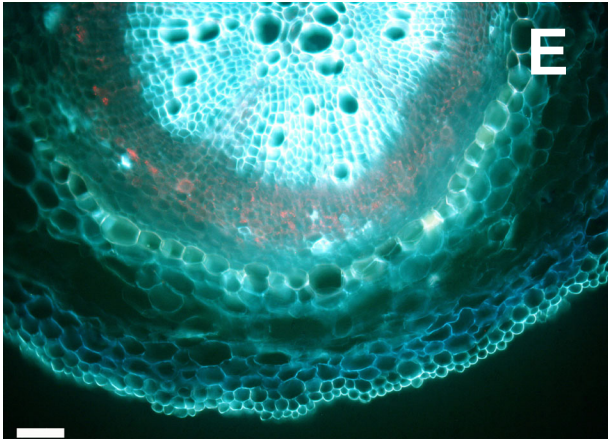
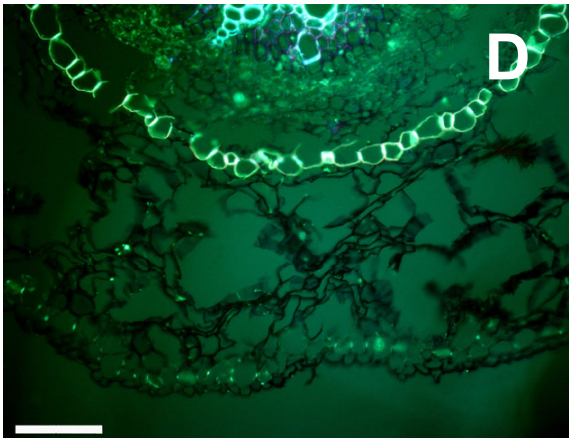
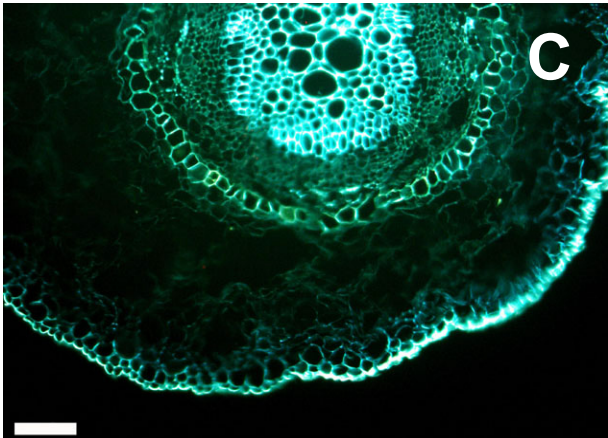
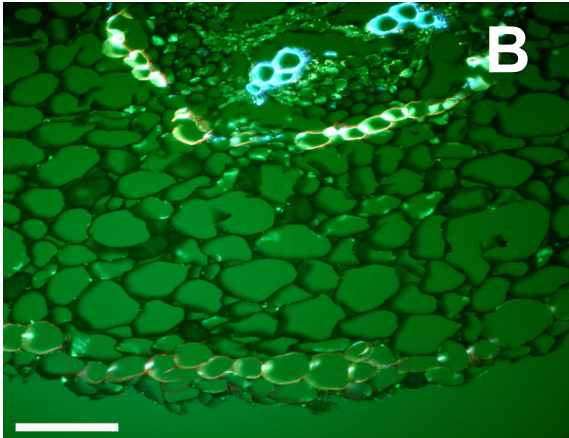
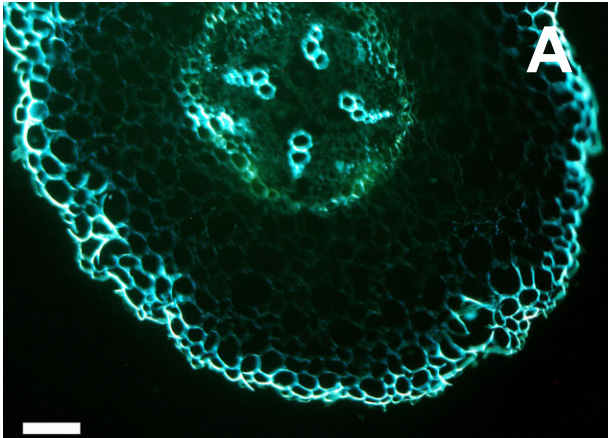
	Wurzellänge (Mittelwert) [cm]	Zone I [cm]	Zone II [cm]	Zone III [cm]	Sprosslänge (Mittelwert) [cm]	Spross/ Wurzel
Kontrolle	56.3 \pm 5.71	0-20	20-45	ab 45	22.1 \pm 3.1	0.39
Nitratmangel	71.5 \pm 10.2	0-25	25-50	ab 50	16.2 \pm 4.3	0.23
100 mM NaCl	25.9 \pm 7.87	0-8	8-16	ab 16	13.5 \pm 2.8	0.52

Kontrollpflanzen waren mit über 20 cm am höchsten, Nitratmangelpflanzen und NaCl-gestresste Pflanzen waren nach 30 Tagen Wuchs unter 20 cm Größe. Das Spross-Wurzellängen-Verhältnis von 0.39 bei Kontrollpflanzen war bei Nitratmangelpflanzen mit 0.23 am kleinsten, bei 100 mM NaCl im Nährmedium mit 0.52 am größten (Tab 6.1). Die Wurzellängen der 100 mM NaCl-Kultur war um den Faktor 2.17 kürzer als die der Kontrolle, die Nitratmangelpflanzen hatten um den Faktor 1.27 längere Wurzeln.

6.1.1 Mikroskopische Untersuchungen an *R. communis*

Die mit Formalin fixierten Rizinuswurzeln wurden mit dem Kryomikrotom geschnitten und mittels verschiedener Färbetechniken unter dem Mikroskop untersucht. Ein CASPARY-Streifen ließ sich in allen Proben mit Fluorol Yellow/Kristallviolett-Färbung (FY/CV) in exodermalen und endodermalen Zellwänden nachweisen. Abb. 6.1 zeigt exemplarisch mikroskopische Abbildungen für die einzelnen Zonen anhand der Kontrollpflanzen, die sich anatomisch nur gering von den unter Stressbedingungen angewachsenen unterschieden. In exodermalen Zellwänden aller Wurzelregionen und Kulturen konnte mit FY/CV Färbung eine Suberinlamelle mit CASPARY-Streifen nachgewiesen werden (Abb. 6.1 G), allerdings in Nitratmangel-Pflanzen nicht durchgängig in allen Zellen. Die endodermalen Zellwände zeigten in allen untersuchten Wurzeln analog zu den Ergebnissen von ZEIER *et al.* (1999a) deutliche Färbung einer Suberinlamelle mit Sudan III (Abb. 6.1 H), in Zone I und II sind Durchlasszellen erkennbar (Abb. 6.1 B, D). Autofluoreszenzbilder (Abb. 6.1 A, C, E) zeigen eine starke Fluoreszenz in den endodermalen, sowie den epidermalen/rhizodermalen Zellwänden, aliphatische Färbereagenzien zeigten jedoch nur in den darunterliegenden exodermalen sowie in den endodermalen Zellwänden eine Färbung.

Abb. 6.1 (nächste Seite): Querschnitte der Wurzel von *R. communis* Kontrollpflanzen; **A, B, G** Zone I, **C, D, H** Zone II; **E, F** Zone III; **A, C, E** Autofluoreszenz, **B, D, F, G** Fluoreszenzbilder nach Färbung mit FY 088 und Kristallviolett. **A** Zone I, apicaler Bereich, rhizodermale und endodermale Zellwände zeigen Autofluoreszenz, Balken = 100 μ m; **B** Zone I, CASPARY-Streifen in der Hypodermis gut sichtbar, Suberinlamelle in der Endodermis mit CASPARY-Streifen und Durchlasszellen, Balken = 100 μ m; **C** Zone II starke Autofluoreszenz in rhizodermalen und endodermalen Zellwänden, Balken = 100 μ m; **D** Zone II Suberinlamelle mit CASPARY-Streifen und vereinzelt Durchlasszellen in der Endodermis, CASPARY-Streifen in der Hypodermis sichtbar, Balken = 100 μ m; **E** Zone III starke Autofluoreszenz in Rhizodermis und Endodermis, Balken = 100 μ m; **F** Zone III Suberinlamelle in Hypo- und Endodermis mit CASPARY-Streifen, Balken = 100 μ m; **G** Zone I Suberinlamelle mit CASPARY-Streifen in der Exodermis, Balken = 50 μ m; **H** Zone II Suberinlamelle der Endodermis mit Sudan III gefärbt, Balken = 50 μ m.



6.2 Veränderungen der Suberinmengen und der Suberin-Zusammensetzung apoplastischer Wurzelbarrieren in *R. communis* unter Nitratmangel und Salzstress

Im Suberin der Rizinus-Wurzeln dominierte der aliphatische Anteil (85-97%), wohingegen Aromaten (Ferulasäure und Cumarsäure) nur in geringen Mengen nachweisbar waren (Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Ergebnisse der quantitativen Analysen von Zellwandisolaten der Wurzeln von 30 Tage alten *R. communis* Pflanzen. Anteil von aliphatischen und aromatischen Bestandteilen am Gesamtsuberin.

	Zone I		Zone II		Zone III	
	RHZW %	EZW %	RHZW %	EZW %	RHZW %	EZW %
aliph. Suberin						
100 mM NaCl	93.1(±5.1)	96.1(±6.2)	91.9(±13.4)	97.1 (±8.5)	94.8(±24.5)	97.3(± 2.4)
Nitratmangel	89.3(±6.2)	96.1 ^{a)}	85.5(±13.1)	93.5 ^{a)}	86.4(±44.8)	92.4(± 7.0)
Kontrolle	95.6(±4.1)	96.3(±7.0)	91.6(±18.5)	97.0 (±2.7)	95.3(±25.5)	96.6(±27.4)
arom. Suberin						
100 mM NaCl	6.91(±0.93)	3.93 (±0.3)	8.08(±1.92)	2.87(±0.31)	5.21(±1.54)	2.65(±0.11)
Nitratmangel	10.7 (±0.7)	3.88 ^{a)}	14.5 (±4.8)	6.48 ^{a)}	13.6 (±9.1)	7.58 (±0.34)
Kontrolle	4.44(±0.41)	3.65 (±0.3)	8.36(±2.08)	2.98(±0.33)	4.68(±0.09)	3.43 (±0.51)

a) Einzelbestimmung.

RHZW der Nitratmangelpflanzen enthielt mit 89% (Zone I), 85% (Zone II) und 86% (Zone III) die niedrigsten Anteile aliphatischen Suberins. In EZW fiel der Anteil der Aliphaten nie unter 93%, bei den Kontrollpflanzen und unter Salzstress aufgewachsenen Pflanzen betrug er über alle Zonen >96%. Der aromatische Anteil im Rizinus-Suberin wurde auf 2-8% des gesamten Suberins bestimmt, mit Ausnahme des RHZW von Nitratmangelpflanzen, wo Werte von bis zu 14% (Zone II) gemessen wurden.

RHZW enthielten bei allen Kulturen, die geringsten Mengen aliphatischen Suberins. Die kleinste Menge mit nur 4.61 nmol cm⁻² wurde in Zone III von Nitratmangelpflanzen detektiert. Die größte Menge fand sich mit 31.4 nmol cm⁻² (Zone I) in NaCl-gestressten Pflanzen (Abb. 6.2 A). Generell ließ sich ein Trend zu geringeren Suberinmengen mit zunehmendem Alter der RHZW feststellen. Bei unter Salzstress aufgewachsenen Pflanzen nahm der aliphatische Suberingehalt von 31.4 nmol cm⁻² in Zone I auf 21.7 nmol cm⁻² in Zone II ab und veränderte sich kaum noch in Zone III (20.7 nmol cm⁻²). Dies ließ sich ebenfalls bei den Kontrollpflanzen feststellen, hier sank die Suberin Stoffmengenbelegung von 29.0 nmol cm⁻² in Zone III auf 7.6 nmol cm⁻² in Zone II und III. Für die Nitratmangel-Kultur galt dies in

geringerem Maße. Bei dieser Kultur konnte in RHZW wie EZW mit 5-15 nmol cm⁻² etwa die gleiche Menge an Aliphaten gefunden werden. Bei den anderen Kulturen bestanden zwischen RHZW und EZW große Unterschiede in den gefundenen Suberinmengen.

Der aliphatische Suberingehalt endodermaler Zellwänden wies nur geringe Unterschiede zwischen den der Zonen gleicher Kulturen auf. Die EZW von salzgestressten Pflanzen enthielten mit 94.5-107.1 nmol cm⁻² in etwa fünfmal soviel Suberin wie in RHZW. Bei den Kontrollpflanzen konnten 59.6-64.4 nmol cm⁻² Aliphaten festgestellt werden, was einer siebenfach höheren Menge in den Zonen II und III entspricht. Die geringsten Mengen Suberin fanden sich in Pflanzen aus Nitratmangel-Kultur, hier wurden lediglich Mengen von 10.2-16.8 nmol cm⁻² gefunden (Abb. 6.2. A).

Der Gehalt an aromatischen Bestandteilen in salzgestressten Pflanzen zeigte einen Trend zur Abnahme in älteren Zonen, bei RHZW wie EZW. In den Geweben anderer Kulturen, konnte dieser Befund nicht bestätigt werden, bei Nitratmangel-Kultur ließ sich im EZW sogar ein leichter Anstieg beobachten (Abb. 6.2 B).

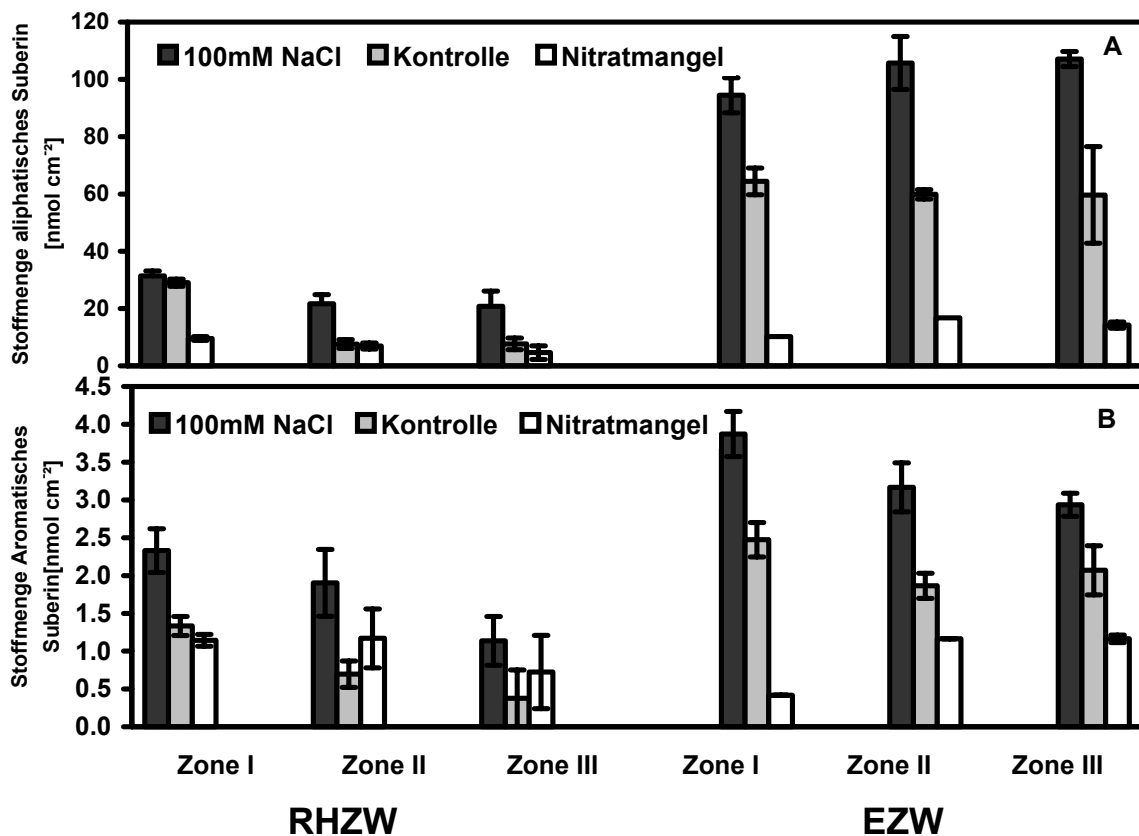


Abb. 6.2: Suberingehalt in Rizinus Wurzeln verschiedener Kulturen; Kontrolle, Nitratmangel und 100 mM NaCl; **A** Aliphatisches Suberin (links RHZW; rechts EZW); **B** aromatisches Suberin (links RHZW; rechts EZW); Alter 30 Tage; (Fehlerbalken = StabWN).

6.2.1 Suberinzusammensetzung in *R. communis*

6.2.1.1 Suberinzusammensetzung in RHZW von *R. communis*

Das Suberin in den isolierten Zellwänden von Rhizo- und Hypodermis bestand in der Kontrollgruppe überwiegend aus sechs Substanzklassen, estergebundene Aromaten, linear langkettige aliphatische Alkohole, Monocarbonsäuren, α,ω -Disäuren, ω -Hydroxysäuren und 2-Hydroxysäuren. α,ω -Disäuren und ω -Hydroxysäuren lagen zudem in großen Anteilen in einfach ungesättigter Form vor. Die Zusammensetzung veränderte sich mit zunehmendem Alter nicht signifikant, mit Ausnahme einer starken Abnahme des Anteils ungesättigter Disäuren von Zone I zu Zone II und III und einem Anstieg des Alkoholanteils von Zone I zu Zone II. Es dominierten über alle Alterszonen die Mengenanteile der gesättigten Di- und ω -Hydroxysäuren. Meist unter 5% blieb der Anteil der Aromaten und der 2-OH-Säuren. Der Anteil der Disäuren nahm innerhalb der Zonen von 22 auf 17% ab, im gleichen Maße nahm der Anteil von ω -Hydroxysäuren zu (Abb. 6.3 B).

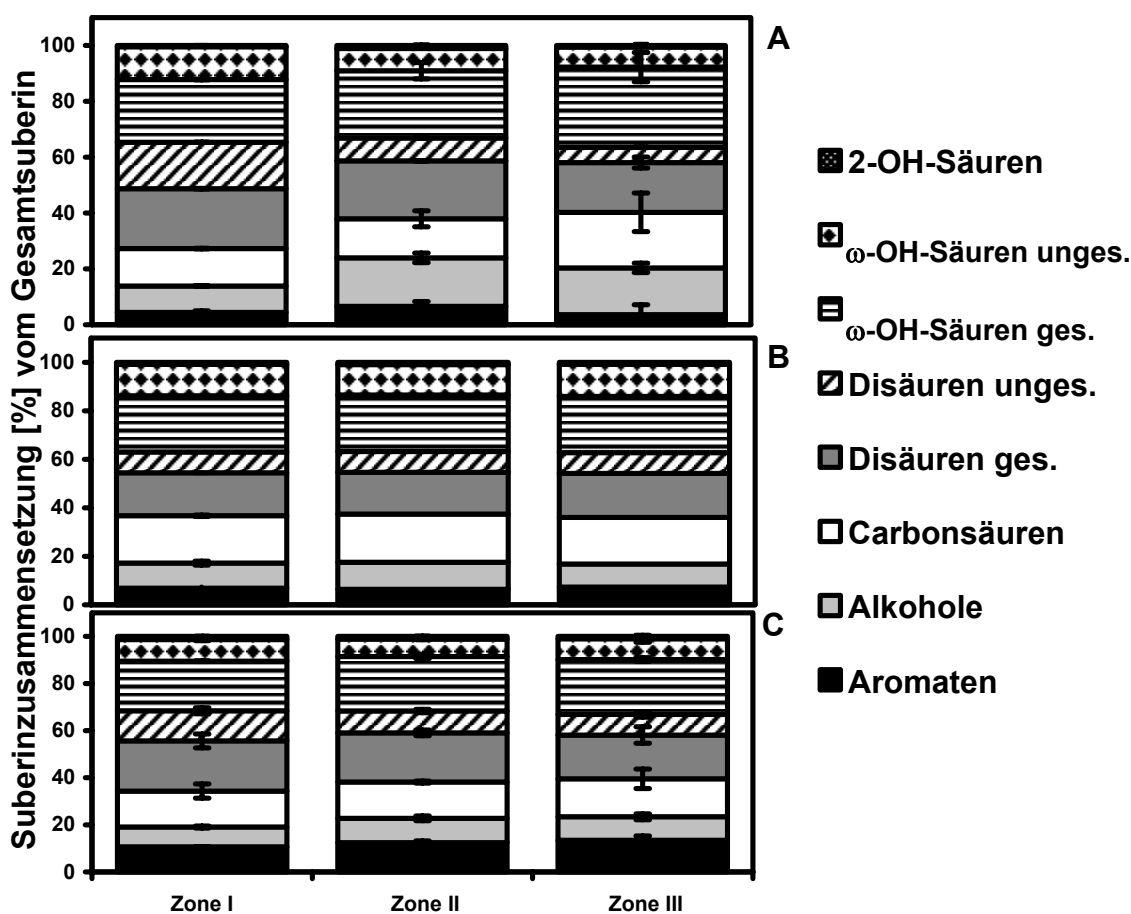


Abb. 6.3 Suberinzusammensetzung in Prozent vom Gesamtsuberin; *R. communis* RHZW; Alter 30 Tage; A Kontrolle; B 100 mM NaCl; C Nitratmangel; (Fehlerbalken = StabWN).

Die aufgezeigten Trends wurden auch in der Nitratmangelkultur festgestellt, jedoch konnte hier über alle Zonen ein wesentlich höherer Anteil an estergebundenen Aromaten festgestellt werden (Abb. 6.3 C). Mit über 10% des Gesamtsuberins stellten Aromaten hier einen doppelt so hohen Anteil verglichen mit der Kontrollgruppe. Zudem konnte eine Zunahme um etwa 3% von Zone I zu III beobachtet werden. Im Vergleich mit der Kontrollkultur wurde ein geringerer Prozentsatz Alkohole in diesen Geweben festgestellt, in den Alterszonen II und III ca. 5% weniger. Der Anteil der ω -Hydroxysäuren war bei dieser Kultur ebenfalls ca. 5% geringer als in der Kontrollgruppe, zeigt aber keine ausgeprägten Änderungen mit zunehmendem Alter. Auch bei dieser Mangelkultur, konnte eine Abnahme des Anteils ungesättigter Disäuren mit dem Alter festgestellt werden, mit ca. 4% jedoch nicht so ausgeprägt, wie in der Kontrollgruppe. Ebenso nahm der Anteil an gesättigten Disäuren ab.

Die RHZW der mit 100 mM NaCl gestressten Rizinus-Pflanzen zeigten im Vergleich mit den anderen Kulturen die geringsten Veränderungen in der altersabhängigen Substanzklassenverteilung (Abb. 6.3 A). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ließ sich vor allem ein über alle Altersstufen um etwa 3-5% höherer Gehalt an gesättigten ω -Hydroxysäuren feststellen. Abweichend von den anderen Kulturen fanden sich in den NaCl-gestressten Wurzeln auch etwa 5% mehr Monocarbonsäuren.

6.2.1.2 Suberinzusammensetzung EZW von *R. communis*

Die Substanzklassenverteilung im Suberin der endodermalen Zellwände (EZW) unterschied sich von der Zusammensetzung der RHZW vor allem durch einen durchschnittlich höheren Anteil ungesättigter C₁₈- ω -Hydroxysäure mit >20% in allen Kulturen, sowie in einem vergleichsweise geringerem Anteil an Monocarbonsäuren über alle Kulturen.

Innerhalb der Alterszonen, ließ sich in der Kontrollgruppe ein Anstieg des Gehaltes an Alkoholen und Säuren um jeweils etwa 5-6% von Zone I zu III feststellen. Gesättigte und ungesättigte ω -Hydroxysäuren dominierten und ein großer Anteil gesättigter Disäuren konnte ebenfalls festgestellt werden. Des Weiteren tendierte die Zusammensetzung innerhalb der Alterszonen zu einer Abnahme des Anteils gesättigter und ungesättigten Disäuren, sowie der ungesättigten ω -Hydroxysäuren. 2-Hydroxysäuren fanden sich nur in sehr geringem Anteil (Abb. 6.4 B).

Nitratmangelernährte Pflanzen enthielten in den EZW etwa 5% geringere Anteile der ungesättigten C-₁₈- ω -Hydroxysäure, jedoch einen um ca. 2-5% erhöhten Gehalt an den gesättigten ω -Hydroxysäuren (Abb. 6.4 C). Der Gehalt ungesättigter Disäuren war ebenfalls um etwa 5% geringer, wobei auch hier ein im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöhter Gehalt an den gesättigten Verbindungen festgestellt wurde. Die in der Kontrollgruppe festgestellten Trends zur Erhöhung des Alkohol- und Carbonsäuregehaltes mit dem Alter konnten hier nicht bestätigt werden. Der Anteil dieser Komponenten am Gesamtsuberin war etwa auf dem Niveau der Kontrollzone II konstant über alle Alterszonen. Der Aromatenanteil

am EZW- Suberin in der Mangelkultur stieg von Zone I zu III mit einem Faktor >2 auf über 10%. Dies war der höchste in Rizinus EZW festgestellte Aromatenanteil.

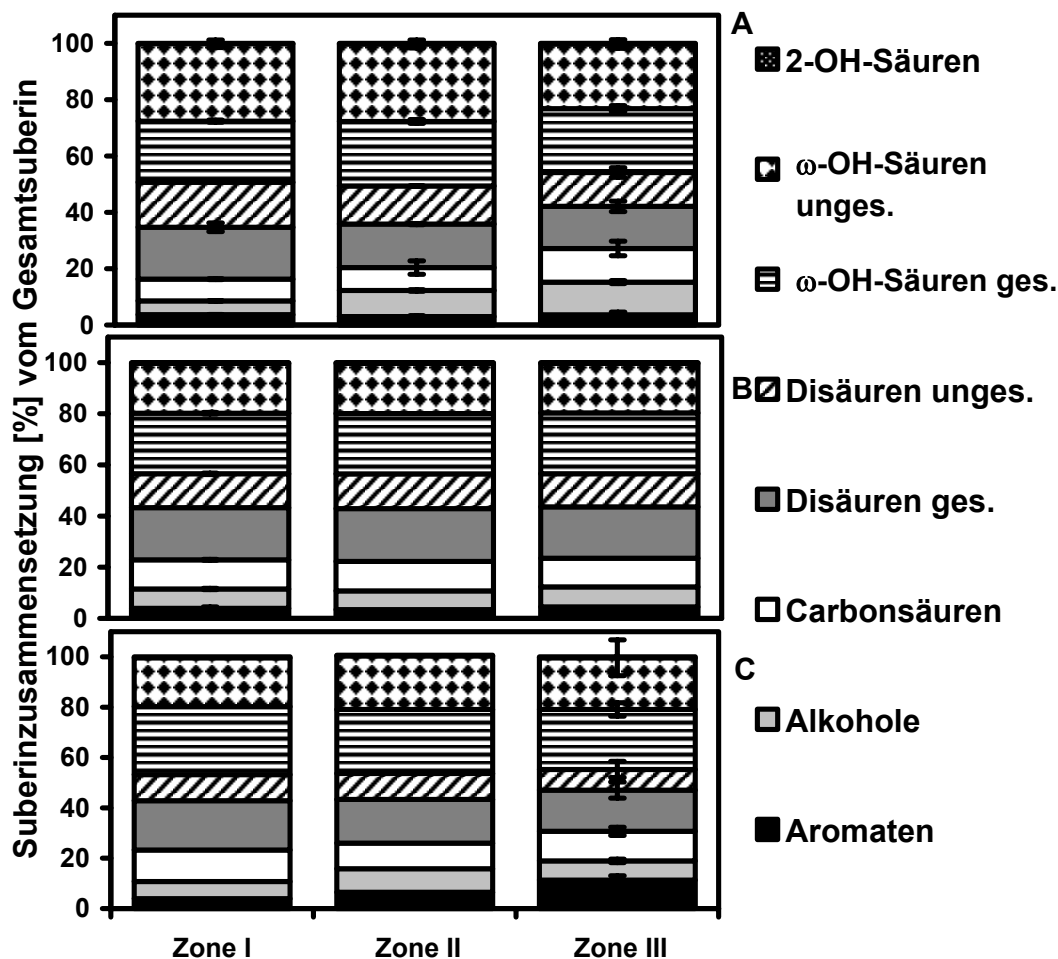


Abb. 6.4: Suberinzusammensetzung in Prozent vom Gesamtsuberin; *R. communis* EZW; Alter 30 Tage; A Kontrolle; B 100 mM NaCl; C Nitratmangel; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Suberinzusammensetzung der EZW von bei 100 mM NaCl kultivierten Rizinuspflanzen zeigte im Vergleich mit der Kontrollgruppe ein genau umgekehrtes Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten ω -Hydroxysäuren (Abb. 6.4 A). Innerhalb der Altersklassen ließ sich kein Unterschied in der Zusammensetzung des Salzstress-EZW-Suberins erkennen. Der Anteil Monocarbonsäuren entsprach den in der Nitratmangel-Kultur gefundenen Werten, ebenso der Anteil Alkohole.

6.2.1.3 Mittlere Kettenlängenverteilung im *R. communis* -Suberin

Die Kettenlängenverteilungen innerhalb der Alterszonen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Diese Feststellung konnte in allen Kulturen gemacht werden. Bei der Kontrollkultur konnte ein Mittelwert von etwa 18.4 C-Atomen über alle Altersstufen und

Gewebearten errechnet werden (Abb. 6.5). In den Geweben der Stress- und Mangelkulturen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, die hier nicht abgebildet wurden.

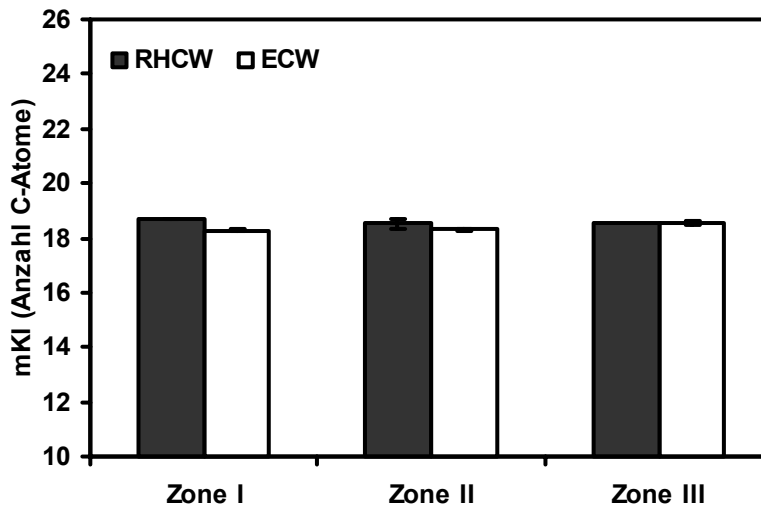


Abb. 6.5: Mittelwerte der mittleren Kettenlängenverteilung aller aliphatischen Bestandteile (Anzahl C-Atome) in Rizinus RHZW und EZW von Kontrollkulturen in drei Wurzelzonen (Zone I apikal, Zone II Mitte, Zone III basal); (Fehlerbalken = StabWN).

6.2.1.3.1 Mittlere Kettenlängenverteilung in RHZW von *R. communis*

Untersucht man die Verteilung der mittleren Kettenlängen aller Suberinmonomeren in RHZW, so findet man die durchschnittlich längsten Kohlenstoffketten in den 2-OH Säuren mit 24 C-Atomen. Allerdings wurden hier auch keine kürzerkettigen Vertreter dieser Substanzklasse gefunden. Auch im Vergleich der unterschiedlichen Kulturmethoden zeigen sich nur geringe Unterschiede in der Kettenlängenverteilung. So schwankten die Werte der einzelnen Substanzklassen zwischen 17 und 21 Kohlenstoffatomen (Abb. 6.6). Gesättigte Disäuren zeigten in allen Kulturen die kürzesten Kettenlänge von durchschnittlich 17 C-Atomen.

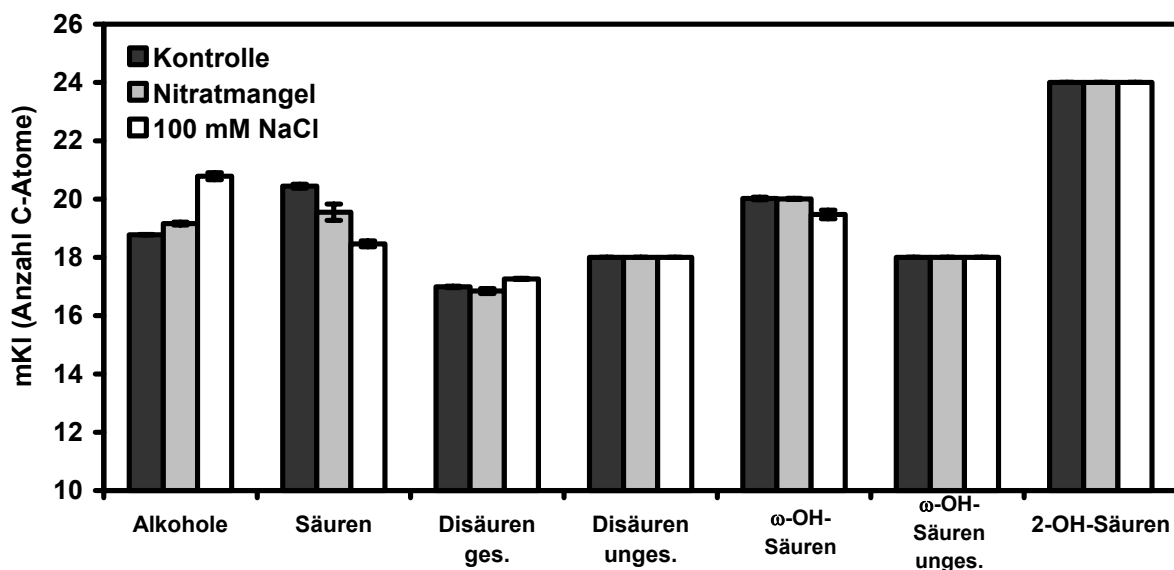


Abb. 6.6: Mittlere Kettenlängenverteilung (Anzahl C-Atome) in Substanzklassen von Rizinus RHZW Zone I bei Kontrollkultur, 100mM NaCl, und Nitratmangel; Alter 30 Tage; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Kettenlänge der Alkohole nahm im Mittel von den Kontrollkulturen mit ca.19 C-Atomen über die Nitratmangelkultur zu 21 C-Atomen bei den salzgestressten Wurzeln zu. Monocarbonsäuremonomere nahmen in der umgekehrten Reihenfolge in der Kettenlänge ab.

6.2.1.3.2 Mittlere Kettenlängenverteilung in EZW von *R. communis*

Die mittlere Kettenlängenverteilung in EZW von Rizinus verhielt sich analog der mKI in RHZW, mit der Ausnahme, dass sich in der mKI der Monocarbonsäuren kein Rückgang der Kettenlänge beobachtet werden konnte (Abb. 6.7)

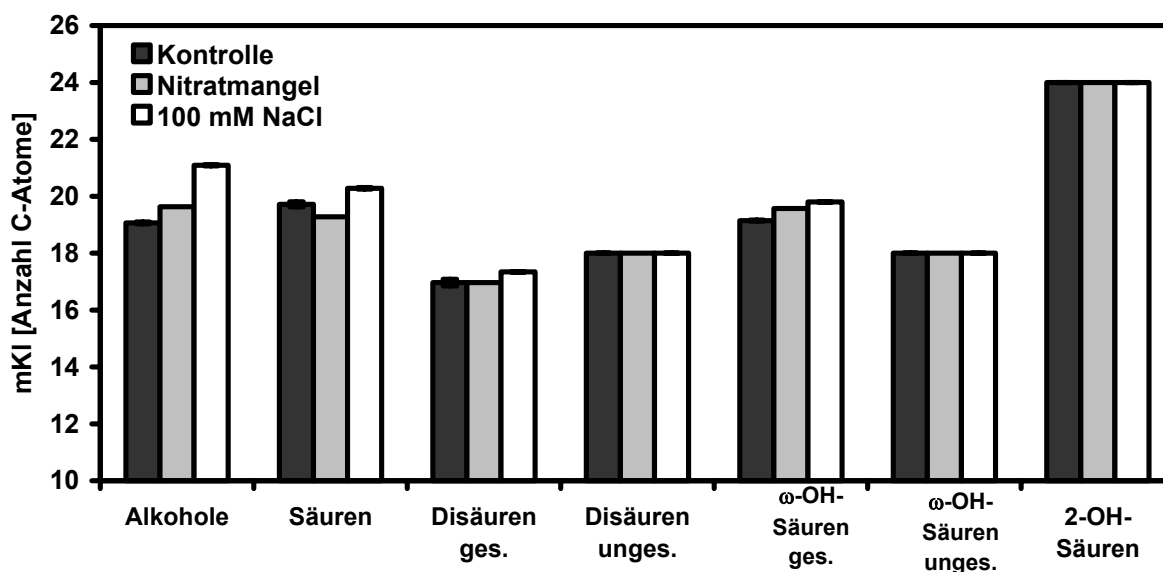


Abb. 6.7: Mittlere Kettenlängenverteilung (Anzahl C-Atome) in Substanzklassen von Rizinus EZW Zone I bei Kontrollkultur, Alter 30 Tage; 100mM NaCl, und Nitratmangel; (Fehlerbalken = StabWN).

6.2.1.4 Konnektivität in *R. communis*

Die Anzahl freier Carboxygruppen, als Indikator für die Konnektivität des Suberin Polymers betrug 50 bis 65% (Tab. 6.3). Die Zahl der freien Säuregruppen nahm mit zunehmendem Alter des Gewebes ab, der Konnektivitätsgrad stieg somit in älteren Wurzelgeweben von Rizinus. Endodermale Zellwände besaßen prozentual weniger freie Carboxygruppen als rhizodermale/hypodermale Zellwände.

Tab. 6.3: Freie Carboxygruppen im Suberin von Rizinus-Wurzel Zellwandisolaten der Kontrollkultur; Alter 30 Tage; Angaben in Prozent der Gesamtzahl aller Carboxygruppen.

	Zone I [%]	Zone II [%]	Zone III [%]
RHZW	64.5	52.1	50.3
EZW	57.0	51.1	49.3

Stressernährung bewirkte niedrigere Verknüpfungsgrade verglichen mit der Kontrollgruppe in den RHZW und EZW der NaCl-Stress-Pflanzen sowie in RHZW der Nitratmangelernährten Pflanzen (Abb. 6.8 A). Endodermale Zellwände der mangelernährten Wurzeln zeigten geringfügig höhere Konnektivitäten als die Gewebe der Kontrollpflanzen (Abb. 6.8 B).

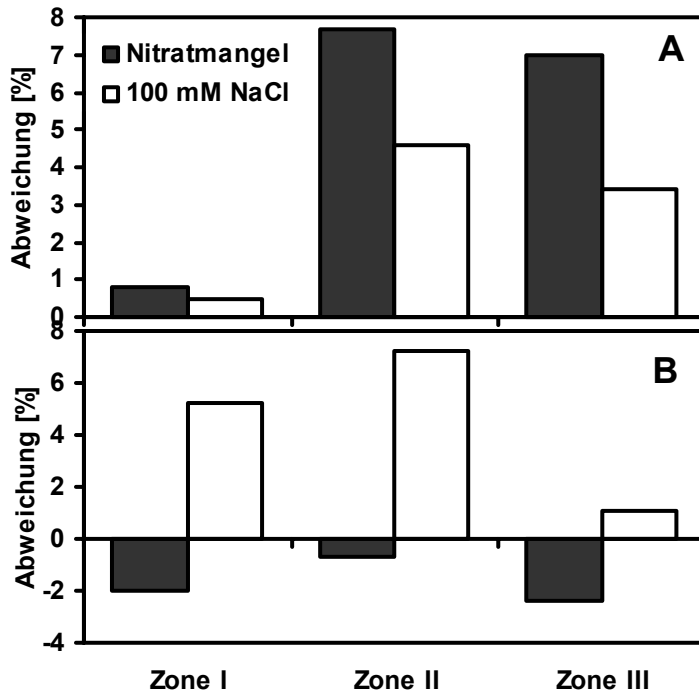


Abb. 6.8: Abweichung der Anzahl freier Carboxygruppen der aliphatischen Substanzklassen zur Kontrollgruppe in Prozent im Suberin der Wurzeln von unter Nitratmangel und unter 100 mM NaCl angezogener Rizinuspflanzen; Alter 30 Tage; A = RHZW; B = EZW.

6.3 Beeinflussung der Rb^+ -Aufnahme durch die Kulturbedingungen von *R. communis*

Rubidium-Ionen wurden als Nachweis für den Transport von Kalium-Ionen verwendet. Da Rubidium in der Natur nur selten vorkommt, ließen sich mit den verwendeten Systemen schon geringe Spuren Rubidium nachweisen, Blindproben enthielten keine nachweisbaren Mengen des Ions. Die Aufnahme des Rubidium-Ions über die Wurzel sollte analog zu Kalium-Ionen und somit über apoplastische und symplastische Pfade erfolgen, da sich Ladung und Ionenradius ähneln. Da sich die Kultur der salzgestressten Pflanzen als problematisch erwies, wurden die Transportexperimente für Rubidium-Ionen mit Nitratmangelpflanzen und normal ernährten Kontrollpflanzen durchgeführt.

Um die Größe der Oberfläche zu bestimmen wurden die Wurzeln entsprechend ihrer Größenklasse sortiert und die Projektionsflächen über ein digitales Bildabtastsystem ermittelt. Die Größe der Blattflächen wurde ebenfalls mit einem digitalen Bildabtaster ermittelt. Die Oberfläche der Wurzeln war stets größer als die einfache Blattoberfläche. In Kontrollpflanzen betrug die Wurzeloberfläche $258 \text{ cm}^2 (\pm 50.3 \text{ cm}^2)$ die Blattfläche $134 \text{ cm}^2 (\pm 52.6 \text{ cm}^2)$, was einem Blatt/Wurzel Verhältnis von 0.51 entspricht. Bei den schwächer gewachsenen

Nitratmangelpflanzen betrug dieses Verhältnis 0.27, das heißt, die Wurzeloberfläche von 153 cm² (± 31.1 cm²) war mehr als dreimal so groß wie die 40.7 cm² (± 34.6 cm²) der Blattoberfläche (Abb. 6.9).

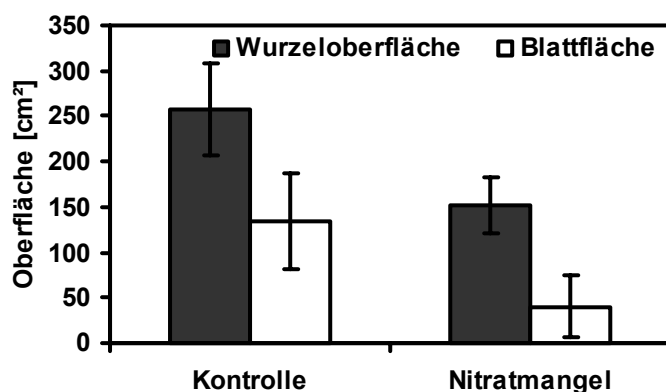


Abb. 6.9: Wurzel- und Blattoberfläche der verwendeten Versuchspflanzen; Alter 30 Tage; die Daten von Kontroll- und Nitratmangelpflanzen unterschieden sich nach einem *t*-Test signifikant auf einem 99% Niveau (*p*-Wert für Wurzeloberflächen $6.2 \cdot 10^{-6}$ für Blattflächen $6.9 \cdot 10^{-5}$); (Fehlerbalken = StabWN).

Die Transpiration der Pflanzen wurde während der Versuchsdauer mittels eines Porometers erfasst. Mit 1.54 cm s^{-1} ($\pm 0.22 \text{ cm s}^{-1}$) konnte in den Kontrollpflanzen eine weit höhere Transpirationsrate als in den Mangelpflanzen (0.95 cm s^{-1} ($\pm 0.22 \text{ cm s}^{-1}$)) bei 27 °C und 75% rel. Luftfeuchte gemessen werden.

Die Aufnahme von Rubidium-Ionen über die Wurzel wurde über 12 h in einem Klimakammerexperiment verfolgt. Der Nährlösung wurden 10.0 mmol L^{-1} Rubidiumchlorid zugesetzt und die Pflanzen im Abstand von einer Stunde geerntet. Nach dem Vermessen und Trocknen wurde der Rubidiumgehalt der Blätter mittels ICP-OES bestimmt.

Die Aufnahmeraten der Nitratmangelpflanzen und der Kontrollpflanzen verhielten sich linear, eine Sättigung konnte nicht beobachtet werden (Abb. 6.10). Die Gesamtmenge des aufgenommenen Rb⁺ unterschied sich stark unter den verschiedenen Kulturen, während die Kontrollpflanzen nach 12 h 1.42 mmol Rubidium-Ionen aufgenommen hatten, konnte in den Nitratmangelernährten nur eine Gesamtmenge von 0.22 mmol Rubidium nachgewiesen werden.

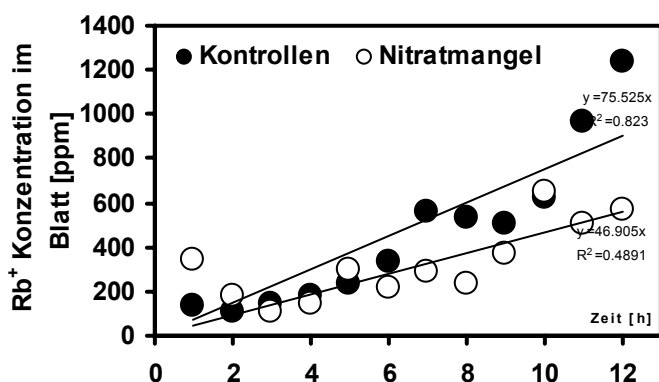


Abb. 6.10: Konzentration über die Wurzel aufgenommener Rubidium-Ionen pro Zeiteinheit in Spross und Blättern von 30 Tage alten Rizinus-Pflanzen in ppm; Vergleich Nitratmangel und Kontrollpflanzen; die Steigung der linearen Regressionsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Geraden wurden angegeben.

Bezog man den Rubidiumgehalt der Blätter auf die Wurzeloberfläche, so ergab sich für die aufgenommene Menge Rb^+ -Ionen pro Zeit kein Unterschied zwischen den Kulturen (Abb. 6.11 A). Berücksichtigte man zusätzlich die unterschiedlichen Transpirationsraten, so nahmen die nitratmangelernährten Pflanzen mehr Rb^+ -Ionen pro Zeiteinheit auf, als die Kontrollpflanzen, was einer um den Faktor 1.8 erhöhten Steigung der Regressionsgeraden der Nitratmangelpflanzen entsprach (Abb. 6.11 B).

Der Rubidiumgehalt mit Bezug auf die Blattgröße ergab eine höhere Rubidium-Ionenaufnahmerate der Nitratmangelpflanzen. Diese Bezugsgröße ermöglichte es einen Verdünnungseffekt durch die unterschiedliche Biomasse der Pflanzen herauszurechnen. Der Unterschied in der Steigung der Regressionsgeraden betrug hier den Faktor 3.0 (Abb. 6.11 C). Dieses Verhältnis verschob sich weiter zugunsten eines Faktors von 4.9, berücksichtigte man zusätzlich die geringere Transpiration der Nitratmangelpflanzen (Abb. 6.11 D).

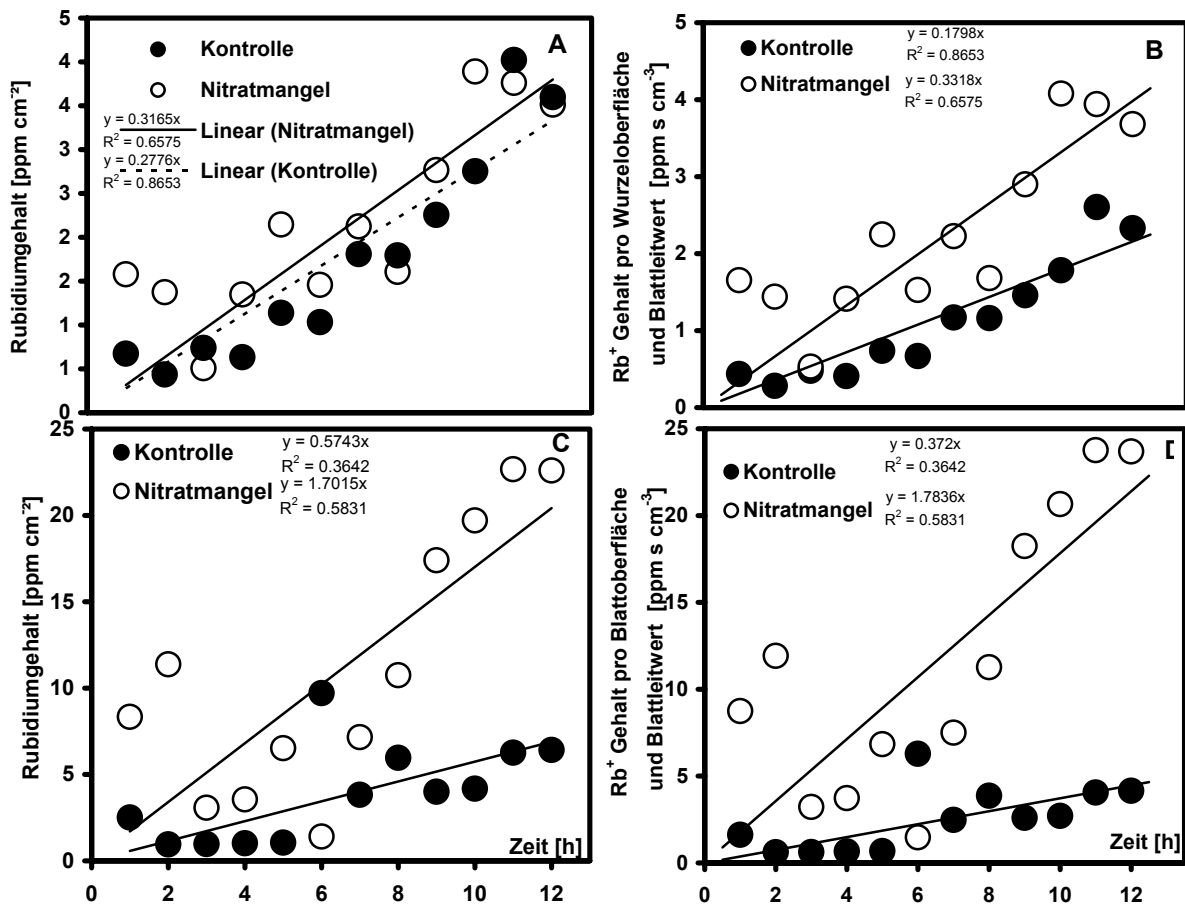


Abb. 6.11: Konzentration über die Wurzel aufgenommener Rubidium-Ionen pro Zeiteinheit in Spross und Blättern von 30 Tage alten Rizinus-Pflanzen; Vergleich von Nitratmangel und Kontrollpflanzen; die Steigung der linearen Regressionsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2) der jeweiligen Geraden wurden angegeben; **A** ppm Rb^+ in Blättern mit Bezug auf die Wurzeloberfläche; **B** ppm Rb^+ in Blättern mit Bezug auf die Wurzeloberfläche und die Transpiration der Blätter **C** ppm Rb^+ in Blättern mit Bezug auf die Blattfläche; **D** ppm Rb^+ in Blättern mit Bezug auf die Blattfläche und die Transpiration der Blätter. (Alle Werte aus Einfachbestimmungen).

6.4 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu *R. communis* Wurzeln

30 Tage alte Pflanzen von *Ricinus communis* L. zeigten bei Aufzucht in Hydroponischer Kultur mit 100 mM NaCl deutliche Wachstumseinbußen, die Spross und Wurzel betrafen. Wurden Pflanzen unter Mangel an Nitrat-Ionen aufgezogen, so konnte eine starke Zunahme des Wurzelwachstums beobachtet werden, was eine Verschiebung des Spross/Wurzel Verhältnis von 0.39 auf 0.23 im Vergleich mit normal ernährten Pflanzen zur Folge hatte und mit Literaturdaten vergleichbar ist (PEUKE *et al.*, 1994a, 2002). Die Wurzelmorphologie zeigte Unterschiede im Wurzeldurchmesser und einer reduzierten Anzahl der Seitenwurzeln in den unter Nitratmangel oder Salzstress angezogenen Pflanzen, was zu einer deutlich geringeren Oberfläche gegenüber den Kontrollpflanzen führte.

Histochemische mikroskopische Untersuchungen der Wurzeln von *R. communis* ergaben ein einheitliches Bild der Ausbildung apoplastischer Barrieren in allen drei untersuchten Zonen. In allen Zellwänden von Exodermis und Endodermis wurde mit aliphatischen Farbstoffen ein CASPARY-Streifen und Suberin-Lamelle nachgewiesen. Lediglich im extremen Spitzenbereich wurde keine Suberinlamelle in der Endodermis angefärbt. Auch zwischen den verschiedenen Anzuchten ließen sich keine auffälligen anatomischen Änderungen im Vergleich mit der Kontrolle auf mikroskopischer Ebene feststellen. Autofluoreszenzbilder wiesen darauf hin, dass sich der Hauptanteil aromatischer Komponenten der isolierten RHZW in den rhizodermalen Zellwänden befand während die Färbung mit Sudan III und FY 088 die aliphatischen Komponenten der RHZW in der Exodermis lokalisierte. Bei ZEIER *et al.* (1999a) wurden ähnliche Ergebnisse für die Endodermis gefunden. Im Vergleich mit Wurzeln von *Zea mays*, welche schon innerhalb weniger Zentimeter Wurzellänge große altersabhängige Unterschiede in der mikroskopischen Struktur apoplastischer Zellwände aufweisen (siehe Abschnitt 7.1; SCHREIBER *et al.*, 1999), sind die apoplastischen Barrieren der dicotyle Pflanze *R. communis* entlang ihrer Wurzel in Endodermis und Exodermis weitestgehend gleichmäßig entwickelt. Auch der Mangel an Nitrat-Ionen, oder die Anwesenheit von 100 mmol NaCl über 30 Tage in der Nährlösung veränderten den mikroskopischen Befund nur unwesentlich. Als besonders interessant erwiesen sich daher die chemischen Analysen der Barrieregewebe, da sich hier sehr große Unterschiede im Suberingehalt der Barrieregewebe unter den verschiedenen Kulturmethoden nachweisen ließen, trotz vergleichbarer Bilder mit histochemischen Methoden. Der Anteil aromatischer Komponenten im Suberin der dicotylen Pflanze *R. communis* war vergleichbar mit den Werten von ZEIER *et al.* (1999a) und für dicotyle Pflanzen verhältnismäßig hoch (SCHREIBER *et al.*, 1999), jedoch eher niedrig verglichen mit dem Aromatengehalt in Zellwänden der Mehrzahl bisher untersuchter monocotyler Pflanzen (ZEIER, 1998). Am auffälligsten war der erhöhte Gehalt estergebundener Aromaten in Nitratmangelpflanzen, deren Suberin bis zu 15% aromatische Komponenten enthielt, was einem mehr als doppelt so hohem Anteil vom

Suberin verglichen mit den Kontroll- oder Salzstress-Pflanzen entspricht. Allerdings wurden die höchsten Stoffmengen an Aromaten wie auch an Aliphaten in den Salzstresspflanzen gefunden. Wurzeln aus Salzstress-Aufzucht enthielten etwa zehnmals größere Stoffmengen aliphatischer Suberinkomponenten in der Endodermis als Nitratmangelpflanzen, diese wiederum enthielten nur etwa ein Viertel der Suberinmenge von Kontrollpflanzen. Besonders augenfällig ist die Diskrepanz in der Endodermis, dort enthielten die NaCl-Pflanzen etwa 100 nmol cm⁻², Nitratmangelpflanzen lediglich 10-15 nmol cm⁻² aliphatische Suberinkomponenten.

Die Suberinzusammensetzung der RHZW aller drei Kulturen war im Rahmen der Fehlergrenzen gleich und unterschied sich von der Zusammensetzung des EZW-Suberins lediglich durch einen geringeren Anteil an ω -Hydroxysäuren, auch in den EZW änderten die unterschiedlichen Ernährungsbedingungen nur wenig an der Suberinzusammensetzung. Die mittleren Kettenlängen unterschieden sich in der Summe aller Komponenten weder zwischen RHZW und EZW noch unter den verschiedenen Kulturen und Zonen. Bei RHZW konnte eine um ein C-Atom verlängerte mittlere Kettenlänge der Alkohole festgestellt werden, einhergehend mit einer um den gleichen Betrag erniedrigten mittleren Kettenlänge der Monocarbonsäurefraktion. Die Anzahl der freien, nicht mit anderen detektierten Hydroxygruppen veresterten Säuregruppen nahm mit steigendem Alter in RHZW und EZW der Kontrollgruppe ab, man kann hier also von einem Reifeprozess sprechen, das Suberin älterer Zonen ist besser verknüpft als das jüngerer Zonen. Bei Nitratmangel und Salzstress nahm in den RHZW der Verknüpfungsgrad um bis zu 8% ab, in EZW dagegen nur in Salzstress-Wurzeln während Nitratmangelpflanzen sogar eine leichte Zunahme der Konnektivität zeigten.

Unterschiede in der Ausprägung apoplastischer Barrieren sollten sich auch auf die Aufnahmefähigkeit für Ionen auswirken. Experimente von PEUKE *et al.* (1994a) zeigten, dass ein verringerter Nitratgehalt der Nährlösung eine stark verringerte Aufnahme von Kalium, Magnesium und Calcium in den Spross und eine Verlagerung dieser Ionen in die Wurzel bewirkt, ein hoher Salzgehalt verringert die Nitrataufnahme um 68% (PEUKE *et al.*, 1996). Ginge man von einem rein apoplastischen Transport von Rb⁺ aus, so sollten die Nitratmangelpflanzen aufgrund ihrer nur schwach suberinisierten EZW und RHZW leicht größere Mengen dieser Ionen aufnehmen können. Aufgrund der Literaturdaten (PEUKE *et al.*, 1994a) für das Kalium-Ion, war es wahrscheinlich, dass dies nicht der Fall sei. In der Tat nahmen die Nitratmangelpflanzen in etwa nur die gleiche Gesamtmenge an Rubidium-Ionen auf wie die Kontrollpflanzen. Berücksichtigte man die etwas kleinere Wurzeloberfläche und die geringere Transpirationsrate, welche auch in der Literatur festgestellt wurde (PEUKE *et al.*, 1994b), durch die ein geringerer Volumenfluss in der Pflanze verursacht wurde, dann zeigte sich tatsächlich eine höhere Aufnahmerate bei den Nitratmangelpflanzen, besonders aber, wenn man die bei Nitratmangelpflanzen deutlich kleinere Blattfläche als Bezugsgröße wählte,

um einen Verdünnungseffekt durch die unterschiedliche Biomasse auszugleichen. Für Salzstress Pflanzen stehen gleichartige Messungen noch aus.

7 Chemische Zusammensetzung, mikroskopische Betrachtung und Transportuntersuchungen für Wasser und Ionen in apoplastischen Barrieren von Wurzeln dreier Genotypen von *Zea mays* L. unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Die Wurzelzellwände apoplastischer Barrieren (RHZW, EZW) von drei Genotypen der monocotylen Poaceae *Zea mays* L. (Mais), Across 8023, Helix und Pioneer 3906 wurden in dieser Arbeit nach Applikation von 100 mM NaCl im Nährmedium oder bei Anzucht in Nebelkultur sowie bei Anwesenheit von 10 μ M des Stresshormones Abscisinsäure (ABA) isoliert und deren Polymerzusammensetzung (Suberin, Lignin (partiell)) im Vergleich mit Wurzelzellwänden von Kontrollpflanzen analysiert. Die drei Genotypen unterschieden sich in ihrer Salzresistenz, Pioneer 3906 ist eine salztolerante Sorte, Across 8023 eine salzempfindliche Sorte (FORTMEIER und SCHUBERT 1995), für Helix gab es bislang keine Daten über die Salztoleranz. Die Wirkung von ABA als Stresshormon auf die Bildung apoplastischer Barrieren wurde bereits von ZEIER (1998) und HOSE (2001) untersucht, wobei eine starke zusätzliche Suberinisierung festgestellt wurde. Die hydraulische Leitfähigkeit von Nebelkulturwurzeln wurde in Zusammenarbeit mit DR. HILDE ZIMMERMANN (AG PROF. DR. STEUDLE, Bayreuth) bestimmt, außerdem wurde die Aufnahme rate von Rubidium-Ionen in die gestressten Pflanzen im eigenen Labor ermittelt.

7.1 Mikroskopische Untersuchungen an *Z. mays*.

Analog zu den Beobachtungen von KRÖMER (1903) konnte die ontogenetische Entwicklung der Maiswurzel in drei Entwicklungsstadien der Endodermis an allen untersuchten Genotypen festgestellt werden. Die Wurzel von 12 Tage alten Keimlingen wurde analog der Untersuchungen von ZEIER (1998) zur Zellwandanalyse in fünf äquidistante Zonen unterteilt und anschließend mikroskopisch und chemisch charakterisiert. In der Endodermis der Zone I konnten CASPARY-Streifen mit präparationsbedingter typischer Bandplasmolyse (ENSTONE und PETERSON, 1997) mit Sudan III angefärbt werden (Abb. 7.1 L), in Zone II wurde bereits eine Suberinlamelle angefärbt (Abb. 7.1 J), die jedoch erst in Zone III (Abb. 7.1 H) vollständig an allen Endodermiszellen mit Ausnahme weniger Durchlasszellen zu sehen war. Zone IV und V (Abb. 7.1 F, D) zeigen deutlich tertiäre Zellwandauflagerungen. Zellwände der Hypodermis und Rhizodermis ließen sich in Zone I-II nicht mit Sudan färben (Abb. 7.1 K, I) in Zone III war vor allem die Rhizodermis angefärbt (Abb. 7.1 G), in der Hypodermis der 12 Tage alten Maispflanzen (Kontrollen) in Zone IV und V (Abb. 7.1 E, C) konnte ein CASPARYScher Streifen mit Berberinchlorid/Kristallviolett angefärbt werden, so dass in

diesem Fall die Bezeichnung Exodermis gewählt werden konnte (Abb. 7.1 B). Sudan III Färbungen war in Rhizodermis wie Exodermis erfolgreich.

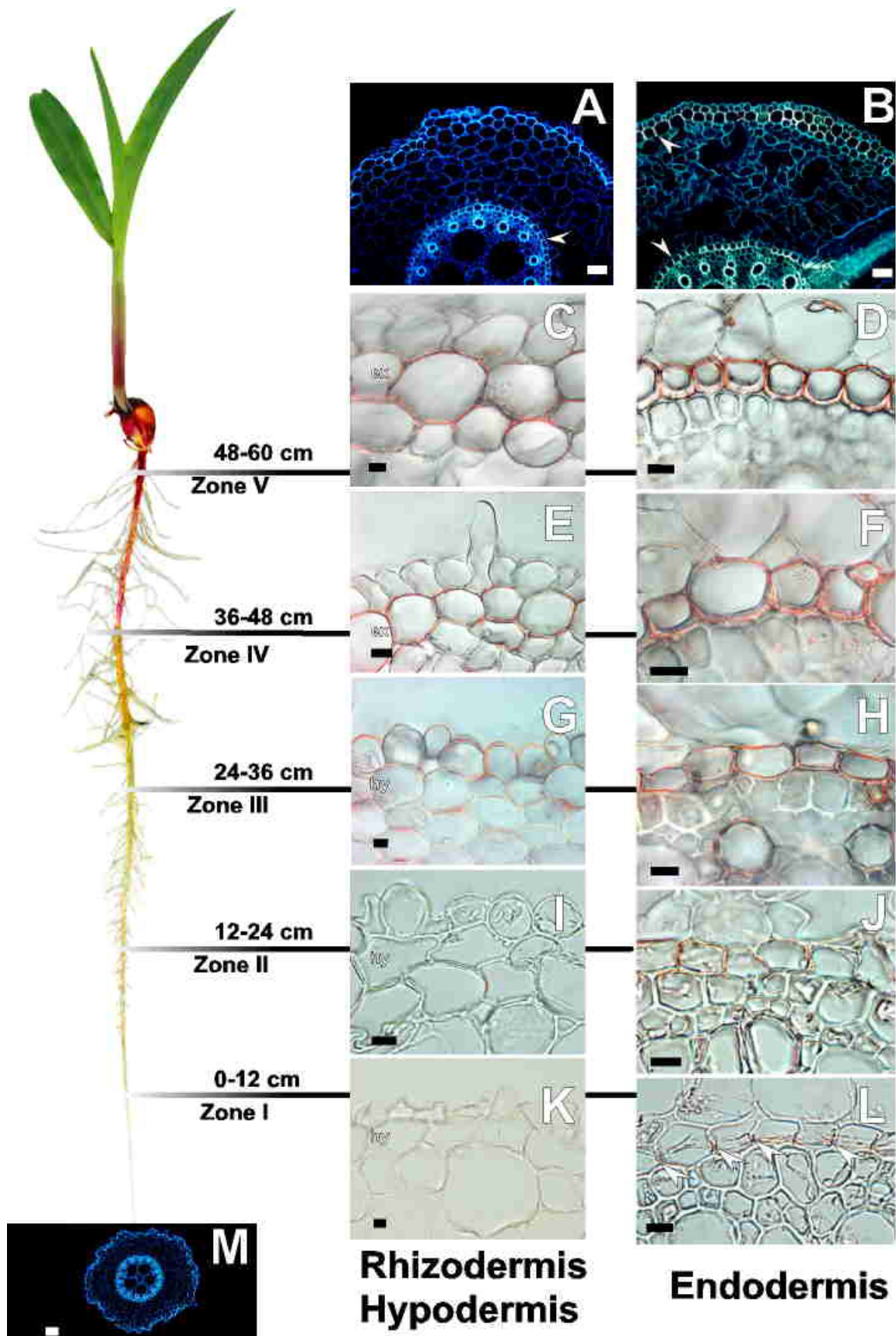


Abb. 7.1: Entwicklungsstufen apoplastischen Barrieren in der Maiswurzel (Kontrollanzucht) der Sorte Helix und Einteilung der Wurzellänge in Zonen I-V nach dem Entwicklungszustand der Endodermis; Alter 12 Tage; Mikroskopische Querschnittsbilder der Maiswurzel; **A, M** Autofluoreszenz; **B** Berberinchlorid Anilinblau Färbung; **C-L** Sudan III Färbung. **C, E, G, I, K** Rhizodermis und Hypo/Exodermis; **D, F, H, J, L** Endodermis; **A** Zone I, äußere tangentiale hypodermale Zellwände und CASPARY-Streifen der endodermale Zellwände (Pfeilspitze) sowie Xylemelemente zeigen starke Autofluoreszenz; **B** Zone V, Exodermale und endodermale CASPARY-Streifen leuchten nach der Färbung gelblich (Pfeilspitzen); **C** Zone V, Exodermis (ex) und Rhizodermis sind stark gefärbt; **D** Zone V, Endodermis mit tertiären Zellwandauflagerungen und Suberinlamellen (rot); **E** Zone IV, Exodermis stark gefärbt schwach gefärbte Rhizodermis; **F** Zone IV, Endodermis mit tertiären Zellwandauflagerungen und Suberinlamelle (rot); **G** Zone III, Radial- und Tangentialwändeder Rhizodermis sowie der Hypodermis angefärbt; **H** Zone III, Endodermis, Suberinlamelle angefärbt, sek. Entwicklungsstadium; **I** Zone II, Rhizodermis ungefärbt, Radialwände der Hypodermis teilweise gefärbt; **J** Zone II, Endodermis alle Radial und fast alle Tangentialwände sind gefärbt; **K** Zone I, Hypodermis und Rhizodermis zeigen keine Färbung; **L** Zone I; Endodermis mit CASPARY-Streifen (Pfeilspitzen) und typischer Bandplasmolyse; **M** Zone I; Übersicht eines Maiswurzelquerschnittes mit Autofluoreszenz in den frühen Metaxylem, -endodermalen- und hypodermalen Zellwänden.

Im Vergleich der drei Sorten zeigte sich, dass Wurzeln von Across 8023-Mais in der Kontrollkultur die größten Längen von bis über 60 cm erreichten, während Pioneer 3906-Wurzeln 20 cm kürzer blieben, die Sorte Helix blieb mit 40-50 cm dazwischen (Tab. 7.1). Bei zwölf tägiger Kultur in Nährlösung mit 100 mM NaCl entwickelten sich die Wurzeln von Across 8023 und Helix nur bis maximal 26 cm Länge, während Pioneer 3906 Wurzeln bis zu 34 cm erreichten (Tab. 7.1). Die Verhältnisse der Wurzel und Sprosslängen von Kontroll- zu NaCl-Pflanzen betragen bei Across 8023 und Helix 2.82 bis 3.26, bei Pioneer 3906 wurde dagegen 1.15 nicht überschritten (Tab. 7.1).

Tab. 7.1: Wurzel- und Sprosslängen von Wurzeln von *Z. mays* der Sorten Across 8023, Helix und Pioneer 3906 Kontroll-Kultur und Kultur unter 100 mM NaCl; Alter 12 Tage; Fehlerangabe (\pm) = StabWN mit $N > 4$.

	Across 8023		Helix		Pioneer 3906	
	Wurzel [cm]	Spross [cm]	Wurzel [cm]	Spross [cm]	Wurzel [cm]	Spross [cm]
Kontrolle	55.5 \pm 6.1	34.2 \pm 4.6	46.2 \pm 5.9	33.6 \pm 3.4	33.2 \pm 7.3	25.3 \pm 5.3
100 mM NaCl	18.1 \pm 8.2	9.2 \pm 7.5	16.4 \pm 3.1	10.3 \pm 4.5	28.9 \pm 5.8	20.7 \pm 3.5
Verhältnis Kontrolle/NaCl	3.06	3.72	2.82	3.26	1.15	1.22

Die Spross-Wurzellängen Verhältnisse betragen ohne Berücksichtigung der Standardfehler bei Across 8023-Kontrollen 0.62, bei Helix 0.72 und bei Pioneer 3906 0.76. Bei 100 mM NaCl im Nährmedium verschoben sich die Verhältnisse zugunsten der Wurzel, auf 0.51 bei Across 8023, 0.63 bei Helix und 0.72 bei Pioneer 3906-Mais.

Die Radien der Wurzeln wurden unter dem Mikroskop bestimmt und ein Trockengewichts-Oberflächenbezug der isolierten RHZW mithilfe des Gewichts-Längenbezuges hergestellt (Abb. 7.2). Die Radien der Kontrollwurzeln stiegen bei Across 8023 nur unwesentlich, jedoch erhöhte sich das Gewicht der isolierten RHZW pro Wurzellänge von ca. 63 $\mu\text{g cm}^{-1}$ auf 135

$\mu\text{g cm}^{-1}$ wodurch in Zone V der mit $341 \mu\text{g cm}^{-2}$ höchste Trockengewichts/Oberflächenbezug aller drei Sorten resultiert. Entlang der Wurzel nahm das Gewicht pro Oberfläche von Zone I auf Zone V um das 2.3 fache zu. Bei Helix konnte eine Zunahme um das 2.1 fache festgestellt werden, bei Pioneer 3906 wurde nur eine geringe Steigerung um den Faktor 1.1 beobachtet (Abb. 7.2 linke Spalte A, B, C).

Bei Salzgestressten Pflanzen, konnte von Zone I zu Zone II von Across 8023 RHZW ein starker Anstieg um das 1.9 fache dieser Bezugsgröße festgestellt werden, in den Zonen III bis V konnten keine Änderungen mehr festgestellt werden, mit $219 \mu\text{g cm}^{-2}$ wurden 64% des Kontrollwertes errechnet. Geringe Änderungen im Gewichts-Oberflächen Bezug charakterisieren die Salz-Kulturen von Helix und Pioneer 3906, die Werte entsprechen innerhalb der Fehlergrenzen den Kontrollwerten der linken Spalte (Abb. 7.2 rechte Spalte A, B, C). Als Trend ließ sich erkennen, dass unter 100 mM-NaCl aufgewachsene Pflanzen in den apicalen Zonen meist größere Radien als die Kontrollpflanzen aufwiesen, jedoch diese sich mit zunehmendem Alter nicht mehr stark veränderten.

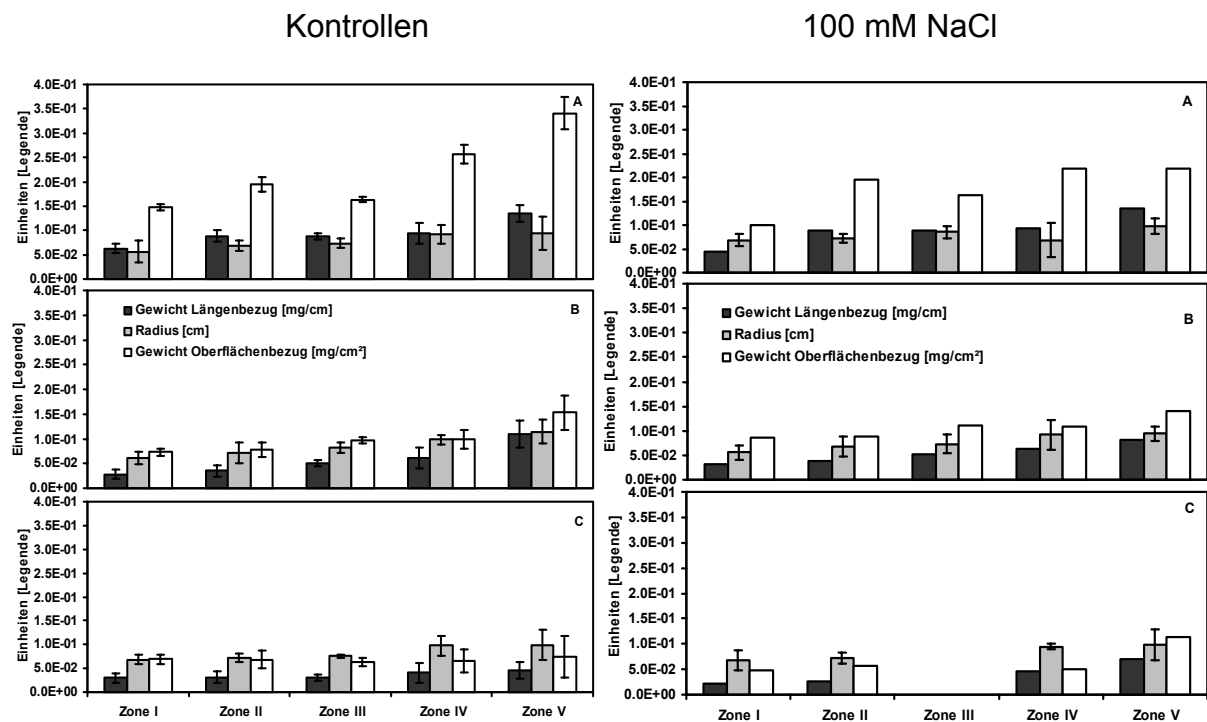


Abb. 7.2: Anatomische Parameter der untersuchten Wurzeln von *Z. mays*; Alter = 12 Tage; linke Spalte Kontrollkultur, rechte Spalte Kultur mit 100 mM NaCl , Trockengewicht der isolierten RHZW pro cm Wurzellänge (linker Balken), $[\text{mg cm}^{-1}]$; Radius der äußeren Rhizodermiszellwand (mittlerer Balken), $[\text{cm}]$ ermittelt durch mikroskopische Messung; Trockengewicht der isolierten RHZW pro cm^2 Wurzeloberfläche (rechter Balken), $[\text{mg cm}^{-2}]$; A Sorte Across 8023; B Sorte Helix; C Sorte Pioneer 3906; Zone III keine Analyse vorhanden; (Fehlerbalken = StabWN wenn nicht angezeigt; Wert wurde durch gemeinsames Wiegen des Materials mehrerer Stücke RHZW bekannter Länge gewonnen).

7.2 Suberinanalysen der Rhizodermis/Hypodermis der Wurzeln von *Z. mays*.

Der Gehalt aliphatischer Suberinkomponenten in den RHZW der Kontrollkulturen der zwei Mais-Sorten Across 8023 und Helix liegt zwischen drei nmol cm^{-2} ($2.84 \text{ nmol cm}^{-2}$ und $3.63 \text{ nmol cm}^{-2}$ entsprechend $1.08 \mu\text{g cm}^{-2}$ und $1.44 \mu\text{g cm}^{-2}$), in Zone I, und sechs nmol cm^{-2} ($5.42 \text{ nmol cm}^{-2}$ bzw. $5.84 \text{ nmol cm}^{-2}$ entsprechend $2.17 \mu\text{g cm}^{-2}$ bzw. $2.37 \mu\text{g cm}^{-2}$), in Zone V (Tab. 7.2). Die Sorte Pioneer 3906 enthielt dagegen maximal ein bis zwei nmol cm^{-2} ($1.44 \text{ nmol cm}^{-2}$ bis $1.74 \text{ nmol cm}^{-2}$ entsprechend $0.54 \mu\text{g cm}^{-2}$ bis $0.66 \mu\text{g cm}^{-2}$) aliphatisches Suberin, ohne signifikante Mengen-Unterschiede innerhalb der Zonen aufzuweisen (Tab. 7.2). Aromatische Suberinkomponenten bildeten in Across 8023 RHZW mit 3 bis 18 nmol cm^{-2} im Durchschnitt etwa 70% des Gesamtsuberins, so dass die Gesamtmengen an Suberin bei Across 8023 RHZW 6 bis 25 nmol cm^{-2} betragen (Tab. 7.2). Maximal die Hälfte des Across 8023 RHZW-Suberins konnte in Helix-Mais nachgewiesen werden, der Anteil an aromatischen Estergebundenen Suberinkomponenten betrug hier nur etwa 60%, was je nach Zone 6 bis 12 nmol cm^{-2} entsprach. Mais der Sorte Pioneer 3906 enthielt mit durchschnittlich etwa 80% den höchsten Aromatenanteil, welcher jedoch innerhalb der Zonen von 4.7 nmol cm^{-2} auf 6.1 nmol cm^{-2} nur wenig stieg (Tab. 7.2).

Tab. 7.2: Suberingehalt (Aliphaten) in RHZW in Wurzeln von drei Zuchtsorten *Z. mays*; Kultur bei 100 mM NaCl und Kontrollkultur ohne NaCl, Mittelwerte aller Zonen; Alter = 12 Tage; der Fehler (\pm) gibt die Standardabweichung an.

Sorte	Zone	RHZW Kontrolle			RHZW 100mM NaCl		
		Aliphaten [nmol cm^{-2}]	Aromaten [nmol cm^{-2}]	Summe [nmol cm^{-2}]	Aliphaten [nmol cm^{-2}]	Aromaten [nmol cm^{-2}]	Summe [nmol cm^{-2}]
A ^{a)}	I	2.84±0.83	3.41±1.39	6.26±2.00	2.40	12.9	15.4
	II	4.62±0.63	11.7±0.1	16.3 ±0.69	3.71	18.9	22.6
	III	4.71±0.37	10.0±1.6	14.7 ±1.9	4.95	17.4	22.3
	IV	5.48±2.03	13.7±0.2	19.2 ±2.2	4.18±0.11	19.7 ±1.5	23.9 ±1.6
	V	5.43±1.13	18.9±3.6	24.4 ±4.7	4.91±0.16	22.5 ±1.9	27.4 ±1.8
H ^{b)}	I	3.64±0.19	2.76±0.04	6.40±0.23	3.66	6.21	9.87
	II	4.02±0.02	5.42±0.06	9.44±0.08	3.07	7.64	10.7
	III	3.26±0.74	7.39±1.31	10.7 ±2.1	4.09	6.78	10.9
	IV	3.79±0.41	6.83±0.40	10.6 ±0.7	3.18	6.97	10.2
	V	5.84±0.23	6.97±0.44	12.8 ±0.7	4.94	12.8	17.7
P ^{c)}	I	1.44±0.38	4.65±0.03	6.09±0.35	1.37±0.47	8.11±3.11	9.49±3.58
	II	1.57±0.05	5.07±0.01	6.64±0.07	1.89±0.39	7.76±1.28	9.66±1.68
	III	1.41±0.33	5.46±0.39	6.87±0.72	n.d.	n.d.	n.d.
	IV	1.14±0.09	5.18±0.46	6.32±0.55	2.87±0.38	7.14±1.70	10.0 ±2.1
	V	1.75±0.16	6.03±0.22	7.78±0.05	2.94±0.11	10.0 ±0.4	12.9 ±0.3

a) A = Across 8023; b) H = Helix; c) P = Pioneer 3906

Die Mengen Aliphatischer Bestandteile im RHZW der Sorten Across 8023 und Helix entsprachen sich in allen Zonen im Rahmen der Standardfehler, bei Kultur unter Salzstress konnte bei Across 8023 ein schwacher Trend zu geringeren Mengen Suberin gefunden werden, der bei Helix geringfügig stärker war. Bei Mais der Sorte Pioneer 3906 wurde dagegen ein deutlicher Trend zu größeren Mengen Suberin in den RHZW bei Salzstress festgestellt.

Der Aromatengehalt in RHZW von Mais aller drei untersuchten Sorten, stieg bei Salzstress an. Es konnte ein schwacher Trend zu geringeren Mengen aromatischer Bestandteile in den älteren Wurzelzonen bei Across 8023 und Helix festgestellt werden. Auch der Anteil aromatischer Suberinbestandteile in den salzgestressten Wurzeln nahm bei Across 8023 und Helix um ca. 10% zu, jedoch nicht bei Pioneer 3906-Mais (Tab. 7.3).

Tab. 7.3: Aromatengehalt im Suberin von RHZW in Wurzeln von *Z. mays*, Mittelwerte über alle Zonen; Alter = 12 Tage; der Fehler (\pm) gibt die Standardabweichung der Zonen untereinander an.

Sorte	RHZW Kontrolle Aromatenanteil [%]	RHZW 100mM NaCl Aromatenanteil [%]
Across 8023	68.7 (± 8.1)	82.1 (± 2.3)
Helix	57.7 (± 9.1)	67.8 (± 4.5)
Pioneer 3906	78.4 (± 2.1)	78.5 (± 5.3)

Das Suberin in den untersuchten RHZW setzte sich neben den aromatischen Anteil, der aus Ferulasäure und Cumarsäure und geringen Mengen *m*-Anisinsäure (*p*-Hydroxybenzoesäure) gebildet wurde, aus einem aliphatischen Teil mit acht Substanzklassen (Alkohole, Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren ges./unges., ω -Hydroxysäuren ges./unges., 2-Hydroxysäuren und C₁₈-12-Hydroxysäure) zusammen. In den Kontrollkulturen wie in den 100mM NaCl Kulturen dominierten ω -Hydroxysäuren und Monocarbonsäuren das Suberin (Abb. 7.3 und Abb. 7.4). Die in der Abbildung 7.3 und 7.4 aufgeführten ungesättigten Verbindungen wurden lediglich in Form ihrer C₁₈-9-en Monomere gefunden, die Monomere der restlichen Substanzklassen besaßen Kettenlängen von C₁₆ bis C₃₀.

In Across 8023-RHZW der Kontrollkultur (Abb. 7.3 A) unterschied sich die Zusammensetzung in Zone I der Wurzel durch einen höheren Anteil ungesättigter Disäure (18%) der bereits in Zone II auf 7% sank und in Zone V bis auf 2% fiel, auch bei gesättigten Disäuren konnte eine Abnahme von 8% auf unter 2% festgestellt werden. Die Menge gesättigter ω -Hydroxysäuren nahm innerhalb der Zonen zu, von 35% auf 58%. Bei anderen Substanzklassen konnte keine ausgeprägte Altersentwicklung festgestellt werden, etwa 18% des aliphatischen Suberins bestand aus Monocarbonsäuren, durchschnittlich 5% aus Alkoholen, zu etwa 10% waren ungesättigte ω -Hydroxysäuren vorhanden und die 2-

Hydroxysäuren sowie die C₁₈-12-Hydroxysäure bildeten jeweils durchschnittlich 4% des aliphatischen Suberins in Across 8023 RHZW (Abb. 7.3 A).

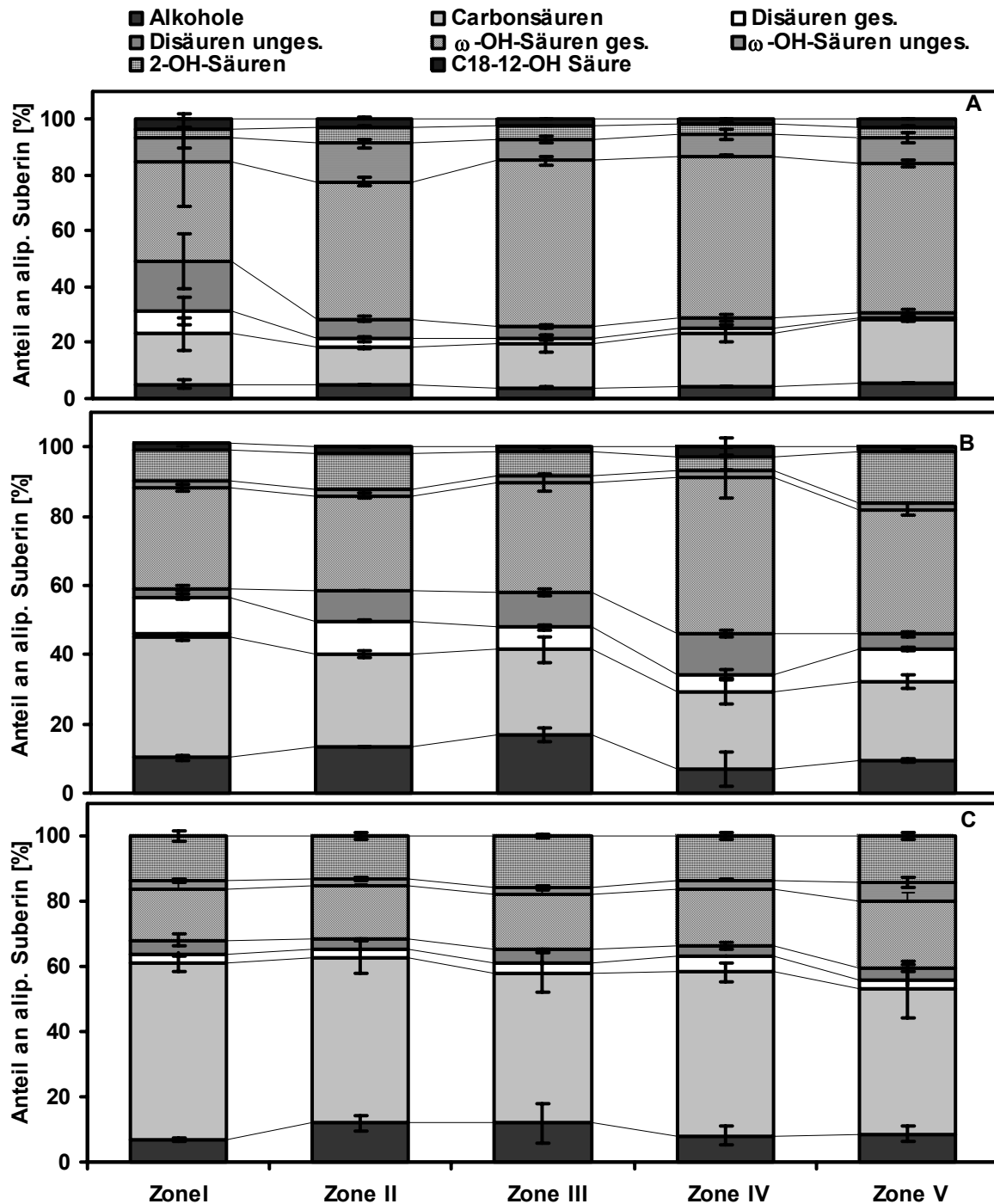


Abb. 7.3: Suberinzusammensetzung nach Substanzklassen des aliphatischen Suberins von RHZW in Wurzeln von *Z. mays*, Kontrollkultur; Alter = 12 Tage; **A** Sorte Across 8023; **B** Sorte Helix; **C** Sorte Pioneer 3906; Angaben in Prozent von der Stoffmenge des aliphatischen Suberins; ges. = gesättigt; unges. = ungesättigt; (Fehlerbalken = StabWN).

Bei der Sorte Helix enthielt das aliphatische Suberin der RHZW größere Anteile an Alkoholen (10-17%), Monocarbonsäuren (35-22%) und 2-Hydroxysäuren (3-15%) als die Sorte Across 8023 (Abb. 7.3 B). Zudem konnten in fast jeder Zone ca. 10% gesättigter Disäuren nachgewiesen werden. Altersabhängigkeiten der Zusammensetzung waren bei dieser Sorte weniger ausgeprägt, der Anteil ω -Hydroxysäuren nahm von Zone I zu Zone V geringfügig zu, auch der Anteil an 2-OH-Säuren. Alkohol und Säuregehalt nahmen im Gegenzug ab (Abb. 7.3 B).

Die Sorte Pioneer 3906 zeigte im aliphatischen Suberin keine altersabhängigen Unterschiede, dies bestand jedoch zu 44-54% aus Monocarbonsäuren (Abb. 7.3 C). Etwa 10% bildeten Alkohole, 3% Bestand aus gesättigten und ca. 4% aus ungesättigten Disäuren, zu 16%, maximal 20% waren gesättigte, zu 2% ungesättigte ω -Hydroxysäuren vertreten und 15% bildeten 2-Hydroxysäuren. C₁₈-12-Hydroxysäure konnte hier nicht nachgewiesen werden (Abb. 7.3 C).

Der Anteil aliphatischen Suberins in salzgestressten Across 8023-Mais nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe um ca. 10% ab und änderte seine Zusammensetzung geringfügig (Abb. 7.4 A). In Zone I der Wurzel konnten 50% gesättigte ω -Hydroxysäuren im aliphatischen Suberin nachgewiesen werden, dieser Anteil änderte sich bis in Zone V nicht signifikant. Der im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Anteil an 2-OH-Säuren von 16% in Zone I nahm kontinuierlich bis auf 5% in Zone V ab. 4% ungesättigte Disäuren in Zone I-III wurden in Zone IV und V durch einen gleich großen Anteil gesättigter Disäuren substituiert. Alkohole und Monocarbonsäuren veränderten ihre Anteile am aliphatischen Suberin in RHZW von Across 8023-Mais mit zunehmendem Alter nicht signifikant (Abb. 7.4 A).

C₁₈-12-Hydroxysäure konnte in RHZW-Suberin von bei 100 mM NaCl angezogenem Helix-Mais nicht nachgewiesen werden (Abb. 7.4 B). Eine altersabhängige Veränderung der Substanzklassenzusammensetzung konnte nicht festgestellt werden. 8% des Suberins bestanden aus Alkoholen, zu 26% waren Monocarbonsäuren enthalten, gesättigte und ungesättigte Disäuren bildeten 11% des Suberins und 37% waren gesättigte ω -Hydroxysäuren, ungesättigte konnten zu 5% nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht war der durchschnittliche Anteil von 14% an 2-Hydroxysäuren in allen Zonen (Abb. 7.4 B).

Mais der Sorte Pioneer 3906 änderte die Zusammensetzung des aliphatischen Suberins bei Kultur in 100 mM NaCl gegenüber der Kontrollgruppe deutlich durch den vermehrten Einbau von ω -Hydroxysäuren und einem geringeren Anteil an Monocarbonsäuren (Abb. 7.4 C). Auch eine altersabhängige Variation der Substanzklassenanteile bestand. Von Zone I zu Zone II stieg der Anteil an ω -Hydroxysäuren von 27% auf 41% gleichzeitig nahm der Anteil der 2-OH-Säuren von 30% auf 20% und der Anteil der Monocarbonsäuren von 32% auf 24% ab. Gesättigte Disäuren wurden ebenfalls reduziert eingebaut, von Zone IV auf Zone V nahm der Anteil der ungesättigten Disäure von 2% auf 13% zu während der Anteil Monocarbonsäuren weiter auf 18% abnahm. Ungesättigte ω -Hydroxysäure konnten in den Zonen I-IV nur in

Spuren nachgewiesen werden, in Zone V bilden sie jedoch 12% des aliphatischen Suberins neben 37% der gesättigten Komponente (Abb. 7.4 C).

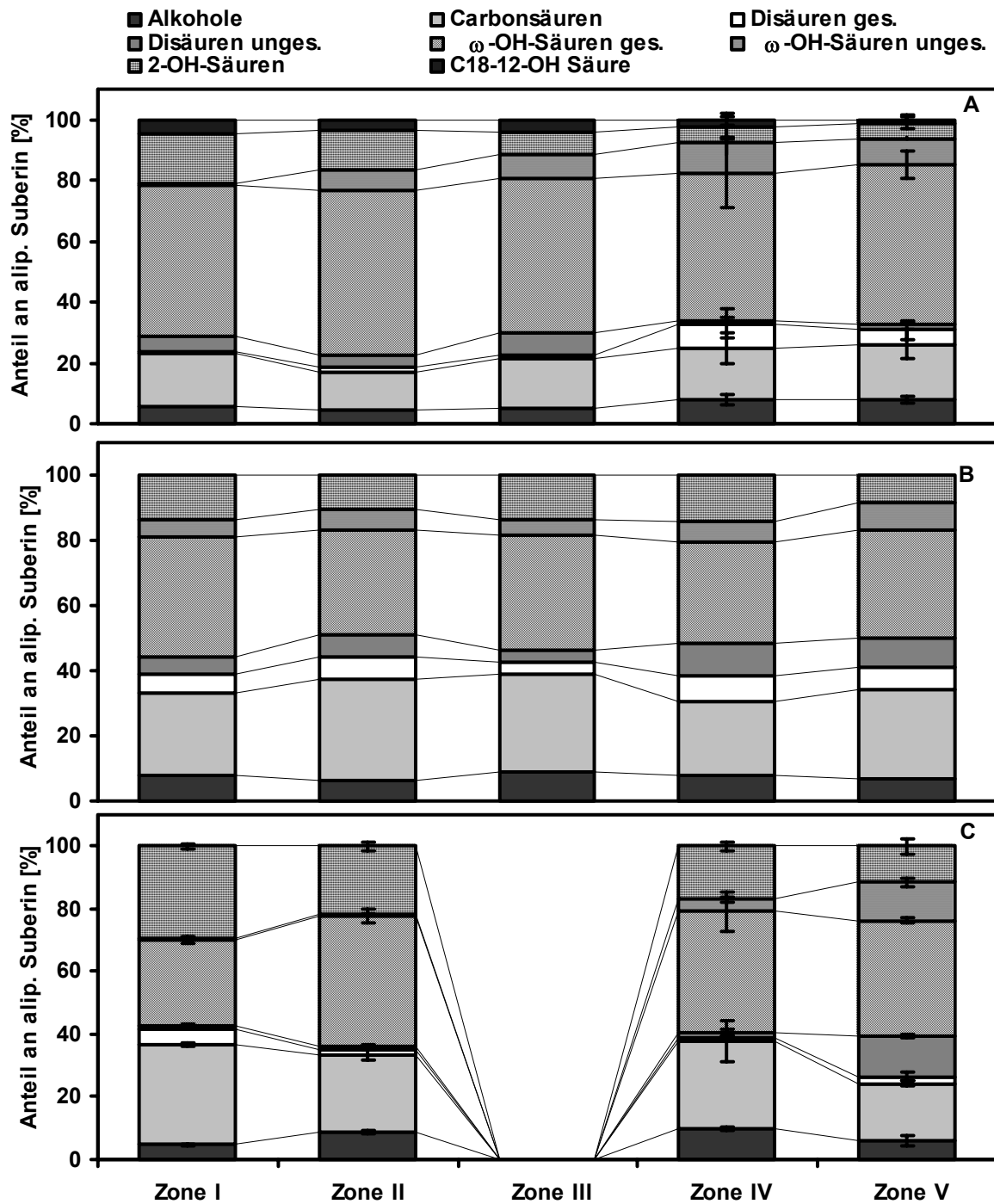


Abb. 7.4: Suberinzusammensetzung nach Substanzklassen des aliphatischen Suberins von RHZW in Wurzeln von *Z. mays*, Kultur in 100 mM NaCl-Lösung; Alter = 12 Tage; **A** Sorte Across 8023; **B** Sorte Helix; **C** Sorte Pioneer 3906; Zone III keine Analyse vorhanden. Alle Angaben in Prozent von der Stoffmenge des aliphatischen Suberins; ges. = gesättigt; unges. = ungesättigt; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Untersuchung der mittleren Kettenlängenverteilung der drei Sorten ergab bei den Kontrollgruppen nur geringe Unterschiede der mittleren Kettenlänge innerhalb der fünf Zonen einer Sorte (Abb. 7.5 A). Zwischen den Sorten konnten jedoch nach der Berechnung der mittleren Kettenlänge aller aliphatischen Komponenten im Suberin der RHZW-Fraktion deutliche Unterschiede festgestellt werden. Across 8023-Mais RHZW wies mit durchschnittlich 19.7 C-Atomen die kleinste mittlere Kettenlänge auf, Pioneer 3906 konnte mit durchschnittlich 20.4 Kohlenstoffeinheiten geringfügig längere Ketten aufweisen, im RHZW von Helix-Mais wurde die größte mittlere Kettenlänge von 21.8 C-Atomen festgestellt, also durchschnittlich 2 Methylenheiten mehr als bei Across 8023-Mais (Abb. 7.5 A).

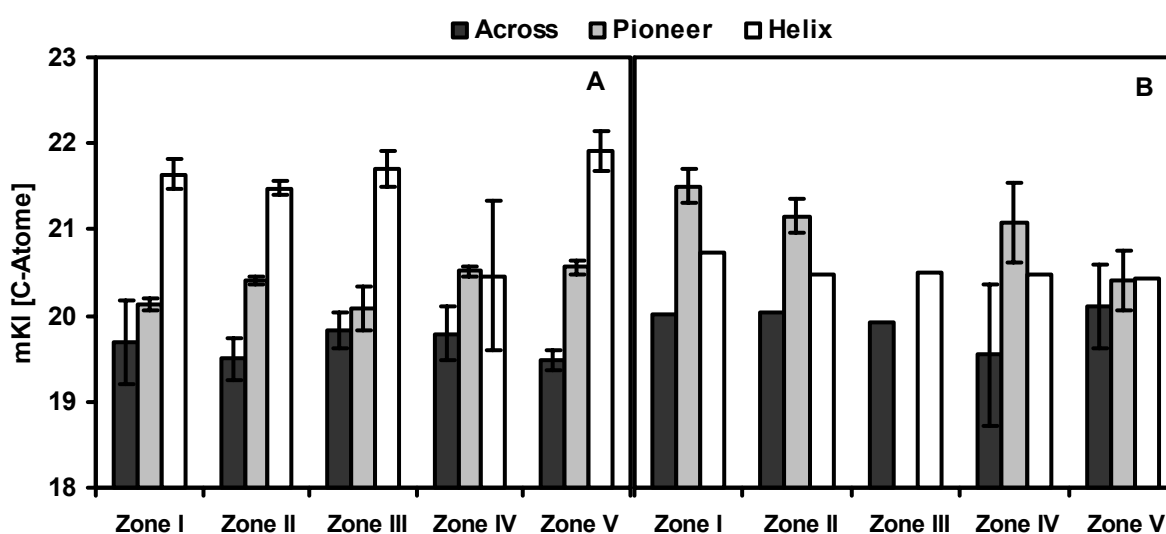


Abb. 7.5: Mittlere Kettenlängen der aliphatischen Monomeren in RHZW von *Z. mays* verschiedener Sorten; Alter = 12 Tage; **A** Kontrollkultur; **B** Kultur mit 100 mM NaCl; Die Werte stellen Mittelwerte der Kettenlängen aliphatischer Monomeren nach Zonen sortiert dar; (Fehlerbalken = StabWN der mKl aller aliphatischen Substanzen innerhalb einer Zone).

Bei Kultur mit 100 mM NaCl (Abb. 7.5 B) konnte eine Verschiebung der mittleren Kettenlängenverteilung bei Pioneer 3906 und Helix-Mais RHZW-Suberin beobachtet werden, bei Across 8023 wurde keine signifikante Änderung der mittleren Kettenlänge festgestellt. Die mittlere Kettenlänge in Pioneer 3906 RHZW-Suberin stieg um durchschnittlich ein C-Atom auf 21.1, und zeigte eine Tendenz zu kleinerer Kettenlänge bei älteren Zonen. Helix Mais RHZW-Suberin bestand bei Kultur unter Salzstress aus Kohlenstoffketten mit einer mittleren Kettenlänge von 20.5 C-Atomen, was einem Rückgang um durchschnittlich eine Methylen-Einheit bedeutet.

Die Konnektivität des Polymers, also die Zahl der miteinander verbundenen funktionellen Gruppen der Monomeren kann anzeigen, wie gut das Polymer vernetzt ist. Eine hohe Anzahl geknüpfter Bindungen lässt auf ein stabiles, undurchlässigeres Polymer schließen, bei einer niedrigeren Anzahl verbundener funktioneller Gruppen wird eine schlechtere Barrierefunktion

vermutet. Bei Mais lag die Anzahl freier Carbonsäuregruppen meist über 20% (Abb. 7.6). Bei Suberin in RHZW von Across 8023-Mais fiel die Anzahl ungebundener Carboxy-Gruppen in der Kontrollgruppe von 48% in der Zone I auf 28% in Zone II und bis auf 22% in Zone V (Durchschnitt aller Zonen = 29%), bei Pioneer 3906 RHZW ging der Anteil ungebundener Carboxy-Gruppen im Suberin von Zone I auf Zone II um 10% zurück, hier konnte schon in Zone III mit 44% ein Minimum festgestellt werden, in älteren Zonen stieg die Anzahl freier Carboxygruppen wieder an (Durchschnitt aller Zonen = 51%), (Abb. 7.6 A). Der Anteil ungebundener COOH in der Kontrollgruppe von Helix-Mais sank von 48% in Zone I stetig auf 39% in Zone V (Durchschnitt aller Zonen = 44%), (Abb. 7.6 A).

In den Kulturen mit 100 mM NaCl im Nährmedium konnten im Suberin der RHZW keine Abhängigkeiten der Konnektivität vom Entwicklungszustand der Gewebe festgestellt werden (Abb. 7.6 B). Der Anteil ungebundener Carboxy-Gruppen bei Across 8023-Mais lag durchschnittlich bei 24%, somit niedriger als es bei der Kontrollgruppe der Fall war, niedrigere Durchschnitts-Werte als in der Kontrollgruppe konnten auch bei Suberin in salzgestressten Pioneer 3906- (36%) und Helix-RHZW (38%) festgestellt werden (Abb. 7.6 B).

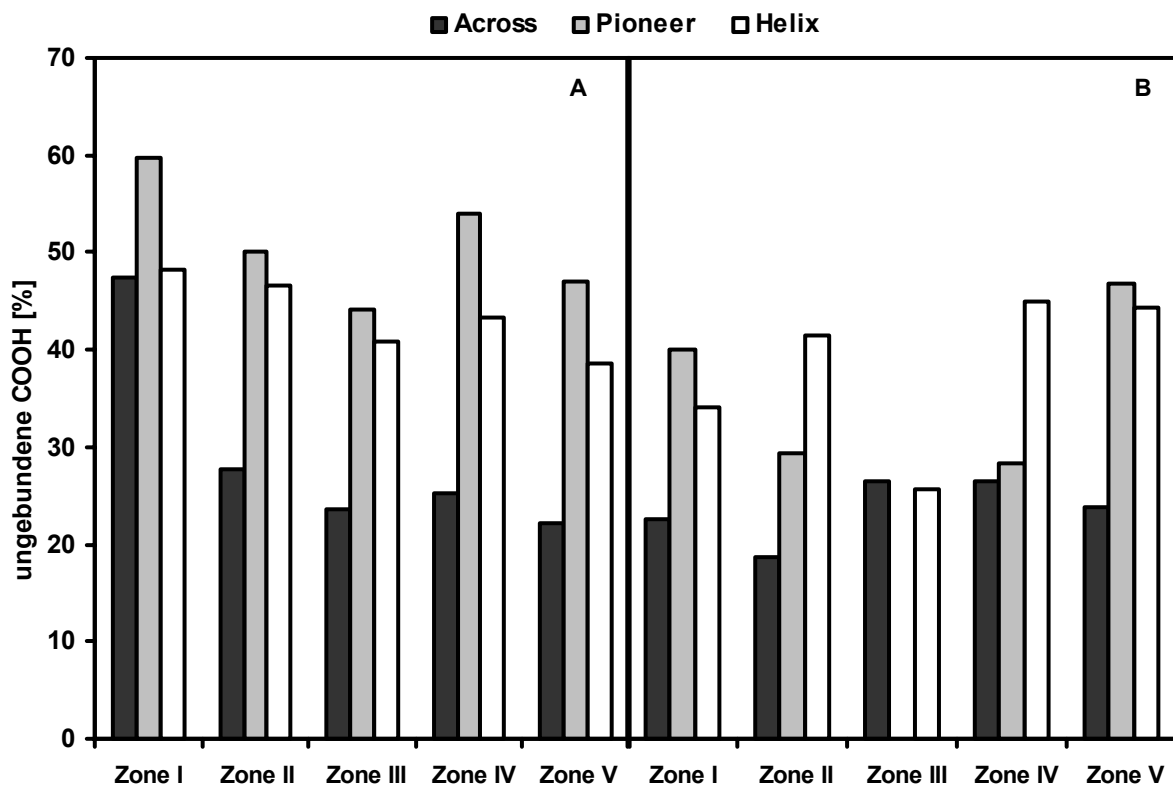


Abb. 7.6: Prozentsatz der nicht mit (im gleichen Suberin detektierten) Hydroxygruppen veresterten Carboxy-Gruppen in RHZW von *Z. mays* verschiedener Zuchtsorten; Alter = 12 Tage; **A** Kontrollkultur; **B** Kultur mit 100 mM NaCl. Berechnungsgrundlage waren die Mittelwerte der Stoffmengen der einzelnen Monomeren (kleinere Prozentzahlen bedeuten höhere Konnektivität).

7.2.1 Suberinanalysen der Endodermis von *Z. mays*.

Endodermale Zellwände der drei Maissorten konnten nicht immer in ausreichender Menge von jeder Zone erhalten werden, daher sind die Ergebnisse zum Teil lückenhaft.

Anatomische Untersuchungen des Zentralzylinders ergaben bei allen drei Sorten nur geringe Unterschiede im Radius des Zentralzylinders, auch zwischen den Zonen innerhalb einer Sorte konnten keine substantiellen Abweichungen von einem Durchschnittswert von etwa 190 μm Radius festgestellt werden (Abb. 7.7 A). Bei Kultur in 100 mM NaCl, konnte bei den Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 eine deutliche Vergrößerung des Radius des Zentralzylinders auf über 400 μm gemessen werden, was der Vergrößerung des gesamten Wurzeldurchmessers Rechnung trägt (Abb. 7.7 B). Bei der Sorte Helix wurde keine Änderung im Radius festgestellt. Bei allen Sorten konnte unter Salzstress eine Zunahme der EZW Masse pro Oberflächenäquivalent festgestellt werden, dieser Massenzuwachs, war in den Zonen II bis IV am ausgeprägtestem, in Zone V weniger stark.

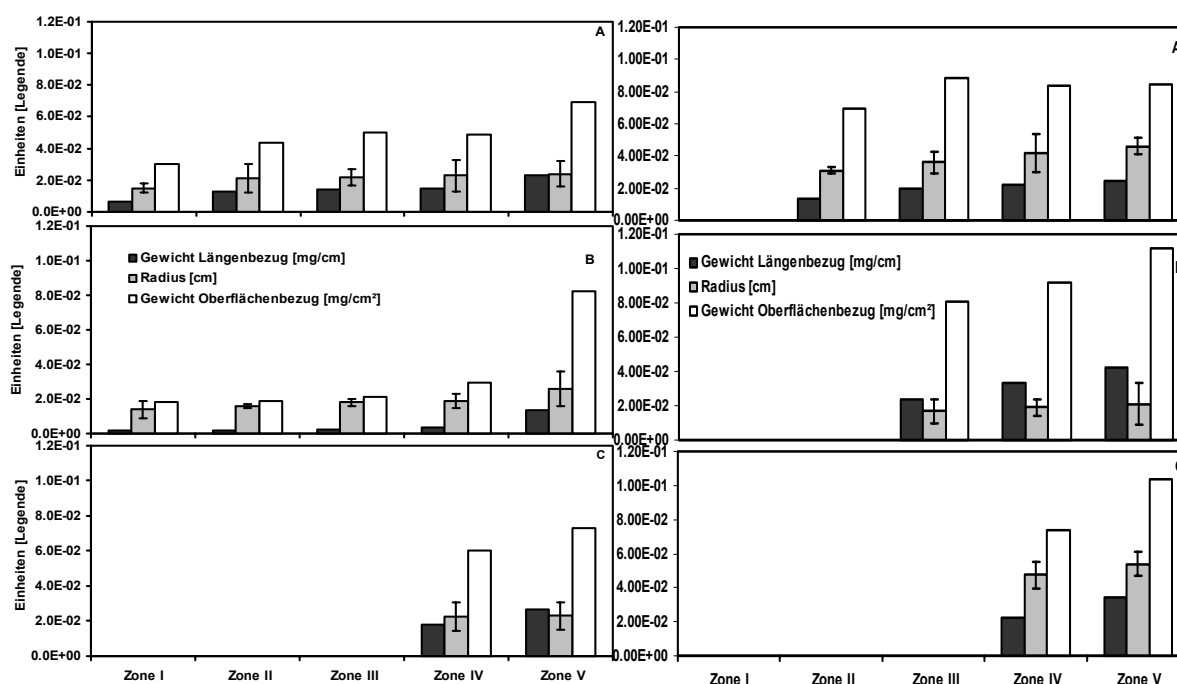


Abb. 7.7: Anatomische Parameter der untersuchten Wurzeln von *Z. mays*; Alter = 12 Tage; linke Spalte Kontrollkultur, rechte Spalte Kultur mit 100 mM NaCl, Trockengewicht der isolierten EZW pro cm Wurzellänge (linker Balken), $[\text{mg cm}^{-1}]$; Radius der äußeren Endodermiszellwand (mittlerer Balken), $[\text{cm}]$ ermittelt durch mikroskopische Messung; Trockengewicht der isolierten EZW pro cm^2 Wurzeloberfläche (rechter Balken), $[\text{mg cm}^{-2}]$; A Sorte Across 8023; B Sorte Helix; C Sorte Pioneer 3906; (Fehlerbalken = StabWN wenn nicht angezeigt: Wert wurde durch gemeinsames wiegen des Materials mehrerer Stücke EZW bekannter Länge gewonnen). Einige Analysen in Zone I-III waren nicht möglich, da kein Material isoliert werden konnte (leere Felder).

Das aliphatische, endodermale Suberin verteilte sich auf die isolierten Zellwände mit 1.36 nmol cm^{-2} bis 6.16 nmol cm^{-2} (0.51 $\mu\text{g cm}^{-2}$ bis 2.28 $\mu\text{g cm}^{-2}$), die niedrigsten Konzentrationen wurden in den Zonen I und II gemessen, die höchsten in Zone IV und V (Tab. 7.4). Across

8023-Mais enthielt 30-72% Aromatische Komponenten, mit zunehmenden Alter der Zone nahm der Aromatenanteil proportional zu, der niedrigste Gehalt an aliphatischen Bestandteilen wurde in Zone I mit $1.36 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($0.51 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$) festgestellt und der höchste in Zone IV mit $3.59 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($1.33 \mu\text{g cm}^{-2}$). Zone III und V enthalten mit jeweils etwa drei nmol cm^{-2} vergleichbare Mengen aliphatischer Komponenten. Helix-Mais wies erst in Zone IV über drei nmol cm^{-2} auf, in Zone III betrug die Summe aller aliphatischen Suberinkomponenten nur $1.59 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($0.57 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$), der Aromatenanteil betrug 30-63%, mit den höchsten Werten in den Zonen III-IV. EZW von Pioneer 3906-Mais konnten nur in den Zonen IV und V in ausreichender Menge isoliert werden, dort wurden mit $3.39 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($1.28 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$) in Zone IV und $6.16 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($2.28 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$) in Zone V große Mengen an Aliphaten gefunden, der 65%ige Aromatenanteil in Zone IV lag 10% über dem Wert in Zone V (Tab 7.4).

Tab. 7.4: Suberingehalt (Aliphaten) in EZW in Wurzeln von *Z. mays* Kultur bei 100 mM NaCl und Kontrollkultur, Mittelwerte aller Zonen; Alter = 12 Tage; der Fehler (\pm) gibt die Standardabweichung an.

Sorte	Zone	EZW Kontrolle			EZW 100mM NaCl		
		Aliphaten [nmolcm ⁻²]	Aromaten [nmolcm ⁻²]	Summe [nmolcm ⁻²]	Aliphaten [nmolcm ⁻²]	Aromaten [nmolcm ⁻²]	Summe [nmolcm ⁻²]
A ^{b)}	I	1.36	0.58	1.94	n.d. ^{b)}	n.d.	n.d.
	II	1.77	1.77	3.54	6.43	1.14	7.57
	III	2.94±0.21	4.55±0.25	7.49±0.05	13.2	12.8	26.1
	IV	3.59±0.31	5.57±0.58	9.17±0.89	14.4	13.3	27.7
	V	3.00±0.66	8.11±2.05	11.1±1.4	19.1	15.5	34.6
H ^{b)}	I	1.67	0.72	2.39	n.d.	n.d.	n.d.
	II	1.77±0.09	0.96±0.25	2.73±0.15	n.d.	n.d.	n.d.
	III	1.59±0.37	1.43±0.68	3.02±0.30	17.1	15.9	33.4
	IV	3.01±0.26	3.54±0.1	6.55±0.16	17.2	19.8	37.6
	V	3.29±0.18	4.82±0.43	8.12±0.62	26.0	61.9	89.8
P ^{b)}	I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	III	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	IV	3.39	6.38	9.78	5.70±0.42	8.40±0.71	14.1±0.3
	V	6.16	7.67	13.8	5.38±0.64	8.67±0.75	14.1±1.4

a) A = Across 8023 b) n.d. = keine Analyse vorhanden; c) H = Helix; d) P = Pioneer 3906.

Isolierte EZW in Kulturen mit 100 mM NaCl im Nährmedium der Hydrokultur enthielten in Across 8023 und Helix-Mais deutlich mehr Suberin als die EZW der Kontrollpflanzen (Tab 7.4). EZW der Sorte Pioneer 3906 zeigten dagegen keine stark erhöhten Suberinkonzentrationen. Bei Across 8023 konnten in Zone V mit $19.1 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($7.17 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$) die 6.4 fache Menge an Aliphaten gegenüber der Kontrolle gefunden werden, bei Helix fanden sich in der gleichen Zone $26.0 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($9.54 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$), ein Anstieg um das 7.9fache

des Kontrollwertes. Im Mittelwert stieg der Aliphatengehalt in Across 8023-EZW um den Faktor 4.6 (± 1.1) bei Helix-EZW um den Faktor 8.2 (± 2.1) und bei Pioneer 3906 am geringsten, lediglich um das 1.3 fache (± 0.5) (Tab 7.4).

Estergebundene Aromatische Komponenten im Suberin der EZW waren Ferulasäure und Cumarsäure, sowie geringe Mengen *m*-Anisinsäure. Ihr Anteil am Suberin betrug zwischen 45% (Helix) und 60% (Pioneer 3906) wenn man über alle Zonen mittelt (Tab 7.5). Bei Salzstress nahm der Aromatenanteil in Across 8023 EZW um 10% ab, in Helix EZW um 10% zu und bei Pioneer 3906 konnte nur eine marginale Änderung festgestellt werden (Tab 7.5).

Tab. 7.5: Aromatengehalt im Suberin von EZW in Wurzeln von *Z. mays*, Mittelwerte über alle Zonen; Alter = 12 Tage; der Fehler (\pm) gibt die Standardabweichung der Zonen untereinander an.

Sorte	EZW Kontrolle Aromatenanteil [%]	EZW 100mM NaCl Aromatenanteil [%]
Across 8023	49.9 (± 18.8)	39.3 (± 14.1)
Helix	44.7 (± 11.1)	56.5 (± 9.1)
Pioneer 3906	60.4 (± 4.1)	60.6 (± 1.0)

Die Zusammensetzung des aliphatischen Suberins in EZW der drei Maissorten rekrutierte sich aus den schon im RHZW gefundenen Substanzklassen. In der Kontrollgruppe dominierten vor allem gesättigte und ungesättigte ω -Hydroxysäuren mit 24-62% neben den Monocarbonsäuren. Bei Across 8023-EZW fiel der Anteil gesättigter ω -Hydroxysäuren von 44% in Zone I auf 28% in Zone II, stieg dann aber wieder kontinuierlich auf 43% in Zone V an, der Anteil ungesättigter ω -Hydroxysäuren nahm im Gegenzug ab (Abb. 7.8 A). Der Anteil der Monocarbonsäuren nahm von 9% auf 20% zu. Bei Helix konnte ein gegenläufiger Trend beobachtet werden, der Anteil an Monocarbonsäuren nahm mit fortschreitendem Alter von 40% auf 16% ab, im Gegenzug erhöhte sich der Anteil gesättigter und ungesättigter ω -Hydroxysäuren von 24% auf 45% (Abb. 7.8 B). Suberin in EZW der Sorte Pioneer 3906 ähnelt in seiner Zusammensetzung stark dem in Zone V der Sorte Helix (Abb. 7.8 C).

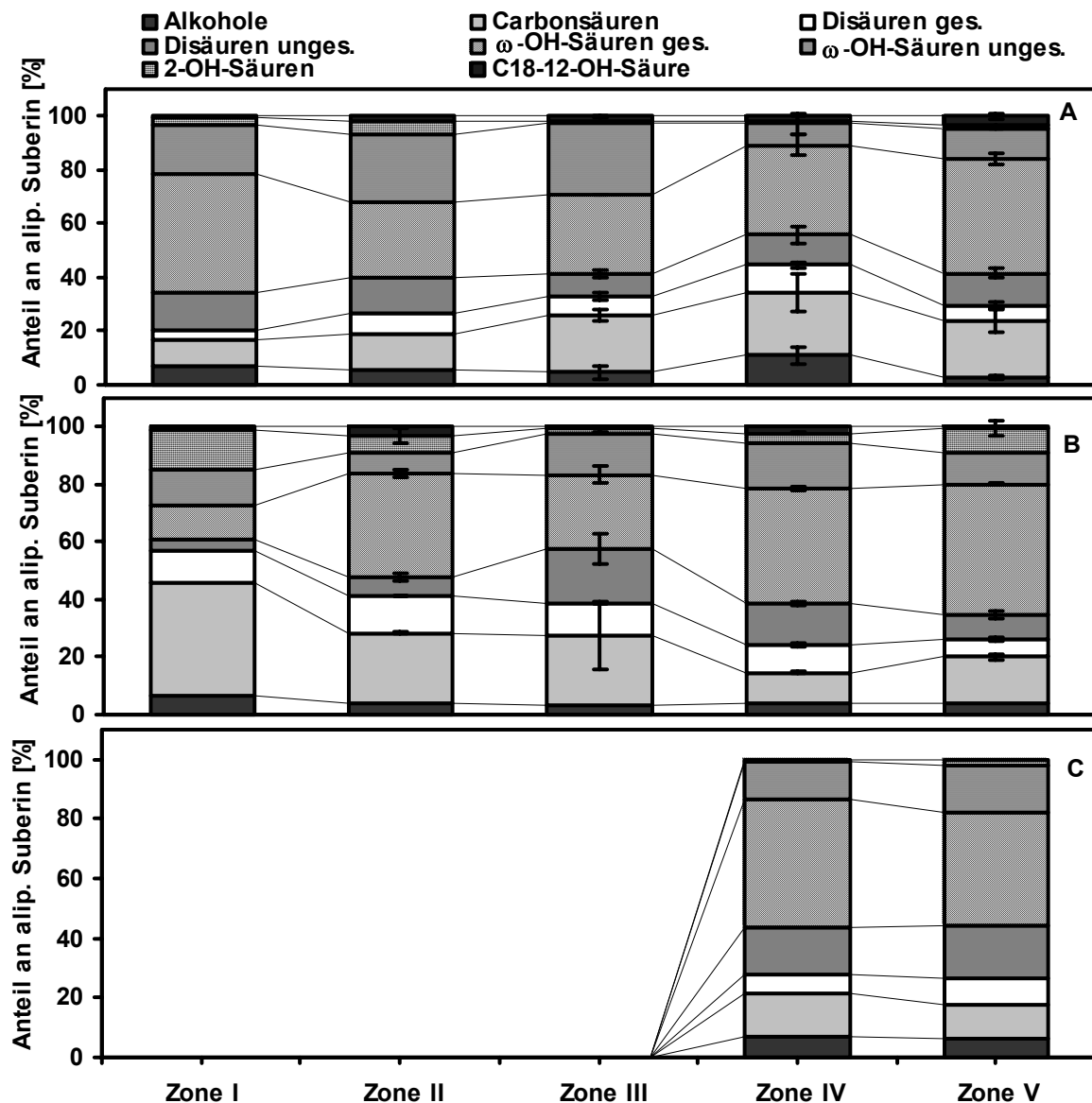


Abb. 7.8: Suberinzusammensetzung nach Substanzklassen des aliphatischen Suberins von EZW in Wurzeln von *Z. mays*, Kontrollkultur; Alter = 12 Tage; **A** Sorte Across 8023; **B** Sorte Helix; **C** Sorte Pioneer 3906; Zone I-III keine Analyse möglich. Angaben in Prozent von der Stoffmenge des aliphatischen Suberins; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Substanzklassenzusammensetzung von Pioneer 3906 EZW zeigte nach Kultur in 100 mM NaCl keine Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 7.9 C). In Across 8023 EZW konnten nach der Aufzucht in 100 mM NaCl deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung festgestellt werden, in Zone II konnten nur Spuren an ungesättigter ω -Hydroxysäure gefunden werden, jedoch größere Anteile an Alkoholen und Monocarbonsäuren bildeten 40% des Suberins, weitere 40% waren gesättigte ω -Hydroxysäuren (Abb. 7.9 A). Auch war der Anteil an Disäuren über alle Zonen größer als in der Kontrollgruppe. Besonders stark fiel die Steigerung des Anteils der C₁₈₋₁₂-Hydroxysäuren in Zone V von 2% in den übrigen Zonen auf 30% auf. Die Zusammensetzung des EZW-Suberins in Helix-Mais verschob sich nur geringfügig zu einem erhöhten Anteil an

Monocarbonsäuren von durchschnittlich 30%, sowie einen leicht erhöhten Anteil an gesättigten Disäuren (Abb. 7.9 B).

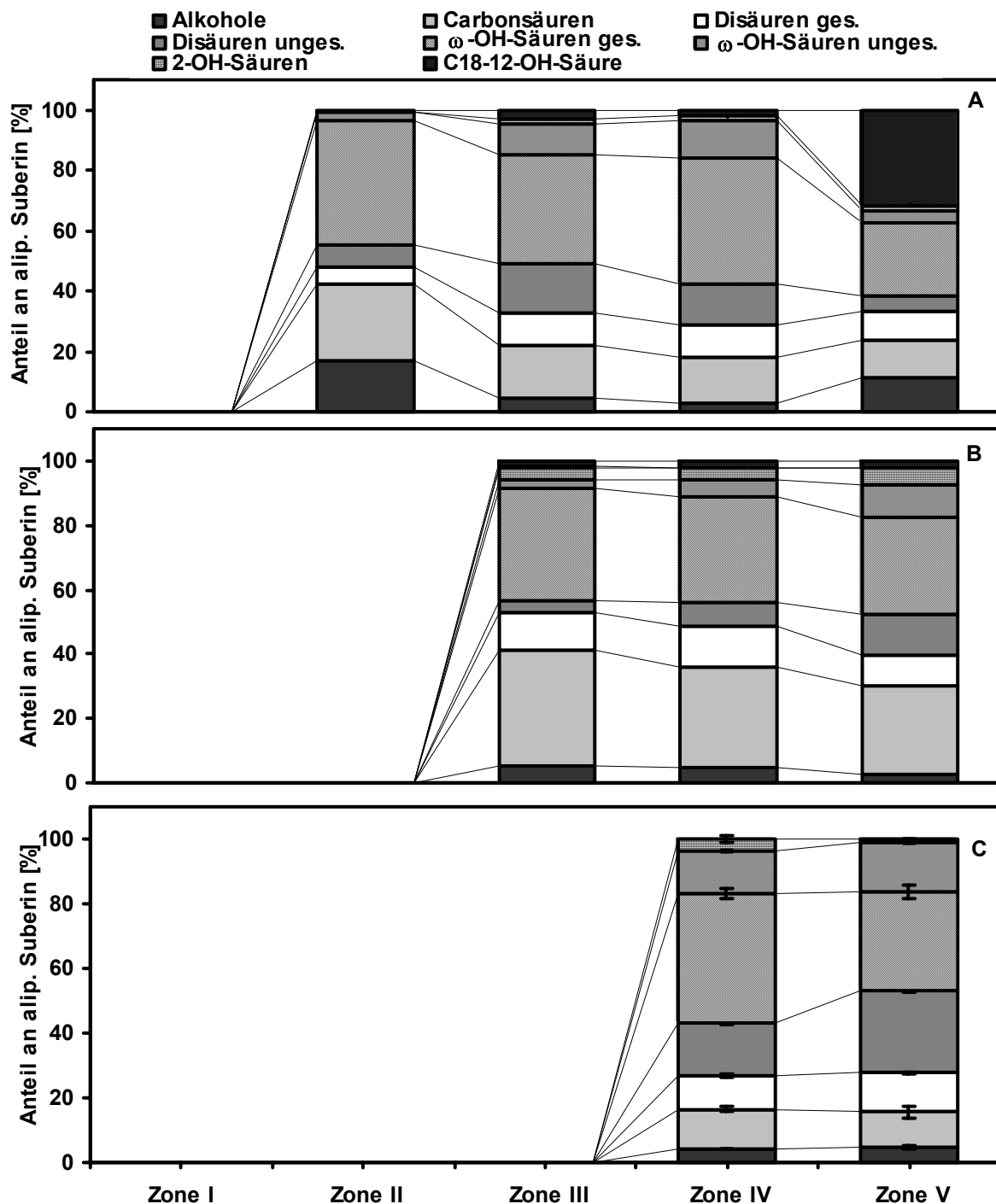


Abb. 7.9: Suberinzusammensetzung nach Substanzklassen des aliphatischen Suberins von EZW in Wurzeln von *Z. mays*, Kultur mit 100 mM NaCl; Alter = 12 Tage; **A** Sorte Across 8023 (Einfachbestimmungen); Zone I keine Analyse möglich; **B** Sorte Helix; (Einfachbestimmungen); Zone I, II keine Analyse möglich; **C** Sorte Pioneer 3906; Zone I-III keine Analyse möglich. Alle Angaben in Prozent von der Stoffmenge des aliphatischen Suberins; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Berechnung der mittleren Kettenlänge des aliphatischen Anteils im EZW ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten oder den Altersklassen des Gewebes, auch ein Zusammenhang der mittleren Kettenlänge mit der Aufzucht in 100 mM NaCl-Lösung konnte nicht beobachtet werden, die mittlere Kettenlänge betrug bei allen Pflanzen etwa 19 C-Atome (Abb. 7.10). Ein schwacher Trend zu etwas kürzeren Kohlenstoffketten in der Salzstress-Kultur bestand für die Sorten Helix und Pioneer 3906 (Abb. 7.10 **B**).

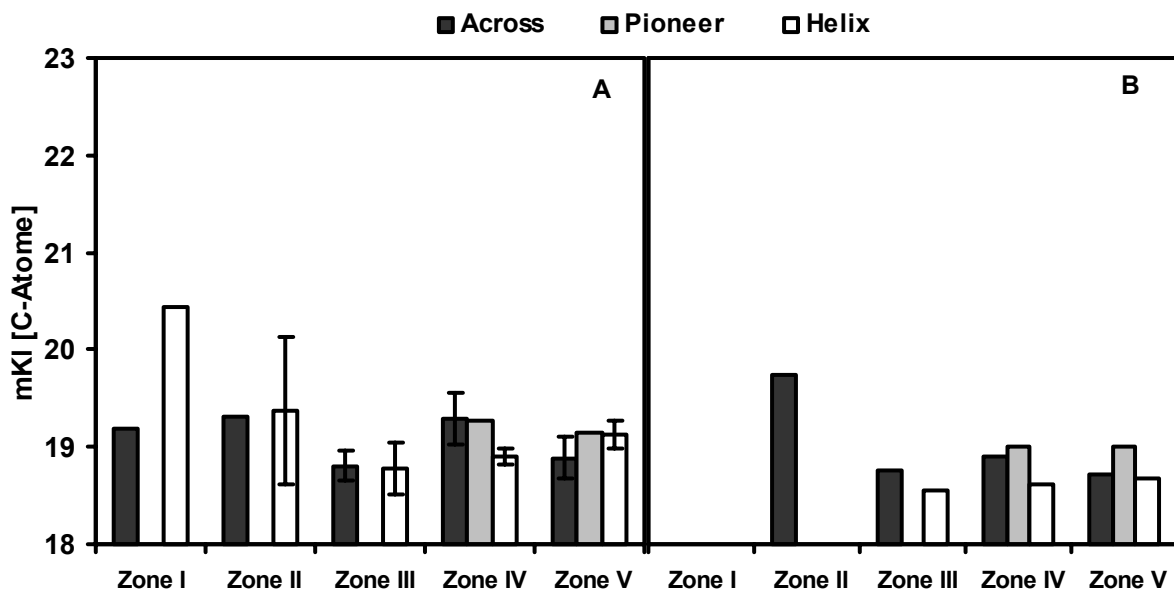


Abb. 7.10: Mittlere Kettenlängen in EZW von *Z. mays* verschiedener Sorten; Alter = 12 Tage; **A** Kontrollkultur; **B** Kultur mit 100 mM NaCl; Mittelwerte der Kettenlängen aliphatischer Substanzen nach Zonen sortiert; (Fehlerbalken = StabWN der mKI innerhalb einer Zone).

Die Berechnung ungebundener Säuregruppen im Suberin der EZW ergab für die Sorte Across 8023 einen Anstieg von 34% in Zone I der Kontrollgruppe auf 48% in Zone V (Abb. 7.11 **A**), bei Salzstress konnte kein Trend gefunden werden, die Anzahl der freien Carboxy-Gruppen entspricht hier in etwa der der Kontrollgruppe (Abb. 7.11 **B**). Bei Pioneer 3906-Mais konnte ein Anstieg freier Carboxy-Funktionalitäten bei Salzstress von 47% in der Kontrollgruppe auf im Mittel 55% bestimmt werden. Die Sorte Helix zeigt bei älteren Zonen der Kontrollkultur mit 43-38% etwa 10% weniger ungebundene Carboxy-Gruppen, bei Salzstress stieg die Anzahl ungebundener Carboxy-Gruppen auf durchschnittlich 58% an (Abb. 7.11 **B**).

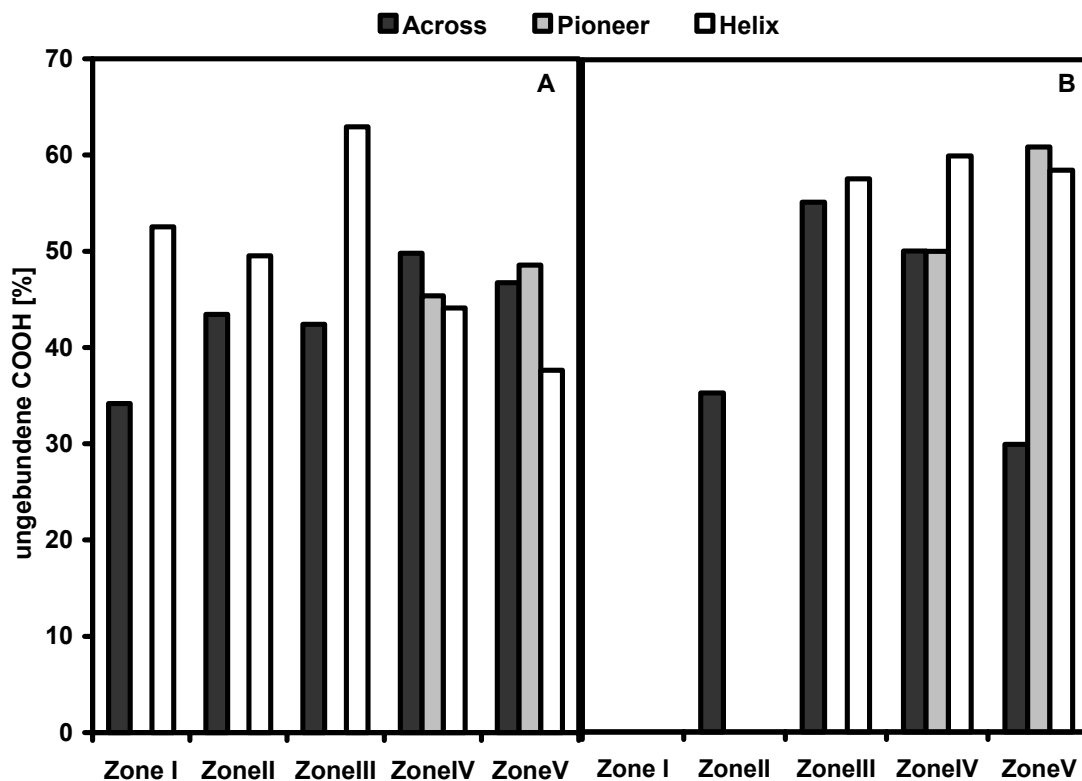


Abb. 7.11: Prozentsatz der nicht mit (im gleichen Suberin detektierten) Hydroxygruppen veresterten Carboxy-Gruppen in RHZW von *Z. mays* verschiedener Zuchtsorten; Alter = 12 Tage; **A** Kontrollkultur; **B** Kultur mit 100 mM NaCl. Berechnungsgrundlage waren die Mittelwerte der Stoffmengen der einzelnen Monomeren (kleinere Prozentzahlen bedeuten höhere Konnektivität).

7.3 Vergleich Nebelkultur-Hydrokultur; Einfluss der Exodermis auf die radiale hydraulische Leitfähigkeit von *Z. mays* der Sorte Helix.

Die Sorte Helix wurde in Hydrokultur (Hydroponic) sowie in Nebelkultur (Aeroponic) unter gleichen Klimakammerbedingungen angezogen. Die 8 Tage alten Pflanzen besaßen bei der Ernte drei Blätter und eine Wurzellänge von 21.0 bis 29.0 cm. Ein morphologischer Unterschied zwischen den Pflanzen der verschiedenen Kulturmethoden bestand in der signifikant längere Anteil der, basalen, Seitenwurzelzone (Zone II) bei Nebelkulturpflanzen (ZIMMERMANN, 2001). Die seitenwurzelfreie, apicale, Zone wurde für die Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit verwendet und wurde als Zone I bezeichnet. Außerdem wurde eine höhere Elastizität der Wurzeln auf mechanische Belastung festgestellt (ZIMMERMANN, 2001). Wichtigstes Unterscheidungsmerkmal der Wurzel von Nebelkulturpflanzen diesen Alters mit denen aus hydroponischer Kultur war der mikroskopische Nachweis einer Exodermis in Nebelkulturpflanzen, die einen erhöhten hydraulischen Widerstand vermuten ließ.

7.3.1 Mikroskopische Untersuchungen an *Z. mays*, Helix.

Die lichtmikroskopische Betrachtung der Wurzelquerschnitte ergab deutliche Unterschiede in den äußeren Abschlussgeweben, während bei hydroponischer Kultur in der seitenwurzelfreien Zone I weder eine Suberinlamelle noch CASPARY-Streifen in der Hypodermis durch Färbereaktionen sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 7.12 **A**) wurde in der gleichen Zone bei Nebelkulturkultur in der Hypodermis eine vollständige Suberinlamelle mit CASPARY-Streifen (Exodermis) nachgewiesen (Abb. 7.12 **C**). In Zone II wurde bei beiden Kulturmethoden eine Exodermis, das heißt eine Hypodermis mit CASPARY-Streifen beobachtet (Abb. 7.12 **B, D**). Die Entwicklungszustände der Endodermis ähnelten sich bei allen Zonen und Kulturvarianten, in Zone I konnte jeweils ein CASPARY-Streifen nachgewiesen werden (Abb. 7.12 **E, G**), während in Zone 2 eine komplette Suberinlamelle mit Sudan III anfärbbar war (Abb. 7.12 **F, H**).

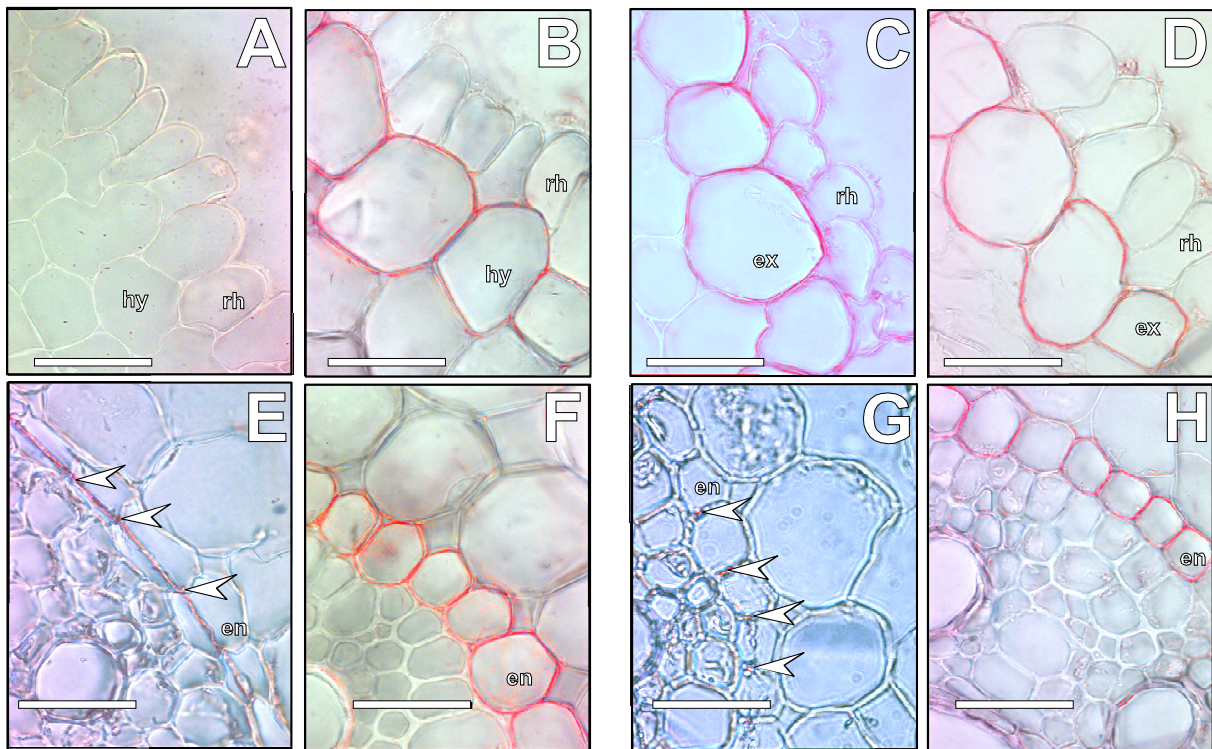


Abb. 7.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelquerschnitten von *Z. mays* (Helix), Alter = acht Tage; Sudan III Färbung; **A-D** RHZW, **E-F** EZW, **A, B, E, F** hydroponische Kultur; **C, D, G, H** Nebelkultur (aeroponisch); **A, E, C, G** seitenwurzelfreie (apicale) Zone I; **B, F, D, H** (basale) Seitenwurzelzone (Zone II); **A** Zone I hydroponisch, Sudan III, keine Färbung hy = Hypodermis, rh = Rhizodermis; **B** Zone II hydroponisch, Suberinlamelle der Exodermis mit Sudan III gefärbt; **C-E** ex = Exodermis; **C** Zone I, aeroponisch, Suberinlamelle der Exodermis mit Sudan III gefärbt; **D** Zone II aeroponisch, Suberinlamelle der Exodermis mit Sudan III gefärbt; **E** Zone I, hydroponisch, Endodermis (en) mit CASPARY-Streifen (Pfeile) und präparationsbedingter typischer Bandplasmolyse; **F** Zone II, hydroponisch, Suberinlamelle der Endodermis mit Sudan III gefärbt; **G** Zone I, aeroponisch, Endodermis (en) mit CASPARY-Streifen (Pfeile); **H** Zone II, aeroponisch Endodermis (en) mit Sudan III gefärbter Suberinlamelle; Alle Balken = 30 µm.

7.3.2 Polymerzusammensetzung in *Z. mays*, Helix.

Nennenswerte Mengen extrahierbarer Wachsartiger Substanzen konnten nicht isoliert werden, die Zellwandisolate wurden nach der Extraktion mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ mit BF_3/MeOH umgeestert oder zur Ligninanalyse einer Thioacidolyse unterworfen und die Suberin, bzw. Ligninmonomere mit GC und GC/MS analysiert.

7.3.2.1 Suberinzusammensetzung in *Z. mays*, Helix.

Die Mengen des aliphatischen Anteils im Suberin in nmol cm^{-2} Trockengewicht in der Endodermis unterschieden sich deutlich innerhalb der Zonen, von Zone I zu Zone II etwa um das 40 fache, jedoch nicht nach Art der Kultur (Abb. 7.13). Die Mengen aliphatischen Suberins in isolierten RHZW zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kulturvarianten, da hydroponisch angezogene RHZW der Zone I signifikant weniger aliphatische Bestandteile enthielten als aeroponisch angezogene (Faktor 2.3). In Zone II bestanden dagegen nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kulturen (Abb. 7.13).

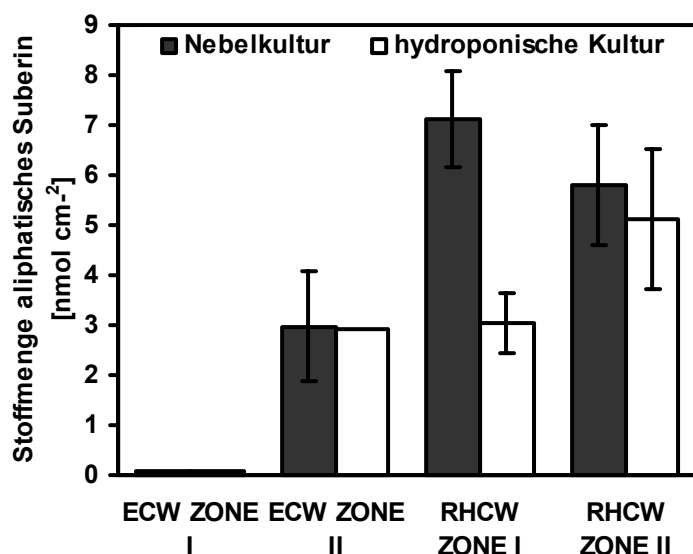


Abb. 7.13: Stoffmenge aliphatisches Suberin in isolierten Wurzelzellwänden von Endodermis (EZW) und Rhizodermis/Hypodermis (RHZW) bei *Z. mays*; Alter = acht Tage; nach Kultur in hydroponischer oder Nebelkultur; Angaben in nmol cm^{-2} ; Zone I seitenwurzelfreie Zone; Zone II Seitenwurzelzone; (Fehlerbalken = StabWN).

Ferulasäure und Cumarsäure bildeten die Mehrheit der gewonnenen Estergebundenen Substanzen in diesen jungen Maiswurzelzellwänden, ihr Anteil lag unabhängig von der Aufzuchtmethode bei 60-85% des Gesamtsuberins.

Die Substanzklassenverteilung des Suberins in der für die Wurzeldruckmessungen verwendeten Zone I (apicale Zone) zeigte bei keiner Kulturvariante im EZW Unterschiede zu bereits untersuchten Zellwandisolaten der Sorte Helix. In den RHZW-Isolaten war der Anteil estergebundener Aromaten in hydroponischer Kultur 20% höher als in Nebelkultur, zudem konnten keine Disäuren bei diesen Isolaten festgestellt werden (Abb. 7.14). Auch der Anteil an ω -Hydroxysäuren war in Nebelkultur höher als in Hydroponischer. Die mittlere

Kettenlänge der Summen aller aliphatischen Suberinbestandteile betrug bei Nebelkultur-Kultur in RHZW der Zone I 20.9 C-Atome, während bei hydroponischer Kultur 21.5 C-Atome berechnet wurden. RHZW der Zone II entsprach in seiner Zusammensetzung der von Zone I in Nebelkultur angezogener Maiswurzeln, ohne Unterschied zwischen den Kulturvarianten.

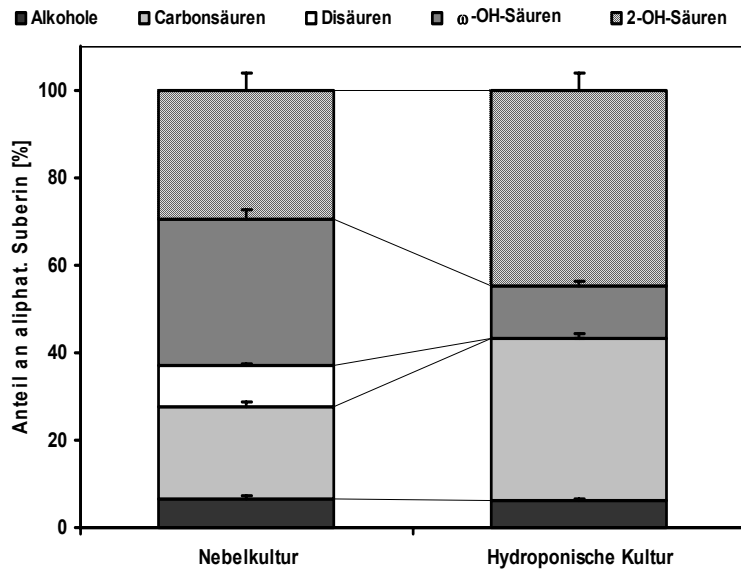


Abb. 7.14: Suberinzusammensetzung in Prozent des aliphatischen Suberins in RHZW von *Z. mays* der Sorte Helix, Aufzucht in Nebelkultur und Hydrokultur; Alter = acht Tage; jeweils Zone I (apicaler Bereich); (Fehlerbalken = StabWN).

7.3.2.2 Ligninzusammensetzung in *Z. mays*, Helix.

Ligninmengen in RHZW beider Kulturen unterscheiden sich signifikant, Nebelkultur RHZW enthalten in beiden Zonen etwa doppelt soviel Lignin pro cm^2 Wurzeloberfläche als von in hydroponischer Kultur angezogenen RHZW von Mais (Abb. 7.15).

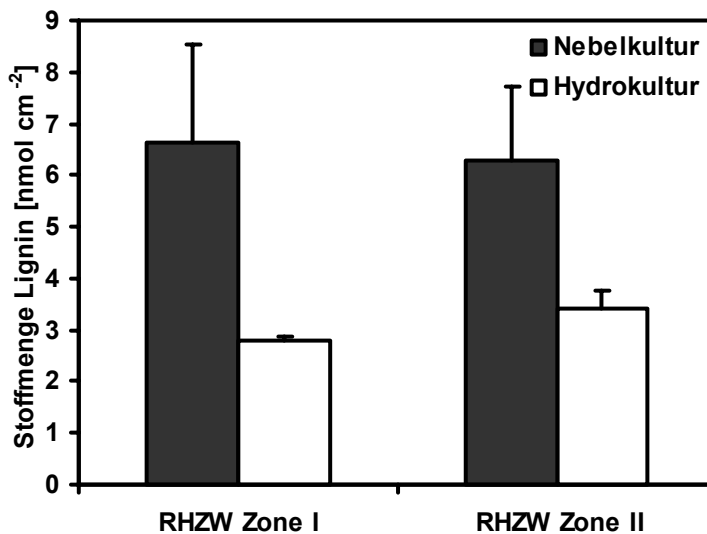


Abb. 7.15: Stoffmenge Lignin in RHZW von *Z. mays* der Sorte Helix; Nebelkultur und hydroponische Kultur; Alter = acht Tage; Werte in nmol cm^{-2} ; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Zusammensetzung des Lignins unterschied sich innerhalb der Kulturvarianten nur wenig, allerdings konnte ein erhöhter Hydroxyphenyl-Anteil in den Ligninfraktionen der Zone I beider Kulturen festgestellt werden (Abb. 7.16).

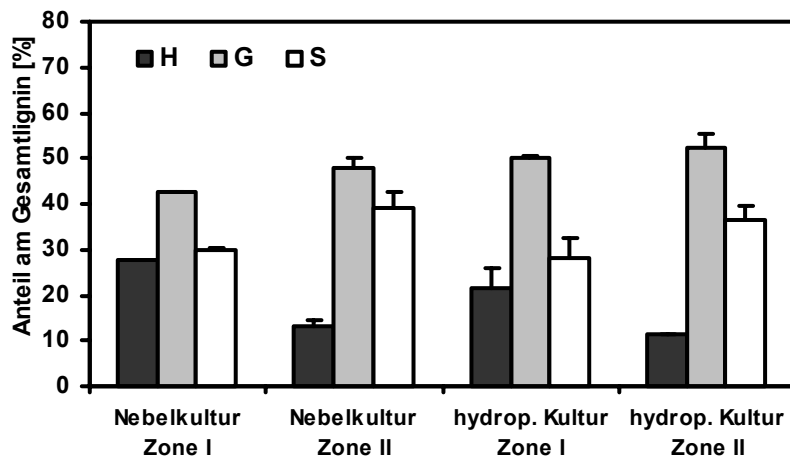


Abb. 7.16: Ligninzusammensetzung von RHW bei *Z. mays*; Nebelkultur und hydroponische Kultur; Alter = acht Tage; Angaben in Prozent der Gesamtlignin Stoffmenge; (Fehlerbalken = StabWN)

Ligninmengen in EZW der beiden Kulturvarianten unterschieden sich nur geringfügig bei einem Wert um drei nmol cm^{-2} , in der Nebelkultur wurden in Zone I mit $2.24 \text{ nmol cm}^{-2}$ geringere Mengen an Lignin detektiert (Abb. 7.17).

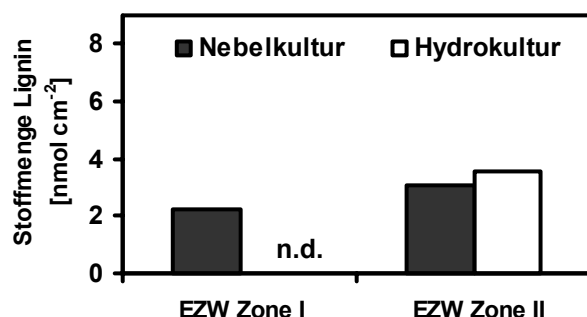


Abb. 7.17: Stoffmenge Lignin in EZW von *Z. mays* der Sorte Helix; Nebelkultur und hydroponische Kultur; Alter = acht Tage; Werte aus Einzelbestimmungen in nmol cm^{-2} ; n.d. keine Analyse für EZW Zone I Hydrokultur vorhanden.

Die Zusammensetzung des EZW-Lignins unterschied sich von dem RHW-Lignin, hier dominierten Syringyl Einheiten mit 50-70% des Gesamtlignins die Komposition, vor allem in den Nebelkultur-Geweben. 26-30% bildeten G-Einheiten und zu 5-18% konnte H bestimmt werden (Abb. 7.18).

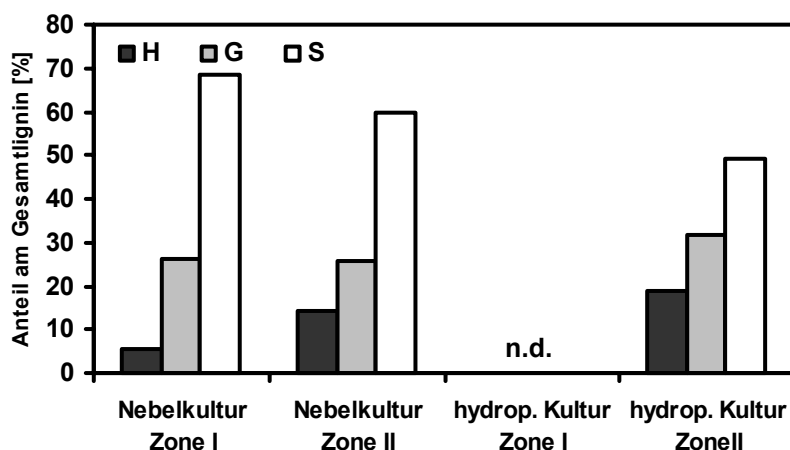


Abb. 7.18: Ligninzusammensetzung von EZW bei *Z. mays* der Sorte Helix; Alter = acht Tage; Angaben in Prozent der Gesamtlignin Stoffmenge aus Einzelbestimmungen; n.d. keine Analyse vorhanden.

7.3.3 Wassertransportmessungen an Wurzeln von *Z. mays*, Helix.

Die hydraulische Leitfähigkeit der seitenwurzelfreien Zone von Wurzeln der Maispflanzen aus Nebel- und hydroponischer Kultur wurde mit hydrostatischer und osmotischer Relaxation über die Wurzeldruckmesssondentechnik ermittelt (STEUDLE, 1993; STEUDLE *et al.*, 1993). Zu Beginn des Experiments wurde der Wurzeldruck mit 0.1 bis 0.3 MPa bestimmt, wobei es keine Unterschiede zwischen den Anzuchtmethoden gab. Signifikante Unterschiede konnten während der hydrostatischen Relaxation zwischen Nebel- und hydroponischer Aufzucht festgestellt werden, Nebelkulturwurzeln besaßen eine niedrigere Durchlässigkeit als hydroponisch angezogene Wurzeln, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied in der Leitfähigkeit zwischen den Kulturmethoden, wenn ein osmotischer Druckgradient angelegt wurde (Abb. 7.19).

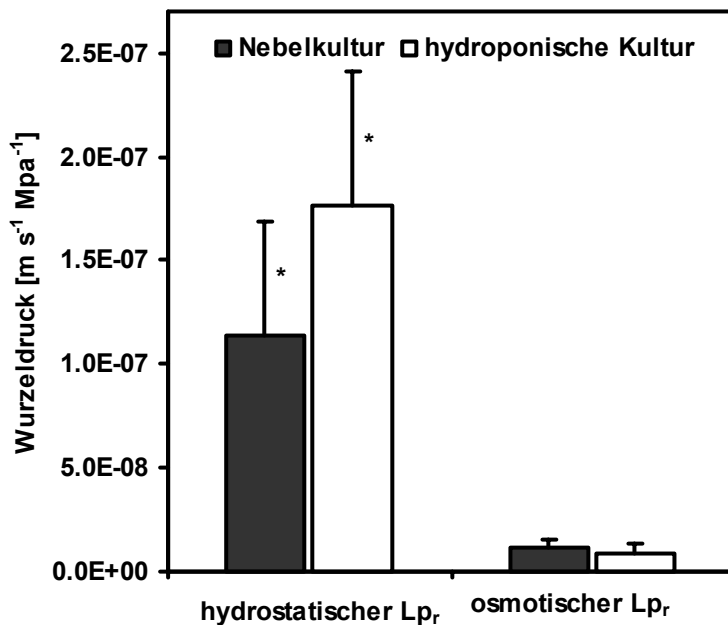


Abb. 7.19: Hydraulische Leitfähigkeiten von *Z. mays* Wurzelsegmenten der Zone I, Nebelkultur (gefüllte Balken) im Vergleich mit hydroponischer Kultur (leere Balken); Sternchen kennzeichnen signifikant unterschiedliche Daten auf einem 95% Niveau; osmotischer Druck wurde durch Zugabe von 10-40 mM NaCl in das Nährmedium ausgeübt; hydrostatischer Druck durch das Öffnen oder Schließen des Druckzylinders der Wurzeldruckmesssonde; Alter = acht Tage; (Fehlerbalken = StabWN; n = 11).

Osmotische Leitfähigkeiten der Zone I von im Mittel $1.0 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ beider Anzuchtmethoden erwiesen sich als deutlich niedriger, verglichen mit den hydrostatischen Leitwerten von $17.6 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ bei hydroponischer Kultur und $11.4 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ bei Nebelkultur.

7.4 Beeinflussung der Ionenaufnahme über die Wurzel durch die Einwirkung von Abscisinsäure und Salzstress bei *Z. mays*, Helix.

Maispflanzen der Sorte Helix wurden zur Erzeugung von Salzstress mit 100 mM NaCl sowie mit 10 μ M des bei Pflanzen mit Trockenstress nachgewiesenen Phytohormons ABA in der Nährlösung über 12 Tage herangezogen. Die Ergebnisse der chemischen Analysen der Zellwandpolymere von Kontroll- und Salzstressanzuchten wurden zum Teil schon dargestellt und sind hier auf zwei Zonen zusammengefasst und zusätzlich in Tab. 7.6 um die Daten aus einer 10 μ M ABA-Kultur erweitert.

Tab. 7.6: Suberinmengen (Aliphaten) in RHZW und EZW von *Z. mays*, (Helix) unter verschiedenen Stressbedingungen. Zone I = seitenwurzelfreie Zone; Zone II = Seitenwurzelzone; Alter = 12 Tage.

	Kontrolle		100 mM NaCl		10 μ M ABA	
	[nmol cm ⁻²]		[nmol cm ⁻²]		[nmol cm ⁻²]	
	Zone I ^{a)}	Zone II ^{b)}	Zone I ^{a)}	Zone II ^{b)}	Zone I	Zone II
RHZW	3.8(\pm 0.3)	4.3(\pm 1.1)	3.4(\pm 0.4)	4.1(\pm 0.7)	4.6(\pm 0.4)	5.3(\pm 0.5)
EZW	1.7(\pm 0.1)	2.6(\pm 0.7)	n.d. ^{c)}	20.1(\pm 4.2)	32.7(\pm 3.1)	47.7(\pm 3.9)

a) Mittelwert der Zonen I-II Abschnitt 7.2; mit StabWN; b) Mittelwert der Zonen III-V Abschnitt 7.2 mit StabWN; c) n.d. = keine Analysen vorhanden.

Durch den Einfluss der Stressoren veränderten sich vor allem die Suberinmengen in der Endodermis wobei in der Salzstress-Kultur beinahe die 10-fache und in der ABA-Kultur die annähernd 20-fache Suberinmenge der in der Kontrollanzucht gemessenen Daten ermittelt wurden. Die Steigerung des Suberingehaltes in den rhizodermalen/hypodermalen Zellwänden fiel im Vergleich mit der Endodermis nicht so stark aus, jedoch konnten auch hier größere Mengen Suberin in den NaCl und ABA-Kulturen festgestellt werden (Tab. 7.6).

7.4.1 Anatomische Veränderungen durch hohe NaCl und ABA Konzentrationen an Wurzeln von *Z. mays*, Helix.

Rhizodermis/Hypodermis und die Endodermis der untersuchten Maiswurzeln zeigen bei Aufzucht in Medien mit hohen Salz- oder ABA-Konzentrationen deutliche morphologische und anatomische Unterschiede die man mit lichtmikroskopischen Methoden zeigen kann. Die Wurzeln der gestressten Pflanzen sind deutlich kürzer und verdickt, mit einer stark reduzierten seitenwurzelfreien Zone(vgl. SAAB *et al.*, 1990) (Abb. 7.20).

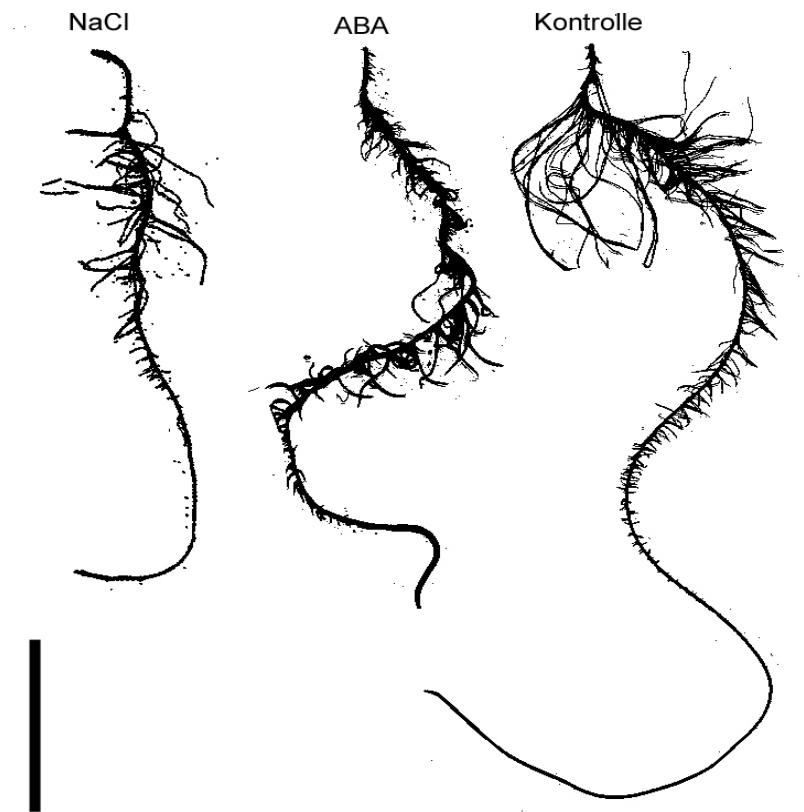


Abb. 7.20: Wurzelanatomie von *Z. mays* Wurzeln unter Stressaufzucht, exemplarisch für 100 mM NaCl, 10 μ M ABA und Kontrollwurzel; Alter = 12 Tage; (Balken = 5 cm).

Unter dem Mikroskop erkennt man starke tertiäre Zellwandauflagerungen schon in Zone II und III bei NaCl, aber auch zum Teil schon bei ABA-Applikation (Abb. 7.21 C, D). Noch stärker ausgeprägt sind die Zellwandauflagerungen in Zone IV und V bei beiden Faktoren (Abb. 7.21 F, G). Exodermisbildung von der Wurzelspitze an konnte bei NaCl- wie bei ABA-Applikation festgestellt werden (Abb. 7.21 A). Gut färbbar waren auch die Suberinlamellen in dieser Zone (Abb. 7.21 B) vor allem aber konnte in älteren Wurzelabschnitten beider Anzuchten eine Suberinlamelle rot angefärbt werden (Abb. 7.21 E).

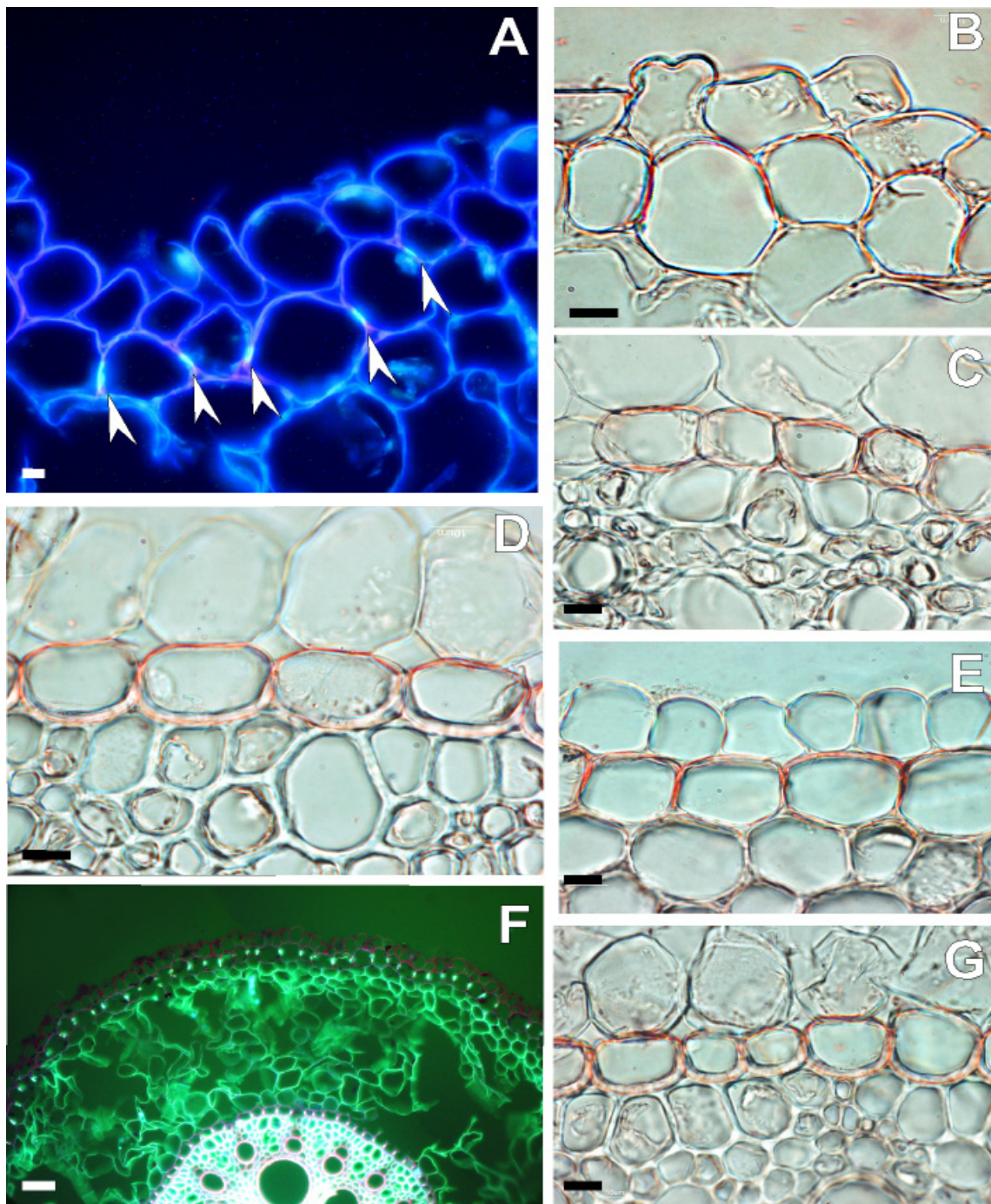


Abb. 7.21: Wurzelquerschnitte von *Z. mays*, Alter = 12 Tage. **A, D, F** 100 mM NaCl-Kultur; **B, C, E, G** 10 μ M ABA-Kultur; **A**, Fluorol Yellow 088/Kristallviolett-Färbung; **B, C, D, E, G** Sudan III Färbung; **A** NaCl; RHZW Zone I CASPARY-Streifen sichtbar (Pfeile) Balken = 10 μ m; **B** ABA; RHZW Zone I Färbung der Suberinlamelle in der Hypodermis mit Sudan III Balken = 10 μ m; **C** ABA, Zone III EZW Suberinlamelle, Balken = 10 μ m; **D** Zone III NaCl; tertiäres Entwicklungs-Stadium, Balken = 10 μ m; **E** ABA; RHZW Zone V stark gefärbte Exodermis Balken = 10 μ m; **F** Übersicht NaCl; Zone V CASPARY-Streifen in der Exodermis, tertiäres Entwicklungs-Stadium in der Endodermis, Balken = 50 μ m; **G** ABA; Zone V EZW tertiäres Entwicklungs-Stadium, Balken = 10 μ m.

7.4.2 Aufnahme von Rb^+ über die Wurzel von *Z. mays*, Helix.

Rubidium-Ionen besitzen einen dem Kalium-Ion ähnlichen Ionenradius, weshalb sich Rubidium als in der Natur seltenes Element als Nachweis-Substanz für Kalium-Flüsse eignet. Durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der apoplastischen Barrieregewebe sollte ein Einfluss auf den apoplastischen Bypass der Rubidium-Ionen durch die Analyse der in den Spross transportierten Rubidium-Menge nachweisbar sein. In Kontrollpflanzen ohne Rubidiumzusatz in der Nährlösung konnte kein Rubidium nachgewiesen werden. Wurzeln von *Z. mays* wurden zwölf Tage in Standard-Nährlösung angezogen der 10 μM ABA oder 100 mM NaCl zugefügt wurde, Kontrollen erhielten ausschließlich Nährlösung. Die Stressoren bewirkten ein niedrigeres Trockengewicht der Blätter das von im Mittelwert 57.1 mg (± 10.0 mg) bei den Kontrollpflanzen auf 32.4 mg (± 2.75 mg) bei ABA und 23.1 mg (± 6.1 mg) bei NaCl-gestressten Pflanzen sank (Abb. 7.22). Gleichzeitig sanken die Wurzellängen von 52.5 cm (± 4.12 cm) der Kontrollpflanzen auf 26.8 cm (± 1.41 cm) bei ABA sowie 24.3 cm (± 1.44 cm) bei NaCl-Kultur, wobei die ABA-Wurzeln einen wesentlich größeren Durchmesser aufwiesen, als die der NaCl-Anzucht.

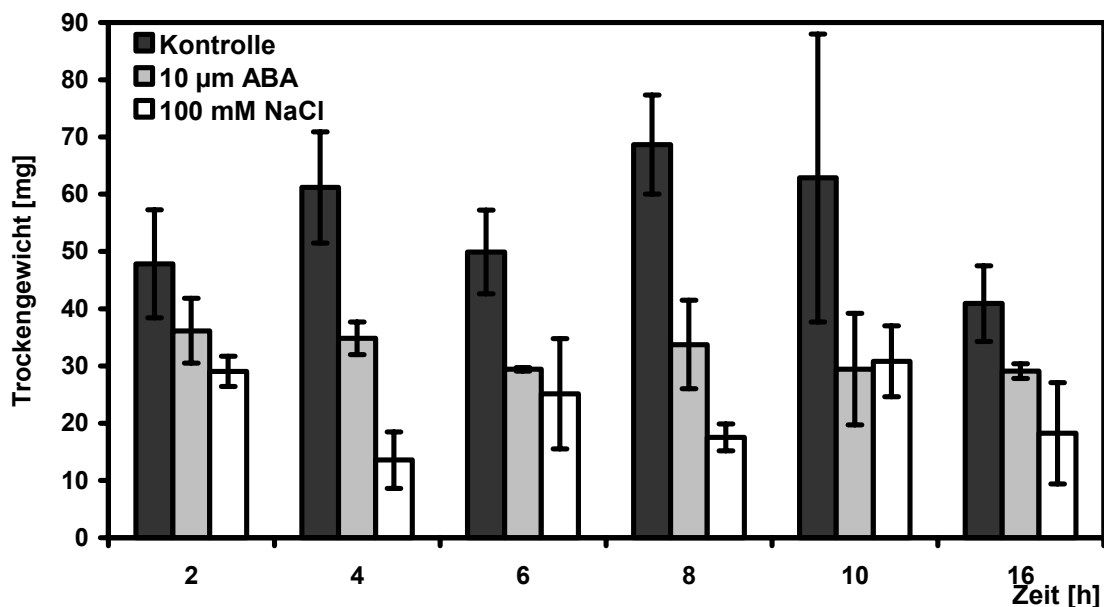


Abb. 7.22: Trockengewicht der nach Applikation von RbCl geernteten Blätter von *Z. mays* der Sorte Helix; Alter = 12 Tage; Angaben in mg; (Fehlerbalken = StabWN).

Nach der Applikation von 1.0 mM RbCl zu der Nährlösung, wurden die Transpirationsraten der Blätter bestimmt wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (Kontrolle 0.16 cm s^{-1} (± 0.02) ABA 0.16 cm s^{-1} (± 0.03) NaCl 0.14 cm s^{-1} (± 0.02)). In die Blätter aufgenommenes Rubidium wurde nach der jeweils stündlichen Ernte mittels ICP analysiert und die gefundene Konzentration auf die Wurzeloberfläche bezogen (Abb. 7.23). Es zeigte sich, dass die Kontrollwurzeln zu jedem Erntezeitpunkt deutlich mehr Rb^+ pro Wurzeloberfläche enthielten als die gestressten Pflanzen Die Kontrollpflanzen nahmen 1.7-

mal mehr Rubidium pro Stunde auf, als die ABA-Kultur, und 3.7-mal mehr als die NaCl-gestressten Pflanzen (Abb. 7.23).

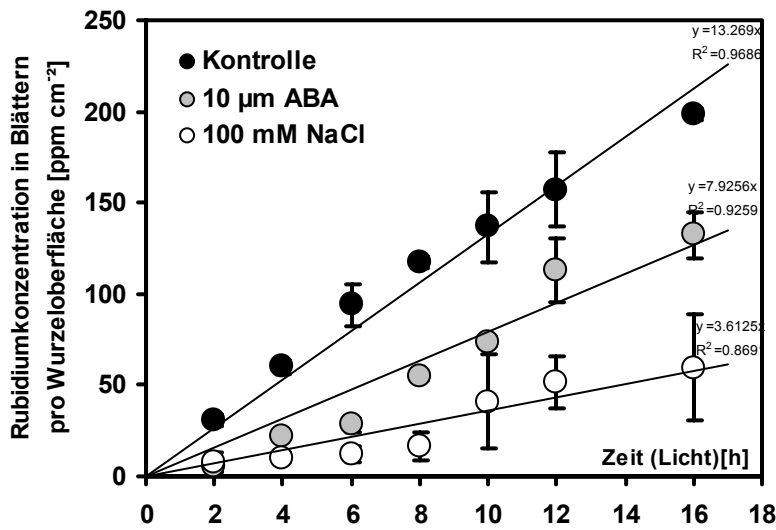


Abb. 7.23: Rubidium-Ionenkonzentration zum Erntezeitpunkt nach Applikation von 1.00 mM RbCl pro Wurzelfläche in Blättern von *Z. mays*, Alter = 12 Tage; die Steigungen und das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression sind angegeben; (Fehlerbalken = StabWN).

Blockierte man die spezifischen Kaliumtransportkanäle in den Zellmembranen, über die der Rubidiumtransport ebenfalls stattfindet (BECKER *et al.*, 1996 MÜLLER-Röber *et al.*, 1995) durch Zugabe von Cäsium-Ionen irreversibel, so sollte eine Aufnahme von Rubidium-Ionen nur noch über den Apoplasten mit dem Transpirationsstrom stattfinden. Tatsächlich sanken die transportierten Rb⁺ Mengen bereits um den Faktor 2.4 bei Anwesenheit von 1.0 mM Cs⁺ bis um den Faktor 4.3 bei 10.0 mM CsCl in der Nährlösung (Abb. 7.24). Gleichzeitig sank auch die Vitalität der Pflanzen, bei 5.0 und 10.0 mM CsCl vertrockneten die Pflanzen ca. 10 h nach Zugabe des Salzes. Die Aufnahmerate entsprach hier in etwa der von salzgestressten Pflanzen (Abb. 7.23).

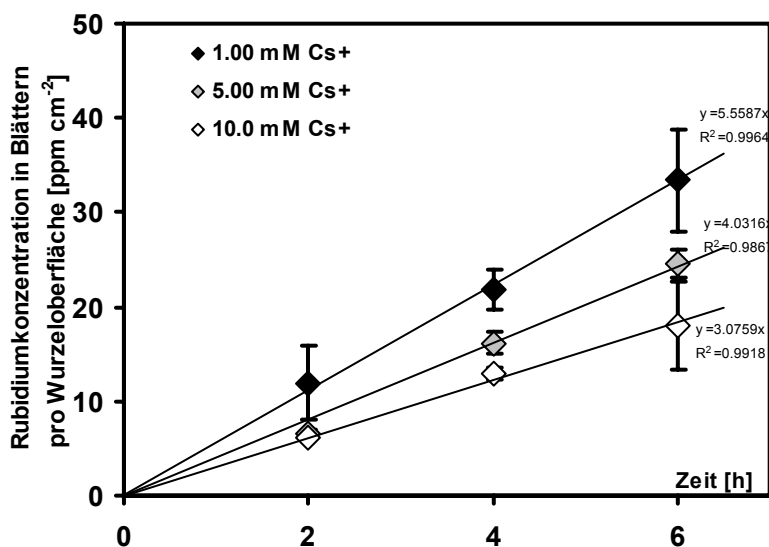


Abb. 7.24: Rubidium-Ionenkonzentration zum Erntezeitpunkt nach Applikation von 1.00 mM RbCl pro Wurzelfläche in Blättern von *Z. mays* nach Zugabe von CsCl in unterschiedlichen Konzentrationen zur Nährlösung, Alter = 12 Tage; die Steigungen und das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression sind angegeben; (Fehlerbalken = StabWN).

7.5 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu apoplastischen Barrieren in Wurzeln von *Z. mays*

7.5.1 Vergleich der Sorten Across 8023, Helix und Pioneer 3906

Für die Untersuchung der Reaktion apoplastischer Barrieren auf 100 mM NaCl-Salzstress wurden drei verschiedene Hybrid-Maissorten verwendet, Helix als Standardsorte, Across 8023 als salzempfindliche Sorte und Pioneer 3906 als salztolerante Sorte (FORTMEIER und SCHUBERT 1995). Vorangegangene Untersuchungen mit dieser und einer weiteren Sorte (de Kalb XL75) hatten ergeben, dass aktive und passive Natriumausschlussmechanismen in der Wurzel wahrscheinlich sind, zum Einen ein passiver Ausschluss an der Rhizodermis oder den Plasmamembranen dieser Zellschicht, zum Anderen wurde ein aktiver Ionentransport in den Xylem-Parenchymzellen vermutet, der einen Weitertransport des toxischen Na^+ in den Spross verhindern sollte (SCHUBERT und LÄUCHLI, 1990; SCHUBERT und LÄUCHLI, 1986). Die Möglichkeit Natrium-Ionen auszuschließen stellt für die salzempfindliche Art *Z. mays* die beste Überlebensstrategie dar, da der Spross, im Gegensatz etwa zu Gerste, welche höhere Salzmenngen gut einlagern kann, nicht in der Lage ist mit hohen Konzentrationen Na^+ die Lebensfunktionen der Pflanze aufrechtzuerhalten (JESCHKE, 1984). Der Einfluss apoplastischer Barrieren für den Transport der Ionen wurde bislang nicht in die Betrachtungen einbezogen, da ein passiver Ausschluss überschüssiger Natrium Ionen an der Plasmalemma-Membran der Rhizodermis-Zellen vermutet wurde.

Die Kontrollpflanzen der drei Sorten zeigten makroskopisch geringe morphologische Unterschiede, Pioneer 3906 Pflanzen besaßen im Durchschnitt 10 cm kürzere Wurzel und Sprosslängen als die Vergleichssorten, die Spross/Wurzel-Längen-Verhältnisse unterschieden sich jedoch nur gering (0.62-0.76) (Tab. 7.1). Bei 100 mM NaCl-Salzstress, zeigten allen Sorten eine geringe Zunahme des Wurzellängen-Sprosslängenverhältnisses, der Wuchs von Across 8023s und Helix blieb aber sehr stark hinter den Kontrollpflanzen zurück, der Spross und die Wurzeln erreichten nur ein Drittel der Länge der Kontrollen, Pioneer 3906 dagegen zeigte keine signifikanten Wachstumseinbußen. Die Wurzeldurchmesser von Kontrollen und den gestressten Pflanzen variierten nur geringfügig, jedoch nahm das oberflächenspezifische Gewicht der isolierten RHZW etwas ab (Abb. 7.2), was auf geringere Mengen in die Zellwand eingelagerter Substanzen hinweist.

Auf mikroskopischer Ebene konnte analog den Ergebnissen von SHANNON *et al.* (1994) eine frühere Reifung der hypo- und endodermalen Zellwände bei Salzstress festgestellt werden, ähnlich den Befunden an anderen Arten (*Gossypium hirsutum* (REINHARDT und ROST, 1995); Tomate (PEYRANO *et al.*, 1997); *Citrus* (WALKER *et al.*, 1984); *Sueda maritima* (HAJIBAGHERI *et al.*, 1985); Mais (AZAIZEH *et al.*, 1992; BIRNER und STEUDLE 1993; Abb. 7.22)

Die analytisch nachgewiesenen aliphatischen Suberinmengen in RHZW unterschieden sich zwischen Kontroll- und NaCl-Pflanzen tatsächlich nur unwesentlich, mit der Ausnahme der Pflanzen der Sorte Pioneer 3906, die etwa die doppelte Menge aliphatisches Suberin in die Zellwände der salzgestressten Pflanzen einlagerten. Bei Across 8023 wurden die größten Mengen der aliphatischen Suberin-Monomere gefunden, und etwa doppelt so viele estergebundene aromatische Zellwandbestandteile (Ferulasäure und Cumarsäure) wie in den RHZW der Sorten Helix und Pioneer 3906. Bei Salzstress erhöhte sich der Aromatenanteil im Suberin von Across 8023 und Helix RHZW deutlich, blieb bei Pioneer 3906 aber unverändert (Tab. 7.3).

Die im nachfolgenden diskutierten chemischen Analysen zeigen deutlich, dass jede Sorte andere Strategien entwickelt hat um mit hohen Salzkonzentrationen zu überleben. Pioneer 3906 reagiert mit geringer zusätzlicher Suberinisierung der RHZW, Across 8023 und Helix bauen große zusätzliche Mengen Suberin in die EZW ein. Pioneer-Mais zeigt sich aber robuster gegenüber der Salzapplikation, da er vermutlich auf physiologischer Ebene NaCl ausschließen kann. Diese Eigenschaft macht die Sorte vor allem auch gegen Salzschocks resistenter. Helix und Across 8023 können sich an hohe Salzkonzentrationen gewöhnen, aber bei einem Salzschock würde der Einbau zusätzlichen Suberins in die Endodermis zu lange dauern, um ein Überleben der Pflanze zu sichern.

Die Suberinisierung der RHZW weisen nur bei der salztoleranten Varietät Pioneer 3906-Mais auf eine Strategie einer gezielten Hydrophobisierung apoplastischer Barrieren zum Salzausschluss an der Außenhaut der Wurzel hin. Across 8023 und Helix zeigen keine verstärkte Hydrophobisierung, aber man kann eine Verstärkung der Abwehr von Pathogenen durch den erhöhten Einbau der Zimtsäurederivate vermuten.

Alle drei Sorten unterschieden sich schon bei den Kontrollpflanzen deutlich in der Monomerenzusammensetzung des aliphatischen Suberinanteils, bei Across 8023 dominierten ω -Hydroxysäuren, bei Pioneer 3906 Monocarbonsäuren und bei Helix-Mais gab es etwa gleich viele Monocarbonsäuren wie ω -Hydroxysäuren, abgesehen von Zone I bei Across 8023 traten keine altersspezifischen Suberinveränderungen in anderen Zonen oder Sorten auf (Abb. 7.3 A). Die Zusammensetzung des aliphatischen Suberins änderte sich am stärksten bei Pioneer 3906, dessen Kontroll-RHZW enthielten große Mengen an Monocarbonsäuren, die bei den salzgestressten Wurzeln im RHZW zugunsten der ω -Hydroxysäuren um 20% geringer waren (Abb. 7.3-4 C). Suberin von Across 8023 RHZW besaß von allen Sorten die niedrigste mittlere Kettenlänge, jedoch auch die höchste Verknüpfungsrates des Suberins mit im Durchschnitt nur etwa 30% freien Carboxy-Gruppen, die ist auf den hohen Anteil an ω -Hydroxysäuren zurückzuführen. Bei Salzstress änderte sich an diesen Befunden nur wenig, auch die Monomerenzusammensetzung wurde kaum verändert (Ausnahme war hier die Zone I, vgl. Abb. 7.3-4 A). Pioneer 3906 RHZW mit seinem hohen Anteil an Monocarbonsäuren ergab bei der Berechnung der Konnektivität die schlechtesten Werte, mit Zunahme des Anteils der ω -Hydroxysäuren bei Salzstress, sank der Anteil nicht verknüpfter Säuregruppen

signifikant ab, das Suberin wurde dadurch besser verknüpft. Zudem stiegen bei Salzstress in Pioneer 3906 RHZW die Kettenlängen um durchschnittlich ein C-Atom an, insgesamt stieg also neben der Quantität auch die Qualität des Pioneer 3906 RHZW-Suberins unter Stress an. Das Gegenteil war bei Helix-Mais der Fall, nicht nur die Morphologie der Pflanzen blieb weit hinter den Kontrollen zurück, auch die mittlere Kettenlänge des RHZW-Suberins verkürzte sich um mehr als ein C-Atom (Abb. 7.6), die Konnektivität veränderte sich dagegen nur geringfügig, auch die Zusammensetzung unterschied sich nur unwesentlich von der Kontrollgruppe.

EZW der gestressten Across 8023 und Helix Pflanzen nahm im Vergleich zur Kontrolle in allen Zonen im Gewicht und im Suberingehalt der Aliphaten-Fraktion um ein mehrfaches zu, bei Pioneer 3906 blieben die Suberinmengen der Endodermis so gering wie in der Kontrollgruppe. Ebenso verhielt sich der Anteil an Aromaten, bei Pioneer 3906 änderte sich der Anteil kaum, bei Across 8023 nahm der prozentuale Anteil der Zimtsäurederivate um ca. 10% ab und in Helix um den gleichen Betrag zu. Die Zusammensetzung des EZW-Suberins in Pioneer 3906 veränderte sich bei Salzstress nicht signifikant, während bei Helix deutlich mehr Monocarbonsäuren detektiert wurden, bei Across 8023 nahm vor allem der Anteil gesättigter ω -Hydroxysäuren bei Kultur in 100 mM NaCl-Lösung zu, in Zone V wurden überraschend große Mengen der C₁₈-12-OH-Säure gefunden, was sich auch auf die Konnektivität dieser Zone auswirkte, die in Zone V 20% höher war als in Zone IV. Insgesamt bleiben die Änderungen der chemischen Zusammensetzung, sofern diese ermittelt werden konnte zwischen den Kontrollen und der Salzstress gering sieht man von den stark gestiegenen Mengen Suberin in EZW von Across 8023 und Helix ab, ein Trend, der auch in den dicotylen Rizinus-Pflanzen gefunden wurde (siehe Kapitel 7.2).

Eine eindeutige Antwort der Zellwandzusammensetzung auf die Stresssituation 100 mM NaCl im Nährmedium scheint es nicht zu geben, anscheinend haben selbst Pflanzen der gleichen Art unterschiedliche Strategien um toxische Na⁺ Konzentrationen in den Zellen zu vermeiden. Messungen der Ionenkonzentrationen in Spross und Wurzel ergaben (FORTMEIER und SCHUBERT 1995), dass die Wurzeln der Sorte Pioneer 3906 besser in der Lage sind die schädlichen Ionen schon auf der Ebene der Rhizodermis/Hypodermis auszuschließen, dies wird durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Suberinkonzentrationen unterstützt. Wichtig ist hierbei vor allem, dass sich die Qualität des Pioneer 3906-Suberins deutlich ändert, eine höhere Kettenlänge und größere Konnektivität scheinen in diesem Fall die entscheidenden Parameter zu sein. Die Wurzel dieser Sorte war als einzige der gestressten Maispflanzen noch in der Lage die chemischen Parameter entscheidend zu verbessern. Die empfindlichste Sorte Across 8023, besaß zwar auch eine hohe Konnektivität, allerdings bei sehr niedriger mittlerer Kettenlänge. Helix Mais scheint dagegen starke Hemmung des Elongasesystems bei Salzstress zu erfahren, da die mittlere Kettenlänge deutlich sank. Helix und Across 8023 reagierten beide vor allem mit einer verstärkten Endodermis, was bei Pioneer 3906 nicht festzustellen war. Diese Strategie scheint jedoch nicht den Anstieg der

Na⁺-Ionenkonzentration im Spross zu verhindern, da FORTMEIER und SCHUBERT (1995) große Mengen Natrium-Ionen im Spross von Across 8023 nachwiesen, jedoch nur geringe Mengen in Pioneer 3906, bei annähernd gleichem Na⁺ Gehalt in den Wurzeln. Die apoplastische Barrieren der Endodermis als Ionen-Barriere scheint aber auf die zweiwertigen Calcium-Ionen zu wirken, denn Kontrollpflanzen von Across 8023 enthielten im Vergleich mit Pioneer 3906 etwa doppelt soviel Ca²⁺ im Spross, während bei den 100 mM NaCl-Pflanzen nur äquivalente Mengen gefunden wurde (FORTMEIER und SCHUBERT, 1995). Da jedoch ebenfalls eine starke Erniedrigung des Kalium-Ionen-Gehaltes gefunden wurde, scheint allein die Natrium-Aufnahme unbeeinflusst von der Barriere der Endodermis. Auch in Helix-Mais wurden im Verlauf der Experimente zur Rubidium-Ionen Aufnahme bei 100 mM-NaCl-Stress große Mengen Natrium im Spross detektiert (Kontrolle 59.5 ppm in Blättern, Stresspflanze 30422 ppm in Blättern), ein Na⁺-Ausschluss-Mechanismus scheint hier physiologisch nicht so gut entwickelt wie bei der Pioneer 3906-Hybride.

Für die anatomische Entwicklung der apoplastischen Barrieren ist in den hier durchgeführten Kurzzeitexperimenten primär der durch den hohen Salzgehalt hervorgerufene osmotische Stress verantwortlich, ähnliche anatomische Veränderungen, wie die hier ebenfalls beobachtete frühzeitige Reifung der Hypo- und Endodermis, wurden auch unter Einfluss von durch PEG verursachten osmotischen Stress beobachtet (PERUMALLA und PETERSON, 1986). Der Einfluss der Natrium-Ionen wird nach MUNNS (1993) erst nach einer längeren Wachstumsphase an der Pflanze sichtbar. Suberinkonzentrationen der apoplastischen Barrieren bei osmotischen (z.B. durch Polyethylenglycol-Lösung (PEG) verursachten) wie auch NaCl-Stress entsprachen sich auch auf der Ebene der Endodermis (ZEIER 1998), RHZW enthielten in dieser Untersuchung bei durch PEG verursachten Stress deutlich mehr Suberin.

7.5.2 Milder Wasserstress bei Helix, Nebelkultur im Vergleich mit hydroponischer Kultur

Mikroskopische Histochemische Befunde ließen erkennen, dass bei Nebelkultur die Entwicklung der Hypodermis beschleunigt wird (ZIMMERMANN und STEUDLE, 1998; ENSTONE und PETERSON, 1998; CLARKSON *et al.*, 1987), und schon in geringem Abstand von der Wurzelspitze eine Exodermis mit CASPARY-Streifen ausgebildet wurde (Abb. 7.12 F-D), was den Verhältnissen bei geringem Wasserstress ähnelt (PERUMALLA und PETERSON, 1986), aber auch bei in Erde angezogenen Maispflanzen gefunden wurde (DEGENHARDT und GIMMLER, 2000). Aus diesen Befunden wurde auf eine verminderte radiale Leitfähigkeit der Wurzel für Wasser und Ionen durch eine verstärkte Suberineinlagerung in die apoplastischen Barrieren geschlossen, was in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe STEUDLE (Bayreuth) im Rahmen dieser Arbeit eindrucksvoll gezeigt werden konnte und bei ZIMMERMANN *et al.* (2000) ebenfalls diskutiert wurde.

Zusätzlich zu den dort präsentierten Ergebnissen, konnte in dieser Arbeit die Daten in ihrer Aussage gestärkt werden, indem es gelang einen Oberflächen-Stoffmengen Bezug für die analysierten Zellwandpolymere herzustellen. Durch die Bezugsgröße nmol cm^{-2} konnte so erstmals ein direkter Bezug zwischen der Quantität der Suberinbelegung von Zellschichten apoplastischer Barrieren und Hydraulischer Wurzeleitfähigkeit hergestellt werden. Die Summe der Suberinmengen von Endodermis und Hypodermis/Exodermis konnte nun direkt mit der radialen Leitfähigkeit der Wurzel korreliert werden und mit den gegenüber ZIMMERMANN *et al.* (2000) aktualisierten und erweiterten Messwerten aus ZIMMERMANN (2001) verglichen (Tab. 7.7).

Tab. 7.7: Aliphatische Suberinmengen von EZW und RHZW einer Zone und Leitwerte der entsprechenden Wurzelsegmente von *Z. mays* bei Nebel oder Hydro-Kultur (\pm gibt die Standardabweichungen an).

	Aliph. Suberin [nmol cm^{-2}]	Hydraulische Leitfähigkeit (L_p) ^{a)} [$\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1} \cdot 10^{-7}$]
Nebekultur		
Zone I RHZW	7.13(± 0.97)	1.09 (± 0.53)
EZW	0.08	
Zone II RHZW	5.80(± 1.20)	
EZW	2.98(± 1.10)	
Mittelwert (ganze Wurzel) ^{b)}	3.99(± 2.71)	1.22 (± 0.46)
Hydrokultur		
Zone I RHZW	3.04(± 0.59)	1.80 (± 1.22)
EZW	0.07	
Zone II RHZW	5.12(± 1.40)	
EZW	2.91	
Mittelwert (ganze Wurzel) ^{b)}	2.79(± 1.79)	2.16 (± 1.14)

a) aus ZIMMERMANN, 2001. b) dieser Wert repräsentiert die theoretische Suberinbelegung einer Mono-Schicht mit gleichmäßiger Verteilung über die Wurzel mit einer Konzentration, die dem Mittelwert der Konzentration von RHZW und EZW entspricht.

Verstärkte die Pflanze die apoplastischen Barrieren, dann wurde auch die Leitfähigkeit der Wurzel für Wasser in Zone I signifikant eingeschränkt. Bei Messung des gesamten Wurzelsystems konnte für Hydro- und Nebelkultur eine größere radiale Leitfähigkeit gemessen werden als im Spitzenbereich (Tab. 7.7). Dieser Befund lässt sich durch einen erhöhten Bypass entlang von Seitenwurzelaustrüben in der basalen Zone (Zone II) erklären. Histochemische Experimente mit Farbstoffdiffusion lassen diesen Schluss zu (HÄUSSLING *et al.*, 1988; NORTH *et al.*, 1993; PETERSON und MOON, 1993; SOUKUP *et al.*, 2002). Der hierfür am häufigsten verwendeten Farbstoffes PTS (Pyren-3-hydroxy-5,8,10-trisulfonsäure Na-Salz) eignet sich gut zur Detektion eines möglichen Bypass für Wasser und Ionen, als Modellsubstanz für den Wasserfluss ist er aufgrund seiner Molekülgröße jedoch ungeeignet (ZIMMERMANN und STEUDLE, 1998).

7.5.3 Einfluss der apoplastischen Barrieren auf den Transport von Ionen in den Spross von *Z. mays*, Helix.

Mais der Sorte Helix wurde unter Zugabe von 100 mM NaCl und unter Zugabe von 10 μ M ABA zur hydroponischen Nährlösung bis zum Alter von 12 Tagen kultiviert. Die Einwirkung dieser Substanzen bewirkt in der Pflanze einen hohen osmotischen Stress (NaCl) bzw. eine direkte Induktion der Suberinbiosynthese. So konnte eine verstärkte Suberinisierung von Wundperidermen bei Kartoffeln bei Einwirkung von ABA gezeigt werden (KOLATTUKUDY und AGRAWAL, 1974; SOLIDAY *et al.*, 1978). ABA kann also als Stresshormon bei Langzeiteinwirkung eine verstärkte Suberinisierung veranlassen, um der Wurzel bei Wassermangel vor dem Austrocknen zu schützen, unter Umständen ist sogar die gesamte Biosynthese des Suberins ABA gesteuert, wofür es Hinweise in der Literatur gibt (CHANDLER und ROBERTSON, 1994). Auch in der Entwicklung der Salztoleranz spielt ABA eine Rolle, was im Einklang mit den vorherigen Erkenntnissen steht (SINGH *et al.*, 1987). Mit der Zugabe der Agenzien, veränderte sich auch die Wurzelanatomie, ABA und NaCl-Wurzeln waren stark gestaucht und dicker als die Kontrollwurzeln, die Entwicklung der Suberinlamelle in Endo- und Hypodermis war in den gestressten Pflanzen schon nahe der Wurzelspitze beobachtbar (Abb. 7.21 A).

Rubidium-Ionen gelten als Tracer für Kalium-Ionen und lassen sich leicht in biologischem Material nachweisen, da sie in der Natur nur selten vorkommen und spektroskopisch routinemäßig nachgewiesen werden können. Zahlreiche in Pflanzen bekannte Kalium-Ionenkanäle transportieren auch Rubidium-Ionen, wie auch Cäsium-Ionen, welche allerdings einige Kanäle blockieren können (BECKER *et al.*, 1996; MÜLLER-RÖBER *et al.*, 1995). Ein Teil der Rubidium-Ionen sollte bei ausreichendem Angebot im Nährmedium aber auch diffusiv apoplastisch durch die Wurzel transportiert werden und über den Transpirationsstrom in die Blätter gelangen, wo man es leicht analysieren kann. Von Vorteil wäre es wenn es gelänge, die Kaliumkanäle der Plasmalemmamembran selektiv zu blockieren, oder auszuschalten, um einen höheren Effekt der apoplastischen Barrieren zu messen. Bei Versuchen die Kalium-Ionenkanäle durch 1.0 mM CsCl zu blockieren und die Aufnahmezeit von kurzer Zeit später zugefügtem RbCl zu bestimmen, konnte zwar eine Reduktion der Rubidium-Ionenaufnahme mit steigender Cäsium-Ionenkonzentration festgestellt werden, jedoch verloren die Pflanzen an Vitalität, bei hohen Cs⁺ waren die Pflanzen nach 10 h ausgetrocknet. Aber schon bei niedrigen Cäsium-Ionenkonzentrationen konnte die Aufnahmezeit um mehr als die Hälfte gesenkt werden die passive Aufnahme von Rubidium ist also wesentlich kleiner als die über den Symplasten. Ähnlich niedrige Aufnahmezeiten wurden nur nach der Anzucht von Maispflanzen in 100 mM NaCl gemessen.

Für die Aufnahmeexperimente ohne CsCl wurden verschieden gestresste 12 Tage alte Helix-Maiskeimlinge in Nährlösung mit 1.0 mol L⁻¹ RbCl Lösung gestellt und die Aufnahmezeit durch Ernten der Pflanzen im Abstand von zwei Stunden und Bestimmung des Rb⁺-Gehaltes

der getrockneten Blätter ermittelt. Die Blätter der drei Gruppen zeigten starke Unterschiede im Trockengewicht, Kontrollen >> ABA > NaCl, die Transpirationsraten der Pflanzen unterschieden sich nicht signifikant. Aufnahmeraten der drei Kulturen bezogen auf die zur Aufnahme zur Verfügung stehende Wurzeloberfläche unterschieden sich deutlich: Kontrolle >> ABA > NaCl. Die behandelten Pflanzen nahmen deutlich weniger auf, da sie eine substantiell verstärkte Suberinschicht in der Endodermis besaßen, in NaCl-Mais konnte etwa das 10-fache an Suberin im Vergleich mit der Kontrolle gefunden werden, in ABA-Wurzeln sogar das bis zu 18-fache. Demnach sollten die ABA-Wurzeln viel weniger Rubidium-Ionen in den Spross lassen, aber dies war nicht der Fall. Gründe dafür sind vermutlich physiologischer Art, da in den unter NaCl-Stress gesetzten Pflanzen sehr hohe Natrium-Konzentrationen nachzuweisen waren (Kontrolle 0.90 ppm cm⁻²; ABA 1.36 ppm cm⁻²; NaCl 1358.1 ppm cm⁻²). Eine Auswirkung auf die verminderte Aufnahme zusätzlicher Ionen lässt sich schon aus den Daten von FORTMEIER und SCHUBERT (1995) erkennen, es konnten dort signifikant (um den Faktor 2.6) verminderte Kalium-Ionenkonzentrationen im Spross bei Across 8023 unter Salzstress festgestellt werden. Eine Auswirkung auf die Rubidiumaufnahme ist daher denkbar, multipliziert man den gemessenen Rubidiumgehalt mit dem dort festgestellten Faktor, so erreicht die Steigung der Regressionsgeraden einen Wert, der mit $y = 9.36 x$ deutlich über der Rubidiumaufnahme von ABA-Wurzeln liegt und so eine Reihenfolge in der Aufnahmerate, wie sie der Rangfolge im Suberingehalt der Endodermis entspricht. Neuere Ergebnisse belegen eine positive Wirkung des Phytohormons ABA auf die Aktivität von Kalium-Ionenkanälen (ROBERTS, 1998), was den Transport von Rubidium ebenfalls beeinflussen könnte, tatsächlich konnte von ROBERTS und SNOWMAN (2000) gezeigt werden, dass eine langfristige ABA-Behandlung von Maiswurzeln zu einer verstärkten Aufnahme von ⁸⁶Rb⁺ führt. Klar ersichtlich, wird aus diesen Überlegungen, dass eine monokausale Sichtweise, in der nur der beobachtete Parameter isoliert gesehen wird, für die Aufklärung der funktionellen Aspekte nicht ausreicht, da die Pflanzewurzel mit Zellwänden und physiologisch aktiven Zellen nicht als rein physikalische Barriere für den Transport von Ionen und Wasser angesehen werden kann.

8 Kartoffelperiderm als Modellgewebe für apoplastische Transportprozesse durch suberinisierte Gewebe.

Das vielschichtige Periderm (LULAI und FREEMAN, 2001) der unterirdischen Sprossknollen von *Solanum tuberosum* L. besteht zu 20-28% (GRAÇA und PEREIRA 2000a, b; KOLATTUKUDY, 1974; BRIESKORN und BINNEMANN, 1974; BINNEMANN, 1973) des Trockengewichtes aus Suberin und lässt sich einfach großflächig gewinnen. Kartoffelperiderm einzelner Sorten und Entwicklungsstadien ist zum Teil chemisch charakterisiert (BINNEMANN, 1973; KOLATTUKUDY, 1974; GRAÇA und PEREIRA, 2000a, b). Leitwerte des Periderms wurden bestimmt (VOGT *et al.*, 1983; SOLIDAY *et al.*, 1979), jedoch erschwert die natürliche Variationsbreite und Sortenvielfalt, den direkten Vergleich. In dieser Arbeit wurden kontinuierliche Messungen des Suberin und des aliphatischen Extraktgehaltes sowie der Wasserpermeabilität an natürlichem Periderm und neu gebildetem Wundperiderm der Sorte Désirée durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Luftfeuchtebedingungen bei der Peridermbildung nach der Ernte sowie der Einfluss des Fettsäureelongase-Hemmstoffes Ethofumesat untersucht. Die verwendeten Sprossknollen waren bei der Ernte nicht ausgereift. Alle Experimente wurden mit enzymatisch isolierten Periderm-Scheiben von 14 mm Durchmesser durchgeführt, der Begriff Periderm im folgenden Abschnitt bezieht sich auf diese isolierten Peridermscheiben.

8.1 Mikroskopische Untersuchungen

Von den unterschiedlich angezogenen Peridermen wurden mikroskopische Schnitte angefertigt und mit verschiedenen licht- und fluoreszenzoptischen Methoden untersucht.

Für die Zählung der Zelllagen wurden 6-10 Mikroskopische Schnitte an verschiedenen Stellen des Schnittes unter dem Mikroskop gezählt, sodass 10-15 Datensätze pro Schnitt entstanden. Abb. 8.1 zeigt die Mittelwerte und die minimalen und maximalen Abweichungen bei den Zählungen. Bei natürlichem Periderm betrug die Anzahl der Zelllagen 8-9 Lagen, mit fortschreitender Lagerdauer konnte keine Zunahme der Zelllagen festgestellt werden. Das Wundperiderm wuchs bereits nach 10 Tagen auf 4-5 neue Zelllagen an (Abb. 8.1).

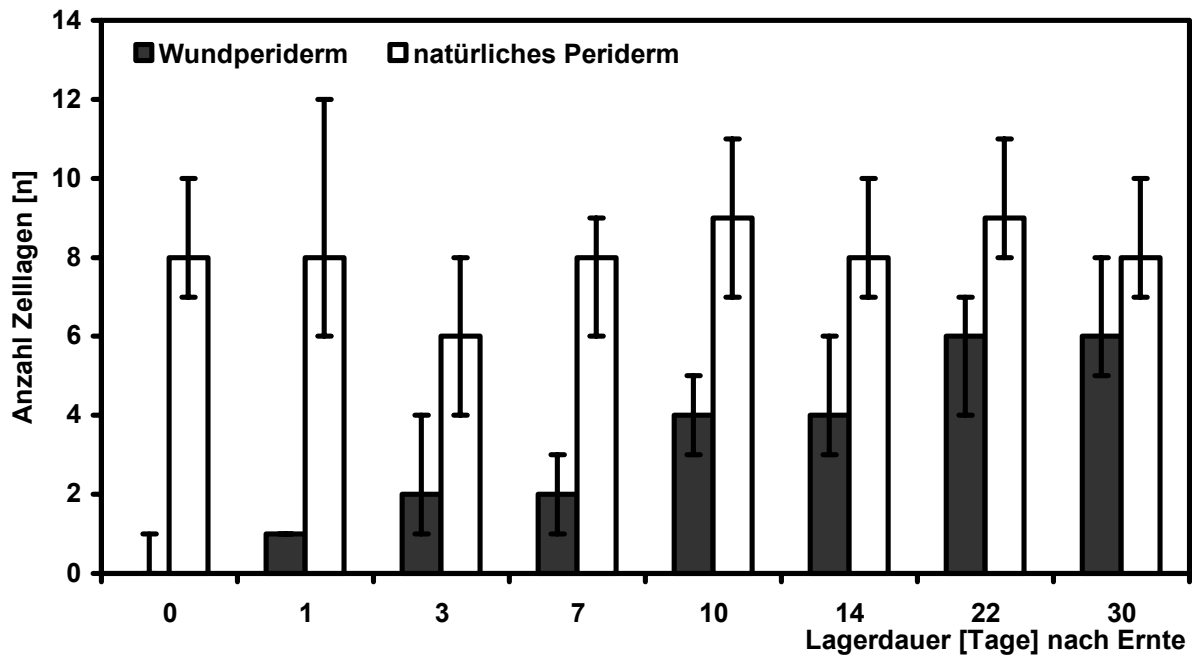


Abb. 8.1: Anzahl Zelllagen bei natürlichem Periderm und Wundperiderm von Kartoffeln nach Lagerung in 100% Luftfeuchte (Fehlerbalken = Minima/Maxima).

Die mikroskopischen Schnitte zeigten bei den frisch geernteten Kartoffelperidermen keine Unterschiede in der regelmäßigen Anordnung der Zellen (Abb. 8.2 C, D, E, G, H). Die auf dem Markt gekauften, reif geernteten und gelagerten Kartoffeln unterschieden sich etwas von den frisch geernteten, da sie auf der Oberfläche einige abgestorbene Zellen besaßen, die dicht zusammengedrückt waren (Abb. 8.2 A, B). In Abb. 8.2 C kann man gut den unter dem Periderm eingelagerten Farbstoff erkennen, vermutlich handelt es sich hierbei um Anthocyan-Derivate (MIYAZAKI *et al.*, 1991), die die Knollen dieser Kartoffelvarietät rot erscheinen lässt. Die Peridermzellwände zeigen eine starke Autofluoreszenz (Abb. 8.2 D; G) und ließen sich mit Sudan III sehr gut anfärben (Abb. 8.2 E). Abbildung 8.2 F zeigt ein rasterelektronenmikroskopisches Bild einer Lentizelle, die auch makroskopisch erkennbar waren. Für die Transpirationsexperimente wurden ausschließlich lentizellenfreie Peridermstücke verwendet.

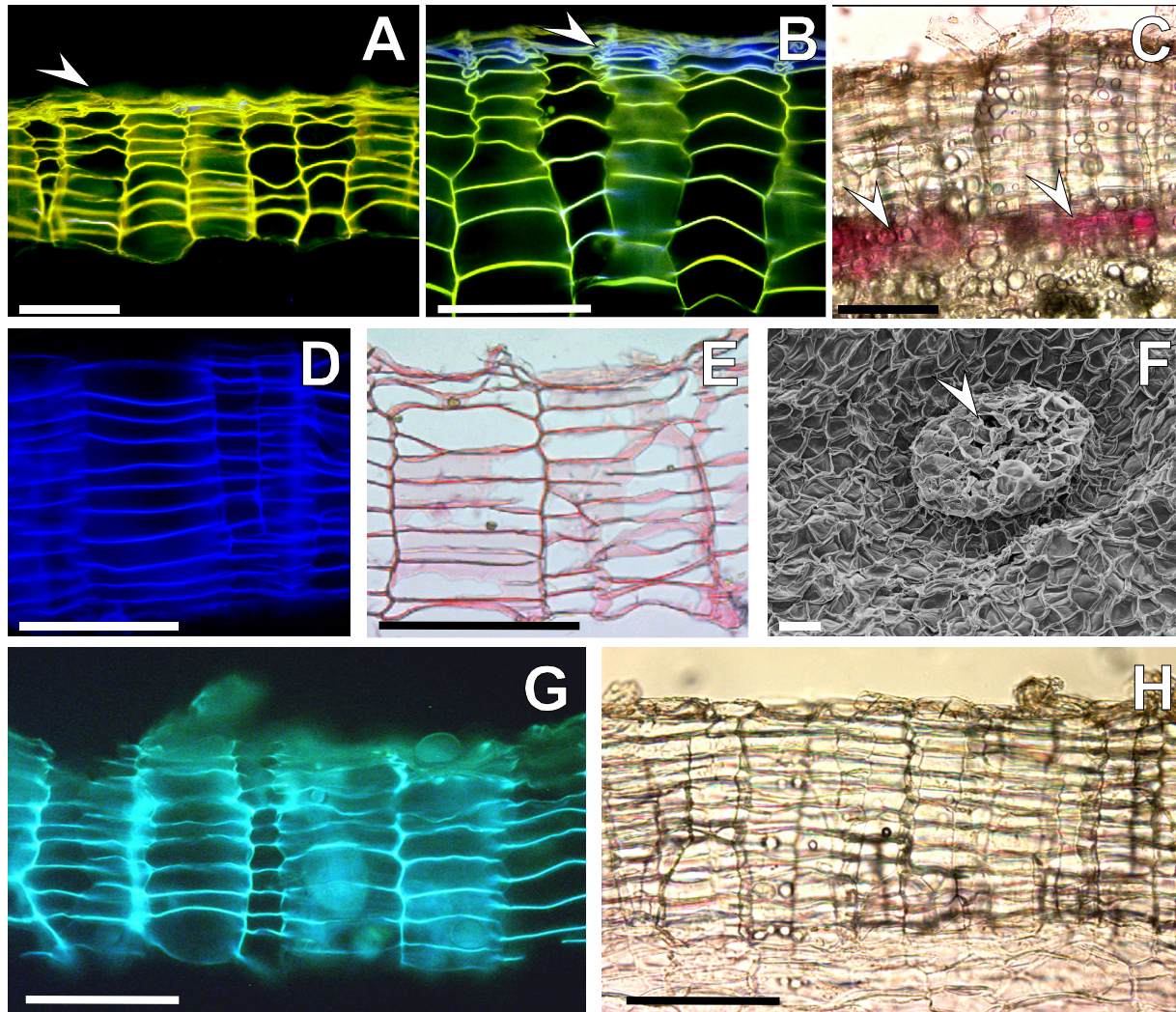


Abb. 8.2: Mikroskopische Handschnitte und Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von natürlichem Kartoffelperiderm der Sorte Désirée. Alle Balken entsprechen 100 μm . Alle Bilder sind mit der Außenseite nach oben orientiert; **A, B** marktfrische gelagerte Kartoffeln, Fluorol Yellow 088 gefärbt unter UV 395 nm Beleuchtung, gut sichtbar, alte äußere tote Zellschichten (Pfeilspitze); **C** frisch geerntete Kartoffel im Durchlicht, unter den Peridermschichten: Anthocyan Farbstoffeinlagerung (Pfeilspitzen); **D** frisch geerntetes Periderm Autofluoreszenz bei 365 nm; **E** 17 Tage altes Periderm Sudan III gefärbt; **F** Lentizelle (Pfeil) auf isoliertem Periderm Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme; **G** 28 Tage altes Periderm Autofluoreszenz bei 365nm; **H** 28 Tage altes Periderm, Durchlicht.

Die mikroskopische Betrachtung der Wundperiderme zeigte ein deutliches Anwachsen der Zellschichten im Laufe der Zeit (Abb. 8.3 A-H). Bereits nach wenigen Stunden konnte man durch die Autofluoreszenz eine neue Peridermschicht erkennen (Abb. 8.3 A). Nach drei Tagen ließen sich die entstandenen 1-2 Zellschichten schon sehr gut mit Sudan III anfärben (Abb. 8.3 B). Auch das neu entstandene Periderm zeigte eine gute Regelmäßigkeit im Aufbau der Zellschichten (Abb. 8.3 C-H). Im Vergleich mit natürlichem Periderm konnte man beobachten, dass die Zellen des Wundperiderm deutlich kürzer gebaut und etwas unregelmäßiger angeordnet waren (Abb. 8.3 G, H).

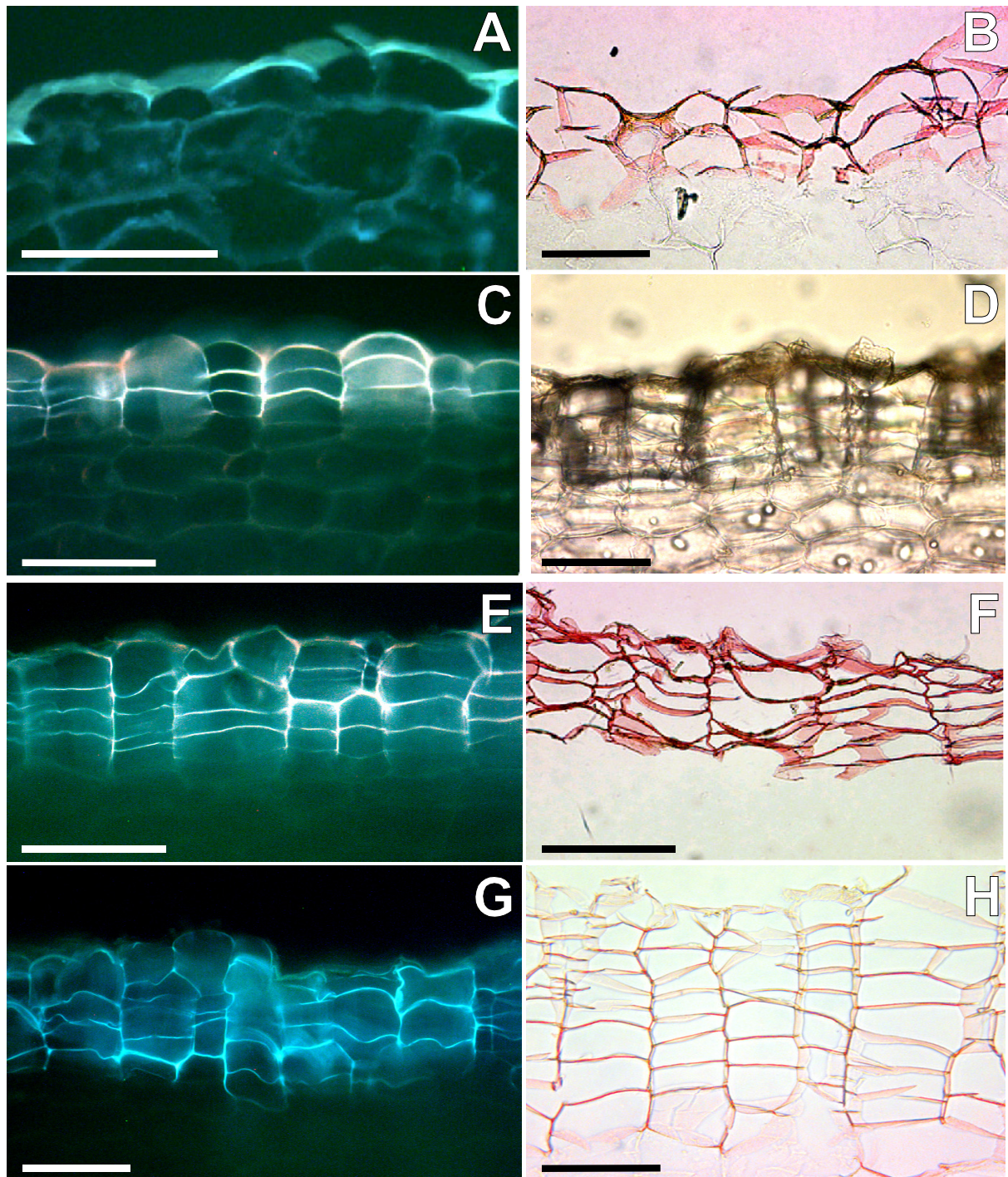


Abb. 8.3: Mikroskopische Handschnitte von Kartoffelwundperiderm der Sorte Desirée. Alle Balken entsprechen 100 μm . Alle Bilder sind mit der Außenseite nach oben orientiert; **A** 1 Tag altes Wundperiderm Autofluoreszenz bei 395 nm; **B** 3 Tage altes Wundperiderm, Sudan III; **C** 5 Tage altes Wundperiderm Autofluoreszenz bei 395 nm; **D** 8 Tage altes Wundperiderm Durchlicht; **E** 12 Tage altes Wundperiderm Autofluoreszenz bei 395 nm; **F** 12 Tage altes Wundperiderm, Sudan III; **G** 20 Tage altes Wundperiderm Autofluoreszenz bei 395 nm; **H** 30 Tage altes Wundperiderm Sudan III.

Bei allen untersuchten Peridermen nahm das flächenspezifische Peridermgewicht während der Lagerzeit stark zu. Obwohl die Anzahl der Zellschichten von Anfang an konstant blieb, wogen die

natürlichen Periderme bei der Isolation ca. 1 mg cm^{-2} ($0.94 \pm 0.10 \text{ mg cm}^{-2}$), nach 30 Tagen bereits annähernd 2 mg cm^{-2} ($1.89 \pm 0.14 \text{ mg cm}^{-2}$) (Abb. 8.4).

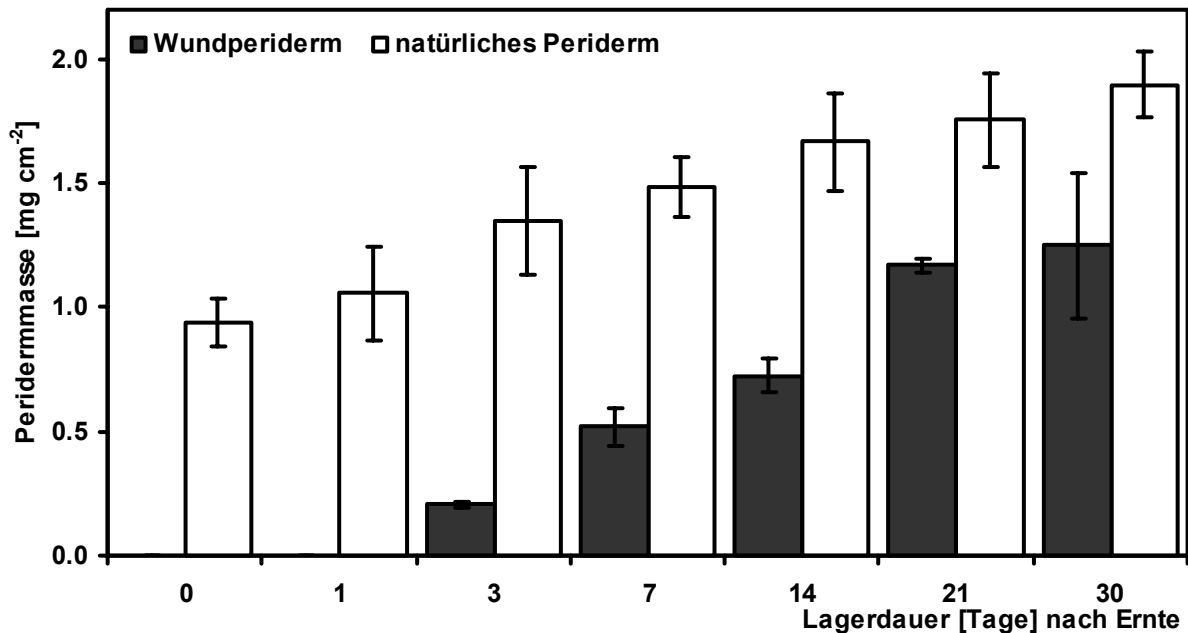


Abb. 8.4: Gewichtszunahme von getrocknetem Kartoffelperiderm der Sorte Désirée nach der Ernte (natürliches Periderm) oder dem Schälen (Wundperiderm) nach Lagerung bei 100% Luftfeuchte und anschließender enzymatischer Isolation; (Fehlerbalken = StabWN).

Bei Wundperidermen stieg das Gewicht von etwa 0.24 mg cm^{-2} (± 0.01) am 3. Tag, auf 0.63 mg cm^{-2} (± 0.09) nach 14 Tagen und erreichte nach 30 Tagen 1.25 mg cm^{-2} (± 0.29). Dies entspricht einer Steigerung innerhalb von 27 Tagen um den Faktor 5.2.

Der Effekt der Extraktion (Gewicht vor der Extraktion/Gewicht nach der Extraktion) mit organischen Lösungsmitteln ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) auf das Peridermgewicht war bei allen untersuchten Peridermen größer als 1.1. Die Effekte der Extraktion von natürlichen und Wundperidermen unterschieden sich nicht substantiell, bei jungen natürlichen Peridermen wurde ein leicht erhöhter Effekt (ca. 1.2) festgestellt (Abb. 8.5).

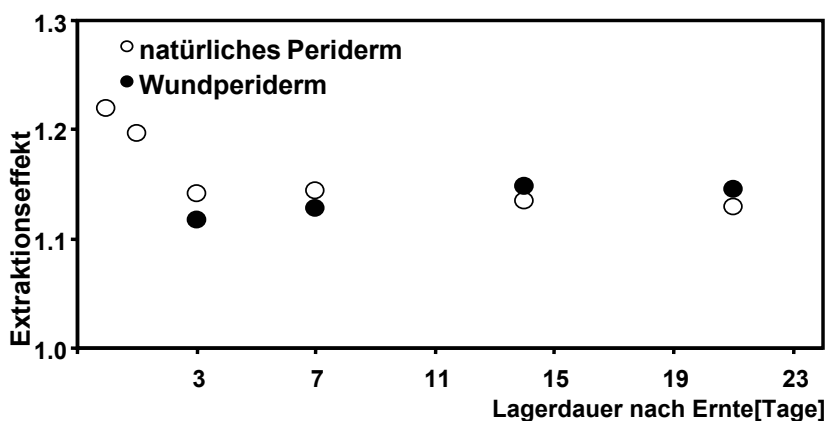


Abb. 8.5: Effekt der Extraktion mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ auf das Peridermgewicht von isolierten natürlichen und Wundperidermen der Kartoffel (Gewicht vor der Extraktion dividiert durch Gewicht nach der Extraktion).

8.2 IR-Absorbtion

Zur Charakterisierung der Periderme wurden diese nach dem Trocknen, der Extraktion, und der Umesterungsreaktion in KBr auf ihre Transmissionseigenschaften für IR-Strahlung untersucht. Die Unterschiede in der Transmission von extrahiertem und getrocknetem natürlichem Periderm von Kartoffeln waren sehr gering, die getrockneten Periderme zeigten jedoch meist eine etwas geringere Absorption als die Extrahierten. Die schwächsten Absorptionen zeigten mit Methanol umgeesterte Periderme (Abb. 8.6).

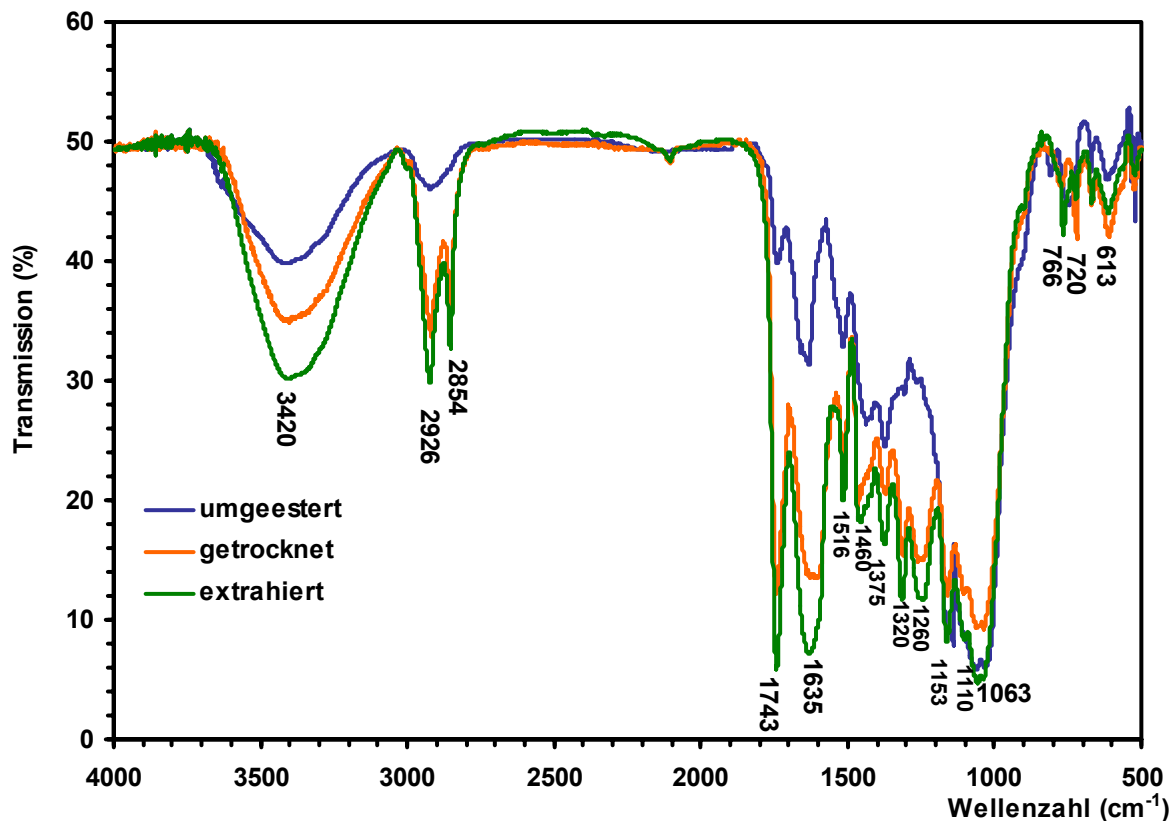


Abb. 8.6: FT-IR-Spektrum (basislinienkorrigiert) von enzymatisch isolierten natürlichen Kartoffelperidermen in KBr am Erntetag, getrocknet (rot), extrahiert (grün) und umgeestert mit BF_3/MeOH (blau).

Die Absorptionen des IR bei 3200-3600 cm^{-1} (R-O-H Valenzschwingung) deuten auf einen hohen Gehalt an gebundenem Wasser (in Wasserstoffbrücken zu freien Säuregruppen) und Alkoholen. Ausgeprägte symmetrische und asymmetrische CH-Valenzschwingungen bei 2926 cm^{-1} und 2854 cm^{-1} (-CH₂- und -CH₃ bzw. O-CH₃) weisen auf einen hohen Gehalt an aliphatischen Verbindungen hin, was durch die Anwesenheit von C-H („rocking“ Pendelbewegung in der Ebene) Schwingungen im Bereich von 720 bis 766 cm^{-1} gestützt wird. Nach Extraktion und Umesterung mit Methanol traten diese Absorptionen weiterhin auf, während die Intensität der C-H-Valenzschwingungen abnahm, es könnte sich daher auch um aromatische „out of plane“ C-H Schwingungen von mehrfach substituierten Benzolen handeln

(z.B.: Ferulasäureester). Die kleine Schulter bei ca. 3045 Wellenzahlen zeigt durch energiereiche C-H Valenzschwingungen ebenfalls auf aromatische und ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe hin.

Der Bereich längerer Wellenlängen wurde durch starke Schwingungen bei $\tilde{\nu} = 900$ bis 1750 cm^{-1} beherrscht. Besonders charakteristisch für aliphatische Ester sind C=O Streckschwingungen mit einer Energie von $3.46 \cdot 10^{-20}$ Joule oder 1743 Wellenzahlen (HESSE, 1991). Nach der Umesterung des Suberins mit Methanol (und Katalysator), war diese Bande erheblich reduziert, eine vorherige Extraktion mit Lösungsmittel hatte nur geringe Effekte auf das IR-Spektrum. Die Messungen bestätigten demnach die Struktur des Suberins als ein aliphatischer Polyester. Ebenfalls reduziert waren Absorptionen im Bereich von 1600 bis 1670 cm^{-1} , welche das Resultat von C=C-Valenzschwingungen sind, was auf einen hohen Anteil an ungesättigten aliphatischen Verbindungen schließen lässt, die teilweise durch Umesterung entfernt werden konnten. An einer leichten Verschiebung des blauen (umgeesterten) Signals in den energieärmeren Teil des Spektrums kann man auf die Anwesenheit von nicht veresterten Aromaten (evtl. Lignin) schließen.

Durch die Umesterung verringerten sich auch die Intensitäten der asymmetrischen C-H-Deformationsschwingungen bei 1516 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} . Wenig beeinflusst wurden die symmetrischen C-H (-CH₃) Deformationsschwingungen im Bereich von 1375 (O-CH₃)-1320 (O-C-OCH₃) Wellenzahlen. Die Intensität energiereicher C-O (C-O-C=) Valenzschwingungen zu denen auch Epoxide und Acetyl C-O zählen, nahm durch die Umesterung ebenfalls ab (1260 cm^{-1}). Die starken C-O-C Valenzschwingungssignale zwischen 1153 (asymmetrische C-O-C Streckschwingung) und 1063 Wellenzahlen (C-O, C-OH Deformationsschwingung) konnten durch Umesterung nicht verringert werden und gehören vermutlich zu einem Polyether aus Kohlenhydraten etwa Pektin oder Cellulose.

Nach einer Thioacidolyse des Kartoffelperiderms zeigte das IR-Spektrum eine deutliche Intensitätsabnahme im Bereich der C=C Valenzschwingungen bei 1630 cm^{-1} (Abb. 8.7). Andere Schwingungen des unbehandelten natürlichen Kartoffelperiderms (Abb. 8.6, 8.8) schienen nicht beeinflusst.

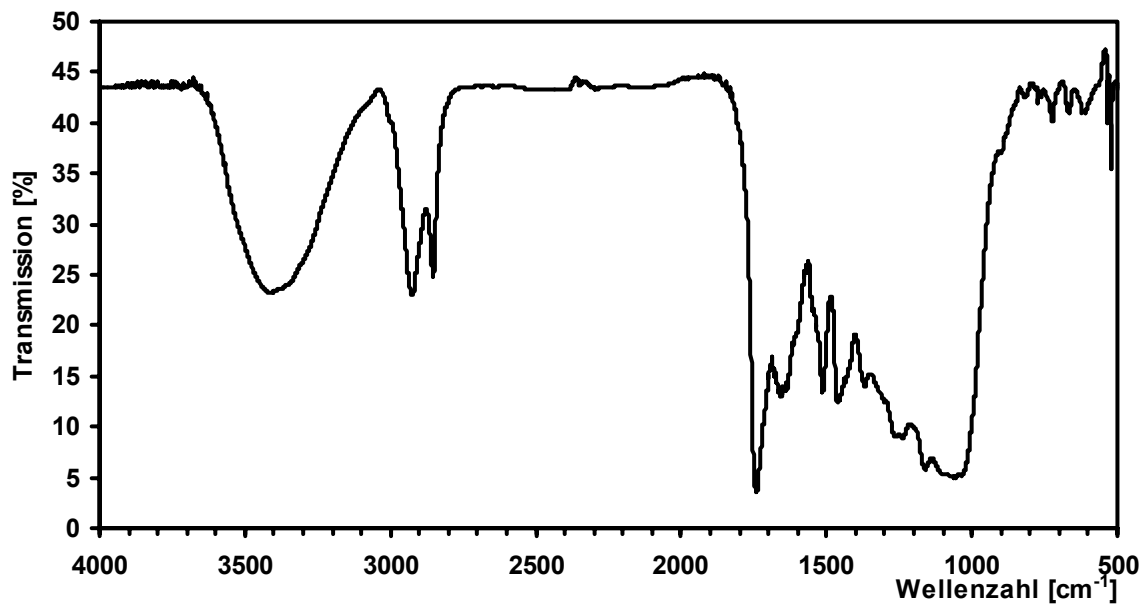


Abb. 8.7: IR-Spektrum (basislinienkorrigiert) von extrahiertem Kartoffelperiderm (14 Tage gelagert) in KBr nach einer Thioacidolyse-Reaktion.

Die IR-Absorptionen von 14 Tage altem extrahiertem Wundperiderm waren deutlich schwächer, als die von gleich altem natürlichem Periderm. Die substantiellsten Unterschiede waren im Bereich von 1750 bis 900 cm⁻¹ zu finden (Abb. 8.8), also in einem Bereich in dem Ether, Ester und ungesättigten Verbindungen Energie absorbieren.

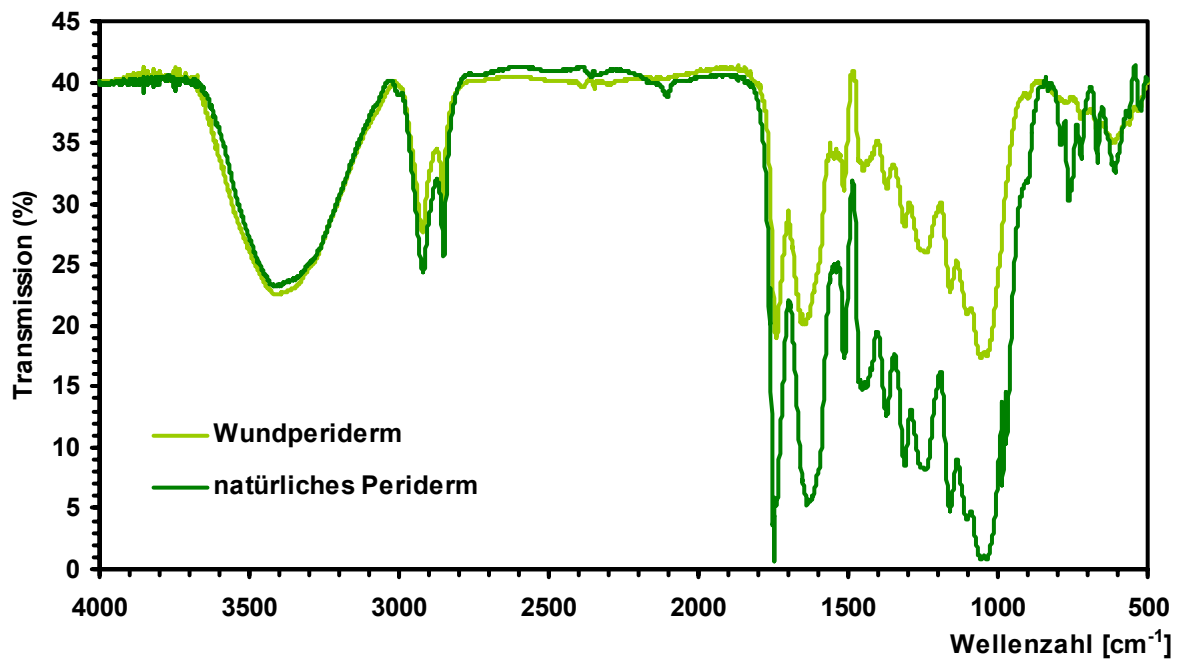


Abb. 8.8: Vergleich der IR-Absorption (basislinienkorrigiert) von natürlichem Kartoffelperiderm, 14 Tage nach der Ernte, mit gleich altem Wundperiderm, beide Peridermarten wurden vorher extrahiert.

8.3 Ergebnisse chemischer Analysen

Die untersuchten Kartoffelperiderme verschiedenen Alters und unterschiedlichen Lagerungsbedingungen und Zeiten wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; 1/1), und mit BF_3/MeOH umgeestert. Thioacidolysen zur Ligninbestimmung wurden durchgeführt, jedoch waren die detektierten Ligninmengen mit $< 0.01 \mu\text{g mg}^{-1}$ sehr gering. Eine Ligninbestimmung wurde daher nicht weiter verfolgt, da solch geringe Mengen an aromatischem Lignin vermutlich keine Wirkung auf die Wasserpermeabilität haben.

Im folgendem werden zuerst die Ergebnisse der Analysen der Extrakte und des Suberin von ausgewählten Peridermen exemplarisch untersucht. Dafür ausgewählt wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und Raumluftfeuchte (50-60% RH) gelagerte natürliche Periderme, sowie bei 100% Luftfeuchte und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (über Wasser) gelagerte geschälte Kartoffeln zur Gewinnung von Wundperidermen. Im weiteren Verlauf werden die Ergebnisse der, bei verschiedenen Luftfeuchten und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ Raumtemperatur gewonnenen Wachs- und Suberindaten an natürlichen und Wundperidermen präsentiert.

8.3.1 Extrakte: Vergleich Wund und bei 50% Luftfeuchte gewachsenes natürliches Kartoffelperiderm

Die mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) gewonnenen Extraktmengen bei natürlichen Peridermen stiegen mit der Lagerungszeit signifikant an (Abb. 8.9). Wundperiderme enthielten viel geringere Extraktmengen pro Peridermscheibe, daher wurden die Daten durch gemeinsame Extraktion von jeweils vier Peridermen gewonnen, um analytisch ausreichende Mengen zu erhalten. Daher konnte hierfür keine weitere statistische Information geliefert werden, nach 21 Tagen wurden einzelne Periderme analysiert und die Standardabweichung (StabWN) von jeweils drei Peridermen ermittelt.

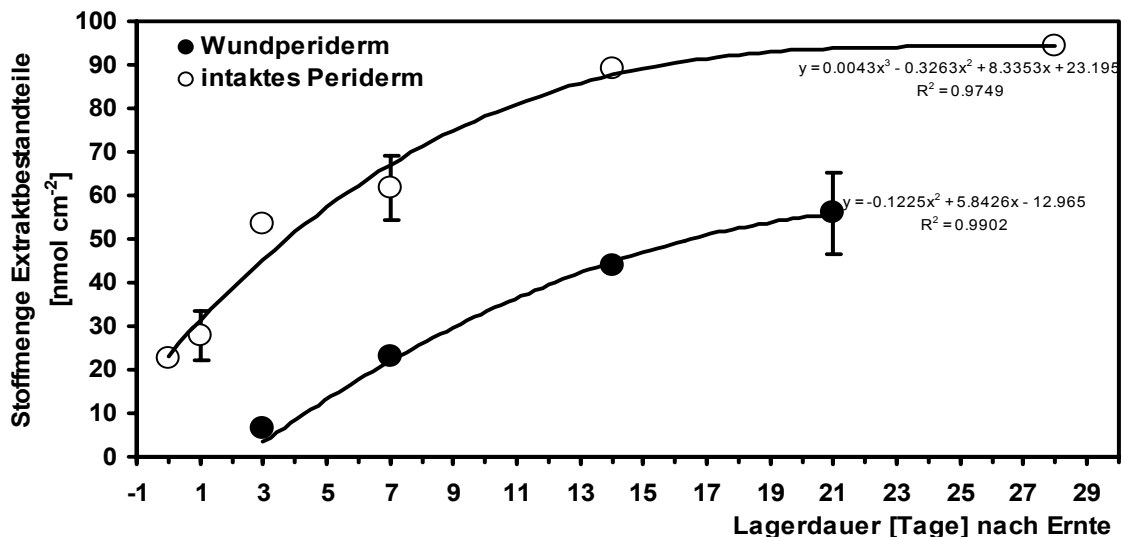


Abb. 8.9: Gesamt-Extraktmengen nach $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ Extraktion von Kartoffelperiderm (natürlich 50% RH) und Wundperiderm (100% RH); für 28 Tage altes Wundperiderm konnte kein Wert ermittelt werden, da Pilzbefall eine Ernte vereitelte; (Fehlerbalken = StabWN).

Nach ca. 20 Tagen nähert sich der Extraktgehalt bei beiden Peridermartem einem Plateau an, der größte Anstieg wurde innerhalb der ersten drei Tage (natürliches Periderm) bzw. der ersten vier Tage nach dem Schälen beim Wundperiderm beobachtet. Die Gesamtwachsmengen stiegen hierbei von $22.6 \text{ nmol cm}^{-2}$ auf $53.6 \text{ nmol cm}^{-2}$, bei natürlichem Periderm, was einer Zunahme um den Faktor 2.4 entspricht. Insgesamt stieg die Wachsmenge bei natürlichem Periderm um über auf $94.2 \text{ nmol cm}^{-2}$ nach 28 Tagen (Faktor 4.2).

Beim Wundperiderm konnte erst ab dem dritten Tag Material isoliert werden, die Extraktmenge der isolierten Periderme stieg innerhalb der nächsten vier Tage um den Faktor 3.6 von 6.4 nmol cm^{-2} auf $22.9 \text{ nmol cm}^{-2}$. Die Gesamtmenge gebildeten Wachses erreichte nach 21 Tagen $55.9 \text{ nmol cm}^{-2}$ (Faktor 8.7), was jedoch lediglich 59% der Wachsmenge in natürlichem Periderm zu diesem Zeitpunkt entsprach.

8.3.2 Extraktzusammensetzung der Kartoffelperiderme

Der mehrheitliche Teil des Peridermextraktes bestand aus aliphatischen Substanzen, vor allem *n*-Alkanen, Hydroxyalkanen und langkettigen Monocarbonsäuren. Im natürlichen Periderm wurde in allen Altersklassen ein Anteil von etwa 30-40% an aromatischen Komponenten gefunden (Abb. 8.10).

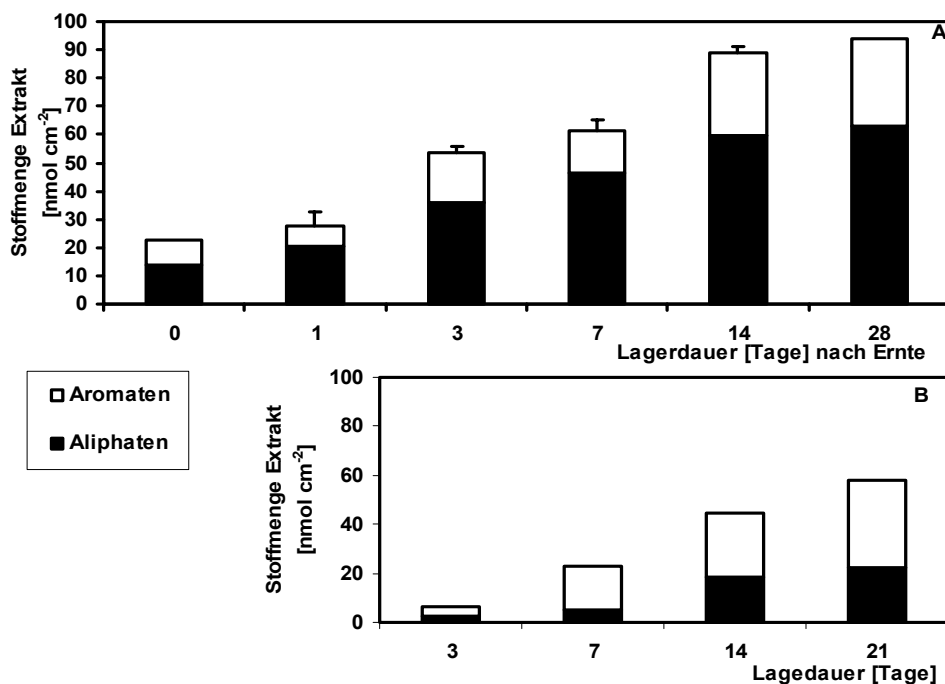


Abb. 8.10: Wachszusammensetzung von Kartoffelperidermen **A** natürliches Periderm (Fehlerbalken = StabWN); **B** Wundperiderm (Mischprobe aus vier gemeinsam extrahierten Peridermen).

Der Anteil aromatischer Komponenten lag beim Wundperiderm mit meist über 64% (Mittelwert) deutlich höher als beim natürlichen Periderm (32% im Mittel) mit Ausnahme des Erntetages, der mit über 39% deutlich über dem Mittelwert lag (Abb. 8.11).

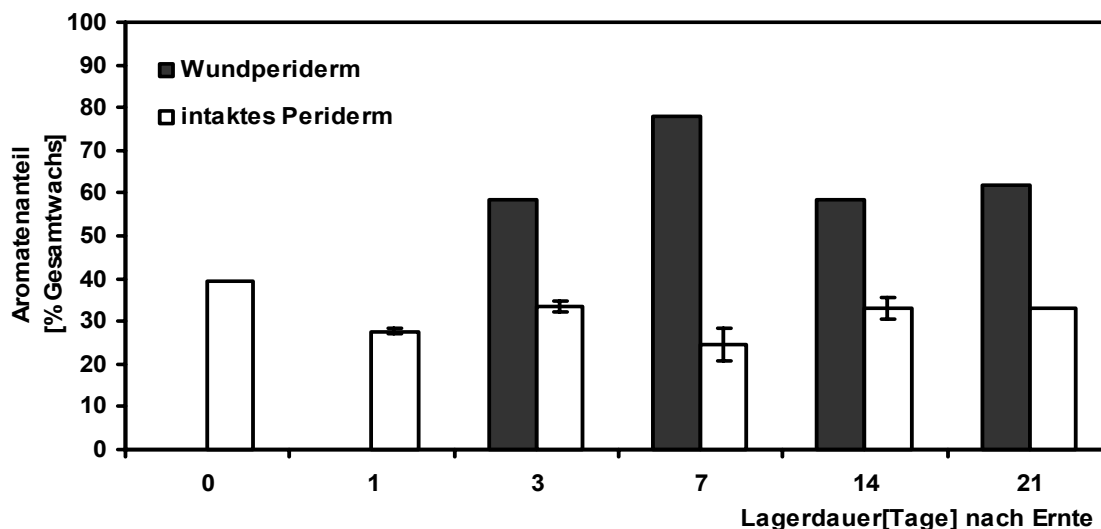


Abb. 8.11: Aromatenanteil am Gesamtwachs von natürlichen (50% RH) und Wundperidermen bei Kartoffel; (Fehlerbalken = StabWN).

Der aromatische Teil setzte sich überwiegend aus Ferulasäureester der Kettenlängen C_{16} bis C_{30} und geringen Mengen Feruloyltyramin und Kaffeesäure zusammen (Abbe 8.12). Feruloyltyramin konnte mittels Koinjektion einer authentischen Standardsubstanz identifiziert werden.

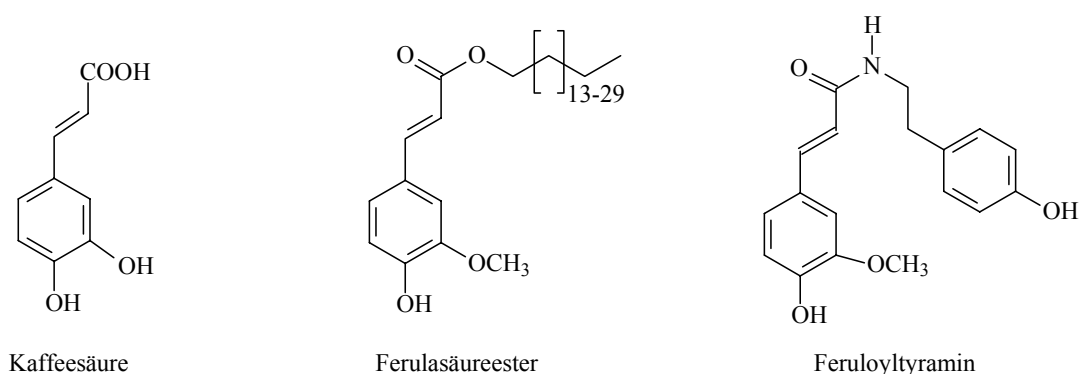


Abb. 8.12: Strukturformeln häufiger Aromatischer Extraktkomponenten in Wund und natürlichen Periderm, Kaffeesäure (3,4-Dihydroxycimtsäure); Ferulasäureester mit Alkoholen der Kettenlänge C_{16} - C_{32} ; Feruloyltyramin.

8.3.2.1 Ferulasäureester

Der Aromatenanteil im Wachsextrakt wird zum überwiegenden Teil aus Ferulasäureestern gebildet. Diese Substanzklasse ist bislang nur wenig in der Literatur beschrieben (ADAMOVIĆ)

et al., 1977; BALDÉ, 1991; LAVER, 1989; BERNARDS und LEWIS, 1992; BORG-OLIVER und MONTIES, 1989, 1993). Als Bestandteil von Kartoffelwundperiderm wurden von BERNARDS und LEWIS (1992) sowie ADAMOVICS *et al.* (1977) Ferulasäureester mit Kettenlängen von C₁₆ bis C₃₀ mittels HPLC nachgewiesen und als Suberinbestandteil beschrieben. Im Rahmen dieser Dissertation konnten erstmals Ferulasäureester der Kettenlängen C₁₆ bis C₃₂ im Wachsextrakt von isolierten natürlichen Peridermen festgestellt und als TMS-Derivate mittels MS auch in Wundperiderm nachgewiesen werden (Abb. 8.13).

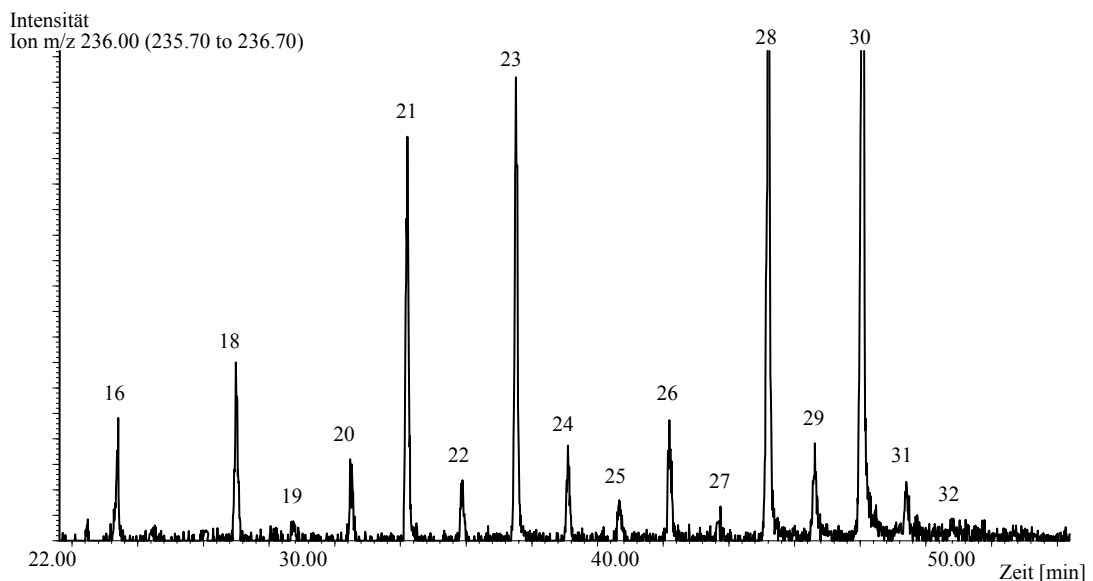


Abb. 8.13: Ionenchromatogramm von Ferulasäureestern in Kartoffelperidermextrakt ($m/z = 236$). Die homologen Ferulasäureester mit im Alkoholanteil 16 bis 32 C-Atomen. Der Abstand der Retentionszeiten beträgt ca. 1.4 min.

Die Ester mit den Kettenlängen C₂₁-, C₂₃-, C₂₈- und C₃₀- wurden bevorzugt gefunden, Ester mit C₁₇-Alkohol wurden nicht gefunden. Alle Homologen konnten anhand ihres charakteristischen Zerfallsmusters im Massenspektrum zugeordnet werden, Abb. 8.14 zeigt das EI-Massenspektrum des Trimethylsilylderivates der C₁₈-Verbindung.

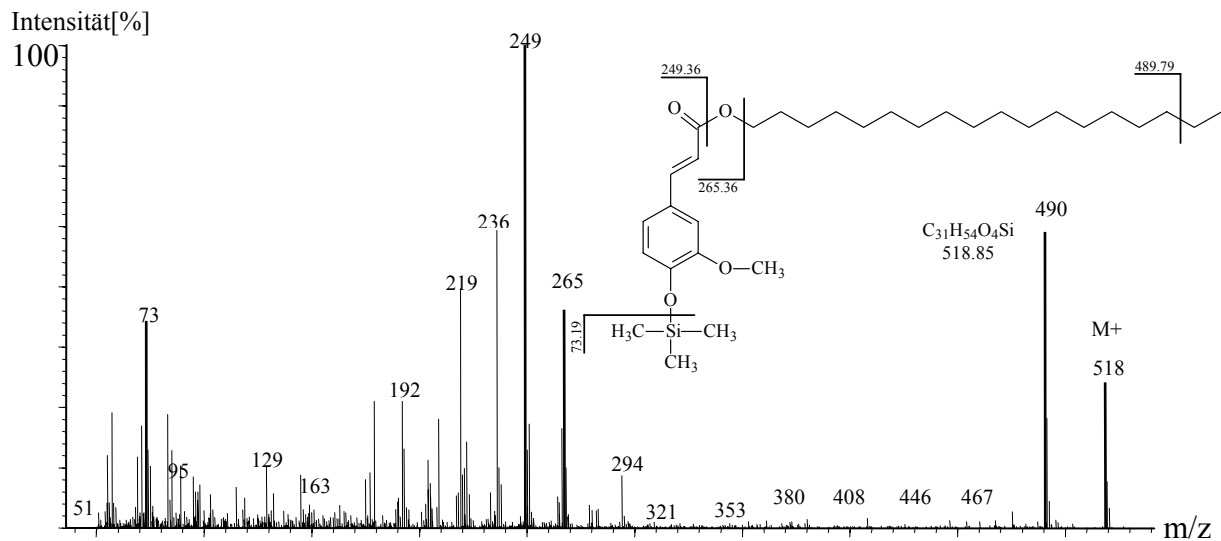


Abb. 8.14: EI-Massenspektrum und Fragmentierungsmuster des C₁₈-Ferulasäureesters.

Neben den typischen Signalen von $m/z = 73$ für die TMS Gruppe sowie $m/z = 249$ bzw. 265 für den Ferulasäurekern konnten die in Tabelle 8.1 abgelegten Signale von M^+ und M^+-28 ($C_2H_4^+$) mit hohen Intensitäten detektiert werden.

Tab. 8.1: Wichtige Massenfragmente der identifizierten TMS-Derivate der Ferulasäureester.

n ^{a)}	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
M^+	490	519	533	547	561	575	589	603	617	631	645	659	673	687	701	715
M^+-28	462	490	505	519	533	547	561	575	589	603	617	631	645	659	673	687

a) Kettenlänge des Alkoxyrestes in Anzahl C-Atome.

Ferulasäureestern der Kettenlängen C₂₈ bis C₃₀ bildeten 20-35% des gesamten Ferulasäuregehaltes in natürlichem Periderm. Bei Wundperidermen (Abb. 8.15 **B**) betrug dieser Anteil nur 15-32%. Aus Wundperiderm wurden am dritten Tag sehr große Stoffmengen an C₁₈ und C₁₉ (30% und 23%) Ester isoliert, zudem konnte an den darauf folgenden Tagen eine Häufung der Anteile um die Kettenlänge 23 (10-13%) festgestellt werden. Insgesamt konnte man bei Wundperidermen einen deutlichen Anstieg in der Kettenlänge mit zunehmender Lagerzeit feststellen (Abb. 8.15 **A**), während bei natürlichen Periderm Änderungen nicht deutlich erkennbar waren (Abb. 8.15 **A**).

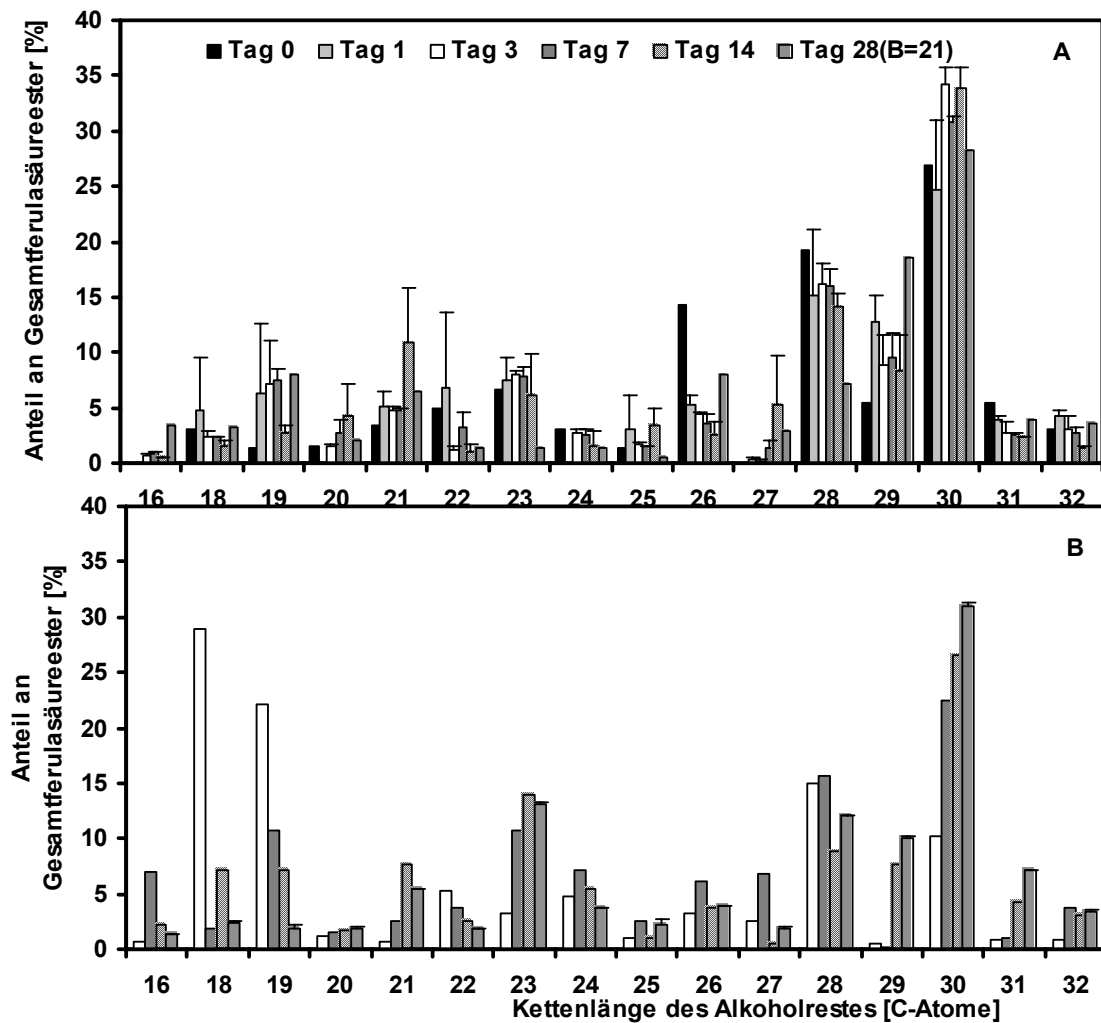


Abb. 8.15: Kettenlängenverteilung der Ferulasäureester in Prozent von der Gesamtstoffmenge der Ferulasäureester in **A** natürlichem Periderm (50% RH; Fehlerbalken = StabWN); **B** Wundperiderm, Tag 3, 7, 14, 21, (Mischprobe aus vier gemeinsam extrahierten Peridermen).

8.3.2.2 Substanzklassenverteilung im Extrakt von Kartoffelperiderm

Die prozentuale Zusammensetzung der fünf Hauptsubstanzklassen (Alkane, Alkohole, Monocarbonsäuren, Ferulasäureester und Aromaten) im $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ Extrakt unterschied sich je nach Alter der untersuchten Periderme (Abb. 8.16).

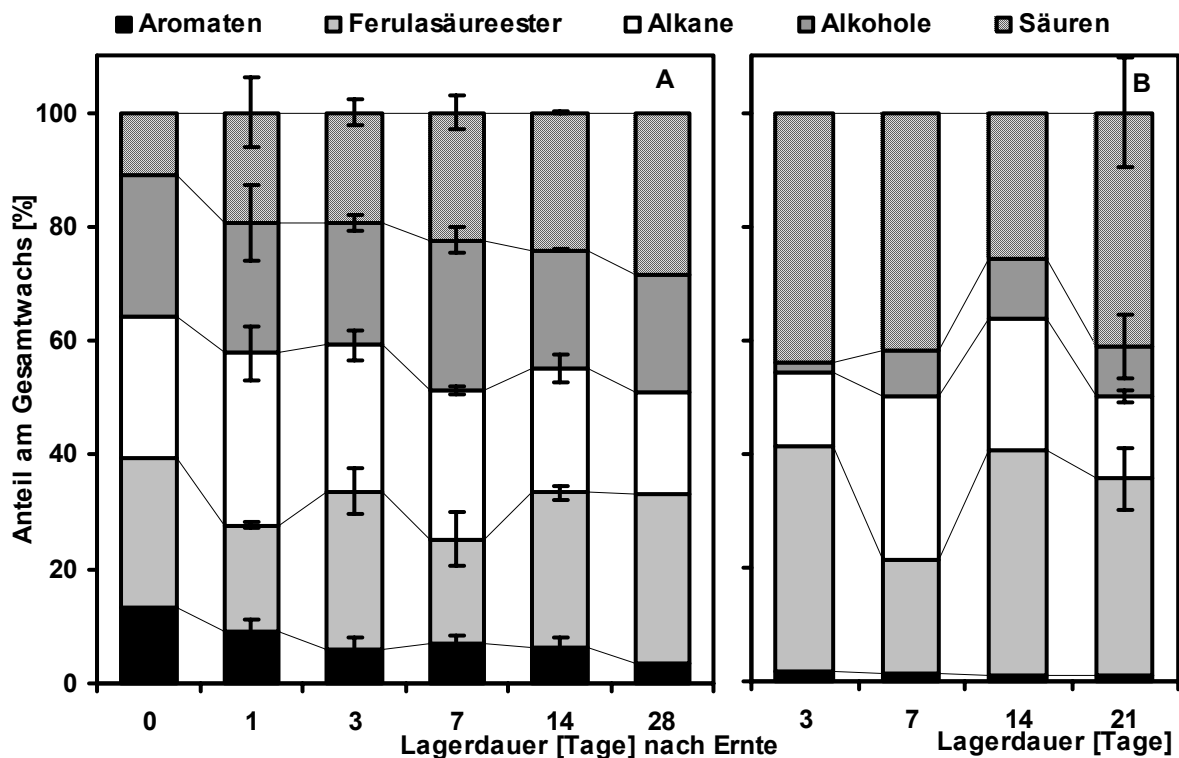


Abb. 8.16: Substanzklassenverteilung in Prozent an der Gesamt-Stoffmenge des Extraktes von Kartoffelperidermen **A** natürlich 50% RH, (Fehlerbalken = StabWN) und **B** Wundperiderm (Mischprobe aus 4 gemeinsam extrahierten Peridermen).

Der Anteil an Monocarbonsäuren stieg bei natürlichem Periderm kontinuierlich von 10% am Erntetag auf 28% am Ende des Beobachtungszeitraumes (Faktor 2.8). Bei Alkoholen konnte eine leichte Abnahme von 25% auf 20% am Anteil am Gesamtwachs festgestellt werden, ebenfalls bei Alkanen von 25% auf 18% (Abb. 8.16 **A**). Der Aromatenanteil nahm im gleichen Zeitraum ab (s.o.), der Anteil Ferulasäureester war hingegen mit durchschnittlich 26% beinahe zu allen Zeitpunkten gleich (Ausnahme ist der 7. Tag, hier betrug der Gehalt unter 20%) (Abb. 8.16 **A**).

Bei Wundperidermen konnte ein Anstieg des Alkoholanteils im Gesamtextrakt von 2% auf 9% festgestellt werden (Faktor 4.5), der Anteil der Alkane stieg bis zum siebten Tag stark von 13% auf 28% an, und fiel nach diesem Maximalwert zum 21. Tag wieder auf 15% Anteil am Gesamtwachs (Abb. 8.16 **B**). Auffällig war der konstant hohe Anteil an Ferulasäureestern und Monocarbonsäuren von 35-44% mit Ausnahmen am siebten und 14. Tag, wo der Anteil auf das Niveau von natürlichem Periderm abfiel (Säuren 14. Tag 25%, Ferulasäureester 7. Tag 20%) (Abb. 8.16 **B**).

8.3.2.3 Kettenlängenverteilung der Wachse im Kartoffelperiderm

Zur Beurteilung der Wachsqualität wurde die mittlere Kettenlängenverteilung (Anzahl C-Atome) der Extraktkomponenten berechnet. In der Summe über alle Komponenten konnte bei Wund- wie bei natürlichem Periderm ein Anstieg der Kettenlängen über den Lagerzeitraum beobachtet werden (Abb. 8.17).

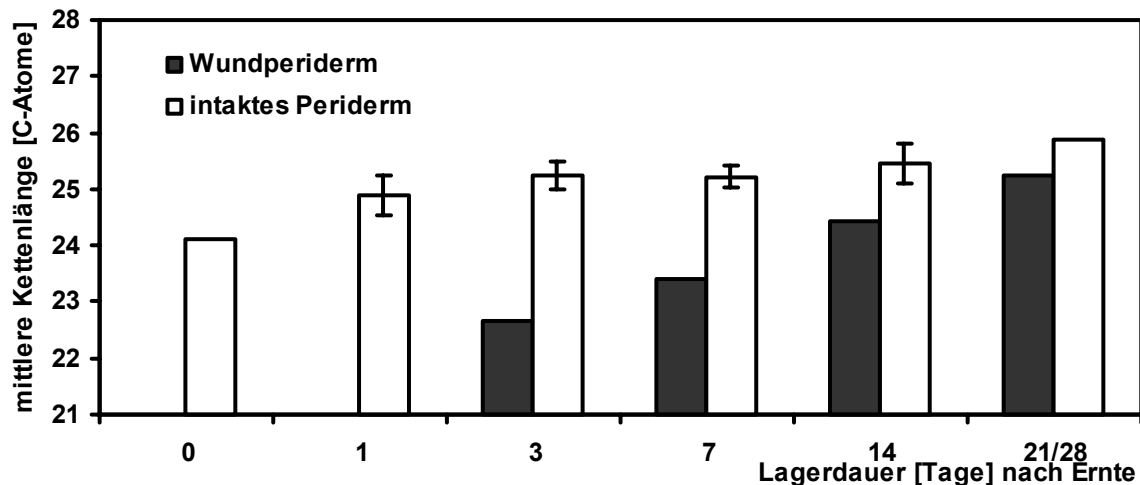


Abb. 8.17: Summen mittlerer Kettenlängen in Wund und natürlichem (50% RH) Kartoffelperidermextrakt; basierend auf der Gesamtstoffmenge des Extraktes; zeitliche Entwicklung (Fehlerbalken = StabWN), Wundperiderm: Mischprobe aus 4 gemeinsam extrahierten Peridermen.

Bei natürlichem Periderm stieg die mittlere Kettenlänge aller Substanzklassen innerhalb eines Zeitraumes von 28 Tagen um 1.7 Kohlenstoffatome von 24.1 auf 25.8 C-Atome in den Ketten der beteiligten Substanzen (Abb. 8.17; leere Balken). Beim Wundperiderm stieg die mittlere Kettenlänge um 2.3 C-Einheiten innerhalb von 21 Tagen von 22.8 auf 25.1.

Die mittlere Kettenlängenverteilung der einzelnen Substanzklassen bei natürlichem Periderm zeigte, dass die Zunahme der Gesamtkettenlänge fast ausschließlich auf die Substanzklasse der Monocarbonsäuren zurückzuführen ist, deren Stoffmengenanteil und Kettenlänge bei älteren Peridermen stark zunimmt, von 18.6 auf 24.6 Kohlenstoffeinheiten, also um 6.0 C-Atome (Abb. 8.18 A; Kreise). Bei allen anderen Substanzklassen bleibt die Kettenlänge annähernd konstant, aber mit durchschnittlich höherer Kettenlänge als beim Wundperiderm, vom Erntetag an (Abb. 8.18 B).

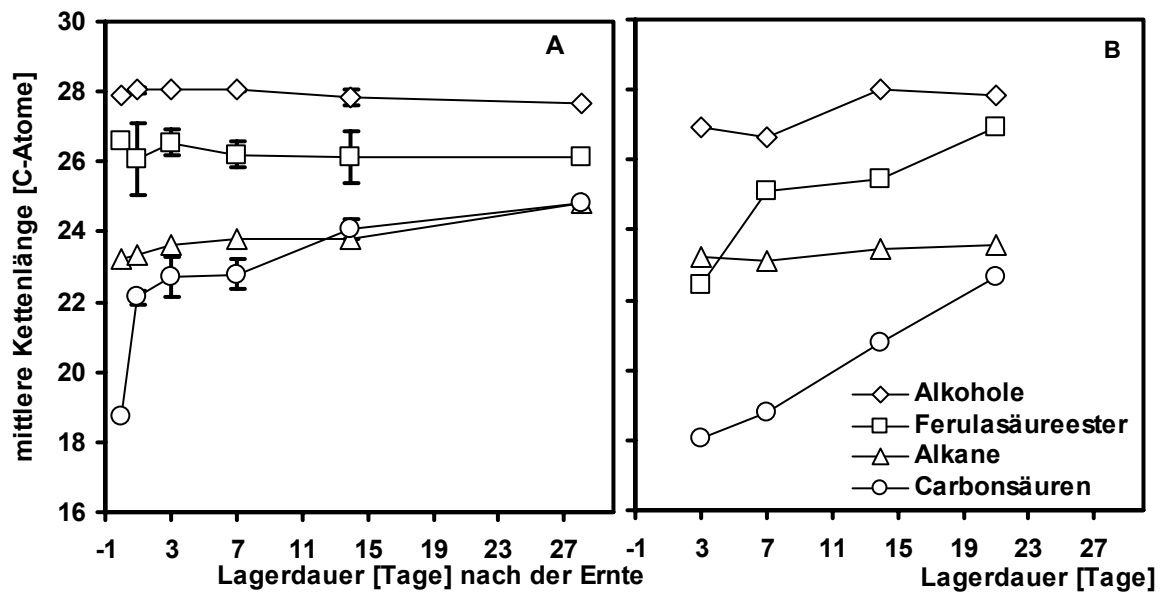


Abb. 8.18: Mittlere Kettenlängen in Substanzklassen von natürlichem Kartoffelperidermextrakt **A** (Fehlerbalken = StabWN); **B** in Wundperidermen (Mischprobe aus 4 gemeinsam extrahierten Peridermen), Legende gültig für **A** und **B**.

Bei Wundperidermen nahmen mit Ausnahme der Alkane (Abb. 8.18 **B**; Dreiecke) die mittleren Kettenlängen aller beteiligten Substanzklassen zu. Am stärksten wiederum bei den Monocarbonsäuren (18.8 auf 22.6) aber auch bei den Ferulasäureestern (22.3 auf 26.4) (Abb. 8.18 **B**). Die mittleren Kettenlängen der Alkane unterschieden sich nicht von denen der natürlichen Periderme, bei Alkoholen und Ferulasäureestern wurden nach 14 Tagen Wachstum dem natürlichen Periderm ähnliche mittlere Kettenlängen von 28.0 bzw. 25.0 beobachtet (Abb. 8.18 **B**)

8.4 Suberin; Vergleich Wund- und natürliches Periderm 50% RH

Der Gesamtsuberingehalt (Aromaten und Aliphaten) von natürlichem Periderm betrug am Erntetag $266.0 \text{ nmol cm}^{-2}$ und nahm mit dem Verlauf einer Sättigungskurve nach 28 Tagen auf $493.3 \text{ nmol cm}^{-2}$ zu, das ausgereifte Periderm enthielt demnach fast die doppelte Menge Suberin des frisch geernteten (Abb. 8.19; volle Kreise).

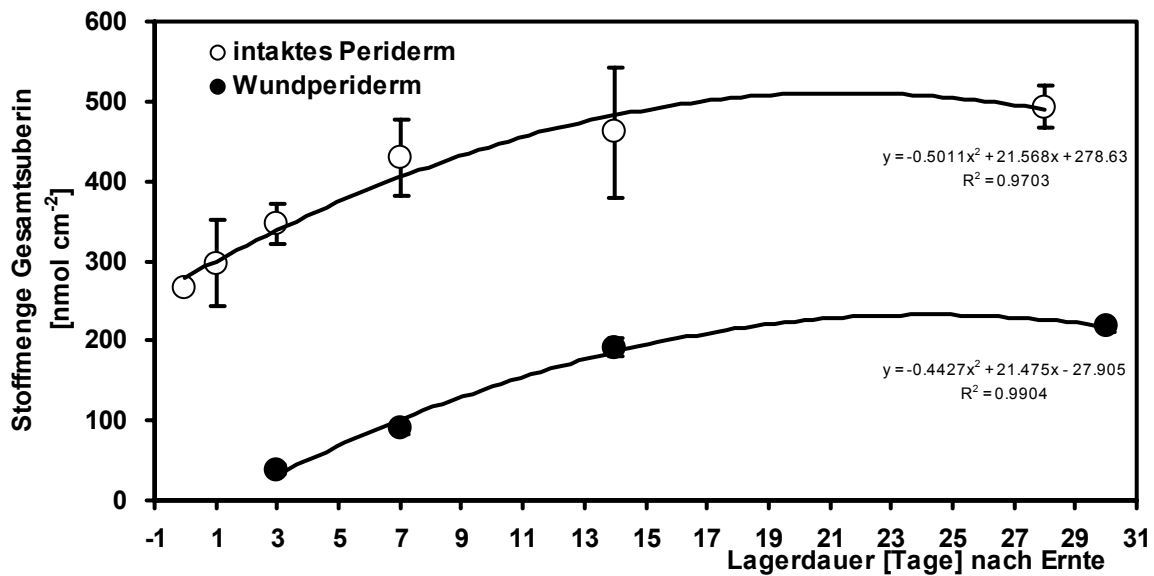


Abb. 8.19: Gesamtsuberinergehalt in Kartoffelperidermen; natürliches Periderm (offene Punkte) (50% RH), Wundperiderm (gefüllte Punkte) (100% RH), Angaben in nmol cm^{-2} (Fehlerbalken = StabWN).

Das Wundperiderm enthielt mit $38.7 \text{ nmol cm}^{-2}$ am 3. Tag nach dem Schälen etwa 11% des Suberins des natürlichen Periderms, nach weiteren 27 Tagen wurden 44% ($217.19 \text{ nmol cm}^{-2}$) der Suberinmonomere des Suberins von natürlichem Periderm isoliert (Abb. 8.19; leere Kreise), dies entspricht einer Steigerung um das 5.6 fache.

8.4.1 Suberinzusammensetzung

Aliphatische Verbindungen dominierten die Zusammensetzung des Suberins von Wund- und natürlichem Periderm (245 bis 459 nmol cm^{-2} natürliches; und 33.7 bis 200 nmol cm^{-2} Wundperiderm). Die Hauptbestandteile waren die ungesättigte C_{18} -Di- und C_{18} - ω -Hydroxysäure, daneben wurden Alkohole, Monocarbonsäuren, gesättigte Dicarbonsäuren, 2-Hydroxysäuren und gesättigte ω -Hydroxysäuren nachgewiesen. Die Menge an Aromaten war gering (13.8 - $33.6 \text{ nmol cm}^{-2}$ natürliches; 4.95 - $17.2 \text{ nmol cm}^{-2}$ Wundperiderm) und bestand zu etwa gleichen Teilen aus Cumarsäure, Ferulasäure und *m*-Anisinsäure (letzteres wurde nur in natürlichem Periderm nachgewiesen) (Abb. 8.20).

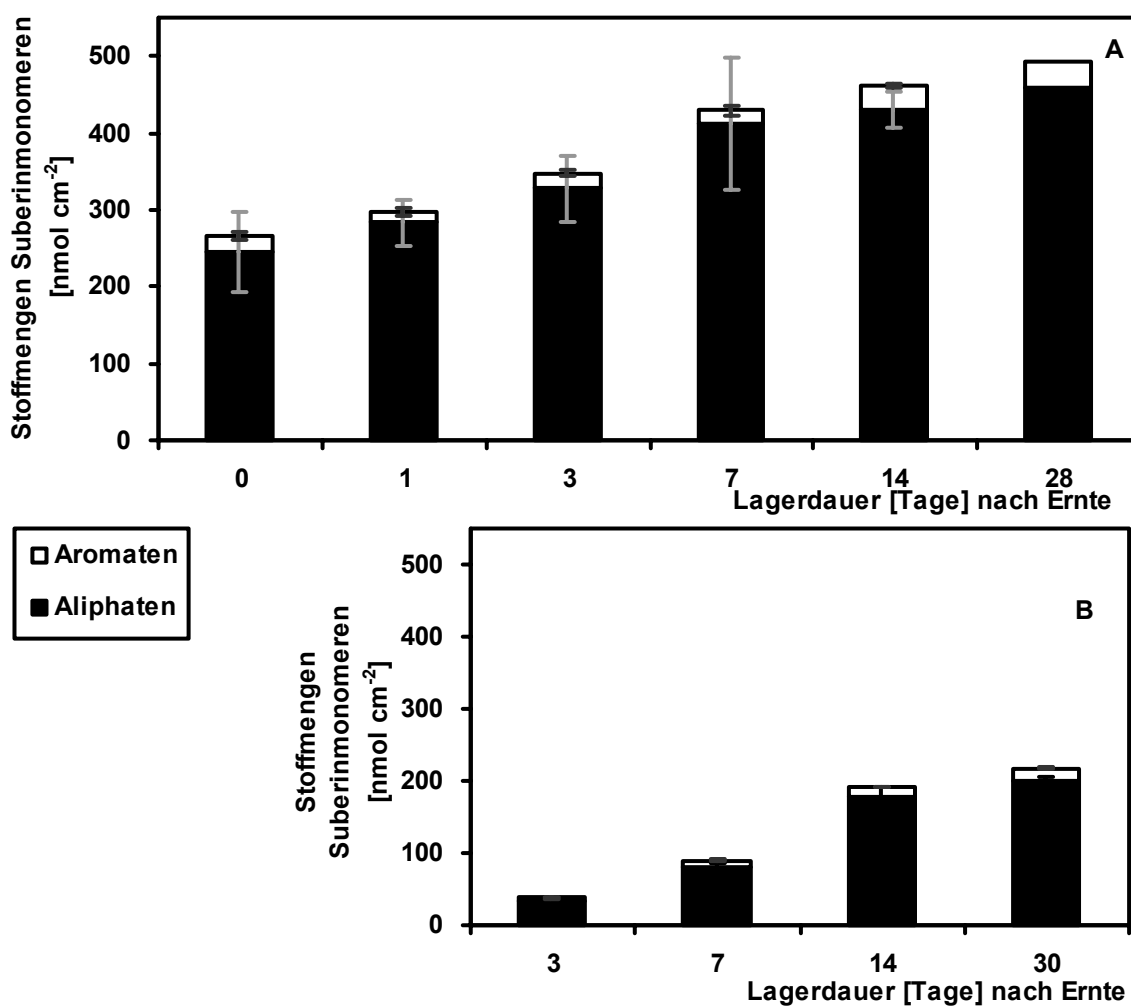
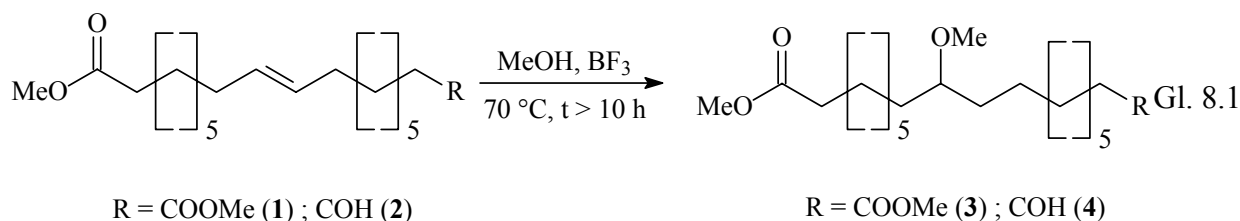


Abb. 8.20: Gesamtsuberingehalt aliphatischer und aromatischer Teil in Kartoffelperidermen; **A** natürliches Periderm (50% RH), **B** Wundperiderm (100% RH), Angaben in nmol cm⁻² (Fehlerbalken = StabWN).

8.4.1.1 Substanzklassenverteilung

Die Monomerenzusammensetzung des Kartoffelperidermsuberins wird dominiert von den Ölsäurederivaten 1,18-Dicarboxy-9-octadecensäure (**1**, R = COOH) und 1-Carboxy-18-hydroxy-9-octadecensäure (**2**, R = OH). In den Chromatogrammen konnten bei längerer Reaktionsdauer (>14 Stunden) der Umesterung auch die Additionsprodukte **3** und **4** von Methanol an die Doppelbindung nachgewiesen werden (Gl. 8.1).



Die methoxylierte Verbindung **4** konnte durch den Vergleich mit Massenspektren aus der Literatur identifiziert werden (KOLATTUKUDY, 1974), auf **3** wurde analog aus dem Fragmentierungsmuster des Massenspektrums geschlossen. Die Additionsprodukte wurden in der Summenberechnung zu den ungesättigten Verbindungen addiert, da sie als Reaktionsartefakte der Originalverbindungen bei der Umesterung anzusehen sind.

Die Komposition der Substanzklassen im Suberin von natürlichem Kartoffelperiderm zeigte im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Änderungen (Abb. 8.21 A). Lediglich bei den ungesättigten ω -Hydroxysäuren konnte vom Tag 0 zum 14. Tag ein Rückgang um 5% festgestellt werden, jedoch war der Anteil am letzten Messtag (28. Tag) nur 2% niedriger als der erstgemessene. Die dominierende Substanzklasse war die der ungesättigten Disäuren (25-31%), gefolgt von den ω -Hydroxysäuren (20-26%). Alkohole und Monocarbonsäuren waren zu etwa gleichen Teilen (10-16%) vorhanden, die gesättigten Disäuren und ω -Hydroxysäuren waren mit jeweils 2-6% vertreten, von 2-OH-Säuren konnten nur Spuren festgestellt werden, der Aromatenanteil lag zwischen 4% und 7%.

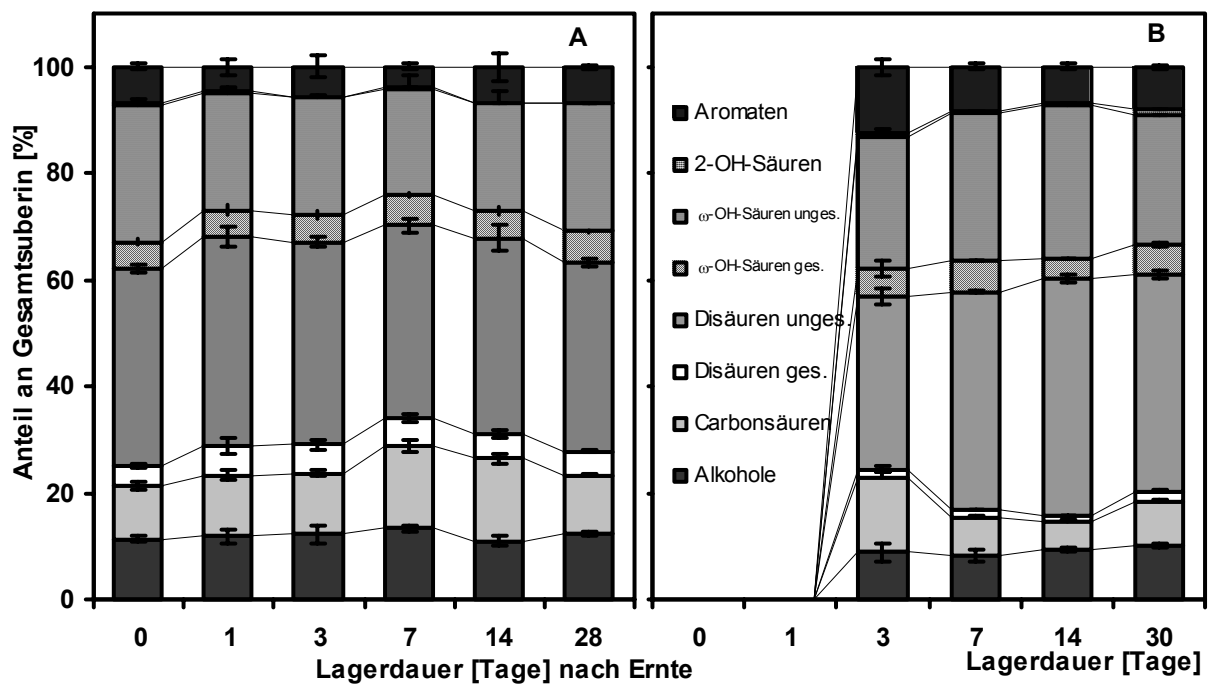


Abb. 8.21: Substanzklassenverteilung im Suberin von natürlichem Periderm (50% RH) und Wundperiderm (100% RH), Angaben in Prozent vom Gesamtsuberinmonomerengehalt der nachgewiesenen Stoffmenge an Suberin, (Fehlerbalken = StabWN).

Die Monomerenzusammensetzung des Wundperiderms war ähnlich der des natürlichen Periderms, jedoch ließ sich ein abnehmender Gehalt an Monocarbonsäuren (14% auf 5-8%) vom dritten zum 30. Tag feststellen (Abb. 8.21 B). Eine Zunahme des Gehalts an ungesättigten Disäuren vom dritten zum siebten Tag von 33% auf 41% war ebenfalls

auffällig. Der Aromatengehalt nahm geringfügig ab, von 13% auf 8%. Gesättigte Disäuren und ω -Hydroxysäuren waren zu 1-3% bzw. zu 4-6% vertreten, 2-OH-Säuren in Spuren bis 1% vom Gesamtsuberingehalt.

8.4.1.2 Kettenlängenverteilung

Die Mittelwerte der mittleren Kettenlängen aller Substanzklassen von Wund- und natürlichem Periderm zeigten, mit Ausnahme eines Unterschiedes von 0.9 C-Atomen bei den ältesten untersuchten Peridermen, keine signifikanten Abweichungen (Abb. 8.22). Bei natürlichen Peridermen konnte ein Anstieg der Kettenlänge vom Erntetag (19.7 C-Atome) zum 28. Tag (20.1 C-Atome) um 0.4 C-Atome, also um 2% festgestellt werden. Bei Wundperidermen betrug der Zuwachs der mittleren Kettenlänge vom dritten (19.5 C-Atome) zum 30. Tag (21.0 C-Atome) 1.5 C-Atome, somit 8%.

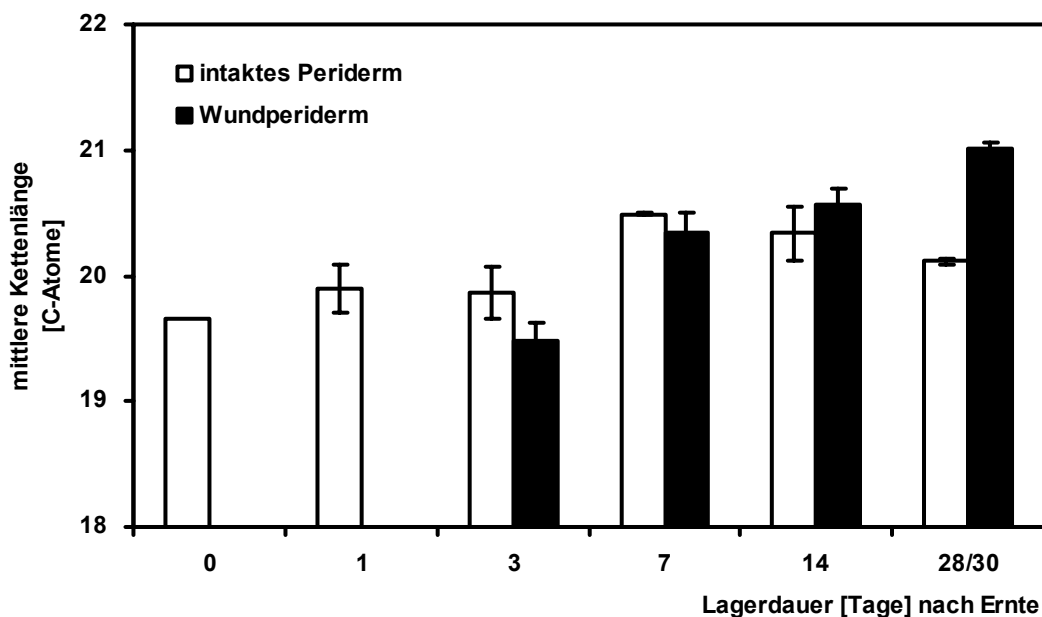


Abb. 8.22: Mittlere Kettenlängenverteilung in der Gesamt-Stoffmenge des Suberins von natürlichem und Wundperiderm (Fehlerbalken = StabWN).

Die Auftragung der mittleren Kettenlängen nach Substanzklassen zeigte, dass sich die Kettenlängen des Suberins bei natürlichen Peridermen kaum verändern (Abb. 8.23 A). Die längsten Ketten konnten bei den Monocarbonsäuren festgestellt werden (24.6-25.9). Mit 23.1-23.9 Kohlenstoffatomen erreichten die Alkohole Werte die nur knapp über denen der ω -Hydroxysäuren (22.3-23.3) lagen. Bei den gesättigten Disäuren nahmen die Kettenlängen von 19.5 auf 20.1 C-Atome zu und die mittlere Kettenlänge der 2-Hydroxysäuren nahm von 19.1 auf 18.0 sogar etwas ab, aber mit einer aufgrund der kleinen Substanzmengen sehr hohen Variabilität. Ungesättigte ω -Hydroxysäuren und Disäuren wurden ausschließlich mit 18

Kohlenstoffatomen in der Kette gefunden und sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Abb. 8.23 aufgeführt.

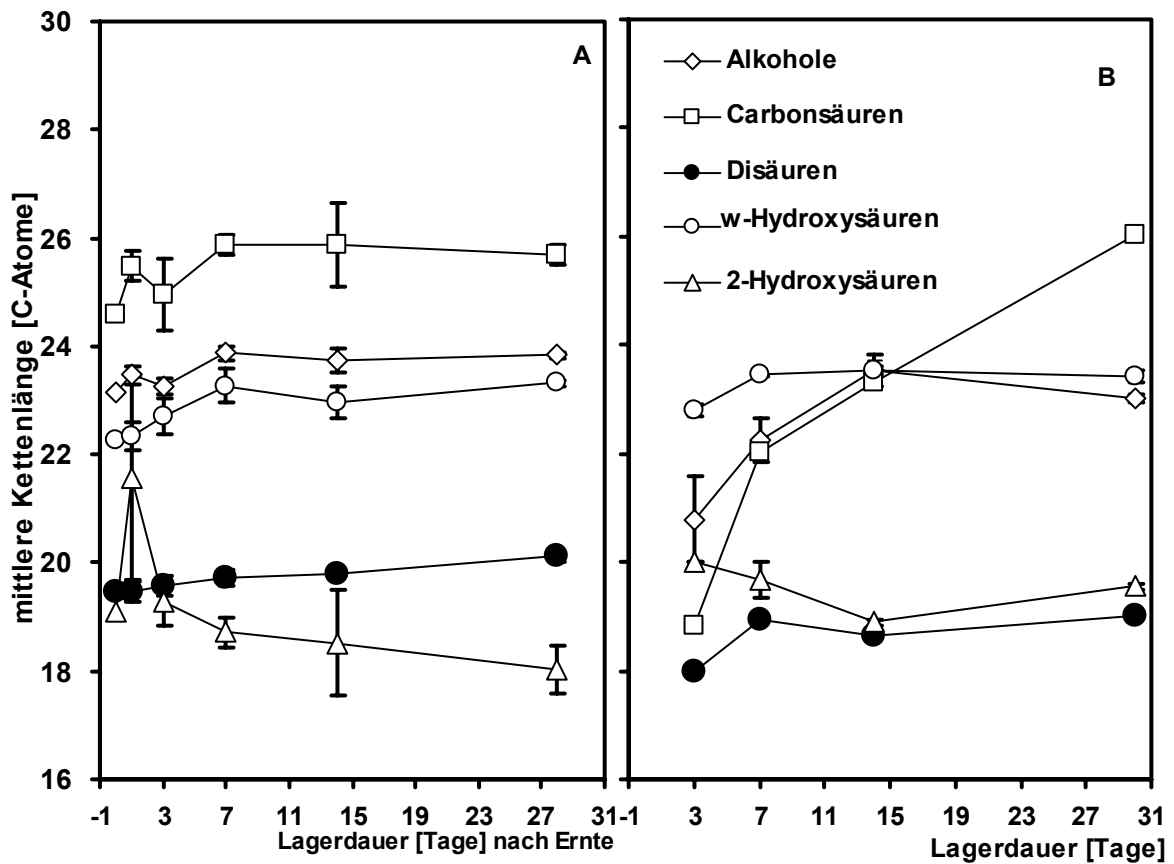


Abb. 8.23: Mittlere Kettenlängen der Substanzklassen im Suberin von **A** natürlichem Periderm (50% RH) und **B** Wundperiderm (Fehlerbalken = StabWN).

Die mittleren Kettenlängen der einzelnen Substanzklassen im Suberin von Wundperidermen stiegen bei Monocarbonsäuren und Alkoholen mit zunehmendem Alter (Abb. 8.23 **B**). Monocarbonsäuren mit zunächst im Mittel 18.8 C-Atomen, verlängerten sich nach 30 Tagen um 7.2 Methyleneinheiten auf eine mittlere Kettenlänge von 26.0 Kohlenstoffatomen (38%). Die Kettenlängen der Alkohole nahmen von durchschnittlich 20.8 um 2.2 auf 23.0 C-Atome zu (11%). Bei Disäuren, ω -Hydroxysäuren und 2-Hydroxysäuren konnten keine substantiellen Änderungen mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Die mittleren Kettenlängen der ω -Hydroxysäuren befanden sich mit 22.8-23.5 C-Atomen auf dem Niveau des natürlichen Periderms, ebenso 2-Hydroxysäuren. Disäuren dagegen hatten mit 18.0-19.0 C-Atomen im Mittel deutlich kürzere Ketten als in natürlichen Peridermen.

8.4.1.3 Konnektivität im Suberin

Zur Bewertung der Konnektivität des Suberins unterschiedlicher Periderme wurde die Anzahl freier Carboxygruppen im Polymer bestimmt. Diese ergibt sich aus der Differenz von

Hydroxy- mit Säuregruppen. Im Mittel 68.5% (StabWN = 1.6%) der vorhandenen Carboxygruppen im natürlichen Kartoffelsuberin waren nicht mit im Suberin als Monomer detektierten Molekülen verestert. Bei Wundperidermen konnte ein Mittelwert von 66.6% (StabWN = 2.8%) festgestellt werden. Bei beiden Peridermartentypen konnte keine Abhängigkeit von der Lagerdauer festgestellt werden, die Daten waren für alle Zeitpunkte annähernd gleich.

8.5 Unterschiede im Wachs und Suberingehalt bei Lagerung in unterschiedlicher Raumluftfeuchte

Um unterschiedlichen Wasserstress für die Kartoffelknollen zu simulieren, wurden sie bei Lagerluftfeuchten von 0%, 50% und 100% relativer Feuchte aufbewahrt. Die vereinigten Lösungsmittelextrakte von jeweils vier Peridermen mit 14 mm Durchmesser wurden für die Analysen der bei 0% und 100% Luftfeuchte gelagerten Kartoffeln verwendet. Die dargestellten Werte repräsentieren daher den Durchschnittswert von 4 extrahierten Peridermen. Bei den in 50% Luftfeuchte Umgebung gelagerten Kartoffeln wurden die Peridermscheiben einzeln analysiert um eine Standardabweichung der Wachsbelegung aus den Analysenergebnissen dreier Einzelperidermscheiben zu berechnen.

8.5.1 Wachsgehalt

Der Gesamtwachsgehalt der Periderme stieg bei 0% Luftfeuchte von 67.2 nmol cm⁻² innerhalb von 28 Tagen mit einem Faktor von 1.9 auf den insgesamt höchsten Wert von 128 nmol cm⁻² (Abb. 8.24). Der stärksten Anstieg der Stoffmenge an extrahierbaren Substanzen um dem Faktor 4.2 ließ sich bei 50% Luftfeuchte feststellen (22.6 auf 94.2 nmol cm⁻²). Allerdings handelte es sich hier um eine zu einem anderen Zeitpunkt geerntete Charge, trotzdem ähneln sich die Verläufe der Regressionsgraden der 0% und 50% Charge, sodass die Werte vergleichbar bleiben (Abb. 8.24). Beide Kurven bilden eine charakteristische Sättigungskurve mit der größten Steigung innerhalb der ersten 7 Tage.

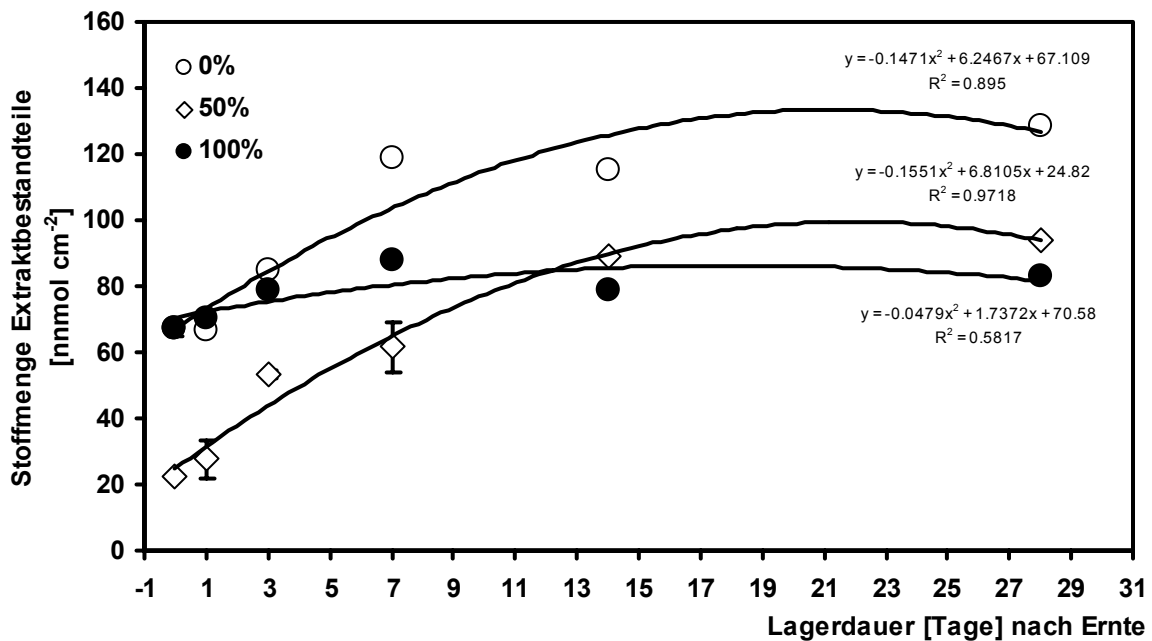


Abb. 8.24: Gesamtextaktmengen (Aromaten und Aliphaten) in Kartoffelperidermen, gelagert bei 0%, 50%, 100% RH, nmol cm⁻², 50% RH andere Charge (Erntedatum) (Fehlerbalken= StabWN).

Von den bei 100% Luftfeuchte gelagerten Peridermen konnten die geringsten Steigerungen im Extraktgehalt festgestellt werden, von 67.2 nmol cm⁻² stieg die extrahierte Wachsmenge nach 28 Tagen nur auf 82.8 nmol cm⁻² (Faktor 1.2).

Zur Verdeutlichung der Unterschiede wurde für jede Gruppe die Zuwachsrate in Prozent pro Messzeitpunkt ermittelt und in Abb. 8.25 aufgetragen.

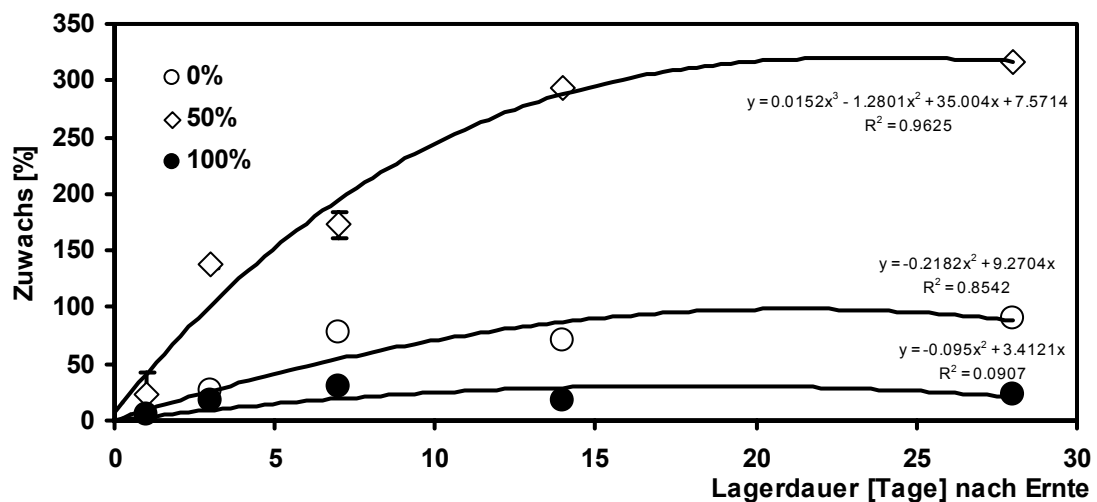


Abb. 8.25: Zuwachs an Gesamtwachsextrakt bei Lagerung von Kartoffeln in 0%, 50% oder 100% RH; Angaben in Prozent Zuwachs (Fehlerbalken = StabWN).

Die mit Abstand höchsten Zuwächse an extrahierbarem Material konnten für die, bei 50% Luftfeuchte gelagerten Periderme ermittelt werden, die Werte für die bei 100% Luftfeuchte gelagerten Kartoffelperiderme lagen weit unter 50%.

8.5.2 Extraktzusammensetzung

Vergleich man die Extraktzusammensetzung der bei verschiedenen Luftfeuchten angezogenen natürlichen Kartoffelperidermen nach ihrem Anteil an aliphatischen und aromatischen Komponenten inklusive der Ferulasäureester, so konnte kein Einfluss der Lagerbedingungen auf den Aromaten und Ferulasäureesteranteil festgestellt werden (Abb. 8.26). Anteilsmäßig repräsentieren die Aromaten etwa 1/3 der Extraktmenge (24-39%) bei allen drei Luftfeuchte-Gruppen.

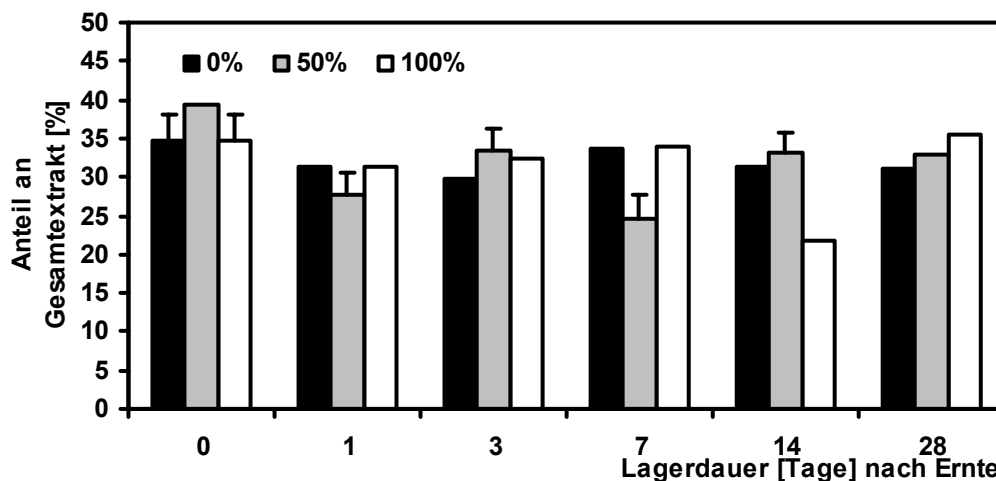


Abb. 8.26: Anteil der Aromaten am Gesamtextrakt bei natürlichen unter verschiedenen Luftfeuchten gelagerten Kartoffelperidermen; Angaben in Prozent Gesamtwachs (Fehlerbalken: StabWN).

Bei sieben und bei 14 Tage gelagerten Peridermen ergaben sich bei 50% und 100% Luftfeuchte-Peridermen geringfügige Abweichungen von etwa 10% nach unten. Ein sichtbarer Trend im Aromatenanteil ließ sich nicht feststellen.

8.5.2.1 Substanzklassenverteilung

Im Unterschied zu den schon unter 8.4 behandelten 50%-Luftfeuchte Periderme, enthielten die bei 0% und die bei 100% Luftfeuchte angezogenen Periderme in allen Altersklassen prozentual weniger Alkane, aber einen erhöhten Anteil an Alkoholen (Abb. 8.27).

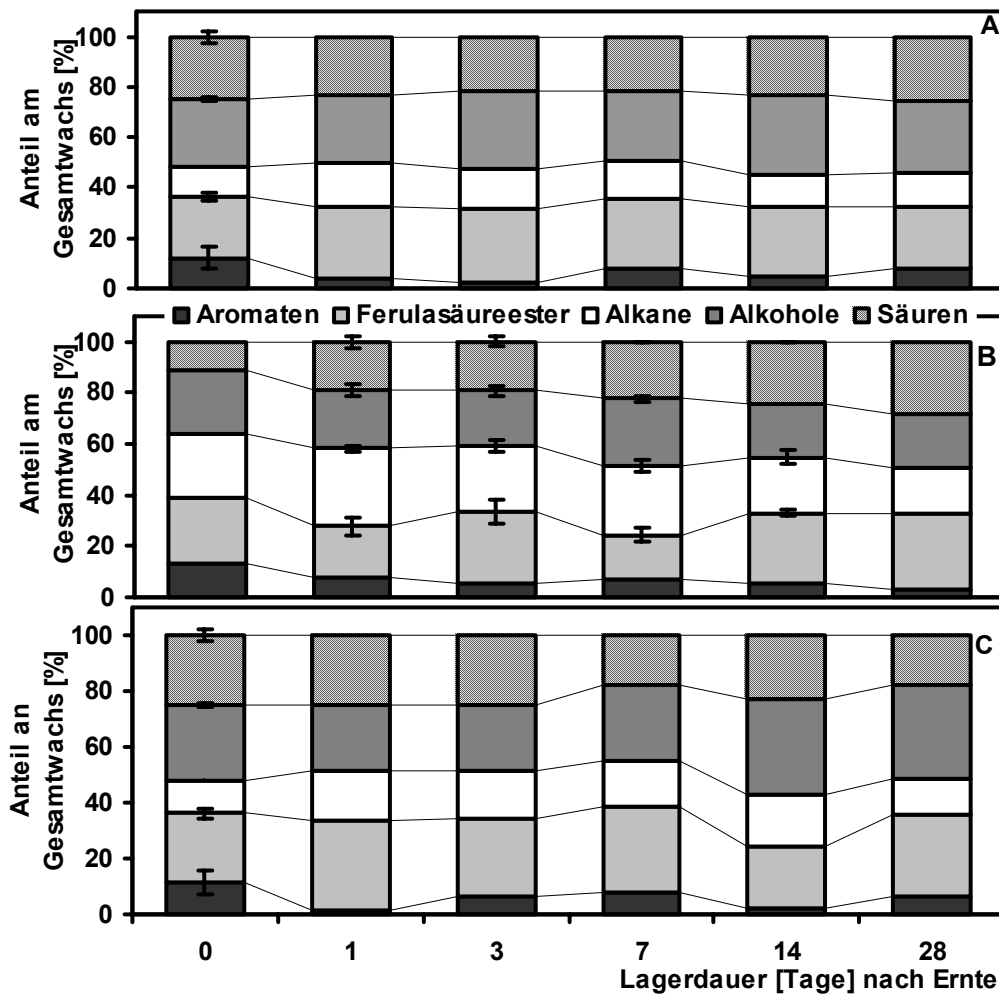


Abb. 8.27: Anteil einzelner Substanzklassen am Gesamtwachs in Kartoffelperiderm angezogen bei **A** 0%, **B** 50%, **C** 100% RH (Fehlerbalken = StabWN).

Kartoffelperiderme, welche bei 0% Luftfeuchte gelagert wurden, zeigten mit zunehmender Lagerdauer keine signifikanten Schwankungen in der Wachs zusammensetzung. Bei 50% Luftfeuchte gelagerten Peridermen konnte eine Zunahme des Säureanteils (10% auf 28%) und eine Abnahme des Alkananteils (24% auf 17%) mit fortschreitender Lagerzeit korreliert werden. Allerdings betrug der Alkangehalt im Mittel das Doppelte der beiden anderen Gruppen. Signifikant war auch ein abfallender Aromatengehalt (ohne Ferulasäureester) von 13% auf 3%. Bei 100% Luftfeuchte gelagerte Kartoffelperiderme enthielten weniger Säuren, der Säureanteil sank von 25% auf 18% ab, der Alkoholgehalt dagegen stieg von 27 auf 33%.

8.5.2.2 Kettenlängenverteilung der Wachse

Die mittleren Kettenlängen aller Substanzklassen der extrahierten Wachse ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 8.28). Die Kettenlängen stiegen mit zunehmender Lagerdauer nur wenig (von 25 (0%,100%); (50% = 24.1) auf max. 26.0 C-Atome).

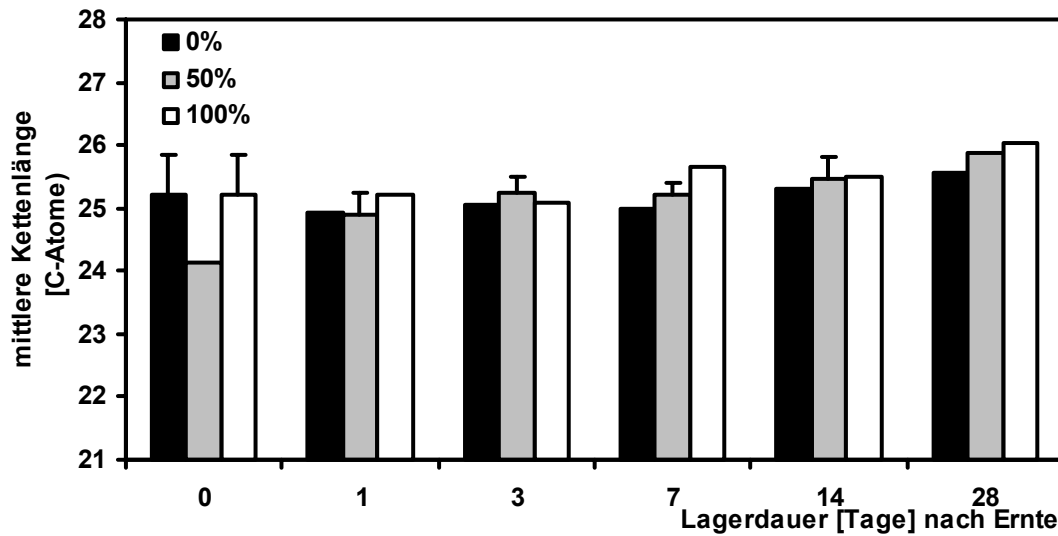


Abb. 8.28: Mittlere Kettenlänge der Extraktbestandteile von bei unterschiedlicher Luftfeuchte gelagerter Kartoffelperiderme; (Fehlerbalken = StabWN).

Bei der Auftragung der mittleren Kettenlänge der einzelnen Substanzklassen nach der Lagerdauer ließ sich ein Anstieg der Kettenlänge von Monocarbonsäuren bei der 50% Gruppe von 18.8 auf 24.1 und bei der 100% Gruppe von 21.7 auf 24.9 Kohlenstoffatome feststellen. Den schwächsten Anstieg konnte man von 21.7 auf 22.9 bei den bei 0% Luftfeuchte gelagerten Peridermen beobachten. Die Kettenlängen der Alkohole mit durchschnittlich 28 C-Atomen war bei allen Gruppen und Lagerzeiten ähnlich, Ferulasäureester waren im Durchschnitt 27 C-Atome lang, mit Ausnahme der bei 100% RH gelagerten Peridermen, wo der Durchschnitt ca. 28 C-Atome betrug. Alkane maßen 23.5 bis 24.0 Kohlenstoffeinheiten bei allen Lagerbedingungen und es konnten keine Änderungen im zeitlichen Verlauf festgestellt werden (Abb. 8.29)

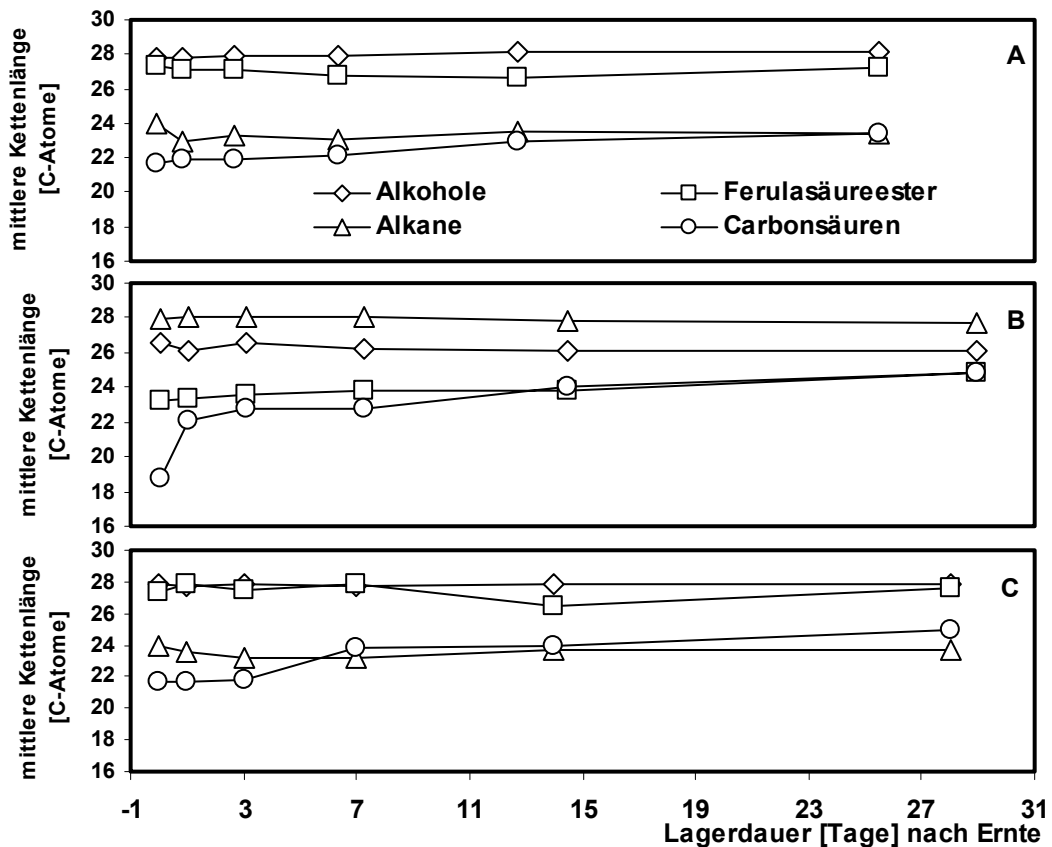


Abb. 8.29: Mittlere Kettenlänge der Substanzklassen in Extrakten von bei unterschiedlicher Luftfeuchte gelagerten Kartoffelperidermen. **A** 0% Luftfeuchte; **B** 50% Luftfeuchte; **C** 100% Luftfeuchte. (Mischproben aus Extraktion von 4 Peridermen gleichzeitig).

Die Kettenlängenverteilung der Ferulasäureester (Abb. 8.30) zeigte bei den bei 0% Luftfeuchte gelagerten Peridermen eine Bevorzugung der Kettenlänge 28 am ersten Tag mit 27% von der Gesamtstoffmenge der Ferulasäureester. Bis zum 28. Tag fiel der Gehalt an C_{28} auf 21% und C_{29} von 11% auf 5%, jedoch stieg der Anteil an C_{30} von 25% auf 33%. C_{31} und C_{32} wurden ebenfalls vermehrt eingebaut (Abb. 8.30 **A**). Bei den bei 50% Luftfeuchte gelagerten Peridermen konnte eine ähnliche Entwicklung festgestellt werden, jedoch konnte bei C_{31} und C_{32} keine Zunahme registriert werden, hier nahmen die Ferulasäureester mit 16 und mit 26 C-Atomen im Alkoholrest sichtbar zu (Abb. 8.30 **B**). Abweichend von den anderen Gruppen, konnte bei der 100% Luftfeuchte-Gruppe, keine starke Veränderung in den Anteilen von C_{28} und C_{30} beobachtet werden. Der Anteil an C_{30} war jedoch von Anfang sehr hoch (39%). C_{31} und C_{32} werden nach 28 Tagen in geringeren Anteilen vorgefunden, Allerdings stieg der Gehalt an C_{19} und C_{23} stark an (Abb. 8.30 **C**).

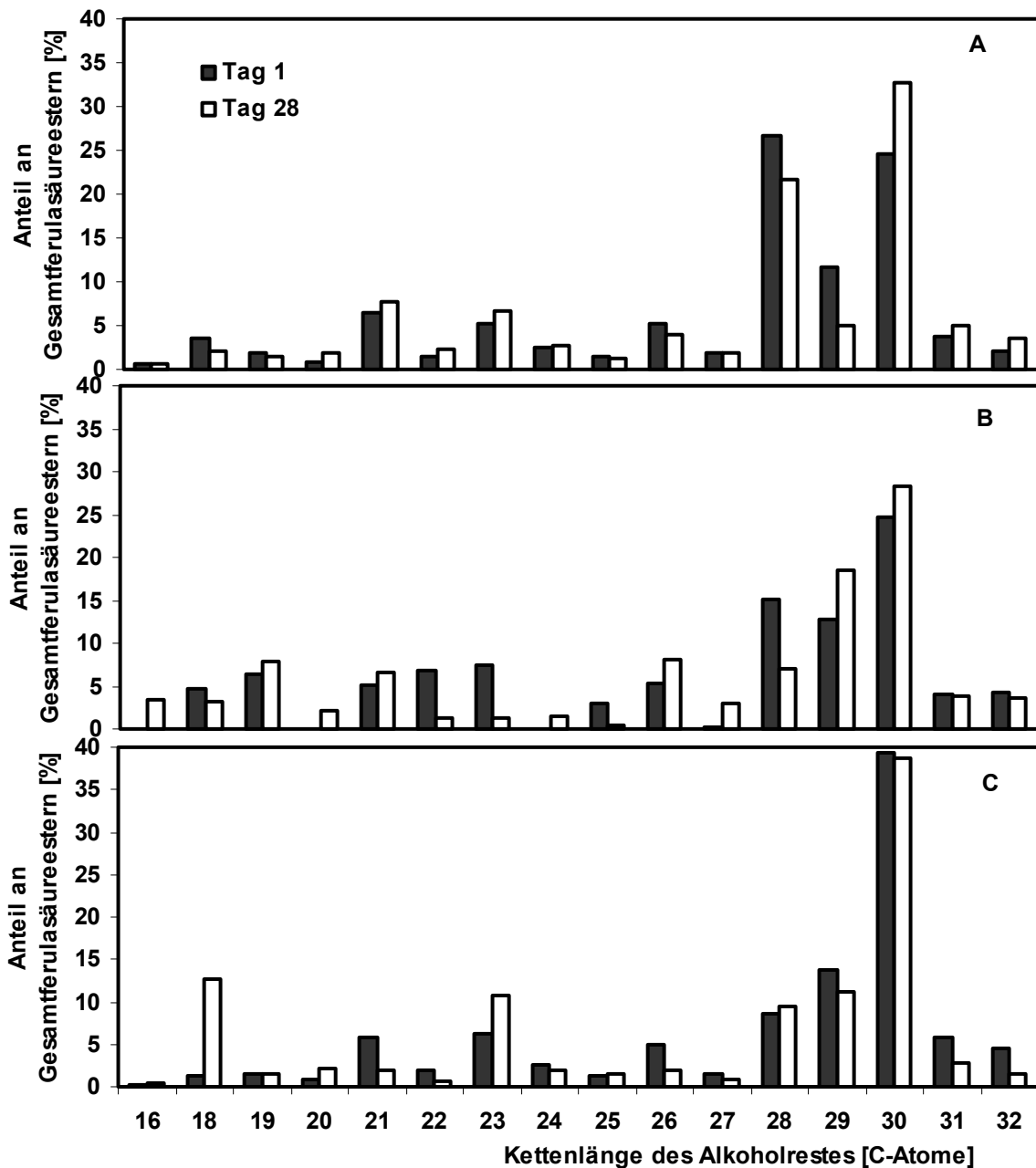


Abb. 8.30: Kettenlängenverteilung der Ferulasäureester, Vergleich von Tag 1 und Tag 28, A 0% Luftfeuchte; B 50% Luftfeuchte; C 100% Luftfeuchte. (Mischproben aus Extraktion von 4 Peridermen gleichzeitig).

8.5.3 Suberin in Kartoffelperidermen unterschiedlicher Lagerungsluftfeuchte

Die Ermittlung des Suberingehaltes der unterschiedlich gelagerten Kartoffelperiderme ergab keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander (Abb. 8.31). Alle drei Gruppen zeigten im Mittel die gleichen Zuwächse an Suberin mit fortschreitender Lagerdauer von etwa 300 nmol cm^{-2} nach der Ernte, auf maximal 597 nmol cm^{-2} nach 28 Tagen. Durch die große

Streuung des Maximalwertes von bei 0% gelagerten Peridermen liegen die Werte der bei 100% Luftfeuchte gelagerte Peridermen von maximal 468 nmol cm⁻² nach 28 Tagen noch innerhalb des Fehlerbereiches der den bei 0% Luftfeuchte gelagerten Peridermen.

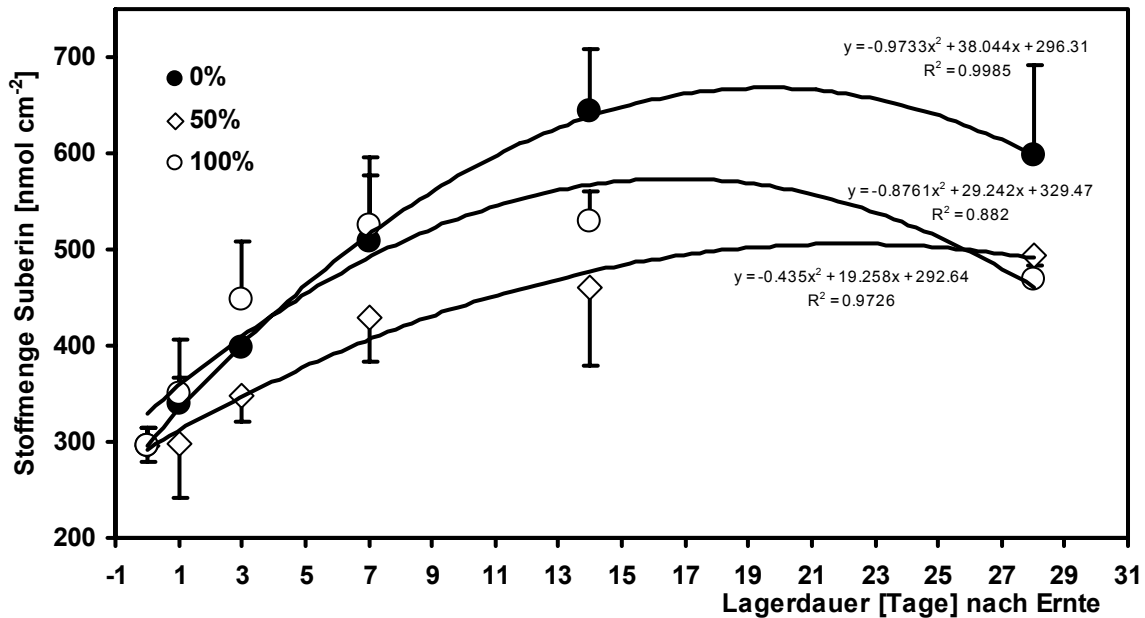


Abb. 8.31: Stoffmenge Gesamtsuberin in natürlichen Kartoffelperidermen gelagert bei verschiedenen Luftfeuchten (Fehlerbalken = StabWN)

8.5.3.1 Substanzklassenverteilung im Suberin

Das Suberin von natürlichem, bei unterschiedlicher Luftfeuchte gelagertem Kartoffelperiderm unterschied sich in der Zusammensetzung der Monomeren der einzelnen Substanzklassen nur unwesentlich. Alle drei Gruppen enthielten zu 35-40% die ungesättigte C₁₈-Disäure, und zu 20-25% die C₁₈- ω -Hydroxysäure. Zu 11-13% waren Alkohole enthalten. Monocarbonsäuren konnten in den Analysen mit 9-15% Gehalt am Gesamtsuberin festgestellt werden. Mit 4-7% waren die homologen Disäuren enthalten und zu 5-8% die ω -Hydroxysäuren. Spuren von unter 0.5% an 2-Hydroxysäuren konnten ermittelt werden und der Aromatenanteil lag im Mittel bei 4-7% (Abb. 8.32)

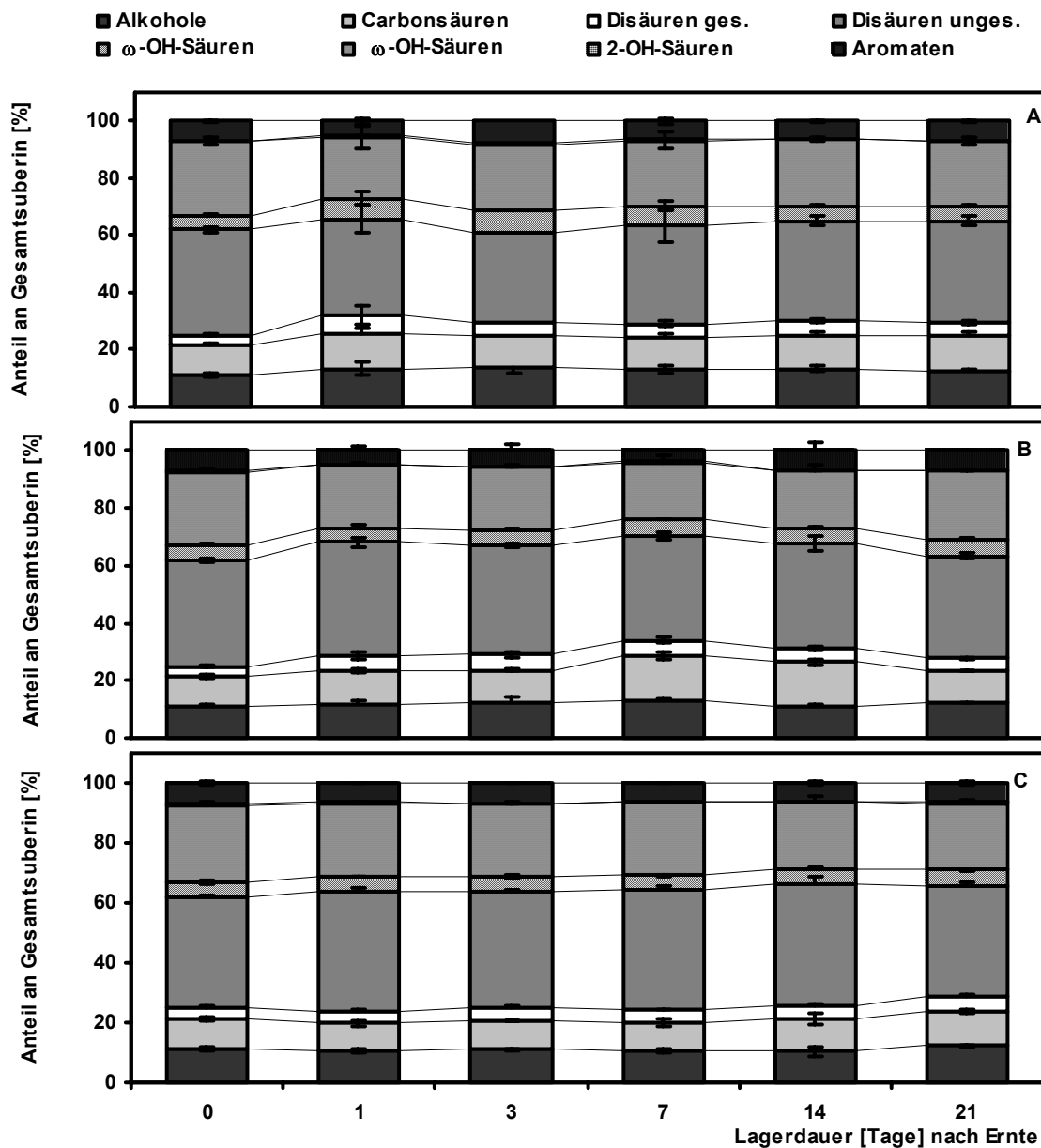


Abb. 8.32: Substanzklassenverteilung im Suberin von natürlichem Kartoffelperiderm, gelagert bei verschiedenen Luftfeuchten. **A** 0% RH; **B** 50% relat. Luftfeuchte; **C** 100% RH; Angaben in % vom Gesamtsuberin; (Fehlerbalken = StabWN).

8.5.3.2 Kettenlängenverteilung im Suberin

Die mittlere Kettenlänge aller Substanzklassen im Suberin des Kartoffelperiderms betrug 19.7 Kohlenstoffeinheiten am Tag der Ernte und 20.1 Kohlenstoffeinheiten nach 28 Tagen Lagerzeit. Diese Werte konnten bei allen drei Luftfeuchte-Gruppen ermittelt werden (Abb. 8.33). Während der Lagerperiode kam es nur zu geringen Abweichungen unter den drei Luftfeuchte Bedingungen, jedoch hatten diese keine signifikanten Auswirkungen auf die mittlere Kettenlänge am Ende des Experiments.

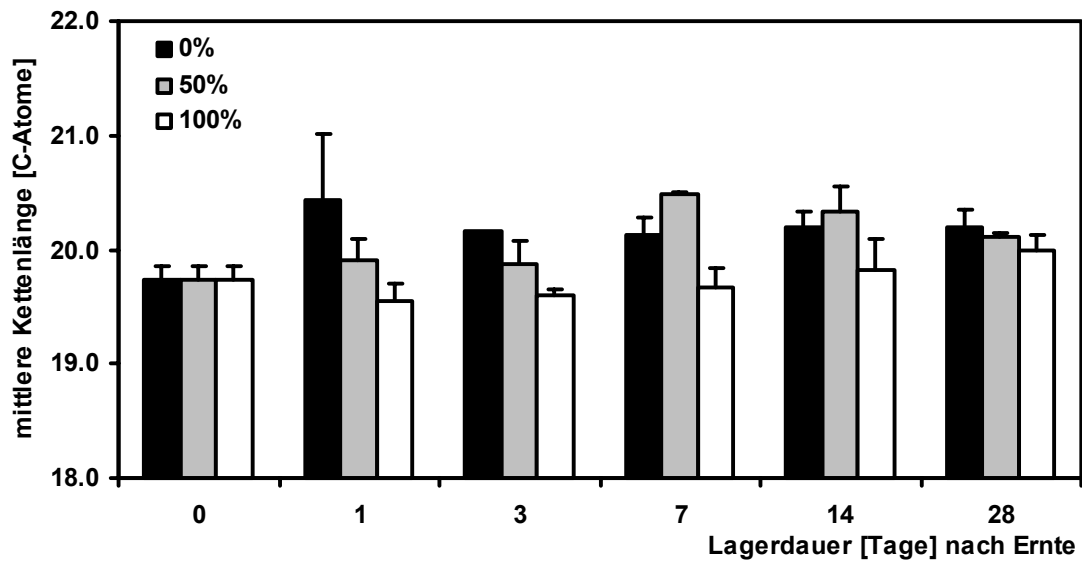


Abb. 8.33: Mittlere Kettenlängenverteilung der Summen aliphatischer Substanzen in natürlichen Kartoffelperidermsuberin nach Lagerung bei unterschiedlicher Luftfeuchte. (Fehlerbalken = StabWN).

Die Substanzklassenverteilung (Abb. 8.34) zeigte, dass der leichte Anstieg der Gesamtkettenlänge fast ausschließlich auf das Anwachsen der Kettenlängen in der Substanzklasse der Carbonsäuren zurückzuführen war. Bei 0% Luftfeuchte von 24.5 auf 25.8 C-Atome, bei 50% Luftfeuchte (Abb. 8.34) von 24.5 auf 25.7 und der schwächste Anstieg bei 100% Luftfeuchte-Lagerung von 24.5 auf 24.7 Kohlenstoffeinheiten im Mittel von jeweils drei untersuchten Peridermscheiben.

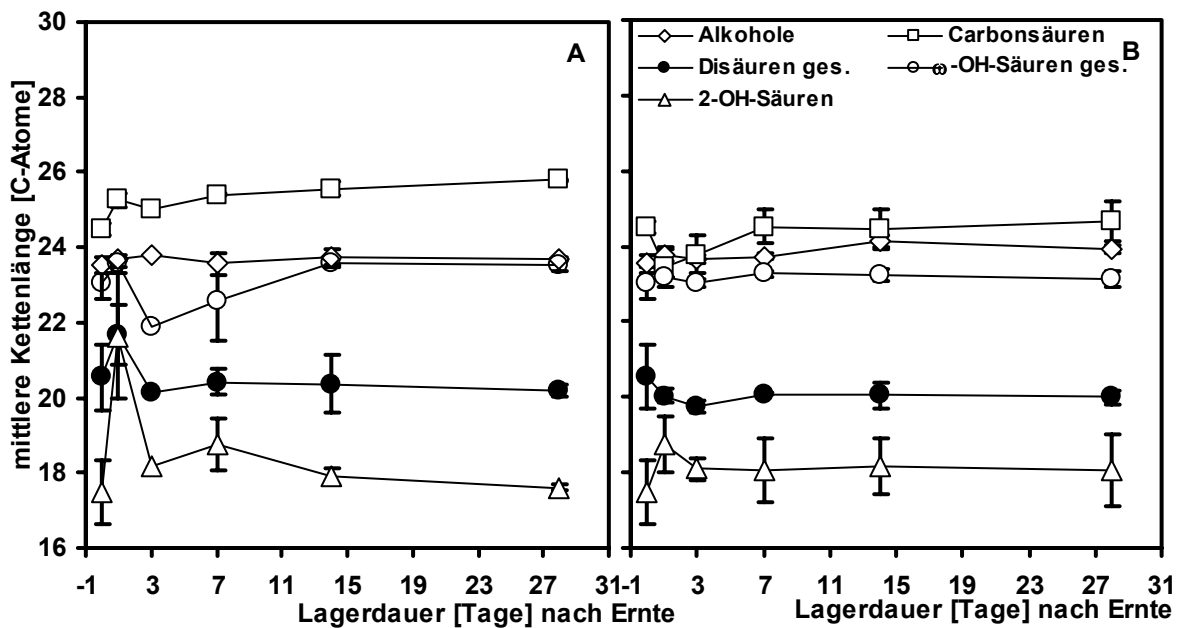


Abb. 8.34: Mittlere Kettenlängenverteilung in natürlichen Kartoffelperidermsuberin angezogen bei **A** 0% RH; **B** 100% RH. Daten für 50% Luftfeuchte siehe Abb. 8.23. (Fehlerbalken = StabWN).

8.5.3.3 Konnektivität im Suberin

Die Anzahl der nicht mit gleichfalls bestimmten Hydroxygruppen veresterten Carboxygruppen im Suberin konnte auf 60-71% ermittelt werden. Eine Abhängigkeit von der Lagerdauer konnte nicht festgestellt werden. Im Mittel die niedrigsten Werte ergaben sich für die bei 0% Luftfeuchte gelagerten Peridermen, hier wurden nie mehr als 67% freie Carboxygruppen gefunden. Den mit 68.5% durchschnittlich höchsten Wert erreichten die bei 100% Luftfeuchte gelagerten Peridermen, bei 50% RH gelagerte Kartoffelperiderme erreichten aber ebenfalls diesen Durchschnittswert.

8.6 Wundperiderm bei verschiedenen Luftfeuchten

In einem weiteren Ansatz wurde die Bildung von Wundperiderm bei verschiedenen Luftfeuchten verfolgt. Da durch Pilzbefall die Menge an brauchbaren Peridermen gering war, wurde keine zeitliche Entwicklung der Suberin- und Wachsanalysen vorgenommen. Die Peridermen wurden bei 45%, 73%, 90% und 100% RH gelagert und nach 21 Tagen enzymatisch isoliert.

8.6.1 Wachsgehalt

Die größte Menge an Wachsen wurde bei den geringsten Luftfeuchten gefunden. Bei 45% RH konnten bis zu 115 nmol cm⁻² Extraktbestandteile isoliert werden, bei 73% Luftfeuchte bis zu 114 nmol cm⁻². Bei 90% wurden nur noch maximal 88.2 nmol cm⁻² an Wachskomponenten gefunden und bei 100% Luftfeuchte maximal 63.5 nmol cm⁻² (Abb. 8.35).

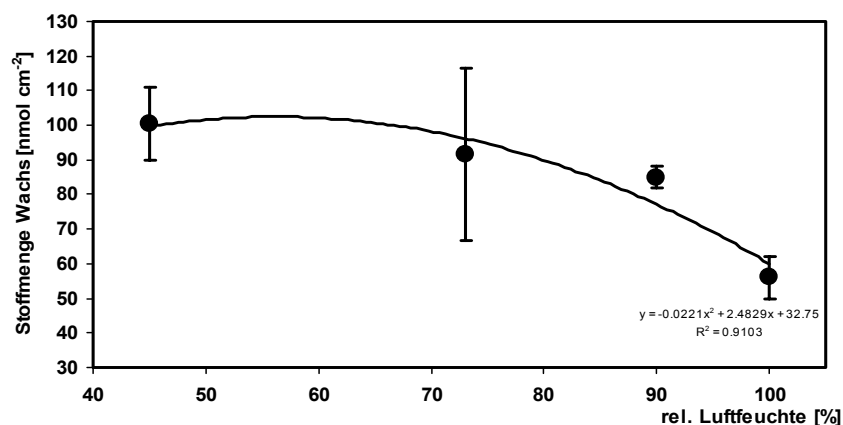


Abb. 8.35: Gesamtstoffmenge in Wundperidermextrakten nach Lagerung bei verschiedenen Luftfeuchten, Flächenbezug; Alter 21 Tage. (Fehlerbalken = StabWN).

8.6.2 Extraktzusammensetzung

Mit Ausnahme der bei 45% angezogenen Wundperiderme finden sich keine augenfälligen Unterschiede in der prozentualen Extraktzusammensetzung (Abb. 8.36). Das Wachs der Gruppen 73-100% besteht zu 10-15% aus Alkanen, 9% Alkoholen, 41-43% Monocarbonsäuren und zu 35-40% aus Ferulasäureestern. Der Anteil der Ferulasäureester ist beim 45% Wundperiderm auf über 50% erhöht, dagegen wurden mit 7% der geringste Alkananteil festgestellt. 35% Carbonsäuregehalt im bei 45% Luftfeuchte angezogenen Wundperiderm stellen ebenfalls den niedrigsten Wert aller Gruppen dar.

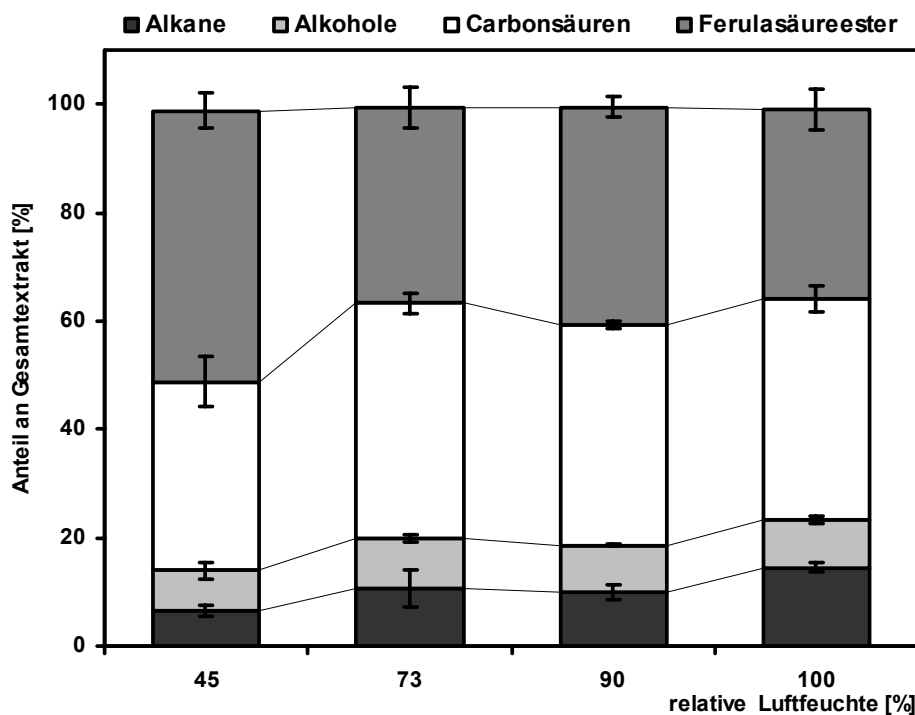


Abb. 8.36: Substanzklassenverteilung in Wundperiderm angezogen bei verschiedenen Luftfeuchten Alter: 21 Tage. (Fehlerbalken = StabWN)

Die Verteilung der mittleren Kettenlängen innerhalb der Substanzklassen zeigte die niedrigsten mittleren Kettenlängen bei den Carbonsäuren (21.5-23.7), und hier vor allem bei 45% und 100% Luftfeuchte-Anzucht (Abb. 8.37). Alkohole bildeten über alle Gruppen die längsten Ketten mit durchschnittlich 28 Kohlenstoffatomen. Ferulasäureester besaßen bei 45% die kürzesten Ketten, bei 100% Luftfeuchte bildeten sich die längsten Ketten (26.4 C-Atome). Die Kettenlängen der Alkane (23.3-23.6) und Alkohole (28.1-27.8) veränderten sich bei keiner Behandlung nennenswert.

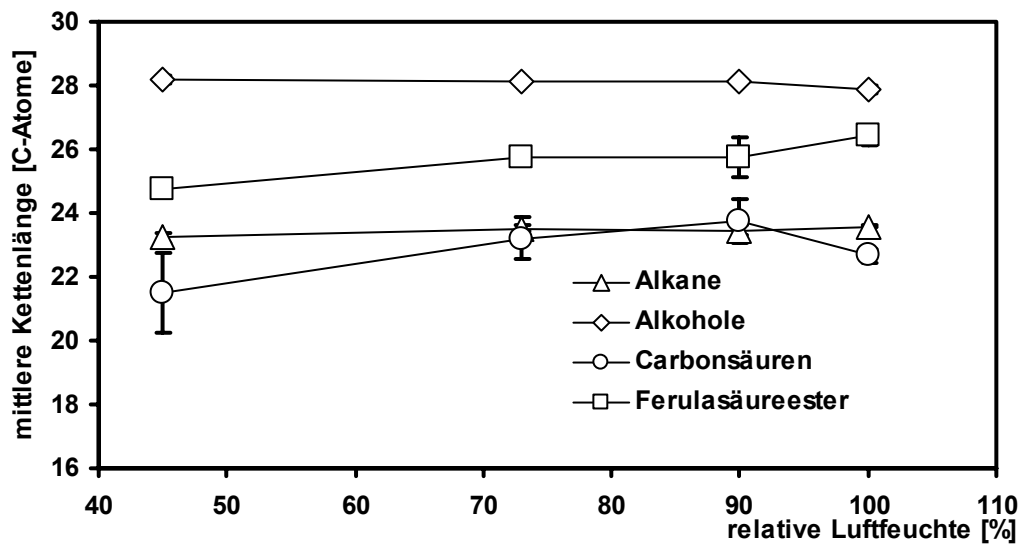


Abb. 8.37: Mittlere Kettenlängenverteilung der Substanzklassen in Kartoffelwundperidermen angezogen bei versch. Luftfeuchten, Alter 21 Tage. (Fehlerbalken = StabWN)

8.6.3 Suberin

Ähnlich dem Wachsgehalt konnten die größten Mengen Suberin in den trockeneren Anzuchten ermittelt werden. Allerdings auch bei 90% Luftfeuchte konnten mit im Mittel 455 nmol cm^{-2} ebenso hohe Mengen wie bei 45% Luftfeuchte-Anzucht (441 nmol cm^{-2}) nachgewiesen werden. Nur bei 100% Luftfeuchte angezogenes Periderm enthielt mit 297 nmol cm^{-2} die geringsten Suberinmengen (Abb. 8.38)

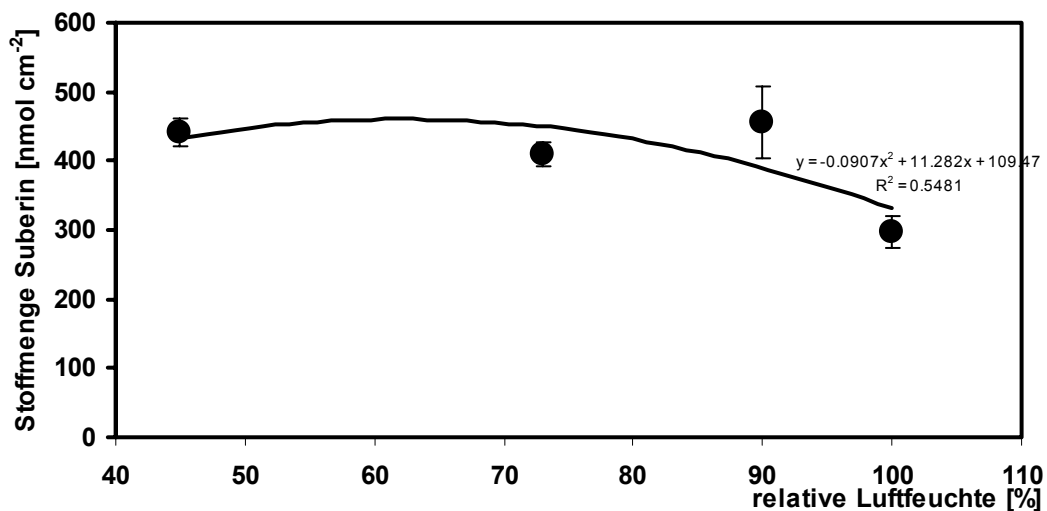


Abb. 8.38: Suberingehalt in Wundperiderm bei verschiedenen Anzuchtluftfeuchten, Alter 21 Tage. (Fehlerbalken = StabWN)

8.6.4 Suberinzusammensetzung

In der Substanzklassenverteilung des Suberins (Abb. 8.39) dominierte die ungesättigte Disäure (32-39%) und die ungesättigte ω -Hydroxysäure (18-21%). Gesättigte Disäuren nehmen von 5 auf 2% mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ab, ebenso die gesättigten homologen ω -Hydroxysäuren (8% auf 6%). Noch stärker reduziert sich der Anteil der Aromaten von 12 auf 7%. Der Alkoholgehalt bleibt bei allen Behandlungen auf ca. 11% und der Monocarbonsäuregehalt schwankt zwischen 12 (45% und 100% Luftfeuchte) und 16% (73% RH).

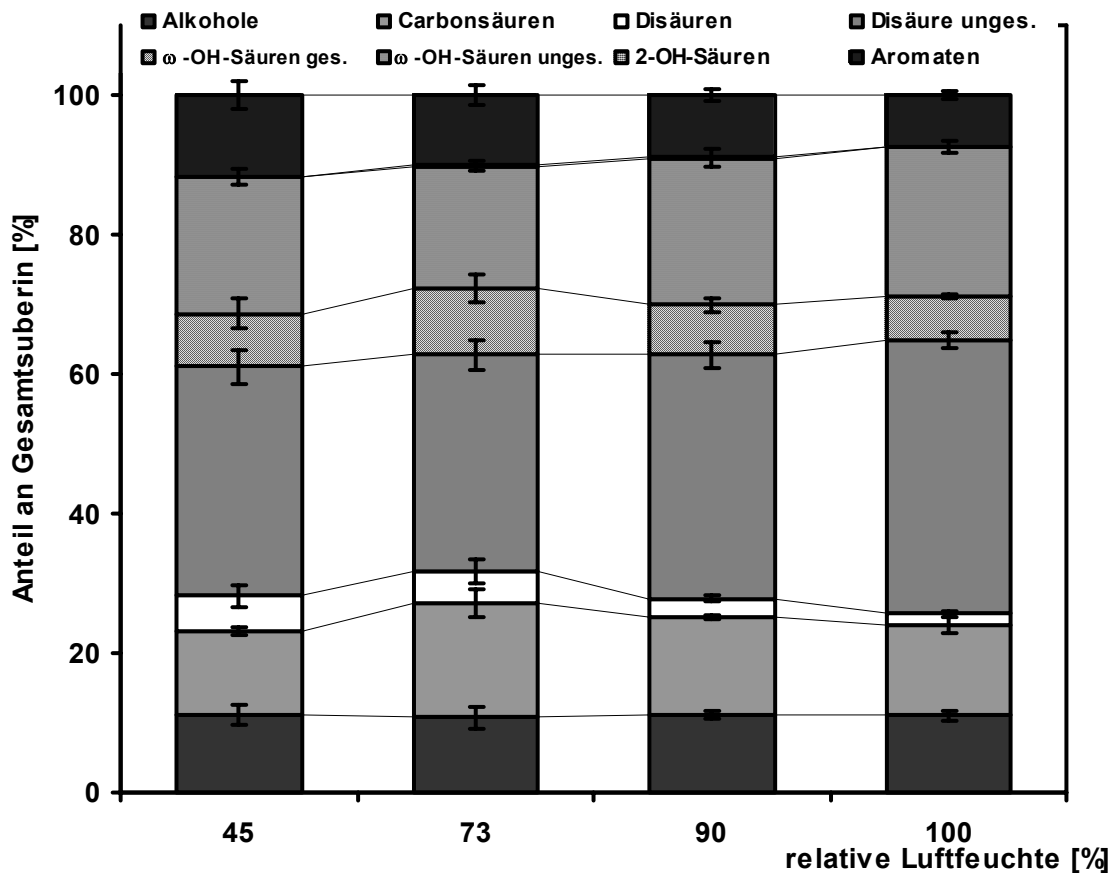


Abb. 8.39: Substanzklassenverteilung % von Gesamtsuberinmenge in Wundperidermsuberin, angezogen bei verschiedenen Luftfeuchten. Alter 21 Tage. (Fehlerbalken = StabWN)

Die Kettenlängen des Suberins erhöhten sich mit zunehmender Luftfeuchtigkeit um durchschnittlich 0.8 Kohlenstoffatome bei allen Substanzklassen (Abb. 8.39). Die höchsten mittleren Kettenlängen wurden bei den Monocarbonsäuren mit 25.5-26.8 C-Atomen und die niedrigsten mit 19.2-20.0 bei den Dicarbonsäuren festgestellt. Alkohole und ω -Hydroxysäuren zeigten etwa gleich lange Ketten, von 22.6-24.3 C-Atomen.

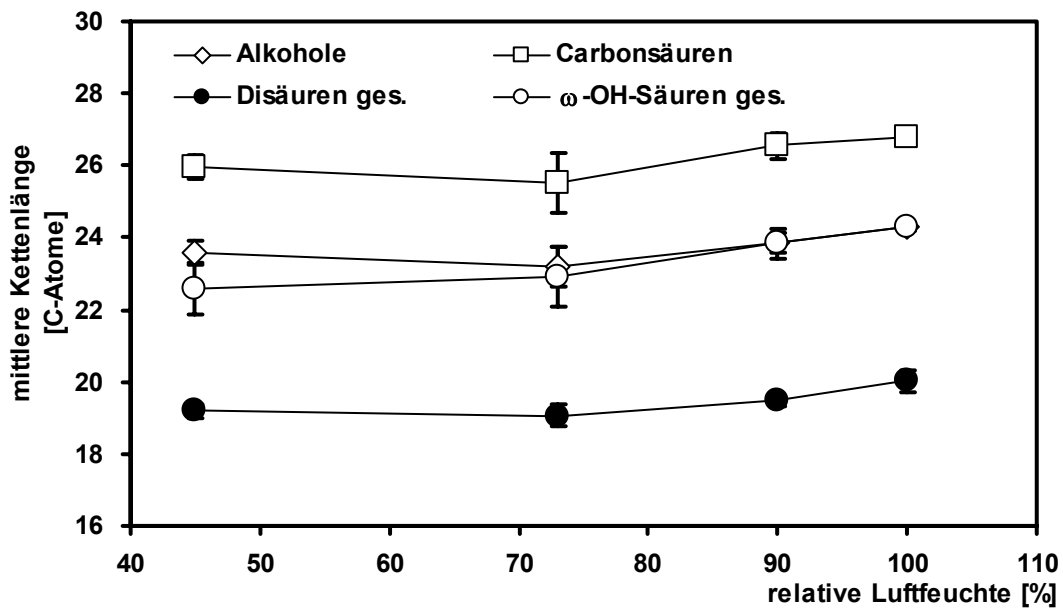


Abb. 8.40: Mittlere Kettenlängenverteilung der Substanzklassen in Kartoffelwundperiderm angezogen bei verschiedenen Luftfeuchten, Alter 21 Tage, 2-OH-Säuren wurden nicht einbezogen, da lediglich Kettenlänge 16 gefunden wurde, ebenso wurden die ungesättigte Di und ω-Hydroxysäure (mit C = 18 über alle Luftfeuchten) nicht einbezogen. (Fehlerbalken = StabWN)

8.7 Permeationsexperimente

Aufbauend auf den Arbeiten von VOGT *et al.* (1983) wurden von enzymatisch isolierten natürlichen und Wundperidermen verschiedener Lagerbedingungen mithilfe der Transpirationskammermethode die Leitwerte (P) von lentizellenfreien Bereichen der jeweiligen Membranen bei 25 °C und 0% Luftfeuchte ermittelt. Zusätzlich wurden die Leitwerte (P_{ex}) derselben mit MeOH/CHCl₃ extrahierten Peridermen ermittelt.

8.7.1 Natürliches Periderm

Die Leitwerte von natürlichen Peridermen unterschiedlicher Lagerluftfeuchten unterschieden sich untereinander kaum. Jedoch konnte eine negative Abhängigkeit der Leitwerte von der Lagerdauer der intakten Kartoffelknollen festgestellt werden (Abb. 8.41). Mit am Erntetag isolierten Peridermscheiben wurde ein mittlerer Leitwert P von $6.4 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ gemessen, nach 28 Tagen Lagerung betrug der Leitwert für Wasser nur noch $5.4 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$, was einem Effekt von 12 entspricht. Die Abnahme der Leitfähigkeit nach 28 Tagen konnte nach einem studentischen *t*-test ($p = 0.03$) ebenfalls als signifikant bestätigt werden.

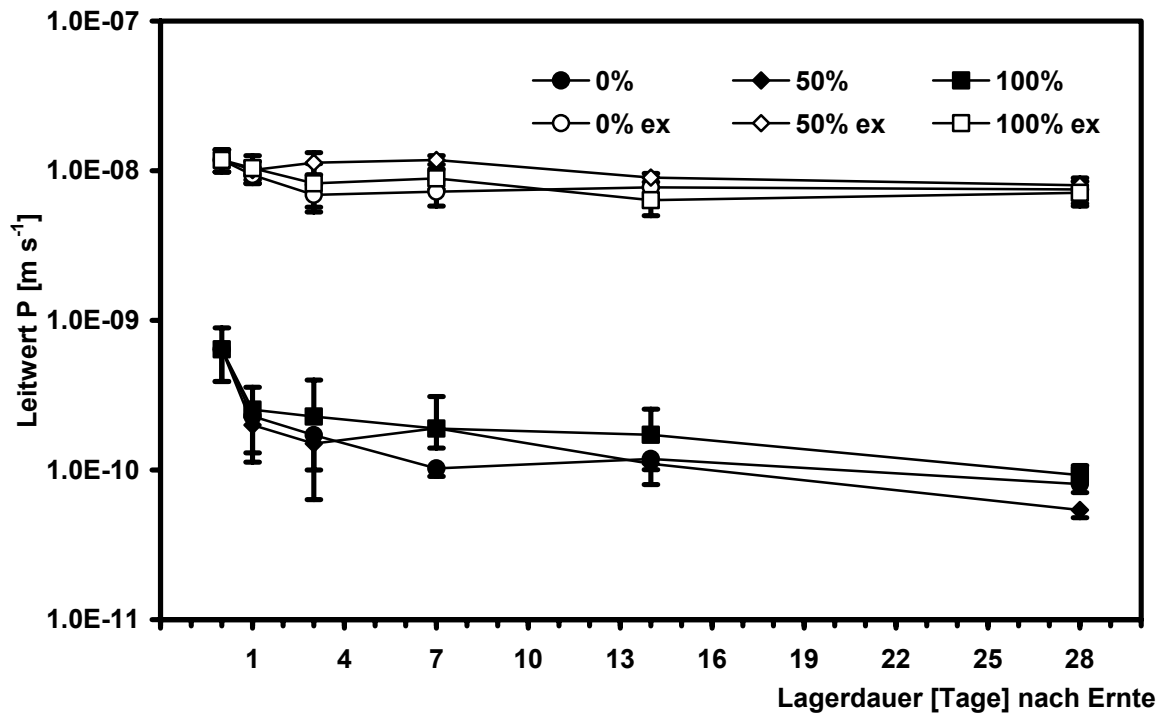


Abb. 8.41: Leitwerte in $P = \text{m s}^{-1}$ bei 0% Luftfeuchte und 25 °C von intakten und von mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ extrahierten natürlichen Peridermen, gelagert bei 0%, 50% und 100% Luftfeuchte. (Fehlerbalken = StabWN).

Die Ermittlung der Leitwerte (P_{ex}) derselben Periderme nach einer Extraktion mit $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ ergab um ein bis zwei Größenordnungen höhere Leitwerte (P_{ex}), als die der intakten Periderme. Es konnte kein Lagerungseffekt auf P_{ex} festgestellt werden. Periderme vom Erntetag unterschieden sich mit $1.18 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ nicht signifikant im Leitwert von denen gegen Ende der Lagerzeit $8.00 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$. Effekte der Lagerluftfeuchte konnten ebenfalls keine festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Lagerluftfeuchten waren in keinem Fall signifikant, dies kann man auch an der Verteilung der Extraktionseffekte (P_{ex}/P) sehen (Abb. 8.42). Alle isolierten Membranen zeigten deutlich lagerzeitabhängige Extraktionseffekte von 18 auf 148 ansteigend, jedoch keine signifikanten Unterschiede unter den drei Gruppen verschiedener Lagerluftfeuchte.

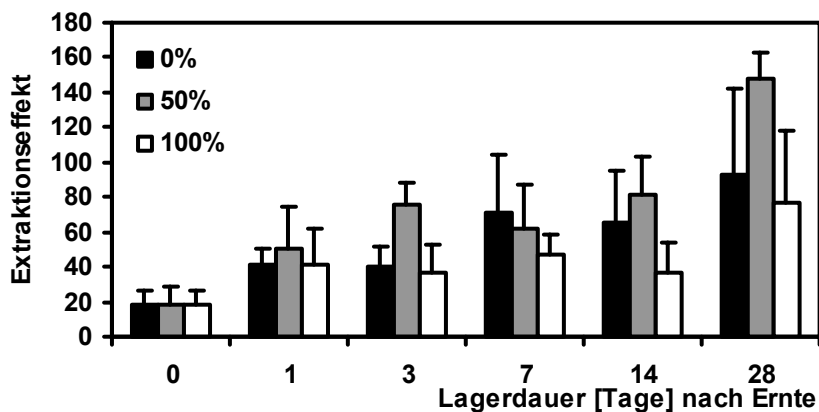


Abb. 8.42: Effekt der Lösungsmittelextraktion (P_{ex}/P) von natürlichem Kartoffelperiderm auf die Leitfähigkeit für Wasser bei 25 °C und 0% Luftfeuchte im Receiver. (Fehlerbalken = StabWN).

8.7.2 Leitwerte von Wundperiderm

Der Leitwerte von bei 100% Luftfeuchte angezogenem Wundperiderm betrug im Mittel $4.71 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ nach drei Tagen Lagerung, und sank auf $5.37 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ innerhalb weiterer 27 Tage ab (Faktor 8.7) (Abb. 8.43).

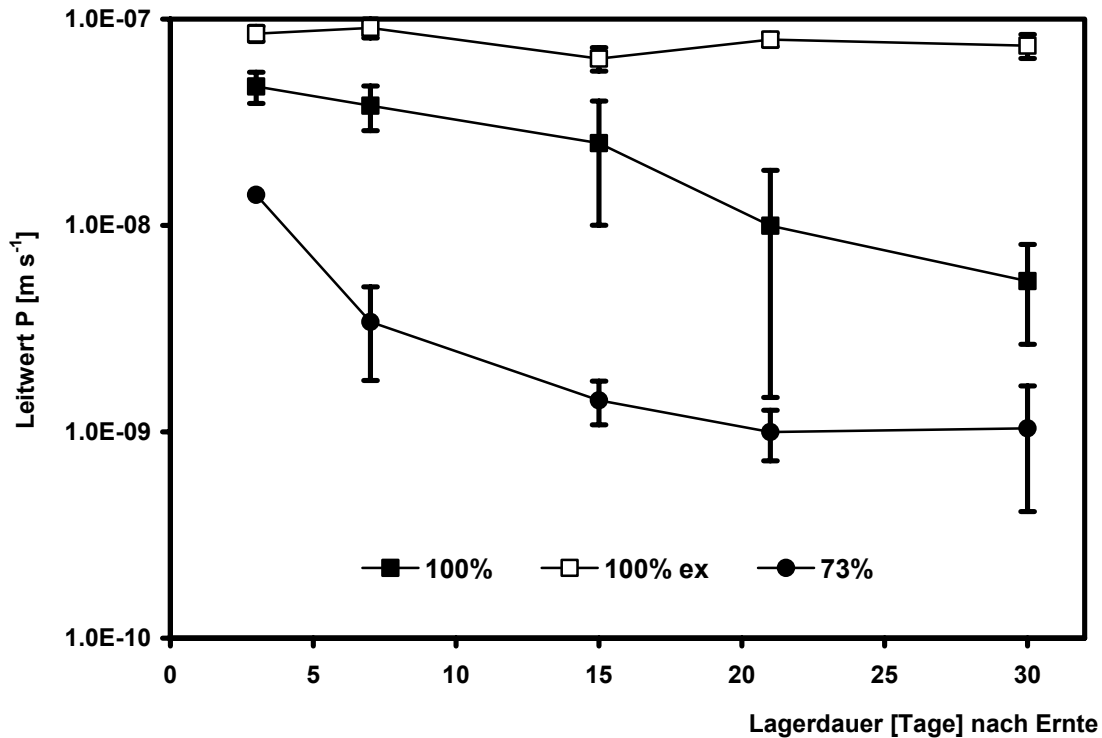


Abb. 8.43: Leitwerte P in m s^{-1} von intakten und extrahierten Wundperidermen bei 25 °C, logarithmische Skalierung; Wundperidermen angezogen bei 100% und 73% Luftfeuchte. (Fehlerbalken = StabWN)

Wurden die Periderme bei 73% Luftfeuchte angezogen, so erniedrigte sich der Leitwert von $P = 1.41 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ nach drei Tagen auf $1.04 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ nach 30 Tagen, was einem Faktor von 13.6 entspricht (Abb. 8.43).

Extrahierte, in 100% RH angezogenen Wundperiderme vom dritten Tag besaßen einen Leitwert von $P_{\text{ex}} = 8.51 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ bei 30 Tage alten fiel der Leitwert auf $P_{\text{ex}} = 7.44 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ (Faktor 1.14) (Abb. 8.44). Der Effekt der Lösungsmittelextraktion (P_{ex}/P) betrug in den ersten drei Messwerten 1.8 bis 2.6 und stieg nach 30 Tagen Lagerdauer auf einen signifikanten Faktor von 13.8 (Abb. 8.44).

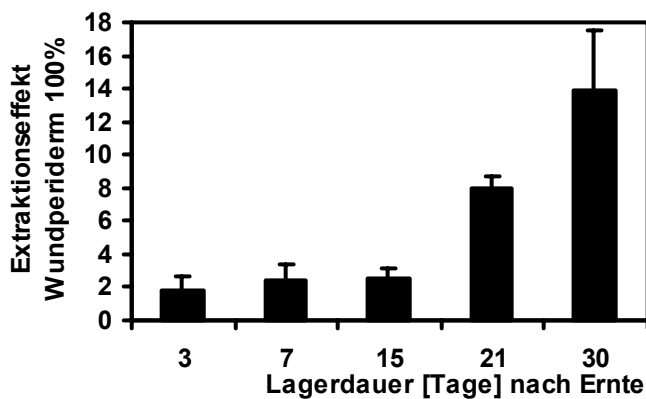


Abb. 8.44: Effekt der Lösungsmittelextraktion (P_{ex}/P) auf die Leitfähigkeit für Wasser durch Kartoffelwundperiderme angezogen bei 100% Luftfeuchte; (Fehlerbalken = StabWN).

8.7.2.1 Beeinflussung der Leitfähigkeit und der Peridermchemie durch die Wirkung des Elongasehemmstoffes Ethofumesat

Das zur Bekämpfung monokotyle Wildkräuter (FRANZARING *et al.*, 2001; DUNCAN *et al.*, 1982) in der industriellen Pflanzenzucht verwendete Herbizid Ethofumesat (LI *et al.*, 2000) (2-Ethoxy-2,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-benzofuranylmethansulfonat, Aventis Crop Science, Frankfurt), ist als Fettsäure-Elongase-Hemmstoff bei der Synthese langkettiger Aliphaten von Blattwachsen bekannt (ABULNAJA *et al.*, 1992; RUBIN *et al.*, 1986; LEAVITT *et al.*, 1978). Zur Applikation des Hemmstoffes wurden frisch geerntete Kartoffelknollen in einer verdünnten wässrigen sauerstoffgesättigten Lösung über 24 h inkubiert. Anschließend wurden die behandelten Knollen und unbehandelte Kontrollen 17 Tage unter 100% RH bei 25 °C gelagert. Nach der enzymatischen Isolation wurden die physikalischen und chemischen Untersuchungen durchgeführt.

Die Ermittlung des Leitwertes ergab für mit Ethofumesat behandelte Peridermen einen leicht erhöhte Durchlässigkeit ($P = 1.67 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe ($P = 7.67 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$). Der Unterschied erwies sich nach einem studentischen *t*-test ($p = 0.07$) aber als nicht signifikant (Abb. 8.45).

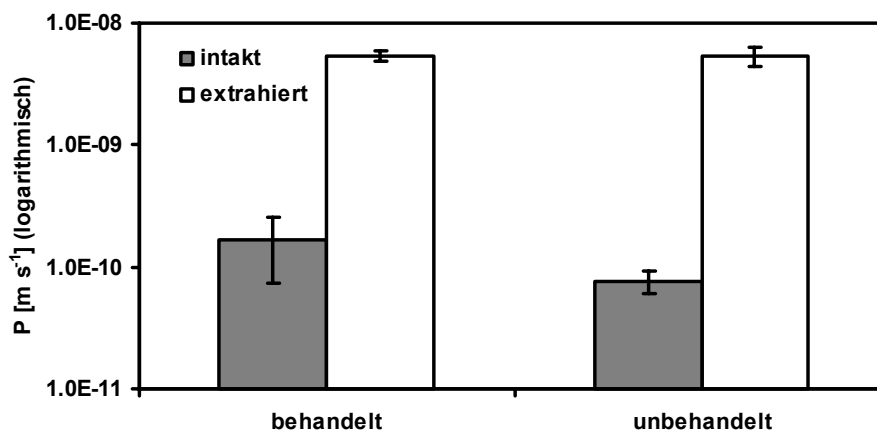


Abb. 8.45: Leitwerte von intakten und extrahierten natürlichen Peridermen 17 Tage bei 100% Luftfeuchte gelagert, am 1. Tag mit Ethofumesatlösung behandelte, und unbehandelte Kontrollen. Alter 17 Tage (Fehlerbalken = StabWN).

Die Leitwerte extrahierter Periderme (P_{ex}) zeigten zwischen behandelten und unbehandelten Peridermen keine Unterschiede, jedoch wurde durch die Extraktion der Wachse bei beiden Gruppen eine hoch signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit hervorgerufen (Abb. 8.45). Bei den behandelten Peridermen konnte ein Extraktionseffekt (P_{ex}/P) von 32, bei den unbehandelten ein Effekt von 71 festgestellt werden.

Der Suberingehalt von unbehandelten Kontrollen war niedriger als der mit Ethofumesat behandelten Periderme, jedoch nicht signifikant (Abb. 8.46 A). Bei der Extraktion der Wachse konnte kein Unterschied in der extrahierten Stoffmenge zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 8.46 B).

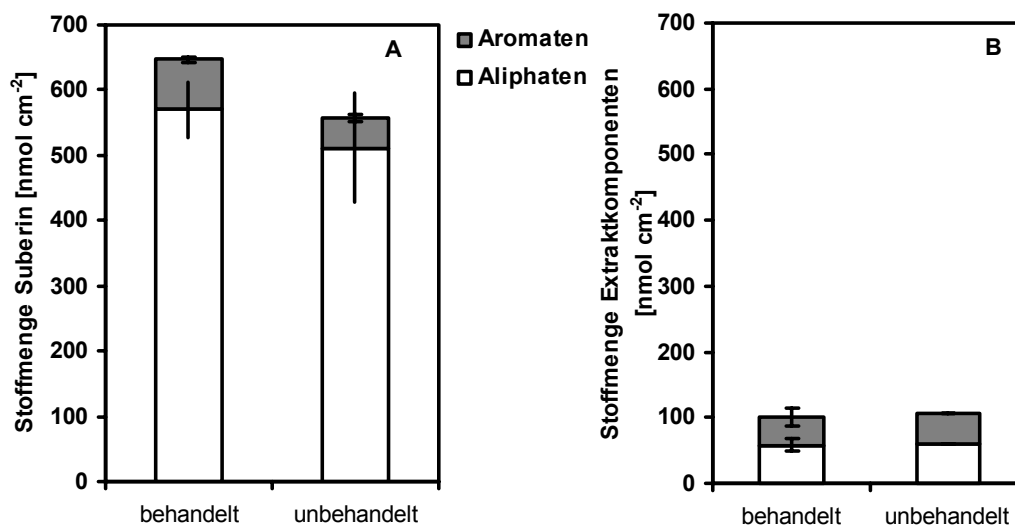


Abb. 8.46: Stoffmengen an Suberin und Wachsen in Kartoffelperidermen mit Ethofumesat und unbehandelt. Alter 17 Tage. (Fehlerbalken = StabWN).

Für die Beurteilung der Hemmwirkung des Ethofumesats auf die Fettsäureelongase wurden die mittleren Kettenlängenverteilungen von Wachs und Suberin bestimmt. Die größten Änderungen gegenüber der Kontrollgruppe konnten bei Säuren und Ferulasäureestern festgestellt werden (Abb. 8.47). Hier ergab sich für Ferulasäureester ein rechnerischer Unterschied von 2.0 C-Atomen (24.4 auf 26.4) und bei den Monocarbonsäuren von 2.8-Methylen-Einheiten (20.6 auf 23.4).

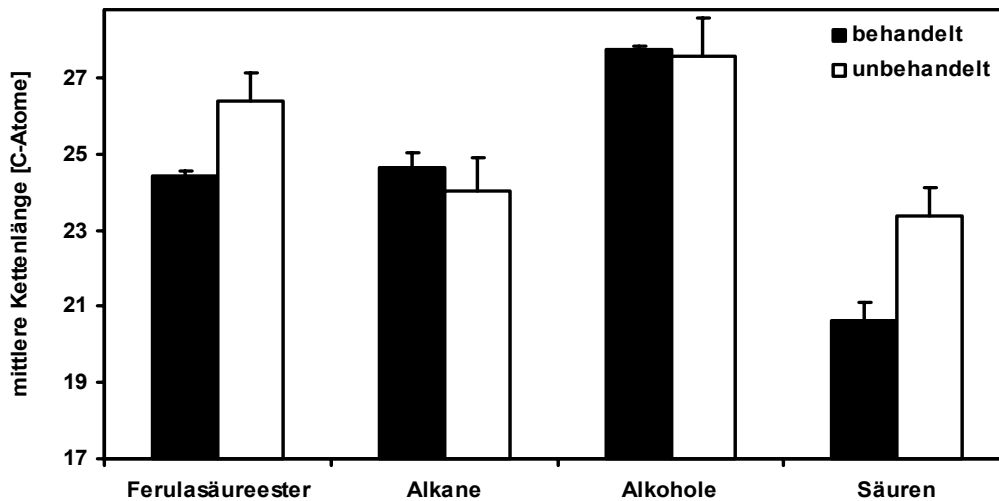


Abb. 8.47: mittlere Kettenlängenverteilung in Extrakten von ethofumesatbehandelten und unbehandelten Kartoffelperidermen. Alter 17 Tage. (Fehlerbalken = StabWN).

Besonders deutlich konnte man Unterschiede in der Verteilung der Kettenlängen bei den Ferulasäureestern erkennen, hier wurden bei den behandelten Peridermen Ferulasäureester mit den Kettenlängen 18-22 C-Atome vermehrt akkumuliert, während in der Vergleichsgruppe die Kettenlänge mit 30 C-Atomen stark zunahm (Abb. 8.48).

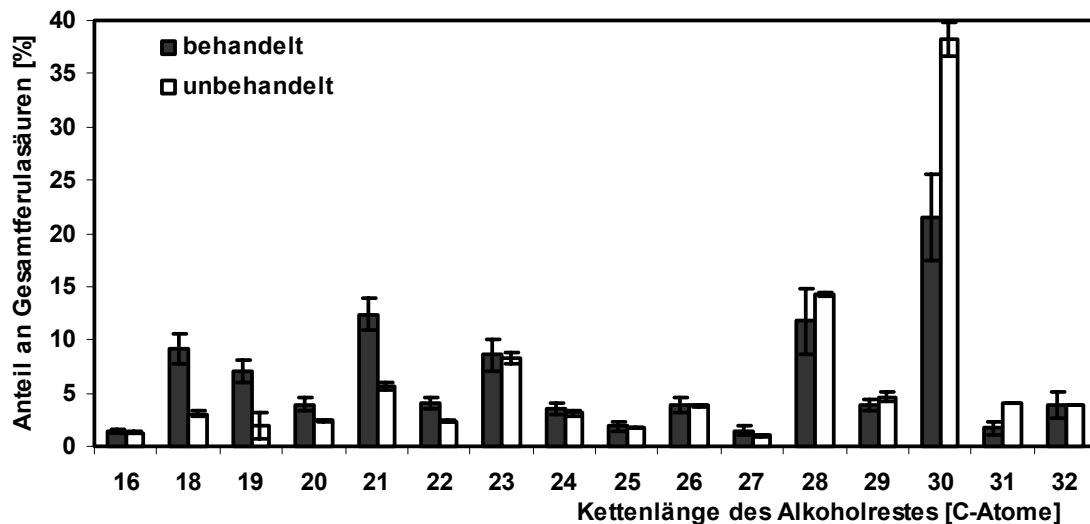


Abb. 8.48: Kettenlängenverteilung bei Ferulasäureestern des Wachsextraktes von ethofumesatbehandelten und unbehandelten 17 Tage gelagerten Kartoffelperidermen. (Fehlerbalken = StabWN)

Bei den untersuchten Suberinproben besaßen unbehandelte Periderme über die Mehrzahl der Substanzklassen die längeren Ketten (Abb. 8.49). Bei den Alkoholen waren es 2.0 C-Atome (22.4 auf 24.4) bei Monocarbonsäuren 1.3 Kohlenstoffe mehr und bei gesättigten Dicarbonsäuren 1.7-CH₂-Einheiten. Der größte Unterschied bestand mit 2.8-Methylen

Einheiten (von 21.1 auf 23.9) bei den gesättigten ω -OH-Säuren. Die ungesättigten Verbindungen sind hier nicht einbezogen, da jeweils nur der C₁₈-Vertreter zu finden war.

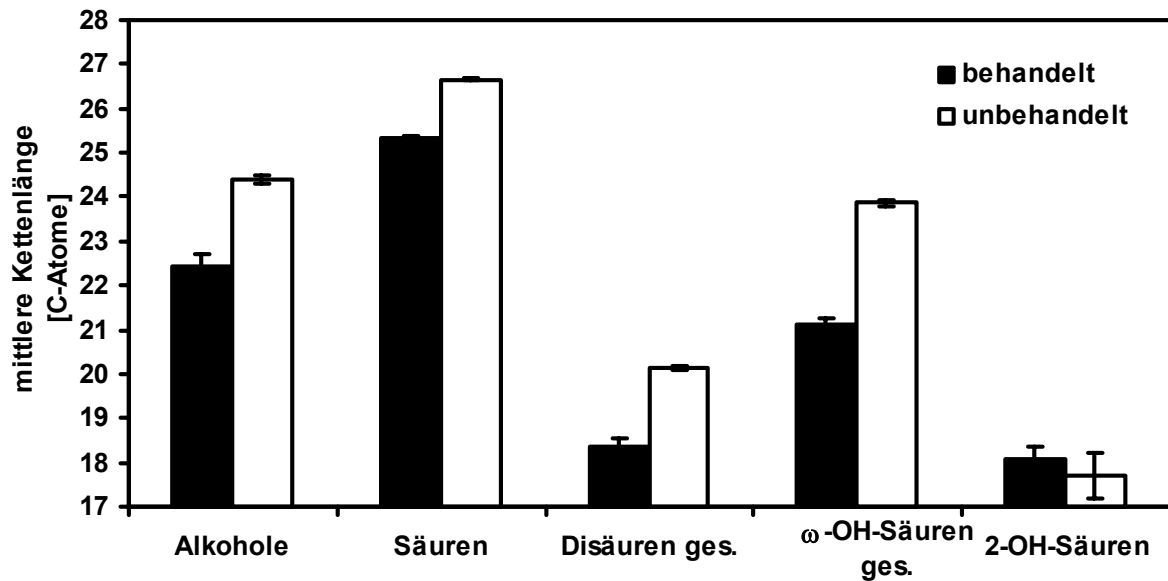


Abb. 8.49: mittlere Kettenlängenverteilung im Suberin von ethofumesatbehandelten und unbehandelten Kartoffelperidermen. Alter 17 Tage. (Fehlerbalken = StabWN).

8.8 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu *S. tuberosum* Sprossknollenperiderm

1. Kartoffeln synthetisieren in den ersten 3-7 Tagen nach der Ernte in großen Mengen aliphatische Substanzen wie Wachse und Suberin in schon vorhandenen Zellen und sind in der Lage unabhängig von der Umgebungsluftfeuchte auf verletzten Stellen ein mehrlagiges Wundperiderm neu aufzubauen.
2. Wundperiderm enthält im Extrakt größere Mengen an Aromaten als das natürliche Periderm.
3. Natürliche Periderme werden durch Wachs-Extraktion bis über 100mal durchlässiger, die Anzuchtluftfeuchten spielen hierbei keine Rolle.
4. Intaktes Wundperiderm ist für Wasser so durchlässig wie extrahiertes natürliches Periderm, extrahiertes Wundperiderm wird noch 2-10mal durchlässiger als nicht extrahiertes Wundperiderm.
5. Die Durchlässigkeit der Periderme ist nahezu ausschließlich abhängig von der Wachskonzentration und nur geringfügig von der Suberinkonzentration.
6. Elongasehemmstoffe führen zu einer Kettenlängenverkürzung von Wachs und Suberinkomponenten. Die Durchlässigkeit des Periderms wird dadurch leicht erhöht.

8.8.1 Natürliches Periderm

Die erstmals kombiniert durchgeführte Analysen der chemischen Zusammensetzung und der physikalischen Transporteigenschaften für Wasser von unterschiedlich behandelten nicht ausgereiften natürlichem Kartoffelknollenperiderm einer Sorte, zeigten eine deutliche Zunahme der Extrakt- und Suberinmengen im Verlauf der Lagerung, verbunden mit einer signifikanten Abnahme der Wasserleitfähigkeit. Anatomische Untersuchungen (Abb. 8.2; 8.3) zeigten, dass bei natürlichen Peridermen diese Phänomene nicht durch den Aufbau zusätzlicher Peridermschichten zu den vorhandenen 8-11 Zellschichten (Abb. 8.1) erklärbar waren. Eine verstärkte Einlagerung an Suberin und Wachsen war gravimetrisch schon durch die Zunahme des Peridermgewichtes pro Flächeneinheit nachweisbar (Abb. 8.4). Der Anstieg ist vergleichbar mit einer Sättigungskurve mit großer Zunahme innerhalb der ersten fünf Tage nach der Ernte und verlangsamter Zunahme in den darauf folgenden Tagen (Abb. 8.4). Um die zusätzlichen Suberinmengen zu lokalisieren, sollten analog SCHMIDT und SCHÖNHERR (1982) elektronenmikroskopische Untersuchungen der Ultrastruktur hilfreich sein, welche aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten. Arbeiten von LULAI und

FREEMAN (2001) identifizierten mit elektronenmikroskopischen und histochemischen Methoden Phellogen-Zellen als die Zone der Suberinsynthese.

Die Analysen der mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gewonnenen Peridermextrakte von bei 0%, 50% und 100% Luftfeuchte gelagerten natürlichen Periderme enthielten direkt nach der Ernte 20-65 nmol cm^{-2} aliphatische (65-70%) und zu 30-35% aromatische Komponenten. Aromatische Komponenten waren vor allem Ester der Ferulasäure mit langkettigen Alkoholen ($\text{C}_{16}\text{-C}_{32}$), die hier erstmals in natürlichem Kartoffelperiderm nachgewiesen wurden. Der in Abb. 8.25 gezeigter Anstieg der Stoffmenge an extrahierbaren Substanzen mit zunehmender Lagerdauer fiel bei 100% Luftfeuchte am niedrigsten aus (Faktor 1.2), anscheinend ist für die Sprossknolle unter diesen Bedingungen der Aufbau zusätzlichen Verdunstungsschutzes nicht notwendig. Bei einer Luftfeuchte von 0% betrug der Anstieg einem Faktor von 1.9 was einer erhöhten treibenden Kraft für den Wasserverlust Rechnung trägt. Den höchsten Anstieg jedoch verzeichneten mit einem Faktor von 4.2 die Periderme der bei 50% Raumlufteuchte gelagerten Knollen.

Eine Erklärung für dieses Verhalten liegt vermutlich in einer Anpassungsreaktion der Knolle. Bei der extremen Luftfeuchte von 0% ist der Wasserstress am höchsten, vermutlich trocknen die obersten lebenden Zellen aus, sodass die Biosynthese gehemmt wird. Das andere Extrem von 100% RH erfordert keine Anpassung, da die Knolle keinen Trockenstress verspürt, somit ist die Biosyntheserate gering. Einzig bei der mittleren Luftfeuchte von 50-60% versucht die Knolle sich anzupassen, ohne durch extreme Trockenheit geschädigt zu sein und baut daher große Mengen Wachse ein. Eine abweichende Substanzklassenverteilung der Substanzen im Lösungsmittelextrakt im Vergleich mit den anderen Luftfeuchte-Gruppen konnte ebenfalls festgestellt werden. Die Periderme der 50% Gruppe enthielten im Mittel doppelt so viele Alkane (Abb. 8.27)..

Allen Gruppen gemeinsam war jedoch ein Anstieg der mittleren Kettenlänge bei Monocarbonsäuren, wohingegen sich die mittleren Kettenlängen der übrigen Substanzklassen während der Lagerung nicht veränderten (Abb. 8.29). Die höchsten festgestellten Kettenlänge der aliphatischen Wachskomponenten von bis zu 31 C-Atomen konnten ebenfalls bei den Monocarbonsäuren festgestellt werden. Unterschiede im Anstieg der mittleren Kettenlängen der Säuren waren bei der 50% Gruppe am größten (+6 C-Einheiten), am zweitstärksten stieg die Kettenlänge bei der 100% Gruppe (+3 C-Einheiten), während die Kettenlängen der 0% Gruppe nur marginale Änderungen zeigte.

Vermutlich läuft die Strategie der Knollen für einen verbesserten Verdunstungsschutz im untersuchten Zeitraum weniger auf eine Kettenlängenverlängerung als auf den Einbau von zusätzlichem extrahierbaren Materialien relativ konstanter Zusammensetzung hinaus (vor allem bei 0% Luftfeuchte-Lagerung). Beeinflussen ließ sich die Kettenlänge der Säuren und Ferulasäureester effektiv durch die einmalige Applikation des Elongase-Hemmstoffes Ethofumesat direkt nach der Ernte. Nach 17 Tagen Lagerzeit konnte eine deutlich verringerte

Kettenlänge des Alkoholrestes der Ferulasäureester um 2-3 C-Atome im Vergleich zu einer Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 8.45). Bei den Ferulasäureestern konnte anhand einer Kettenlängenverteilung gezeigt werden, dass sich kurzkettige (C_{18} - C_{22}) Ester akkumulierten, während in der nicht behandelten Kontrollgruppe langkettige Ester (C_{28} - C_{30}) verstärkt nachzuweisen waren (Abb. 8.46). Andere Substanzklassen änderten sich nicht signifikant in ihrer Kettenlänge.

Wenig Aufmerksamkeit in der Literatur wurde den Extraktbestandteilen der natürlichen Periderme gewidmet, deren Rolle für die Diffusionseigenschaften entscheidend ist (SOLIDAY *et al.*, 1978; SOLIDAY *et al.*, 1979). Lediglich die Arbeiten der Würzburger Lebensmittelchemiker von BINNEMANN (1973) und BRIESKORN und BINNEMANN (1972,1974) beschrieben die Extrakte als ein Gemisch aus *n*-Alkanen, *n*-Alkoholen und *n*-Monocarbonsäuren. Die Fraktion der Alkane aus der Bestimmung von BINNEMANN (1973) enthielt allerdings einen hohen Artefakt-Anteil aus einer homologen Reihe von Alkanen anthropogenen Ursprungs, was den Autoren damals nicht bekannt war. Einen Vergleich der Ergebnisse der Würzburger Arbeitsgruppe mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt Abb. 8.50 für die Kettenlängenverteilung der Alkohole und Monocarbonsäuren. Homologe Ferulasäureester wurden erstmals in dieser Dissertation im Lösungsmittelextrakt von natürlichen Peridermen nachgewiesen, nicht im Suberin selbst, wie in vorhergehenden Untersuchungen von z.B. BERNARDS und LEWIS (1992).

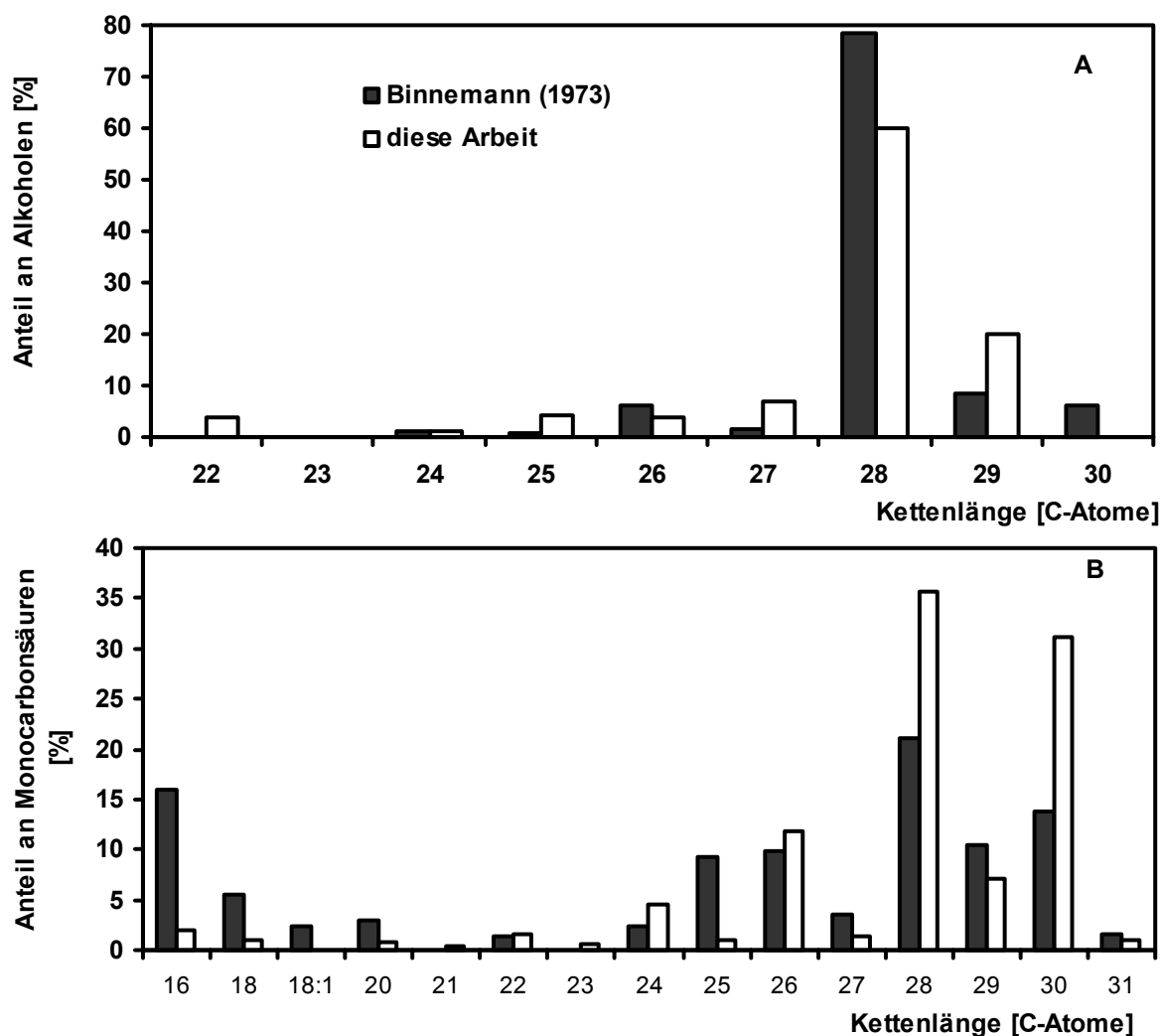


Abb. 8.50: Vergleich der Kettenlängen im Wachs von Kartoffelschale verschiedener Untersuchungen bei **A** Alkoholen, **B** Monocarbonsäuren. Angaben in Prozent der Summe der jeweiligen Substanzklasse.

Suberinanalysen der isolierten und extrahierten natürlichen Periderme ergaben in Menge und Substanzklassenverteilung keine Unterschiede in den verschiedenen Anzuchtluftfeuchten. Der Gesamt-Suberingehalt nach der Ernte von 266-296 nmol cm⁻² stieg innerhalb der ersten 5-7 Tage linear mit hoher Steigung auf 430-510 nmol cm⁻² und danach nur noch in geringem Maße auf 490-640 nmol cm⁻². Hauptkomponenten waren die ungesättigten C₁₈-Di und ω-Hydroxysäuren mit zusammen 55-65% vom Gesamtsuberin. Die Kettenlängenzusammensetzung der verschiedenen Substanzklassen des Suberins änderte sich während der Lagerdauer bei keiner Gruppe. Berechnete man den molaren Anteil der Carboxygruppen in dem Polyester Suberin, so konnte festgestellt werden, dass bei allen Altersklassen in allen Gruppen, der Anteil nicht mit der Anzahl ebenfalls detektierten Hydroxygruppen übereinstimmte. Im Mittel ergab sich ein Überschuss an Säuregruppen von 68%. Hieraus ergibt sich für das Suberin die Suche nach einem bislang übersehenen Faktor, der diese Diskrepanz ausgleicht. GRAÇA und PEREIRA (2000a, b) haben mit der Methode der

Natriummethanolat-Verseifung des Suberins eine Antwort auf diese Frage gefunden, da sie in großer Menge Glycerin im Polyester nachweisen konnten, das in idealer Weise die freien Säuregruppen verbinden könnte, um ein höher vernetztes Polymer zu erzeugen. Auch andere Autoren haben dies in früherer Zeit an Suberin mehrerer Pflanzenarten nachgewiesen (MOIRE *et al.*, 1999; SCHMUTZ *et al.*, 1993).

Eine Auswirkung des unterschiedlichen Suberingehaltes auf die Permeabilität für Wasser konnte nicht bei allen Lagerluftfeuchten festgestellt werden. Extrahierte Periderme vom Erntetag der 100% Gruppe transpirierten mit $1.18 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ am 28. Tag mit $7.13 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ was einen schwach signifikanter Rückgang der Leitfähigkeit ($p = 0.05$) anzeigte, von Vogt *et al.* (1983) wurden für extrahierte Periderme von reifen, nicht gelagerten Kartoffeln der Sorte Maritta geringfügig höhere Leitwerte von $P_{\text{ex}} = 3.4 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ festgestellt. Bei 50% und 0% Peridermen konnte mit dem studentischen *t*-Test keine signifikante Änderung der Leitwerte von extrahierten Peridermen verschiedenen Alters festgestellt werden.

Beließ man die Wachse auf der Oberfläche, so betrug der Leitwert am Erntetag $6.4 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ und sank kontinuierlich auf $9.25 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ bis $5.4 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ ab (Abb. 8.41) dies stimmte sehr gut mit von VOGT *et al.* (1983) ermittelten Leitwerten von $1.64 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ an isoliertem Periderm gelagerter Kartoffeln der Sorte Primura überein, der Leitwert vom Erntetag entspricht exakt dem von reif-geernteten und fünf Tage gelagerten Periderm der Sorte Maritta.

Im Vergleich mit isolierten Kutikularmembranen von Blättern von *Hedera helix* L., die eine Wachsmenge von $64 (\pm 5.5) \mu\text{g cm}^{-2}$ (Schreiber und Riederer 1996) enthalten, finden sich im Kartoffelperiderm mit $58.9 \mu\text{g cm}^{-2}$ ganz ähnliche Mengen extrahierbarer Substanzen. Der Leitwert der intakten nur wenige μm dicken Kutikularmembran beträgt $8.00 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ (SCHREIBER *et al.*, 2001), demnach etwa so niedrig wie der von intakten Kartoffelperiderm nach 66 Tagen Lagerung ($5.4 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$). Extrahiert man die Kutikularmembran, so erhöht sich der Leitwert auf $2.65 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ (SCHÖNHERR und LENDZIAN, 1981), ein ähnlicher Wert, konnte mit $1.18 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ in Rahmen dieser Arbeit im vielschichtigen Kartoffelperiderm nach Lösungsmittelextraktion gefunden werden.

Für die Sprossknolle bedeutet der durch die Ernte hervorgerufene Verlust einer kontinuierlichen Wasser und Nährstoffversorgung durch den Spross der Kartoffelpflanze eine extreme Stresssituation. Um dem drohenden Wasserverlust zu verhindern schafft sie es innerhalb der ersten Tage eine wirksame Barriere aufzubauen die 100mal dichter ist, als zum Erntezeitpunkt. Dies geschieht vor allem durch den massiven Einbau von wachsartigen Substanzen, in die noch lebenden inneren Zellschichten des Periderms.

8.8.2 Wundperiderm

Durch Abschälen des natürlichen Periderms unreifer Kartoffeln am Erntetag, wurde die Bildung von Wundperiderm induziert, welches bei ausreichend Wasserdampf in der

Lagerumgebung (45-100% RH) bereits nach 5-7 Tagen aus 2-3 neuen Zellschichten bestand. Das Wundperiderm konnte ab drei Tagen Wachstum regelmäßig geerntet und enzymatisch isoliert werden. So gewonnenes Material wurde in dieser Arbeit erstmals auf die Permeabilität für Wasser untersucht und diese in den Zusammenhang mit der chemischen Zusammensetzung von Wachsen und Suberin gestellt.

Das Peridermgewicht der bei 100% Luftfeuchte angezogenen Wundperidermen stieg bis zum 21. Tag linear mit $y = 5.30 \cdot 10^{-2} \cdot x$, während das, ebenfalls bei 100% Luftfeuchte gelagerte, natürliche Periderm schon nach drei Tagen keine lineare Gewichtszunahme mehr zeigte (Steigung hier, bis zum dritten Tag $1.37 \cdot 10^{-1} \cdot x$). Nach 30 Tagen isolierte Peridermen erreichten mit 1.24 mg cm^{-2} annähernd das Gewicht von drei Tage altem natürlichem Periderm (1.35 mg cm^{-2}) obwohl sie durchschnittlich zwei Zelllagen weniger besaßen (Abb. 8.4). Die Mengen an extrahierbaren Substanzen im drei Tage alten intakten Periderm waren signifikant größer ($81.5 \text{ nmol cm}^{-2}$) als die im vergleichbar schweren 30 Tage alten Wundperiderm ($58.1 \text{ nmol cm}^{-2}$). Auch die Suberinmengen waren mit 217 nmol cm^{-2} signifikant niedriger als in gleich schweren natürlichem Peridermen (448 nmol cm^{-2}). Im Vergleich mit natürlichem Peridermen enthält das Wundperiderm substantiell niedrigere Mengen an Wachsen und Suberin, die Geschwindigkeit, mit der diese Mengen gebildet werden, ist jedoch wesentlich größer, wie eine Auftragung der Zuwachsraten an extrahierbaren Materialien zeigt (Abb. 8.51).

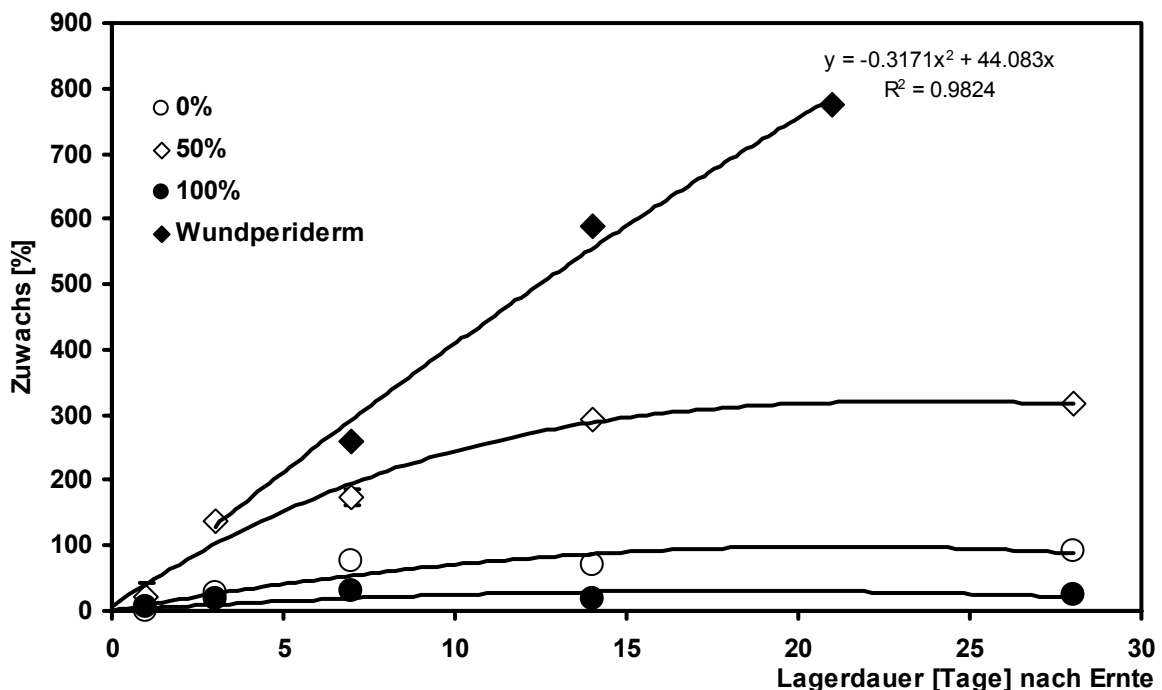


Abb. 8.51: Zuwachs des Gesamtwachsextraktes in % bei Lagerung von Wundperiderm und natürlichem Periderm bei Kartoffeln in 0%, 50% oder 100% RH (Mischproben aus jeweils 4 gemeinsam extrahierten Peridermen).

Ein hoher Prozentsatz des neu aufgebauten Wachses bestand aus Aromaten (Abb. 8.52), vornehmlich Ferulasäureester, die mit hohen Kettenlängen von C₁₆ bis C₃₂ nachgewiesen wurden (Abb. 8.15). Ferulasäure und vermutlich auch Ferulasäureester haben hohe biologische Wirksamkeit in der Pathogenabwehr (FAULDS und WILLIAMSON, 1999; ROSENTHAL *et al.*, 1997; CHOWDHURY *et al.*, 1996; RAVN *et al.* 1989; MARHUENDA und GARCIA, 1985), wodurch die hohen Konzentrationen dieser Substanzen im Wachs des Wundperiderms erklärt werden könnten. Der Aromatengehalt im Suberin des Wundperiderms unterschied sich dagegen nicht sehr stark von dem in natürlichen Peridermen (Abb. 8.21).

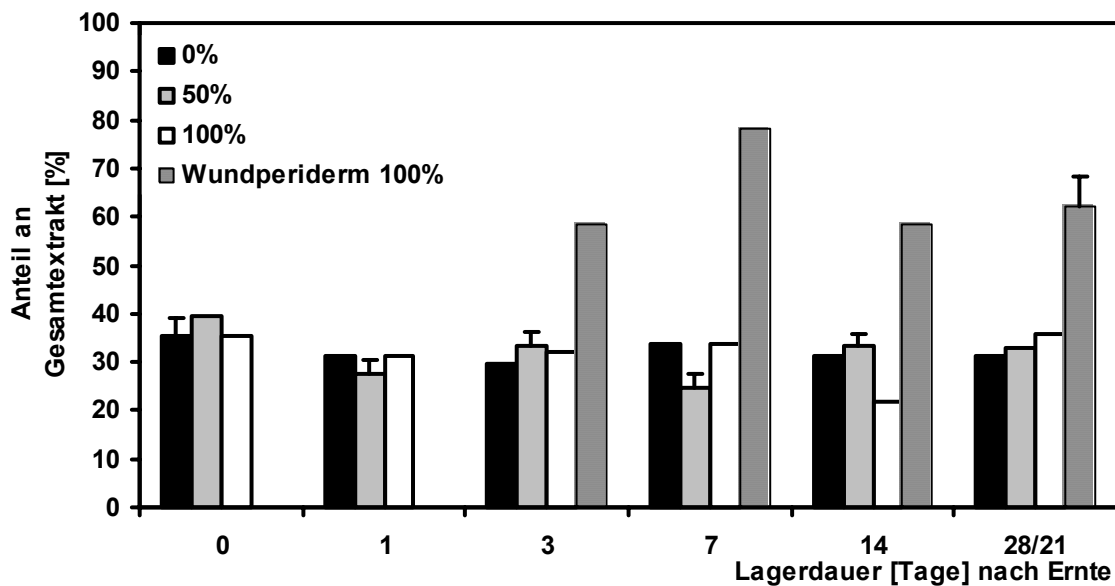


Abb. 8.52: Vergleich des Aromatengehaltes im Wachsextrakt von Kartoffelperiderm verschiedener Lagerluftfeuchten und Kartoffelwundperiderm in Prozent von der Stoffmenge im Gesamtextrakt. (Fehlerbalken = StabWN).

Am effizientesten scheint die Synthese von Wachsen und Suberin in Wundperiderm bei niedrigeren Luftfeuchten abzulaufen. Bei 100% Luftfeuchte gebildetes Wundperiderm enthielt 40% geringere Mengen Wachse und 30% weniger Suberin, als bei 45-90% gewachsenes. Bei 0% Luftfeuchte angezogenes Wundperiderm konnte sich nur innerhalb der ersten drei Tage bilden, anschließend war die Kartoffel abgestorben. Das Wundperiderm enthielt jedoch ab dem ersten Tag substantielle Wachs- und Suberinmengen von über 40 $\mu\text{g cm}^{-2}$ bzw. 150 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Dies waren doppelt so hohe Mengen wie bei Luftfeuchtebedingungen zwischen 100% und 45% und 21 Tagen Lagerdauer.

Die in der Literatur für das Wundperiderm ermittelten Mengen Suberin (z.B.: KOLATTUKUDY und DEAN 1974, SOLIDAY 1978) betragen nach drei Tagen ca. 15 $\mu\text{g g}^{-1}$, nach sieben Tagen ca. 360 $\mu\text{g g}^{-1}$ als Summe an ungesättigten Verbindungen. Diese Werte konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, die verwandten enzymatisch isolierten Periderme enthielten mit 43 bis 80 mg g^{-1} Suberin ein um Größenordnungen abweichendes Ergebnis. Zurückzuführen ist diese Diskrepanz vermutlich auf sehr unterschiedliche Systeme und Materialien.

Die Leitwerte der isolierten, nicht extrahierten, Wundperiderme waren geringfügig niedriger, als die der extrahierten natürlichen Periderme. Das Wundperiderm wies eine zunehmende Dichtigkeit mit zunehmender Lagerdauer auf, vor allem bei 73% Lagerluftfeuchte war dies signifikant. Trotz sehr hoher Syntheseraten von aliphatischen Materialien betrug die Leitfähigkeit auch nach drei Wochen noch etwa das 100 fache der von natürlichen Peridermen. Vermutlich dient das Wundperiderm mit seinem hohen Gehalt an Aromaten (>60% im Wachs) und ungesättigten Verbindungen (>65% im Suberin) vor allem der Abwehr von Pathogenen und Minderung von Sauerstoffstress (durch den Abfang reaktiver Sauerstoffspezies durch Reaktion mit den Doppelbindungen), und nicht wie in der Literatur (KOLATTUKUDY und DEAN 1974, SOLIDAY 1978) bislang vermutet wurde, nur dem Verdunstungsschutz.

Die Synthese der Fettsäuren ist anscheinend auch zeitlich limitiert, oder Produkt gesteuert, denn Untersuchungen zur Enzymaktivität von Fettsäureelongasen zeigten beim Wundperiderm nach sieben Tagen maximale Aktivität, die jedoch nach 20 Tagen wieder gegen null tendierte (WALKER und HARWOOD, 1986). Dies könnte die geringeren Syntheseraten für Wachse und Suberin nach ca. 20 Tagen erklären (Abb. 8.24 und Abb. 8.31).

Schlussfolgern lässt sich aus den gewonnenen Resultaten, das Suberin alleine als Barriere nicht ausreichend ist, denn Wundperiderm mit 50% des Suberins des natürlichen Periderms ist bis zu 100mal durchlässiger als das natürliche Periderm.

8.8.3 Suberin aus Kartoffel als Modell für die Suberinstruktur

Da sich Kartoffelperiderm leicht gewinnen lässt, und einen hohen Suberingehalt von 20-30% besitzt wurden, angefangen mit BINNEMANN (1973), viele Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Suberins an Kartoffelperiderm und Wundperidermen der Kartoffel durchgeführt. Eine Vielzahl von Arbeiten versuchte die aromatische Domäne zu charakterisieren, da deren Bausteine mit modernen spektroskopischen Techniken wie CP/MAS-NMR (STARK *et al.*, 1994; YAN und STARK, 1998, 2000) am leichtesten zu detektieren sind. Zum Beispiel wurden strukturelle Verwandtheiten mit Lignin festgestellt (LAPIERRE *et al.*, 1996) und etherverknüpftes Feruloyltyramin entdeckt (NEGREL *et al.*, 1996). Neuere Hinweise sprechen jedoch für eine dem Lignin nicht verwandte Art eines aromatischen Polymers im Kartoffelsuberin (BORG-OLIVER und MONTIES, 1989, 1993; BERNARDS *et al.*, 1995; BERNARDS und LEWIS, 1998; BERNARDS und RAZEM, 2001, BERNARDS, 2002). Auch langkettige Ferulasäureester wurden in Wundperidermen gefunden (BERNARDS und LEWIS, 1992) und deren Biosynthese untersucht (LOTFY *et al.*, 1994; NEGREL *et al.*, 1995). Die aromatische Domäne wurde in dieser Dissertation aber nur am Rande betrachtet, da dem aliphatischen Teil des Suberins eine höhere Relevanz für die Erniedrigung der Wasserleitfähigkeit der Membran zugesprochen wurde.

Auch die aliphatische Domäne des Suberins wurde bis heute mit vielen Methoden untersucht. Dazu zählen histochemische Untersuchungen (WALTER und SCHADEL, 1983; VAUGHN und LULAI, 1991, LULAI und MORGAN, 1992; LULAI und ORR, 1994; LULAI und CORSINI, 1998; LULAI und FREEMAN, 2001) und eine Vielzahl elektronenmikroskopischer Betrachtungen, in denen die lamellare Struktur der Suberineinlagerung gezeigt werden konnte (z.B.: SCHMIDT und SCHÖNHERR, 1982. Suberinanalysen durch Umesterungsreaktionen vor allem an Wundperidermen (KOLATTUKUDY *et al.*, 1974, 1975; KOLATTUKUDY und DEAN, 1974, BINNEMANN, 1973, BRIESKORN und BINNEMANN, 1974; WALTER und SCHADEL, 1982, DEAN *et al.*, 1977), zeigten als Hauptbestandteil die ungesättigten C₁₈-Di- und ω -Hydroxysäuren. Als weiterer wichtiger Baustein von Suberin natürlicher Kartoffelperiderme wurde erst kürzlich Glycerin nachgewiesen und als Konjugat von Estern der Mono-, Di- und ω -Hydroxysäuren sowie der Ferulasäure nachgewiesen (GRAÇA und PEREIRA, 2000a, b)

Nach einer Umrechnung der verschiedenen literaturbekannten Analysen von natürlichem Kartoffelperiderm auf vergleichbare Größen, konnte man feststellen, dass die Materialausbeuten nach einer Analyse bis auf eine Ausnahme 90-120 mg g⁻¹ betragen. Fünf mal höhere Ausbeuten lieferte die Natriummethoxid Verseifung, bei der zu einem Drittel Glycerin als wesentlicher Baustein gefunden wurde (Tab. 8.2), welches in den anderen Untersuchungen aufgrund der wässrigen Aufarbeitungsmethode übersehen wurde.

Tab. 8.2: Vergleich der Suberinanalysen verschiedener Autoren mit verschiedenen Sorten mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

	I ^{a)}	II ^{b)}	III ^{c)}	IV ^{d)}	I ^{a)}	II ^{b)}	III ^{c)}	IV ^{d)}
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	%	%	%	%
Alkohole	24.7	13.2	7.2	17.6 ±1.7	3.1	6.0	7.5	13.5
Monocarbonsäuren	84.1	17.6	7.7	16.9 ±1.0	10.4	8.0	8.0	13.0
Dicarbonsäuren	18.7	2.2	9.3	5.6 ±0.5	2.3	1.0	9.7	4.3
Disäuren unges.	300.8	50.6	37.6	40.7 ±8.0	37.3	23.0	39.3	31.4
ω -OH-Säuren	27.8	2.2	8.6	7.7 ±0.8	3.4	1.0	9.0	6.0
ω -OH-Säuren unges.	120.8	33.0	20.1	29.2 ±6.2	15.0	15.0	21.0	22.5
Glycerin	220.3	n.n. ^{e)}	n.n.	n.n.	27.3	n.n.	n.n.	n.n.
Aromaten	9.5	n.n.	n.n.	6.7 ±1.5	1.2	n.n.	n.n.	5.2
Summe	576.9 ^{f)}	118.0	90.5	117.3				

a) GRAÇA und PEREIRA, 2001, gelagerte Kartoffeln vom Markt, enzymatische Isolation; b) KOLATTUKUDY, 1974, geerntete Kartoffeln nach unbek. Lagerdauer; enzymatische Isolation c) BINNEMANN, 1973 gelagerte Kartoffeln vom Markt (Isolation durch Abschälen nach dem Kochen); d) diese Arbeit, natürliches Periderm 28 Tage bei 0% Luftfeuchte gelagert e) n.n. = nicht nachgewiesen f) Glycerin nicht einbezogen

Die prozentuale Zusammensetzung der Substanzklassen des Suberins unterschiedlicher Untersuchungen stimmt in den Größenordnungen gut überein. Lediglich der Alkoholanteil scheint in dieser Arbeit (IV) höher bestimmt als in den beiden anderen, dies könnte in der Art des Aufschluss liegen, da nur in dieser Arbeit ganze, extrahierte Peridermscheiben umgeestert wurden, während in den übrigen Arbeitsvorschriften ein feines gut extrahiertes Pulver

verwendet wurde. Nicht vollständig extrahierte Alkohole durch tief in das Suberin eingelagertes und durch einfache Extraktion nicht herauslösbares Material wären denkbar. Glycerin wurde nur in I bestimmt, hier wurde eine andere, basische Aufschlussmethode verwendet, die evtl. auch die wesentlich höhere Gesamtausbeute (mg Suberin pro g Trockengewicht) erklärt. Eine andere Erklärung, unabhängig von den unterschiedlichen Sorten die Verwendung fanden, bietet die Herkunft des Materials, in der Arbeit von GRAÇA und PEREIRA (2001) wurden gelagerte (auf dem Markt gekaufte) Kartoffeln unbekanntes Alters verwendet, wohingegen die anderen Arbeiten Periderm frisch geernteter Knollen verarbeiteten. Allen Bestimmungen gemeinsam ist jedoch ein hoher Anteil an ungesättigter C₁₈-Di und ω -Hydroxysäuren. Zum Teil konnten auch in IV größere Mengen an Glycerin nachgewiesen werden, jedoch nur an Einzelproben, die hier nicht in den Zusammenhang gestellt werden.

Vergleicht man die Substanzklassenverteilung in Kartoffelperiderm mit anderen in dieser Arbeit untersuchten suberinisierten Zellen in Wurzeln, so kann man abgesehen von der allgemeinen Heterogenität, gut erkennen, dass die ungesättigte Disäure in diesem Ausmaß nur in Kartoffelperiderm zu finden ist (Abb. 8.53). Bei Abschlussgeweben anderer Arten fand man vor allem gesättigte und ungesättigte ω -Hydroxysäuren, die auch im Kartoffelperiderm vorhanden waren, aber weniger häufig sind.

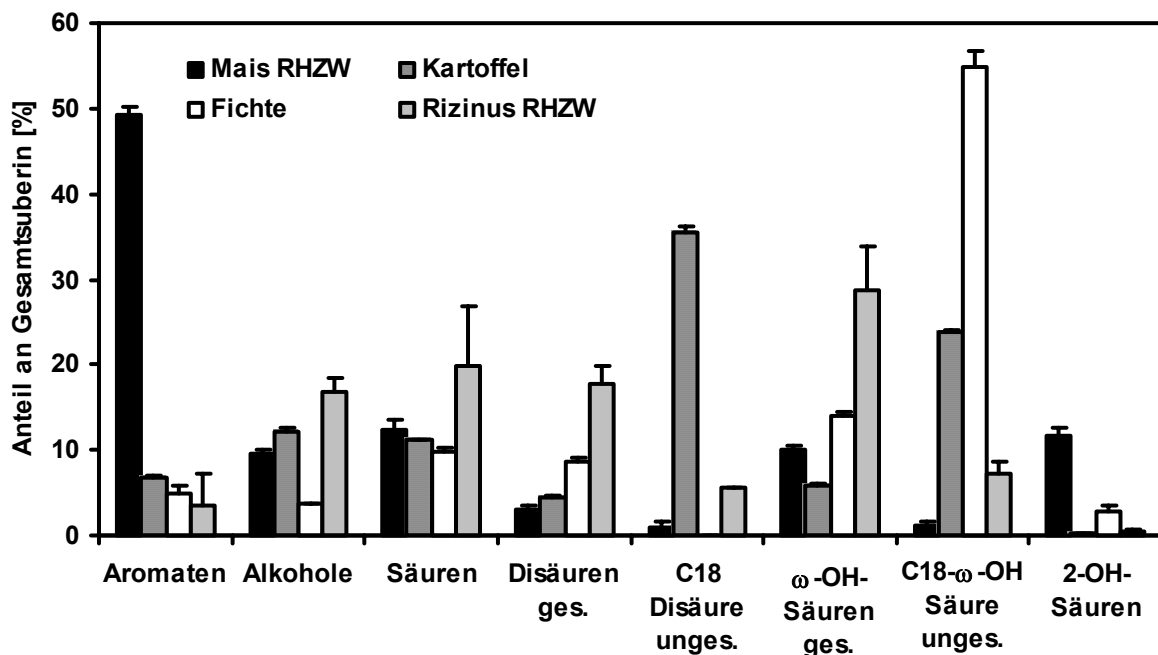


Abb. 8.53: Vergleich der prozentualen Substanzklassenverteilung im Suberin von Kartoffelperiderm mit dem Suberin verschiedener Pflanzenwurzeln; Fichtenwurzelperiderm, Maiswurzel Zone IV RHZW (Helix), Rizinus Zone III RHZW. (Fehlerbalken = StabWN)

Eine Prognose über die Barriereigenschaften des Suberins aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung aufzustellen ist so einfach nicht möglich, denn es spielt nicht nur die

chemische Zusammensetzung und somit die Qualität des Polymers eine Rolle für die Funktion (Monomerenzusammensetzung, Vernetzungsgrad, Kettenlängen), sondern auch die Quantität in den jeweiligen Geweben, sowie der relative Anteil des Polymers in diesen Geweben, im Vergleich zu anderen Zellwänden der gleichen Art.

8.8.4 Bedeutung des Kartoffelperiderms als Modellgewebe für die Leitfähigkeit von suberinisierten Barrieren im Apoplasten.

Untersuchungen zur Korrelation von Leitfähigkeit mit der diskreten chemischen Zusammensetzung des Suberins und der Wachse von Kartoffelperiderm wurden bislang nur an Wundperidermen durchgeführt (unter anderem: SOLIDAY *et al.*, 1978; SOLIDAY *et al.*, 1979; KOLATTUKUDY und DEAN, 1974).

Durch Untersuchungen zur Hemmung der Wachssynthese durch Trichloressigsäure erkannten SOLIDAY *et al.* (1979) die Rolle der Wachse als Hauptbarriere im Periderm. Die von SOLIDAY *et al.* (1979) ermittelten Wachsmengen liegen mit ca. $1.00 \mu\text{g cm}^{-2}$ nach vier Tagen und ca. $4.70 \mu\text{g cm}^{-2}$ nach acht Tagen in der gleichen Größenordnung wie in dieser Arbeit ($1.40 \mu\text{g cm}^{-2}$ nach drei Tagen und $6.40 \mu\text{g cm}^{-2}$ nach sieben Tagen). Durch die Behandlung mit Trichloressigsäure konnten nach acht Tagen nur noch $0.80 \mu\text{g cm}^{-2}$ an Wachsen nachgewiesen werden, und der Widerstand für die Wasserverdunstung der bei unbehandeltem Wundperiderm ca. 4.50 s cm^{-1} nach vier Tagen und 32.4 s cm^{-1} nach acht Tagen betrug, blieb mit 1.20 s cm^{-1} sehr gering (SOLIDAY *et al.*, 1978; SOLIDAY *et al.*, 1979).

Rechnet man diese Werte auf Leitwerte um (SCHÖNHERR, 1982), so entspricht der Widerstand nach vier Tagen $5.12 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ und liegt somit in der gleichen Größenordnung wie der in dieser Arbeit ermittelte Wert von $4.71 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$. Nach acht Tagen Peridermwachstum entsprach der ermittelte Widerstand einem Leitwert von $7.11 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ was etwas niedriger war, als bei den in dieser Arbeit bei 100% Luftfeuchte angezogenen Wundperidermen gemessen wurde ($3.81 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$). Bei 73% Luftfeuchte angezogene Wundperidermen zeigten aber mit $3.41 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ einen von der Größenordnung her vergleichbaren Wert. Ähnliche Werte wurden schon von KOLATTUKUDY und DEAN (1974) durch Differenzwägung ermittelt und mit der Mengenzunahme ungesättigter Di- und ω -Hydroxysäure im Suberin positiv korreliert.

Kartoffelperiderme unterschiedlicher Herkunft ließen sich nach den obigen Ausführungen sehr gut vergleichen und bieten sich daher als Modell für Transportstudien suberinisierter Barrieren an. Das Ziel dieser Arbeit, die an extrahierten Kartoffelperiderm ermittelten Leitwerte auf suberinisierte Apoplastische Transportbarrieren von Wurzeln verschiedener Arten anzuwenden ist nicht ganz unproblematisch durchführbar. Zum einen besteht die Problematik der Heterogenität der Suberinzusammensetzung verschiedener Arten zum

anderen (z.B. nimmt mit zunehmender Kettenlänge die Hydrophobizität zu, bei freien Aliphaten (wie in Wachsen) verdoppelt sich der Diffusionswiderstand für Wasser je zusätzliche Methylen-Einheit um etwa das Doppelte (ARCHER und LA MER, 1955)). gilt es eine einheitliche Bezugsgröße zu finden. Am idealsten erscheint hier der Bezug auf die Oberfläche der Barrieregewebe. Jedoch spielt für die Diffusion auch die Dichte des Materials und die zur Verfügung stehenden Wege eine Rolle (SCHÖNHERR, 1982).

Extrahierte Kartoffelperiderme unterscheiden sich bei verschiedenen Suberingehalten in ihrem Leitwert nur noch gering (Abb. 8.41). Daher wurde den extrahierbaren Wachsen der größte Anteil an der Dichtwirkung zugerechnet. In suberinisierten apoplastischen Barrieregeweben, konnten bislang aber nur keine oder nicht signifikante Mengen an Wachsartigen Substanzen gefunden werden (ZEIER, 1998). Demnach muss das aliphatische Suberin als Barrierematerial dienen. Die bei extrahierten Kartoffelperidermen ermittelten Leitwerte sollen im Folgenden umgerechnet werden, um eine Größenordnung für die Leitfähigkeit bzw. den Widerstand dieser Barrieren in Pflanzenwurzeln zu ermitteln.

8.8.4.1 Modellrechnungen

Die für die Messungen verwandten Membranen bestanden aus extrahiertem natürlichen Kartoffelperiderm mit durchschnittlich 8 Zelllagen (Abb. 8.1; 8.2). Diese enthielten über alle Alters und Anzuchtclassen betrachtet unterschiedliche Mengen an Suberin pro Flächeneinheit, von 275 nmol cm^{-2} ($108 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$) bis 602 nmol cm^{-2} ($241 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$). Da die hier untersuchten apoplastische Barrieregewebe aus einer Zelllage bestehen (Endodermis, Hypodermis) wurden die Werte des Kartoffelperiderms durch die Anzahl der Zelllagen dividiert, so erhielt man den mittleren Gehalt an Suberin pro Zelllage und Fläche. Es ergaben sich Suberinmengen von $34.4\text{-}75.3 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($13.5\text{-}30.2 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$). Aus den ermittelten Leitwerten ließ sich analog der Leitwert pro Zelllage ermitteln, welcher zwischen $9.44 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ und $6.19 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ lag.

Ziel der Modellrechnungen ist es einen Faktor (a_{sub}) zu ermitteln, mit dem man in der Lage ist aus dem analytisch bestimmten Suberingehalt (m_{sub}) eines Gewebes eine Aussage über die mögliche Barrierefunktion der suberinisierten Zellwand mit der Angabe eines potenziellen Leitwertes zu treffen.

Als Datenbasis für die Ermittlung des Faktors (a_{sub}) dienten die gemittelten Suberinmengen und Leitwerte aus ca. 45 natürlichen extrahierten Kartoffelperidermen der vorangegangenen Untersuchungen in dieser Arbeit. Hierzu wurde aus den Leitwerten pro Zelllage und den Suberinbelegungen pro m^2 und Zelllage Durchschnittswerte (Mittelwerte) gebildet, die für die folgende Berechnung des Faktors verwendet wurden.

Eine direkte Möglichkeit zur Ermittlung der Leitwerte bietet die grafische Methode, durch Extrapolation der Datenpunkte aus der Datenbasis in Abb. 8.54.

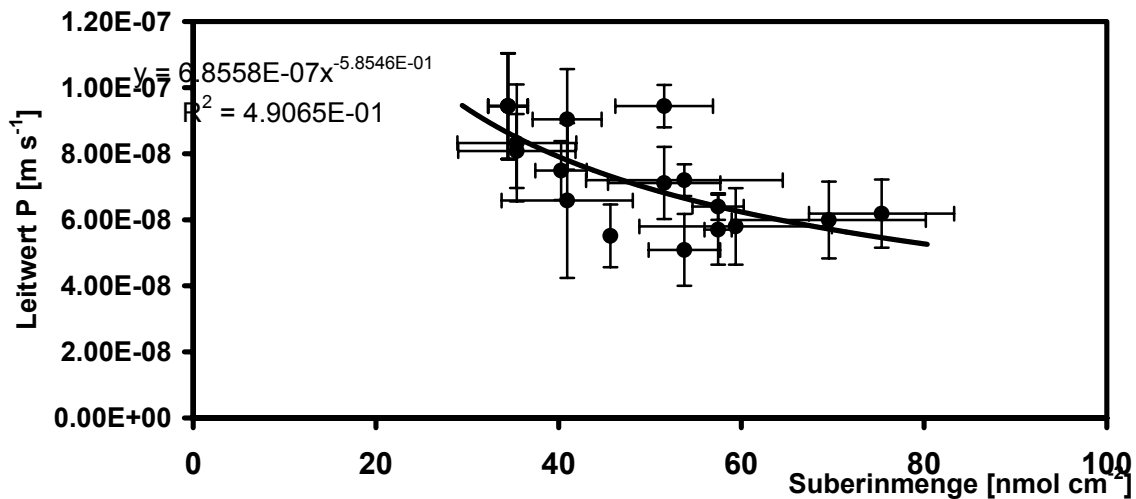


Abb. 8.54: Suberinbelegung (nmol cm^{-2}) pro Zellauftrag in extrahiertem natürlichem Kartoffelperiderm aufgetragen gegen den Leitwert pro Zellauftrag (m s^{-1}); (Fehlerbalken = StabWN).

Eine weitere Methode ist die Berechnung eines Faktors aus den Mittelwerten des Basisdatensatzes:

Da sich der Suberingehalt umgekehrt proportional zum Leitwert verhält, ergibt sich Gleichung 8.2a mit a_{sub} als Proportionalitätsfaktor und m_{sub} als Suberinmenge.

$$P = \frac{a_{\text{sub}}}{m_{\text{sub}}} \quad \text{Gl 8.2 a}$$

aufgelöst nach a_{sub} :

$$P \cdot m_{\text{sub}} = a_{\text{sub}} \quad \text{Gl 8.2 b}$$

mit: $P = \text{Leitwert } [\text{m s}^{-1}]$
 $a_{\text{sub}} = \text{Proportionalitätsfaktor } [\text{mmol m}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ oder } \text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}]$
 $m_{\text{sub}} = \text{Suberinmenge pro Fläche } [\text{mmol m}^{-2} \text{ oder } \text{kg m}^{-2}]$

Um einen Vergleich der Suberingehalte und Leitwerte anderer Gewebe zu berechnen, wurde ein universeller Proportionalitätsfaktor a_{sub} nach Gl. 8.2b mit der oben erwähnten Datenbasis berechnet. Es ergaben sich folgende Werte:

$$a_{\text{sub}} = 3.5578 \cdot 10^{-8} \text{ mmol m}^{-1}\text{s}^{-1} (\pm 1.06 \cdot 10^{-9})$$

oder

$$a_{\text{sub}} = 1.3942 \cdot 10^{-8} \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1} (\pm 3.25 \cdot 10^{-10})$$

Anhand der durch chemische Analysen ermittelten Daten für m_{sub} kann man nun mit dem bekannten a_{sub} nach Gl. 8.2a einen Leitwert für das untersuchte Gewebe berechnen.

Eine Bewertung dieser Berechnungen konnte im Vergleich eines berechneten Leitwertes mit dem in Experimenten ermittelten Leitwertes an gleichem Wurzelmaterial erstellt werden. Die zuverlässigste Methode der Ermittlung hydrostatischer Leitfähigkeiten (L_p) in Pflanzenwurzeln besteht in Messungen mit der Wurzeldruckmesssonde (STEUDLE und PETERSON, 1998; STEUDLE und ZIMMERMANN, 1974), die so gewonnenen Daten lassen sich leicht in Leitwerte (P) umrechnen (DAINTY, 1963)(Gl. 2.11). Untersuchungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe STEUDLE an Wurzeln von 12 Tage alten Maiskeimlingen zeigten innerhalb einer Größenordnung eine Übereinstimmung der gemessenen hydrostatischen Leitwerte (L_p) von seitenwurzelfreien Maiswurzelabschnitten mit den Summen der berechneten Leitwerte aus den Suberinmengen von EZW und RHZW bei beiden Ermittlungsmethoden (Tab. 8.3). In diesem Fall erzielt die grafische Ermittlung ein besseres Ergebnis, das sehr nahe an das Gemessene heranreicht.

Tabelle 8.3: Vergleich ausgewählter hydraulischer Wurzeleitfähigkeiten von *Zea mays* verschiedener Anzuchten (hydroponisch mit und ohne Sauerstoff im Nährmedium) mit den anhand des Suberingehaltes berechneten Leitwerten. Die hydraulischen Wurzeleitfähigkeiten L_p wurden vorher in Leitwerte P umgerechnet (Gl. 2.11).

Mais Anzucht	RHZW Zone I		EZW Zone I		Vergleich		
	Suberin [nmol cm ⁻²]	P_{RHZW} berechnet ^{a)} 10 ⁻⁶ [m s ⁻¹]	Suberin [nmol cm ⁻²]	P_{EZW} berechnet ^{a)} 10 ⁻⁶ [m s ⁻¹]	Rechnung P A ^{b)} 10 ⁻⁶ [m s ⁻¹]	Messung P B ^{c)} 10 ⁻⁶ [m s ⁻¹]	P 10 ⁻⁶ [m s ⁻¹]
aerob	2.89	1.23	2.25	1.58	0.69	1.96	4.24
anaerob	5.50	0.64	2.50	1.42	0.44	3.05	5.98

a) P berechnet mithilfe der Formel und dem Faktor a_{sub} ; b) P berechnet sich aus der Summe der Kehrwerte der berechneten P_{RHZW} und P_{EZW} ; c) Grafisch ermittelt aus der Trendlinie ($y = 6.86 \cdot 10^{-7} \cdot x^{-0.58}$) von Abb. 8.54.

Die in dieser Arbeit gefundenen Hinweise auf einen berechenbaren Einfluss des Suberingehaltes der apoplastischen Barrieren auf den Leitwert, bietet mit Einschränkungen ein hilfreiches Werkzeug zur Aufklärung der Funktion apoplastischer Barrieren. Bislang ist dieses Modell noch recht grob, und vernachlässigt die Struktur und Qualität des jeweiligen Suberins der untersuchten Arten, aber mit dieser Rechenmethode lässt sich auf jeden Fall in etwa die Größenordnung der zu erwartenden Leitfähigkeiten für Wasser aus dem Suberingehalt abschätzen. Durch eine bessere Datengrundlage die für jede Spezies einen eigenen Faktor a_{sub} verwendet, könnte die Methode an die spezifischen Suberinstrukturen angepasst werden. Veränderungen im Suberingehalt einer Spezies könnten so direkt mit veränderten Leitwerten korreliert werden.

Interessanter ist es aber, die Auswirkung des Suberingehaltes auf die Leitfähigkeit für gelöste Stoffe zu untersuchen. Bei Messungen an intakten Kartoffelperidermen fanden ERSÖZ und DUNCAN (1996, 1995, 1994) eine Abhängigkeit der Diffusionsgeschwindigkeit vom Ionenradius. Cäsium-Ionen diffundierten mit $9.5 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ mal schneller durch die

Peridermen als Li-Ionen ($3.4 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$). Innerhalb der Alkalimetall-Ionen ergab sich eine Reihenfolge in der Diffusionsgeschwindigkeit von $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. Rubidium-Ionen wurden nicht getestet. Auch die Transporteigenschaften für Aminosäuren und Pflanzenschutzmittel (ERSÖZ *et al.*, 1996, 1995) wurden an intakten Kartoffelperidermen getestet. Leider lassen sich aus diesen Daten keine Rückschlüsse auf die Transporteigenschaften der extrahierten Periderme und somit des Suberins ziehen. In zukünftigen Projekten sollte daher die Ermittlung von Transportdaten für Ionen an extrahierten Kartoffelperidermen ein wichtiges Ziel darstellen, um Ionenflüsse an suberinisierten Geweben berechenbar zu gestalten.

9 Zusammenfassende Diskussion

9.1 Suberin, Bedeutung, Struktur und Funktion

Das lipophile Polymer Suberin besitzt wasserabweisende Eigenschaften, die mit den Gebrauch von Borke der Korkeiche seit dem frühen 18. Jahrhundert als Flaschenkork und bei vielen weiteren Anwendungen ausgenutzt wurden (SANTOS, 2000). Struktur und vor allem die Zusammensetzung des Suberins oder suberinisierter Zellwände wurden schon in den 1970er Jahren teilweise aufgeklärt. Dies jedoch meist nur an leicht zugänglichen Abschlussgeweben von Bäumen, die große Mengen Suberin enthalten wie z.B.: von der Borke der Korkeiche, *Quercus suber* (HOLLOWAY, 1983, 1982), allerdings nur selten an krautigen Pflanzen. Eine Ausnahme bildeten die Sprossknollen der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) deren Periderm und insbesondere deren Wundperiderm zu den am häufigsten untersuchten suberinisierten Zellwänden gehören. Auch hier sind große Mengen Suberin leicht zugänglich erhältlich (BINNEMAN, 1973). Diese Untersuchungen bestimmten das Bild des Suberins bis heute entscheidend (KOLATTUKUDY, 2001), obwohl sich die Monomerenzusammensetzung der Suberinbestandteile zwischen verschiedenen Spezies aber auch innerhalb unterschiedlicher Genotypen einer Spezies und zwischen unterschiedlichen Entwicklungsstadien der gleichen Spezies, stark unterscheiden können. Dies sind Befunde neuerer Arbeiten (z.B.: SCHREIBER *et al.*, 1999). Aber auch im Rahmen dieser Dissertation konnte eine hohe Variabilität in der Substanzklassenverteilung gefunden werden. Suberinanalysen von Wurzelgewebe wurden vor den Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe nur in wenigen anderen Arbeiten publiziert (MATZKE und RIEDERER, 1996; POZUELO *et al.*, 1984; HOLLOWAY 1982), jedoch besteht ein steigendes Interesse an der Materie Suberin, was durch die bis zum Jahr 2000 stark gestiegene Zahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet belegt werden kann (Abb. 9.1).

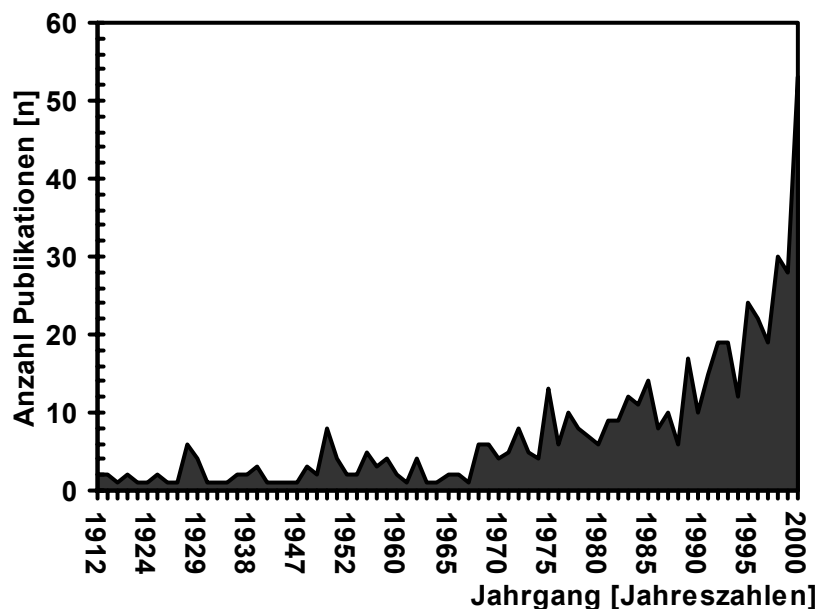


Abb. 9.1: Anzahl der Publikationen über Suberin (pflanzenanatomisch und chemisch), Recherche via SciFinder™ Datenbanken (CAPLUS, MEDLINE) Suchwort „Suberin“

Die zunehmende Zahl von Veröffentlichungen ist mit Sicherheit auch durch die Verbreitung moderner Analysetechniken zu erklären, welche die Voraussetzung für strukturelle Analysen des Suberins darstellen. Neben der vollständigen und partiellen Depolymerisierung des Suberins durch Umesterungsreaktionen und Analyse der erhaltenen Monomere mittels chromatographischer und spektroskopischer Methoden wurde auch versucht die Verknüpfung und den räumliche Bau des Suberins mit Festkörper (CP/MAS)-NMR und der mehrdimensionalen Lösungsmittel-NMR Spektroskopie zu ergründen (z.B. ROCHA *et al.*, 2001; STARK *et al.*, 2000; LOPES *et al.*; 2000; GIL *et al.*, 1997).

Heute geht man davon aus, das Suberin aus einem aliphatischen Polyester und einer aromatischen Domäne besteht. Die aromatische Domäne ist aus estergebundenen Zimtsäurederivaten und Ligninbausteinen zusammengesetzt und sie stellt eine Verbindung zu den Kohlenhydraten der Zellwand her (z.B.: BERNARDS, 2002; KOLATTUKUDY, 2001; LOPES *et al.*, 2000b) (Abb.9.2). Erst in jüngerer Zeit konnte Glycerin als ein weiterer wesentlicher Suberinbaustein identifiziert werden, der für die Verknüpfung des aliphatischen Anteils im Polymer eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, aber auch bei der Verknüpfung des aromatischen mit dem aliphatischen Teil (z.B.: GRAÇA und PEREIRA, 1997).

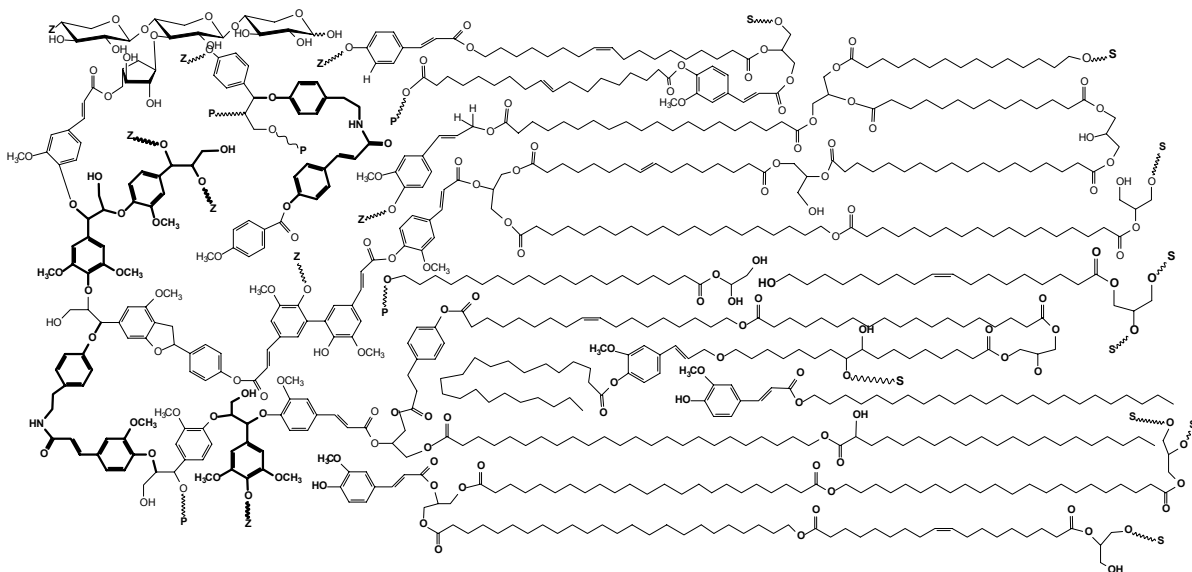


Abb. 9.2: Zweidimensionaler Strukturausschnitt einer Suberinschicht in Periderm (z.B.: Kartoffel, Borke, Wurzelrinde, auch Suberinlamelle) modifiziert nach BERNARDS (2002), die aliphatische Domäne rechts, entspricht einer Breite von ca. 5.9 nm. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (z.B. SCHMIDT und SCHÖNHERR, 1982) haben eine 4-10 nm breite elektronendurchlässige Schicht in Kartoffelperiderm gezeigt, deren Dicke also vergleichbar mit etwa zwei verknüpften C₂₀-Körpern (ca. 9.4 nm) ist. Gestützt wird diese Darstellungsweise auch von GIL *et al.* (1997) durch den Nachweis zweier Methylen-Domänen, in MAS-NMR Experimenten (beweglichere und unbewegliche Methylen-Protonen in den Ketten fern, oder nahe zum phenolischen Bereich). Der aromatische Bereich befindet sich auf der rechten Seite. Fettgedruckte Aromaten lassen sich dem Lignin zuordnen, S bedeutet Verknüpfung zum Suberin, Z Verknüpfung zu Kohlenhydraten (meist über Arabinose verknüpft), P Verknüpfung zu phenolischen Komponenten. Der Strukturausschnitt zeigt lediglich eine zweidimensionale Schicht des dreidimensionalen Polymers, einer Suberinlamelle, CASPARY-Streifen Suberin ist vermutlich abweichend aufgebaut und enthält zusätzlich Zellwandspezifische Proteine (ZEIER, 1998).

Glycerin konnte auch im Rahmen dieser Arbeit in allen untersuchten Suberinanalysen gefunden werden, jedoch meist nur in geringen Mengen, da durch die wässrige Aufarbeitung ein Großteil des Glycerins verloren ging. Lediglich in Stichproben wurde der wässrige Rückstand analysiert, hier konnten größere Mengen Glycerin gefunden werden, auf die Darstellung dieser lückenhaften Daten wurde aber verzichtet. Allerdings wurde deutlich, dass die ermittelten Stoffmengen von etwa 2 mmol mg^{-1} Glycerin bei weitem ausreichten, alle errechneten freien Säuregruppen zu verestern, die nur $0.2\text{-}0.3 \text{ mmol mg}^{-1}$ des Trockengewichts ergaben. Jedes Glycerin-Molekül könnte rechnerisch drei Säuregruppen verestern, somit bis zu 6 mmol mg^{-1} . Aus dieser Modellrechnung wird deutlich, dass anscheinend ein großer Überschuss an Glycerin im Suberin existiert. Nähme man an, dass alle Säuren mit Glycerin verknüpft würden, bestünde noch ein Überschuss von etwa 5 mmol mg^{-1} Hydroxygruppen. Das Glycerin scheint also noch mit anderen Zellwandkomponenten verbunden zu sein, oder ist als eine Art Weichmacher zwischen den Polymerketten eingelagert. Der Zusammenhang zwischen Glyceringehalt und der Anzahl ungebundener Carboxygruppen sollte aber in weiteren Arbeiten berücksichtigt werden und nach Möglichkeit versucht werden die Glycerinmengen zum Beispiel mit der Natriummethanolat-Depolymerisierungsmethode quantitativ zu erfassen und ebenfalls mit dieser milden Methode erfassbaren Dimere und Oligomere zu charakterisieren.

Zimtsäurederivate, vor allem Ester der Cumar- und Ferulasäure wie sie in vielen Zellwandfraktionen gefunden wurden, sind Hauptbestandteile der aromatischen Domäne, des zweiten wichtigen Teil des Suberinpolymers. Dieser Teil des Suberins soll durch die antimikrobielle Wirkung stark zur Pathogenabwehr beitragen. Aber auch im aliphatischen Teil beziehungsweise in eingelagerten Wachsen finden sich Ferulasäureester. Ferula- und Cumarsäureester scheinen aber auch eine entscheidende Rolle bei der Verknüpfung des aliphatischen Suberins mit dem aromatischen sowie mit der aus Kohlenhydraten aufgebauten Zellwand zu spielen. So wurden Konjugate der Ferulasäure und der Cumarsäure mit Fettsäuren (GRAÇA und PEREIRA, 2000a,b), sowie mit Arabino-Xylanen gefunden (HATFIELD *et al.*, 1999b). Letzterer Befund kann auch zur Erklärung der hohen Arabinose-Gehalte in isolierten RHZW und EZW beitragen (ZEIER, 1998).

Trotz der Anwendung vieler moderner Messmethoden ist es bislang noch nicht gelungen ein überzeugendes dreidimensionales Bild von Suberin zu ermitteln, beziehungsweise das Polymer zum Beispiel mit quantenchemischen Methoden zu modellieren. Dies würde helfen, die Eigenschaften des Polymers besser zu verstehen. Die Abbildung 9.2 stellt eine Möglichkeit dar, wie eine Suberinlamelle in Kartoffeln beschaffen sein könnte, jedoch zeigen die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten eine hohe Diversität der Zusammensetzung des Suberins, nicht nur unter den Arten, sondern auch bei verschiedenen Genotypen einer Art.

Neben der, bislang nur teilweise, gelungenen Aufklärung des räumlichen Baus von Suberin und suberinisierten Zellwänden konnten Fortschritte in der Aufklärung der Biosynthese des Suberins erzielt werden (BERNARDS, 2002; KOLATTUKUDY 2001). Der aliphatische Teil des

Suberins wird über den Fettsäuremetabolismus gebildet und die für den Aufbau der Plasmamembran verwendeten C₁₆ und C₁₈-Fettsäuren werden über Elongasen verlängert (SCHREIBER *et al.*, 2000; DOMEREGUE *et al.*, 1998; WALKER und HARWOOD, 1986). Cytochrom P450 enthaltende Enzymsysteme sorgen für eine Hydroxylierung, oder weitere Oxidationsstufen des Kohlenstoffes (LEBOUQUIN *et al.*, 2001; PINOT *et al.*, 1992,1993; AGRAWAL und KOLATTUKUDY, 1978). Die Zimtsäure-Derivate der aromatischen Domäne werden über den Shikimisäure-Phenylpropanoid Weg synthetisiert. Ein aktuelles und umfassendes Bild der Suberinbiosynthese zeigt neben KOLATTUKUDY (2001) vor allem der Übersichtsartikel von BERNARDS (2002).

Ein weiterer wichtiger Aspekt in dieser Arbeit war die erstmalige Berücksichtigung der Suberinstoffmengen, die eine Berechnung verschiedenster Kennzahlen für das Polymer ermöglicht (z.B. mittlere Kettenlänge, oder die Konnektivität). Zusammen mit dem Bezug auf die Oberfläche der jeweiligen Organe wird das Bild der suberinisierten Barrieren deutlicher und ein Vergleich der Spezies einfacher. Durch die Erfassung dieser Parameter konnte mit dieser Arbeit eine Grundlage geschaffen werden, die für die Analyse der Eigenschaften dieser Gewebe von Bedeutung sein wird. Es wurde gezeigt, dass die Verlängerung der Kette um eine Methylen-Einheit den Diffusionswiderstand in künstlichen Monolayern um etwa das doppelte erhöht, was die Bedeutung der Kenntnis der mittleren Kettenlänge des Polymers für die Funktionsbewertung betont (ARCHER und LA MER, 1955).

Da in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Bezug zwischen Gewebeoberfläche und der Polymermenge hergestellt werden konnte, mussten für einen Vergleich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen die Oberflächen/Gewichtsbezüge der dort verwandten Gewebe ermittelt werden. Da diese Untersuchungen schon längere Zeit zurücklagen, konnte nicht mit demselben Material gearbeitet werden. Daher wurde genetisch identisches Pflanzenmaterial verwendet und die erforderlichen Parameter durch mikroskopische Analyse und Isolation der Zellwandfraktionen ermittelt. Die Daten wurden daher nicht konsistent ermittelt, jedoch wird deutlich, dass Spezies mit mehrlagiger Hypodermis auch eine höhere Suberinbelegung aufweisen (Tab. 9.1). Diese Aussage konnte aus den reinen Trockengewichtsbezügen nicht getroffen werden (SCHREIBER *et al.*, 1999). Mit steigendem Durchmesser der Wurzeln konnte, mit Ausnahme der Baumwurzeln (*Quercus*, *Fagus*, *Picea*), eine steigende Suberinbelegung festgestellt werden. Für die Zellwände der Endodermis konnte kein Zusammenhang der Suberinbelegung mit der Entwicklungsstufe hergestellt werden (Tab. 9.1).

Tab. 9.1.: Flächenbelegung apoplastischer Barrieren mit aliphatischen Suberin in $\mu\text{g cm}^{-2}$, sortiert nach Suberingehalt der RHZW; von Arten die nicht in dieser Arbeit behandelt wurden, wurde die Suberinbelegung durch nachträglich bestimmte Wurzeloberflächen- und Gewichtsparametern von Pflanzen gleichen Genotypes ermittelt.

Art	RHZW alip. Suberin [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	Anatomie	EZW alip. Suberin [$\mu\text{g cm}^{-2}$]	Anatomie Stadium I-III ^{c)}
<i>Quercus robur</i> ^{a)}	600	multi ^{b)}	--	n.d. ^{d)}
<i>Fagus sylvatica</i> ^{e)}	330	multi	--	n.d.
<i>Solanum tuberosum</i> natürl. ^{f); e)}	180	multi	--	n.d.
<i>Iris germanica</i> ^{a)}	95.0	multi	20.8	III
<i>Solanum tuberosum</i> Wund. ^{g); e)}	75.0	multi	--	n.d.
<i>Monstera deliciosa</i> Luftwurzel ^{a)}	53.7	multi	0.23	I
<i>Picea abies</i> ^{e)}	40.0	multi	--	n.d.
<i>Aspidistra eliator</i> ^{a)}	12.6	multi	2.10	III
<i>Agapanthus africanus</i> ^{a)}	11.0	multi	2.89	III
<i>Clivia miniata</i> ^{a)}	5.42	multi	0.69	I
<i>Oryza sativa</i> ^{h)}	4.53-9.58	RHZW	9.61-17.2	III
<i>Pisum sativum</i> ^{a)}	3.31	RHZW	7.54	I
<i>Ricinus communis</i> (Sanguines) ^{e)}	2.81-10.6	RHZW	22.5	II
<i>Zea mays</i> (Helix) ^{e)}	0.51-2.43	RHZW	0.61-1.24	I-III
<i>Cicer arietinum</i> ^{a)}	0.41	RHZW	22.4	II

a) SCHREIBER *et al.*, 1999; b) multi = mehrschichtige Hypodermis; c) III = tertiäres Stadium; II = sekundäres Stadium (Suberinlamelle); I = CASPARY-Streifen; d) n.d. = nicht vorhanden; e) diese Arbeit; f) natürliches Periderm; g) Wundperiderm; h) EFFINGER, 2002.

In zukünftigen Untersuchungen sollte auf jeden Fall die Flächenbelegung des Suberins ermittelt werden, da nur über diese Größe ein funktioneller Bezug möglich ist. Allerdings ist auch dieser Bezug nicht unproblematisch, da zum Beispiel im CASPARY-Streifen das Suberin sehr lokal begrenzt vorkommt und die tatsächliche molekulare Anordnung unbekannt ist. Wenig berücksichtigt wurden bislang lösliche Wachse in Suberinlamellen und CASPARY-Streifen. Jedoch kommt diesen Komponenten der suberinisierten Zellwände mit Sicherheit eine führende Rolle in der Reduktion der Wasserleitfähigkeit zu, was die Ergebnisse am Kartoffelperiderm deutlich zeigten. Bislang wurden aber an Wurzeln nur in seltenen Fällen wachstartige aliphatische Substanzen gefunden, zumeist dominieren hier Phytosterine und Triterpene (siehe z.B. Kapitel 5.2).

Ein weiterer Aspekt zur Beurteilung der Suberinqualität ist die Konnektivität des Suberins. Zur Bestimmung der Konnektivität des Polymernetzes, wurde die Anzahl (Mol) der Carboxygruppen mit der Anzahl (Mol) der Hydroxygruppen in den nachgewiesenen Suberin-Monomeren verglichen ((Mol Carboxygruppen) – (Mol Hydroxygruppen) = (Mol freie Carboxygruppen)). Diese Rechnung konnte nur durch die Kenntnis der Stoffmenge der einzelnen Suberinkomponenten durchgeführt werden, was erstmals in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Bei allen untersuchten Spezies ergab sich ein Überschuss an Carboxygruppen (Tab. 9.2).

Tab. 9.2: Anzahl nicht im Suberin gebundener Säuregruppen in % aller Carboxygruppen

<i>Z. mays</i>	<i>T. glauca</i>	<i>R. communis</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>V. faba</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>F. sylvatica</i>	<i>P. abies</i>
24-55%	18-84%	50-60%	67-68%	44-68%	8%	5%	56%

Ein niedriger Verknüpfungsgrad mit großer Anzahl freier Carboxygruppen bedeutet in Analogie zu technischen Polymeren ein flexibleres, durchlässigeres Polymer, eine niedrige Anzahl freier Carboxygruppen sollte ein steiferes, dichteres Polymer ergeben.

Einschränkend muss hier gesagt werden, dass wegen fehlender quantitativer Analysen des vermutlich quervernetzenden Triols Glycerin es nicht möglich war einen Bezug zu der tatsächlichen Anzahl freien Säuregruppen herzustellen. So lässt sich nur vermuten, dass Gewebe mit hoher Anzahl ungebundener Säuregruppen entsprechend hohe Mengen Glycerin enthalten, die die geringere Anzahl Hydroxygruppen in den langkettigen Suberinmonomeren ausgleichen.

9.2 Transporte von Wasser und Ionen durch apoplastische Barrieren in den Wurzel verschiedener Pflanzenarten

In mikroskopischen Schnitten der Pflanze sind hohe Konzentrationen von Suberin mit histochemischen Methoden leicht nachweisbar, und es wurde in vielen Abschlussgeweben identifiziert. In der Regel wurde daraus die Schlussfolgerung gezogen, dass Suberin maßgeblich an der Abdichtung von Abschlussgeweben oder Wundstellen gegen Wasserverlust beteiligt ist. Allerdings wurde in der Vergangenheit auch gezeigt, das extrahiertes Kartoffelperiderm, das zu einem hohen Prozentsatz aus Suberin besteht, eine wesentlich höhere Leitfähigkeit besitzt als das intakte nicht extrahierte Periderm (SOLIDAY *et al.*, 1979; VOGT *et al.*, 1983). Mit der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel der Kartoffel eindeutig gezeigt werden, dass zwischen der Suberinmenge in der Zellwand und der Leitfähigkeit für Wasser kein Zusammenhang besteht, jedoch eine starke Korrelation zwischen der Menge der extrahierbaren Wachse und der Abnahme der Leitfähigkeit besteht.

Mit der Verwendung von nicht-symplastisch wandernden Farbstoffen zum Nachweis des apoplastischen Wasserflusses wurde gezeigt, dass apoplastische Barrieren effektiv in der Lage sind diese Moleküle zurückzuhalten. Ein Rückschluss auf die Eigenschaften für den Wassertransport ist mit diesen Methoden allerdings nicht möglich (ZIMMERMANN und STEUDLE, 2000). Diese Experimente zeigen aber die Barriereigenschaften einer Hypodermis mit CASPARY-Streifen, oder einer ebenso imprägnierten Endodermis für große Farbstoffe und geladene Moleküle wie Ionen. Mit spektroskopischen Methoden konnte die Rückhaltefunktionen der Suberin-enthaltenden Zellwände für z.B. Rubidium und Lanthan-Ionen gezeigt werden (GIERTH *et al.*, 1999; LEHMANN *et al.*, 2000; PETERSON *et al.*, 1986; DU

PONT und LEONARD, 1977; NAGAHASHI *et al.*, 1974). Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass zusätzlichen Suberineinlagerungen in Maiswurzeln mit einer erhöhten Rückhaltefunktion für den Ionen-transport korreliert sind (Kapitel 7.4.2). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Wasserrückhaltekapazität exodermaler Pflanzen deutlich höher war, als die nicht exodermaler Pflanzen, was unter anderem durch Austrocknungsexperimente (TALEISNIK *et al.*, 1999) und Diffusionsexperimente von ABA belegt werden konnte (HOSE *et al.*, 2001).

Bessere Möglichkeiten für die Analyse des Wassertransportes bietet die Druckmesssondentechnik (STEUDLE und PETERSON, 1998; STEUDLE *et al.*, 1998; STEUDLE und FRENSCH, 1996; STEUDLE, 1994; STEUDLE, 1993; STEUDLE *et al.*, 1987; STEUDLE und ZIMMERMANN, 1974), mit der auch im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Zusammenhang zwischen Suberingehalt der Hypodermis in Mais und der hydraulischen Leitfähigkeit (L_p) hergestellt werden konnte, mehr Suberin führte zu einem höheren Widerstand (ZIMMERMANN *et al.*, 2001).

Die Wasserleitfähigkeit isolierter suberinisierter Barrieren zu messen ist bislang zum Beispiel an Kartoffelperiderm (SOLIDAY *et al.*, 1979; VOGT *et al.*, 1983), röhrenförmigen Wurzelsegmenten von *Opuntia ficus-indica* (NORTH und NOBEL, 1996) oder an hypodermalen Zellwänden von *Clivia miniata* (CASADO und HEREDIA, 1998) gelungen. Jedoch wurde in keiner dieser Untersuchungen ein quantitativer Zusammenhang zwischen Suberingehalt und den Wassertransporteigenschaften hergestellt, da der Suberingehalt nicht gemessen wurde. Daher wurden in dieser Arbeit erstmals Daten der Wasserpermeabilität, der Wachs- und der Suberinbelegung an dem einheitlichen System Kartoffelperiderm gleichzeitig ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Leitfähigkeit zwischen den unterschiedlich stark suberinhaltigen extrahierten natürlichen Peridermen verschiedenen Alters festgestellt werden. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen natürlichem und Wundperiderm konnte festgestellt werden, Wundperiderm wies jedoch auch bis zu einer Größenordnung geringere Suberinmengen pro Zelle auf.

Der Leitwert-Suberinmengen-Bezug aus den Daten der natürlichen extrahierten Kartoffelperiderme (Kapitel 8.8.4.1) wurde herangezogen, um die zu erwartenden Leitwerte für einlagige suberinisierte und extrahierte apoplastische Barrieren analog der in Kapitel 8.8.4.1 vorgestellten Methode abzuschätzen. Die berechneten Werte korrespondieren nur in wenigen Fällen gut mit den experimentellen Ergebnissen, meist werden um ein bis mehrere Größenordnung niedrigere Leitwerte berechnet, obwohl hier nur die Suberinmengen in den RHW zur Berechnung herangezogen wurden. Vor allem in besonders stark suberinisierten Materialien wie Eichen oder Buchenwurzeln scheint der Widerstand für Wasser durch die Suberinmengen kaum beeinflusst zu werden, da die gemessenen Werte drei Größenordnungen über den berechneten liegen (Tab. 9.3). Einschränkend muss gesagt werden, dass die Berechnung von einer hypothetischen Monoschicht ausgeht, wodurch die Diskrepanz zwischen Rechnung und Messwert entstehen kann, da die am meisten abweichenden Gewebe

aus bis zu 15 Schichten bestanden, was nicht von der auf Monoschichten ausgelegte Berechnungsformel (Gl. 8.2a) berücksichtigt wird.

Tab. 9.3: Suberinbelegung einer hypothetischen Monoschicht aus dem aliphatischem RHZW-Suberin im Vergleich mit berechneten (nach Gl. 8.2a) und verschiedenen experimentellen Techniken ermittelten hydraulische Leitfähigkeiten verschiedener Arten und Aufzuchtverfahren.(Fehler \pm = Standardabweichung).

Art	Aliph. Suberin in RHZW [nmol cm ⁻²]	L _p (berechnet) [m s ⁻¹ MPa ⁻¹]	L _p (gemessen) [m s ⁻¹ MPa ⁻¹ ·10 ⁻⁸]
<i>Quercus robur</i> (2 mm Durchmesser.) ^{a)}	1778	4.48·10 ⁻¹¹	1.27±0.67 ^{b)}
<i>Fagus sylvatica</i> (2 mm Durchmesser.) ^{a)}	1008	7.89·10 ⁻¹¹	2.87±1.66 ^{b)}
<i>Solanum tuberosum</i> natürlich ex ^{a)}	487	1.30·10 ⁻⁸	1.30±0.50
<i>Solanum tuberosum</i> Wundperiderm ex ^{a)}	200	7.97·10 ⁻⁸	7.97±0.54
<i>Picea abies</i> (2 mm Durchmesser.) ^{a)}	126	6.31·10 ⁻¹⁰	3.94±1.08 ^{b)}
<i>Zea mays</i> L. (Helix) hydro. aerob ^{c)}	2.89	2.75·10⁻⁸	9.50 ±3.7
<i>Zea mays</i> L. (Helix) hydro. anaerob ^{c)}	5.50	1.45·10 ⁻⁸	13.4 ±6.0
<i>Zea mays</i> L. (Helix) aeroponic ^{a)}	7.13	1.12·10 ⁻⁸	11.0 ±6
<i>Zea mays</i> L. (Helix) hydro. aerob ^{a)}	3.04	2.62·10 ⁻⁸	18.0 ±7
<i>Oryza sativa</i> L. (IR64) hydro. anaerob ^{c)}	10.90	7.31·10 ⁻⁹	4.30 ±0.9
<i>Oryza sativa</i> L. (IR64) hydro. aerob ^{c)}	13.70	5.82·10 ⁻⁹	3.70 ±0.6
<i>Oryza sativa</i> L. (IR64) aeroponic ^{c)}	6.21	1.28·10⁻⁸	2.30 ±1.1
<i>Oryza sativa</i> L. (Azucena) hydro.aerob ^{c)}	23.50	3.38·10 ⁻⁹	5.00 ±2.5
<i>Clivia miniata</i> ^{d)}	5.42µg cm ⁻²	5.76·10 ⁻⁹	0.50 ^{e)}

a) diese Arbeit, Leitwerte der Kartoffeln sind Mittelwerte und stammen von extrahiertem Material b)CONERS, 2001; c) EFFINGER, 2002; d) Schreiber *et al.*, 1999, keine Stoffmengenangabe möglich, Oberflächenbezug=diese Arbeit; e) CASADO und HEREDIA, 1998, nicht extrahierte Zellwände

Eine Wirkung der Suberinmengen auf den Wassertransport lässt sich nach Tab. 9.3 kaum abschätzen, allerdings sind die Vergleichswerte immer an intakten Pflanzen ermittelt worden und die Suberinqualität wurde nicht berücksichtigt. Es ist aber nicht anzunehmen, dass sich bestimmte hydrophilere Suberinzusammensetzungen so deutlich auf die Barriere für Wasser auswirken, dass der Leitwert um drei Größenordnungen steigt. Bei niedrigen Suberinkonzentrationen steigt aber die Zuverlässigkeit der Vorhersage, was im Bezug auf endodermale Suberinkonzentrationen durchaus interessant ist, da es bei diesen Geweben am schwersten sein wird physiologisch unabhängige Daten zu gewinnen, was bei den außen liegenden Peridermen und oft mehrlagigen Hypodermen durchaus im Bereich des experimentell zugänglichen liegt, wie die Experimente von CASADO und HEREDIA (1998) zeigten.

Der Apoplast der Wurzel vieler Pflanzen weist eine hohe Variabilität auf (z.B. Aerenchymbildung, Sklerenchymschichten, mehrlagige Hypodermen, Interzellularen). Dies deutet auf vielfältige Strategien für den Transport von Wasser und Ionen hin. Daher ist der

Parameter der Hydrophobisierung spezieller Zellwände zur Regulation des Wasserhaushaltes ein wichtiges Stellglied in einem komplizierten Regelkreis. Genauso wichtig wie die Beeinflussung der Leitfähigkeit für Wasser ist aber auch die Wirkung apoplastischer Barrieren als Filter für Ionen und kleine Moleküle, im Sinne einer Regulation der Ionenflüsse in den vielfach geregelten Transport des Symplasten. Das ist insbesondere wichtig, da alle höheren Pflanzen eine Endodermis besitzen, die den Wurzelcortex von den Leitelementen trennt, und diese durchquert werden muss. Es ist daher sinnvoll, die Permeationsparameter von Ionen, Gasen und kleinen Molekülen mit dem hier eingeführten Modellsystem des Kartoffelperiderms zu ermitteln und analoge Berechnungen zur Leitfähigkeit durchzuführen. Im Sinne eines Mehrkomponentenmodells für den Wassertransport, spielen apoplastische Barrieren eine wichtige Rolle, denn ihnen kommt eine Funktion in der Grobregulierung der Wasser und der Ionenflüsse zu. Bis zu 95% des benötigten Wassers werden über den Wurzelapoplasten von der Pflanze aufgenommen (ZIMMERMANN, 2001). Der hochregulierte Transport von Wasser über den Symplasten spielt für den Spross daher nur eine untergeordnete Rolle. Einschränkungen im apoplastischen Raum wie zum Beispiel der Einbau einer suberinisierten Exodermis sollten dagegen spürbare Auswirkungen zeigen.

Die Regulation des symplastischen Wasserhaushaltes geschieht über sehr selektive Wasserporen in der Zellmembran, so genannte Aquaporine (Abb. 9.1).

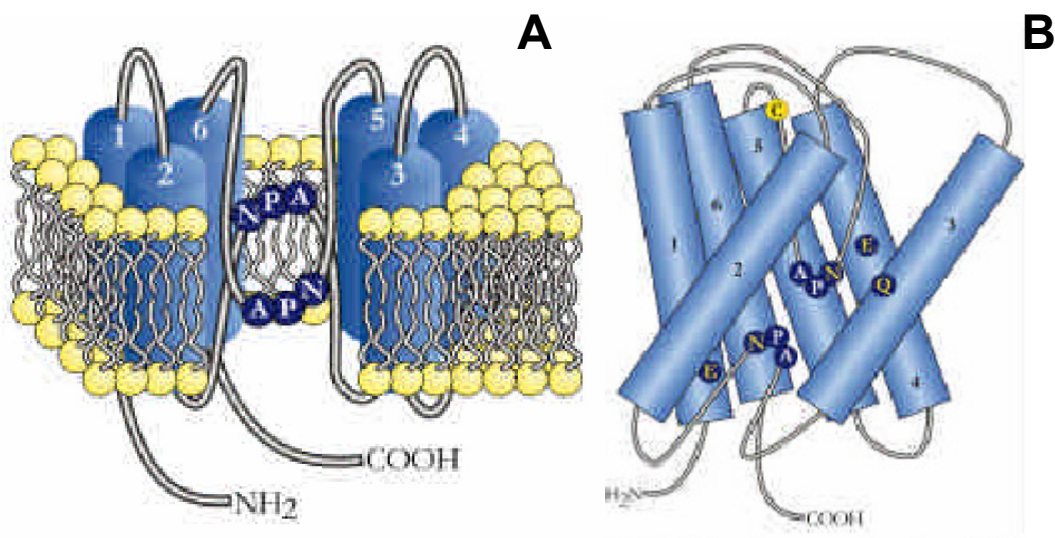


Abb. 9.2: Modellzeichnungen von Aquaporin, **A** nach JUNG *et al.*, 1994; **B** verbessert nach HEYMANN *et al.*, 1998.

Aquaporine werden in die Membran inseriert (DANIELS *et al.*, 1994, 1996; KAMMERLOHER *et al.*, 1994) und bilden so Poren von etwa 0.35-0.6 nm, welche selektiv von Wassermolekülen (in Einzelfällen auch Glycerinmolekülen) ohne hohen Energieaufwand durchquert werden können (DE GROOT und GRUBMÜLLER, 2001).

Die Wirkung der Aquaporine auf den Wassertransport der Pflanzen besteht vermutlich in einer Feinregulation des symplastischen Wassertransportes durch mehr oder minderstarke

Exprimierung der Kanäle im Plasmalemma (SCHÄFFNER 1997; STEUDLE und HENZLER, 1995; STEUDLE, 2001 HENZLER und STEUDLE, 1995; HENZLER *et al.*, 1999). Aquaporine finden sich häufig stärker exprimiert in der Nähe apoplastischer Barrieren (HOSE, 2000) vermutlich um der Pflanze eine schnelle Reaktion auf Stresssituationen zu ermöglichen. Aquaporintätigkeit wird wie die Suberinsynthese vermutlich durch das Stresshormon ABA reguliert (HOSE, 2000). Die Strategie der Pflanze als Stressantwort ist also doppelt ausgerichtet, zum Einem die schnelle Antwort des Symplasten zum Anderem eine nachfolgende Verstärkung von Zellwandbarrieren durch zusätzliche Suberinmengen. Messungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass eine Verdoppelung des Suberingehaltes in RHZW von Mais eine Verringerung des Wasserflusses um das 15 fache erwirkt (ZIMMERMANN *et al.*, 2000; ZIMMERMANN, 2001). Dieses Beispiel verdeutlicht am Einfluss eines zusätzlichen CASPARY-Streifens in der Exodermis, das nicht unbedingt die Suberinmengen ausschlaggebend für eine Verringerung der Leitfähigkeit sind, sondern der Ort der Barriere, beziehungsweise, die Konzentration auf bestimmte Bereiche der Zellwand. Dadurch ergibt sich ein Bild für den apoplastischen Transport, das dem CASPARY-Streifen eine erhebliche Wirkung auf die Wasserpermeabilität zuspricht, der sekundären Suberinlamelle aber nur eine weniger ausgeprägte. Die Rolle der Suberinlamelle im sekundären und tertiären Zustand besteht daher vermutlich aus einer zusätzlich zum CASPARY-Streifen aufgebauten Barriere für den Ionentransport. Dafür spricht auch die räumliche Anordnung, als Auflagerung auf der Sekundärwand der Zelle. Eine Wirkung der Suberinlamelle ist demnach wahrscheinlich in der Eigenschaft als einem der Zellmembran vorgeschalteten Filter zu sehen.

10Ausblick

In neuerer Zeit hat sich die Aufklärung der monomeren Bestandteile des Suberins sehr dynamisch entwickelt und mit dem Nachweis von Glycerin als möglicher Vernetzer des Polymers wurde ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Struktur getan. Wichtig ist es nun den Nachweis zu erbringen, dass in allen suberinisierten Geweben, dieser Baustein zu finden ist. Teilweise ist dies auch im Rahmen dieser Arbeit gelungen, so konnte neben den bereits erwiesenermaßen glycerinhaltigen Kartoffelperidermen auch in Wurzelpolymeren von Mais, Ackerbohne, Eiche, Buche und Fichte in Spuren, aber auch in größeren Mengen Propantriol gefunden werden. Eine exakte Quantifizierung konnte jedoch nicht vorgenommen werden. Partieller Abbau des Suberins könnte dazu beitragen größere Fragmente zu identifizieren die einen Einblick in die dreidimensionale Struktur des Polymers ermöglichen sollten. Aufgrund der zu erwartenden Molekülgrößen sind dafür gaschromatographische Methoden allerdings nicht besonders gut geeignet, hier sollte die Flüssigchromatographie (z.B.: HPLC) die Methode der Wahl sein. Außerdem können Pyrolyse oder MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*) Experimente gekoppelt mit leistungsfähigen Massenspektrometern bei der Strukturaufklärung helfen (BENTO *et al.*, 2001). Nicht zu vergessen sind ein- und zweidimensionale CP/MAS-NMR-Methoden, welche jedoch eine höhere Empfindlichkeit der Geräte oder eine Anreicherung mit ^{13}C -Kohlenstoff benötigen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen (z.B.: LOPES *et al.*, 2000a,b,c; YAN und STARK, 1998, 2000; STARK *et al.*, 1994; PACCHIANO *et al.*, 1993). Zudem sind NMR-Methoden ungeeignet Zellwandstrukturen mit geringen Suberingehalten zu untersuchen, so dass solche Experimente in Zukunft auch nur mit stark suberinisiertem Material wie Borke von Bäumen (z.B.: Korkeiche) oder mit Kartoffelperiderm sinnvoll durchgeführt werden können.

Die Lokalisierung des Suberins um die Zusammensetzung der Polymere in der intakten Zellwand zu erfahren wird weiterhin problematisch sein. Mithilfe der FT-IR-Mikroskopie, oder RAMAN-Techniken (RÖSCH *et al.*, 1999), können zwar einzelne Molekülgruppen erfasst werden, jedoch ist die räumliche Auflösung sehr begrenzt vor allem durch die verwendete Wellenlänge des IR-Bereiches. Mit geeigneten Fluoreszenzfärbungen im Confocalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) kann zumindest eine etwas höhere Auflösung erreicht werden, jedoch ohne direkte spektroskopische Information über das angefärbte Material zu erhalten (z.B. HUTZLER *et al.*, 1998). Höhere örtliche Auflösung erreicht man mit der Elektronenmikroskopie in Verbindung mit Antikörper-Techniken, die sehr gute Orts-Auflösung bietet, jedoch keine spektroskopische Information über die molekulare Anordnung und chemische Umgebung des Suberins in der Suberinlamelle liefert (z.B.: ZEIER, 1999b).

Für die GC-Analyse der Suberinmonomeren sollte in Zukunft ein besseres System der internen Standardisierung angewandt werden. Kurzkettenige Disäuren oder ω -Hydroxysäuren sollten sich als Standardsubstanzen aufgrund ihrer dem Analyten ähnlichen chemischen und

physikalischen Eigenschaften eignen. Derartige Verbindungen sind nicht kommerziell erhältlich, aber durch einfache Synthesen darstellbar. Erste Ansätze zu einer Validierung alternativer Standardsubstanzen und der erhaltenen Chromatogramme wurden von GRAÇA und PEREIRA (2000b) durch die Verwendung kommerziell erhältlicher langkettiger α,ω -Diolen durchgeführt.

Im Gegensatz zum Suberin ist das Lignin wesentlich besser untersucht und verstanden. Es gibt neben der in dieser Arbeit verwendeten Thioacidolyse mehrere spezifische Nachweis- und Abbaumethoden, wie die Nitrobenzoxoxidation (LAWTHER *et al.*, 1996), oder die Reaktion mit Bromessigsäure zum photometrischen Nachweis des Aromatengehaltes (MORRISON und STEWARD, 1995; DENCE 1992; IYAMA und WALLIS, 1988; JOHNSON *et al.*, 1961), sowie eine sehr gut beschriebene DFRC genannte moderne Variante dieser Reaktion zur Analyse mittels GC/MS. (HATFIELD *et al.*, 1999a,b; LU und RALPH, 1999,1998a,b, 1997a,b; PENG *et al.*, 1998).

Mit Reis (*Oryza sativa* L.) könnten in Zukunft interessante Ergebnisse zu erwarten sein, Wurzeldruckmessungen wurden bereits veröffentlicht (MIYAMOTO *et al.*, 2001) und erste Ergebnisse zur Zusammensetzung der Wurzelbarrieren ergaben eine höhere Flächenbelegung der Exodermis mit Suberin als im Mais (EFFINGER, 2002). Dies korreliert gut mit den höheren hydraulischen Widerständen die im Vergleich zum Mais ermittelt wurden. Auch andere Pflanzen mit submersen Wurzeln wie der Rohrkolben (*Typha sp.*) haben evtl. vergleichbare Strategien entwickelt, die auch die Funktion der Wurzelbarrieren für den Gastransport in die Diskussion mit einbringen können.

Da man Baumwurzeln sehr gut handhaben kann, und Daten zur Wasseraufnahme und des hydraulischen Widerstandes von Bäumen verfügbar sind, wäre zum Beispiel die Pappel (z.B. *Populus tremula*) ein interessantes Untersuchungsobjekt, zumal auch für den Wasserhaushalt und die Permeations-Eigenschaften der Blätter wichtige Daten bereits ermittelt wurden (SCHÖNHERR, 2000, 2002).

Außerdem sollte man sich bei der Pflanzenaufzucht im wachsenden Maße versuchen sich Freilandbedingungen zu nähern, da die Beschaffenheit des Bodensubstrates einen deutlichen Einfluss auf die Ausprägung apoplastischer Barrieren hat (DEGENHARDT und GIMMLER 2001). Ergebnisse aus Laborexperimenten sind daher nur schwer auf Freilandbedingungen zu übertragen.

Um die radialen Transporteigenschaften an intakten Wurzeln *in vivo* zu untersuchen, bieten sich idealerweise Experimente mit der NMR-Bildgebung an (MRI = *Magnetic Resonance Imaging*). Bei dieser Technik konnten bereits longitudinale Transportraten von Wasser in Rizinus Spross (PEUKE *et al.*, 2001; ROKITTA *et al.*, 1999a,b) und Mais (KUCHENBROD *et al.*, 1996) bestimmt werden, sogar einzelne Metaboliten wie zum Beispiel Zucker, wurden in

Kombination mit spektroskopischen Messpulsen von der lebenden Pflanze ortsgetreu abgebildet (WOLF *et al.*, 2000).

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man direkt an lebenden Pflanzen den Wassertransport messen kann, und bei schnellen Flussgeschwindigkeiten einzelne Wassermoleküle elektromagnetisch markieren kann, um ihren Ortswechsel festzustellen. Eingeschränkt wird die Anwendung der Technik in der noch immer relativ groben räumlichen Auflösung, die nur durch sehr hohen apparativen Aufwand verbessert werden kann. Als Beispiel für das Auflösungsvermögen eines üblicherweise verwendeten Spektrometers zeigt Abb. 10.1 das Querschnittsbild einer Wurzel von *Clivia miniata*, in Abb. 10.1 B, überlagert mit UV- und lichtmikroskopischen Bildern zum Vergleich des Auflösungsvermögens. Die hellen Stellen zeigen Orte hoher Protonenkonzentration, dunkle Stellen niedrigere Konzentrationen. Die sehr hellen Grenzschichten sind vermutlich ein Artefakt der Bildgebung, da an Phasenübergängen oder bei massiveren Materialien, die Relaxationszeiten der Spinumkehr (T1) deutlich kürzer werden, und so einen höheren Wassergehalt vortäuschen. Nichtsdestotrotz kann hieraus eine wichtige Information über die Beschaffenheit des Materials gewonnen werden.

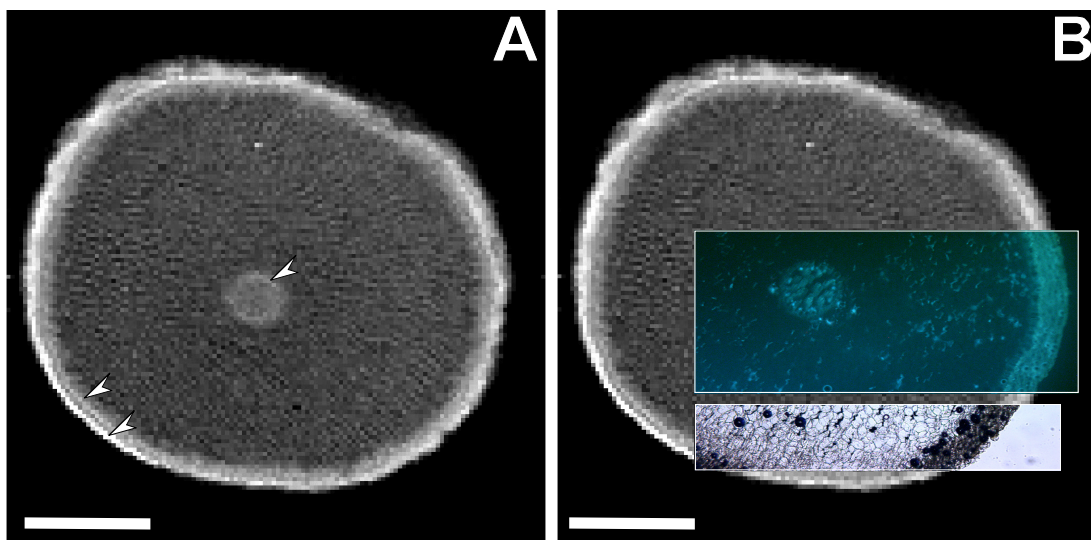


Abb. 10.1: NMR-Bildgebung an lebenden *C. miniata* Wurzeln, Spektrometer: Biospec 70/20, Bruker, Rheinstetten, D; Protonenresonanzfrequenz 300 MHz, gemessen am Physikalischen Institut der Uni-Würzburg von Kristina Wolf. **A** Protonenresonanzbild, Querschnitt, deutlich erkennbar sind Grenzschichten der Hypo und Endodermis (Pfeile) (1 voxel ca. 30x30 μm); **B** wie **A**, jedoch überlagert mit lichtmikroskopischen Schnittbildern. Balken = 1.00 mm.

Die Ermittlung von radialen Diffusionsparametern ist bislang noch nicht gelungen, was vor allem an der langsamen Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser über den apoplastischen oder zellulären Weg liegt, da die räumliche Auflösung des Spektrometers noch unter der Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb eines Messzyklus liegt. Vorversuche zur Aufklärung des radialen Transportes mit Trifluoracetat (^{19}F -Spektroskopie) als Tracer an Luftwurzeln der Grünstilbe (*Chlorophytum sp.*) haben gezeigt, dass es möglich ist radiale diffundierende

Substanzen abzubilden (Abb. 10.2 C), jedoch ist bei dieser Methode die Ortsauflösung noch geringer, als schon bei ^1H -Experimenten (Abb. 10.2 A, B) und somit nur an sehr dicken Wurzeln geeignet. Zudem ist es nur mit sehr großem Aufwand möglich die Messungen in Wasser durchzuführen, so dass Untersuchungen über die Diffusion an Wurzeln bislang noch selten sind. Nichtsdestotrotz kann man auf Abb. 10.2 C sehr gut die Wirkung der Endodermis als Barriere für Trifluoracetat erkennen, die Konzentration im Zentralzylinder ist nahe Null. Eine Alternative zu Messungen von spingelabelten Wasser ist die Verwendung anderer NMR-aktiver Kerne, deren Diffusion analog dem Trifluoracetat leichter verfolgbar ist. Vor allem H_2O^{18} wäre optimal geeignet, da man mit diesem Isotop die Wasserdiffusion gut verfolgen könnte. Um Ionendiffusion zu verfolgen, ist ^{23}Na -Isotop ein idealer Kern, mit dem man auch Salzstress-Experimente durchführen könnte (OLT *et al.*, 2000; SPICKETT *et al.*, 1993). Die Möglichkeiten der MRI (MRI = *Magnetic Resonance Imaging*) werden vor allem durch den hohen apparativen Aufwand eingeschränkt. Die schwierigen Entwicklungen der Messmethoden und der Ausrüstung sind extrem langwierig, aber dennoch nötig um Artefakte auszuschließen. Diese Methode wird aber in Zukunft an Bedeutung gewinnen, da sie die einzigartige Möglichkeit einer orts aufgelösten Spektroskopie an lebendem Material bietet.

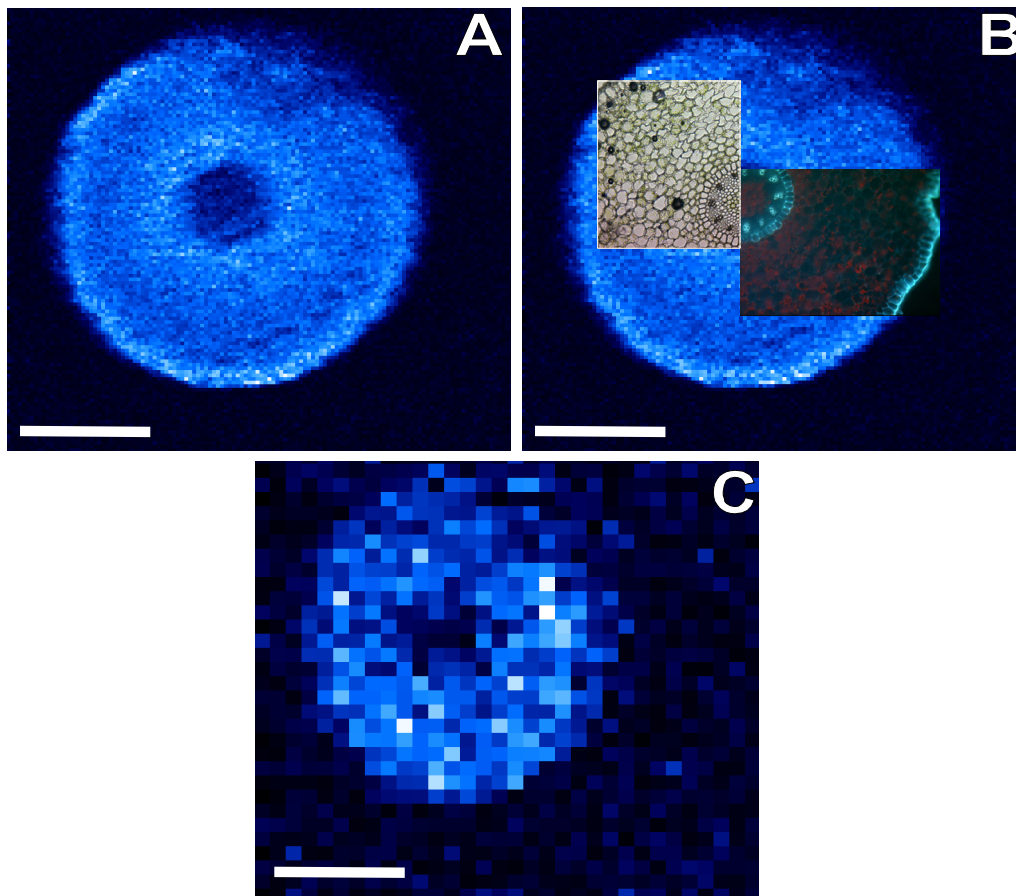


Abb. 10.2: NMR-Bildgebung an Luftwurzeln von Grönlilie; Spektrometer wie Abb. 10.1; Fluorresonanzfrequenz 282.5 MHz; **A** Protonenresonanzbild, die Leitelemente enthalten keine nennenswerten Mengen Wasser (Luftwurzel) (1 voxel ca. $30 \times 30 \mu\text{m}$); **B** Protonenresonanzbild überlagert mit lichtmikroskopischen Bildern; **C** Fluorresonanzbild, hohe Konzentrationen Fluor sind im Bereich des Cortex (hellblau), keine Fluorresonanz im Zentralzylinder messbar (1 voxel ca. $100 \times 100 \mu\text{m}$); Balken = 1.00 mm.

Wesentlich geringer ist der Aufwand von Diffusionsmessungen mithilfe von Transpirationskammern, die bereits an Kartoffelperiderm und Kutikularmembranen erfolgreich eingesetzt wurde. Hier wäre es denkbar, dass man Hypodermiszellwände von Pflanzenarten mit großflächigen Wurzeln oder Rhizomen (z.B. *Typha* Rhizome, *Monstera* Luftwurzeln o.ä.) isoliert und in Transpirationskammern mit kleinen Deckelbohrungen einbaut. Besonders geeignet für derartige Experimente sollten Arten mit einer mehrlagigen Hypodermis sein. Daten zur chemischen Zusammensetzung dieser Gewebe liegen zum Teil schon vor (z.B.: SCHREIBER *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass es möglich ist die Größenordnung der Barrierewirkung von Suberin über einen an Kartoffelperiderm ermittelten Leitwertskoeffizienten zu bestimmen. Von Großem Interesse wäre es, diesen Koeffizienten für die Diffusion von Ionen zu erhalten, da eine der Hauptaufgaben der Endodermis sicherlich auch in ihrer Eigenschaft als apoplastischer Filter zu sehen ist. Erste Versuche mit dem direkten UV-spektroskopischen Nachweis von durch die Membran diffundierten Nitratmengen waren nicht erfolgreich, hier sollten spezifische Farbreaktionen die photometrische Detektion erleichtern. Mit einer chemisch-physikalische Analyse verschiedener Ionen durch AAS (Atom-Absorbtions-Spektroskopie), oder ICP könnten analog zu den Arbeiten von ERSÖZ und DUNCAN (1994, 1995, 1996) und ERSÖZ *et al.* (1996, 1995) die Permeabilitäten an extrahierten Peridermen oder Hypodermen gemessen werden.

Nährstoffmanglexperimente an inzwischen gut untersuchten Pflanzen wie Mais oder Rizinus sollten auch unter Einbeziehung möglichst vieler physiologischer und physikalischer Parameter durchgeführt werden. So wäre es möglich zusätzlich zu den Suberin und Ligninkonzentrationen, die Wasser- oder Ionenkanalaktivitäten in den unter Mangel angezogenen Wurzeln zu bestimmen, und mit Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit zu korrelieren. Erste Messungen an unter Phosphat-, Nitrat- und Sulfatmangel angezogenen Maispflanzen ergaben in der Zusammensetzung der apoplastischen Barrieren nur geringe Unterschiede (Daten nicht gezeigt), jedoch war die Aufnahme von Rb^+ bei allen Mangelkulturen signifikant gesteigert, vor allem bei Sulfatmangel konnte ein sehr großer Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 10.3).

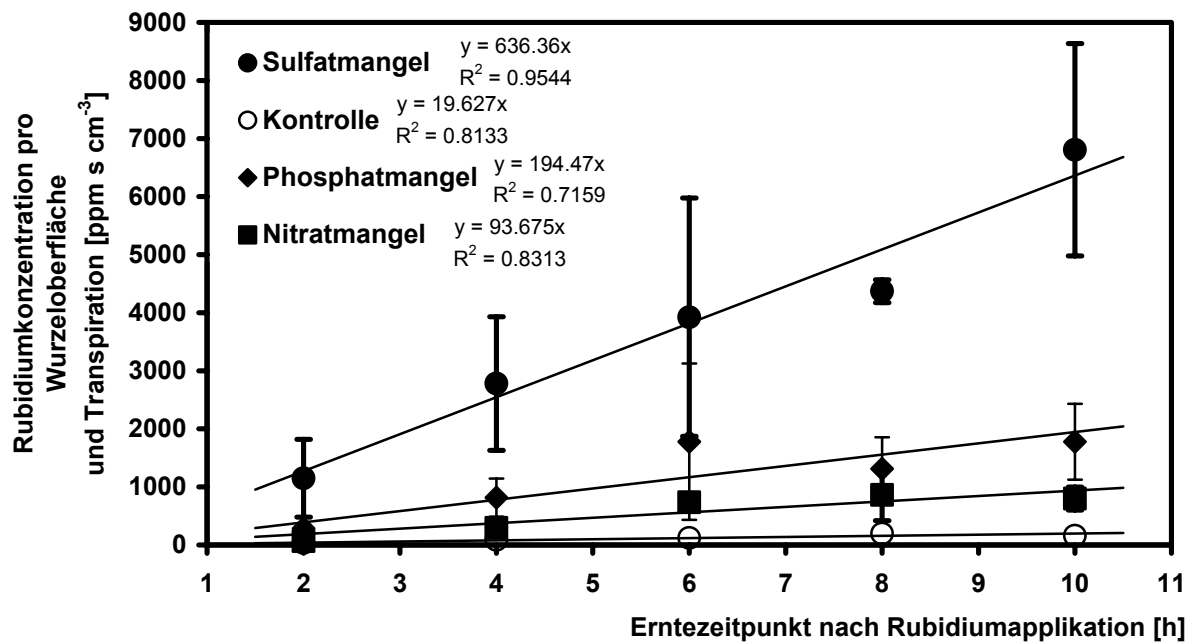


Abb. 10.3: Aufnahme von Rubidium-Ionen in Blätter von *Z. mays* (Helix); Aufzucht unter Sulfat-, Phosphat-, Nitratmangel (jeweils komplett ohne das entsprechende Ion kultiviert); Alter = 12 Tage; (Fehlerbalken = StabWN).

Die Aufklärung des Aufbaus und der Funktion pflanzlicher Abschlussgewebe und apoplastischer Barrieren ist noch immer eine sehr komplexe Aufgabe und kann in Zukunft nur durch den parallelen Einsatz physikalischer, chemischer, pflanzenphysiologischer und gentechnologischer Methoden gelingen. Daher ist es wichtig, auch in Zukunft interdisziplinär zu arbeiten, um die Transportmechanismen der Pflanzen verstehen zu lernen.

11 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die für den radialen Stofftransport durch die Wurzel Höherer Pflanzen wichtigen apoplastischen Barrieren der Wurzeln von sieben Pflanzenarten (*Vicia faba* L.; *Typha glauca* Godr.; *Ricinus communis* L.; *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.; *Fagus sylvatica* L.; *Picea abies* (L.) Karst.; *Zea mays* L.) mikroskopisch charakterisiert und chemisch analysiert. Nach enzymatischer Isolation der Gewebe wurde die Biopolymerzusammensetzung von Suberin und Lignin der isolierten Zellwände nach Depolymerisierung durch Umesterungsreaktion (Abbau von Suberin) oder Thioacidolyse (Abbau von Lignin) mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie aufgeklärt. Außerdem wurde Sprossknollenperiderm der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) verschiedener *post harvest* Luftfeuchtebedingungen, sowie neugeformtes Wundperiderm chemisch-analytisch und auf die Permeabilität für Wasser hin untersucht. Zusätzlich zu den mikroskopischen und chemischen Analysen wurden die hydraulischen Leitfähigkeiten von Maiswurzeln verschiedener Kulturbedingungen und die Aufnahme von Rubidium-Ionen über die Maiswurzeln untersucht. Dabei wurde die Auswirkung von Salzstress (100mM NaCl), und eine Applikation des Phytohormons Abscisinsäure (10 μ M ABA) bei der Aufzucht der Pflanzen auf apoplastische Barrieren untersucht. Auch die Rubidiumaufnahme von bei Nitratmangel (0.00 M NO₃⁻) aufgewachsenen Rizinuspflanzen wurde ermittelt und mit der chemischen Zusammensetzung der apoplastischen Barrieren korreliert.

Die Rolle apoplastischer Barrieren in den Wurzeln der Höheren Pflanzen für den Stofftransport ist bislang nicht vollständig geklärt. Neben einer „Grobregulation“ des Wasserhaushaltes kommt diesen Barrieren eine Rolle zur Steuerung der Ionenflüsse zwischen den einzelnen Kompartimenten der Wurzel zu. Eine wichtige Funktion ist auch in der Pathogenabwehr als präformiertes Wundperiderm zu sehen.

Informationen über die chemischen Komponenten der Barrieregewebe lassen sich über eine qualitative und quantitative chemische Analyse nach Isolation der Zellwände erhalten. Eine Funktionsanalyse dieser Barrieren als Transportbarriere für Wasser oder Ionen ist aber bislang nicht an isolierten suberinisierten Zellwänden möglich gewesen, da die grundlegenden chemischen und physikalischen Eigenschaften der Barrieren in der Wurzel nicht ermittelbar waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Beziehung der hydraulischen Wasserleitfähigkeit mit der chemischen Zusammensetzung des wichtigsten hydrophoben Barrierepolymeren Suberin (Korkstoff) anhand der Exodermis von Mais hergestellt. Außerdem konnte mit der Verwendung von Kartoffelperiderm ein Modellsystem entwickelt werden, das eine einfache Analyse der Transportparameter und der chemischen Zusammensetzung suberinisierter Zellwände ermöglicht. Durch dieses Modellsystem ist es möglich in gewissen Grenzen die Leitfähigkeit von suberinisierten Geweben zu berechnen. Vor allem für schwach suberinisierte Barrieren konnten hier Daten errechnet werden, die in

der Größenordnung zum Teil gut mit gemessenen hydraulischen Leitfähigkeiten der Wurzeln korrespondierten. Vor allem aber konnte anhand des Modells eindeutig gezeigt werden, dass die Hauptbarriere für den Wassertransport nicht das Suberin selbst ist, sondern dass vielmehr eingelagerte Wachskomponenten für einen stark erhöhten Diffusionswiderstand verantwortlich sind. Die Qualität der Monomerenzusammensetzung die Verknüpfung des Suberinpolymers und die räumliche Anordnung innerhalb Zellwand sowie die Anatomie des Zellwandverbandes scheinen außerdem für die Leitfähigkeit eine wichtige Rolle zu spielen. Im Vergleich von Wund- und natürlichem Periderm der Kartoffelknolle ist zum Beispiel bei einer vergleichbar großen Suberinmenge im Wundperiderm ein deutlich höherer Leitwert bei geänderter Suberinzusammensetzung und stark veränderter Anatomie, messbar.

Verglichen mit *in situ* ermittelten hydraulischen Leitfähigkeiten an den Wurzeln der drei untersuchten Baumarten (Eiche, Buche, Fichte) und den jeweiligen Suberingehalten konnte auch hier nur eine geringe Barrierewirkung zusätzlicher Suberinmengen auf die gemessene Wasserleitfähigkeit festgestellt werden. Einer sehr hohen Differenz in der Menge des Suberins stand eine relativ geringe Differenz der gemessenen Leitfähigkeit gegenüber. Jedoch wiesen die untersuchten Gewebe deutliche Unterschiede in der Monomerenzusammensetzung des Suberin und der Anatomie auf.

Die Aufnahmefähigkeit der Wurzeln für Ionen und kleine organische Moleküle wurde durch Analyse der Blätter in Mais und Rizinus durchgeführt. Die Aufnahme von Rubidium-Ionen und der Transport zum Spross und in die Blätter wurde durch Salzstress und ABA-Wirkung in Maispflanzen deutlich verringert. Mangelernährung führte zu höheren Rubidiumaufnahmeleistungen in Mais, in Rizinus konnten keine signifikanten Veränderungen der Aufnahmeleistungen festgestellt werden.

Durchgängig wurde versucht die Suberinbelegung der Oberfläche untersuchter Gewebe zu ermitteln, da es nur mit dieser Bezugsgröße sinnvoll möglich ist einen Zusammenhang der Funktion des Materials als Barriere mit der chemischen Zusammensetzung herzustellen. Außerdem wurden die Stoffmengen der Monomeren ermittelt, um die Suberinkonzentration auf eine kettenlängenunabhängige Größe zu beziehen. Hieraus konnte dann auch die stoffmengenbezogene mittlere Kettenlänge ermittelt werden, die ein detaillierteres Bild der Polymerstruktur ermöglichte. Durch den Oberflächenbezug konnte auch gezeigt werden, dass der mikroskopische Entwicklungszustand der Endodermis nicht mit der Suberinmenge der Zellwände korreliert werden kann. Wichtig für eine Beurteilung der Qualität des polymeren Suberins war auch die durch den Stoffmengenbezug erstmalig mögliche Ermittlung der Anzahl (mol) freier Säuregruppen, die je nach Art 20-60% betragen konnte. Hierdurch wurde die Relevanz des Glycerins als quervernetzendes Molekül im Suberin betont.

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach Arten und Reihenfolge des Erscheinens in dieser Arbeit zusammengefasst:

Vicia faba L.: Die mit dem Symbionten infizierte Zone der Knöllchen war von einer stark suberinisierten Endodermis im sekundären Entwicklungszustand umgeben auf deren Innenseite sich die Leitbündel befanden, deren Endodermis einen primären bis sekundären Entwicklungszustand entwickelte. Der die Knöllchen umgebende Cortex enthielt große Mengen an Triterpenen, die in anderen Geweben nicht nachgewiesen wurden. Endodermale Zellwände (EZW) der Wurzel lagen im primären und sekundären Zustand vor und enthielten etwa die Hälfte des Knöllchen-Suberin. Die rhizodermalen und hypodermalen Zellwände (RHZW) dieser nicht exodermalen Spezies bargen nur geringe Mengen Suberin ($<20 \text{ nmol mg}^{-1}$). Insgesamt wurden nur geringe Mengen Aromaten im Suberin aller untersuchten Zellwände gefunden. Die hohen Suberinmengen in der Knöllchenendodermis weisen auf eine Funktion als Barriere gegen unkontrolliert eindiffundierenden Sauerstoff hin, aber auch als Dichtung gegen das Auswaschen von durch die Bakterien fixierten Stickstoff. Triterpene im äußeren Cortex haben vermutlich eine antipathogene Funktion.

Typha glauca Godr.: Junge Rhizome und Wurzeln wiesen durchgängig apoplastische Barrieren im sekundären Zustand auf, EZW in älteren Rhizomen zeigten auch tertiären Zustand. Alle RHZW enthielten eine ähnliche Suberinzusammensetzung, Aromaten bildeten mehr als 60% des Suberins. Suberinmengen in den RHZW der jungen Wurzel waren geringfügig größer als in den Rhizomproben. EZW enthielten weniger Suberin als die RHZW, zwischen Rhizom und Wurzelproben waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Auch im EZW betrug der Aromatenanteil über 60% des Gesamtsuberins. Der aliphatische Anteil im EZW der Rhizome bestand aus nur drei Substanzklassen, in Wurzel-EZW wurden neun Substanzklassen festgestellt. Die im Vergleich zum EZW höheren Konzentrationen an Suberin in RHZW bilden bei *T. glauca* vermutlich einen Diffusionsschutz für den in den Wurzeln vorhandenen Sauerstoff.

Quercus, Fagus, Picea: Die Wurzelperiderme von $<0.5\text{-}2.0$ mm dicken Feinwurzeln 100-200 Jahre alter Eichen, Buchen und Fichten wurden nachdem die Wasseraufnahme über Saftflussensoren ermittelt wurde anatomisch untersucht und nach einer Einteilung in drei Größenklassen die Periderme isoliert. Eichen und Buchenwurzeln besaßen deutlich mehr Zellschichten als Fichtenwurzeln. Extraktmengen der Periderme betragen 4-11% (Fichte), 8-16% Buche und 6-18% (Eiche). Suberinmengen in Buchen- und Eichenwurzelperidermen stiegen linear mit dem Wurzeldurchmesser, Fichtenwurzelperiderm enthielt in allen Größenklassen etwa die gleiche Menge Suberin pro Oberfläche. Bezogen auf einzelne Zellschichten enthielten die Peridermen der kleinen Durchmesserklassen in allen Arten etwa gleichviel Suberin pro Zellschicht und Oberfläche, erst bei Wurzeln mit einem Durchmesser >1.0 mm enthielten Eichenperidermen wieder deutlich mehr Suberin als die anderen Arten. Die monomere Zusammensetzung aller drei Baumarten unterschied sich deutlich, in Eiche dominierten ungesättigte ω -Hydroxysäuren und Phloionolsäure (9,10,18-Trihydroxysäure), in Buche war der Anteil gesättigter ω -Hydroxysäuren größer, der Anteil von Phloionolsäure war geringer, die Suberinzusammensetzung des Fichtenperiderms wurde zu 60% aus

gesättigten ω -Hydroxysäuren gebildet, Phloionolsäure wurde nur in Spuren gefunden. Die gemessenen Leitwerte nehmen in genau der Reihenfolge zu (Eiche<Buche<Fichte), in der die Suberingehalte abnehmen Eiche>Buche>Fichte). Ligninmengen in Fichtenwurzelperidermen änderten sich nicht mit steigendem Durchmesser, während Eichen- und vor allem Buchenwurzelperiderme der größeren Durchmesserklassen wesentlich größere Mengen Lignin aufwiesen. Fichtenperiderm zeigt zudem ein typisches Gymnospermenlignin ohne Syringyl- (S) und mehrheitlich aus Hydroxyphenyl-(H) und Guaiacyl-Einheiten (G) aufgebaut, während Eichen und Buchenlignin nur wenig H und hauptsächlich G und S enthielt.

Ricinus communis L.: Rizinuspflanzen wuchsen in hydroponischen Nährmedien mit 100 mM NaCl, 0.0 M Nitrat und mit kompletter Nährstoffversorgung in 30 Tage auf. RHZW und EZW befanden sich außer im extremen Spitzenbereich (primäres Stadium) über die gesamte Länge der Wurzel im sekundären Stadium, auch unter den Stressbedingungen wurde niemals tertiärer Entwicklungszustand festgestellt. Die Suberinmengen der RHZW unter Salzstress waren mehr als doppelt so hoch wie in den anderen beiden Gruppen. EZW enthielten mehr als die dreifache Menge Suberin pro Oberfläche in Salz und Kontrollkulturen als RHZW, unter Nitratmangel wurde dagegen nur wenig mehr Suberin in EZW eingebaut als in RHZW. Salzgestresste Pflanzen enthielten in EZW noch etwa doppelt so viel Suberin wie Kontrollpflanzen. Rizinus scheint vor allem auf der Ebene der Endodermis auf Stress zu reagieren. Die Suberinzusammensetzung der verschiedenen Gruppen in RHZW und EZW unterschied sich nur unwesentlich. Der Aromatengehalt des Suberins war insgesamt sehr gering (<10%). Die Aufnahme von Rubidium-Ionen von Nitratmangel-Pflanzen unterschied sich nur wenig von der bei Kontrollpflanzen.

Zea mays L.: Von dieser Art wurden drei verschiedene Genotypen (Across 8032, Pioneer 3096, Helix) unter 100 mM NaCl und in normaler Nährlösung untersucht, außerdem wurde zusätzlich eine Varietät (Helix) in Nebelkultur und in Hydrokultur mit ABA-Applikation (10 μ M ABA) angezogen. Die Auswirkungen der Stressoren konnte mikroskopisch und makroskopisch verfolgt werden, die Wurzeln waren wesentlich kürzer und erreichten in der Entwicklung der Endodermis schon in der Nähe der Wurzelspitze ein tertiäres Stadium. Unterschiede bestanden auch in den Auswirkungen von Salzstress auf die verschiedenen Genotypen. Bereits die über die Wurzellänge in fünf Zonen ermittelten Suberindaten der Kontrollgruppe zeigten große Unterschiede sowohl in Quantität wie auch in der Qualität des Suberins in RHZW. Pioneer besaß in RHZW die geringsten Mengen Suberin, Across und Helix etwa das Doppelte des Pioneer-Mais, zudem unterschied sich die Zusammensetzung der drei Sorten. Sichtbare Sortenunterschiede ergaben sich auch bei der Betrachtung der mittleren Kettenlängen und der Konnektivität des Suberins. Im Suberin der EZW waren keine deutlichen Unterschiede sichtbar. Die Auswirkung des Salzes auf Pioneer 3096 war makroskopisch kaum feststellbar, während in Helix und Across 8032 deutliche Effekte der Kultur in NaCl-Lösung auf Wurzel und Sprosswachstum sichtbar waren. Ebenso konnten die

Auswirkungen der ABA-Gabe zum Nährmedium in einer verkürzten und verdickten Wurzel und geringerem Sprosswachstum dokumentiert werden. Die Suberinmengen der RHZW bei Salzstress veränderten sich bei allen Sorten nur gering, am meisten nahm der Suberingehalt in RHZW von Pioneer 3096 zu. EZW der Sorten Across 8032 und Helix enthielten bei Salzstress die 3-4 fache Menge Suberin, Pioneer nur wenig mehr als die Kontrollgruppe. EZW in ABA-Pflanzen von Helix enthielt am meisten Suberin von allen untersuchten Mais-Geweben. Der Suberingehalt in RHZW von Nebelkulturpflanzen war deutlich höher als in Hydrokulturpflanzen. Ein Aromatengehalt in RHZW und EZW-Suberin von 40-60% konnte bei allen Genotypen festgestellt werden. Der Wassertransport vermindern Einfluss zusätzlicher Suberineinlagerungen in RHZW der Wurzel auf die hydraulische Leitfähigkeit konnte durch Wurzeldruckmessungen belegt werden. Zusätzliche Suberineinlagerungen durch Salzstress und ABA-Application in die EZW der Wurzel erniedrigten die Aufnahme von Rubidium-Ionen in den Spross.

Solanum tuberosum L.: In Sprossknollenperiderm von Kartoffeln der Sorte Désirée konnten große Wachs und Suberinmengen nachgewiesen werden. Erstmals wurden Ferulasäureester der Kettenlängen C₁₆ bis C₃₂ im Extrakt von natürlichen Peridermen in großen Mengen nachgewiesen. Es konnte ein zeitlicher Verlauf der Suberinsynthese vom Erntetag bis 28 Tage nach der Ernte bei verschiedenen Lagerluftfeuchten verfolgt und die Permeabilität der entsprechenden Periderme gemessen werden. So konnte erstmals eine Korrelation von Wachs und Suberinmengen mit der Leitfähigkeit der Kartoffelschale hergestellt werden. Durch Extraktion der Wachse konnte die Leitfähigkeit um zwei Größenordnungen erhöht werden, die Suberinkonzentration spielte für die Leitfähigkeit der extrahierten Periderme nur noch eine geringe Rolle. Gleichartige Untersuchungen mit neugebildetem Wundperiderm wurden durchgeführt und ergaben einen Extraktionseffekt von etwa einer halben Größenordnung, junges nicht extrahiertes Wundperiderm besaß Leitwerte in der Größenordnung des extrahierten natürlichen Periderms. Eine hohe Lagerluftfeuchte ergab bei natürlichem und Wundperiderm geringere Suberin und Wachsmengen. Außerdem wurde eine Wirkung des Elongasehemmstoffes Ethofumesat auf die Suberinzusammensetzung und Kettenlängenverteilung sowie den Leitwert von natürlichen Peridermen nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass:

- monocotyle Pflanzen wesentlich höhere Aromatenanteile im Suberin apoplastischer Barrieren besitzen als dicotyle Pflanzen;
- bei der Bewertung des Suberingehaltes apoplastischer Barrieren histochemische Methoden unzureichend sind;
- die Flächenbelegung mit Suberin auch innerhalb gleicher Entwicklungsstadien bei verschiedenen Pflanzen stark unterschiedlich sein kann;
- der Verknüpfungsgrad der Monomeren im Suberin stark unterschiedlich sein kann;

- Suberin keine 100%ige Barriere für Wasser und Ionen darstellt;
- Suberin auch eine Barriere gegen unkontrollierte Gasdiffusion darstellen kann;
- der Stofftransport (z.B. Rb-Ionen) durch zusätzliche Suberinnengen verlangsamt werden kann (Mais), geringere Suberinnengen den Stofffluss aber nicht signifikant erhöhen wie bei Nitratmangelpflanzen (Rizinus) gezeigt wurde;
- eine direkte Ableitung der Funktion für den Wasser und Stofftransport aus dem Suberingehalt nicht ohne eine Extraktanalyse möglich ist, und in jedem Fall die Notwendigkeit besteht eine Flächenbelegung mit Suberin oder Wachsen zu ermitteln;
- die Variabilität von Pflanzen verschiedenen Genotyps und die Entwicklung vieler verschiedener Anpassungsstrategien zum Schutz vor Stress eine Abschätzung funktioneller Aspekte aus monokausaler Sichtweise (z.B.: Suberingehalt) unmöglich macht. Um der Vielfältigkeit pflanzlicher Strategien gerecht zu werden, ist daher die Integration vieler unterschiedlicher Untersuchungsmethoden in interdisziplinärer Arbeitsweise notwendig.

12 Summary: “Structur, Function and Chemical Composition of Suberized Transport Barriers in the Apoplast of Higher Plants”

The aim of this thesis was to examine the chemical composition of suberised apoplastic barriers in roots of higher plants and to relate the obtained results to the function of these barrier tissues for the diffusive transport of ions and water. For the analysis of the chemical composition (mainly suberin and also lignin), the roots were digested enzymatically, and the remaining material was separated in two fractions: one fraction consisting of rhizodermal and hypodermal cell walls (RHCW) and the second one of endodermal cell walls (ECW). Xylem vessels were not analysed. Suberin content of the isolated cell walls was determined after transesterification and GC/FID and GC/MS analysis of the monomers. Prior to the chemical analysis, the anatomical structures of the roots were thoroughly examined with light microscopy using histochemical dyes and UV-light as well as scanning electron microscopy. Analysis were performed on the roots of several species: *Vicia faba* L., *Typha glauca* Godr., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Fagus sylvatica* L., *Picea abies* (L.) Karst., *Rhcinus communis* L. and *Zea mays* L. To reveal functional aspects for the transport of water through suberised barriers, potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) skin was used as a model system because it is easy to obtain and consists to more than 20% of suberin. Additionally it is impregnated with aliphatic wax like materials. Experiments with freshly harvested potatoes showed, that suberin and wax content increased in the first days after cutting the tubers from the stele, but no additional cell layers were build. As the content of aliphatic components increased in the peridermal cell walls, the water permeability decreased. Removal of the waxes increased the water permeability of potato periderm to more than a 100 fold from $5.4 \cdot 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ to $8.0 \cdot 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ for the extracted ones. Surprisingly, there was no significant difference in the water permeability of periderms with different suberin content. 28 day old periderms had approx. twice as much as the suberin from freshly harvested ones, but the difference in permeability was smaller than 0.4 units. These results are showing, that suberin is not a water tight barrier as it is discussed in common text books, but to a certain extend it controls the water flux. Suberin amounts and permeabilities where used to estimate hypothetical transport data for root tissues, but the calculated values were only roughly in the range of measured root hydraulic permeabilities obtained from pressure probe experiments.

Pressure probe experiments with roots of 8 day old maize seedlings showed, that a higher suberin content in the exodermis significantly reduces the radial water flow through the roots. Even the ion flux in maize roots is reduced, when barrier tissues contained more suberin. These results were obtained in experiments with rubidium-ions as a tracer for potassium-ions in maize seedlings. Apoplastic root barrier tissues, especially the endodermis were strongly enhanced, when the plants were grown under 100 mM NaCl or with 10 μM of the stress-

hormone abscisic acid in the hydroponic growth-solution. On the other hand, it was shown that plants of the same species but with different genotypes responded each in a different way to stress situations. For example, whilst maize genotype Pioneer 3906 was able to cope with high salt concentrations, without altering apoplastic barriers, the genotype Across 8023 showed strong enhancement with high suberin amounts of the endodermal cell walls at the same salt concentrations.

Lack of nutrients (e.g.: nitrate) in castor bean hydroponic culture leads to low suberin content in the endodermis but the uptake ability for rubidium-ions was not affected at all.

Analysis of broad bean root nodules showed the relevance of high suberin amounts as a barrier for water and solutes as well as for gases. Suberin content in nodules were much higher than in the root apoplastic barriers, for that it would concluded, that the uncontrolled diffusion of oxygen into the infected zone of the nodule was inhibited by large amounts of suberin in the nodule endodermis. Another hint to this idea was the analysis of *Typha glauca* roots and rhizomes, which had more suberin in the exodermis than in the endodermis (in maize it was vice versa), because the submerged tissues are full of air-filled intercellular spaces and the function of higher suberin amounts in the exodermis may be to prevent oxygen loss.

The results of this thesis are showing that suberin is a variable material with several functions, not only as a transport barrier for water, ions and gases which controls to a certain extend the fluxes in and out of the apoplast, but also as a barrier against pathogens with high contents of aromatic materials.

13Literatur

- M.H. ABD-ALLA, H.W. KOYRO, F. YAN, S. SCHUBERT, E. PEITER, (2000) Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: implications for metabolite transport. *J. Plant Physiol.* 157, 335-343.
- K.O. ABULNAJA, C.R. TIGHE, J.L. HARWOOD, (1992) Inhibition of fatty acid elongation provides a basis for the action of the herbicide, ethofumesate, on surface wax formation. *Phytochemistry* 31, 1155-1159.
- J.A. ADAMOVICS, G. JOHNSON, F.R. STERMITZ, (1977) Ferulates from cork layers of *Solanum tuberosum* and *Pseudogutsa menziesii*. *Phytochemistry* 16, 1089-1099.
- B. ALLARD, J. TEMPLIER, (2001) High molecular weight lipids from the trilaminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* 57, 459-467.
- R. ALONI, D. E. ENSTONE, C.A. PETERSON, (1998) Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207, 1-7.
- W.P. ANDERSON, (1975) Ion transport through roots. In: J.G. Porrey, D.T. Clarkson (Editoren), *The Development and Function of Roots*. Academic, London, pp 437-463.
- R.J. ARCHER, V.K. LA MER, (1955) The rate of evaporation of water through fatty acid monolayers. *J. Phys. Chem.* 59, 200-208.
- W. ARMSTRONG, D. COUSINS, J. ARMSTRONG, D.W. TURNER, P.M. BECKETT, (2000) Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Ann. Bot.* 86, 687-703.
- J. ARMSTRONG, W. ARMSTRONG, (1999) *Phragmites* die-back: toxic effects of propionic, butyric, and caproic acids in relation to pH. *New Phytologist* 142, 201-217.
- H. AZAIZEH, B. GUNSE, E. STEUDLE, (1992) Effects of NaCl und CaCl₂ on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 99, 886-894.
- K. BACKES, CH. LEUSCHNER, (2000) Leaf water relations of competitive *Fagus sylvatica* L. and *Quercus petraea* (Matt.). Liebl. trees during four years differing in soil drought. *Can. J. For.* 30, 335-346.
- D.A. BAKER, (1971) Barriers to the radial diffusion of ions in maize roots. *Planta*, 98, 285-293.

- A.M. BALDÉ, M. CLAEYS, L.A. PIETERS, V. WRAY, A.J. VLIETINCK, (1991) Ferulic acid esters from stem bark of *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry* 30, 1024-1026.
- A. BANO, K. DÖRFFLING, D. BETTIN, H. HAHN, (1993) Abscisic acid and cytokinins as possible root to shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Austr. J. Plant Physiol.* 20, 109-115.
- D. BECKER, I. DREYER, S. HOTH, J.D. REID, H. BUSCH, M. LEHEN, K. PALME, R. HEDRICH, (1996) Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. *PNAS* 93, 8123-8128.
- M.F. BENTO, H. PEREIRA, M.À CUNHA, A.M.C. MOUTINHO, K.J. VAN DEN BERG, J.J. BOON, O. VAN DEN BRINK, R.M.A. HEEREN, (2001) Fragmentation of suberin and composition of aliphatic monomers released by methanolysis of cork from *Quercus suber* L., analysed by GC-MS and MALDI-MS. *Holzforschung* 55, 487-493.
- M.A. BERNARDS, (2002) Demystifying Suberin, *Can. J. Bot.* 80, 227-240.
- M.A. BERNARDS, F.A. RAZEM, (2001) The polyphenolic domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* 57, 1115-1122.
- M.A. BERNARDS, N.G. LEWIS, (1992) Alkyl Ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry* 31, 3409-3412.
- M.A. BERNARDS, N.G. LEWIS, (1998) The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry* 47, 915-933.
- M.A. BERNARDS, M.L. LOPEZ, J. ZAJICEK, N.G. LEWIS, (1995) Hydroxycinnamic acid derived polymer constitute the polyaromatic domain of suberin. *J. Biol. Chem.* 270, 7382-7386.
- P.H. BINNEMANN, (1973) Über die chemische Zusammensetzung des Suberins bei der Kartoffelsschale und des Cutins beim Kartoffelblatt. *Dissertation Univ. Würzburg*.
- H.T. BONNETT, (1968) The root endodermis: fine structure and function. *J. Cell Biol.* 37, 199-205.
- O. BORG-OLIVIER, B. MONTIES, (1993) Lignin, suberin, phenolic acids and tyramine in the suberized, wound-induced potato periderm. *Phytochemistry* 32, 601-606.
- O. BORG-OLIVIER, B. MONTIES, (1989) Characterization of lignins, phenolic acids and tyramine in the suberized tissues of natural and wound-induced potato periderm. *C. R. Acad. Sci., Ser. 3*, 308, 141-7.
- C. BRETT, K. WALDRON, (1990) *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Unwin Hyman Ltd., London.

-
- C.H. BRIESKORN, P.H. BINNEMANN, (1972) Chemische Zusammensetzung der Wachse und des Suberins der Kartoffelschale. *Tetrahedron Lett.* 1127-1135.
- C.H. BRIESKORN, P.H. BINNEMANN, (1974) Chemische Zusammensetzung des Suberins der Kartoffelschale. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 154, 213-222.
- M.C. BRUNDRETT, D.E. ENSTONE, C.A. PETERSON, (1988) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146, 133-142.
- M.C. BRUNDRETT, B. KENDRICK, C.A. PETERSON, (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluorol yellow 088 in polyethyleneglycol-glycerol. *Biotech. Histochem.* 66, 111-116.
- C.C. CASADO, A. HEREDIA, (1998) Water permeability of hypodermis, isolated from *Clivia miniata* roots. *Z. Naturforschung*, 53c, 1096-1099.
- R. CASPARY, (1866) Bemerkungen ueber die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahrb. wiss. Bot.* 4, 101-123.
- P.M. CHANDLER, M. ROBERTSON, (1994) Gene expression by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 113-141.
- B. CHOWDHURY, D. BHATTACHARYY, S. MUKHOPADHYAY, (1996) Antimicrobial effect of some simple and complex phenolic compounds of olive fruits against pathogenic bacteria. *Can. Biomed. Lett.* 54, 45-49.
- M.J. CHRISPEELS, C. MAUREL, (1994) Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol.* 105, 9-13.
- H. ČÍŽKOVÁ, H. BRIX, J. KOPECKÝ, A. LUKAVSKÁ, (1999) Organic acids in the sediments of wetlands dominated by *Phragmites australis*: evidence of phytotoxic concentrations. *Aquatic Botany* 64, 303-315.
- D.T. CLARKSON, M. CARVAJAL, T. HENZLER, R.N. WATERHOUSE, A.J. SMYTH, D.T. COOKE, E. STEUDLE, (2000) Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.* 51, 61-70.
- D.T. CLARKSON, A.W. ROBARDS, J.E. STEPHENS, M. STARK, (1987) Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays* L.) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant Cell Env.* 10, 83-93.
- T.D. COLMER, M.R. GIBBERD, A. WIENGWEERA, T.K. TINH, (1998) The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution. *J. Exp. Bot.* 49, 1431-1436.

- H. CONERS, (2001) Wasseraufnahme und artspezifische Eigenschaften der Feinwurzeln von Buche, Eiche und Fichte: *In situ* Messungen an Altbäumen. Dissertation, Univ. Göttingen.
- H. CONERS, CH. LEUSCHNER, (2002) Water absorption by tree fine roots measured *in situ* with miniature sap flow gauges. *Oecologia*, eingereicht.
- H. CONERS, CH. LEUSCHNER, K. HARTMANN, L. SCHREIBER, (2002) Chemical composition of the periderm in relation to *in situ* water absorption rates of oak, beech and spruce fine roots. *Tree Physiol.*, eingereicht.
- R.T. CRUZ, W.R. JORDAN, M.C. DREW, (1992) Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiol.* 99, 203-213.
- J. DAINTY, (1963) Water relations of plant cells. *Adv. Bot. Res.* 1, 279-326.
- M.J. DANIELS, F. CHAUMONT, T.E. MIRKOV, M.J. CHRISPEELS, (1996) Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8, 587-599.
- M.J. DANIELS, T.E. MIRKOV, M.J. CHRISPEELS, (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel TIP. *Plant Physiol.* 106, 1325-1333.
- W.J. DAVIES, F. TARDIEU, C.L. TREJO, (1994) How do chemical signals work in plants that grow in drying soil? *Plant Physiol.* 104, 309-314.
- B.L. DE GROOT, H. GRUBMÜLLER, (2001) Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294, 2353-2356.
- O. DE SIMONE, K. HAASE, E. MÜLLER, W.J. JUNK, G. GONSIOR, W. SCHMIDT, (2002) Impact of root morphology on metabolism and oxygen distribution in roots and rhizosphere from two Central Amazon floodplain tree species. *Functional Plant Biology* 29, 1025-1035.
- O. DE SIMONE, K. HAASE, E. MÜLLER, W.J. JUNK, K. HARTMANN, L. SCHREIBER, W. SCHMIDT, (2002) Composition and function of suberized barriers in hypodermal cell walls of roots from four Amazonian tree species. *Plant Physiol.*, eingereicht.
- DEGENHARDT B, GIMMLER H (2000) Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *J. Exp. Bot.* 51, 595-603.
- C.W. DENCE, (1992) The determination of lignin. In: *Methods in lignin chemistry*, pp. 33-61, S.Y. Lin, C.W. Dence, eds., Springer, Berlin.

- F. DOMEREGUE, J.-J. BESSOULE, P. MOREAU, R. LESSIRE, C. CASSAGNE, (1998) Recent advances in plant fatty acid elongation. In "Plant Lipid biosynthesis" (J.L. Harwood ed.) 67, 185-220. Cambridge University Press, Cambridge.
- W. DRABER, J.F. KLUTH, K. TIETJEN, A. TREBST, (1991) Herbizide in der Photosyntheseforschung. Angew. Chem. 103, 1650-1663.
- F.M. DU PONT, R.T. LEONARD, (1977) The use of lanthanum to study the functional development of the Casparian strip in corn roots. Protoplasma 91, 315-323.
- D.N. DUNCAN, W.F. MEGGITT, D. PENNER, (1982) Basis for increased activity from herbicide combinations with ethofumesate applied on sugarbeet (*Beta vulgaris*). Weed Sci. 30, 195-200.
- M. ECKERT, A. BIELA, F. SIEFRITZ, R. KALDENHOFF, (1999) New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. J. Exp. Bot. 50, 1541-1545.
- N.D.C. EFFINGER, (2002) Apoplastische Barrieren in den Wurzeln von Reis und Mais: Chemische Zusammensetzung und Einfluss auf die radiale hydraulische Leitfähigkeit. Diplomarbeit, Univ. Würzburg.
- G. EGLINTON, D.H. HUNNEMAN, A. MCCORMICK, (1968) Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids. III. The mass spectra of the methyl esters trimethylsilyl ethers of aliphatic hydroxy acids. A facile method of double bond location. Org. Mass Spectrom. 1, 593-611.
- H. ELLENBERG, (1996) Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht. 5th ed. Ulmer, Stuttgart.
- D.E. ENSTONE, C.A. PETERSON, (1992) A rapid fluorescence technique to probe the permeability of the root apoplast. Can. J. Bot. 70, 1493-1501.
- D.E. ENSTONE, C.A. PETERSON, (1998) Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. Plant Cell Env. 21, 837-844.
- D.E. ENSTONE, C.A. PETERSON, (1997) Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. Can. J. Bot. 75, 1188-1199.
- M. ERSÖZ, H. J. DUNCAN, M. LALE, H.I. UCAN, I. HALIL, (1996) Herbicide penetration through isolated periderm and cuticular membranes. Environ. Technol. 17, 87-93.
- M. ERSÖZ, H.J. DUNCAN, (1994) Ion-exchange selectivities of periderm and cuticular membranes toward alkali cations. Sep. Sci. Technol. 29, 1719-31.
- M. ERSÖZ, H.J. DUNCAN, (1995) Permeability of periderm and cuticular membranes to alkali cations. J. Colloid Interface Sci. 169, 143-8.

- M. ERSÖZ, H.J. DUNCAN, (1996) Transport of K^+ ions and selective transport of alkali cations through periderm and cuticular membrane. *J. Controlled Release*, 39, 9-15.
- M. ERSÖZ, U.S. VURAL, H.J. DUNCAN, (1995) Transport and selectivities of amino acids on periderm and cuticular membrane. *Sep. Sci. Technol.* 30, 2173-87.
- K. ESAU, (1977) *Anatomy of seed plants*. John Wiley, New York.
- C.B. FAULDS, G. WILLIAMSON, (1999) The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.* 79, 393-395.
- I.B. FERGUSON, D.T. CLARKSON, (1976) Ion uptake in relation to the development of a root hypodermis. *New Phytol.* 77, 11-14.
- R. FORTMEIER, S. SCHUBERT, (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. *Plant Cell Env.* 18, 1041-1047.
- J. FRANZARING, C. KEMPENAAR, L. J. M. VAN DER EERDEN, (2001) Effects of vapors of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environ. Pollut.* 11, 21-28.
- J. FRENCH, T. C. HSIAO, E. STEUDLE, (1996) Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* 198, 348-355.
- S.C. FRY, (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37, 165-186.
- H. FUKAKI, J. WYSOCKA-DILLER, T. KATO, H. FULISAWA, P.N. BENFEY, M. TASAKA, (1998) Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 14, 425-430.
- D. GERLACH, (1984) *Botanische Mikrotechnik*. Thieme, Stuttgart.
- U. GEYER, J. SCHÖNHERR, (1990) The effect of the environment on permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. 1. Water permeability of isolated cuticular membranes. *Planta* 180, 147-153.
- M. GIERTH, R. STELZER, H. LEHMANN, (1999) An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic $Rb^+(K^+)$ transport in barley roots. *Plant and Soil* 207, 209-218.
- J.H. GRABBER, S. QUIDEAU, J. RALPH, (1996) *p*-Coumaroylated syringyl units in maize lignin: implication for α -ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry* 43, 1189-1194.
- J. GRAÇA, H. PEREIRA, (2000a), Suberin structure in potato periderm: Glycerol, long-chain monomers, and glyceryl and feruloyl dimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5476-5483.

-
- J. GRAÇA, H. PEREIRA, (2000b) Diglycerol Alkenedioates in Suberin: Building Units of a Poly(aclyglycerol) Polyester. *Biomacromolecules* 1, 519-522.
- H. v. GUTTENBERG (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: Gebrüder Lindsbauer (Editoren) *Handbuch der Pflanzenanatomie* 8, Kapitel 5 Borntraeger, Berlin.
- G.A. HARRIS, G.C. CAMPBELL, (1989) Automated quantification of roots using a simple image analyzer. *Agron J.* 81, 935-938.
- R.D. HATFIELD, J. GRABBER, J. RALPH, K. BREI, (1999a) Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: Some cautionary notes. *J. Agric. Food Chem.* 47, 628-632.
- R.D. HATFIELD, J. RALPH, J.H. GRABBER, (1999b) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* 79, 403-407.
- M. HÄUSSLING, C.A. JORNS, G. LEHMBECKER, C.H. HECHT-BUCHHOLZ, H. MARSCHNER, (1988) Ion and water uptake in relation to root development in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *J. Plant Physiol.* 133, 486-491.
- E.W.H. HAYEK, U. JORDIS, W. MOCHE, F. SAUTER, (1989) A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* 28, 2229-2242.
- T. HENZLER, E. STEUDLE, (1995) Reversible closing of water channels in *Chara* internodes provides evidence for a composite transport model of the plasma membrane. *J. Exp. Bot.* 46, 199-209.
- T. HENZLER, R.N. WATERHOUSE, A.J. SMYTH, M. CARVAJAL, D.T. COOKE, A.R. SCHÄFFNER, E. STEUDLE, D.T. CLARKSON, (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the root of *Lotus japonicus*. *Planta* 210, 50-60.
- M. HESSE, H. MEIER, B. ZEEH, (1991) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 4. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- J.B. HEYMANN, P. AGRE, A. ENGEL, (1998) Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J. Struc. Biol.* 121, 191-206.
- P.J. HOLLOWAY, (1982) Suberins of *Malus pumila* stem and root corks. *Phytochemistry* 21, 2517-2522.
- P.J. HOLLOWAY, (1983) Some variations in the composition of suberin from cork layers of higher plants. *Phytochemistry* 22, 495-502.
- E. HOSE, D.T. CLARKSON, E. STEUDLE, L. SCHREIBER, W. HARTUNG, (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J. Exp. Bot* 52, 2245-2264.

- M. HÜLSBRUCH, (1944) Fluoreszenzoptische Untersuchungen über den Wasserweg in der Wurzel. *Planta* 34, 221-248.
- P. HUTZLER, R. FISCHBACH, W. HELLER, T.P. JUNGBLUT, S. REUBER, R. SCHMITZ, M. VEIT, G. WEISSENBÖCK, J-P. SCHNITZLER, (1998) Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 49, 953-965.
- K. IYAMA, A.F.A. WALLIS, (1988) An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci. Technol.* 22, 271-280.
- M.B. JACKSON, W. ARMSTRONG, (1999) Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology* 1, 274-87.
- K.R. JACOBSEN, R.A. ROUSSEAU, R.F. DENSON, (1998) Tracing the path of oxygen into birds foot trefoil and *alfalfa* nodules using iodine vapor. *Bot. Acta* 111, 193-203.
- W.D. JESCHKE, (1984) K^+ - Na^+ exchange at cellular membranes intracellular compartmentation of cations and salt tolerance. In: *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement* (Herausgeber R.C. Staples & G.H. Toenniessen) Seite 37-66. John Wiley and Sons, New York.
- D. B. JOHNSON, W. E. MOORE, L.C. ZANK, (1961) The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi* 44, 793-798.
- J.S. JUNG, G.M. PRESTON, B.L. SMITH, W.B. GUGGINO, P. AGRE, (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269, 14648-14654.
- A.P. JUPP, E.I. NEUMANN, (1987) Morphological and anatomical effects of severe drought on the roots of *Lolium perenne* L. *New Phytol.* 105, 393-402.
- W. KAMMERLOHER, U. FISCHER, G.P. PIECHOTTKA, A.R. SCHÄFFNER, (1994) Water channels in the plasmamembrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.* 6, 187-199.
- I. KAUFMANN, (1997) Diplomarbeit, Univ. Würzburg.
- H. KIDD, D.R. JAMES, (1991) *The Agrochemical Handbook*. Unwin Brothers Limited, Old Working.
- B. A. KNIGHTS, W.M. MCKINLEY, C.T. WHEELER, (1977) Sterols of root and nitrogen fixing root nodules of *Vicia faba*. *Phytochemistry* 16, 727-728.
- P.E. KOLATTUKUDY, (2001) Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 71(Biopolyesters), 1-49.

- P.E. KOLATTUKUDY, B.B. DEAN, (1974) Structure, gas chromatographic measurement, and function of suberin synthesized by potato tuber tissue slices. *Plant Physiol.* 54, 116-21.
- P.E. KOLATTUKUDY, V. P. AGRAWAL, (1974) Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids* 9, 682-91.
- T.T. KOZLOWSKI, (1984) Plant responses to flooding of soil. *Bioscience* 34, 162-167.
- K. KROEMER, (1903) Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibl. Bot.* 59, 1-148.
- E. KUCHENBROD, M. LANDECK, F. THÜRMER, A. HAASE, U. ZIMMERMANN, (1996) Measurement of water flow in the xylem vessels of intact maize plants using flow-sensitive NMR imaging. *Bot. Acta* 109, 184-186.
- M.M. KUEHN, B.N. WHITE, (1999) Morphological analysis of genetically identified cattails *Typha latifolia*, *Typha angustifolia*, and *Typha X glauca*. *Can. J. Bot.* 77, 906-912.
- C. LAPIERRE, B. POLLET, B. MONTIES, (1991) Thioacidolysis of spruce lignin: GC-MS analysis of the main dimers recovered after Raney nickel desulphurisation. *Holzforschung* 4, 61-68.
- C. LAPIERRE, B. POLLET, J. NEGREL, (1996) The phenolic domain of potato suberin: structural comparison with lignins. *Phytochemistry* 42, 949-953.
- C. LAPIERRE, B. MONTIES, (1986) Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions. *Holzforschung* 40, 113-118.
- W. LARCHER, (1987) Streß bei Pflanzen. *Naturwiss.* 74, 158-167.
- M. L. LAVER, H.H.L.J. FANG, (1989) Ferulic acid esters from bark of *Pseudotsuga menziesii*. *Agric. Food Chem.* 37, 114-16.
- J.M. LAWTHORPE, R.C. SUN, W.B. BANKS, (1996) Fractional characterization of wheat straw lignin components by alkaline nitrobenzene oxidation and FT-IR spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* 44, 1241-1247.
- J.R.C. LEAVITT, D.N. DUNCAN, D. PENNER, W.F. MEGGITT, (1978) Inhibition of epicuticular wax deposition on cabbage by ethofumesate. *Plant Physiol.* 61, 1034-1036.
- R. LEBOUQUIN, M. SKRABS, R. KAHN, I. BENVENISTE, J.P. SALAUN, L. SCHREIBER, F. DURST, F. PINOT, (2001) CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the omega-alcohol and to the corresponding diacid. *Eur. J. Biochem.* 268, 3083-3090.

- H. LEHMANN, R. STELZER, S. HOLZAMER, U. KUNZ, M. GIERTH, (2000) Analytical electron microscopic investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* 211, 816-822.
- C. LEUSCHNER, D. HERTEL, H. CONERS, V. BÜTTNER, (2001) Root competition between beech and oak: a hypothesis. *Oecologia* 126, 276-284.
- H. LI, S. LEE, B.K. JAP, (1997) Molecular design of aquaporin-1 water channel as revealed by electron crystallography. *Nature Struct Biol* 4, 263-265.
- X. LI, W. HUA, L. LU, (2000) Synthesis and characterization of herbicidal ethofumesate. *Nanjing Ligong Daxue Xuebao* 24, 215-218.
- M.H. LOPES, C.P. NETO, A.S. BARROS, D. RUTLEDGE, I. DELGADILLO, A.M. GIL, (2000a) Quantitation of aliphatic suberin in *Quercus suber* L. cork by FTIR-spectroscopy and solid state ¹³C-NMR spectroscopy. *Biopolymers* 57, 344-351.
- M.H. LOPES, A.M. GIL, A.D.J. SILVESTRE, C.P. NETO, (2000b) Composition of suberin extracted upon gradual alkaline methanolysis of *quercus suber* L. cork. *J. Agric. Food Chem.* 48, 383-391.
- M.H. LOPES, A. SARYCHEV, A.M. GIL, C.P. NETO, (2000c) Spectra editing of 13C CP/MAS NMR spectra of complex systems: application to the structural characterization of cork cell walls. *Solid State NMR* 16, 109-121.
- S. LOTFY, J. NEGREL, F. JAVELLE, (1994) Formation of omega-Feruloyloxypalmitic acid by an enzyme from wound healing potato tuber disks. *Phytochemistry* 35, 1419-1424.
- F. LU, J. RALPH, (1997a) Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC Method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2590-2592.
- F. LU, J. RALPH, (1997b) DFRC method for lignin analysis. 1. New method for , -aryl ether cleavage: Lignin model studies. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4655-4660.
- F. LU, J. RALPH, (1998a) The DFRC method for lignin analysis. 2. Monomers from isolated lignins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 547-552.
- F. LU, J. RALPH, (1998b) The DFRC method for lignin analysis. 6. A simple modification for identifying natural acetates on lignins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4616-4619
- F. LU, J. RALPH, (1999) The DFRC Method for lignin analysis. 7. behavior of Cinnamyl end groups *J. Agric. Food Chem.* 47, 1981-1987.
- E.C. LULAI, D.L. CORSINI, (1998) Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 209-222.

- E.C. LULAI, T.P. FREEMAN, (2001) The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) periderm. *Ann. Bot.* 88, 555-561.
- E.C. LULAI, W.C. MORGAN, (1992) Histochemical probing of potato periderm with Neutral Red: a sensitive cytofluorochrome for the hydrophobic domain of suberin. *Biotech. Histochem.* 67, 185-195.
- E.C. LULAI, P.H. ORR, (1994) Techniques for detecting and measuring developmental and maturational changes in tuber native periderm. *Amer. Potato J.* 71, 489-505.
- E. MARHUENDA, M.D. GARCIA, (1985) Demonstration of the antimicrobial properties of flowers of *Ononis natrix* L. Identification of ferulic acid. *Plant. Med. Phytother.* 19, 163-172.
- A.H. MARKHART, E.L. FISCUS, A.W. NAYLOR, P.J. KRAMER (1979) Effect of abscisic acid on root hydraulic conductivity. *Plant Physiol.* 64, 611-614.
- H. MARSCHNER, (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- K. MATZKE, M. RIEDERER, (1991) A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta*, 185, 233-245.
- C. MAUREL, (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 399-429.
- M. MC NEIL, A.G. DARVILL, S.C. FRY, P. ALBERSHEIM, (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
- W. MELCHIOR, E. STEUDLE, (1993) Water transport in onion (*Allium cepa* L.) roots. Changes of axial and radial hydraulic conductivity during root development. *Plant Physiol.* 101, 1305-1315.
- N. MIYAMOTO, E. STEUDLE, T. HIRASAWA, R. LAFITTE, (2001) Hydraulic conductivity of rice roots. *J. Exp. Bot.* 52, 1835-1846.
- T. MIYAZAKI, W. TSUZUKI, T. SUZUKI, (1991) Composition and structure of anthocyanins in the periderm and flesh of sweet potatoes. *Engei Gakkai Zasshi* 60, 217-224.
- L. MOIRE, A. SCHMUTZ, A. BUCHALA, B. YAN, R.E. STARK, U. RYSER, (1999) Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol.* 119, 1137-1146.
- G.J. MOON, B.F. CLOUGH, C.A. PETERSON, W.G. ALLAWAY, (1986) Apoplastic and symplastic pathways in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Roots revealed by fluorescent dyes. *Australien J. Plant. Physiol.* 13, 637-648.

- I.M. MORRISON, D. STEWART, (1995) Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agr.* 69, 151-157.
- M. MÜLLER, C. DEIGELE, H. ZIEGLER, (1989) Hormonal interactions in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) and their effects on plant development. *Z. Pflanzenernährung Bodenkunde* 152, 247-254.
- B. MÜLLER-RÖBER, J. ELLENBERG, N. PROVART, L. WILLMITZER, H. BUSCH, D. BECKER, P. DIETRICH, S. HOTH, R. HEDRICH, (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K⁺ channel expressed in potato guard cells. *EMBO J.* 14, 2409-2416.
- E. MÜNCH, (1930) *Die Stoffbewegung in der Pflanze*, Fischer, Jena.
- R. MUNNS, (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Env.* 16, 15-24.
- R. MUNNS, R.E. SHARP, (1994) Involvement of ABA in controlling plant growth in soils at low water potential. *Austr. J. Plant Physiol.* 20, 425-437.
- G. NAGAHASHI, W.W. THOMSON, R.T. LEONARD, (1974) The Casparian strip as a barrier to the movement of lanthanum in corn roots. *Science* 183, 670-671.
- J. NEGREL, S. LOTFY, F. JAVELLE, (1995) Modulation of the activity of two hydroxycinnamoyl transferases in wound-healing potato tuber discs in response to pectinase or abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 146, 318-322.
- J. NEGREL, B. POLLET, C. LAPIERRE, (1996) Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderm of potato tuber. *Phytochemistry* 43, 1195-1199.
- G.B. NORTH, B. HUANG, P.S. NOBEL, (1993) Changes in structure and hydraulic conductivity for root junctions of desert succulents as soil water status varies. *Bot. Acta* 106, 126-135.
- G.B. NORTH, P.S. NOBEL, (1996) Radial hydraulic conductivity of individual root tissues of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as soil moisture varies. *Ann. Bot.* 77, 133-142.
- S. OLT, E. KROTZ, E. KOMOR, M. ROKITTA, A. HAASE, (2000) ²³Na and ¹H NMR microimaging of intact plants. *J. Magn. Reson.* 144, 297-304.
- M.J. OTTMANN, H. TIMM, (1984) Measurement of viable plant roots with the image analyzing computer. *Agron J.* 76, 1018-1020.
- R.A. PACCHIANO, W. SOHN, V.L. CHLANDA, J.R. GARBOW, R.E. STARK (1993) Isolation and spectral characterization of plant-cuticle polyesters. *J. Agric. Food Chem.* 41, 78-83.

-
- J. PENG, F. LU, J. RALPH, (1998) The DFRC method for lignin analysis. 4. Lignin dimers isolated from DFRC-degraded loblolly pine wood. *J. Agric. Food Chem.* 46, 553-560.
- C.J. PERUMALLA, C.A. PETERSON, D.E. ENSTONE, (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniserate hypodermis and epidermis. *Bot. J. Lin. Soc.* 103, 93-112.
- C.J. PERUMALLA, C.A. PETERSON, (1986) Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Can. J. Bot.* 64, 1873-1878.
- C.A. PETERSON, (1988) Exodermal Casparian bands, their significance for ion uptake by roots. *Physiol. Plant.* 72, 204-208.
- C.A. PETERSON, B.E.M. LEFCOURT, (1990) Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Can. J. Bot.* 68, 2729-2735.
- C.A. PETERSON, M. MURRMANN, E. STEUDLE, (1993) Location of the major barriers to water and ion movement in young corn roots of *Zea mays* L. *Planta* 190, 127-136.
- C.A. PETERSON, C.J. PERUMALLA, (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiserate hypodermis or epidermis. *Bot. J. Lin. Soc.* 103, 113-125.
- C.A. PETERSON, E. STEUDLE, (1993) Lateral hydraulic conductivity of early metaxylem vessels in *Zea mays* L. roots. *Planta* 189, 288-297.
- R.L. PETERSON, (1992) Adaptations of root structure in relation to biotic and abiotic factors. *Can. J. Bot.* 70, 661-675.
- T.A. PETERSON, E.S. SWANSON, R.J. HULL, (1986) Use of Lanthanum to trace apoplastic solute transport in intact plants. *J. Exp. Bot.* 37, 807-822.
- C.A. PETERSON, (1987) The exodermal Casparian band of onion roots blocks apoplastic movement of sulphate ions. *J. Exp. Bot.* 38, 2068-2081.
- C.A. PETERSON, (1989) Significance of the exodermis in root function. In: Structural and functional aspects of transport in roots. B.C. Loughman, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 35-40.
- C.A. PETERSON, M.E. EMANUEL, G.B. HUMPHREYS, (1980) Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Can. J. Bot.* 59, 618-625.

- C.A. PETERSON, G.J. MOON, (1993) The effect of lateral root outgrowth on the structure and permeability of the onion root exodermis. *Bot. Acta* 106, 411-418.
- C.A. PETERSON, M. MURRMANN, E. STEUDLE, (1993) Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190, 127-136.
- A.D. PEUKE, W.D. JESCHKE, W. HARTUNG, (2002) Flows of elements, ions and abscisic acid in *Ricinus communis* and site of nitrate reduction under potassium limitation. *J. Exp. Bot.* 53, 241-250.
- A.D. PEUKE, J. GLAAB, W.M. KAISER, W.D. JESCHKE, (1996) The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. IV. Flow and metabolism of inorganic nitrogen and malate depending on nitrogen nutrition and salt treatment. *J. Exp. Bot.* 47, 377-385.
- A.D. PEUKE, W. HARTUNG, W.D. JESCHKE, (1994a) The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I. Grown with low or high nitrate supply. *J. Exp. Bot.* 45, 733-740.
- A.D. PEUKE, W.D. JESCHKE, W. HARTUNG, (1994b) 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. *J. Exp. Bot.* 45, 741-747.
- A.D. PEUKE, M. ROKITTA, U. ZIMMERMANN, L. SCHREIBER, A. HAASE, (2001) Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and phloem of adult plants of *Ricinus communis* over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Plant Cell Env.* 24, 491-503.
- G. PEYRANO, E. TALEISNIK, M. QUIROGA, S.M. DE FORCHETTI, H. TIGIER, (1997) Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 387-393.
- F. PINOT, H. BOSCH, C. ALAYRAC, C. MIOSKOWSKI, A. VENDAIS, F. DURST, J.-P. SALAUN, (1993) ω -hydroxylation of oleic acid in *Vicia sativa* microsomes: inhibition by substrate analogs and inactivation by terminal acetylenes. *Plant Physiol.* 102, 1313-1318.
- F. PINOT, J.-P. SALAUN, H. BOSCH, A. LESOT, C. MIOSKOWSKI, F. DURST, (1992) ω -hydroxylation of Z9-octadecenoic, Z9,10-epoxystearic and 9,10-dihydroxystearic acids by microsomal cytochrome P450 systems from *Vicia sativa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184, 183-193.
- J.H. PRIESTLEY, E. RHODES, (1926) On the macro-chemistry of the endodermis. *Proceed. Royal Soc. London B* 100, 119-128.

- J.M. POZUELO K.E. ESPELIE; P.E. KOLATTUKUDY, (1984) Magnesium deficiency results in increased suberization in endodermis and hypodermis of corn roots. *Plant Physiol.* 74, 256-260.
- H. RAVN, C. ANDARY, G. KOVACS, P. MOELGAARD, (1989) Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 175-84.
- D.H. REINHARDT, T.L. ROST, (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environ. Exp. Bot.* 35, 563-574
- M. RIEDERER, L. SCHREIBER, (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* 52, 2023-2032.
- A.W. ROBARDS, S.M. JACKSON, D.T. CLARKSON, J. SANDERSON, (1973) The structure of barley roots in relation to the transport of ions into the stele. *Protoplasma* 77, 291-311.
- S.K. ROBERTS, (1998) Regulation of K⁺ channels in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 116, 145-153.
- S.K. ROBERTS, B.N. SNOWMAN, (2000) The effect of ABA on channel mediated K⁺ transport across higher plant roots. *J. Exp. Bot.* 51, 1585-1594.
- S.M. ROCHA, B.J. GOODFELLOW, I. DELGADILLO, P.C. NETO, A.M. GIL, (2001) Enzymatic isolation and structural characterisation of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L.. *Int. J. Biol. Macromolecules* 28, 107-119.
- M. ROKITTA, A.D. PEUKE, U. ZIMMERMANN, A. HAASE, (1999b) Dynamic studies of phloem and xylem flow in fully differentiated plants by fast nuclear magnetic resonance microimaging. *Protoplasma* 209, 126-131.
- M. ROKITTA, U. ZIMMERMANN, A. HAASE, (1999a) Fast NMR flow measurements in plants using FLASH imaging. *J. Magn. Reson.* 137, 29-32.
- C. ROLANDO, B. MONTIES, C. LAPIERRE, (1992) Thioacidolysis. In: *Methods in lignin chemistry*, pp. 334-349, S.Y. Lin, C.W. Dence, eds., Springer, Berlin.
- P. RÖSCH, J. POPP, W. KIEFER, (1999) Raman and surface enhanced Raman spectroscopic investigations on *Laminaceae* plants. *J. Molecular Structure*, 480-481, 121-124.
- I. ROSENTHAL, B. ROSEN, S. BERNSTEIN, (1997) Phenols in milk. Evaluation of ferulic acid and other phenols as antifungal agents. *Milchwissenschaft* 52, 134-138.
- B. RUBIN, U. ADLER, R. VARSANO, H.D. RABINOWITCH, (1986) Effect of ethofumesate on the epicuticular waxes of onion leaves, and on the response of plants to foliage-applied herbicides *Ann. Appl. Biol.*, 108, 365-371.

- M. RÜDINGER, S.W. HALLGREN, E. STEUDLE, E.-D. SCHULZE, (1994) Hydraulic and osmotic properties of spruce roots. *J. Exp. Bot.* 45, 1413-1425.
- I.N. SAAB, R.E. SHARP, J. PRITCHARD, G.S. VOETBERG, (1990) Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93, 1329-1336.
- J. SANDERSON, (1983) Water uptake by different regions of the barley root. Pathways of radial flow in relation to development of the endodermis. *J. Exp. Bot.* 34, 240-253.
- O.C. SANTOS, (2000) Cork industry and the world in the XVIII and XIX centuries. Konferenzbeitrag bei: Conference on cork oak forests and cork. Hannover, 16.-20. Oktober.
- B. SATTELMACHER, K.-H. MÜHLING, K. PENNEWIB, (1998) The apoplast- its significance for the nutrition of higher plants. *Z. Pflanzenenähr. Bodenk.* 161, 485-498.
- A.R. SCHÄFFNER, (1998) Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204, 131-139.
- H.W. SCHMIDT, J. SCHÖNHERR, (1982) Fine structure of isolated and non-isolated potato tuber periderm. *Planta*, 154, 76-80.
- A. SCHMUTZ, T. JENNY, N. AMRHEIN, U. RYSER, (1993) Caffeic acid and glycerol are constituents of the suberin layers in green cotton fibers. *Planta* 189, 453-60.
- J. SCHÖNHERR, (1982) Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin suberin and associated lipids. In: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler, (Herausgeber) *Encyclopedia of plant physiology*, NS, Vol. 12 B Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 154-177.
- J. SCHÖNHERR, (2000) Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta* 212, 112-118.
- J. SCHÖNHERR, (2002) A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. *Pest Manag. Sci.* 58, 343-51.
- J. SCHÖNHERR, K. LENDZIAN, (1981) A simple and inexpensive method of measuring water permeability of isolated plant cuticular membranes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102, 321-327.
- L. SCHREIBER, (1996) Chemical composition of Casparian strips isolated from *Clivia miniata* Reg. roots: evidence for lignin. *Planta* 199, 596-601.
- L. SCHREIBER, K. HARTMANN, M. SKRABS, J. ZEIER, (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal walls. *J. Exp. Bot.* 50, 1267-1280.

-
- L. SCHREIBER, H.-W. BREINER, M. RIEDERER, M. DÜGGELIN, R. GUGGENHEIM, (1994) The Casparian strip of *Clivia miniata* Reg. roots: isolation, fine structure and chemical nature. Bot. Acta 107, 353-361.
- L. SCHREIBER, M. RIEDERER, (1996) Ecophysiology of cuticular transpiration: comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. Oecologia, 107, 426-432.
- L. SCHREIBER, M. SKRABS, K. HARTMANN, D. BECKER, C. CASSAGNE, R. LESSIRE, (2000) Biochemical and molecular characterization of corn (*Zea mays* L.) root elongases. Biochemical Society Transactions 28, 647-649.
- L. SCHREIBER, M. SKRABS, K.D. HARTMANN, P. DIAMANTOPOULUS, E. SIMANOVA, J. SANTRUCEK, (2001) Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. Planta 214, 274-282.
- U. SCHREIBER, H. HORMANN, C. NEUBAUER, C. KLUGHAMMER, (1995) Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. Aust. J. Plant Physiol. 22, 209-220.
- S. SCHUBERT, A. LÄUCHLI, (1986) Na⁺ Exclusion, H⁺ Release, and Growth of Two Different Maize Cultivars under NaCl-Salinity. J. Plant. Physiol. 126, 145-154.
- S. SCHUBERT, A. LÄUCHLI, (1990) Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. Plant and Soil 123, 205-209.
- J.L. SEAGO, C.A. PETERSON, D.E. ENSTONE, (1994) Fluorescent and histochemical studies of cattail roots Am. J. Bot. 81, (6 SUPPL.) 31.
- J.L. SEAGO, C.A. PETERSON, D.A. ENSTONE, C.A. SCHOLEY, (1999) Development of the endodermis and hypodermis of *Typha glauca* Godr. and *Typha angustifolia* L. roots. Can. J. Bot. 77, 122-134.
- K. SEELKOPF, (1952) Versuche zur Synthese von Bandwurmmitteln. Arzneimittelforschung 2, 158-162
- R.S. SENOCK, C. LEUSCHNER, (1999) Axial water flux dynamics in small diameter roots of a fast growing tropical tree. Plant and Soil 208, 57-71.
- SIEDLER, P. (1892) Über den radialen Saftstrom in den Wurzeln. Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. 5, Breslau.
- A. SIEVERS, K. SCHRÖTER, (1971) Versuch einer Kausalanalyse der geotropischen Reaktionskette im Chara-Rhizoid. Planta 96, 339-353.

- N.K. SINGH, P.C. LA ROSA, A.K. HANDA, P.M. HASEGAWA, R.A. BRESSAN, (1987) Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. Proc. Nat. A. Soc. USA 84, 739-743.
- C.L. SOLIDAY, B.B. DEAN, P.E. KOLATTUKUDY, (1978) Suberization: inhibition by washing and stimulation by abscisic acid in potato disks and tissue culture. Plant Physiol. 61, 170-174.
- C.L. SOLIDAY, P.E. KOLATTUKUDY, R.W. DAVIS, (1979) Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the major diffusion barrier to water vapor in potato tuber (*Solanum tuberosum*). Planta 146, 607-614.
- A. SOUKUP, O. VOTRUBOVÁ, H. ČÍŽKOVÁ, (2002) Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. New Phytologist 153, 277-287.
- C.M. SPICKETT, N. SMIRNOFF, R.G. RATCLIFFE, (1993) An in vivo nuclear magnetic resonance investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and *Spartina anglica* roots during exposure to high salt concentrations. Plant Physiol. 102, 629-638.
- R.E. STARK, W. SOHN, R.A. JR. PACCHIANO, M. AL-BASHIR, J.R. GARBOW, (1994) Following suberization in potato wound periderm by histochemical and solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance methods. Plant Physiol. 104, 527-33.
- E. STEUDLE, (1993) Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue, and organ level. In: J.A.C. Smith, H. Griffith (eds) Water deficits: plant responses from cell to community. Oxford: Bios Scientific Publishers. pp. 5-36.
- E. STEUDLE, (1994) Water transport across roots. Plant and Soil 167, 79-90.
- E. STEUDLE, (1997) Water transport across plant tissue: role of water channels. Biology of the Cell 89, 259-273.
- E. STEUDLE, (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 847-875.
- E. STEUDLE, J. FRENCH (1996) Water transport in plants: role of the apoplast. Plant and Soil 198, 67-79.
- E. STEUDLE, T. HENZLER, (1995) Water channels in plants: Do basic concepts of water transport change? J. Exp. Bot. 46, 1067-1076.
- E. STEUDLE, H. HEYDT, (1997) Water transport across tree roots. In: Trees – contributions to Modern Tree Physiology. Eds. H. Rennenberg, W. Eschrich, H. Ziegler, pp. 239-255. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

-
- E. STEUDLE, A.B. MESHCHERYAKOV, (1996) Hydraulic and osmotic properties of oak roots. *J. Exp. Bot.* 47, 387-401.
- E. STEUDLE, M. MURRMANN, C.A. PETERSON, (1993) Transport of water and solutes across maize roots modified by puncturing the endodermis. Further evidence for the composite transport model of the root. *Plant Physiol.* 103, 335-349.
- E. STEUDLE, R. OREN, E.-D. SCHULZE, (1987) Water transport in maize roots. Measurement of hydraulic conductivity, solute permeability, and of reflection coefficients of excised roots using the root pressure probe. *Plant Physiol.* 84, 1220-1232.
- E. STEUDLE, C.A. PETERSON, (1998) How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49, 775-788.
- E. STEUDLE, H.M. ZIMMERMANN, T. HENZLER, (1998) Water uptake by plant roots, modes of regulation. In: O. Ito, J O'Toole, B. Hardy, eds., Genetic improvement of rice for water limited environments. Los Banos, Manila, Phillipinen: International Rice Research Institute (IRRI), 73-88.
- E. STEUDLE, U. ZIMMERMANN, (1974) Determination of the hydraulic conductivity and of reflection coefficients in *Nitella flexilis* by means of direct cell-turgor pressure measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 332, 399-412.
- E. TALEISNIK, G. PEYRANO, A. CORDOBA, C. ARIAS, (1999) Water retention capacity in root segments differing in the degree of exodermis development. *Ann. Bot.* 83, 19-27.
- S.D. TYERMAN, H.J. BOHNERT, C. MAUREL, E. STEUDLE, J. A. C. SMITH, (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* 50, 1055-1071.
- D.S. VAN FLEET, (1961) Histochemistry and function of the endodermis. *Bot. Rev.* 27, 165-220.
- C. VAN WISSELINGH, (1926) Beitrag zur Kenntnis der inneren Endodermis. *Planta* 2, 27-43.
- S.F. VAUGHN, E.C. LULAI, (1991) Suberin stains comparison of fluorescent stains for the detection of suberin in potato Periderm. *Amer. Potato J.* 68, 667-674.
- E. VOGT, J. SCHÖNHERR, H.W. SCHMIDT, (1983) Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*Solanum tuberosum* L). *Planta* 158, 294-301.
- F. VON HÖHNEL, (1877) Über den Kork und verkorkte Gewebe überhaupt. *Sitzungsber. Math.-Naturwiss. Kl. Kais. Akad. der Wiss. Wien* 76, 507-660.

- K. VON WILPERT, (1990) Die Jahrringstruktur von Fichten in Abhängigkeit vom Bodenwasser-haushalt auf Pseudogley und Parabraunerde. Freiburger Bodenkundl. Abh. 24, 1-184.
- K.A. WALKER, J.L. HARWOOD, (1986) Evidence for separate elongation enzymes for very-long-chain-fatty-acid synthesis in potato (*Solanum tuberosum*). Biochem. J. 237, 41-46.
- R.R. WALKER, M. SEDGLEY, M.A. BLESING, T.J. DOUGLAS, (1984) Anatomy, ultrastructure and assimilate concentrations of roots of *Citrus* genotypes differing in ability for salt exclusion. J. Exp. Bot. 35, 1481-1494.
- W.M. WALTHER, W.E. SCHADEL, (1983) Structure and composition of normal skin (periderm) and wound tissue from cured sweet potatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108, 909-914.
- M. WATT, C.M. VAN DER WEELE, M.E. MCCULLY, M.J. CANNY, (1996) Effects of local variations in soil moisture on hydrophobic deposits and dye diffusion in corn roots. Bot. Acta 109, 492-501.
- P.J. WHITE, H.C. BOWEN, K.E. WOOLAWAY, (2000) Transport of calcium to the xylem in plant roots. J. Exp. Bot. 51, Supplement 5
- C.A. WILSON, C.A. PETERSON, (1983) Chemical composition of the epidermal, hypodermal, endodermal and intervening cortical cell walls of various plant roots. Ann. Bot. 51, 759-769.
- B. YAN, R.E. STARK, (1998) A WISE NMR Approach to Heterogeneous Biopolymer Mixtures: Dynamics and Domains in Wounded Potato Tissues Macromolecules 31, 2600-2605.
- B. YAN, R.E. STARK, (2000) Biosynthesis, molecular structure, and domain architecture of potato suberin: a ¹³C NMR Study using isotopically labeled precursors. J. Agric. Food Chem. 48, 3298-3304.
- J. ZEIER, (1998) Pflanzliche Abschlussgewebe der Wurzel: Chemische Zusammensetzung und Feinstruktur der Endodermis in Abhängigkeit von Entwicklung und äußeren Einflüssen. Dissertation Univ. Würzburg.
- J. ZEIER, A. GOLL, M. YOKOYAMA, I. KARAHARA, L. SCHREIBER (1999a) Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. Plant Cell Env. 22, 271-279.
- J. ZEIER, K. RUEL, U. RYSER, L. SCHREIBER, (1999b) Chemical analysis and immunolocalization of lignin and suberin in the endodermis and hypodermis/rhizodermis of developing maize (*Zea mays* L.) roots. Planta 209, 1-12.

-
- J. ZEIER, L. SCHREIBER, (1997) Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*: Identification of the biopolymers lignin and suberin. *Plant Physiol.* 113, 1223-1231.
- J. ZEIER, L. SCHREIBER, (1998a) Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206, 349-361.
- G.L. ZHU, E. STEUDLE, (1991) Water transport across maize roots. *Plant Physiol.* 95, 305-315.
- H. ZIEGENSPECK, (1921) Ueber die Rolle des Casparyschen Streifens der Endodermis und analoge Bildungen. *Ber. Deut. Bot. Gesellsch.* 39, 302-310.
- H.M. ZIMMERMANN, E. STEUDLE, (1998) Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206, 7-19.
- H.M. ZIMMERMANN, K. HARTMANN, L. SCHREIBER, E. STEUDLE, (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210, 302-311.

■ Beiträge in Fachzeitschriften:**Transition-metal-mediated radical reactions as an easy route to 2-C-analogs of carbohydrates.**

Linker, T.; **Hartmann, K.**; Sommermann, T.; Scheutzow, D.; Ruckdeschel, E.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (1996), 35(15), 1730-1732. *Angew. Chem.* (1996), 108(15), 1819-1821.

Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls.

Schreiber, L.; **Hartmann, K.**; Skrabs, M.; Zeier, J.; *J. Exp. Bot.* (1999), 50(337), 1267-1280.

Biochemical and molecular characterization of corn (*Zea mays* L.) root elongases.

Schreiber, L.; Skrabs, M.; **Hartmann, K.**; Becker, D.; Cassagne, C.; Lessire, R.; *Biochem. Soc. Trans.* (2000), 28(6), 647-649.

Metabolite monitoring in plants with double-quantum filtered chemical shift imaging.

Wolf, K.; Van der Toorn, A.; **Hartmann, K.**; Schreiber, L.; Schwab, W.; Haase, A.; Bringmann, G.; *J. Exp. Bot.* (2000), 51(353), 2109-2117.

Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.).

Zimmermann, H. M.; **Hartmann, K.**; Schreiber, L.; Steudle, E.; *Planta* (2000), 210, 302-311.

Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks.

Schreiber, L.; Skrabs, M.; **Hartmann, K.**; Diamantopoulos, J.; Simanova, E.; Santrucek, J.; *Planta* (2001) 214, 274-282.

Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis.

Hartmann, K., Peiter, E.; Koch, K.; Schubert, S.; Schreiber, L.; *Planta* (2002), 215, 14-25.

Chemical composition of the periderm in relation to in situ water absorption rates of oak, beech and spruce fine roots.

Coners, H.; Leuschner, C.; **Hartmann, K.**; Effinger, N.; Schreiber, L.; *Tree Physiol.* (2003, im Druck).

Suberin composition and oxygen transport properties of hypodermal cell walls in roots from four Amazonian tree species.

De Simone, O.; Haase, K.; **Hartmann, K.**; Junk, W. J.; Müller, E.; Schreiber, L.; Schmidt, W.; *Plant. Physiol.* (2003, im Druck).

■ Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber für die Vergabe des sehr interessanten und spannenden Themas, sowie die stets konstruktive Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit bedanken. Die Gewährung größtmöglicher Freiheit bei der Arbeit und wenn nötig tatkräftige Unterstützung dabei ergaben eine einmalige Arbeitsatmosphäre die letztendlich für die vielen Seiten dieser Arbeit verantwortlich zu machen ist.

Zu Danken habe ich auch Herrn Prof. Dr. Markus Riederer für die großzügige Bereitstellung der Analysentechnik und der Klimakammern sowie der Versuchsgewächshäuser des Botanischen Instituts in Würzburg. Herrn Prof. Dr. A. Haase danke ich für die Bereitstellung der NMR-Spektrometer am Institut für Biophysik in Würzburg, und Herrn Prof. Dr. E. Steudle (Bayreuth) für die Möglichkeit einen Einblick in die Druckmesssondentechnik zu erhalten und die interessante Tour durch Südengland.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen Praktikant(Inn)en, Diplomand(Inn)en und Staatsexamenskandidaten bedanken, das waren: Angela (Angi) Baier (Photosyntheseinhibition), DJ (Christian Hell) (...im Moos nix los), Nicole-Dominique Christine Effinger, (Reis, Mais und Wurzeldruckmessungen), Kristina Stöckler (Wundperiderm) und Markus Kron (Mais, Rubidium).

Ohne die manuelle und moralische Unterstützung im Würzburger Labor von unserer Manu(ela) Skrabs wäre vieles nicht so reibungslos gelaufen, ein herzliches Dankeschön dafür. In diesem Zusammenhang geht mein Dank auch an die Würzburger, Dr. Claus Markstätter und Bianca Pink für den Support in analytischen Fragestellungen, Frieda und Astrid aus der Botanik I danke ich für die klaglose Bearbeitung der zahlreichen ICP-, CHN- und Proteinanalysen, allen Mitarbeitern des Botanischen Gartens und der Werkstatt danke ich für die stets freundliche und oftmals blitzschnelle Erfüllung aller Aufträge und Wünsche.

Mein Dank geht auch an die vielen Kooperationspartner die mit fruchtbaren Diskussionen und erfolgreicher Zusammenarbeit viele Ideen in diese Arbeit brachten. Vor allem müssen hier die leider mit wenig Erfolg aber umso mehr Mühen vorbereiteten und durchgeführte NMR-Experimente von Dr. Kristina Wolf genannt werden. Außerdem danke ich Dr. Jürgen Zeier, der mit seiner Arbeit die Grundlage für dieses Werk legte, Edgar Peiter aus Giessen, für die knifflige Knöllchen-Frage, und Dr. Kerstin Koch (Bonn), die mithelfen konnte diese zu veranschaulichen, Dr. Hilde Zimmermann danke ich für die Durchführung der

Druckmesssondenexperimente am Mais in Bayreuth, Dr. Heinz Coners aus Göttingen/Kassel für die interessante Fragestellung über die Baumwurzeln, Dr. Jim Seago (Oswego, USA) für den Ausflug in die Anatomie submerser Pflanzen, Prof. Dr. Carol Peterson (Waterloo, CA) für die kompetente und schnelle Beantwortung anatomischer Fragestellungen.

Für die richtige Atmosphäre sorgten die Labormannschaften in Würzburg und Bonn, Dank dafür an Dr. Katja Vorndran, Jasmin Scheinpflug-Lichtinger, Eva Šimáňová, Michael Kutzer, Maria Magdalena Kühne, und an die Desirée, besonders aber danke ich Ursula Krimm, für die gemeinschaftliche Lösung und moralische Stütze bei den schier endlosen Problemen des Laborumzugs und der Laboreinrichtung in Bonn sowie für die Unterstützung bei der Lösung biologischer Fragestellungen.

Korrekturgelesen haben diese Arbeit Ursula Krimm, Dr. Katja Vorndran, Eva Šimáňová (summary) und Gertraude Hartmann. Danke dafür!

Danken möchte ich auch dem Chemiker-„Dream Team“ Uwe Schneider und Dr. Thomas Sommermann für die Freundschaft und Unterstützung während der ganzen Studienzeit und danach. Ebenso danke ich Edeltraud und Rudolf Vorndran für die Anteilnahme und die Zeit in Würzburg, die ich bei ihnen wohnen durfte.

Mein herzlichster Dank für so vieles geht an Katja Vorndran, auch für die Korrektur dieser Arbeit, vor allem aber für die liebevolle Unterstützung und die Freuden der vergangenen Jahre.

Nicht Zuletzt danke ich meinen Eltern für die immer große Anteilnahme und kompromisslose Unterstützung in jeder Beziehung während des gesamten Studiums.

Allen ein herzliches

Dankeschön!!!

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Promotionsverfahren vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 23. August 2002