
2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial und Kultivationsmethoden

Alle Untersuchungen wurden an selbstkultivierten Keimlingen der Arten *Helianthus annuus* L., *Zea mays* L. und *Nicotiana tabacum* L. durchgeführt. Das Saatgut von *Helianthus annuus* L. wurde von Rollis, Hargelsberg, Österreich bezogen. Karyopsen von *Zea mays* L. cv Garant FAO 240 stammten von der Firma Asgrow (Bruchsal, FRG). Die Sorte Helix wurde von der Kleinwanzlebener Saatzucht (Einbeck, FRG) zur Verfügung gestellt. Tabak-Saatgut der Sorte Xanthi wurden freundlicherweise als Wildtyp und als *antisense*-Konstrukt bezüglich des Aquaporins 1 (Nt.AQP.1) aus dem tonoplastidären Raum (NCBI-Zugangsnummer: Y08161) von Dr. Alfons Weig, Universität Bayreuth, bereitgestellt. Die Linien TIP-M1-1 und TIP-M1-5 stellen hierbei zwei voneinander unabhängige Regenerate dar. Saatgut von *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun als Wildtyp und als *antisense*-Konstrukt bezüglich des Wasserkanals Nt.AQP.1 (NCBI-Zugangsnummer: Y001416) des Plasmalemmas (PIP) wurden von Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff, Universität Würzburg, bezogen. Die Linien PIP-18-3, PIP-4-3, PIP-11-7, und PIP-3-4 stellen hierbei unabhängige Transformanden dar.

Maiskaryopsen und Sonnenblumensamen wurden vier bis fünf Tage bei 25 °C im Dunkeln auf mit 0.5 mM CaSO₄ angefeuchtetem Filterpapier, Tabaksamen im Licht 10 bis 14 Tage auf einem feuchten 1:1 Vermiculit/Sand-Gemisch (v/v) vorgekeimt. Nach dieser Zeit wurden sie pikiert und 10 bis 14 Tage kultiviert. Die weitere Anzucht erfolgte für alle Pflanzen in einer Nährlösung mit den Nährelementen modifiziert nach Pirson und Seidel (1950): 1.5 mM KH₂PO₄, 2.0 mM KNO₃, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 18 µM FeNaEDTA, 8.1 µM H₃BO₃ und 1.5 µM MnCl₂. Die ungepufferte Nährlösung hatte einen pH-Wert von 5.5. Die drei verwendeten Pflanzenarten wurden in Hydrokultur weiterangezogen. Die Keimpflanzen wurden vorsichtig auf 100 ml oder 1.8 l Hydrokulturtöpfe überführt, wobei sie am unteren Hypokotyl bzw. am Mesokotyl mit Hilfe von Schaumstoff in Bohrungen angepasster PVC-Abdeckungen befestigt wurden. Zur Aufrechterhaltung aerober Bedingungen wurde die Hydrokulturlösung kontinuierlich mit einem Druckluftstrom durchspült. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus des Botanischen Instituts in einem Tag-und-Nacht-

17 °C. Zusätzlich zum Tageslicht wurde eine Quecksilberdampfampe (Osram, München, FRG) installiert, die $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produzierte. Mais wurde parallel dazu in Luftkultur („Aeroponics“) kultiviert. Hier wuchsen die Keimlinge in einem 1m^3 großen, abgedunkelten Behälter. Die Keimlinge wurden mittels Schaumstoff in kleinen Öffnungen des Deckels befestigt. Der Boden des Containers war mit 20 l Nährlösung befüllt, die ein Zerstäuber (Defensor; Axair, Nürnberg, FRG) auf die Wurzeln sprühte. Die Gesamtsprühzeit pro Tag betrug 10 Stunden und war gleichmäßig auf 24 Stunden verteilt (Sprühintervall: 25 min h^{-1})

2.1.1 Bestimmung von Wurzellänge und –oberfläche

Wurzellängen wurden mittels eines Lineals gemessen. Die Oberfläche der Wurzelsysteme konnte mit Hilfe von DIAS (**D**elta-**T** **I**mage **A**nalysis **S**ystem; Delta-T Devices; Cambridge, UK) bestimmt werden. Dieses Softwareprogramm ermittelt über ein computergesteuertes Videosystem die Fläche eines Objektes durch Bestimmung der im Vergleich zum hellen Hintergrund (Leuchttisch) dunklen Pixel. Um den Kontrast zwischen Wurzel und Hintergrund zu verstärken, wurden diese 30 s in einer 0.25 mM Lösung von Methylviolett (Sigma, Deisenhofen, FRG) gefärbt und unverzüglich auf einer Glasplatte vermessen. Zusätzlich zur Gerätekalibrierung wurde parallel zu jedem Messvorgang die Oberfläche eines geeichten Drahtes, der dem Durchmesser der Wurzeln entsprach, mitbestimmt und dementsprechend die Wurzeloberfläche korrigiert (Ottmann und Timm 1984, Harris und Campbell 1989, Ebert et al. 1991). Die Wurzeloberfläche errechnete sich unter der Annahme einer zylindrischen Wurzelgestalt aus der projizierten Fläche ($2r_{\text{Wurzel}}l_{\text{Wurzel}}$; r = Radius, l = Länge) multipliziert mit π .

2.1.2 Bestimmung des Zellvolumens

Zur Bestimmung des Zellvolumens im Cortex von Maiswurzelzellen wurden Wurzelquer- und Wurzellängsschnitte im untersuchten Bereich, 40 bis 60 mm oberhalb der Wurzelspitze, per Hand angefertigt. Die frischen Schnitte wurden kurz mit einer 0.05 %igen wässrigen Lösung Toluidin-Blau-O (Chroma-Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart, FRG) gefärbt, um die Zellwände blau zu färben (O'Brien et

und Querschnitte unter geeigneten Vergrößerungen mit Eichskala in einem Zeiss Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, FRG) fotografiert.

Zelllängen (l_{Zelle}) und durchschnittliche –radien (r_{Zelle}) wurden mittels eines Lineals bestimmt. Die Zelloberfläche errechnet sich aus $\pi \cdot 2r_{\text{Zelle}} \cdot l_{\text{Zelle}}$, wobei Oberseite und Boden einer zylindrischen Zelle vernachlässigt wurden.

2.2 Mikroskopische Techniken

2.2.1 Lichtmikroskopie

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden Handquerschnitte durch Primärwurzeln von Mais in Abständen von 20 bis 400 mm oberhalb der Wurzelspitze bis hin zur Wurzelbasis angefertigt. Die Wurzeln stammten sowohl aus Hydro- als auch aus Luftkultur. Handschnitte durch *Helianthus annuus* L. wurden in Abständen von 10 bis 30 mm von der Wurzelbasis aus angefertigt. Die frischen Schnitte wurden sofort mit Hilfe eines Axioplan-Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss, Oberkochen, FRG) durchlicht- oder fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Anregungsquelle für die Fluoreszenzmikroskopie diente eine Quecksilberdampf Lampe (HBO 50W, Osram, München, FRG), aus deren Linienspektren durch vier verschiedene Filtersätze (Zeiss, Oberkochen, FRG) Anregungsquellen von 365, 395-440, 450-490 und 546 nm zur Verfügung standen. Long-Pass Filter ermöglichten eine Beobachtung bei Fluoreszenzlicht von 397, 470, 520 oder 590 nm. Durch ein Bildaufzeichnungsgerät (Seescan; Intas, Göttingen, FRG) bestand die Möglichkeit der Bildvisualisierung und –analyse auf einem Farbmonitor sowie der digitalen Bildspeicherung.

2.2.2 Histochemie

2.2.2.1 Sudan-III Färbung

Färbungen von Suberin mit dem roten, lipophilen Farbstoff Sudan-III wurden nach Gerlach (1984) durchgeführt. Dazu wurde eine gesättigte Lösung von Sudan-III (Merck, Darmstadt, FRG) in 92 % (v/v) Ethanol mit dem gleichen Volumen an

Objektträger getropft. Ein frischer Schnitt wurde umgehend aufgelegt und mit einem weiteren Tropfen bedeckt. Der Objektträger konnte so auf einer Heizplatte für 10 min auf 70 °C erhitzt werden. Anschließend wusch man die Querschnitte gründlich mit Glycerin / Wasser (1:1; v/v) und untersuchte sie mikroskopisch.

2.2.2.2 Berberin-Toluidin-Blau Färbung

Eine empfindlichere und für Caspary'sche Bänder spezifischere histochemische Methode ist die Berberin-Toluidin-Blau Färbung nach Brundrett et al. 1988. Eine 0.1 %ige wässrige Lösung von Berberin-Hemi-Sulfat (Sigma, Deisenhofen, FRG) wurde auf einen Objektträger getropft. Frische Handschnitte wurden darin für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mehrmals mit frischem Wasser gespült. Anschließend gab man eine 0.5 %ige wässrige Lösung von Toluidine-Blau-O (Chroma Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart, FRG) (anstelle von Anilinblau aus der Originalvorschrift) auf die Schnitte und färbte diese darin für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit erfolgte wiederum mehrmaliges Waschen mit Wasser. Eine 0.1 %ige wässrige Lösung von FeCl₃ (Merck, Darmstadt, FRG) wurde mit dem gleiche Volumen Glycerin (AppliChem, Darmstadt, FRG) vermischt. In dieses Medium wurden die Schnitte sofort eingebettet und bei einem Fluoreszenzlicht von 397 nm untersucht.

2.2.2.3 Berberin-Thiocyanat als apoplastischer Tracer

Die Fällung des Fluoreszenzfarbstoffes Berberin-Hemi-Sulfat (Sigma, Deisenhofen, FRG) mit KSCN (Merck, Darmstadt, FRG) in pflanzlichem Gewebe kann benutzt werden, um den für Berberin frei zugänglichen apoplastischen Raum einer Wurzel zu bestimmen (Enstone und Peterson 1992a, 1992b). Es wurden Wurzelstücke gleichen Alters von *Zea mays* L., kultiviert sowohl in Hydro- als auch in Luftkultur, verwendet. Die Schnittstellen wurden mit Paraffin (Schmelzpunkt: 42°C – 44°C; Merck, Darmstadt, FRG) versiegelt und anschließend in einer 0.05% (w/v) gepufferten Berberin-Hemi-Sulfat Lösung 45 min inkubiert (Puffer: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.5 mM Ca(NO₃)₂; pH = 6). Anschließend wurden die Wurzelstücke mehrmals kurz in kaltem Puffer gewaschen, um dann gut bedeckt für weitere 45 min in einer 0.05 M, gepufferten (s.o.) KSCN-Lösung zu liegen. Am Ende dieser Inkubationszeit wurde

Schnitte wurden darin bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Vor der Verwendung wurden diese mit frischer Thiocyanatlösung gespült und trockengetupft. In direktem Anschluss wurden Handquerschnitte angefertigt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop bei geeigneter Vergrößerung unter Blaulicht (460 nm).

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Elementaranalysen

2.3.1.1 Stickstoff- und Kohlenstoffgesamtgehalte

Die Bestimmung der Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte wurde mit Hilfe eines CN-Analysators (Elementaranalysator CHN-O-Rapid; Hareus, Hanau, FRG) durch oxidative Verbrennung bei 1600°C durchgeführt. Dabei wurde Acetanilid (10.36 % N, 71.09 % C; Merck, Darmstadt, FRG) in Mengen von 2 – 5 mg als Standardsubstanz verwendet. Von nachgetrockneten, feingemahlenden Gewebeproben wurden jeweils 5 mg eingesetzt. Standardsubstanz und Probenmaterial wurden mittels einer Mikrofeinwaage in Zinnschiffchen (Haraeus, Hanau, FRG) eingewogen. Die Angabe der Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte erfolgte in Prozent der eingesetzten Trockenmasse.

2.3.1.2 ICP-Spektroskopie

Die Gesamtgehalte der Elemente Schwefel, Phosphor, Kalium, Calcium, Magnesium und Zink in Wurzelgewebeproben wurden mittels ICP-Atomemissionsspektroskopie (Jobin Yvon 70 PLUS, Software Version 3.34, Jobin Yvon Instruments S. A. GmbH, Grasbrunn, FRG, mit angeschlossenem automatischen Probenwechsler Gilson 222, IBM-PC und Drucker) bestimmt.

Von getrockneten und feingemahlenden Gewebeproben wurden mindestens 30 mg durch einen Säureaufschluss mit 750 µl 65% HNO₃ suprapur und 250 µl 30% HCl suprapur in einer Druckaufschlussapparatur (Seif Aufschlusstechnik,

Menge Aqua demin. aufgenommen. Die Gehalte der Angaben erfolgte in ppm (mg kg⁻¹ Trockenmasse).

2.3.1.3 Anionenanalysen

Die Gehalte bzw. Konzentrationen der Chlorid-, Nitrat-, Phosphat- und Sulfat-Anionen wurden nach geeigneter Verdünnung mit Aqua demin. in wässrigen Extrakten von Gewebeproben mittels HPLC (Ionenchromatograf IC 1000, mit angeschlossenenem Probengeber BT 7041 und Leitfähigkeitsdetektor BT 0330, Biotronic, Maintal, FRG und Integrator Printer-Plotter C-R1B, Chromatopak, Shimadzu, Tokio, Japan) bestimmt. Als Standard wurde ein Gemisch der entsprechenden Anionen mit der jeweiligen Endkonzentration von 0.1 mM verwendet. Das feingemahlene Probenmaterial wurde im Verhältnis 20 µl (mg TG)⁻¹ mit Aqua demin. versetzt und fünf min im Thermoblock auf 105 °C erhitzt. Anschließend wurden die Suspensionen 10 min bei 4000 U min⁻¹ zentrifugiert (Mikroliter Zentrifuge; Hettich, Tuttlingen, FRG). Der durch das Kochen bedingte Wasserverlust wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

2.3.2 Osmotisches Potential

Die Bestimmung der Osmolalität des Xylemsaftes erfolgte über die Methode der Gefrierpunktserniedrigung mit einem kryoskopischen Osmometer (Osmomat 030; Gonotec GmbH, Berlin, FRG). Die Osmolalität wurde umgerechnet in das osmotische Potential des Xylemsaftes und der Gewebe.

2.3.3 Gewinnung und Analyse von Zellwandisolaten

2.3.3.1 Zellwandisolierung

Als Pflanzenmaterial wurden Primärwurzeln von 11 Tage alten Maiskeimlingen, angezogen in Hydro- und in Luftkultur, und von 10 Tage alten Sonnenblumenkeimlingen aus Hydrokultur verwendet. Maiswurzeln wurden jeweils in fünf gleich große Wurzelzonen (Zone 1 bestand dabei aus der Wurzelspitze, Zone fünf aus der Wurzelbasis) aufgeteilt. Bei den Sonnenblumenwurzeln wurde der Bereich der Seitenwurzelzone verwendet. Die Wurzelsegmente der jeweiligen Zonen wurden in 2 bis 3 cm lange Stücke geschnitten und in einer Enzymlösung, bestehend aus Cellulase, Pectinase und Hemicellulase (Onozuka R-10 und Macerozym R-10; Serva, Heidelberg, FRG) in 10 mM Citratpuffer pH = 3 mit Natriumazidzusatz (0.01%) inkubiert. Die enzymatische Verdauung der Zellwände dauerte zwischen drei und fünf Wochen. Lignifizierte und suberinisierte Zellwände bleiben von diesem Verdauungsprozess unangetastet, die Zellwände des Wurzelcortex werden dagegen vollständig verdaut (Zeier 1998). Mittels eines Binokulars (Leitz, Wetzlar, FRG) und zwei Uhrmacherpinzetten wurden Hypodermis (mit anhaftender Rhizodermis) und Endodermis von den Xylemgefäßen getrennt. Die so erhaltenen Zellwandisolate wurden dreimal für je 1h mit 10 mM Boratpuffer (pH = 9) und dreimal mit deionisiertem Wasser für je 30 min gewaschen. Anschließend wurden sie im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dort aufbewahrt.

2.3.3.2 Umesterung

Der Abbau des Zellwandmaterials für die Detektion von Suberin wurde nach Kolattukudy und Agrawal (1974) durchgeführt. Sie läuft nach dem in Abb. 2-1 dargestellten Reaktionsschema ab.

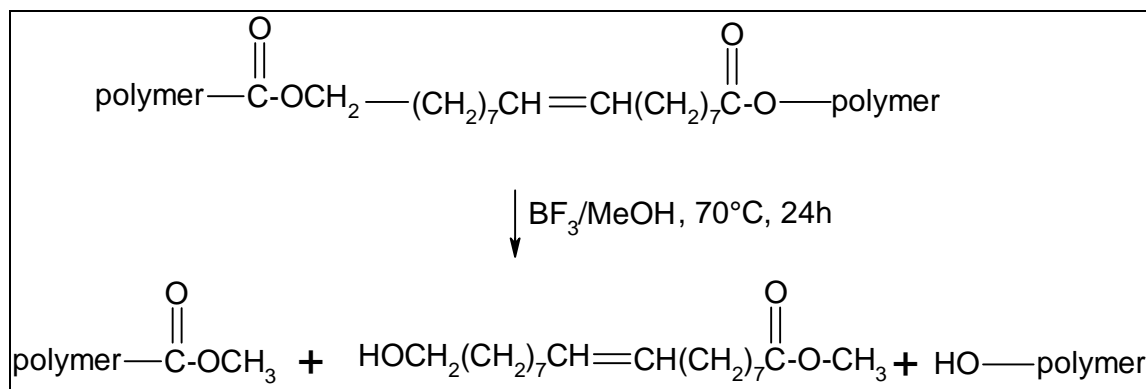


Abb. 2-1 Abbau des Suberin-Polymers aus Endo- und Hypodermisisolaten mittels BF_3 /Methanol zu den jeweiligen Fettsäuren.

Ca. 1 mg Zellwandisolat wurde mit 1 ml einer 10% BF_3 /Methanol-Lösung versetzt und für 24h auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen trennte man die Reaktionslösung vom Zellwandmaterial. Das Zellwandisolat wurde dreimal mit je 1 ml CHCl_3 gewaschen, die organischen Phasen mit der Reaktionslösung vereinigt und mit 20 μg Dotriacontan als internem Standard versetzt. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit je 1 ml gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und auf ein Endvolumen von 100 μl konzentriert.

2.3.3.3 GC/MS

Die Reaktionsprodukte aus der Umesterung wurden Druck- und Temperaturkontrolliert in einem Gaschromatografen (HP 5890 Series, Hewlett Packard, USA) mit einem Flammenionisationsdetektor (GC/FID, Hewlett Packard 5890 Series II, USA) analysiert, wie bei Zeier 1998 beschrieben. Als Trennsäulen dienten 3 m lange Fused-Silica-Kapillarsäulen (DB-1; Fisons, Folsom, USA) mit einem Innendurchmesser von 0.32 mm und einer Filmschichtdicke von 0.1 μm . Zur qualitativen Bestimmung der Analysen wurde ein massenselektiver Quadrupoldetektor (GC/MS, Hewlett Packard 5971A) verwendet. Die Massenspektren wurden bei 70eV aufgenommen.

Vor der Injektion (1 μl) wurden die Proben mit 20 μl getrocknetem Pyridin und 20 μl BSTFA (N,N-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid; Macherey-Nagel, Düren, FRG) für 30 min auf 70°C erhitzt. Freie Hydroxyl- oder Carboxylgruppen wurden so in die entsprechenden, leichter flüchtigen Trimethylsilylether bzw. -ester derivatisiert. Die Datenanalyse und Integration der Peakflächen erfolgte mit der HP-Software

Man erhält die quantitative und qualitative Suberin-Zusammensetzung der Zellwände. Dabei unterscheidet man zwischen aliphatischem und aromatischem Suberin.

2.3.4 Abscisinsäuregehalte und –konzentrationen

2.3.4.1 ELISA

Die Quantifizierung nicht radioaktiver ABA erfolgte nach Weiler (1986) mittels ELISA (**E**nzyme-**l**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay) in Mikrotiterplatten. Die Reaktionsgefäße wurden zunächst mit RAMIG (**R**abbit **A**nti **M**ouse **I**mmuno**G**lobuline; Sigma, Deisenhofen, FRG) beschichtet. An diesen ersten Antikörper wurde ein zweiter, für (+)-ABA spezifischer, monoklonaler Antikörper gebunden. Für den Test wurden 100 µl der gegebenenfalls verdünnten Proben zusammen mit einem Tracer (kovalent an ABA gebundene alkalische Phosphatase, Prof. Dr. E. Weiler, Universität Bochum) in die Reaktionsgefäße pipettiert. Nach dem Entfernen der Proben-Tracer-Gemische und Waschen der Platten mit Wasser wurde p-Nitrophenylphosphat, ein farbloses Phosphatasesubstrat (Sigma, Deisenhofen, FRG), aufgegeben. Nach Spaltung des Substrats durch den Tracer entsteht das gelbe p-Nitrophenol. Aus der Extinktion bei der Wellenlänge 405 nm (BIO-RAD Microplate Reader Model 550; BIO-RAD Laboratories GmbH, München, FRG) und der mittels linearer Regression für jede Mikrotiterplatte erstellten Kalibrierungsgeraden wurde der (+)-ABA-Gehalt der Proben ermittelt.

Pflanzliche Gewebe wurden gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gut zermörsert, mit 80% Methanol (v/v) überschichtet und mindestens 24 Stunden bei -25°C extrahiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4000 U min⁻¹ wurde der Überstand abgenommen und der Rückstand nochmals mit mindestens 1 ml 80% Methanol (v/v) gewaschen. Die vereinigten methanolischen Fraktionen wurden über C₁₈-Kartuschen (SEP-PAK C₁₈-Cartridges; Millipore Corp., Milford, USA), die mit 80% Methanol vorgewaschen wurden, gegeben und mit 70% Methanol eluiert. Die methanolische Phase wurde anschließend eingeeengt, der Rückstand in 1ml Aqua demin. resuspendiert, mit 1N HCl auf pH 2 bis 3 eingestellt und dreimal gegen jeweils 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Fraktion wurde im Vakuum

50 mM Tris-HCl, pH 7.8) aufgenommen. Eine Reinigung der Xylemsaftproben war nicht erforderlich. Anschließend wurde nach geeigneter Verdünnung mit Tris-Puffer mittels ELISA der (+)-ABA-Gehalt bestimmt.

2.3.4.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung der [¹⁴C]ABA-Metabolite wurde die Methode der Dünnschichtchromatographie (DC) angewendet. Die DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F₂₄₅; Merck, Darmstadt, FRG) wurden vor dem Auftragen der in Ethylacetat gelösten Proben mit einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure (98:2, v/v) vorgewaschen. Jedes Chromatogramm wurde dreimal in einem Gemisch aus Toluol, Ethylacetat und Eisessig (50:30:4; v/v) sukzessive bis 12.5 cm, 14 cm und 15.5 cm oberhalb der Startlinie entwickelt und getrocknet. Die aufgetrennten Banden wurden entsprechend ihrer Migrationsstrecke identifiziert (Daeter 1994).

2.3.4.3 Messung der Radioaktivität

Radioaktive Proben wurden in Scintillationsgefäße gegeben und mit 4 bzw. 8 ml Scintillationscocktail (Emulsifier Safe; Packard Instr. Comp., Downers Grove, IL, USA) versetzt. Gewebeproben wurden vorher in Scintillationsgefäßen mit 400 µl 80 %igem Methanol extrahiert, wässrige Proben wurden bei 60°C eingetrocknet und in 800 µl Aqua demin. aufgenommen. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach Zugabe des Cocktails mit einem β-Scintillationszähler (Liquid Scintillation Counter; Kontron Instr., München, FRG).

Radioaktiv markierte Metabolite der ABA wurden nach Auftrennung auf Dünnschichtchromatographie-Platten mit einem RITA-3200-Analyser (**R**apid-**I**ntelligent-**R**adio-**T**LC-**A**nalysier; Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, FRG) quantifiziert.

2.4 ABA Metabolisierung

Zur Analyse der ABA-Metabolisierung und der Wirkung von Tetcyclacis (Tet) auf den ABA-Abbau in Wurzeln von *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L. wurde die Hälfte von zehn beziehungsweise neun Tage alten Keimlingen für 24 Stunden in

kultiviert. Tet ist ein Norbornan-Diacetinderivat [5 - (4 - Chlorophenyl) - 3, 4, 5, 9, 10 - Pentaazatetracyclo - 5, 4, 1, O^{2,6}, O^{8,11}- Dodecan-3,9-dien], das den oxidativen Abbau von ABA verhindert (Rademacher et al. 1987; Grossmann 1990). Am Versuchstag wurden die intakten Wurzeln für zwei Stunden in Nährlösung mit 100 nM ABA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Wurzeln gewaschen, abgetrocknet und das Frischgewicht bestimmt. Die Gewebe wurden in Stickstoff schockgefroren, gemörsert und anschließend in 2 ml 80% (v/v) Methanol bei -20 °C extrahiert. Die Extrakte wurden (wie in 2.3.4.1 beschrieben) gereinigt und nach dem Einengen im Vakuum bis zur Trockne in 200 µl Ethylacetat resuspendiert. Die radioaktiv markierten ABA-Metabolite wurden mittels Dünnschichtchromatographie (2.3.4.3) aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert. Um die Radioaktivität der einzelnen Banden mit der Gesamtradioaktivität im Ausgangsextrakt korrelieren zu können, wurden der wässrigen Phase vor und nach dem Ausschütteln mit Ethylacetat Aliquots entnommen und im β -Scintillationszähler gemessen.

2.5 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten verschiedener Substanzen zwischen Oktanol und einer wässrigen Phase

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten (K_r) einer gelösten Substanz zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase erfolgte nach Gimmler et al. (1981). Die zu untersuchende, radioaktiv markierte Substanz wurde in einem Reagenzglas mit gleichen Teilen Oktanol und wässrigem Medium vermischt (Vortex Genie; Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz, 2 min, 25 °C). Als wässriges Medium wurde Aqua demin. verwendet, in dem mittels 20 mM Mes/NaOH die pH-Werte 5.5, 6.0, 6.5, mittels 20 mM Hepes/NaOH die pH-Werte 7.0, 7.5 und 8.0 und mittels 20 mM Taps/NaOH der pH-Wert 8.5 eingestellt wurden. Verwendete radioaktive Substanzen waren [¹⁴C]ABA (spezifische Aktivität: 833 MBq mmol⁻¹; Amersham Buchler, Braunschweig, FRG), ³H-ABA (spezifische Aktivität: 2 TBq mmol⁻¹; Amersham Buchler, Braunschweig, FRG), α -D-[U¹⁴C]-Methylglucopyranose (spezifische Aktivität: 10.8 GBq mmol⁻¹; Amersham Buchler, Buckinghamshire, UK) und [U¹⁴C]-Sorbit (spezifische Aktivität: 1.85 MBq mmol⁻¹; Amersham Buchler, Braunschweig, FRG). Nachdem sich die Phasen restlos getrennt hatten, wurden aus beiden Phasen

jeweilige Konzentration der Substanz in den Phasen geschlossen ($[S]_{\text{Oktanol}}$ beziehungsweise $[S]_{\text{Medium}}$). Der Verteilungskoeffizient K_r errechnete sich aus $\frac{[S]_{\text{Oktanol}}}{[S]_{\text{Medium}}}$. Ionisationsgrade von ABA wurden dabei nicht berücksichtigt.

2.6 Apparaturen zur Messung von Wasser- und Stoffflüssen

2.6.1 Theorie

Essenziell für das Pflanzenwachstum ist eine Versorgung mit Wasser und Nährstoffen. Dabei finden Flüsse dieser Substanzen durch Zellmembranen, Organe und schließlich durch ganze Gewebe statt. Angetrieben werden diese Flüsse durch Druck- und Konzentrationsgradienten sowie durch aktive Prozesse. Teilchen- und Wasserflüsse finden hierbei nicht unabhängig voneinander, sondern gekoppelt statt. Der Wasserfluss kann Teilchen mit seinem „Solvent-drag“ mitreißen und umgekehrt.

2.6.1.1 Die praktischen Gleichungen

Nach Henzler 1996 bestehen die messbaren Größen zur Beschreibung von Flüssen durch eine Pflanzenwurzel aus den hydrostatischen Druckdifferenzen $P = P^i - P^o$ und der osmotischen Druckdifferenz $\Delta\pi_s = RT \cdot \Delta c_s = RT \cdot (c_1^s - c_0^s)$ zwischen den Kompartimenten „i“ and „o“ (z.B. Xylem und Außenmedium oder Cytosol und Apoplast). Hier bedeuten R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und c_s die Konzentration des Stoffes „s“. Abgeleitet aus der Thermodynamik für irreversible Prozesse ergeben sich folgende Flussgleichungen (Steudle und Tyerman 1983; Steudle 1993):

$$J_{Vr} = -\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \underbrace{L_p \cdot P}_{\text{hydraulischer}} - \underbrace{L_p \cdot \sigma_s \cdot RT \cdot (c_1^s - c_0^s)}_{\text{osmotischer Fluss}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$J_s = -\frac{1}{A} \frac{dn_s}{dt} = \underbrace{P_s \cdot (c_1^s - c_0^s)}_{\text{Diffusionsfluss}} + \underbrace{(1 - \sigma_s) \cdot \bar{c}_s \cdot J_V}_{\text{solvent-drag}} + \underbrace{J_s^*}_{\text{aktive Komponente}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Bedeutung der Parameter:

J_{Vr} [$m^3 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]	: radialer Volumenfluss \cong Wasserfluss
J_S [$mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]	: Teilchenfluss
A [m^2]	: Oberfläche des Kompartiments
V [m^3]	: Volumen des Kompartiments
n_s [mol]	: Stoffmenge des gelösten Stoffes „s“
L_p [$m \cdot s^{-1} \cdot MPa^{-1}$]	: hydraulische Leitfähigkeit der Barriere
P_s [$m \cdot s^{-1}$]	: Permeabilitätskoeffizient der Barriere für „s“
σ_s [1]	: Reflexionskoeffizient der Barriere für „s“
P [MPa]	: hydrostatische Druckdifferenz
$c_{i,o}^S$ [$mol \cdot m^{-3}$]:	: Konzentration des Stoffes „s“ im inneren „i oder X“ (=Xylem) bzw. äußeren „o“ (=Medium) Kompartiment
\bar{c}_s [$mol \cdot m^{-3}$]	: Konzentration des Stoffes „s“ in der Barriere $\cong ((c_i^S + c_o^S)/2)$
R [$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$]	: allgemeine Gaskonstante (= 8.318)
T [K]	: absolute Temperatur

Die Gl. (1) beschreibt den Volumenfluss über eine Barriere, der im wesentlichen gleich dem Wasserfluss ist; gelöste Stoffe liegen in nur geringer Konzentration vor. Flüsse aus den Kompartimenten heraus werden konventionsgemäß positiv gerechnet. Der erste Term verknüpft den Wasser- bzw. Volumenfluss mit seiner konjugierten Kraft, dem Druck P (hydraulischer Fluss). Der zweite Term koppelt den Volumenfluss mit dem Konzentrationsgradienten (osmotischer Fluss), der die konjugierte Kraft für den Teilchenfluss darstellt. Gl. (2) gibt den Teilchenfluss an, der sich aus drei Beiträgen zusammensetzt. Der erste Term auf der rechten Seite stellt den Diffusionsfluss dar. Der zweite beschreibt die Kopplung zwischen Volumen- und Teilchenfluss. Er wird auch „solvent drag“ genannt, da Teilchen mit dem Wasser „mitgezogen“ werden.

Ein weiterer Beitrag zum Teilchenfluss kann von einem aktiven Transport der Teilchen „s“ herrühren. Dieser Transport wird durch spezifische Carrier in der Membran angetrieben oder zumindest erleichtert. Stoffe können sich so gegen einen Gradienten auf einer Seite der Barriere anreichern. Aktive Prozesse spielen vor allem für Nährstoffe eine Rolle, für die die Membran praktisch impermeabel ist.

Die drei unabhängigen Parameter, die den passiven Transport von Wasser und

Permeabilitätskoeffizient (P_s) und der sogenannte Reflexionskoeffizient (σ_s). Sie sind Eigenschaften des betrachteten Systems, bestehend aus Wasser, gelösten Stoffen und Membranen. Die hydraulische Leitfähigkeit charakterisiert die Geschwindigkeit des Wasserflusses und ist auf die Oberfläche und treibende Kraft normiert. Der Wert von P_s gibt an, wie schnell die Teilchen des Stoffes „s“ durch die Barriere diffundieren und ist ebenfalls auf die Oberfläche normiert.

Der Reflexionskoeffizient ist der Kreuzkoeffizient, der die beiden Flüsse miteinander koppelt und ihre Interaktion („Reibung“) in der Barriere beschreibt (Kedem und Katchalsky, 1961). Man bezeichnet ihn auch als Maß für die passive Selektivität der Barriere für Wasser gegenüber dem gelösten Stoff. Es lassen sich mehrere Fälle unterscheiden:

- Der maximale Wert von σ_s ist eins ($\sigma_s = 1$). Dies wird bei einer ideal semipermeablen Barriere erreicht, d.h. nur Wasser kann die Membran passieren ($P_s = 0$). Dies trifft vor allem für große, geladene und hydrophile Moleküle wie die meisten Salze und Zucker zu. Es bedeutet, dass im stationären osmotischen Gleichgewicht, wenn kein Volumenfluss stattfindet ($J_v = 0$), der Turgor im Zellinneren gleich der osmotischen Druckdifferenz der nicht permeierenden Stoffe ist: $P = \Delta\pi_{imp}$ (Gl. (1)).
- Für Stoffe mit endlicher Permeabilität ($P_s > 0$) ist der Reflexionskoeffizient kleiner als eins ($0 < \sigma_s < 1$). Die Membran ist weniger selektiv. Die Kraft auf das Wasser ist bei gleicher Konzentrationsdifferenz kleiner als für nicht permeierende Stoffe. In Gegenwart einer permeierenden Substanz muss das van`t Hoffsche Gesetz erweitert werden: $P = \sigma_s \Delta\pi_s$. Allerdings darf σ_s nicht mit der Permeabilität des Stoffes verwechselt werden.
- Nimmt σ_s den Wert null an, ist die Membran überhaupt nicht mehr selektiv. Eine Konzentrationsdifferenz bewirkt keinen osmotischen Volumenfluss mehr.

2.6.1.2 Zusammengesetzte Barrieren

Die vorher ausgeführte theoretische Herleitung für L_p , P_s und σ_s gilt

homogen, sondern aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt, die zudem noch unterschiedliche Transport- und Barriereigenschaften besitzen. Bei solchen Systemen setzen sich die drei Transportkoeffizienten der gesamten Barriere aus den Transportkoeffizienten der einzelnen Bereiche zusammen. Die Theorie, die das Transportverhalten solcher zusammengesetzter, paralleler Barrieren beschreibt, wurde von Kedem und Katchalsky (1963a, b) entwickelt. Nach deren Ableitungen setzt sich die hydraulische Leitfähigkeit additiv aus den Leitfähigkeiten der einzelnen Bereiche zusammen, gewichtet durch den jeweiligen Flächenanteil (γ).

$$L_p = \gamma^a \cdot L_p^a + \gamma^b \cdot L_p^b + \dots \quad (\text{Gleichung 3})$$

Der Reflexionskoeffizient ist ebenfalls ein Mittel aus den Einzelwerten, jedoch gewichtet durch die hydraulische Leitfähigkeit des jeweiligen Bereiches.

$$\sigma_s = \frac{\gamma^a \cdot L_p^a}{L_p} \cdot \sigma_s^a + \frac{\gamma^b \cdot L_p^b}{L_p} \cdot \sigma_s^b \quad (\text{Gleichung 4})$$

Der Gesamtpermeabilitätskoeffizient ergibt sich ebenfalls aus der Summe der einzelnen Permeabilitätskoeffizienten, gewichtet durch die Flächenanteile des jeweiligen Bereiches. Es ergibt sich ein Zusatzterm, der vom „solvent-drag“, d.h. von der Flusskopplung, herrührt.

Insgesamt ändern die Flussgleichungen (1) und (2) bei der Beschreibung zusammengesetzter Barrieren nicht ihre Form. Die Transportparameter erhalten jedoch eine andere Bedeutung, die die Eigenschaften der einzelnen Teilbereiche widerspiegeln (siehe Gl. (3) und Gl. (4)).

2.6.1.3 Zusammengesetzte Barrieren in biologischen Systemen

Wasser und Nährstoffe müssen auf ihrem Weg durch die Pflanze komplexe Gewebestrukturen wie Wurzelcortex und –stele passieren. Eine Vorstellung und auch die mathematisch-physikalische Beschreibung des Transports durch zusammengesetzte Barrieren wird in der Literatur als „composite-transport-model“ bezeichnet. Zuerst wurde ein solches Modell für den Wasser- und Stofftransport in

Peterson 1998). Bei Stoffen, für die die Zellmembranen ideal semipermeabel sind, gilt: $\sigma_s \approx 1$ und $P_s \approx 0$. An komplexeren Systemen wie Wurzeln wurden für diese Stoffe jedoch Reflexionskoeffizienten kleiner 1 gemessen, d.h. $\sigma_s < 1$ (z.B. Steudle et al. 1993, Steudle und Frensch 1996). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Barriere beim Transport durch ein ganzes Wurzelgewebe nicht nur aus einer Membran besteht.

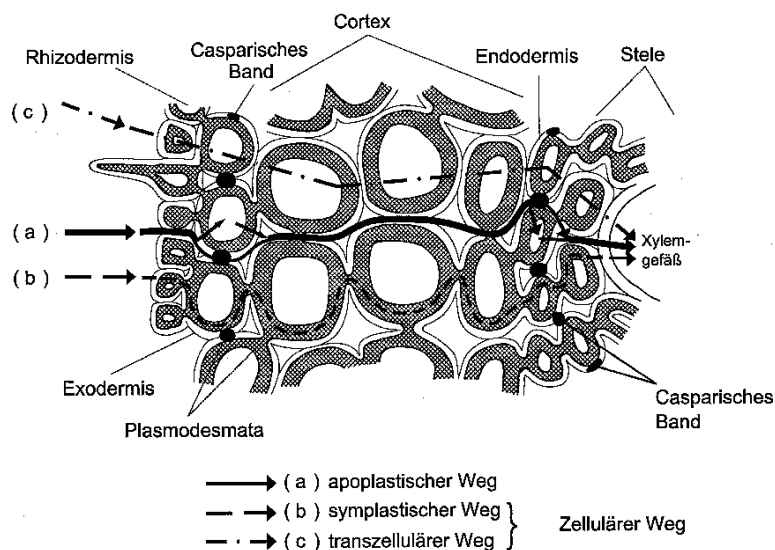


Abb. 2-2 Schematische Darstellung eines Wurzelquerschnitts von *Zea mays* L.. Wasser und darin gelöste Teilchen können auf drei verschiedenen Wegen durch das Wurzelgewebe in das Xylem transportiert werden: (a) apoplastisch, (b) symplastisch und (c) transzellulär. Suberineinlagerungen im Apoplasten (Caspary'sche Bänder) erhöhen dessen Barrierestärke.

Neben dem Weg von Zelle zu Zelle (zellulärer Weg) existiert zusätzlich ein paralleler Weg an den Zellen vorbei, durch den Zellwandraum (=Apoplast). Der zelluläre Weg besitzt wegen der zu passierenden Membranen eine hohe Selektivität, d.h. einen hohen Reflexionskoeffizienten σ_s^{cell} . Der Apoplast bietet hingegen kaum einen Widerstand für Wasser und darin gelöste Teilchen ($L_p^{apo} \gg L_p^{cell}$), da er aus einem porösen Material von Cellulose, Hemicellulose und Proteinen besteht (Zeier und Schreiber 1998a und 1998b; Schreiber et al. 1999). Folglich ist auch seine Selektivität für Wasser und Teilchen sehr gering. Der Reflexionskoeffizient liegt hier wohl nahe bei Null ($\sigma_s^{apo} \approx 0$).

Wendet man Gl. (4) für den Reflexionskoeffizienten einer zusammengesetzten Barriere auf ein Wurzelgewebe an, wird ersichtlich, dass σ_s deutlich kleiner als σ_s^{cell} sein muss und sich mehr dem entsprechenden Wert des Apoplasten nähert. Der

jedoch sehr gering ($\gamma^{apo} \approx 5\%$, Peterson 1987, Henzler 1996), so dass der Reflexionskoeffizient des zellulären Weges wieder mehr Gewicht erhält.

Auch einzelne Zellmembranen sind keine homogenen Barrieren. Integrale Membranproteine beladen als aktive Pumpen unter ATP-Verbrauch das Zellinnere gegen einen Konzentrationsgradienten (aktiver Transport). Es gibt aber auch integrale Kanalproteine, die selektiv bestimmten Stoffen den passiven Transport über Membranen erleichtern. Für Wasser sind dies die Aquaporine, lokalisiert in der Plasmamembran (Kammerloher et al. 1994, Kaldenhoff et al. 1995) und im Tonoplasten (Maurel 1997).

2.6.2 Erzeugung von Wasserflüssen mittels Unterdruck

Um Wasserflüsse durch Wurzeln zu erzeugen, wurde ein Versuchsaufbau (Abb. 2-3) entwickelt, der es ermöglichte, an dekapitierte Wurzeln einen variierbaren Unterdruck anzulegen.

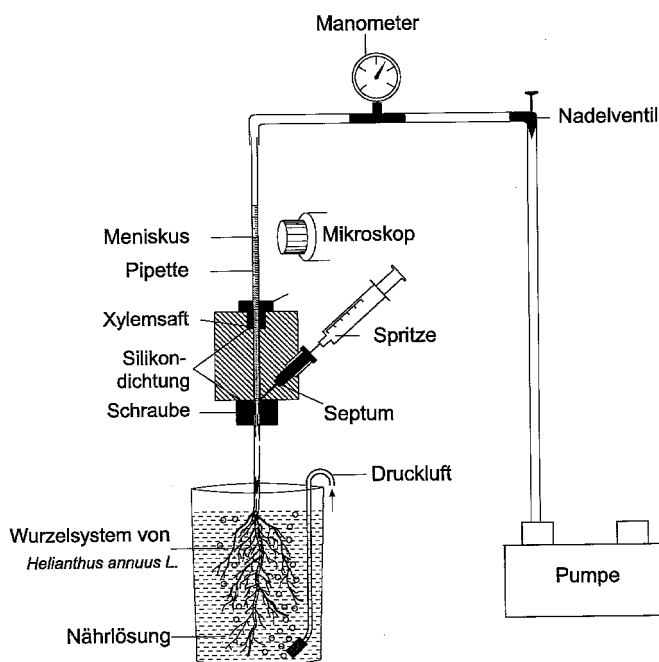


Abb. 2-3 Schematische Darstellung der experimentellen Apparatur zur Xylemsaftgewinnung aus Wurzelsystemen dekapitierter Pflanzen. Mittels einer Membranpumpe konnten Unterdrücke von bis zu -0.1 MPa unter Atmosphärendruck erzeugt werden. Der auf die Wurzel angelegte subatmosphärische Druck war durch ein Nadelventil exakt regelbar. Vergleichbar dem Transpirationssog unter natürlichen Bedingungen erzeugte dieses „Vakuum“ einen Xylemsaftfluss in einen künstlichen „Spross“ (Pipette). Dieser Xylemsaft konnte mittels einer Spritze entnommen und analysiert werden.

Keimlinge wurden am Mesokotyl bzw. Hypokotyl 30 mm oberhalb der Wurzelbasis dekapitiert. An diesem Sprossabschnitt konnten sie mittels einer Silikon-dichtung (Blend-a-scon; Blend-a-med Forschung, Schwalbach, FRG) und Schraube druckdicht an eine Kapillare fixiert werden. Um während des Versuchs Anaerobiose

vorsichtig durchlüftet. In der Kapillare konnten mittels einer Membranpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, FRG) subatmosphärische Drücke von bis zu -0.1 MPa erzeugt werden. Dieser Unterdruck konnte mit Hilfe eines Nadelventils genau eingestellt und an einem Manometer abgelesen werden. Der Sog bewirkte, vergleichbar dem Transpirationssog unter natürlichen Bedingungen, einen Wasserfluss durch die Wurzel in die Kapillare. So gewonnener Xylemsaft konnte mit einer $100 \mu\text{l}$ Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) nach definierten Zeitintervallen entnommen und auf seinen Abscisinsäuregehalt hin (s. 2.3.4.1) untersucht werden. Xylemsaftproben wurden erst dann verwendet, wenn sich der Wasserfluss durch das Wurzelsystem im steady-state befand. Dies war nach 20 bis 30 min erreicht. Zuvor entnommene Proben wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Der Wasserfluss wurde aus dem Gewicht der Xylemsaftfraktionen pro Zeiteinheit (s) und Wurzeloberfläche (m^2) oder aus der Flussgeschwindigkeit durch die kalibrierte Kapillare bezogen auf die Wurzeloberfläche (m^2) berechnet. ABA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Der Abscisinsäurefluss ergab sich aus der transportierten ABA-Menge pro Zeiteinheit (s) und Wurzeloberfläche (m^2). Der Gesamt ABA-Fluss lautet nach Gl. (2):

$$J_{ABA} = P_S^{ABA} \cdot (c_x^{ABA} - c_0^{ABA}) + (1 - \sigma_{ABA}) \cdot \overline{c_{ABA}} \cdot J_V + J_{ABA}^* \quad (\text{Gleichung 5})$$

1
2
3

Der Gesamtfluss J_{ABA} setzt sich aus drei Komponenten zusammen:

- 1: passive Diffusion von ABA durch die Wurzel in das Xylem, den Fickschen Diffusionsgesetzen folgend
- 2: solvent-drag Komponente des ABA Flusses mit dem Wasserfluss
- 3: aktive Aufnahmekomponente für ABA und endogene Produktion

Nach Bestimmung des Abscisinsäureflusses J_{ABA} konnte der apparente Reflexionskoeffizient σ_{ABA} aus der solvent-drag-Komponente (Gl. 5.2) berechnet werden. σ_{ABA} ist apparent, da die tatsächliche ABA Konzentration ($\overline{c_{ABA}}$) innerhalb der Wurzel wegen ungerührter Schichten innerhalb so komplexer Barrieren (siehe Diskussion) nur abgeschätzt werden konnte. Der Abscisinsäurefluss wurde

berechnet aus $J_{ABA} = c_X^{ABA} \cdot J_V$. Somit ergab sich für den apparenten Reflexionskoeffizienten σ_{ABA} :

$$\sigma_{ABA} = 1 - \frac{2c_X^{ABA}}{c_X^{ABA} + c_O^{ABA}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

2.6.3 Lösungen der Flussgleichungen

Die Flussgleichungen (1) und (2) können zur Interpretation von Messkurven verwendet werden. Es ist experimentell möglich, den zeitlichen Verlauf des Zellinnendruckes bzw. des Xylemdruckes von Wurzeln zu messen. Sinnvoll ist es dabei, in Gl. (1) den Ausdruck für die Volumenänderungen pro Zeit in eine Druckänderung pro Zeit umzuformulieren. Die folgenden Überlegungen beziehen sich auf einzelne Pflanzenzellen als inneres Kompartiment. Die Unterschiede zu einem gesamten Wurzelsystem werden später aufgezeigt (s. Kap. 2.6.4.2).

Auf Grund ihrer relativ starren Wand dehnt sich eine Zelle bei Wasserzunahme nicht immer weiter aus, bis sie schließlich platzen würde, sondern setzt mit ihrer Wand der Volumenzunahme eine Kraft entgegen, die sich in ihrem Innendruck äußert. Analog zum Hookschen Gesetz kann man für eine Zelle eine Volumenelastizität ε definieren, wobei eine Volumenänderung ΔV mit einer Druckänderung ΔP korreliert. Diese ist für kleine Änderungen unabhängig vom Druck. Direkt experimentell zugänglich ist β , die Volumenelastizität bezogen auf $1 \mu\text{l}$ Zellvolumen:

$$\varepsilon = \frac{\beta}{V} \equiv V \cdot \frac{dP}{dV} \approx V \cdot \frac{\Delta P}{\Delta V}, \quad (\text{Gleichung 7})$$

wobei

ε [MPa]	:	Elastizitätsmodul der Zelle	
β [MPa μl^{-1}]	:	Elastizitätsmodul der Zelle pro μl Zellvolumen	
V [m^3]	:	Zellvolumen bei stationärem Druck	
$dP \approx \Delta P$ [MPa]	:	Druckänderung	
$dV \approx \Delta V \ll V$ [m^3]	:	Änderung des Volumens	bedeuten.

Zusätzlich zu Gl. (1) muss noch berücksichtigt werden, dass auch nicht permeierende Substanzen vorhanden sind, deren osmotische Druckdifferenz gleich dem stationären Zellturgor ist, d.h. $\Delta\pi_{o,imp} = \pi_{imp}^i - \pi_{imp}^o = P_0$. Allerdings bleibt durch Änderung des Volumens nicht der osmotische Innendruck konstant, sondern nur der Faktor $\pi_{imp}^i(t) \cdot V(t) = \pi_{imp}^i(t=0) \cdot V(t=0) = \pi_{o,imp} \cdot V_0$, wobei gilt: $V \approx V_0$. Dies führt zu einem zusätzlichen Faktor $\frac{\varepsilon + \pi_{o,imp}}{\varepsilon}$ (Rüdinger et al. 1992). Damit erhält man für die

Gln. (1) und (2) folgendes gekoppeltes Differentialgleichungssystem:

$$- \frac{dP}{dt} = \frac{A}{V} \cdot \varepsilon \cdot L_p \cdot [(P - \Delta\pi_{o,imp}) \cdot \frac{\varepsilon + \pi_{o,imp}}{\varepsilon} - \sigma_s \cdot RT \cdot \Delta c_s] \quad (\text{Gleichung 8})$$

$$- \frac{d\Delta c_s}{dt} = \frac{A}{V} \cdot P_s \cdot \Delta c_s - \underbrace{(1 - \sigma_s) \cdot \bar{c}_s \cdot \frac{1}{\varepsilon} \cdot \frac{dP}{dt}}_{\text{solvent-drag-Term}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Hier wurde $dn_s \approx V \cdot d\Delta c_s$ gesetzt, d.h. der Fluss der Stoffmenge über die Membran ist proportional zu der Konzentrationsänderung im Inneren, wobei die Volumenänderung unberücksichtigt bleibt.

Aus den Gln. (8) und (9) ergeben sich die unterschiedlichen Experimenttypen für Relaxationen des Druckes, je nachdem welche der drei Druckgrößen man ändert, um eine Auslenkung aus dem Gleichgewicht zu erreichen:

Osmotische Relaxationen erhält man durch Veränderungen des osmotischen Druckgradienten $\Delta\pi_{o,imp}$ oder der Veränderung der Konzentrationsdifferenz Δc_s eines permeierenden Stoffes. Diese Wasserflüsse wurden in vorliegender Arbeit nicht berücksichtigt.

Hydrostatische Relaxationen oder einen hydrostatischen Wasserfluss erhält man durch eine Änderung des Innendruckes P. Dieser Experimenttyp wird im folgenden beschrieben.

2.6.3.1 Hydrostatische Relaxation

Betrachtet man die Auslenkung ΔP des Druckes aus seinem Ausgangswert P_0 , so erhält man aus Gl. (8):

$$-\frac{dP}{dt} = \frac{A}{V} \cdot (\varepsilon + \Delta\pi_{o,imp}) \cdot Lp \cdot (P - P_{min}) \equiv k_W \cdot (P - P_{min}) \quad (\text{Gleichung 10})$$

Eine Relaxation hin zum Gleichgewicht $P = P_{min} = \Delta\pi_{o,imp}$ wird beschrieben, wobei die Änderung des Druckes proportional zur Auslenkung aus dem Gleichgewicht ist. Die Lösung dieser Gleichung lautet mit den Randbedingungen $P_{(t=0)} = P_{max}$ und $P_{(t \rightarrow \infty)} = P_{min}$:

$$P - P_{min} = (P_{max} - P_{min}) e^{-k_W \cdot t} \quad (\text{Gleichung 11})$$

Die Halbwertszeit der Relaxation ($T_{1/2}^W$) lässt sich aus der Geschwindigkeitskonstanten k_W errechnen. Aus diesem Wert kann mit Hilfe der Zellgröße die hydraulische Leitfähigkeit Lp bestimmt werden (Steudle 1993):

$$k_W = \frac{\ln 2}{T_{1/2}^W} = \frac{A \cdot (\varepsilon + \pi_{o,imp})}{V} \cdot Lp \quad (\text{Gleichung 12})$$

2.6.4 Die Druckmesssonden

Wie im Theorieteil dargelegt, müssen zur Bestimmung der Transportparameter Volumenflüsse gemessen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, den zeitlichen Verlauf, der dem Nettovolumenfluss proportional ist, in dem entsprechenden Kompartiment zu bestimmen. Um dies experimentell zu ermöglichen, wurde die Drucksondentechnik entwickelt (Steudle und Zimmermann 1974; Steudle 1993). Mit der Zelldruckmesssonde ist es möglich, Drücke in den einzelnen Gewebezellen bis zu einer Größe von 10 μm Durchmesser zu bestimmen. Die Wurzeldruckmesssonde erlaubt es, von einem kompletten Wurzelsystem den osmotischen Druck (Wurzeldruck) aller wasserleitenden Xylemgefäße zu messen (Steudle und Jeschke 1983).

2.6.4.1 Die Zelldruckmesssonde

Die Zelldruckmesssonde (ZDS) wurde in dieser Arbeit verwendet, um Druckverläufe in Rindenzellen der beiden äußeren, der Rhizodermis folgenden Zellschichten zu beschreiben. Das Zellvolumen lag hier in einem Bereich von im Mittel 183 bis 188 pl ($1 \text{ pl} = 10^{-15} \text{ m}^3$) (3.1.2.2.1).

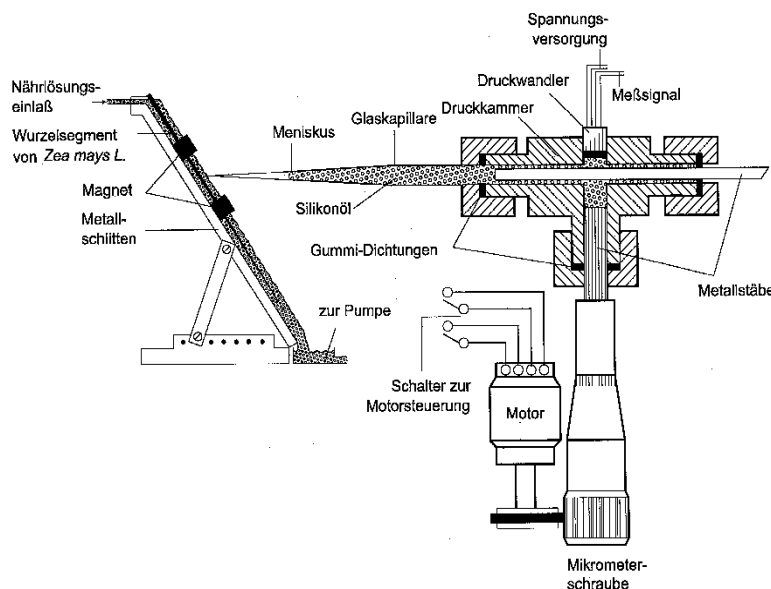


Abb. 2-4 Schematische Darstellung einer Wurzeldrucksonde zur Bestimmung der Zelleitfähigkeit. Eine mit Silikonöl gefüllte Mikrokapillare wird in einer Wurzelcortexzelle platziert. Der Zelldruck wird mittels Druckwandler als Spannungssignal detektiert und aufgezeichnet. Mittels Mikromanipulator kann das Sondenvolumen minimal vergrößert oder verkleinert werden, so dass die punktierte Wurzelzelle Wasser aufnimmt oder abgibt.

Das Kernstück der ZDS besteht aus einem Plexiglasblock, der mit vier Bohrungen versehen ist (Abb. 2-4). In eine Bohrung ist ein Druckwandler (Typ XDM 190M 7 BAR VG; Kulite Semiconductors, Leonia, New Jersey, USA) eingeschraubt und mit Silikonmaterial (Xantopren; Bayer, Leverkusen, FRG) abgedichtet. Der Druckwandler besteht aus einem Halbleiterschaltkreis, der nach dem Prinzip einer Wheatstoneschen Brücke eine Spannung misst, die im Messbereich von 0 bis 1.5 MPa in guter Näherung linear vom Druck auf die Halbleiteroberfläche abhängt. Referenzdruck ist der Atmosphärendruck, der durch ein Röhrchen auf der anderen Seite des Schaltkreises einwirkt. Der Druckwandler ist an einen Speise- und Verstärkerbaustein (Typ 9824; Burster Präzisionstechnik, Gernsbach, FRG) angeschlossen, der zudem die verstärkte Messspannung an einen Kompensationsschreiber (verwendete Typen DHL 252 N, Laumann, Selb, FRG und X-T; Siemens, München, FRG) weiterleitet. An einer weiteren Bohrung kann mit einer Überwurfmutter und Gummidichtung eine Glaskapillare druckdicht mit dem Sondeninnenraum verbunden werden. Diese Kapillare wurde mit Hilfe eines Kapillarziehgerätes (L/M-3P-A; List-Medical, Berlin, FRG) ausgezogen und mit einem

eine Öffnung von 7 bis 10 µm Durchmesser entstand. Über die dritte Bohrung ist ein Metallstab, der mit einer Mikrometerschraube verbunden ist, in den Innenraum eingeführt. Mittels eines Miniaturelektromotors (Gleichstrommotor C-120.00; PI GmbH, Waldbronn, FRG) mit sehr feiner Übersetzung (485:1) kann der Stab im Innenraum bewegt werden. Auf diese Weise lässt sich Sondenvolumen präzise regulieren. Die letzte Bohrung dient zur Einführung eines zweiten Metallstabes, der bis an die Kapillare heran- und auch in sie hineingeschoben werden kann. Das Sondenvolumen wird auf diese Weise verringert, damit beim Anstechen einer turgeszenten Zelle nicht zuviel Zellsaft in die Kapillarenspitze gelangt. Der gesamte Sondeninnenraum, einschließlich Kapillare, ist mit einem niedrigviskosen Silikonöl (AS4; Wacker Chemie, Ottobrunn, FRG) luftblasenfrei gefüllt. Durch Luft würde die Kompressibilität der Sonde stark erhöht. Beim Anstechen der Zelle bildet sich zwischen Silikonöl und dem Zellsaft ein Meniskus, der mit einem Stereomikroskop (M8; Wild, Heerbrugg, Schweiz) beobachtet werden kann. Die Position des Meniskus wird mittels Metallstab und Motor geregelt. Künstliche Volumenänderungen in einer Maiswurzelzelle werden induziert, indem der Metallstab mit dem Motor in die Sonde hinein- oder hinausgeschoben wird. Diese Volumenänderung ΔV kann quantifiziert werden, wenn die Meniskusverschiebung auf einer kalibrierten Strichplatte verfolgt wird. Aus dem Verhältnis der auf dem Schreiber aufgezeichneten Druckänderung ΔP zu der berechneten Volumenänderung ΔV kann nach Gl. (7) ϵ , der Elastizitätsmodul, bestimmt werden, wenn das mittlere Zellvolumen V_0 bekannt ist. Diese Volumenänderung ΔV muss hinreichend schnell vorgenommen werden, so dass sich während des Druckanstieges das Volumen der Zelle nicht signifikant ändert. Dies würde zu einer Unterschätzung der Zellelastizität führen (Steudle et al. 1980). Hält man den Meniskus an der neuen Position fest, so fließt Zellsaft aus der Zelle heraus, wobei der Zelldruck bis zum Gleichgewichtsdruck hin exponentiell abnimmt. Es entsteht eine hydrostatische Relaxation.

Unter diesen Versuchsbedingungen konnte gewährleistet werden, dass nur das Zellvolumen relaxierte, nicht das Sondenvolumen. Die untersuchten Wurzeln wurden auf einem fast senkrecht stehenden Metallschlitten mit Magneten befestigt und bis auf den Abschnitt, in dem die Zellen angestochen werden sollten, mit Zellstoff bedeckt. Der Schlitten wurde mit einer Schlauchpumpe (Typ PA-SF; IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen i. Br., FRG) gleichmäßig mit

Nährlösungskreislauf konnten je nach Experiment unterschiedliche pH-Werte und ABA Konzentrationen eingestellt werden. Am unteren Ende des Schlittens wurde die Lösung in einer Petrischale aufgefangen und in das Nährlösungsreservoir zurückgepumpt. Die ZDS war auf einem Mikromanipulator (Leitz-Vertrieb, München, FRG) montiert, der eine präzise Justierung und einen Vorschub der Kapillare im μm Bereich ermöglichte. Um zu verhindern, dass Silikonöl in die Wurzelzelle geriet, wurde vor dem Einstechen mit dem umspülenden Wasser ein erster Meniskus gebildet und dann die Kapillare vorsichtig in das Gewebe eingeführt. Beim Anstechen einer Zelle bauten sich in der Sonde sofort Drücke zwischen 3.5 und 4.5 bar auf. War ein stabiles Druckplateau erreicht, konnte mit den Messungen begonnen werden.

2.6.4.2 Die Wurzeldrucksonde

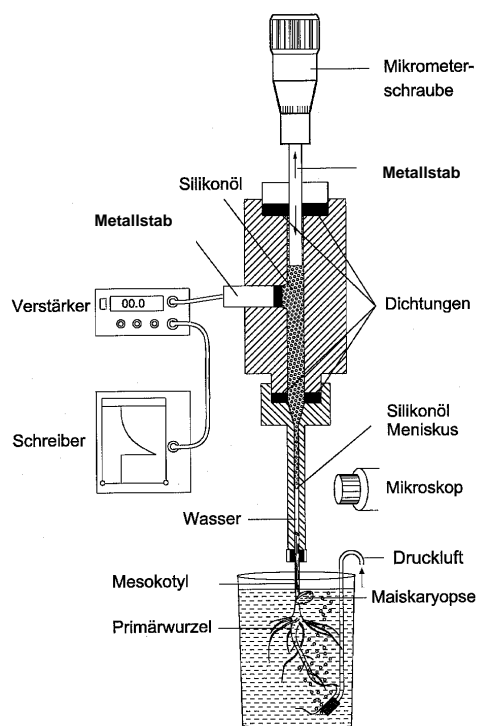


Abb. 2-5 Schematische Darstellung einer Wurzeldrucksonde. Dekapitierte Pflanzen von *Zea mays* L. wurden druckdicht an einer Sonde befestigt. Innerhalb der Sonde konnte sich nun ein Druck aufbauen, der aus der aktiven Anreicherung osmotisch relevanter Teilchen im Xylem entsteht. Dieser Wurzeldruck konnte über einen Verstärker als Spannungssignal aufgezeichnet werden. Mittels Mikrometerschraube kann das Sondenvolumen vergrößert oder verkleinert werden, so dass Wasser durch die Wurzel nachgezogen oder abgegeben wurde. Der zeitliche Verlauf dieser Druckänderungen wurde mittels Kompensationsschreiber aufgezeichnet.

Die Wurzeldrucksonde (WDS; Abb. 2-5) ist im Aufbau der ZDS sehr ähnlich. Es ergeben sich jedoch einige Abweichungen in Theorie und Technik. Zur Messung wurden 11 Tage alte Primärwurzeln von *Zea mays* L. verwendet, die an ihrem Mesokotyl dekapitiert wurden. Diese konnten druckdicht an eine Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von $250 \mu\text{m}$ mittels Silikondichtung fixiert werden. Die Kapillare war mit ihrem anderen Ende ebenfalls druckdicht zum Sondeninnenraum

und erreichte nach zwei bis drei Stunden ein stabiles Plateau bei Drücken von 0.4 bis 2.8 bar. Um zu überprüfen, ob die Xylemgefäße nicht abgeklemmt waren, wurde die Wurzel nach dem Experiment unterhalb des Mesokotyls abgeschnitten. Dabei musste der Druck schnell auf den Wert Null abfallen. Nur wenn seine Halbwertszeit danach um einen Faktor von mindestens zehn kürzer war als bei hydrostatischen Relaxationen, wurden die Ergebnisse verwendet. Da die WDS nicht mehr starr genug war, konnte die Elastizität des Xylems nicht bestimmt werden. Daher wurde hier nur das Verhältnis von ΔP zu ΔV , der Elastizitätsfaktor $\beta = \frac{\Delta P}{\Delta V}$, bestimmt. Im Gegensatz zur ZDS war β eine Geräteeigenschaft und diente nur zur Umrechnung von Druck- in Volumenänderungen. Die Mikrometerschraube wurde hier per Hand bedient. Während der Experimente befand sich die Wurzel in einem abgedunkelten Becherglas von 800 ml, das ständig vorsichtig belüftet wurde. Als Medium wurde die Nährlösung aus Kap. 2.1 verwendet.

2.6.4.3 Auswertung und Berechnung

Die aufgezeichneten Druck-Zeit-Kurven konnten mit Hilfe eines Digitalisiertabletts (Kontron Registriertechnik, Eching, FRG) in einen Computer eingelesen und dort weiter ausgewertet werden. Um die Zeitkonstante des exponentiellen Druckanstiegs oder –abfalls zu bestimmen, wurde die Differenz zum Enddruck P_e halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden ergab sich k_w . Bei den Messungen mit der WDS zeigte sich des Weiteren, dass eine einzelne Exponentialfunktion als Fit zu keinem befriedigendes Ergebnis führte; das Resultat mit zwei Exponentialfunktionen war deutlich besser (Abb. 3-32). Die erste Exponentialfunktion hatte dabei eine Halbwertszeit von weniger als eine s ($T_{1/2}^W A$), die zweite lag im Bereich von 2 bis 19 s ($T_{1/2}^W B$). Um eine optimale Kurvenanpassung an zwei sich überlagernde Exponentialfunktionen zu erhalten, wurden die Zeitkonstanten mit dem Programm fit-eng (Dr. H. Haid, AG Steudle, Universität Bayreuth, FRG) berechnet. Lagen die Halbwertszeiten für den Wassertransport ($T_{1/2}^W$), der Elastizitätsfaktor β und die geometrischen Größen des entsprechenden Kompartiments vor, konnte die hydraulische Leitfähigkeit der Zelle (L_p) und der Wurzel ($L_{p,r}$) berechnet werden.

Damit ergab sich aus Gl. (12) für L_p (ZDS):

$$L_p = \frac{\ln 2 \cdot d_c}{T_{1/2}^w \cdot 4 \cdot (\beta \cdot V + P_0)} \quad (\text{Gleichung 13})$$

Hier stellt d_c den mittleren Durchmesser und V das mittlere Volumen von Zellen der entsprechenden Zellschicht dar. Da es sich bei dem untersuchten Rindengewebe in guter Näherung um zylindrische Zellen handelte, konnte das Volumen-Oberflächenverhältnis durch den Zelldurchmesser ausgedrückt werden, wenn man die Deckelflächen vernachlässigte:

$$\frac{V}{A} = \frac{d_c}{4} \quad .$$

Für den osmotischen Innendruck des Kompartiments ($\pi_{o,imp}$) wurde stets der anfangs gemessene Gleichgewichtsdruck P_0 eingesetzt.

Bei der Berechnung für die gesamte Wurzel konnte man annehmen, dass die Xylemgefäße sehr starr waren und damit der Elastizitätsmodul größer als der osmotische Druck im Xylem war ($\epsilon \gg \pi_{o,imp}$). Nach Gl. (12) folgte für die hydraulische Leitfähigkeit L_{p_r} der Wurzel (WDS) (Frensch und Steudle 1989):

$$L_p = \frac{\ln 2}{T_{1/2}^w \cdot \beta \cdot A_r} \quad (\text{Gleichung 14})$$

Hier stellt A_r die gesamte Wurzeloberfläche, die die leitenden Xylemgefäße umschließt, dar.

2.7 Experimente zum Hormon- und Stofftransport

2.7.1 Aufnahmeexperimente mit radioaktiver ABA und radioaktivem Sorbit

Die Wurzeln von 11 Tage alten Keimlingen, angezogen zur Hälfte in Hydrokultur und zur Hälfte in Luftkultur, wurden 80 bis 110 mm hinter der Wurzelspitze angeschnitten.

angeschnittenen Oberflächen wurden mit Paraffin (Schmelzpunkt: 42°C – 44°C; Merck, Darmstadt, FRG) versiegelt. Die versiegelten Wurzelspitzen wurden 30 min bis zum Beginn der Aufnahmeexperimente in Waschpufferlösung aufbewahrt (10mM MES/NaOH, pH=5.5). Darin enthaltene Nährsalze waren 2 mM CaCl₂, 3 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄. Die Aufnahmeexperimente wurden in einem Versuchsmedium folgender Zusammensetzung durchgeführt: 1 mM Glucose, 2 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 1.5 mM KNO₃, 1 mM MgSO₄, 2 mM K₂HPO₄, 158 U mg⁻¹ Penicillin (Sigma, Deisenhofen, FRG), um Befall mit Keimen zu verhindern, und 10 mM MES/NaOH, pH=5.5. Die Versuchsmedien enthielten entweder 10 µM radioaktive (±) – cis-trans- [¹⁴C]Abscisinsäure (spezifische Aktivität: 833 MBq mmol⁻¹; Amersham Buchler, Braunschweig, FRG) und 10⁻⁵ M Tet, um dem oxidativen Abbau von ABA vorzubeugen (Daeter und Hartung 1990), oder 10 µM radioaktives [U¹⁴C]Sorbit (spezifische Aktivität: 1.85 MBq mmol⁻¹; Amersham Buchler, Braunschweig, FRG). Gewebeproben wurden nach Zeitintervallen von 15, 30, 45, 60 min und 2,3,4,5,6 und 8 Stunden entnommen. Anschließend wurden die Wurzelspitzen zweimal für 10 s in kalter Waschpufferlösung gewaschen, kurz getrocknet und in 1 ml 80% Methanol (v/v) für 24 h extrahiert. Die Radioaktivität wurde in einem β-Scintillationszähler gemessen und auf das Frischgewicht bezogen.

2.7.2 Aufnahme von ABA in Wurzelsysteme intakter Maispflanzen

Die belüftete Nährlösung (2.1) 11 Tage alter Mais-Keimlinge aus Hydro- und Luftkultur wurde mit 500 nM ABA versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 3h. Der Versuch fand im Gewächshaus bei 25°C unter einer Quecksilberdampflampe statt (Lichtmenge: 200 µmol m⁻² s⁻¹). Nach der Inkubationszeit wurden Kontrollen und ABA behandelte Wurzeln in flüssigem Stickstoff zermörsert und anschließend in 80% Methanol (v/v) extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.3.4.1 beschrieben.

2.7.3 Untersuchung von Xylemsäften

Wurzeln von *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L., in Hydrokultur kultiviert, wurden (wie in Kap. 2.6.2 beschrieben) an eine Saugapparatur fixiert. Xylemsaft wurde bei

ABA getauscht. Xylemsaft wurde für weitere 100 min gesammelt und, wie unter 2.3.4.1 beschrieben, auf den ABA Gehalt hin überprüft.

2.7.4 Effluxkompartimentanalysen

2.7.4.1 Efflux radioaktiver Verbindungen

Efflux Experimente wurden mit Wurzelsegmenten von *Zea mays* L., kultiviert in Hydro- und Luftkultur, durchgeführt. Drei verschiedene Segmentlängen wurden verwendet:

- a) Wurzelstücke mit intakter Spitze und einer Länge von 80 bis 110 mm: lange Wurzelspitzen. Die Seitenwurzelzone begann bei den verwendeten Wurzeln nach dieser Strecke von 80 bis 110 mm oberhalb der Wurzelspitze.
- b) Wurzelstücke mit intakter Spitze in einer Länge von 40 bis 50 mm: kurze Wurzelspitzen.
- c) Wurzelsegmente ohne Spitze, die einen Bereich von 40 – 50 mm bis 110 mm oberhalb der Wurzelspitze umfassten.

Die angeschnittenen Enden wurden mit Paraffin (s. 2.7.1) versiegelt. Alle verwendeten Wurzelspitzen oder –segmente wurden in dem unter 2.7.1 beschriebenen Versuchsmedium (pH = 5.5), das [¹⁴C]ABA enthielt, 16 Stunden inkubiert (Gesamt ABA-Konzentration: 10 µM). 10⁻⁵ M Tet im Versuchsmedium verhinderte den oxidativen ABA-Abbau. Nach 16 Stunden, als Gleichgewichtsbedingungen erreicht waren, wurden die Wurzeln fünf Sekunden in kaltem Versuchsmedium gewaschen und dann in 10 ml Effluxmedium überführt und so der Isotopenaustausch gestartet. Das Effluxmedium war identisch mit dem Versuchsmedium, nur [¹⁴C]markierte ABA wurde durch nicht-radioaktive ABA derselben Konzentration ersetzt. Die Effluxmedien wurden nach Intervallen von 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90 min und 2, 3, 4, 5, 6, 7 Stunden ausgetauscht. Anschließend konzentrierte man sie bei 60°C im Trockenschrank. Am Ende der Experimente wurde das Frischgewicht und die in den Geweben verbliebene Radioaktivität bestimmt. In derselben Versuchsanordnung wurde ein Efflux von [U¹⁴C]markiertem Sorbit durchgeführt (Gesamt-Sorbitkonzentration: 10

Die weiteren graphischen und mathematischen Analysen wurden nach Behl und Hartung (1986) durchgeführt. Der Gesamtgehalt an [¹⁴C]ABA und [U¹⁴C]Sorbit in den Maiswurzeln zum Zeitpunkt t ($Q^*_{T(t)}$) wurde durch Addition der Radioaktivität der Eluate zu der verbliebenen Radioaktivität der Wurzeln (nach 7 Stunden) ermittelt. Die Werte wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus der so entstehenden Effluxkurve ließen sich die Phasen des Isotopenaustausches erkennen, die aufgrund ihrer Kinetiken verschiedenen Kompartimenten zugeordnet werden können (Jeschke 1972, Lüttge 1973). Die erste Phase stellt den sehr schnell auswaschbaren Apoplasten dar. Es folgen das Cytosol (Phase zwei) und anschließend die langsam austauschende Vakuole (Phase drei) (vgl. Abb. 3-14). Unter der Voraussetzung, dass Apoplast, Cytosol und Vakuole in Reihe geschaltet sind und die spezifischen Aktivitäten in allen Kompartimenten gleich sind, kann $Q^*_{T(t)}$ folgendermaßen definiert werden:

$$Q^*_{T(t)} = A^*_{(apo, t=0)} \cdot e^{-k_{apo} \cdot t} + A^*_{(cyt, t=0)} \cdot e^{-k_{cyt} \cdot t} + A^*_{(vak, t=0)} \cdot e^{-k_{vak} \cdot t} \quad (\text{Gleichung 15})$$

wobei :

$A^*_{(apo, t=0)}$, $A^*_{(cyt, t=0)}$, $A^*_{(vak, t=0)}$ den Gehalt an Radioaktivität im Apoplasten, Cytosol und der Vakuole zum Zeitpunkt $t = 0$ darstellen.

k_{apo} , k_{cyt} und k_{vak} sind die Geschwindigkeitskonstanten des radioaktiven Flusses zwischen Inkubationsmedium und den Kompartimenten.

Um $A^*_{(vak, t=0)}$ zu ermitteln, wurde für den hinteren linearen Kurvenabschnitt mit der geringsten Steigung eine Gerade berechnet und bis zur Zeit $t = 0$ extrapoliert. Durch Delogarithmieren des Wertes erhielt man den vakuolären Gehalt an Radioaktivität zum Zeitpunkt $t = 0$. Aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden ließ sich die Austauschhalbwertszeit der Vakuole ($T^{\text{vak}}_{1/2}$) berechnen ($k_{vak} = \ln 2 \cdot T^{\text{vak}}_{1/2}^{-1}$). Zur Berechnung von $A^*_{(cyt, t=0)}$ wurden die delogarithmierten Werte der Geraden von $Q^*_{T(t)}$ subtrahiert und die Differenzen erneut halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und $T^{\text{cyt}}_{1/2}$ bestimmt. Zur Berechnung von $A^*_{(apo, t=0)}$ und $T^{\text{apo}}_{1/2}$ wurde ein drittes Mal subtrahiert und logarithmiert.

2.7.4.2 Austrocknungsexperimente

Um den Wasserverlust aus Wurzelsegmenten und kurzen Wurzelstückchen (s. 2.7.4.1) in Abhängigkeit vom Suberingehalt in deren Hypodermis zu bestimmen, wurden 11 Tage alte Maiskeimlinge aus Hydro- und Luftkultur benutzt. Die verwendeten Wurzelstückchen wurden an ihren Schnittflächen mit Paraffin (s. 2.7.4.1) versiegelt. Bis zum Beginn des Experimentes wurden sie in belüfteter Nährlösung (s. 2.1) aufbewahrt (längstens 20 min). Während des Versuchs lagen die Wurzelstücke auf trockenen Glasplatten. Nach der Frischgewichtsbestimmung der vollturgesczten Wurzeln konnte zeitabhängig (s. Abb. 3-44 und 3-45) der Wasserverlust an die umgebende Raumluft mit einer Feinwaage (Chyo IL-180; Chyo Balance Corp., Japan) bestimmt werden. Die relative Luftfeuchte betrug 60%, die Raumtemperatur lag bei 25°C. Nach Versuchsende wurden die Wurzelstücke in einem Trockenschrank bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und deren Trockengewicht bestimmt. Die Gewichtsabnahme während des Versuchs konnte so auf den relativen Wassergehalt (RWG) des Wurzelstückes bezogen werden.

2.7.5 Transportstudien

Um Abscisinsäureflüsse durch Wurzeln von *Zea mays* L. und *Helianthus annuus* L. zu messen, wurde folgender Versuchsablauf verwendet.

Am Vorabend wurden die Pflanzen vom Gewächshaus in das Labor gebracht. Zwei Stunden vor Beginn der Experimente wurden die Versuchspflanzen in belüfteter Nährlösung (2.1) vorinkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sie dekapitiert und (wie in 2.6.2 beschrieben) an der Saugapparatur druckdicht befestigt. Nach Erreichen von steady-state Wasserflüssen wurde Xylemsaft für eine Stunde in Intervallen von 10 min bei einem subatmosphärischen Druck von -0.02 MPa gesammelt. Anschließend wurde der Unterdruck auf -0.06 MPa erhöht und Xylemsaft für eine weitere Stunde gesammelt.

Die Experimente wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Wurzelsysteme von *Helianthus annuus* L. wurden in Hydrokultur angezogen. ABA-Flüsse wurden bestimmt, wobei das externe Nährmedium einen pH-Wert

von 5.5 besaß und ABA Konzentrationen von 5nM, 100 nM und 500 nM enthielt.

- Wurzelsysteme von *Zea mays* L. wurden in Hydro- und Luftkultur angezogen. ABA-Flüsse wurden bestimmt bei einem externen pH-Wert von 5.5 und ABA-Konzentrationen von 0, 5, 10, 20, 50, 100 und 500 nM. Zusätzlich wurden ABA Flüsse bei 100 nM extern applizierter ABA gemessen, wobei der pH-Wert des Mediums variiert wurde. Um einen pH-Wert von 4.8 einzustellen, wurde ein 10 mM Phosphatpuffer verwendet. Mit 10 mM HEPES/KOH wurde ein pH-Wert von 8.0 eingestellt.
- Um den endogenen ABA-Spiegel zu erhöhen, wurde bei in Hydrokultur angezogenen Mais- und Sonnenblumenpflanzen zwei Tage vor Versuchsbeginn Tetracyclin zur Nährlösung appliziert. Die Endkonzentration betrug 10^{-5} M. Dieses Medium wurde einen Tag vor Versuchsbeginn gegen ein Medium ausgetauscht, das 10^{-5} M Tetracyclin und zusätzlich 5 nM ABA enthielt, um natürliche Gegebenheiten der Bodenlösung nachzustellen. (Hartung et al. 1996). Das Nährmedium hatte zu allen Versuchszeitpunkten einen pH-Wert von 5.5.
- Um einen stressbedingten ABA-Anstieg im Wurzelgewebe zu induzieren und zusätzlich Rhizosphäre und Apoplast anzusäuern, wurden Keimlinge von *Zea mays* L. 24 Stunden vor Versuchsbeginn in ein modifiziertes Nährmedium umgesetzt, das als einzige Stickstoffquelle Ammoniumionen enthielt. Diese Nährlösung enthielt 1.5 mM KH_2PO_4 , 1.0 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgSO_4 , 1.0 mM NH_4Cl , 0.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 mM KCl , 18 μM FeNaEDTA , 8.1 μM H_3BO_3 und 1.5 μM MnCl_2 . Der pH-Wert der Nährlösung sank während dieser Zeit von 5.5 auf 3.65 bis 3.97 ab (Marschner 1995).
- Keimlinge von Mais und Sonnenblume, in Hydrokultur angezogen, wurden mit α -D-[^{14}C]-Methylglucopyranose (Spezifische Aktivität: 10.8 mmol^{-1} ; Amersham, Buckinghamshire, UK) zwei Stunden vor Versuchsbeginn in Nährlösung (pH = 5.5; s. 2.1) vorinkubiert.

2.7.6 Wasserleitfähigkeitsmessungen

2.7.6.1 Bestimmung der Wasserleitfähigkeit eines Wurzelsystems (L_p)

Um die hydraulische Leitfähigkeit eines intakten Wurzelsystems von *Zea mays* L. zu bestimmen, wurden Maiskeimlinge aus Hydro- und Luftkultur verwendet. Diese wurden 20 mm oberhalb der Wurzelbasis am Mesokotyl dekapitiert und (wie in Kap. 2.6.2 beschrieben) druckdicht an einer Kapillare befestigt. Um Anaerobiose während des Versuchs zu vermeiden, wurde das Wurzelsystem ständig belüftet. Mit Hilfe einer Membranpumpe konnte nach Erreichen von steady-state Bedingungen bei subatmosphärischen Drücken von -0.02, -0.04, -0.06 und -0.08 MPa der Wasserfluss in $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt werden. Ebenso wurde die rein osmotisch angetriebene Exsudation bei Atmosphärendruck aufgezeichnet. Um die radialen Wasserflüsse (J_{Vr} in $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) zu erhalten, wurden die Wasserflüsse nach Beendigung der Experimente auf die Oberfläche der Maiswurzeln bezogen, die, wie in Kap. 2.1.1 beschrieben, bestimmt wurde. J_{Vr} wurde für jede Wurzel zuerst in Abwesenheit und sofort anschließend in Anwesenheit von 500 nM ABA durchgeführt. Die Pflanzen wurden hierzu 100 min in Nährlösung mit ABA vorinkubiert. Die hydraulische Wasserleitfähigkeit L_p [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$] errechnete sich aus der Steigung von J_{Vr} [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$], aufgetragen gegen den verwendeten Unterdruck [MPa] (s. Abb. 3-31). Der gewonnene Xylemsaft wurde vor jedem Druckanstieg gesammelt und unverdünnt dessen osmotisches Potential (s. Kap. 2.3.2) bestimmt.

2.7.6.2 Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von Maisprimärwurzeln (L_p)

Für die Experimente mit der Wurzeldrucksonde (WDS) wurden ebenfalls Maiskeimlinge verwendet, die sowohl in Hydro- als auch in Luftkultur angezogen wurden. Bestimmung der Wurzeloberflächen erfolgte nach Kap. 2.1.1. Die Wurzeln wurden am Mesokotyl dekapitiert und druckdicht (s. Kap. 2.6.2) an einer Wurzeldrucksonde befestigt. Der Wurzeldruck war nach drei bis vier Stunden stabil. Die Wurzeldrücke betragen bei Hydrokultur 0.4 bis 2.2 MPa und 0.8 bis 2.8 MPa bei Luftkultur. Während des Experiments befanden sich die Wurzeln in abgedunkelten, vorsichtig belüfteten Bechergläsern mit 1 l Nährlösung. Zu Beginn wurden sechs

Kontrollleitfähigkeit (L_p) der jeweiligen Maiswurzel am Beginn des Experiments zu bestimmen. Anschließend erfolgte ABA-Zugabe zum Nährmedium. Die ABA-Konzentration im Nährmedium betrug 100 nM. Abhängig von der ABA-Inkubationszeit wurden nun hydrostatische Wasserflussrelaxationen aufgezeichnet.

2.7.6.3 Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von Maisrindenzellen (L_p)

Für Messungen mit der Zelldrucksonde (ZDS) wurden 11 Tage alte Maiskeimlinge aus Hydrokultur verwendet. Es wurden Cortexzellen aus der ersten und zweiten Zellschicht nach der Rhizodermis in einem Abstand von 40 bis 60 mm hinter der Wurzelspitze angestochen (s. Kap. 2.6.4.1).

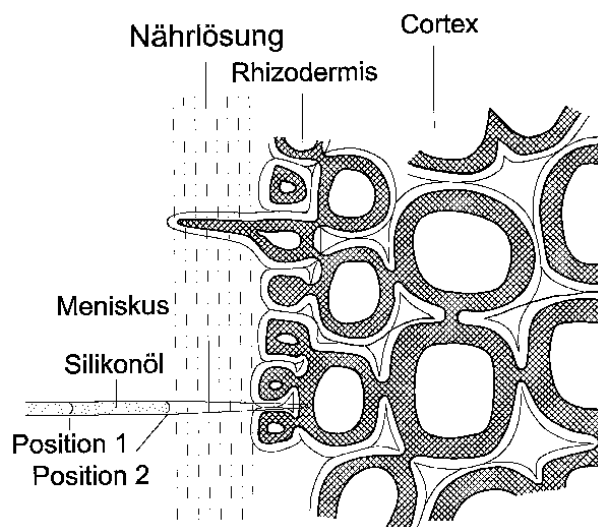


Abb. 2-6 Schematischer Ausschnitt eines Wurzelquerschnittes. Die Insertionsstellen der Mikrokapillaren der Zelldrucksonde zur Messung des Zelldrucks lagen in der ersten oder zweiten Cortex-Zellschicht hinter der Rhizodermis. Das Wurzelgewebe wurde während der Versuche ständig mit Nährlösung umspült. Zur Erhöhung bzw. Erniedrigung des Zelldruckes konnte der Wasser-Öl Meniskus der Kapillare mittels Mikromanipulator von Position 1 zu Position 2 oder umgekehrt bewegt werden.

Um den ABA-Effekt auf die hydraulische Leitfähigkeit von Maiswurzelzellen (L_p) zu untersuchen, wurden verschiedene Experimenttypen verwendet.

11 Tage alte, intakte Maispflanzen wurden in Nährlösungen (pH = 5.5), die 10 nM, 100 nM und 1000 nM ABA enthielten und in einer Nährlösung mit einem pH-Wert von 8.0 (10 mM HEPES/KOH) und 100 nM ABA inkubiert. Inkubationszeiten waren 10 min, 30 min, 1 h und 2 h. Während dieser Zeit war die Nährlösung immer belüftet. Fünf Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde der jüngste Teil der Primärwurzel an der ZDS befestigt (s. Kap. 2.6.4.1) und dort mit Nährlösung der entsprechenden ABA-Konzentrationen und dem jeweiligem pH-Wert umspült. Pro Wurzel wurde nur eine Rindenzelle gemessen, um exakte Inkubationszeiten zu gewährleisten.

Kontrollwurzeln wurden eine Stunde in reine Nährlösung gegeben und dann vermessen.

Um den zeitlichen Verlauf der Änderungen von hydrostatischen Druckrelaxationen in *einer* Wurzelcortexzelle zu verfolgen, wurden 11 Tage alte Maiskeimlinge ohne Vorbehandlung fixiert und eine Zelle angestochen. Nach Stabilisierung des Zelldruckes (P_0) nach zwei bis drei Minuten wurden sechs hydrostatische Relaxationen und die Volumenelastizität als Kontrollwert gemessen. Anschließend wurde ABA in einer Endkonzentration von 1000 nM zur Nährlösung gegeben, die die Wurzel ständig umspülte. In regelmäßigen Abständen wurden hydrostatische Relaxationen und Volumenelastizitäten gemessen. Sobald der Zelldruck abzusinken begann, wurden die Experimente gestoppt, da dies ein Zeichen für das Undichtwerden der Zellen ist.

2.7.6.4 Spezifität der ABA-Wirkung auf $L_{p,r}$ und L_p

Als Pflanzenmaterial wurden elf Tage alte Maiswurzeln aus Hydrokultur verwendet. Ein Teil der Pflanzen wurde am Mesokotyl dekapitiert und an einer Saugapparatur fixiert (s. 2.6.2). Die Wurzeln wurden in dunklen, belüfteten Bechergläsern, die 500 ml Nährlösung enthielten, aufbewahrt. Bei einem Unterdruck von -0.06 MPa wurde der steady-state Wasserfluss (J_{Vr}) für 60 min gemessen. Anschließend wurden folgende Chemikalien in einer Endkonzentration von 100 nM zur Nährlösung gegeben, wobei der pH Wert der Lösung, soweit nicht anders angegeben, 5.5 war: (\pm)-cis-trans-ABA (Sigma, Deisenhofen, FRG), (\pm)-cis-trans-ABA (Sigma, Deisenhofen, FRG) pH = 8.0 (10 mM Hepes/KOH), (+)-cis-trans-ABA (Sigma, Deisenhofen, FRG), (-)-cis-trans-ABA (Sigma, Deisenhofen, FRG), (\pm)-trans-trans-ABA (Sigma, Deisenhofen, FRG), ABA-Glucoseester (Apex-Organics, Devon, UK), ABA-Methylester (Sigma, Deisenhofen, FRG), LAB 173 711 (synthetisches ABA-Analogon; BASF, Limburgerhof, FRG), Gibberellinsäure (Sigma, Deisenhofen, FRG), Kinetin (Sigma, Deisenhofen, FRG), Zeatin (Sigma, Deisenhofen, FRG), Indol-3-Essigsäure (Sigma, Deisenhofen, FRG) und Essigsäure (AppliChem, Darmstadt, FRG). Danach wurde J_{Vr} für weitere 120 bis 140 min gemessen.

Maiswurzeln wurden für eine Stunde in Nährlösung plus Kinetin (Sigma, Deisenhofen, FRG) oder 1000 nM Indol-3-Essigsäure (Sigma, Deisenhofen, FRG)

inkubiert und (wie unter Kap. 2.6.4.1 beschrieben) an einer ZDS fixiert und angestochen. Es wurde die Zelleitfähigkeit (Lp) bestimmt.

2.7.6.5 Flussexperimente mit transgenem Tabak

Keimlinge von transgenem und Wildtyp Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) (s. 2.1) wurden dekapitiert und an einer Saugapparatur druckdicht fixiert. Bei einem Unterdruck von -0.03 MPa wurde der steady-state Wasserfluss bestimmt. Anschließend wurde ABA bis zu einer Endkonzentration von 100 nM zum Medium pipettiert. Der Wasserfluss wurde beobachtet, bis sich erneut ein steady-state Wasserfluss einstellte.

2.8 Untersuchungen zum Aquaporin-mRNA Gehalt mittels quantitativer RT-PCR

2.8.1 Pflanzenmaterial

Um die Aquaporin-mRNA von Cortex und Stele einer Maiswurzel getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden fünf Tage alte Keimlinge von *Zea mays* L. Sorte Helix (s. 1.1) verwendet. Die Keimwurzel war zu diesem Zeitpunkt 60 bis 70 mm lang. Verwendung fand der Bereich von 20 mm bis 60 mm oberhalb der Wurzelspitze. Hier konnte mit Hilfe von zwei Uhrmacherpinzetten (INOX; Rubis, Schweiz) der Zentralzylinder vom Wurzelcortex getrennt werden. Die getrennten Gewebe wurden nach der Separation zweimal für 10 s in Nährlösung (s. 2.1) gewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die endgültige Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in 100 bis 200 mg-Mengen bei -80°C. Um den Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf den Aquaporin-mRNA-Gehalt im Wurzelcortex dieses Bereichs zu bestimmen, wurden acht intakte Keimlinge für eine Stunde in Nährlösung (s. 2.1) mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen inkubiert. In einer weiteren Versuchsreihe sollte der zeitliche Einfluss des Pflanzenhormons Abscisinsäure auf den Aquaporin-mRNA Gehalt des Maiswurzelcortex überprüft werden. Hierzu wurden je acht intakte Keimlinge in einer

aerober Bedingungen wurde ständig belüftet. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Wurzelgewebe wie oben beschrieben getrennt und der Wurzelcortex aufbewahrt.

2.8.2 Verwendete Chemikalien für die Gelelektrophorese

Agarosegele: 1%: 2 g Agarose (SEA KEM[®]LE; FMC Biochemicals, Maine, USA) in 200 ml 1x TAE-Puffer mit 25 mg/l Ethidiumbromid
2%: 4 g Agarose (SEA KEM[®]LE; FMC Biochemicals, Maine, USA) in 200 ml 1x TAE-Puffer mit 25 mg/l Ethidiumbromid

Elektrophorese-1x TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA (pH=8), 8 mM Essigsäure (1.142% v/v);
0.25 mg/l Ethidiumbromid

Auftragspuffer: 20% (w/v) Ficoll (Sigma, Deisenhofen, FRG), 0.2 M EDTA (pH=8),
0.1% (w/v) Bromphenolblau

2.8.3 Isolation der Gesamt-RNA aus Mais-Wurzelgewebe

Gesamt-RNA aus *Zea mays* L.-Wurzelgewebe wurde nach dem „RNeasy[®] Plant Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Plant ... Tissues...“ (Quiagen GmbH, Hilden, FRG) isoliert. Bei -80 °C tiefgekühltes Wurzelgewebe von Maiscortex und -stele (100 bis 200 mg Portionen) wurde unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu sehr feinem Pulver zerrieben. Das feine Pulver gab man in vorgekühlte Eppendorfggefäße. Nach sofortiger Zugabe von 450 µl RLT-Puffer (+ 4,5 µl 2-Mercaptoethanol) ließ man das Pulver unter starkem Schütteln auf dem Whirlmix auftauen. Es schloss sich eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur weiteren Lyse der Pflanzenzellen an. Alle weiteren Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Das Lysat wurde auf den „Qiashredder“ überführt und für zwei min bei 15 000 g (EBA 12; Hettich, Tuttlingen, FRG) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde vorsichtig abgenommen, um eine Kontamination mit den sedimentierten Polysacchariden und anderen Feststoffen zu vermeiden. Er wurde in ein neues, RNase-freies Eppendorf-Cup gegeben und vorsichtig mit 225 µl RNase-freiem Ethanol durchmischt. Anschließend trug man die Probe auf eine Säule auf, die während einer 30sekündigen Zentrifugation bei 8000 g RNA an ihre Säulenmatrix

nachfolgenden Waschschritten mit 500 µl RPE-Puffer und jeweiliger Zentrifugation für 30 s bei 8000 g erfolgte die Reinigung der gebundenen Gesamt-RNA. Das im letzten Waschpuffer enthaltene Ethanol wurde durch eine Zentrifugation bei 15 000 g für zwei min entfernt. Die RNA konnte nach einminütiger Inkubation durch zweimalige Zentrifugation bei 8000 g für 30 s mit 30 µl bzw. 20 µl RNase-freiem Wasser in neue Eppendorf Reaktionsgefäße eluiert werden.

2.8.4 Quantifizierung der Gesamt-RNA

2.8.4.1 Fotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurden Oligonukleotide in 104 µl H₂O_{dd} aufgenommen und die mRNA um den Faktor 100 verdünnt. Die Lösungen wurden in 1 cm dicke Quarzküvetten überführt und die Absorption im Spektralfotometer (DU[®]640; Beckman, USA) bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Anhand von empirischen Vergleichsdaten konnte die Konzentration bestimmt werden. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 bei einzelsträngiger RNA oder DNA ca. 40 µg/ml. Die Konzentration von Oligonukleotiden bei bekannter Sequenz war nach den daraus errechneten Extinktionsfaktoren (OD₂₆₀ = 150 bis 280 für 1 µmol/ml) exakt berechenbar. Über den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. Niedrige Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen (Absorptionsmaximum bei 280 nm).

2.8.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung im Agarosegel

Die Überprüfung der im Spektralfotometer (DU[®]640; Beckman, USA) gemessenen Konzentration der Gesamt-RNA durch eine Quantifizierung der Ethidiumbromidfluoreszenz ist äußerst wichtig, da die Methodik der quantitativen RT-PCR entscheidend vom Einsatz gleicher Mengen an RNA abhängt. Daher wurde 1 µg Gesamt-RNA nach fotometrischer Bestimmung zusammen mit 7 µl RNase-freiem Wasser und 2 µl Auftragspuffer auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung konnte der Reinheitsgrad der präparierten RNA, erkennbar an zwei gut voneinander unterscheidbaren ribosomalen Banden,

Geldokumentation und -analyse (Multi-Analyst; Bio-Rad, München, FRG) unter Verwendung einer lokalen Backgroundkorrektur quantitativ ausgewertet. Ergaben sich Unterschiede in der detektierten mRNA-Menge, wurden diese angepasst.

Das Auswertungsverfahren konnte auch zur Quantifizierung von DNA-Banden verwendet werden. Alle Abbildungen von RNA- oder DNA- Banden sind invertiert dargestellt.

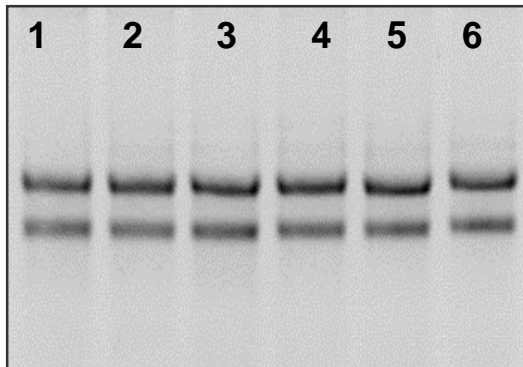


Abb. 2-7 Auftrennung der isolierten Gesamt-mRNA aus Wurzelcortexzellen von *Zea mays* L. des Zeitreihenversuchs (s. 2.8.1) in einem 1%igen Agarosegel. Mittels Ethidiumbromidfluoreszenz-Quantifizierung konnten die eingesetzten mRNA-Mengen exakt aufeinander abgestimmt werden. Bahn 1: Kontrolle, Bahn 2: 30 min Inkubation, Bahn 3: 45 min Inkubation, Bahn 4: 60 min Inkubation, Bahn 5: 90 min Inkubation, Bahn 6: 120 min Inkubation der Keimlinge in 1000 nM ABA.

2.8.5 Analyse der Aquaporin-mRNA mittels quantitativer RT-PCR

Das Prinzip der RT-PCR ist die Kombination einer Reversen Transkription (RT) mit der anschließenden Vervielfältigung der cDNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

2.8.5.1 Reverse Transkription (RT)

Bei der Reversen Transkription wird eine einzelsträngige mRNA als Matrize verwendet und von ihr eine einzelsträngige DNA-Kopie, die sog. cDNA („complementary DNA“), hergestellt. Dieselbe Menge mRNA verschiedener Gewebeproben kann so in cDNA unter denselben Versuchsbedingungen umgeschrieben werden. Unterschiedliche Mengen an mRNA eines spezifischen Gens erzeugen auf diese Weise unterschiedliche Mengen an cDNA dieses Gens. Die katalysierenden Enzyme dieser Reaktion (Reverse Transkriptasen) benötigen ein Oligonukleotid, an dem die Synthese beginnen kann. Hier bindet ein Oligonucleotid (dT)₁₂₋₁₈ (Oligo(dT)) an das polyadenylierte Ende der mRNA-Einzelstränge. Dadurch wird verhindert, dass andere RNA-Typen ebenfalls an der Reaktion teilnehmen.

variieren), wird eine definierte Menge an Kontroll-RNA (pAW109, Wang et al. 1989) als interner biochemischer Standard zur RT der jeweiligen Proben gegeben, um die Effizienz der Reaktion zu kontrollieren. Die RT wurde nach Ausubel et al. (1995) und Richert et al. (1996) durchgeführt.

2.8.5.1.1 Protokoll der Reversen Transkription (RT):

4	µl	5x first-strand buffer (1)	250 mM TRIS-HCl (pH=8.3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂
1	µl	Ribonuclease inhibitor (2)	50 U/µl
1	µl	dNTPs (3)	20 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP
2	µl	DTT (1)	0.1 M
3.4	µl	Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (1)	10 µM (0,05 µg/µl)
0.5	µl	pAW109 mRNA (4)	10 ⁶ Kopien/µl
x	µl	mRNA Probe	1µg
y	µl	H ₂ O _{dd} RNase frei	ad 20 µl Gesamtvolumen

20 µl RT-Volumen

Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur

1	µl	SUPERSCRIPT™ RNase (1)	200 U/µl 1:4 verdünnt mit 1x first-strand H ⁻ Reverse Transkriptase-buffer
---	----	------------------------	---

oder

1	µl	1x first-strand buffer (1)	
---	----	----------------------------	--

als Negativ-Kontrolle.

(1) GIBCOBRL®, LIFE TECHNOLOGIES, Gaithersburg, USA

(2) MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

(3) Boehringer GmbH, Mannheim, FRG

(4) GeneAmp® PCR System, Perkin Elmer GmbH, Weiterstadt, FRG

Die Proben wurden mit 35 µl Mineralöl (Pristan; Sigma, Deisenhofen, FRG) überschichtet und bei 1000 g für eine Minute zentrifugiert (Rotanta/TR; Hettich,

Tuttlingen, FRG). Es schloss sich eine Inkubierung in einem automatischen Thermocycler MultiCycler PTC-200 (Biozym, Oldenburg, FRG) an.

Temperaturprogramm:

42°C 30 min

50°C 40 min

4°C Abkühlung

Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.8.5.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Aus dem so entstandenen Kontingent an cDNA (cDNA pool) konnten nun gezielt einige cDNAs mittels PCR amplifiziert werden. Zur Überprüfung der Probenvarianz wurde die Reaktion auch mit sogenannten Kontrollgenen (in diesem Falle der α -Tubuline) als interner biologischer Standard durchgeführt, die sich in den unterschiedlichen Geweben und während der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht verändern sollten. Die Amplifikation (N) berechnet sich aus $N = N_0(1+eff)^n$, wobei N_0 den Anfangsgehalt der Vorlage, eff die Effizienz der Reaktion und n die Zyklenzahl darstellt. Die optimalen Ausgangsmengen und Zyklenzahlen in der PCR wurden in Vorstudien ermittelt. Quantitativ ausgewertet wurden Standard und Genprodukt nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 2% Agarosegel mittels einer Software zur Geldokumentation (Multi-Analyst; Bio-Rad, München, FRG). Dabei wurde ein pUc12-Plasmidderivat, das gegenüber pUc12 mit einer zusätzlichen BstXI-Restriktionsstelle versehen war und mit MspI verdaut wurde, als Größenmarker zur Bandenidentifizierung benutzt (bp: 501, 489, 404, 328, 242, 190, 147, 110, 87, 67, 34 und 26).

Die selektive Anreicherung bestimmter DNA-Abschnitte erfolgte mittels DNA-Polymerasen, die die Auffüllung eines Einzelstranges in 5' - zu 3' - Richtung katalysieren. Wegen des wiederholten Aufschmelzens der DNA-Doppelstränge müssen alle Komponenten der PCR thermostabil sein. Daher werden Polymerasen aus extrem thermophilen marinen Archaeobakterien wie z. B. die *Taq*-DNA-

an der cDNA ansetzen, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Start zur Verfügung steht. Dazu wurden speziell entworfene, chemisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die aus den Randbereichen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes stammen und sich dort antiparallel durch komplementäre Basenpaarung anlagern können.

Verwendete „Primer“

Die Sequenz der aufgelisteten „Primer“ ist in 5'-3'-Richtung orientiert. Primer in Leserichtung wurden als „forward“(f)-Primer, diejenigen in entgegengesetzter Richtung als „reverse“(r)-Primer bezeichnet. Mit den verwendeten Primern konnten Gensequenzen detektiert werden, die alle das für Wasserkanäle spezifische NPA (Asparagin-Prolin-Alanin)-Motiv enthielten. Die Sequenzen wurden deshalb als „putative Aquaporine“ bezeichnet. Nach fotometrischer Konzentrationsbestimmung (s. 2.8.4.1) wurden alle Oligonukleotide ad 200 µM verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

detektierte mRNA	Primername	Sequenz (5' -> 3')	Größe des PCR Produkts	Aquaporin-familie
Tubulin interner Standard	<i>ZmTUA_f</i>	AAG AAG TCT AAG CT(GT) GGT TTC AC	755 bp	-
	<i>ZmTUA_r</i>	TCC ATG CCC TCG CCG AC		
pAW109 interner Standard	<i>DM152</i>	GTC TCT GAA TCA GAA ATC CTT CTA TC	308 bp	-
	<i>DM152</i>	CAT GTC AAA TTT CAC TGC TTC ATC C		
<i>PIP_{all}⁽¹⁾</i>	<i>PIP_{all_f2}</i>	AT(GT) GC(GC) TGG (GT)CC TTC GGC GGA ATG AT	525 bp	PIP1 u. 2
	<i>PIP_{all_r}</i>	GG(GT) CC(GT) ACC CAG AA(GT) ATC CA(GT) TGG TC		
<i>PIP_{all(B)}⁽¹⁾</i>	<i>PIP_{all_f3}</i>	AT(GT) GC(GC) TGG (GT)CC TTC GGC GGC ATG AT	525 bp	PIP1 u. 2
	<i>PIP_{all_r}</i>	GG(GT) CC(GT) ACC CAG AA(GT) ATC CA(GT) TGG TC		
<i>Zm6⁽¹⁾</i>	<i>Zm6_f</i>	CCT CGT CTA CTG CAC CGC	640 bp	PIP1
	<i>Zm6_r</i>	GAA TTA CAA GTC TGG GTT CGG		

(1)

detektierte Primer- mRNA	name	Sequenz (5' -> 3')	Größe des PCR Produkts	Aquaporin- familie
<i>Zm35</i> ⁽¹⁾	<i>Zm35_f</i> <i>Zm35_r</i>	AGA AGA CGA TGG GCA AGG AC CGT CTG GTT CTT GTA CCC GA	215 bp	PIP2 (partiell)
<i>ZmPIP1</i> (²)	<i>Zm6_f</i> <i>ZMPIP1_r</i>	CCT CGT CTA CTG CAC CGC ACG CCC GTT CTT CGG ACT G	607 bp	PIP1
<i>TC_</i> <i>10431</i> ⁽³⁾	<i>10431_f</i> <i>10431_r</i>	GGT TCG CGG TGT TCC TGG TTA GTT ATA AAC CCA CGT TTC C	487 bp	PIP1
<i>ZmPIP2</i> (²)	<i>ZmP2_f</i> <i>ZmP2_r</i>	CGC CGA GAT CAT CGG CAC TGG CTA GAG GCA ACC AAC GAC	444 bp	PIP2
<i>TC_</i> <i>6510</i> ⁽³⁾	<i>ZmP2_f</i> <i>Zm6510_r</i>	CGC CGA GAT CAT CGG CAC GGA CAC ACA GAC GCT GAC C	532 bp	PIP2
<i>TC_</i> <i>9275</i> ⁽³⁾	<i>ZmP2_f</i> <i>Zm9275_r</i>	CGC CGA GAT CAT CGG CAC GAT TAC ATT GCA GGG GAA CGA AAC	511 bp	PIP2
<i>TC_</i> <i>9274</i> ⁽³⁾	<i>ZmP2_f</i> <i>Zm9274_r</i>	CGC CGA GAT CAT CGG CAC ATC ACA CTT TTT TTC CCC GTC AAG G	512 bp	PIP2

⁽¹⁾Gensequenz nach PD Dr. A.R. Schäffner (unveröffentlicht). ⁽²⁾Gensequenz nach Chaumont et al. 2000 (NCBI-GenBank-Zugangsnummer AF 131201) und Jung et al. (nicht veröffentlicht; NCBI-GenBank-Zugangsnummer AF 130975) ⁽³⁾Gensequenz nach TIGR-clone: <http://www.tigr.org>; Stand Februar 2000.

Die Primer wurden von PD. Dr. A.R. Schäffner entworfen, ihre Herstellung erfolgte in der AG BioDV der GSF, München, FRG.

2.8.5.2.1 Protokoll der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

4	µl	DNA aus RT-Ansatz	
0.75	µl	<i>Aquaporin</i> Forward Primer (f)	10 µM
0.75	µl	<i>Aquaporin</i> Reverse Primer (r)	10 µM
0.75	µl	<i>DM151</i> Primer ⁽¹⁾	10 µM
0.75	µl	<i>DM152</i> Primer ⁽¹⁾	10 µM
1.5	µl	10x <i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer ⁽²⁾	100 mM TRIS-HCl (pH=9); 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 1% Triton X-100; 2mg/ml BSA
0.15	µl	dNTPs ⁽³⁾	20 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP
6.25	µl	H ₂ O _{dd} RNase-frei	
0.15	µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase ⁽²⁾	5 U/µl

15 µl PCR Volumen

(1) Sequenz nach GeneAmp®PCR System, Perkin Elmer GmbH, Weiterstadt, FRG

(2) Appligene oncor, Alameda, USA

(3) Boehringer GmbH, Mannheim, FRG

Die PCR-Ansätze wurden nun 1 min bei 1000 g zentrifugiert, anschließend mit 35 µl Mineralöl (Pristan; Sigma, Deisenhofen, FRG) überschichtet und nochmals zentrifugiert. Die Proben wurden umgehend in einem Thermocycler (MultiCyclerPTC-200; Biozym, Oldenburg, FRG) inkubiert.

Temperatur-Programm:

erste Denaturierung der Matrizen-DNA	94°C	2 min	
Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges	94°C	30 s	} 30 Zyklen
Hybridisierung der Primer	55°C	30 s	
Polymerasenreaktion	72°C	45 s	
Auffüllung aller Doppelstränge	72°C	5 min	
Abkühlung	4°C		
Aufbewahrung	-20°C		

Das PCR-Produkt wurde mit 5 µl Auftragspuffer auf ein 2 %iges Agarosegel geladen. Die Intensität der fluoreszierenden Banden wurde (wie in 2.8.4.2 beschrieben) bestimmt. Banden unterschiedlicher Gewebe oder Versuchsbedingungen wurden in % nach dem Vergleich der Intensitätsverhältnisse zwischen Gen und internem Standard angegeben.

2.8.6 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte der Primer *PIP_{all_f2}*, *PIP_{all_f3}* und *PIP_{all_r}*

Die Primer *PIP_{all_f2/3}* und *PIP_{all_r}* wurden so entworfen, dass sie mit stark konservierten Bereichen der Aquaporinfamilien PIP1 und PIP2 hybridisieren. Ziel war es, möglichst viele und neue Aquaporine im Maiswurzelcortex zu detektieren. Zu diesem Zweck wurde das PCR-Produkt mit den Primern *PIP_{all_f2}*, *PIP_{all_f3}* und *PIP_{all_r}* aus einem cDNA Pool des Wurzelcortex von einem 2%igen Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach dem QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Quiagen, Hilden, FRG). Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit 40 µl EB-Puffer (10 mM Tris, pH=8.5) eluiert. Die Ligation der DNA erfolgte mittels Topoisomerase in einen pCR 2.1-TOPO Vektor nach dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die Effizienz der Ligierung wird hier einmal

PCR-Produkte basenpaart. Zudem wird in diesem Verfahren die Ligation in einer bimolekularen Reaktion durchgeführt, da die Verknüpfung durch eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase erfolgt. Kompetente Zellen (*E.coli*) wurden mit diesem Vektor transformiert. Es folgte eine Kultur bei 37°C auf LB - Medium [2.5% (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma, Deisenhofen, FRG); 60 µl 5 M NaOH/ 100 ml Medium; pH = 7.0] mit 50 µg/l Kanamycin über Nacht im Brutschrank. 10 Kolonien wurden willkürlich gepickt und nach einer Überprüfung der Transformation weiterkultiviert. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol (Quiagen, Hilden, FRG). Die DNA wurde in 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris, pH=8.5) eluiert und mittels OD₂₆₀ am Spektralfotometer (s. 2.8.4.1) quantifiziert. Zur Überprüfung der DNA wurden je 4 µl mit Eco RI verdaut und auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Dabei wurden Vektoren und klonierte Fragmente in der erwarteten Größe (3.9 kbp und 525 bp) nachgewiesen. Die Sequenzierung erfolgte in der Firma TOPLAB, Martinsried, FRG. Dabei wurde nur ein DNA-Strang vollständig sequenziert, die Gegenstranganalyse erfolgte nur unvollständig.

2.9 Datenauswertung

Üblicherweise wurden das Stichprobenmittel und die Standardabweichung der Stichprobe (σ_{n-1}) berechnet. Der Stichprobenumfang n wird in den jeweiligen Abbildungen oder Tabellen angegeben. Zum Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der Student T-Test durchgeführt:

T-Test (A): Zweiseitiger (sofern nicht anders angegeben), Zweistichproben T-Test bei unabhängigen Stichproben

T-Test (B): Einseitiger, Zweistichproben T-Test bei abhängigen Stichproben

Es ist jeweils die Signifikanz (p) angegeben. α betrug 0.05. Die statistische Auswertung der WDS-Experimente wurde mit der Statistik-Software SAS-release 6.12 durchgeführt. Die Regressionsmodelle und die Signifikanz der abgeschätzten Modellparameter wurden mit der Prozedur REG berechnet. Auswahlkriterium war adj. R^2 . Bestes adj. R^2 hatte hierbei eine quadratische Regression abhängig von der Zeit t (s) des Typs $T_{1/2}^w = a + b \cdot t + c \cdot t^2$. Die Homogenität der Steigungen wurde in einem linearen Modell berechnet, das den Zusammenhang der beiden Kultivierungstechniken (Hydro- und Luftkultur) und den linearen und quadratischen