



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Osmotischer Stress auf zellulärer Ebene
Vergleichende Analyse zweier Sorten von *Triticum aestivum*

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Flora Hejjas
Matrikel-Nummer:	9804652
Studienrichtung:	Biologie/Ökologie
Betreuerin:	Ao. Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl

Wien, am 29. 9. 2008

DANKSAGUNG

Meinen Freundinnen und Freunden danke ich für Motivation und Zuspruch während der gesamten Zeit, in der sie manchmal mehr an mich glaubten als ich selbst.

Ich danke Dr. Gottfried Großbointner für die Unterstützung in der schwierigen Schreibphase - ohne seine regelmäßige Zusprache und hilfreichen Tipps hätte ich es wohl nicht geschafft.

Frau Dr. Irene Lichtscheidl danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die freundschaftliche Atmosphäre, die sie in der Abteilung schafft.

Herrn Dr. Wolfram Adlassnig möchte ich für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit und seine vielen fachlichen Tipps und Ideen danken, ebenso wie für die moralische Unterstützung während der gesamten Diplomarbeitszeit und die freundschaftlichen Aufmunterungen, wenn es mal nicht so gut lief.

Auch Frau Dr. Ingeborg Lang und allen anderen Mitgliedern der Abteilung für Zellphysiologie möchte ich für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft danken, einige von ihnen sind mir sehr liebe Freunde geworden und durch sie habe ich mich immer gefreut, ins Labor zu fahren.

Meiner Familie und allen, die hier nicht extra erwähnt werden, mich aber in meinem Studium begleitet haben und mir auf verschiedenste Weise geholfen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	5
Summary	6
1. Einleitung.....	7
1.1. Wurzel	8
1.1.1. Funktion	8
1.1.2. Aufbau	9
1.1.3. Sekundäres Dickenwachstum.....	12
1.2. Wurzelhaare.....	14
1.2.1. Aufbau	14
1.2.2. Funktion	17
1.2.3. Entstehung.....	18
1.3. Zellwand	21
1.3.1. Aufbau	21
1.3.2. Entstehung der Zellwand	23
1.3.3. Zellwand der Wurzelhaare	25
1.4. Plasmamembran	26
1.4.1. Bau der Membran.....	26
1.4.2. Membrantransport.....	26
1.4.3. Membranfluss	28

1.5.	Wasserhaushalt der Zelle	31
1.5.1.	Wasserpotential	31
1.5.2.	Diffusion und Osmose.....	31
1.5.3.	Plasmolyse.....	32
1.6.	Trockenstress	36
1.7.	Salzstress	39
2.	Material und Methoden	41
2.1.	<i>Triticum aestivum</i>	42
2.2.	Kultivierung.....	44
2.3.	Lösungen	47
2.3.1.	Phosphatpuffer	47
2.3.2.	Mannit.....	47
2.3.3.	NaCl	48
2.3.4.	BFA.....	48
2.4.	Fluoreszenzfarbstoffe.....	50
2.4.1.	Lucifer Yellow.....	50
2.4.2.	FM 1-43.....	50
2.4.3.	FM 4-64.....	51
2.5.	Mikroskopie und Dokumentation	52
2.5.1.	NIKON Labophot.....	52
2.5.2.	CLSM	52

2.5.3.	Univar.....	52
2.5.4.	Fotografie.....	52
2.6.	Aufbau der Versuche	54
2.6.1.	Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit	54
2.6.2.	Wachstum der Wurzelhaare in Mannit.....	55
2.6.3.	Wurzelwachstum in Mannit und NaCl.....	55
2.6.4.	Messung der osmotischen Werte der Wurzeln.....	56
2.6.5.	Versuche zur Endo- und Exocytose	57
3.	Ergebnisse.....	59
3.1.	<i>Triticum aestivum</i> in der Kontrolle.....	60
3.1.1.	Wurzelwachstum.....	60
3.1.2.	Osmotischer Wert der Wurzel	60
3.1.3.	Wurzelhaarwachstum.....	60
3.2.	Vergleichende Analysen des Wurzelwachstums	62
3.2.1.	Wurzelwachstum in Mannit.....	62
3.2.2.	OW der Wurzel in Abhängigkeit von der Mannit-Konzentration.....	64
3.2.3.	Wurzelwachstum in Natriumchlorid.....	69
3.2.4.	OW der Wurzeln in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration.....	71
3.3.	Vergleichende Analysen des Wurzelhaarwachstums	72
3.3.1.	Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit	72
3.3.2.	Wachstum der Wurzelhaare in Mannit.....	81

3.4.	Endo- und Exocytose in Wurzelhaaren	84
3.4.1.	Endocytotische Aufnahme von <i>Lucifer Yellow</i>	84
3.4.2.	Unterbindung der Exocytose	85
3.4.3.	Unterbindung der Exocytose während der Plasmolyse	87
4.	Diskussion	93
4.1.	Wurzelhaare unter Einwirkung von osmotischem Stress	94
4.2.	Wurzeln unter Einwirkung von osmotischem Stress	98
4.2.1.	Wurzeln in Mannitol	98
4.2.2.	Wurzeln in Natriumchlorid	104
4.3.	Vergleiche zwischen den Sorten L und J.....	108
4.4.	Exo- und Endocytose	111
4.5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	113
	Literaturverzeichnis	115

ZUSAMMENFASSUNG

Trockenheit stellt einen der wichtigsten Stressoren für Pflanzen dar. Da die Wurzeln - und hier besonders die Wurzelhaare - als erste mit trockenem Boden in Kontakt kommen, ist anzunehmen, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Bewältigung von Trockenstress spielen. Diese Hypothese wurde durch den Vergleich der Wurzel und Wurzelhaare zweier unterschiedlich trockenheitsresistenter Sorten von *Triticum aestivum* (Poaceae) getestet. *T. aestivum* bietet sich als Modellsystem besonders an, da er eine wichtige Rolle für die Welternährung spielt, der Anbau aber oft durch Trockenheit erschwert wird.

Trockenstress wurde durch die Anwendung gestufter Mannitlösungen simuliert. Die Auswirkungen wurden anhand der Zuwachsraten von Wurzel und Wurzelhaaren, des osmotischen Wertes und der Cytomorphologie untersucht. Dabei wurde zwischen nicht adaptierten, 24 Stunden adaptierten und 48 Stunden adaptierten Pflanzen unterschieden. Darüber hinaus wurde das Wurzelhaarwachstum mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *Lucifer Yellow* und des Golgi-Inhibitors Brefeldin A untersucht. Da in der Natur Trocken- und Salzstress oft gemeinsam auftreten, wurde in einer eigenen Versuchsserie der Einfluss von NaCl geprüft.

Bei beiden Sorten bewirkte osmotischer Stress eine Verlangsamung des Wachstums von Wurzelhaaren und Wurzeln. Innerhalb von 24 bis 48 Stunden erhöhte sich der osmotische Wert der Wurzeln und auch das Wurzelhaarwachstum konnte bis in höhere Konzentrationen aufrecht erhalten werden. Generell wurde das Wurzelhaarwachstum durch osmotischen Stress bei der trockenstressresistenteren Sorte weniger beeinträchtigt. NaCl hemmte das Wurzelwachstum stärker als Mannitol.

Obwohl viele Mechanismen an der Entstehung von Trockenheitsresistenz beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass dem Wurzelhaar als dem Ort der unmittelbaren Wasseraufnahme wesentliche Bedeutung zukommt. Wurzelhaare reagieren sensibel auf osmotischen Stress, können sich jedoch innerhalb kürzester Zeit an diesen anpassen. Die Wurzelhaare trockenheitsresistenter Sorten zeigen durchgehend eine höhere Widerstandsfähigkeit. Am Naturstandort wird der osmotische Stress allerdings häufig durch toxische Salze verstärkt.

SUMMARY

Drought is one of the major stress factors for plants. As roots - and especially root hairs - are the first to get in contact with dry soil, it is assumed that they play a key role in the accomplishment of drought stress. This hypothesis was tested by comparing the roots and root hairs of two strains of *Triticum aestivum* (Poaceae) exhibiting different drought resistances. *T. aestivum* is an attractive model system due to its importance to world nutrition, though its cultivation is frequently inhibited by drought.

Drought stress was simulated by means of mannitol solutions. Growth rates of roots and root hairs were studied, as well as changes in the cytomorphology. The roots were observed immediately after stress application, as well as after 24 and 48 hours of adaptation. Furthermore tip growth of root hairs was studied using the fluorescent dye *Lucifer Yellow* and the Golgi-inhibitor Brefeldin A. As drought is frequently combined with salt stress, a series of experiments was dedicated to the influence of NaCl.

In both strains osmotic stress resulted in reduced growth of root hairs and roots. The osmotic value of the roots increased; tip growth was maintained in higher concentrations of mannitol than before. Tip growth was less affected in the more resistant strain. NaCl inhibited the root growth more severely than mannitol.

Even though many mechanisms contribute to drought resistance, evidence was found that root hairs play a key role as the primary site of water uptake. Root hairs show immediate reactions on osmotic stress, but are able to adapt within a short time. The root hairs of drought resistant strains exhibit a higher resistance. At the natural site, however, osmotic stress is intensified by toxic salts.

1. EINLEITUNG

1.1. Wurzel

Die Wurzel ist neben Sprossachse und Blatt eines der drei Grundorgane der Kormophyten. Die meisten Pflanzen haben unterirdische Wurzeln, viele bilden jedoch auch an der Luft (Fahn, 1982) und im Wasser Wurzeln aus. Nur bei wenigen Samenpflanzen bleibt der Wurzelpol des Embryos von vornherein unterdrückt. Zu diesen wurzellosen Arten gehören die Wasserpflanzen *Ceratophyllum* und *Utricularia*, die Orchideen *Epipogium* und *Corallorhiza* sowie die epiphytische Bromeliacee *Tillandsia usneoides*. (Strasburger *et al.*, 1983)

Die erste Wurzel der Pflanze, welche vom Embryo abstammt, wird Primärwurzel genannt. Wächst sie als Pfahlwurzel senkrecht nach unten und bildet akropetale Seitenwurzeln aus, bezeichnet man das Wurzelsystem als allorhiz. Es kommt bei Gymnospermen, magnoliiden und eudicotylen Pflanzen vor. Monocotyle Pflanzen - so auch die Gräser - bilden nach dem frühen Absterben der Primärwurzel ein homorhizes Wurzelsystem aus mehreren, gleichwertigen (sprossbürtigen) Adventivwurzeln aus. (Fahn, 1982; Raven *et al.*, 2006)

Das Geflecht der homorhizen Wurzelsysteme monocotyler Pflanzen reicht meist nicht so tief in den Boden wie die Pfahlwurzeln der dicotylen Pflanzen. Es umklammert jedoch die Bodenpartikel in den oberen Bodenschichten besonders fest und ist deswegen ein sehr guter Schutz gegen Bodenerosion. (Campbell, 1997; Raven *et al.*, 2006)

1.1.1. Funktion

Wurzeln dienen vor allem der mechanischen Verankerung der Pflanze (z.B. im Boden) und der Aufnahme und Weiterleitung von Wasser und den darin gelösten Mineralstoffen. (Kutschera, 1960)

Sie können jedoch auch andere Funktionen erfüllen, wie z.B. Speicherung organischer Stoffe, Gasaustausch und bei vielen Epiphyten sogar Photosynthese. Hierfür bilden sie die verschiedensten Metamorphosen aus. (Fahn, 1982)

1.1.2. Aufbau

1.1.2.1. Primärer Bau der Wurzel

Die Wurzel trägt - gleich dem Spross - ihren Vegetationspunkt an ihrer Spitze. Da sie jedoch keine Blätter ausbildet, kann der Schutz dieses empfindlichen Wachstumspunktes nicht wie beim Spross von Blättern übernommen werden (Kutschera, 1960). Daher findet sich bei den meisten Wurzeln vor dem Vegetationspunkt die sogenannte **Wurzelhaube** (Kalyptra), welche die Wurzelspitze fingerhutartig umgibt (siehe Abb. 1). Die Wurzelhaube besteht aus mehreren Zellreihen, von denen die ältesten, oberflächlich gelegenen Zellen einen Schleim aus Polysacchariden absondern und so das Vorwärtsschieben der Wurzel im Boden erleichtern (Campbell, 1997; Kutschera, 1960). Diese gallertartige Schicht dient außerdem als Austrocknungsschutz und ermöglicht eine stärkere Haftung an Bodenpartikel (Raven *et al.*, 2006). Die Wurzelhaube ist außerdem Ort der Geoperzeption; sie kontrolliert das geotrope Wachstum der Wurzel (Fahn, 1982).

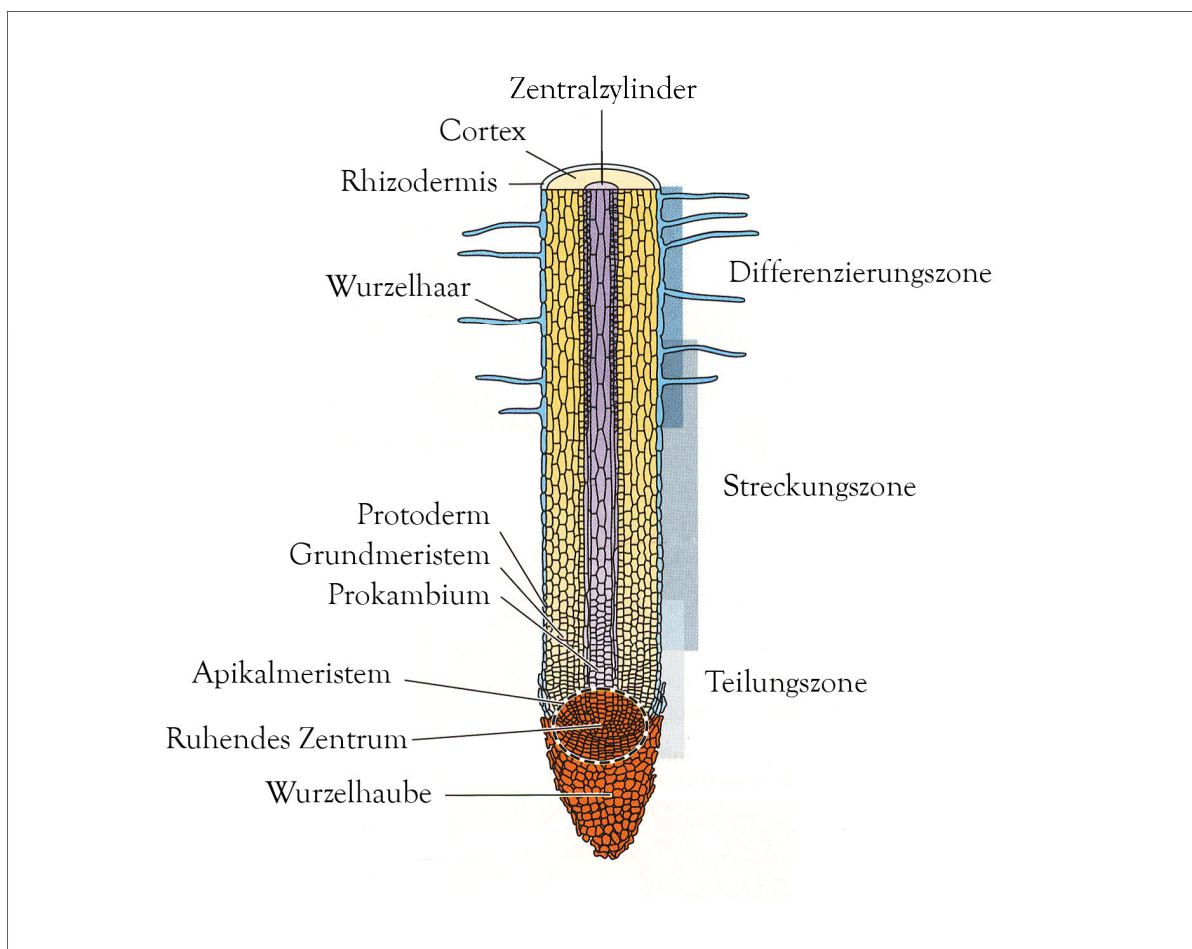


Abb. 1: Aufbau der Primärwurzel (nach Campbell, 2006)

Die der Wurzelhaube am nächsten liegende **Teilungszone** enthält meristematische Zellen. Nur hier finden Mitosen statt; hier entstehen die drei primären Meristeme, welche sich später in die drei Grundgewebe der Wurzel (Rhizodermis, Cortex und Stele) differenzieren (siehe Abbildung 1). Die Teilungszone geht in die **Streckungszone** über, wo sich die Zellen bis auf das Zehnfache ihrer ursprünglichen Länge strecken, was das Längenwachstum der Wurzel bewirkt. Noch während sich die Zellen strecken, beginnen sie sich in der nächsten Zone, der **Differenzierungszone**, zu spezialisieren. Hier erreichen die Zellen ihre funktionelle Reife. Auch die Wurzelhaare der Rhizodermiszellen werden hier gebildet. (Campbell, 1997)

Mit der Differenzierungszone ist der primäre Bau der Wurzel abgeschlossen. In einem Abstand hinter ihr beginnt die **Verzweigungszone** (Raven *et al.*, 2006). Hier erfolgt die Bildung von Seitenwurzeln. Diese entstehen im Gegensatz zu Verzweigungen am Spross endogen, tief im Inneren der Wurzel aus dem Perizykel. (Fahn, 1982)

1.1.2.2. Gewebesysteme der Wurzel

Aus den primären Meristemen der Teilungszone entwickeln sich die drei primären Gewebe (siehe Abb. 2): Das Protoderm wird zur **Rhizodermis** (primäres Abschlussgewebe), welche auch die Wurzelhaare ausbildet. Das Grundmeristem bildet das Grundgewebe (Rinde, **Cortex**) aus und aus dem Prokambium entwickelt sich der **Zentralzylinder** (Leitgewebesystem). (Campbell & Reece, 2006; Raven *et al.*, 2006)

Betrachtet man eine Wurzel im Querschnitt, sieht man, dass der größte Raum im Primärkörper der meisten Wurzeln von der primären Rinde (**Cortex**) eingenommen wird. Der Cortex der Wurzeln ist meist breiter als der der Sprosse und spielt deswegen eine größere Rolle bei der Speicherung. Die Plastiden der primären Rindenzellen speichern Stärke, besitzen jedoch normalerweise kein Chlorophyll. Der Cortex besteht meist aus Parenchymzellen, bei vielen Monocotyledonen zusätzlich aus Sklerenchymzellen. (Fahn, 1982; Raven *et al.*, 2006)

Die innerste Schicht des Cortex stellt die **Endodermis** dar (Fahn, 1982). Anders als die anderen Schichten der primären Rinde besitzt diese keine Interzellularen. Ihre antiklinen Wände (senkrecht zur Wurzeloberfläche verlaufende Quer- und Radialwände) besitzen suberin- und/oder ligninhaltige Wandverdickungen, sogenannte Caspary'sche Streifen. Dieses durchgehende Band blockiert den apoplastischen Transport von Wasser und

Nährstoffen, wodurch eine selektive Aufnahme über die Protoplasten der Endodermis ermöglicht wird. (Raven *et al.*, 2006) In vielen Angiospermen, die kein sekundäres Dickenwachstum aufweisen, wird auf die gesamte Innenseite der Endodermisprimärwand eine fast durchgehende Schicht von Suberin gelagert. In einem dritten Stadium wird eine Zelloschicht zentripetal auf die Innenseite der Suberinschicht aufgelagert. Sie kann eine beträchtliche Dicke erreichen. Dieser Typ einer endodermalen Zelle ist bei den meisten monocotylen Wurzeln üblich. Die verdickten Wände können lignifizieren. (Fahn, 1982)

Bei den meisten Angiospermen-Wurzeln bildet die äußerste Schicht des Cortex eine zweite kompakte und suberinhaltige Zellschicht aus - die **Exodermis** (Raven *et al.*, 2006). Ihre Breite variiert von einer bis mehrere Zellschichten (Fahn, 1982). Sie kann mehr oder weniger verkorken und dient bei älteren Wurzelteilen, wenn die Rhizodermis teilweise oder vollständig verloren geht, als sekundäres Abschlussgewebe. (Kutschera, 1960; Strasburger *et al.*, 1983)

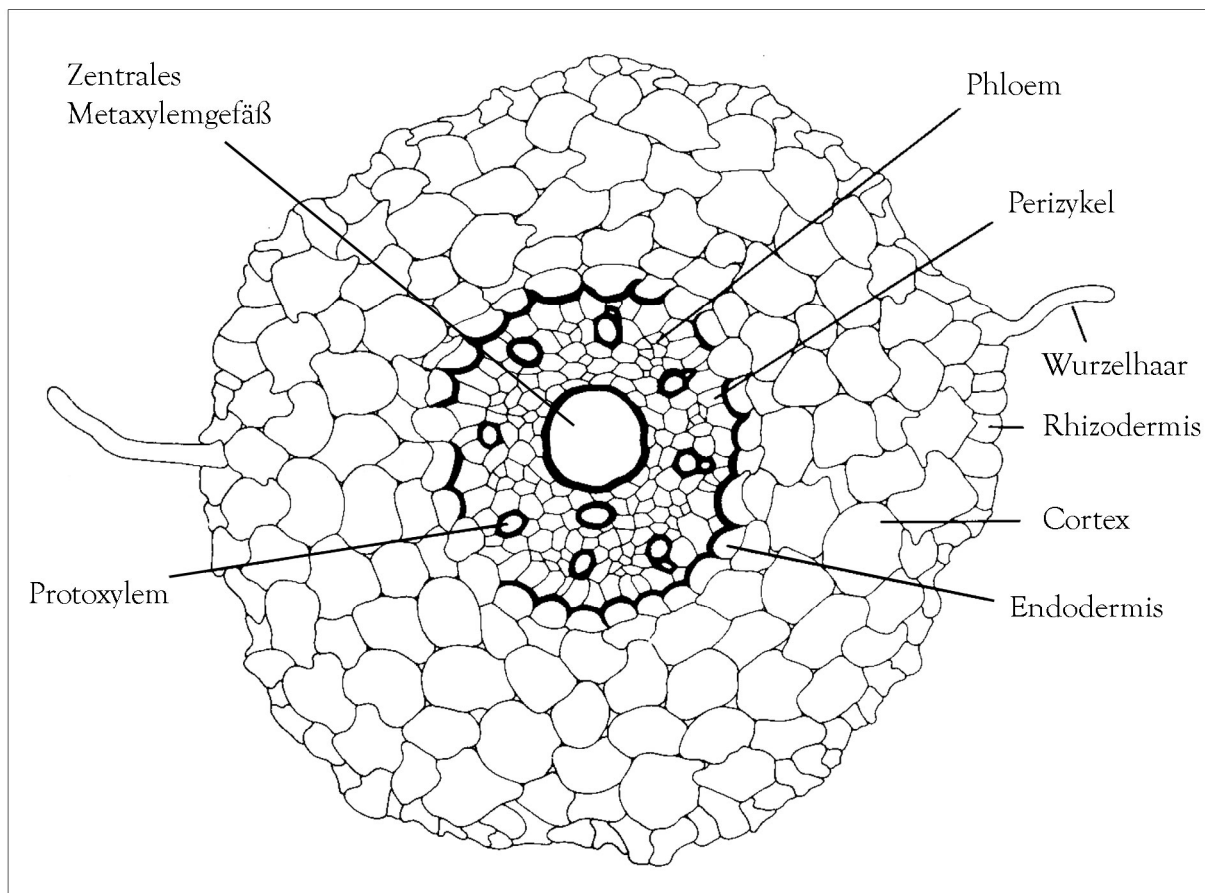


Abb. 2: Wurzelquerschnitt eines Triticum aestivum - Keimlings (nach Avery, 1930)

Die äußerste Schicht der Primärwurzel bildet die **Rhizodermis**. Dieses meist einschichtige Gewebe umgibt die Primärwurzel durchgehend. Im Unterschied zur Epidermis des Sprosses besitzt die Rhizodermis keine Spaltöffnungen, meist keine Cuticula und nur sehr dünne Außenwände. (Kutschera, 1960) In der Differenzierungszone bilden manche Rhizodermiszellen **Wurzelhaare** aus. Diese Zellen nennt man Trichoblasten. Rhizodermiszellen, welche keine Wurzelhaare bilden werden Atrichoblasten genannt. Je nach Pflanzenart und Umweltbedingungen wechseln sich Trichoblasten und Atrichoblasten ab. Bei *Triticum aestivum*, dem Objekt der hier beschriebenen Untersuchungen, bildet jede Rhizodermiszelle ein Wurzelhaar aus, es gibt keine Atrichoblasten.

Im Inneren der Wurzel liegt der **Zentralzylinder**. Seine äußerste, an die Endodermis angrenzende Schicht ist der **Perizykel**. Bei den Samenpflanzen gehen aus diesem meist ein-, manchmal auch mehrschichtigen Gewebe die Seitenwurzeln und beim sekundären Dickenwachstum das Periderm, ein tertiäres Abschlussgewebe, hervor. (Strasburger *et al.*, 1983) Im Grundgewebe des Zentralzylinders liegen radial angeordnet abwechselnd die Leitgefäße des **Xylem** und des **Phloem**. Bei den meisten Wurzeln bilden die Leitgewebe einen kompakten Zylinder (markfreier Zentralzylinder). Die Zentralzylinder der Monocotylen sind meist pentarch (mit fünf Leitgefäßbündeln) bis polyarch und oft als Hohlzylinder in einem auffälligen Kreis rings um ein Markgewebe angeordnet. Manchmal kommt auch ein großes zentrales Gefäß vor. (Kutschera, 1960; Nultsch, 2001; Raven *et al.*, 2006; Strasburger *et al.*, 1983) Auf Abb. 2 sind die Gewebe einer primären Weizenwurzel schematisch dargestellt.

1.1.3. Sekundäres Dickenwachstum

Etwa gleichzeitig mit der Sprossachse beginnt auch die Wurzel der Gymnospermen und Dicotyledonen ihr sekundäres Dickenwachstum. Das Kambium entsteht durch Zellteilungen in den parenchymatischen Gewebestreifen, welche Xylem und Phloem voneinander trennen. Außerhalb der Xylemstrahlen treffen die Kambiumstreifen auf die Zellen des Perizykels (auch Perikambium genannt), welche sich ebenfalls zu teilen beginnen. So entsteht ein geschlossener Kambiumzylinder mit einem ungefähr sternförmigen Querschnitt. (Nultsch, 2001; Strasburger *et al.*, 1983)

Wie bei der Sprossachse erzeugt auch das Kambium der Wurzel nach innen Xylem und nach außen Phloem. Durch anfangs verstärkte Xylemproduktion verliert der Kambiummantel seine sternförmige Gestalt und wird zu einem Kambiumring. (Nultsch, 2001) Xylem und Phloem werden von breiteren oder schmälere Markstrahlen aus Parenchymzellen durchzogen (Raven *et al.*, 2006).

Beim sekundären Dickenwachstum werden die Epidermis und der Cortex einschließlich der Endodermis zerrissen und schließlich abgestoßen (Fahn, 1982; Raven *et al.*, 2006). Als tertiäres Abschlussgewebe wird vom Perikambium ein mehrschichtiges Periderm gebildet, dessen Zellen verkorken (Nultsch, 2001).

Ein sekundäres Dickenwachstum der Wurzel gibt es bei monocotylen Pflanzen - anders als bei dicotylen - nicht.

1.2. Wurzelhaare

Wurzelhaare sind schlauchförmige Ausstülpungen der Rhizodermiszellen (Sievers, 1963). Sie werden von den meisten Gefäßpflanzen ausgebildet (Schwarz, 1883), ihre Anzahl (und ihre Ausbildung) ist aber je nach Pflanzenart, Bodendurchlüftung, Wasser- und Nährstoffgehalt des Bodens sehr unterschiedlich. Besonders auf nassen Standorten begnügen sich manche Pflanzen mit schwachen, besonders dünnwandigen Ausbuchtungen der Absorptionszellen anstatt ausgeprägter Wurzelhaare. Bei einigen Arten wachsen die Wurzeln genetisch bedingt haarlos, wie z.B. bei der Sumpfdotterblume (*Caltha palustris*), der Weißen Seerose (*Nymphaea alba*) und der Kleinen Wasserlinse (*Lemna minor*). (Kutschera, 1960) Diese Pflanzen haben an ihrem natürlichen Standort reichlich Wasser zur Verfügung. Aber auch bei Pflanzen, deren oberirdische Teile keine sehr intensive Wasserverdunstung aufweisen, wie z.B. Coniferen mit lederartigen Blättern wie *Picea abies*, *Pinus silvestris*, *Thuja orientalis* und *Thuja occidentalis*, werden keine Wurzelhaare ausgebildet. (Goebel, 1933) Bei einigen Wasserpflanzen, wie bei der Gelben Teichrose (*Nuphar luteum*) und dem Wasserschieferling (*Cicuta virosa*), entwickeln die Wurzeln in der Erde Wurzelhaare, im Wasser jedoch keine. (Kutschera, 1960) Gräser haben im Allgemeinen vergleichsweise mehr und längere Wurzelhaare als andere Gefäßpflanzen (Dittmer, 1949).

Im Allgemeinen haben Wurzelhaare eine kurze Lebensdauer. Sie gehen meist genauso wie die wurzelhaarfreien Rhizodermiszellen nach wenigen Tagen zugrunde. So sind oft nur die jüngsten Wurzelenden bis wenige Zentimeter hinter der Wurzelspitze mit Wurzelhaaren besetzt. (Kutschera, 1960) Manche Pflanzenarten jedoch können ihre Wurzelhaare länger erhalten. So fand Dittmer (1937) bei der Untersuchung einer Roggenpflanze (*Secale cereale*) vier Monate alte lebende Wurzelhaare. Er beschrieb eine durchschnittliche Gesamtlänge der Wurzelhaare von 6.603,86 Meilen (also über 10.000 km) pro Pflanze. Bei *Drosera* und *Dionaea* bleiben die Wurzelhaare sogar im abgestorbenen Zustand erhalten (Adlassnig *et al.*, 2005).

1.2.1. Aufbau

Wurzelhaare haben einen Durchmesser von 5 μm bis 17 μm (Dittmer, 1949) und werden zwischen 0,1 und 8 mm (Strasburger *et al.*, 1983), oder gar bis zu 15 mm (Adlassnig *et al.*, 2005) lang. Sie können in drei Zonen eingeteilt werden: *Tip zone*, *Zone of vacuolation* und *Foot*

zone (siehe Abb. 4). Sowohl das Plasma als auch das Plasmalemma besitzen in den verschiedenen Zonen unterschiedliche Strukturen. (Volkman, 1984)

1.2.1.1. Apikalzone (*Clear zone*)

In wachsenden Wurzelhaaren füllt eine Zone aus Cytoplasma die äußerste Spitze, wo keine Plasmaströmung stattfindet. Die hier vorkommenden kleinen Vesikel führen meist nur ungerichtete Brown'sche Bewegung aus.

Im Gegensatz zum restlichen Plasma des Wurzelhaares, wo sie in außerordentlich großer Anzahl anzutreffen sind, gibt es in der Apikalzone keine Dictyosomen, jedoch vermehrt (sekretorische) Golgi-Vesikel. Diese wandern vom entfernteren Plasma in Richtung Wurzelhaarspitze, wo sie mit der Plasmamembran verschmelzen. Diese Verschmelzung findet nur hier in der äußersten Wurzelhaarspitze statt, wo auch das alleinige Wachstum der Zelle vonstatten geht. (Sievers, 1963) In ausgewachsenen Wurzelhaaren ist keine *Clear zone* erkennbar, und sekretorische Vesikel fehlen (Galway *et al.*, 1997).

Die Aufrechterhaltung der *Clear zone* geschieht durch eine lokal stark erhöhte Ca^{2+} -Konzentration. Die Plasmaströmung wird durch Aktinfilamente gesteuert, die Positionierung des Zellkerns geschieht durch Mikrotubuli. Da Calcium F-Aktin fragmentiert und Mikrotubuli depolymerisiert, verhindert es das Vordringen des Cytoskeletts in die Apikalzone und unterbindet so die Plasmaströmung. Dadurch wird die *Clear zone* „freigehalten“ und die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran ermöglicht. (Gilroy & Jones, 2000)

1.2.1.2. Subapikalzone

Die an die *Clear zone* anschließende Subapikalzone ist reich an Organellen, welche sich in verkehrter Springbrunnenströmung (*Reverse fountain streaming*) an den Außenseiten der Zelle in Richtung Spitze, und vor der *Clear zone* in der Mitte in einem gemeinsamen Strang wieder zurück bewegen (siehe Abb. 3). Im basalen Zellbereich gelangen die Organellen wieder an die Zellwand und bewegen sich entlang dieser erneut in Richtung Wurzelhaarspitze.

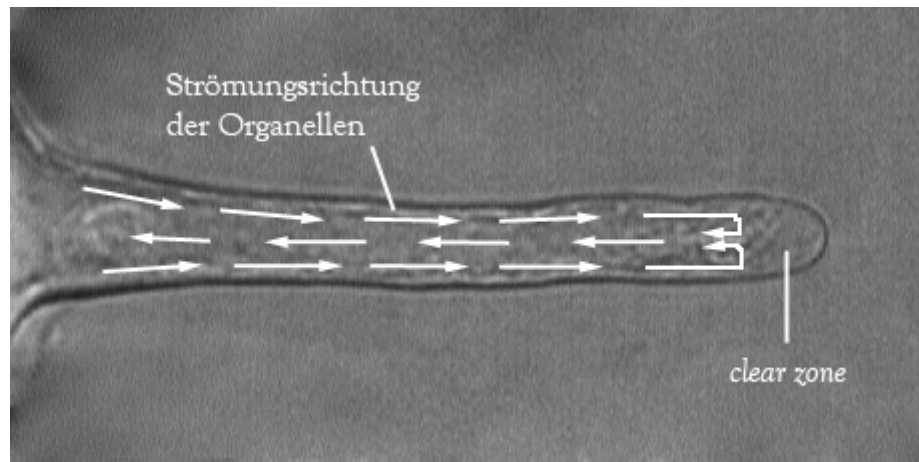


Abb. 3: Verkehrte Springbrunnenströmung (Reverse fountain streaming) in einem Wurzelhaar von *Triticum aestivum*

Bei wachsenden Wurzelhaaren wird der Zellkern von Mikrotubuli in der Subapikalzone gehalten. In Wurzelhaaren, in welchen der Zellkern sich nicht hier befindet, findet auch kein Wachstum mehr statt. (Sato *et al.*, 1995)

Apikalzone und Subapikalzone werden als *Tip zone* zusammengefasst. Diese hebt sich durch die Abwesenheit einer Vakuole von den anderen Wurzelhaarzonen ab. Zwischen den beiden Zonen findet sich ein Bereich mit glattem und rauhem Endoplasmatischem Reticulum. (Galway *et al.*, 1997)

1.2.1.3. *Vacuolation zone*

Bis unter seine Spitze ist das Wurzelhaar von einer großen zentralen Vakuole erfüllt. Hier strömt das Cytoplasma nur als dünner Plasmawandbelag entlang von Mikrofilamenten, welche in deutlichen Bündeln und Strängen parallel zur Längsachse des Wurzelhaares verlaufen. (Galway *et al.*, 1997)

1.2.1.4. *Foot zone*

Diese Zone ist die Basis des Wurzelhaares nahe der Rhizodermis. Sie ist ebenfalls ganz von der Vakuole erfüllt; der Plasmawandbelag enthält Plastiden.

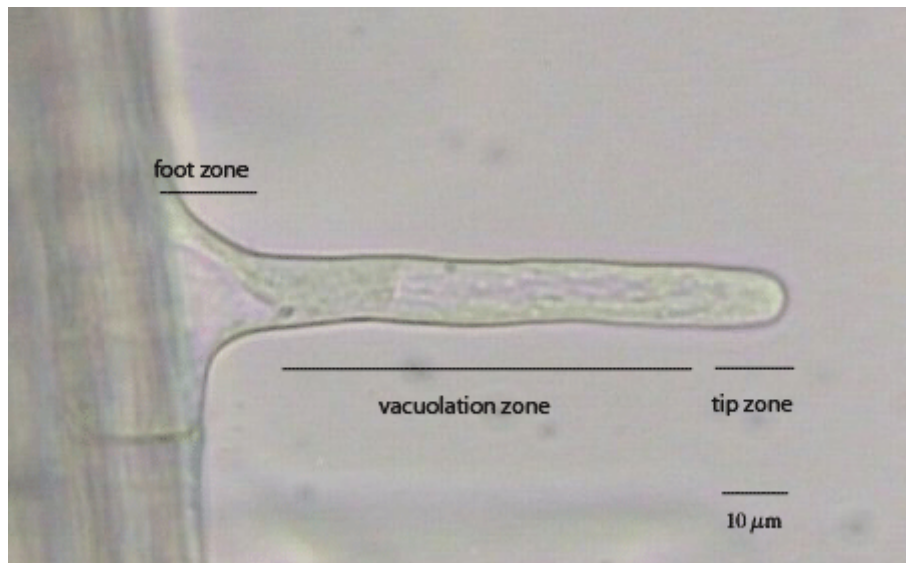


Abb. 4: Zonen eines Wurzelhaares

1.2.2. Funktion

Wurzelhaare vergrößern die Wurzeloberfläche sehr stark und erhöhen dadurch die Wasser- und Mineralstoffaufnahme aus dem Substrat. Dabei erfolgt die Mineralstoffaufnahme vermehrt an der Wurzelhaarspitze, während das Wasser stärker in der *Foot zone* eintritt. Die Zonen der aktivsten Mineralstoff- und Wasseraufnahme unterscheiden sich hingegen je nach Pflanzenart, Umwelteinflüssen und -veränderungen und sind daher nicht immer in gleicher Verteilung anzutreffen. (Kutschera, 1960)

Eine Untersuchung von Dittmer (1937) ergab eine Wurzeloberfläche (ohne Wurzelhaare) von 237 m^2 und eine Wurzelhaaroberfläche von 402 m^2 auf einer einzigen Roggenpflanze. Demnach wurde die Oberfläche der Wurzeln dieser Pflanze von den 14,3 Milliarden lebenden Wurzelhaaren fast verdreifacht. Laut Kutschera (1960) und Strasburger (1982) ist durch Wurzelhaare sogar eine Vergrößerung der Wurzeloberfläche auf das Zwölfwache möglich.

Wurzelhaare tragen ebenfalls zur stabilen Verankerung der Pflanze im Boden bei. Sie wachsen erst senkrecht zur Wurzeloberfläche aus, bis sie an ein Bodenpartikel treffen, welches sie dann eng umwachsen. (Kutschera, 1960)

1.2.3. Entstehung

Die Entstehung eines Wurzelhaares geschieht in mehreren Schritten: In der Teilungszone wird festgelegt, ob eine Rhizodermiszelle ein Wurzelhaar ausbilden wird oder nicht. Danach beginnt das Wurzelhaarwachstum mit der Bildung eines *Bulge* (engl. für Wölbung, Beule), aus dem im darauffolgenden Schritt durch das rasche und polare Spitzenwachstum das Wurzelhaar entsteht.

1.2.3.1. Trichoblast oder Atrichoblast

Die Entscheidung, ob eine Rhizodermiszelle ein Wurzelhaar ausbilden wird oder nicht, fällt schon früh in der Zellentwicklung. Bei manchen Pflanzen (wie z.B. bei *Arabidopsis*) ist die räumliche Anordnung der Zellen zueinander ausschlaggebend (diese wird durch interzelluläre Kommunikation „festgestellt“), bei anderen Arten fällt die Entscheidung schon bei der ungleichen Zellteilung, wobei aus der kleineren Zelle ein Trichoblast und der größeren ein Atrichoblast wird. (Gilroy & Jones, 2000) Rhizodermiszellen, die später ein Wurzelhaar ausbilden werden, besitzen ein auffällig dichteres Cytoplasma als Atrichoblasten (Volkman & Peters, 1995).

1.2.3.2. *Bulge* - Bildung

Ist die Zellteilung abgeschlossen und befindet sich die Zelle im Übergang zur Differenzierungszone, beginnt in der apikalen Hälfte des Trichoblasten (Volkman & Peters, 1995) in Begleitung einer lokalen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Dolan, 2001) die Ausbildung eines sogenannten *Bulge* (siehe Abb. 5 + 6) noch bevor die Rhizodermiszelle ihre endgültige Länge erreicht hat (Dolan *et al.*, 1994). Gleichzeitig wird der pH-Wert der Zellwand lokal von 5 auf 4,5 gesenkt. Dadurch wird zum einen Ca^{2+} , welches die Zellwand stabilisiert, durch H^+ verdrängt, zum anderen haben in die Zellwand eingebaute, zellwandlockernde Proteine bei diesem pH-Wert ihr Optimum und können diese so sekundär verdünnen (Bibikova & Gilroy, 2003; Dolan *et al.*, 1994). Durch die entstandene Zellwandverdünnung kann sich an dieser Stelle ein *Bulge* ausbilden.

Das Wachstum des *Bulge* ist von F-Aktin unabhängig und wird womöglich durch lokale enzymatische Aktivität mitgesteuert (Čiamparová *et al.*, 2003). Es ist im Gegenteil zum anschließenden Spitzenwachstum langsam und diffus; der *Bulge* wächst mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,2 bis 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Dolan *et al.*, 1994).

Nachdem die Rhizodermiszelle ihr Längenwachstum beendet und sich der *Bulge* gebildet hat, findet eine kurze aber deutliche Wachstumspause statt, in welcher sich wahrscheinlich die Zellstrukturen neu organisieren, bevor der nächste Schritt, das Spitzenwachstum beginnt. (Dolan *et al.*, 1994)



Abb. 5 + 6: Bulges in verschiedenen Stadien

1.2.3.3. Spitzenwachstum (*Tip growth*)

Im Gegensatz zu den meisten pflanzlichen Zellen zeigen Wurzelhaare unipolares Wachstum. Dabei dehnt sich die Zelle nicht in alle Richtungen gleichmäßig aus, sondern wächst nur an einer Stelle, der Zellspitze, weswegen diese Art von Wachstum auch Spitzenwachstum (engl. *Tip growth*) genannt wird.

Das schnelle und polare Spitzenwachstum des Wurzelhaares ist im Gegensatz zur *Bulge*-Bildung von F-Aktin abhängig und kann bei dessen Zerstörung durch Latrunculin B nicht stattfinden (Čiamparová *et al.*, 2003).

Beim Spitzenwachstum wird vom Golgi-Apparat gebildetes Zellwandmaterial durch Golgi-Vesikel entlang von Aktinfilamenten zur Wurzelhaarspitze transportiert und dort an die Zellwand abgegeben. Dies geschieht durch Exocytose, bei der die von den Zisternenrändern der Dictyosomen abgeschnürten Golgi-Vesikel in die Apikalzone wandern und am Zellapex mit der Plasmamembran fusionieren. Dadurch vergrößern sie einerseits die Plasmamembran selbst, andererseits geben sie ihren Inhalt, welcher hauptsächlich aus Hemizellulosen und Pektin besteht, nach außen ab und bilden so die Primärwand des Wurzelhaares. (Dolan, 2001; Schröter & Sievers, 1971)

Der Zellkern wandert während des Wachstums in das Wurzelhaar hinein (Galway *et al.*, 1997; Sievers, 1963) und wird, solange das Wurzelhaar wächst, von Mikrotubulibündeln in mehr oder weniger gleichbleibendem Abstand von der Wurzelhaarspitze in der Subapikalzone gehalten (Sato *et al.*, 1995).

Dem Turgordruck kommt beim Spitzenwachstum eine besondere Bedeutung zu. Die Primärwand im Spitzenbereich hat eine geringe Festigkeit und eine hohe Plastizität (Sievers, 1963), die Seitenwände des Wurzelhaarschlauches jedoch sind durch die später eingelagerte Zellulose fest und in ihrer Form unveränderlich. Durch den Turgordruck der Zelle wird nun die elastische Wurzelhaarspitze immer weiter ausgedehnt, während gleichzeitig neues Zellwandmaterial und Plasmalemma eingebaut wird. Zum Spitzenwachstum ist der Turgordruck also unbedingt erforderlich.

Spitzenwachstum kommt universell bei fadenförmigen Zellen wie z.B. Pollenschläuchen, Moosprotonemata und der coenocytischen Alge *Vaucheria* vor. Ähnlich, aber im Detail anders ist das Wachstum von Axonen und Pilzhypen (Read *et al.*, 2003). Spitzenwachsende Zellen sind in der Zellphysiologie beliebte Objekte zur Untersuchung des Zellwachstums, da man annimmt, dass alle Vorgänge, die in der Spitze passieren, in direktem oder indirektem Zusammenhang mit dem Wachstum stehen (Derksen & Emons, 1990).

1.3. Zellwand

Pflanzliche Zellen besitzen im Gegensatz zu tierischen Zellen eine Zellwand, welche den Protoplasten umgibt und ihn vor äußeren Einflüssen schützt. (Raven *et al.*, 2006) Sie ist ein Abcheidungsprodukt der lebenden Zellen, steht aber über die Plasmamembran hinweg in ständiger Wechselwirkung mit dem Cytoplasma (Strasburger *et al.*, 2002). Da die Zellwand starr ist, begrenzt sie Größe und Form der Pflanzelle und hält dem Turgordruck der Vakuole stand. Durch den Aufbau des osmotischen Druckes, welcher durch die Zellwand ermöglicht wird, kann die Pflanzelle Wasser von außen aufnehmen, wird jedoch gleichzeitig daran gehindert, zu viel aufzunehmen und zu platzen. (Raven *et al.*, 2006)

1.3.1. Aufbau

Die pflanzliche Zellwand ist mehrschichtig aufgebaut. Sie besteht aus Mittellamelle, primärer und zumeist auch sekundärer Zellwand. Die äußerste Schicht der Zellwand ist die Mittellamelle. Sie wird bereits bei der Mitose von Golgi-Vesikeln gebildet (Ude & Koch, 1994). An diese lagert der Protoplast während seines Wachstums die Primärwand von innen an. (Raven *et al.*, 2006)

Die chemische Zusammensetzung der Zellwände ist im Pflanzenreich nicht einheitlich. So gibt es zum Beispiel bei den Gräsern massive Abweichungen von der typischen Dikotylenzellwand, die auch bei den meisten anderen Monokotylen und den Gymnospermen vorkommt. (Schopfer & Brennicke, 2006)

Den Großteil der Zellwand bilden Kohlenhydrate. In einer Grundsubstanz (Matrix) sind Gerüstsubstanzen (Zellulose) eingelagert (Ude & Koch, 1994). Die Matrix bilden Pektine und Hemizellulosen, welche vom Endomembransystem produziert werden. Zellulosefibrillen, welche in der Plasmamembran aufgebaut werden, sind netzwerkartig in die Matrix eingebettet (Dolan, 2001).

1.3.1.1. Pektine

Pektine sind Polymere aus α -1-4-glykosidisch verknüpften Galakturonsäureeinheiten als Grundbaustein, deren Carboxylgruppen in Pflanzen meist mit Methylalkohol verestert sind. Sie sind verzweigt und stark hydrophil, wodurch sie für die Wasseraufnahme in die Zellwand

(Quellung) und damit für deren plastische Dehnbarkeit verantwortlich sind. (Raven *et al.*, 2006)

Die Pektine bilden eine Zickzackstruktur, in deren Zwischenräume sich Ca^{2+} -Ionen einlagern und die Moleküle so in einem sogenannten *Eggbox*-Muster zusammenhalten. Bei Senkung des pH-Wertes werden die Ca^{2+} -Ionen durch H^+ -Ionen ersetzt und es kommt zur Auflösung der Verbindung zwischen den Pektinmolekülen. Dadurch wird die Zellwand noch besser verformbar. (Volgger, 2004)

Pektine stellen den Hauptanteil an der Mittellamelle dar. Sie sind auch in der Primärwand von hoher Bedeutung, können jedoch bei später gebildeten Wandschichten (Sekundärwand) völlig fehlen. (Raven *et al.*, 2006)

1.3.1.2. Hemizellulosen

Je nach Zelltyp und Pflanzengruppe findet man in den Zellwänden verschiedene Hemizellulosen. Diese sind heteropolymere Polysaccharide, ähnlich der Zellulose, aber stärker löslich und weniger geordnet (amorph). Sie bestehen aus Ketten von Glucose- oder anderen Hexoseeinheiten und Seitenketten verschiedener Pentosen, wie z.B. Arabinose.

Hemizellulosen bilden zusammen mit den Pektinen die Matrix der primären Zellwand. In ihr sind weiters Strukturproteine (Glykoproteine) eingelagert. Da sie über Wasserstoffbrücken eng an die Zellulosemikrofibrillen gebunden sind und diese miteinander vernetzen, spielen Hemizellulosen auch eine wichtige Rolle in der Strukturbildung der Zellwand. (Raven *et al.*, 2006)

1.3.1.3. Zellulose

Eingebettet in die Matrix der Zellwand ist Zellulose der Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände und für ihre Struktur maßgeblich verantwortlich.

Zellulose ist ein unverzweigtes Polymer aus bis zu 10.000 β -D-Glucose-Monomeren, welche durch 1-4-Bindungen miteinander verknüpft sind. Die langen Zellulosemoleküle liegen parallel zu Mikrofibrillen angeordnet, innerhalb welcher es kristalline Bereiche (Micellen) und weniger geordnete Bereiche gibt. Mehrere Mikrofibrillen sind zu Makrofibrillen gebündelt. (Raven *et al.*, 2006)

Die Zellulosefibrillen sind durch Wasserstoffbrücken mit den Hemizellulosen verbunden und werden so untereinander vernetzt. Sie verleihen der Zellwand extreme Festigkeit.

1.3.1.4. Proteine

Neben Pektinen und Kohlenhydraten enthält die pflanzliche Zellwand auch Proteine. Ihr Anteil liegt bei Dikotylen in der Größenordnung von 1 - 15 %. Sie können als Struktur- oder Enzymproteine (wie z.B. Cellulasen und Pektinasen) vorliegen. Eines der Strukturproteine ist das Extensin. Es besteht zu einem Drittel aus Polypeptidketten und ist meist reich an Lysin, wodurch es einen basischen Charakter erhält. Seine Ketten können untereinander vernetzt sein. Bislang wurde keine kovalente Bindung der Extensinmoleküle an die Zelluloseketten nachgewiesen, daher nimmt man an, dass die untereinander vernetzten Extensinmoleküle ein selbstständiges Gerüst bilden, das in das Gerüst der Zellulosefibrillen räumlich integriert ist. (Nultsch, 2001)

1.3.1.5. Andere Substanzen

In verholzenden Zellwänden wird weiters Lignin eingelagert. In Zellwänden der äußeren Pflanzengewebe findet man häufig fettähnliche Substanzen wie Cutin, Suberin und Wachse, welche den Wasserverlust der Pflanze stark herabsetzen, und Tannine, die der Zelle Schutz vor Pilzen und Fraßfeinden bieten. (Clowes & Juniper, 1968; Raven *et al.*, 2006)

1.3.2. Entstehung der Zellwand

Die pflanzliche Zellwand wird vom Protoplasten gebildet. Diese extrazelluläre Struktur wird schichtweise vom Plasmalemma her aufgebaut.

1.3.2.1. Mittellamelle

Die zuerst gebildete Schicht der Zellwand ist die Mittellamelle. Sie wird bereits bei der Zellteilung durch Verschmelzung von Golgi-Vesikeln als sogenannte Zellplatte gebildet und verbindet die Primärwände benachbarter Zellen miteinander. Auf sie werden im Folgenden die weiteren Zellwandschichten nach innen aufgelagert.

1.3.2.2. Primärwand

Die Primärwand wird gebildet, solange sich die Zelle im Wachstum befindet und muss daher dehnbar sein. Sie wird auf die Mittellamelle aufgelagert und ist mit primären Tüpfelfeldern

durchsetzt, über welche die benachbarten Protoplasten durch Cytoplasmastränge (Plasmodesmata) miteinander verbunden sind. Sie besteht hauptsächlich aus Pektinen und Hemizellulose, welche vom Golgi-Apparat gebildet werden. An den Rändern der Dictyosomen werden Golgi-Vesikel, gefüllt mit Zellwandmaterial, abgeschnürt und entlang von Aktinfilamenten zur Plasmamembran transportiert. Durch Exocytose geben sie ihren Inhalt an die Außenseite der Plasmamembran ab und verschmelzen mit dieser. Der Zelluloseanteil der Primärwand ist gering. Bildet die Zellulose ein lockeres, unregelmäßiges Netzwerk (Streutextur) aus wenig polymerisierten Zellulosefibrillen, ist die Primärwand in alle Richtungen gut verformbar und dehnbar. Werden die Zellulosefibrillen in einer Paralleltextrur angelegt, kann die Zelle nur noch entlang einer Achse senkrecht oder parallel zur Fibrillenorientierung wachsen. So legt die Zellwand die endgültige Form der Zelle fest.

1.3.2.3. Sekundärwand

Ist das Wachstum der Zelle abgeschlossen und muss sich die Primärwand nicht mehr vergrößern, bilden viele Pflanzenzellen innerhalb der Primärwand eine Sekundärwand. Diese ist starrer als die Primärwand, besteht hauptsächlich aus Hemizellulosen und hochpolymerisierter Zellulose; Pektine können völlig fehlen, stattdessen wird Lignin eingelagert. Hier findet man im Normalfall auch keine Struktur- und Enzymproteine. Innerhalb der primären Tüpfelfelder wird keine Sekundärwand abgelagert, diese Stellen nennt man Tüpfel. Die Funktion der Sekundärwand, vor allem die Festigung des Gewebes, wird auch nach Absterben des Protoplasten erfüllt.

Im Gegensatz zu den Matrixkomponenten werden Zellulosefibrillen direkt in der Plasmamembran gebildet. Dort sind Zellulosesynthase-Komplexe eingelagert. Diese bestehen aus je sechs rosettenförmig angeordneten Proteinpartikeln, welche das Plasmalemma durchspannen. Von der Innenseite der Plasmamembran gelangen Uridindiphosphat (UDP)-Glucose-Moleküle an den Enzymkomplex, welcher sie unter Abspaltung von UDP zu mehreren parallelen Zellulosemolekülen verknüpft und nach außen schiebt. Dort kristallisieren mehrere Zellulosemoleküle sofort zu Mikrofibrillen, welche dann parallel zur Plasmamembran außen aufliegen. (Raven *et al.*, 2006) Die Zellulosesynthase-Komplexe sind in der Plasmamembran beweglich und ziehen in ihr - entlang corticaler Mikrotubuli, welche auf der Innenseite der Plasmamembran liegen - ihre Bahnen. So kann der Protoplast die Fibrillentextrur der entstehenden Zellwand steuern. (Paredes *et al.*, 2006)

Eine jüngere Studie von Emons (2007) zweifelt dieses Modell jedoch an. Sie zeigte, dass corticale Mikrotubuli und entstehende Zellulose-Mikrofibrillen oft nicht parallel angeordnet sind, und dass die Zahl der Zellulose-Mikrofibrillen diejenige der corticalen Mikrotubuli bei weitem übersteigt. Es ist also eine Organisation der Zellulose-Mikrofibrillen auch ohne corticale Mikrotubuli möglich. Emons' neues Modell berechnet sie anhand der Dichte der aktiven Zellulosesynthesen in der Plasmamembran, dem Abstand zwischen den eingebauten Mikrofibrillen und der Geometrie der Zelle. (Emons, 2007)

1.3.3. Zellwand der Wurzelhaare

Wurzelhaare wachsen unipolar, die Zellwand wird nur an der wachsenden Spitze der Zelle gebildet. Die Zellwand der Wurzelhaare ist sehr dünn. An der Wurzelhaarspitze ist sie als Primärwand ausgebildet - sie besteht vorwiegend aus Pektin, ihr Zelluloseanteil ist mit weniger als 5 % sehr gering und besitzt Streutextur. Dadurch weist die Zellwand an der Spitze der Zelle eine geringe Festigkeit, aber hohe Plastizität auf, was ein Wachstum der Zelle in diese Richtung erlaubt. Seitlich, an den Flanken des Wurzelhaares und zur *Foot zone* hin, werden vermehrt Zellulosefibrillen parallel zur Wachstumsrichtung (axial orientiert) in die Zellwand eingelagert. Diese Sekundärwand kann sich nicht mehr ausdehnen und die Zelle kann seitlich nicht wachsen. (Sievers, 1963)

1.4. Plasmamembran

Die Plasmamembran (auch Plasmalemma genannt) ist die äußere Begrenzung des Protoplasten und liegt in Pflanzenzellen eng der Zellwand an. Bei höheren Pflanzen sind die Protoplasten benachbarter Zellen durch Plasmodesmen in ihren Plasmamembranen miteinander verbunden. (Nultsch, 2001)

1.4.1. Bau der Membran

Die Grundstruktur der Plasmamembran - wie die der meisten Biomembranen - bildet eine hauptsächlich aus Phospholipiden und Steroiden bestehende Lipid-Doppelschicht (engl. *Bilayer*), in welche Proteine eingebettet sind. Diese Membranproteine können verschiedenste Funktionen erfüllen. Viele fungieren als Rezeptoren, andere dienen der Aufnahme wichtiger Substanzen in die Zelle. Transmembranproteine (integrale Proteine) durchziehen den *Bilayer*, periphere Proteine liegen nur außen an der Membran an. (Nultsch, 2001; Raven *et al.*, 2006)

Transmembranproteine liegen im überwiegenden Teil als Glykoproteine vor, das heißt, an ihre extrazellulären Proteinbereiche sind Oligosaccharide angeknüpft. Die Oberflächen aller eukaryotischen Zellen sind mit einer Schicht dieser Oligosaccharide überzogen. Sie dienen unter anderem der Zellerkennung und dem Schutz der Membran vor äußeren Einflüssen. (Ude & Koch, 1994)

Die beiden Seiten der Plasmamembran sind asymmetrisch aufgebaut. Die Plasmamembran wird als *semi-fluid* bezeichnet, da sich die Proteine in ihr lateral bewegen können. Die Beziehungen zwischen den Membranproteinen und den Elementen des Cytoskeletts spielen eine wichtige Rolle. (Raven *et al.*, 2006; Ude & Koch, 1994)

1.4.2. Membrantransport

Die Plasmamembran grenzt die lebende Zelle nach außen ab und regelt den Stofftransport zwischen der Zelle und ihrer Umgebung. Der Stofftransport geschieht - je nach Substanz - auf unterschiedlichen Wegen, welche im Folgenden beschrieben werden. (Nultsch, 2001)

1.4.2.1. Freie Diffusion

Die Lipidschicht ist für die meisten Moleküle und Ionen unpassierbar. Kleine und unpolare Moleküle (wie Sauerstoff und Kohlendioxid) sowie kleine, polare, aber ungeladene Moleküle (z.B. Wasser, Ammoniak) können jedoch frei durch sie diffundieren. (Raven *et al.*, 2006; Ude & Koch, 1994) Dies geschieht immer in Richtung des Konzentrationsgefälles bzw. des elektrochemischen Gradienten. Diffusion benötigt folglich keine Energie und wird daher als passiver Transport bezeichnet. Der Durchtritt der Substanzen erfolgt nicht durch Poren im engeren Sinne, sondern durch kurzlebige Störstellen, die infolge der thermischen Bewegung der Lipoidmoleküle in dem halbflüssigen Lipoidfilm zwangsläufig entstehen. Auch die Lipidlöslichkeit einer Substanz spielt eine wesentliche Rolle bei der Durchlässigkeit, da hydrophobe Substanzen die Lipidschicht leichter passieren können als hydrophile. (Nultsch, 2001) Die meisten der von Zellen benötigten Substanzen sind jedoch groß und/oder geladen und können nur mit Hilfe von Transportproteinen selektiv durch die Plasmaembran transportiert werden (Raven *et al.*, 2006).

1.4.2.2. Transport durch Membranproteine

Die in die Lipid-Doppelschicht eingelagerten Proteine machen die Membran zur selektiv permeablen Barriere (Ude & Koch, 1994), da sie Substanzen selektiv transportieren können. Je nach dem mit ihm verbundenen Energieaufwand wird der Transport aktiv oder passiv genannt. Passiver Transport kann nur entlang eines Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten erfolgen. Dazu gehört die oben beschriebene freie Diffusion gelöster Teilchen durch die Lipid-Doppelschicht und die erleichterte Diffusion durch Kanäle und *Carrier*-Moleküle. (Raven *et al.*, 2006; Strasburger *et al.*, 2002) Der Transport von gelösten Molekülen entgegen ihrem Konzentrations- bzw. elektrochemischen Gradienten erfordert Energie. Man bezeichnet diese Art von Transport daher als aktiv. (Raven *et al.*, 2006)

Kanal-Proteine bilden wassergefüllte Poren, die im geöffneten Zustand die Passage spezifischer gelöster Substanzen erlauben (in der Regel anorganische Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^-). Der Ionenfluss wird durch Öffnen und Schließen der Kanäle reguliert. In der Plasmamembran und im Tonoplasten sind auch spezielle Wasserkanal-Proteine eingelagert. Diese sogenannten **Aquaporine** können die Diffusion von Wasser durch die Membranen beschleunigen, was für die Erhaltung des osmotischen Gleichgewichts besonders wichtig ist.

Kanalproteine sind selektiv und Uniporter, das heißt sie können die Moleküle nur in eine Richtung durch die Membran transportieren. (Raven *et al.*, 2006)

Carrier-Proteine (Translokatoren) binden die zu transportierende gelöste Substanz und erfahren eine Konformationsänderung um die Substanz durch die Membran zu schleusen. Uniporter-Carrier, welche nur ein bestimmtes Molekül in eine Richtung durch die Membran transportieren können, verbrauchen beim Transport keine Energie. (Raven *et al.*, 2006) Andere Carrier vermitteln einen aktiven Cotransport, bei dem der Transport einer Substanz entgegen ihrem Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten an die erleichterte Diffusion einer anderen Substanz gekoppelt wird (Campbell, 1997). Bei Pflanzenzellen pumpt die H⁺-ATPase (=„Protonenpumpe“) Protonen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten aus der Zelle hinaus und generiert so einen Protonengradienten, welcher die Antriebskraft für alle protonengekoppelten Cotransportsysteme ist. Gemeinsam mit den durch Diffusion wieder eindringenden Protonen können andere Substanzen (auch neutrale) in die Zelle transportiert werden. (Raven *et al.*, 2006) Werden beide Moleküle in die selbe Richtung transportiert, nennt man das Transportprotein Symporter, findet der Transport in die entgegengesetzte Richtung statt, wird das Protein als Antiporter bezeichnet. (Raven *et al.*, 2006) Carrier sind zumeist hochselektiv für „ihr“ Substrat (Strasburger *et al.*, 2002).

Neben der H⁺-ATPase gibt es auch Ca²⁺-pumpende ATPasen in der Plasmamembran, welche Ca²⁺ aktiv aus dem Cytoplasma hinauspumpen. Eine niedrige Ca²⁺-Konzentration im Cytosol relativ zu den Organellen und zum Apoplasten ist für die Zelle von essenzieller Bedeutung, da Ca²⁺ ein wichtiger *Second messenger* bei der Signaltransduktion ist. Außer in der Plasmamembran wurden Ca²⁺-pumpende ATPasen auch in ER-Membranen und im Tonoplasten gefunden. (Briskin, 1990; Schopfer & Brennicke, 2006)

Die Anzahl der transportierten Ionen pro Protein und Sekunde ist bei Ionenpumpen relativ gering (weniger als 500). Carrier sind etwas schneller (500 - 10.000) und Kanäle transportieren 10.000 bis mehrere Millionen gelöste Teilchen pro Sekunde. (Raven *et al.*, 2006)

1.4.3. Membranfluss

Größere Moleküle wie Proteine und Polysaccharide können nicht durch Transportproteine durch die Plasmamembran geschleust werden. Diese Moleküle werden mit Hilfe von Vesikeln

transportiert; sackartigen Bläschen, die sich von der Membran abschnüren bzw. mit ihr verschmelzen. Anders als beim Membrantransport (Verlagerung von Stoffen durch Biomembranen hindurch) werden beim Vesikeltransport membranumhüllte Kompartimente transportiert. Daher spricht man hier von Membranfluss. (Nultsch, 2001; Strasburger *et al.*, 2002)

Vesikel werden in der Zelle mit Hilfe des Cytoskeletts und seiner Motorproteine transportiert und verschmelzen an ihrem Zielort mit anderen Kompartimenten. Sekretvesikel werden an der Trans-Golgi-Seite der Dictyosomen abgeschnürt und transportieren innerhalb der Zelle gebildete Substanzen (wie z.B. Zellwandmaterial) nach außen. Beim Kontakt der Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen diese miteinander, und der Inhalt der Vesikel wird an die Außenseite der Plasmamembran abgegeben. Die Vesikelhülle verschmilzt mit der Plasmamembran und wird ein Teil von ihr. Die zelluläre Sekretion über Vesikel nennt man **Exocytose**. Durch Exocytose können Makromoleküle und größere Substanzen durch die Zellmembran geschleust werden, ohne dass sich diese auch nur vorübergehend öffnen müsste. (Strasburger *et al.*, 2002) Da in Dictyosomen weder Lipide noch Proteine synthetisiert werden können, muss an der Cis-Seite der Dictyosomen ständig neues Membranmaterial vom ER nachgeliefert werden. (Strasburger *et al.*, 2002)

Vesikeltransport von der Außenseite der Plasmamembran in die Zelle hinein wird **Endocytose** genannt. Lange Zeit wurde angenommen, dass Endocytose in Pflanzenzellen aufgrund ihres hohen Turgordrucks nicht möglich wäre (Cram, 1980), doch inzwischen wurde dieser Vorgang auch bei Pflanzenzellen nachgewiesen. Dabei induziert das zu transportierende Partikel ein Einstülpfen der Plasmamembran und es entsteht ein Vesikel, welches das Partikel umschließt und sich nach innen von der Plasmamembran abschnürt. Die Vesikel können in der Zelle transportiert werden sowie mit anderen Zellorganellen verschmelzen und ihren Inhalt dort entleeren. (Strasburger *et al.*, 2002) Bei Aufnahme von Flüssigkeiten spricht man von Pinocytose, bei Nahrungspartikeln von Phagocytose (Campbell, 1997).

Bei spitzenwachsenden Zellen spielt die Endocytose eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Fläche der Plasmamembran. Da die Plasmamembran durch Exocytosevesikel, welche Zellwandmaterial nach außen abgeben und dabei mit der Plasmamembran verschmelzen,

vergrößert wird, muss in einem entsprechenden Maße durch Endocytose Plasmamembran wieder in die Zelle abgeschnürt werden.

Bei der Plasmolyse einer Zelle erfolgt die Reduktion ihrer Plasmamembranfläche ebenfalls durch endocytotisch abgeschnürte Vesikel. Diese osmotisch induzierte Endocytose wird auch **Osmocytose** genannt (Oparka, 1994).

Wird eine Substanz durch vesikulären Transport durch eine Zelle hindurchgeschleust, so spricht man von **Transcytose** (Ude & Koch, 1994).

1.5. Wasserhaushalt der Zelle

1.5.1. Wasserpotential

Wasser fließt immer in Richtung des niedrigeren Wasserpotentials. Dieses ist ein Maß für die potentielle Energie des Wassers. Dabei spielt es keine Rolle, wie dieses Potential zustande kommt. Das Wasserpotential der Zelle setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen:

$$(-)\Psi = (-)\Pi + (-)T + P$$

wobei Π das osmotische Potential der Zelle, T das Matrixpotential (im Gewebe meist vernachlässigbar) und P den Wand- und Gewebedruck wiedergeben. Der Wand- und Gewebedruck ist dem Turgordruck entgegengesetzt gleich, hat daher ein positives Vorzeichen. Das Wasserpotential der Zelle ist in der Gleichung formal negativ (theoretisch, da Kraft nicht negativ sein kann), um zu verdeutlichen, dass Kraft aufgewendet werden muss um Wasser in die Zelle zu bekommen. Daher wird auch von der Saugkraft oder Saugspannung der Zelle gesprochen. Das Wasserpotential entspricht einem Druck und wird daher in Pascal gemessen. (Raven *et al.*, 2006; Schopfer & Brennicke, 2006; Schulze *et al.*, 2002)

1.5.2. Diffusion und Osmose

Diffusion ist die Ausbreitung von Gasen bzw. gelösten Molekülen, bis eine gleichmäßige Verteilung in dem zur Verfügung stehenden Raum bzw. Lösungsmittel erreicht ist (Nultsch, 2001). Die Bewegung der einzelnen Moleküle oder Ionen ist dabei ungerichtet.

Diffusion von Wasser durch eine selektiv permeable Membran wie die Plasmamembran wird als **Osmose** bezeichnet. Der Wasserfluss erfolgt dabei immer von der Seite der niedrigeren Konzentration gelöster Stoffe (hypotonisches Medium) in Richtung der höheren Konzentration gelöster Stoffe (hypertonisches Medium) solange, bis ein Konzentrationsgleichgewicht auf den zwei Seiten der Membran entsteht oder bis ein entsprechender entgegengerichteter hydrostatischer Druck auftritt. Die Art und Größe der Moleküle spielt dabei keine entscheidende Rolle, entscheidend ist nur, wieviel gelöste Substanz das Wasser enthält, also die Gesamtkonzentration aller im Wasser gelöster Substanzen. Diese kann entweder durch die Osmolalität (mol osmotisch aktive Teilchen pro

kg Wasser) oder durch den osmotischen Druck (in MPa) angegeben werden (Schopfer & Brennicke, 2006).

1.5.3. Plasmolyse

Pflanzenzellen reichern in ihren Vakuolen hohe Konzentrationen an Salzen, Zuckern, organischen Säuren und Aminosäuren an. Dadurch nehmen die Zellen durch Osmose Wasser auf und dehnen sich aus, wodurch sie einen Druck auf die Zellwand ausüben. Die Zelle dehnt sich solange aus, bis die Zellwand diesem sogenannten Turgordruck einen gleich großen Widerstand entgegenrichtet. In diesem Zustand nennt man die Zelle turgeszent. (Raven *et al.*, 2006) Wie bereits erwähnt, ist der Turgordruck eine Voraussetzung für das Zellwachstum. Er kann nur aufrechterhalten werden, wenn sich die Zelle in einem hypotonischen Medium befindet. Wird die Zelle in ein isotonisches Medium (mit gleicher Konzentration wie die Zelle) überführt, lässt der Turgordruck der Vakuole nach. Da die Zelle in diesem Zustand weder turgeszent noch plasmolysiert ist, spricht man von Grenzplasmolyse oder Welkepunkt. In einem hypertonischen Medium diffundiert Wasser aus der Vakuole heraus, wodurch der Protoplast (samt Vakuole) schrumpft und sich von der Zellwand ablöst. Diesen Zustand nennt man Plasmolyse. Er ist reversibel: wird die Zelle wieder in ein hypotonisches Medium überführt, kommt es zur Deplasmolyse. Dabei diffundiert Wasser in die Zelle und der Turgordruck wird wiederhergestellt.

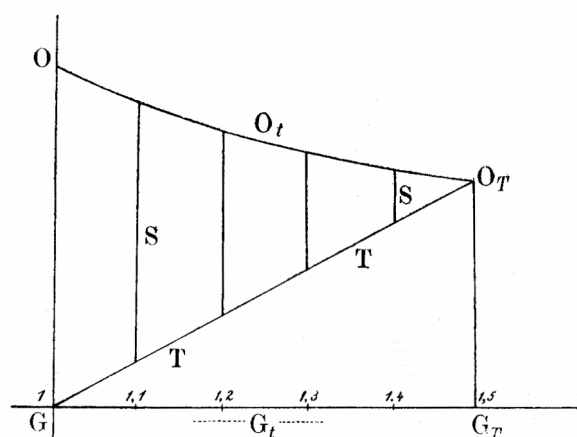


Abb. 7: Zustandsdiagramm der Zelle nach Höfler (1920)
 G = Grad der Turgordehnung, O = Osmotischer Wert der Zelle,
 T = Turgordruck, S = Saugkraft der Zelle

Das osmotische Zustandsdiagramm der Zelle (Höfler-Schema, siehe Abb. 7) zeigt den Zusammenhang von Turgordruck, osmotischem Wert, Saugkraft und Volumen von Pflanzenzellen. Wird das Wasserpotential der Außenlösung experimentell verringert, nimmt das Volumen des Protoplasten ab. Dadurch nimmt auch der Turgordruck T ab und der osmotische Wert der Zelle O nimmt leicht zu. Beim relativen Protoplastenvolumen 67 % ist die Zellwand voll entspannt ($T = 0$), es tritt Grenzplasmolyse ein. (Höfler, 1920) Jeder weitere Wasserentzug durch Plasmolyse führt zu einem entsprechenden Anstieg des osmotischen Werts (Schopfer & Brennicke, 2006).

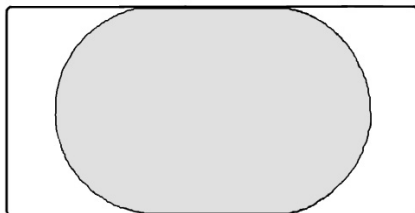
1.5.3.1. Grenzplasmolyse

Ist das Außenmedium dem Zellsaft gegenüber nur gering hypertonisch, löst sich der Protoplast nur leicht von der Zellwand, meist an Stellen, wo sich diese am stärksten krümmt (an den „Ecken“ der Zelle). Diesen Zustand nennt man Grenzplasmolyse. Sie wird häufig verwendet, um den osmotischen Wert einer Zelle zu ermitteln.

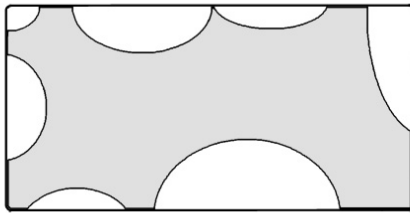
1.5.3.2. Plasmolyseformen

Plasmolyse bezeichnet die Abhebung des lebenden Protoplasten von der Zellwand unter dem Einfluss wasserentziehender Mittel. Die Form des plasmolysierten Protoplasten kann dabei unterschiedlich sein. Sie hängt vom Zelltyp, der Konzentration des Plasmolytikums und vom physiologischen Zustand (Wandhaftung, Viskosität, Alter, Verwundung, etc.) des Protoplasten ab. Man unterscheidet zwischen folgenden Formen der Plasmolyse (Oparka, 1994):

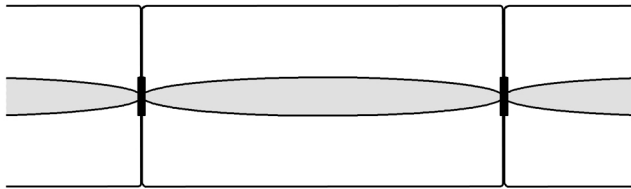
Konvexe Plasmolyse:



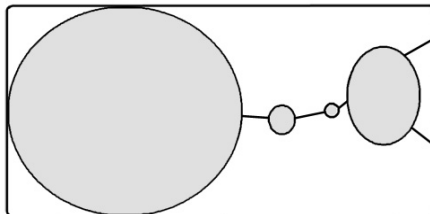
Löst sich der Protoplast in solcher Form von der Zellwand, deutet das auf eine geringe Viskosität des Plasmas oder eine schwache Wandhaftung hin. Anfangs zeigt der Protoplast meist die gleiche Form wie die Zelle, kugelt sich aber nach einigen Stunden so weit wie möglich ab. Dies kommt z.B. bei Wurzelhaaren in Mannitol vor.

Konkave Plasmolyse:

Diese Form der Plasmolyse wird auch Krampfplasmolyse genannt. Sie lässt auf hohe Protoplastviskosität oder starke Wandhaftung des Plasmas schließen. Dieser Typ tritt häufig bei Plasmolyse mit Kalziumsalzen auf.

Band-Plasmolyse:

Diese ungewöhnliche Form der Plasmolyse kommt in Zellen vor, in denen der Protoplast an bestimmten Stellen besonders fest mit der Zellwand verbunden ist. So zum Beispiel in Endodermiszellen an den Stellen des Caspari'schen Streifens.

Teilprotoplasten:

Bei besonders starken Osmotika sowie beispielsweise in Thiocyanat können sich mehrere Teilprotoplasten bilden. Dies geschieht entweder sofort oder auf konkave Plasmolyse folgend. Die Teilprotoplasten sind untereinander häufig durch Protoplasmastränge verbunden.

1.5.3.3. Hecht'sche Fäden

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden diese Plasmastränge beobachtet, über welche der plasmolysierte Protoplast mit der Zellwand verbunden bleibt. Es ist jedoch bis heute nicht geklärt, ob die Hecht'schen Fäden (benannt nach Hecht, 1912) über die Plasmodesmata die benachbarten Zellen miteinander in Verbindung halten sollen, oder ob sie nur durch Transmembranproteine wie z.B. Zellulose-Synthasen so fest mit der Zellwand verbunden sind,

dass sie sich nicht von ihr ablösen können. Hecht'sche Fäden haften jedoch auch an Stellen der Zellwand, an denen sich gar keine Plasmodesmata befinden. (Lang *et al.*, 2004; Oparka, 1994)

1.6. Trockenstress

Wie alle Lebewesen, müssen sich auch Pflanzen ihren Umweltbedingungen anpassen. Da sie jedoch an ihren Standort gebunden sind, müssen sie weit anpassungsfähiger sein und eine höhere Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Stressfaktoren aufweisen als Tiere. (Schulze *et al.*, 2002)

Als Stress bezeichnet man Situationen, in denen Umweltfaktoren in suboptimalen bis schädigenden Quantitäten oder Intensitäten auf einen Organismus einwirken. Sowohl der Stress als auch die Stressreaktion des Organismus zeigen Gradienten ihrer Intensität. Stressreaktionen können von Mangel- bis zu Überbürdungsreaktionen reichen. Die von ihrer optimalen Intensität oder Quantität abweichenden Umweltfaktoren bezeichnet man als Stressoren. (Schulze *et al.*, 2002) Wasser ist lebensnotwendig für Pflanzen und stellt oft den limitierenden Faktor dar. Ist es in zu geringer Menge verfügbar, „leiden“ Pflanzen unter Trockenstress. Daher haben sie verschiedenste Anpassungsmöglichkeiten entwickelt, um auch in Gebieten und Zeiten mit geringer Wasserverfügbarkeit überleben zu können.

Unter dem Einfluss von Stress können sich Organismen an härtere Lebensbedingungen anpassen und ihre Resistenz gegenüber diesen erhöhen. Dies kann auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden: durch **Vermeidung** oder durch **Toleranz**. Zu den stressvermeidenden Pflanzen gehören beispielsweise die CAM-Pflanzen, welche durch die nächtliche CO₂-Fixierung tagsüber den Schluss der Stomata erlauben und so Wasserverlust und damit Trockenstress vermeiden. Stresstolerant im eigentlichen Sinne sind beispielsweise Sukkulente, welche Wasserspeicher besitzen. (Schulze *et al.*, 2002) Aber auch die Akkumulation von Osmotika innerhalb der Pflanze, durch welche die Saugkraft erhöht wird, ist eine Möglichkeit der Anpassung an Trockenheit (Chołuj *et al.*, 2008).

Wie in Kapitel 1.1. beschrieben, nehmen die meisten Pflanzen Wasser in erster Linie über ihre Wurzeln auf, und hier besonders über die Wurzelhaare. Durch den höheren osmotischen Wert des Wurzelhaarplasmas im Vergleich zum Außenmedium (also der Bodenlösung) diffundiert Wasser in die Wurzelhaare hinein und wird von dort in die gesamte Pflanze weitertransportiert. Ist nun weniger Wasser verfügbar, steigt die Konzentration gelöster Substanzen im Boden, die Differenz zwischen osmotischem Wert der Zelle und dem des Außenmediums sinkt, indem sich der osmotische Wert des

Außenmediums dem der Zelle nähert. Dies zieht eine sinkende Wasseraufnahme der Zelle nach sich. Nimmt die Konzentration außerhalb der Wurzel gar so weit zu, dass sie höher wird als die Konzentration in der Vakuole der Wurzelhaare, so strömt unweigerlich Wasser aus der Zelle hinaus - sie plasmolysiert.

Aus der Sicht der Zelle bedeutet Trockenstress demnach eine Erhöhung der Konzentration des Außenmediums, also eine Verminderung des Wasserpotentials der Zelle relativ zu ihrer Umgebung, was Wasserverlust oder zumindest eine erschwerte Wasseraufnahme zur Folge hat. Auf Zellebene wird Wasserdefizit folglich nicht nur durch Trockenstress hervorgerufen, sondern auch durch hohe Salzbelastung oder Frost. Jede Zelle verfügt über mehrere Mechanismen, um auf Trockenstress zu reagieren, diese sind jedoch nicht immer spezifischer Natur. So helfen manche primär auf andere Stressoren gerichtete Reaktionen (z.B. durch Kälte oder Pathogenattacken ausgelöst) der Zelle auch bei Dehydratation. Neben den Reaktionen, die der direkten Stressbewältigung dienen, greift Trockenheit aber auch in das normale Zellgeschehen ein, indem z.B. bei poikilohydran Pflanzen die Photosynthesekapazität reduziert wird, wodurch sich die Gefahr der Photooxidation verringert. Bei der Auferstehungspflanze (*Craterostigma plantaginea*, Linderniaceae) wird die Expression von Photosynthesegenen gedrosselt, vermutlich simultan mit der Induktion vieler Gene, deren Produkte direkt oder indirekt die Trockenheitsresistenz der Zellen steigern. Eine Schlüsselrolle bei der Bewältigung von Dehydratationsstress kommt dem Phytohormon Abscisinsäure zu, sowohl hinsichtlich der schnellen Reaktion als auch der langfristigen Anpassung. (Schopfer & Brennicke, 2006; Schulze *et al.*, 2002)

Wasserverlust führt zu folgenden zellulären Veränderungen (Schulze *et al.*, 2002):

- Volumenverminderung des Protoplasten
- Konzentrierung der zellulären Lösungen
- Verminderung oder Verlust des Turgors
- Veränderung der transmembranen Wasserpotentialgradienten
- im drastischen Fall zu Membranstörungen und Proteindenaturierung

Welche dieser Phänomene Signalcharakter haben, ist bei Pflanzen noch nicht geklärt. Entsprechend der multiplen Stressantwort muss man aber annehmen, dass die Pflanzenzelle

über mehrere Rezeptorsysteme verfügt, die unter Umständen auch gewebsspezifisch sein können. (Schulze *et al.*, 2002)

Aufgrund der oben beschriebenen Tatsachen kann Trockenstress bei Wurzelhaaren durch Anwendung verschiedener Osmotika und die durch diese erzielte Plasmolyse simuliert bzw. künstlich erzeugt werden, um die Abläufe in der Zelle während Trockenstress zu untersuchen.

1.7. Salzstress

Trockenstress und Salzstress führen in Pflanzenzellen zu ähnlichen Reaktionen. Es ist heute bekannt, dass Trockenstress oder Salzstress (osmotischer Stress) Pflanzen gegen Kältestress abhärtet. Salz und Dürre, aber auch Frost führen zu einer Entwässerung der Zellen, da bei Frost Wasser zu Eis gefroren und damit nicht mehr als verfügbares Wasser vorhanden ist. Daraus entstehen vor allem Probleme der Membranstabilität, da die hydrophoben Wechselwirkungen, welche die Membran stabilisieren, durch starke Veränderungen in der Wasserbelegung oder der Ionenkonzentration auf der Oberfläche der Membran gestört werden. Wird aus der Umgebung der Membranen zu viel Wasser entfernt, erhöht sich die Konzentration der im Cytosol gelösten Stoffe. Handelt es sich dabei um Ionen, verändern sich die Membranpotentiale, was meist zur Destabilisierung des Membranaufbaus führt. Solch hohe Ladungsdichten können aber nicht nur durch Wasserentzug, sondern auch aus einem zu hohen Salzgehalt resultieren. Als Stressreaktion werden zur Membranstabilisierung meist niedermolekulare, hydrophile Schutzstoffe, sogenannte *compatible solutes* (Zucker, Zuckeralkohole und Cyclite, Aminosäuren und Betaine) synthetisiert. Diese lagern sich bei Wasserentzug anstelle des Wassers an die Membranoberflächen an und mildern dort die Ionenakkumulation. (Lösch, 2001; Schulze *et al.*, 2002)

Der hohe, vor allem durch NaCl, Na₂SO₄, oder Na₂CO₃ bedingte Salzgehalt mancher Böden (Lundegårdh, 1957) führt zu einer Verminderung des Wasserpotentials im Wurzelraum (0,1 mol/l NaCl vermindert Ψ um 0,5 MPa). Wie bereits oben erwähnt, erzeugt dieser Effekt in der Pflanze einen entsprechenden Trockenstress mit allen oben beschriebenen Folgen. Darüber hinaus bewirkt NaCl zusätzliche, spezifische Stoffwechselbelastungen, wenn es in die Pflanze aufgenommen und in toxischen Mengen im Cytoplasma angehäuft wird. Insbesondere der photosynthetische Elektronentransport wird durch einen Anstieg der NaCl-Konzentration empfindlich gestört. Salztolerante Arten, sogenannte Halophyten, besitzen häufig spezielle Einrichtungen zur Entfernung von NaCl aus dem Cytoplasma (z.B. durch Kompartimentierung in der Vakuole oder durch Exkretion aus Salzdrüsen) und sind daher in der Lage, auf salzreichen Böden, im Extremfall bei 0,5 mol/l NaCl, zu wachsen. Die Erforschung der hierbei wirksamen Resistenzmechanismen ist von entscheidender Bedeutung für die Nutzung von Salzböden für die Landwirtschaft. (Schopfer & Brennicke, 2006)

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. *Triticum aestivum*

Als Versuchspflanzen der vorliegenden Arbeit dienten zwei Sorten des Saatweizens *Triticum aestivum* L., auch Weichweizen genannt.

Triticum aestivum gehört zur Gruppe der Ährengräser aus der Familie der Süßgräser (Poaceae) und ist die wichtigste Getreideart weltweit. Die Pflanze ist einjährig, jedoch gibt es in unseren Breiten zwei jahreszeitliche Formen, Sommerweizen und Winterweizen, wobei letzterer eine längere Vegetationsdauer hat und wohl deswegen ein extensiveres Wurzelsystem ausbildet. (Weaver, 1926)

Triticum aestivum wird zwischen 70 und 160 cm hoch (Adler *et al.*, 1994) und bildet meist drei Keimwurzeln aus, in manchen Fällen sind bis zu acht möglich (Weaver, 1926). Bei älteren Pflanzen werden auch zahlreiche sprossbürtige Wurzeln ausgebildet. Die Keimwurzeln sind reich an Seitenwurzeln zweiter und dritter Ordnung, selten sind sie sogar in Seitenwurzeln vierter Ordnung verzweigt. (Kutschera, 1960) Das ausgedehnte Wurzelsystem kann laut Weaver (1926) bis zu 222 cm tief werden.

Triticum ist eine beliebte Versuchspflanze für Untersuchungen an Wurzelhaaren, weil die Pflanze relativ leicht zu kultivieren ist und im entsprechenden Nährmedium zahlreiche Wurzelhaare ausbildet. Diese erreichen in Kultur etwa eine Länge von 1 - 1,5 mm (Volgger, 2004) und einen Durchmesser von ca. 10 µm. Sie zeigen den typischen Aufbau einer spitzenwachsenden Zelle und sind so neben Pollenschläuchen beliebte Versuchsobjekte in der Zellbiologie. Bei *Triticum aestivum* sind alle Rhizodermiszellen in der Lage, Wurzelhaare auszubilden, es ist keine abwechselnde Anordnung von Trichoblasten und Atrichoblasten vorhanden, wie bei anderen Pflanzen wie z.B. *Arabidopsis*.

Da Weizen für die Ernährung des Menschen von großer Bedeutung ist, sind Ergebnisse von Forschungsarbeiten an dieser Art auch von besonderem wirtschaftlichen Interesse. Wegen ihrem sechsfachen Chromosomensatz sind genetische Untersuchungen an ihr jedoch problematisch.

Für die vergleichenden Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Sorten von *Triticum aestivum* verwendet, welche von der Firma Probstdorfer Saatzucht GmbH stammen und im Folgenden als Sorte L und Sorte J bezeichnet werden. Sorte J wird an

trockeneren Standorten angebaut, da sie an diesen erfahrungsgemäß besser gedeiht als die Sorte L, welche eher in feuchteren Regionen ausgesät wird (persönliche Mitteilung von H. Peikert, Firma Probstdorfer Saatzucht, an I. K. Lichtscheidl).

2.2. Kultivierung

Die Weizenkörner (Karyopsen) wurden 2 bis 4 Tage lang bei einer Temperatur von 4° C in destilliertem Wasser (A. dest.) gequollen, um die darauffolgende Keimung zu synchronisieren (siehe Abb. 8).



Abb. 8: Quellen der Weizenkörner bei 4° C

Danach wurden sie auf feuchtes Filterpapier (A. dest. bzw. Phosphatpuffer) in Petrischalen gelegt, welche anschließend schräg aufgestellt wurden, damit die Wurzeln der Keimlinge nach unten wachsen konnten. Die gequollenen Weizenkörner keimten so 24 Stunden lang bei Dauerbeleuchtung und Raumtemperatur (siehe Abb. 9 und Abb. 10).

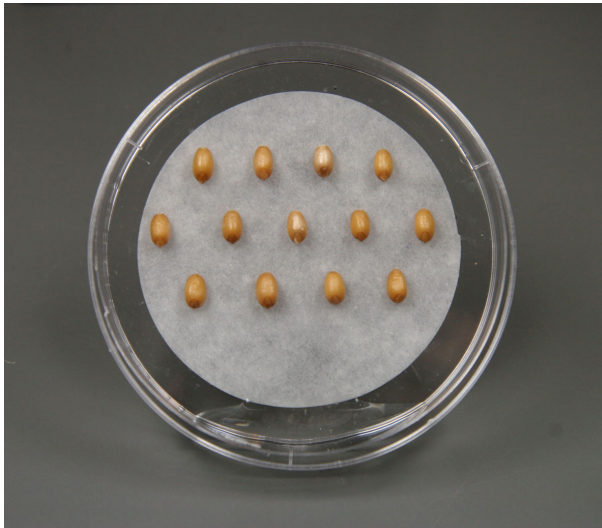


Abb. 9: Beginn der Keimung bei 24° C

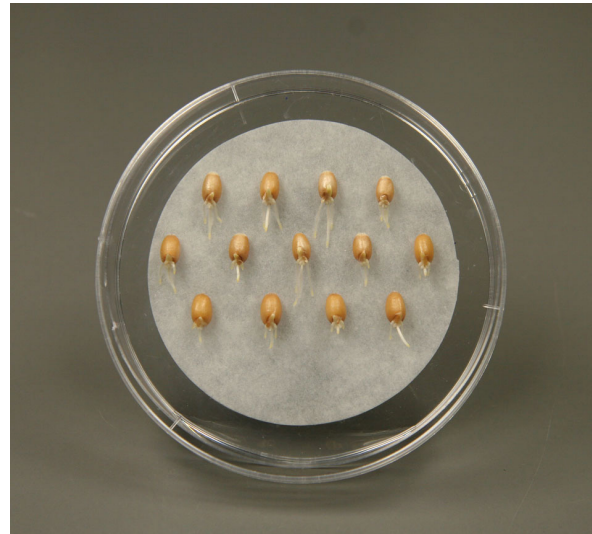


Abb. 10: nach 24 h Keimung bei 24° C

Die mikroskopische Untersuchung muss in flüssigem Medium stattfinden, da sonst störende Lichtbrechungen auftreten würden. Da jedoch die Überführung der Keimlinge ins Medium für diese einen Stressfaktor darstellt und die Wurzelhaare danach häufig zerplatzen oder zumindest ihr Wachstum verändern, wurden die Keimlinge vor den mikroskopischen Untersuchungen an flüssiges Medium adaptiert.

Dazu wurden die Weizenkörner, ebenfalls bei Dauerbeleuchtung, für mindestens 12 Stunden in Phosphatpuffer eingebracht. Es wurden sogenannte *Slide chambers* angefertigt, welche jeweils aus einem Objektträger bestanden, auf welchem ein Deckglas mit sechs Schichten Parafilm - als Abstandhalter - durch Erhitzen befestigt wurde (siehe Abb. 11). Die Keimwurzeln wurden in die *Slide chambers* überführt und senkrecht in mit Phosphatpuffer gefüllte Färbeküvetten gestellt (siehe Abb. 12), welche anschließend mit einem Glasdeckel versehen wurden. Die in dem Phosphatpuffer gebildeten Wurzelhaare wurden im Folgenden untersucht.

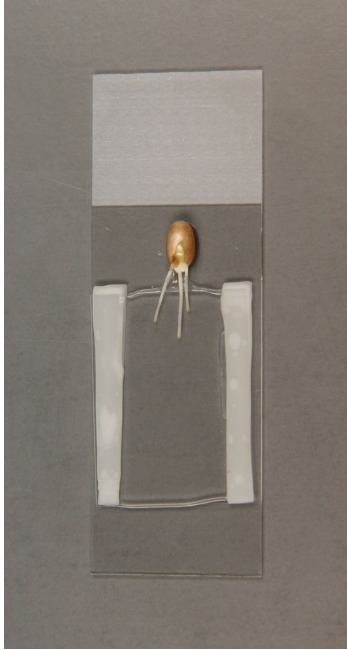


Abb. 11: Keimling in Slide chamber



Abb. 12: Adaptierung bei 24° C

2.3. Lösungen

Wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.6), bedeutet Trockenstress für die Zelle einen erhöhten osmotischen Wert des Außenmediums im Verhältnis zum osmotischen Wert der Zellsaftvakuole. Um den Einfluss von Trocken- und Salzstress auf Wurzeln und Wurzelhaare zu untersuchen, wurden verschiedene Lösungen osmotisch aktiver Substanzen verwendet.

2.3.1. Phosphatpuffer

Laut Volgger (2004) wachsen Wurzelhaare von *Triticum aestivum* in Phosphatpuffer besser als in Wasser. Für die Herstellung des Puffers wurden 18,4 ml einer 1/15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -Lösung der Firma Merck Darmstadt mit einer 1/15 M KH_2PO_4 -Lösung der Firma LOBA Feinchemie Fischamend auf 100 ml ergänzt. Diese Lösung wurde anschließend mit A. dest im Verhältnis 1:6 verdünnt. Der pH-Wert des Phosphatpuffers betrug 6,5 und der osmotische Wert lag bei ca. 20 mOsm.

2.3.2. Mannit

Mannit ist ein Zuckeralkohol und wird daher auch Mannitol genannt (siehe Abb. 13). Es hat die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ und eine Molmasse von 182,17 g/mol. Es wird im Gegensatz zu Saccharose und Glucose nicht von den Zellen aufgenommen, und es sind auch keine sonstigen Wechselwirkungen mit der Zelle bekannt. Mannitol ist pH-neutral, ungiftig und wenig anfällig für Pilzbefall.

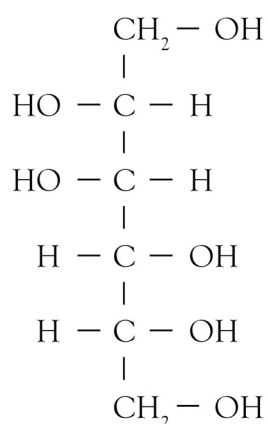


Abb. 13: Strukturformel von Mannit

Zur Herstellung der Mannitlösungen wurde D-Mannit der Firma Merck (Darmstadt) in Phosphatpuffer gelöst. Die Lösungen wurden auf die jeweils entsprechende Konzentration +/- 10 mOsm verdünnt, während der osmotische Wert mittels eines Gefrierpunktsmometers (The AdvancedTM Micro-Osmometer, Model 3MO plus, Advanced Instruments, Inc.) gemessen wurde.

Es wurden Mannitollösungen mit folgenden Osmolalitäten verwendet:

50 mOsm, 100 mOsm, 150 mOsm, 200 mOsm, 250 mOsm, 300 mOsm, 350 mOsm, 400 mOsm, 450 mOsm, 500 mOsm, 550 mOsm, 600 mOsm

2.3.3. NaCl

Da Mannitol im natürlichen Substrat nicht vorkommt, hoher Salzgehalt jedoch einen bedeutenden Stressfaktor für viele Pflanzen darstellt, wurden auch vergleichende Versuche mit Natriumchlorid (Kochsalz) gemacht.

Die Kochsalzlösungen wurden aus kristallinem NaCl der Firma Merck hergestellt. Die Molekularmasse von NaCl beträgt 58,44 g/mol. Wie auch die Mannitlösungen wurden die NaCl-Lösungen ausgepuffert. Die Messung der Osmolalitäten (+/- 10 mOsm) wurde ebenfalls am Gefrierpunktsmometer gemacht.

Für die Versuche mit NaCl-Lösung wurden folgende Osmolalitäten verwendet (die entsprechenden Molaritäten sind in Klammern angefügt):

200 mOsm (100 mM), 400 mOsm (200 mM), 600 mOsm (300 mM), 800 mOsm (400 mM), 1000 mOsm (500 mM)

2.3.4. BFA

Brefeldin A (BFA, siehe Abb. 14) ist ein toxischer Metabolit aus Pilzen (Movafeghi, 2000), welcher bei eukaryotischen Zellen das Sekretionssystem blockiert, indem er die Vesikelbildung am Golgi-Apparat verhindert (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Bei Pflanzenzellen sind die Effekte von BFA jedoch im Detail anders als bei tierischen Zellen. In den ersten 5 Minuten kommt es zu einem kompletten Verlust von At γ -COP, einem Bestandteil von COPI coats, und nach weiteren 15 bis 20 Minuten führt diese Blockade der Vesikelbildung zu einer Serie von Veränderungen der Golgi-Architektur, dem Verlust von ausgeprägten Golgi-

Stapeln, zur Fusion individueller Golgi-Zisternen mit dem ER und der Bildung von großen ER-Golgi-Hybridstapeln. Verlängerte Einwirkung von BFA führt zur Umwandlung der ER-Golgi-Hybridcompartments zu schwammartigen Strukturen, welche dem ER nicht ähneln. (Ritzenthaler *et al.*, 2002)

Die Molmasse von BFA beträgt 280,4 g/mol. In der vorliegenden Arbeit wurde BFA (Sigma) verwendet, um den Vorgang der Exocytose zu untersuchen.

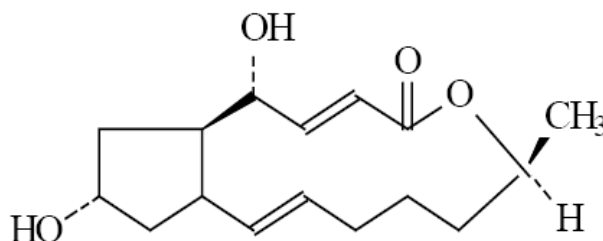


Abb. 14: Strukturformel von BFA (Quelle: <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/b7651pis.pdf>)

Es wurden BFA-Lösungen folgender Molaritäten verwendet:

3,5 μM , 17 μM , 25 μM , 35 μM

Um die Auswirkungen von BFA auf die Zellen noch besser sichtbar zu machen, wurde BFA auch in Kombination mit den Fluoreszenzfarbstoffen FM 1-43 (Kap. 2.4.2) und FM 4-64 (Kap. 2.4.3) angewendet. Es wurden auch Kombinationen von BFA und Mannit verwendet, um Vesikeltransportvorgänge während der Plasmolyse zu untersuchen.

2.4. Fluoreszenzfarbstoffe

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind durchwegs Endocytosemarker. Die Endocytose wurde bei den Wurzelhaaren untersucht, weil sie beim Spitzenwachstum eine wichtige Rolle spielt (siehe Kapitel 1.4.3).

2.4.1. Lucifer Yellow

Lucifer Yellow (LY, Abb. 15) ist ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, welcher unspezifisch das Außenmedium färbt und durch Endocytosevesikel in die Zelle aufgenommen wird. Daher war man bis vor kurzem der Meinung, LY sei ein guter Endocytosemarker. Inzwischen wurde in mehreren Arbeiten (Adlassnig, 2007; Ismail, 2001) gezeigt, dass LY nicht immer als Endocytosemarker geeignet ist. Roszak (1997) beschrieb außerdem auch eine Aufnahme von LY über Membrankanäle.

Der Fluoreszenzfarbstoff wird bei einer Wellenlänge von 428 nm angeregt und emittiert mit einer Wellenlänge von 533 nm. Die Molekularmasse beträgt 457,24 g/mol. Der Farbstoff wurde von der Firma Molecular Probes bezogen und wurde in den Molaritäten 200 μM und 400 μM verwendet.

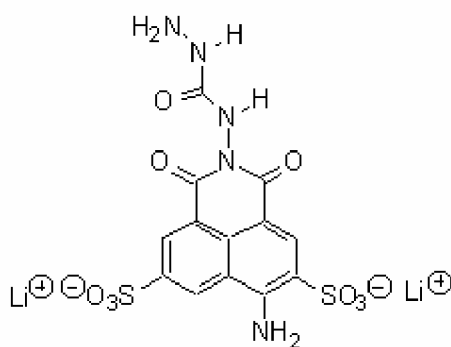


Abb. 15: Strukturformel von Lucifer Yellow (Quelle: <http://omlc.org.edu/spectra/PhotochemCAD/html/luciferyellowCH.html>)

2.4.2. FM 1-43

FM 1-43 ist ein Styrylfarbstoff, welcher zur Färbung von Biomembranen verwendet wird (siehe Abb. 16). Styrylfarbstoffe fluoreszieren erst, wenn sie an eine Membran binden.

Aufgrund der Struktur des Moleküls ist eine passive Diffusion durch die Membran nicht möglich. Eine Aufnahme in die Zelle kann daher nur durch Endocytose von gefärbter Membran erfolgen. (Betz *et al.*, 1996)

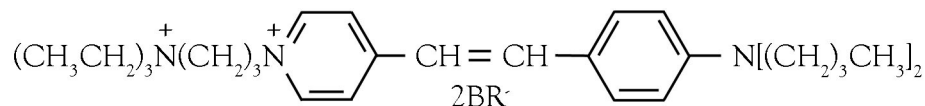


Abb. 16: Strukturformel von FM 1-43

FM 1-43 wird bei einer Wellenlänge von 502 nm maximal angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 625 nm (Betz *et al.*, 1996). Die Molekülmasse beträgt 611,54 g/mol. Dieser Farbstoff stammt ebenfalls von der Firma Molecular Probes.

Die hier eingesetzten FM 1-43 - Lösungen hatten die Molaritäten 2 μM , 3 μM , 4 μM und 8 μM .

2.4.3. FM 4-64

FM 4-64, auch SynaptoRed C2 genannt, ist ebenfalls ein membranselektiver Fluoreszenzfarbstoff und wird auch häufig für die Erforschung der Endocytose und des Vesikeltransportes eingesetzt. FM 4-64 weist die gleiche Funktionsweise wie FM 1-43 auf, jedoch absorbiert und emittiert dieser Farbstoff in einem anderen Spektrum, nämlich bei 560 bzw. 767 nm (Betz *et al.*, 1996). Auch dieser Farbstoff stammt von der Firma Molecular Probes. Die Summenformel von FM 4-64 ist $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{Br}_2\text{N}_3$ und die Molmasse beträgt 608 g/mol. FM 4-64 wurde in einer Molarität von 4 μM verwendet. FM 4-64 wird in den Pflanzenwissenschaften gerne verwendet, da sich sein Fluoreszenzspektrum im Gegensatz zu FM 1-43 kaum mit jenem von Chlorophyll überschneidet. Es zeigte sich jedoch während der Arbeit, dass FM 4-64 auf die Wurzelhaare toxisch wirkt, wurde nach einigen Versuchen statt diesem der Farbstoff FM 1-43 verwendet, da Wurzelhaare kein störendes Chlorophyll enthalten.

2.5. Mikroskopie und Dokumentation

2.5.1. NIKON Labophot

Die meisten Beobachtungen erfolgten im Hellfeld an einem NIKON Labophot 2 Mikroskop mit folgenden Objektiven: Nikon 10x/0.25, Nikon 20x/0.4 und Nikon 40x/0.65. Für die Betrachtung der Fluoreszenzen wurde das Mikroskop mit einer Auflichtfluoreszenz-Einrichtung verwendet.

Die Beobachtungen wurden über die Ikegami Videokamera „ICD-840PDC ink“ auf S-VHS- und MiniDV-Bänder aufgezeichnet.

2.5.2. CLSM

Die Beobachtung fluoreszenzgefärbter Endocytosevesikel und anderer Feinstrukturen erfolgte im LEICA DMIRE2 *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM). Dieses ist vor allem für dickere Präparate wie Wurzeln gut geeignet und erreicht besonders hohe Auflösungen. Der Computer kann auch 3D-Bilder von den Objekten erstellen. Außerdem bleicht die Fluoreszenz der Objekte durch den Laser nur langsam aus. Es wurden die Leica Objektive 2.5x/0.07, 10x/0.30, 20x/0.50 und das PlanApo 40x/1.25 - 0.75 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Auch an diesem Mikroskop wurden Hellfeldbeobachtungen gemacht.

2.5.3. Univar

Einige Beobachtungen der Vesikelströmung in der *Tip zone* wurden mit Hilfe der *Video Enhanced Light Microscopy* (VEC) ermöglicht. Dabei wird eine hochauflösende Videokamera zur Bilderstellung verwendet. Dadurch können auch bei offener Blende deutliche Kontraste erreicht werden. Für die VEC wurde ein REICHERT Univar Mikroskop mit einem Reichert PlanApo 40x/1.00 Objektiv verwendet. Die VEC-Dokumentation erfolgte mittels einer Hamatsu C2400 Kamera auf U-matic-Bänder.

2.5.4. Fotografie

Sowohl die Fotos von den Keimlingen in der Vorbereitung, als auch einige am Labophot entstanden mit den Kameras Nikon Coolpix 990 bzw. 4500. Makrofotos wurden mit der Canon EOS 20D Digitalkamera gemacht.

Das Filmmaterial wurde am Computer mit dem Programm Adobe Premiere Pro 1.5 bearbeitet. Die digitale Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop CS2.

2.6. Aufbau der Versuche

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden - sofern nicht anders hervorgehoben - immer parallel mit beiden Sorten (L und J) durchgeführt, um sie miteinander vergleichen zu können. Der erste Schritt der Versuche war immer die oben beschriebene Quellung der Karyopsen. Bei jedem Versuch wurde eine Kontrolle mit der gleichen Stichprobenzahl wie in jeder anderen Konzentration gemacht.

2.6.1. Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit

Die Weizenkörner wurden gequollen, gekeimt und anschließend in Phosphatpuffer an flüssiges Medium adaptiert. Im Hellfeldmikroskop wurden 3 bis 6 Wurzelhaare pro Keimling beobachtet und ihre Wachstumsgeschwindigkeit in 5-Minuten-Schritten mindestens 15 Minuten lang gemessen. Anschließend wurde unter dem Mikroskop ein Lösungswechsel auf Mannitlösungen definierter Konzentrationen vorgenommen und die Reaktion dieser ausgewählten Wurzelhaare beobachtet und dokumentiert. In erster Linie wurde die Wachstumsgeschwindigkeit - auch hier in 5-Minuten-Schritten, zumindest 20 Minuten lang - gemessen. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt, sodass eine Stichprobenanzahl von zumindest 10 Wurzelhaaren pro Mannitkonzentration und Sorte gegeben war. Aus diesen Messungen wurde schließlich die mittlere Geschwindigkeit vor und nach dem Lösungswechsel berechnet.

Der Versuch wurde mit beiden Weizensorten in Mannitlösungen mit den Osmolalitäten 100 mOsm, 150 mOsm, 200 mOsm, 250 mOsm und mit der Sorte J auch in 300 mOsm durchgeführt.

Da in den höheren Konzentrationen kein Wachstum der Wurzelhaare mehr stattfand, wurden die Zellen auch direkt an der Rhizodermis untersucht. Dabei wurden sie teilweise mit FM 1-43 gefärbt um eine etwaige Plasmolyse am basalen Teil der Zellen besser sichtbar zu machen. Hierfür wurden Mannitosmolalitäten von 350 mOsm, 400 mOsm, 450 mOsm, 500 mOsm, 550 mOsm und 600 mOsm verwendet.

2.6.2. Wachstum der Wurzelhaare in Mannit

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Wurzelhaare sich an eine erhöhte Osmolalität des Außenmediums anpassen. Das Ausmaß einer etwaigen Anpassung, sowie Unterschiede zwischen den beiden Sorten wurden untersucht.

Der Versuchsaufbau war dabei ähnlich wie oben, mit dem Unterschied, dass die Keimlinge nach der Adaptierung für 24 bis 48 Stunden in die jeweilige Mannitlösung überführt wurden, und erst danach die Messung der Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare erfolgte. Es wurden auch hier je Konzentration und Weizensorte mindestens 10 Wurzelhaare untersucht, und anschließend die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit berechnet.

Die hier verwendeten Mannitlösungen hatten die Osmolalitäten 50 mOsm bis 500 mOsm, in 50 mOsm-Schritten.

2.6.3. Wurzelwachstum in Mannit und NaCl

Bei diesem Versuch wurden die bereits gequollenen Weizenkörner beider Sorten getrennt in schräg aufgestellte und mit Parafilm verschlossene Petrischalen auf Mannit-getränktes Filterpapier gesetzt und 24 bzw. 48 Stunden lang beleuchtet. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 50 mOsm bis 450 mOsm in 50 mOsm-Schritten erstellt, wobei in jeder Konzentration 35 - 40 Keimlinge je Sorte wuchsen. Nach Verstreichen der 24 bzw. 48 Stunden wurden die Längen der Wurzeln pro Keimling und Anfangs auch ihre Masse gemessen. Da hier jedoch eine lineare Korrelation zwischen Länge und Masse erkennbar war, erübrigte sich Letzteres in Folge. Die Ergebnisse der beiden Sorten wurden miteinander verglichen.

Um zu sehen ob die Ergebnisse des Wurzelwachstums in Mannit mit dem in NaCl vergleichbar sind, und wie sich höchste Konzentrationen von Salz auf das Wurzelwachstum auswirken, wurde auch ein Aufbau dieses Versuches mit NaCl gemacht. Hier wurde eine Konzentrationsreihe von 200 mOsm bis 1000 mOsm in 200 mOsm-Schritten gemacht. Natürlich wurden auch beim NaCl-Versuch die Sorten L und J miteinander verglichen.

Bei allen Versuchen wurde eine Kontrollreihe mit Phosphatpuffer gemessen.

Es wurden auch zellbiologische Untersuchungen an den Wurzelzellen gemacht: In Mannit-Konzentrationen, in denen kein Wurzelhaarwachstum mehr stattfand, wurden auch die meristematischen Zellen an der Wurzelspitze und Zellen der Kalyptra untersucht. Hierfür wurden Mannitosmolalitäten von 350 mOsm, 400 mOsm, 450 mOsm, 500 mOsm, 550 mOsm und 600 mOsm, teilweise in Kombination mit FM 1-43 verwendet.

2.6.4. Messung der osmotischen Werte der Wurzeln

Zellwachstum ist an Turgordruck gebunden, und dieser besteht nur, wenn der osmotische Wert der Zelle höher ist als der des Außenmediums. Aus diesem Grund wurden die osmotischen Werte der Wurzeln beider Sorten gemessen und miteinander verglichen.

Der Versuchsaufbau begann hier wie bei der Messung des Wurzelwachstums in Mannit bzw. NaCl. Die Weizenkörner keimten auch hier auf Filterpapier mit gestuften Konzentrationen von Mannit. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Wurzeln abgeschnitten und in eine Spritze (innen vor der Spitze mit Filterpapier versehen) gefüllt. Die Spritzen wurden für mehrere Stunden in einen Tiefkühlschrank gelegt, wodurch die Tonoplasten aufbrachen und den Zellsaft freigaben. Anschließend wurde jede Spritze ausgedrückt und der Presssaft in je ein Eppendorfcup gesammelt. Der osmotische Wert dieser Flüssigkeit wurde mittels Gefrierpunktosmometer gemessen. Es wurden drei Messungen pro Eppendorfcup vorgenommen und der Mittelwert aus den drei Ergebnissen berechnet.

Die verwendeten Mannitlösungen hatten die Osmolalitäten 50 mOsm, 100 mOsm, 150 mOsm, 200 mOsm, 250 mOsm, 300 mOsm, 350 mOsm, 400 mOsm und 450 mOsm.

In Mannit wurden die osmotischen Werte sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden Wachstum gemessen, um zu sehen, ob sich diese mit der Zeit veränderten.

Es wurde auch ein methodologischer Vergleich gemacht: Um eine ungefähre Fehlergröße durch das zwischen den Wurzelhaaren verbliebene Medium, welches beim Presssaft die Werte verändert, abzuschätzen, wurden zwei parallele Versuchsreihen durchgeführt. Bei der Versuchsreihe A wurden die Keimlinge vor der Herstellung des Presssaftes einzeln jeweils für einen Moment in destilliertem Wasser geschwenkt und danach auf Küchenpapier abgetupft. Bei dem Versuch B wurden die Keimlinge direkt aus dem Osmotikum kommend abgetupft

und weiterverarbeitet. Beiden Messungen ging eine Keimung von 48 Stunden in der jeweiligen Mannitkonzentration voraus.

Der osmotische Wert der Wurzeln wurde auch bei in NaCl gewachsenen Keimlingen gemessen, hier jedoch nur in den Osmolalitäten 200 mOsm und 400 mOsm, um einen Vergleich zwischen Mannit und NaCl herzustellen. Auch hier wurden beide Sorten untersucht.

2.6.5. Versuche zur Endo- und Exocytose

Für den Endocytoseversuch wurden die Keimlinge in Kammern adaptiert und anschließend in 200 μM bzw. 400 μM Lucifer Yellow (in A. dest.) überführt. Die Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop erfolgte über mehrere Stunden nach dem Lösungswechsel.

Für die Exocytoseversuche wurden die adaptierten Keimlinge in BFA-Lösungen verschiedener Konzentrationen gewechselt. Um die ideale Konzentration herauszufinden, wurden mehrere BFA-Lösungen in den Molaritäten 3,5 μM und 35 μM getestet. Es wurden auch BFA-Lösungen in Kombination mit membranselektiven Fluoreszenzfarbstoffen angewendet, um die Auswirkungen von BFA besser sichtbar zu machen:

3,5 μM BFA + 4 μM FM 4-64

3,5 μM BFA + 8 μM FM 1-43

35 μM BFA + 2 μM FM 1-43.

Schließlich wurde auch probiert, erst BFA einwirken zu lassen und anschließend mit FM 1-43 zu färben. Dabei wurde 35 μM BFA-Lösung und nach 1,5 Stunden 4 μM FM 1-43-Lösung verwendet.

Um zu sehen, ob die beobachteten Vorgänge reversibel sind, wurden die Wurzeln nach den BFA-Beobachtungen mit A. dest. ausgewaschen und weiter beobachtet.

Es wurden auch Vorversuche zur Unterbindung der Exocytose während der Plasmolyse gemacht. Die hierfür verwendeten Lösungen hatten die Konzentrationen:

500 mOsm Mannit

35 μ M BFA

35 μ M BFA + 8 μ M FM 1-43

35 μ M BFA + 4 μ M FM 1-43

35 μ M BFA + 2 μ M FM 1-43 + 400 mOsm Manni

3. ERGEBNISSE

3.1. *Triticum aestivum* in der Kontrolle

3.1.1. Wurzelwachstum

In der Kontrolle (ohne osmotischen Stress) bildeten die Keimlinge beider Sorten drei bis fünf Wurzeln aus. Ihre Gesamtlänge pro Keimling betrug nach 24 Stunden im Phosphatpuffer durchschnittlich $31,2 \pm 6,5$ mm bei der Sorte L und $29,5 \pm 10,1$ mm bei der Sorte J.

Nach 24 Stunden in A. dest. bildeten die Keimlinge beider Sorten längere Wurzeln aus. Bei Sorte L waren die Wurzeln im Durchschnitt $42,7 \pm 16,2$ mm lang und ihre Masse betrug $10,2 \pm 4,5$ mg. Bei Sorte J betrug die durchschnittliche Wurzellänge pro Keimling nach derselben Zeit $42,9 \pm 19,5$ mm und die Wurzelmasse lag bei $10,0 \pm 4,6$ mg.

3.1.2. Osmotischer Wert der Wurzel

Die im Phosphatpuffer gewachsenen Wurzeln der Weizensorte L hatten einen osmotischen Wert von durchschnittlich 255 ± 6 mOsm. Der durchschnittliche osmotische Wert der Wurzeln von Sorte J betrug 231 ± 12 mOsm und war geringfügig aber signifikant niedriger als der von L.

3.1.3. Wurzelhaarwachstum

Durch den mechanischen Reiz bei der Überführung der Keimlinge von der Petrischale in den *Slide chamber* verlangsamte sich das Wachstum der Wurzelhaare anfangs, und es bildeten sich hier und da keulenförmig verdickte Wurzelhaarspitzen (siehe Abb. 18 und Abb. 19). Einige Zellen wuchsen nach einer Weile unter der Spitze seitlich weiter (siehe Abb. 17). Auch aus diesem Grund wurden die Keimlinge über mehrere Stunden nach der Überführung in den Phosphatpuffer in Küvetten stehen gelassen. Für die darauffolgenden Untersuchungen wurden nur Wurzelhaare herangezogen, die im Phosphatpuffer neu gewachsen waren und keine Verformungen aufwiesen.



Abb. 17: Verzweigte und geplatze Wurzelhaare nach mechanischer Reizung

Da die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare nicht ständig konstant bleibt, sondern einer erst steil ansteigenden und später langsam abfallenden Kurve folgt (Volgger, 2004), wurden für die Messung nur vergleichbar alte Wurzelhaare beobachtet. Die gemessenen Wachstumsgeschwindigkeiten beziehen sich daher auf Wurzelhaare mit Längen zwischen 50 und 200 μm . Die Wurzelhaare hatten eine durchschnittliche Breite von ca. 10 μm .

Im Phosphatpuffer hatten die Wurzelhaare der Sorte L eine durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit von $1,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$ pro Minute. Die Wurzeln der Sorte J wuchsen ebenfalls mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $1,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ pro Minute.

3.2. Vergleichende Analysen des Wurzelwachstums

3.2.1. Wurzelwachstum in Mannit

In der Kontrolle (ohne osmotischen Stress) bildeten die Keimlinge beider Sorten drei bis fünf Wurzeln aus. Ihre Gesamtlänge pro Keimling betrug nach 24 Stunden im Phosphatpuffer durchschnittlich $31,2 \pm 6,5$ mm bei der Sorte L und $29,5 \pm 10,1$ mm bei der Sorte J.

Auch in der 50 mOsm Mannitlösung bildeten fast alle Keimlinge der Sorte L drei Wurzeln aus. Insgesamt hatten diese eine durchschnittlichen Länge von $27,5 \pm 10,0$ mm je Keimling. Sorte J bildete ebenfalls drei Wurzeln pro Keimling aus. Ihre durchschnittliche Länge betrug in dieser Konzentration $29,2 \pm 7,7$ mm.

Die Keimlinge der Sorte L bildeten in 100 mOsm Mannitol Wurzeln mit einer Gesamtlänge von $24,5 \pm 9,9$ mm pro Keimling aus. Auch hier hatten die meisten Weizenkörner drei Wurzeln gebildet. Nur wenige entwickelten lediglich zwei oder gar nur eine Wurzel. Die mittlere Wurzellänge der Sorte J betrug nach 24 Stunden Wachstum in dieser Osmolarität $28,8 \pm 6,6$ mm pro Keimling. Auch hier war die Anzahl von meist drei Wurzeln pro Keimling normal.

Nach 24 Stunden in 150 mOsm wuchsen den Keimlingen der Sorte L Wurzeln in der Länge von durchschnittlich $26,3 \pm 8,6$ mm. Fast alle Keimlinge bildeten drei Wurzeln aus, nur sehr selten waren weniger zu zählen. Sorte J bildete Wurzeln in der Gesamtlänge von $27,6 \pm 7,3$ mm pro Keimling aus. Alle untersuchten Keimlinge dieser Sorte hatten drei Wurzeln ausgebildet.

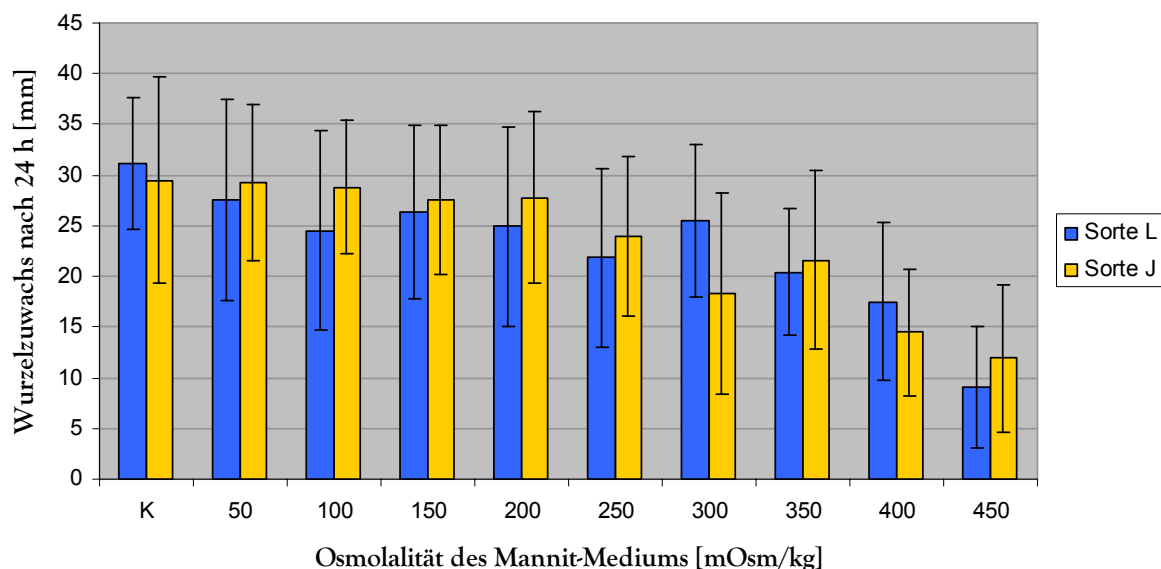
In 200 mOsm Mannit betrug die Länge der Wurzeln der Sorte L durchschnittlich $24,9 \pm 9,9$ mm. Die Wurzeln der Sorte J wurden in diesem Medium durchschnittlich $27,8 \pm 8,4$ mm lang. Auch in dieser Konzentration war bei beiden Sorten keine deutliche Veränderung in der Anzahl der Wurzeln pro Keimling zu sehen, nur vereinzelt wuchsen weniger als drei Wurzeln aus einem Weizenkorn. Einige Keimlinge waren jedoch teilweise oder ganz mit einer schwarzen Schicht überzogen; womöglich ein Pilz, welcher jedoch keine Auswirkungen auf das Wurzelwachstum zu haben schien.

In 250 mOsm Mannit wurden die Wurzeln der Sorte L nach 24 Stunden durchschnittlich $21,8 \pm 8,8$ mm lang. Die mittlere Wurzellänge pro Keimling der Sorte J betrug in dieser Konzentration $24,0 \pm 7,9$ mm. Fast alle Keimlinge hatten auch hier drei Wurzeln ausgebildet.

In 300 mOsm Mannit waren die Wurzeln pro Keimling der Sorte L durchschnittlich $25,5 \pm 7,6$ mm lang. Sorte J bildete in 300 mOsm Mannit durchschnittlich nur $18,3 \pm 9,8$ mm lange Wurzeln aus. Nur einige Weizenkeimlinge bildeten weniger als drei Wurzeln aus.

In der 350 mOsm Mannitlösung bildeten die Keimlinge der Sorte L durchschnittlich $20,4 \pm 6,2$ mm lange Wurzeln pro Keimling aus. Sorte J war mit einer mittleren Wurzellänge von $21,6 \pm 8,8$ mm pro Keimling nicht signifikant verschieden. Bei beiden Sorten wurden bei einigen Keimlingen weniger als drei Wurzeln gezählt.

In 400 mOsm Mannit bildeten die Keimlinge der Sorte L $17,5 \pm 7,8$ mm lange Wurzeln aus. Die Keimlinge der Sorte J waren in dieser Konzentration vermehrt von dem bereits erwähnten Pilz befallen, was sich jedoch nicht auf die Wurzellänge auszuwirken schien. In dieser Konzentration betrug die mittlere Wurzellänge pro Keimling $14,5 \pm 6,3$ mm.



Grafik 1: Überblick über den Wurzelzuwachs von L und J nach 24 Stunden in Mannit

In 450 mOsm betrug die durchschnittliche Länge pro Keimling nur noch $9,0 \pm 6,0$ mm. Hier wurden die Wurzeln der Keimlinge im Durchschnitt $11,9 \pm 7,3$ mm lang. Beide Sorten bildeten in 450 mOsm Mannit häufig weniger als drei Wurzeln pro Keimling aus.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das Wachstum der Wurzeln von beiden Sorten mit zunehmender Mannitkonzentration abnahm (siehe Grafik 1). Bis 250 mOsm geschah dies bei beiden Sorten in geringem Ausmaß, danach fiel die Kurve steiler ab. Noch in 450 mOsm Mannit konnten die Keimlinge beider Sorten Wurzeln ausbilden, wenn auch deutlich kürzere als in derselben Zeit in der Kontrolle. Zwischen Sorte L und Sorte J war kein signifikanter Unterschied im Wurzelwachstum erkennbar. Sorte J verpilzte jedoch in den höheren Mannitkonzentrationen mehr, dies schien sich in dieser frühen Phase allerdings nicht auf das Wurzelwachstum auszuwirken. In den höheren Konzentrationen nahm auch die Anzahl der gebildeten Keimwurzeln bei beiden Sorten ab.

3.2.2. OW der Wurzel in Abhängigkeit von der Mannit-Konzentration

Anschließend an obigen Versuch wurden die osmotischen Werte der Wurzeln gemessen. Dies geschah nach 24 Stunden und nach 48 Stunden, um zu sehen, ob eine Veränderung des osmotischen Wertes der Wurzel im Laufe der Zeit zu erkennen war.

3.2.2.1. Osmotischer Wert der Wurzel nach 24 Stunden in Mannit

Bei diesem Versuch wurden die Keimlinge vor der Messung des osmotischen Wertes nicht gespült. In der Kontrolle hatten die Wurzeln der Sorte L nach 24 Stunden einen mittleren osmotischen Wert von 481 ± 1 mOsm und die Wurzeln der Sorte J 313 ± 3 mOsm.

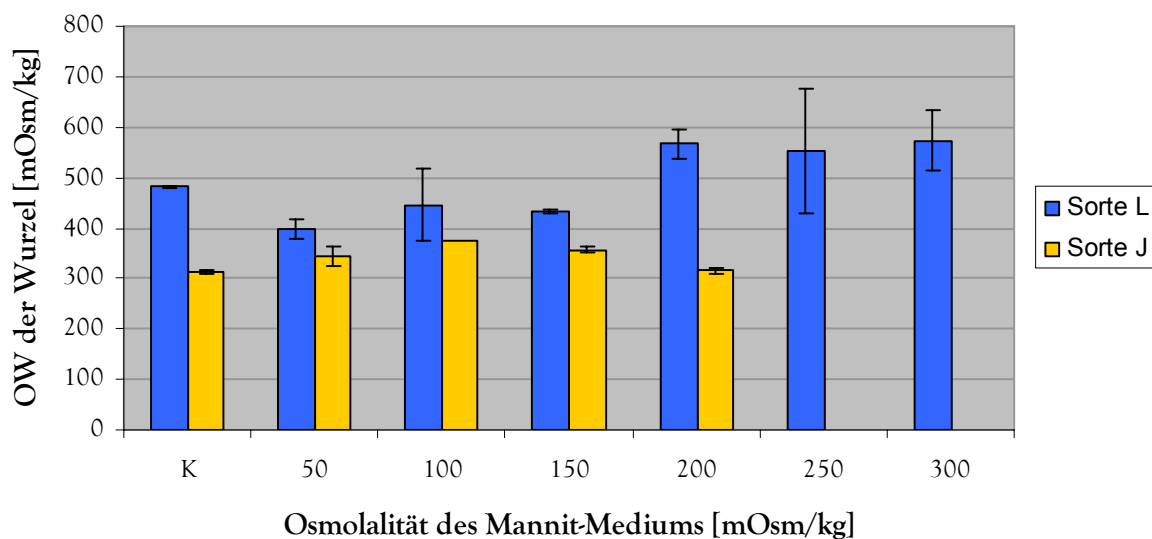
In 50 mOsm hatten die Wurzeln von L einen osmotischen Wert von 399 ± 18 mOsm, der osmotische Wert der Wurzeln der Sorte J betrug 344 ± 18 mOsm.

Auch in 100 mOsm Mannit hatte der Wurzelpresssaft von L einen mit 446 ± 70 mOsm einen höheren osmotischen Wert als der von J, welcher nur 373 mOsm betrug.

In 150 mOsm wurden bei Sorte L 434 ± 5 mOsm osmotischer Wert gemessen, bei Sorte J nur 357 ± 5 mOsm.

In 200 mOsm konnte ich bei Sorte L bereits einen sehr hohen osmotischen Wert von durchschnittlich 567 ± 29 mOsm messen. Der Presssaft von Sorte J hatte auch hier nur 316 ± 6 mOsm.

In den Lösungen mit 250 mOsm bzw. 300 mOsm konnte nur noch der osmotische Wert von Sorte L gemessen werden. Dieser betrug 553 ± 122 mOsm bzw. 573 ± 60 mOsm.



Grafik 2: Osmotischer Wert der Wurzeln nach 24 h in verschiedenen Mannit-Konzentrationen (ungespült)

Der osmotische Wert der Wurzeln der Sorte L nahm mit steigender Konzentration etwas zu. Die ermittelten osmotischen Werte der Sorte J waren jedoch in den verschiedenen Konzentrationen nur geringfügig unterschiedlich (siehe Grafik 2).

3.2.2.2. Osmotischer Wert der Wurzeln nach 48 Stunden in Mannit

In der Kontrolle hatten die Wurzeln der Sorte L einen mittleren osmotischen Wert von 260 ± 1 mOsm (Versuch A: gespült) beziehungsweise 250 ± 1 mOsm (Versuch B: ungespült). Die Wurzeln der Sorte J hatten hier bei Versuch A einen osmotischen Wert von 243 ± 1 mOsm, und bei Versuch B konnten 220 ± 2 mOsm gemessen werden.

Nach 48 Stunden in 50 mOsm Mannitlösung hatten die Wurzeln der Keimlinge der Sorte L einen osmotischen Wert von 239 ± 1 mOsm (Versuch A) beziehungsweise 248 ± 4 mOsm (Versuch B). Sorte J hatte in 50 mOsm Mannit einen osmotischen Wert von 255 ± 2 mOsm mit Spülen und 239 ± 1 mOsm ohne Spülen.

In 100 mOsm ergab die Messung des Wurzelpresssaftes in Versuch A für die Sorte L einen osmotischen Wert von 286 ± 1 mOsm. In Versuch B wurden 313 ± 3 mOsm gemessen. Die Sorte J hatte in Versuch A einen osmotischen Wert von 277 ± 1 mOsm. In Versuch B wurde bei der Sorte J in dieser Mannitkonzentration ein osmotischer Wert der Wurzel von 352 ± 4 mOsm gemessen.

Die Wurzeln der Sorte L hatten in 150 mOsm Mannit bei Versuch A einen mittleren osmotischen Wert von 333 ± 1 mOsm und bei Versuch B 358 ± 2 mOsm. Bei Sorte J wurde bei der Messung der Wurzelosmolalität ein osmotischer Wert von 364 ± 3 mOsm bei Versuch A und 393 ± 1 mOsm bei Versuch B ermittelt.

In 200 mOsm Mannit wurde für die Sorte L ein osmotischer Wert von 392 ± 1 mOsm in Versuch A und einer von 445 ± 1 mOsm in Versuch B gemessen. Sorte J hatte mit einem Wert von 349 ± 4 mOsm in Versuch A und 452 ± 3 mOsm in Versuch B sehr ähnliche osmotische Werte wie die obige Sorte.

Auch in 250 mOsm Mannit lagen die Werte der beiden Sorten nicht sehr weit voneinander entfernt. Allerdings wurden bei Sorte L in Versuch A 377 ± 2 mOsm gemessen, bei Versuch B waren es schon deutlich höhere 514 ± 4 mOsm. Wie erwähnt lagen jedoch die beiden Werte der Sorte J sehr nah an den jeweiligen der obigen Sorte. Bei Versuch A wurden hier 415 ± 3 mOsm osmotischer Wert der Wurzel gemessen, bei Versuch B waren es 503 ± 2 mOsm.

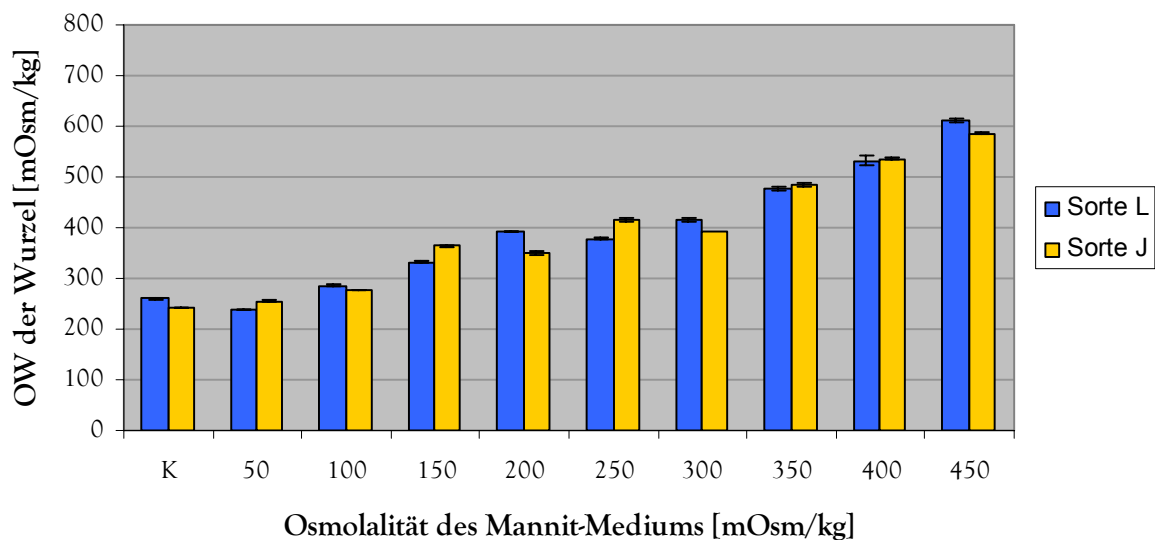
Die Messung in 300 mOsm ergab in Versuch A für Sorte L einen osmotischen Wert der Wurzel von 416 ± 3 mOsm. In Versuch B wurden 628 ± 27 mOsm des Wurzelpresssaftes gemessen. Sorte J hatte in dieser Konzentration von Mannit in Versuch A einen Wert von 392 mOsm. Bei Versuch B wurden deutlich höhere 584 ± 3 mOsm gemessen.

In 350 mOsm betrug der osmotische Wert der Wurzeln der Sorte L in Versuchsreihe A 477 ± 4 mOsm. In Versuchsreihe B war der entsprechende Wert 619 ± 6 mOsm. Sorte J hatte in dieser Konzentration von Mannit in Versuch A einen osmotischen Wert von 485 ± 4 mOsm der Wurzel. In Versuch B wurden hier 600 ± 3 mOsm gemessen.

Der osmotische Wert der Wurzel der Sorte L betrug in 400 mOsm Mannit in Versuch A 532 ± 8 mOsm. In Versuch B wurden deutlich höhere 672 ± 2 mOsm gemessen. In Versuch

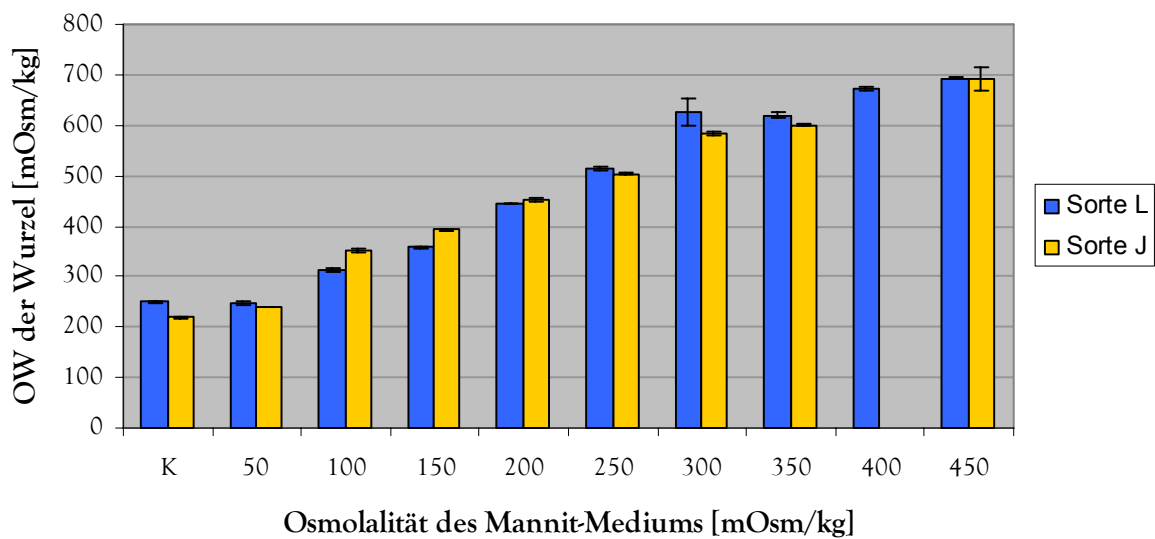
A war der osmotische Wert der Wurzeln der Sorte J 536 ± 2 mOsm. In Versuch B konnte der osmotische Wert des Wurzelpresssaftes aus technischen Gründen nicht gemessen werden.

In 450 mOsm Mannit hatte der Wurzelpresssaft der Sorte L bei Versuch A einen osmotischen Wert von 613 ± 5 mOsm und bei Versuch B einen von 693 ± 3 mOsm. Sorte J hatte in Versuch A einen osmotischen Wert von 585 ± 5 mOsm. Bei Versuch B lag der gemessene Wert des Wurzelpresssaftes bei 692 ± 22 mOsm.



Grafik 3: Osmotischer Wert der Wurzeln nach 48 Stunden in verschiedenen Mannit-Konzentrationen (gespült)

In Versuchsansatz A (bei welchem die Keimlinge nach dem Wachstum im Medium zusätzlich kurz mit A. dest. abgespült und erst dann abgetupft wurden) war die Osmolalität der Wurzeln immer um ca. 150 bis 200 mOsm höher als die des jeweiligen Mediums (siehe Grafik 3).



Grafik 4: Osmotischer Wert der Wurzeln nach 48 Stunden in verschiedenen Mannit-Konzentrationen (ungespült)

In Versuchsansatz B (bei welchem die Keimlinge direkt aus dem Medium kommend abgetupft wurden) lagen die gemessenen osmotischen Werte der Wurzeln konstant um ca. 200 bis 250 mOsm über den Osmolalitäten des jeweiligen Mediums (siehe Grafik 4). Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den Sorten L und J zu erkennen.

Bezüglich des osmotischen Wertes der Wurzeln in Abhängigkeit von der Osmolalität des Mediums konnte zwischen den Sorten L und J nach 48 Stunden kein deutlicher Unterschied festgestellt werden. In beiden Sorten stieg der osmotische Wert der Wurzel mit der Erhöhung der Konzentration des Mediums, in welchem sie wuchsen. Interessant ist, zu beobachten, dass der osmotische Wert der wachsenden Wurzeln bei beiden Sorten (und beiden Versuchsansätzen) mit einem relativ konstanten Wert über der jeweiligen Konzentration des Mediums lag. Generell lagen die gemessenen osmotischen Werte der Wurzeln bei Versuch B höher. Interessant ist jedoch, dass dieser Unterschied sich erst ab einer Osmolalität von 200 mOsm des Mediums zeigte. Unter dieser Konzentration verhielten sich die Wurzeln durchaus ähnlich.

3.2.3. Wurzelwachstum in Natriumchlorid

Nach 24 Stunden in A. dest. bildeten die Keimlinge beider Sorten längere Wurzeln aus, als im Phosphatpuffer. Bei Sorte L waren die Wurzeln im Durchschnitt $42,7 \pm 16,2$ mm lang und ihre Masse betrug $10,2 \pm 4,5$ mg. Bei Sorte J betrug die mittlere Wurzellänge pro Keimling nach derselben Zeit $42,9 \pm 19,5$ mm und die Wurzelmasse lag bei $10,0 \pm 4,6$ mg.

In 200 mOsm NaCl bildeten die Keimlinge der Sorte L Wurzeln mit insgesamt $10,6 \pm 9,0$ mm Länge. Diese hatten eine Masse von $3,1 \pm 2,8$ mg. Sorte J bildete Wurzeln mit einer mittleren Länge von $17,9 \pm 9,4$ mm, deren Masse im Durchschnitt $5,3 \pm 2,6$ mg betrug.

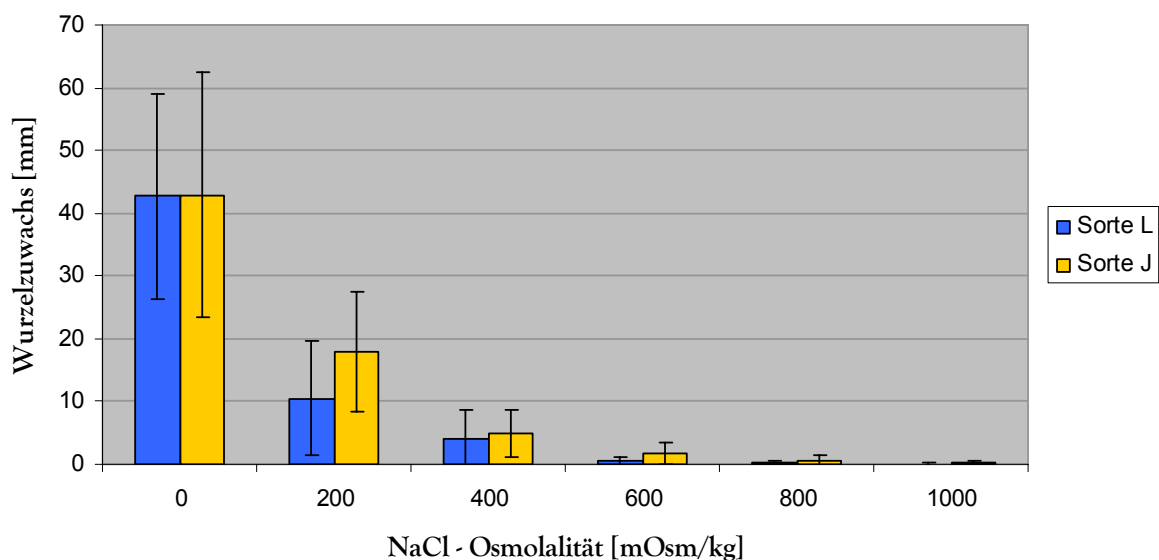
Die in 400 mOsm NaCl gekeimten Weizenkörner der Sorte L bildeten Wurzeln mit einer Gesamtlänge von nur noch $3,9 \pm 4,7$ mm und einer Wurzelmasse von $1,1 \pm 1,8$ mg pro Keimling aus. Die längsten gemessenen Wurzeln eines Keimlings hatten eine Länge von insgesamt 19 mm. Sorte J bildete Wurzeln mit durchschnittlich $4,9 \pm 3,8$ mm Länge. Hier waren die längsten Wurzeln eines Keimlings 13 mm lang. Die Wurzelmassen waren im Allgemeinen so verschwindend, dass sie nicht mehr gemessen wurden. Bei dieser Streuung ist auch in dieser Konzentration kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Sorten erkennbar.

Die in der hohen Konzentration von 600 mOsm NaCl gekeimten Weizenkörner der Sorte L konnten zu einem großen Teil gar keine Wurzeln mehr ausbilden. Die längste Gesamtwurzellänge pro Keimling betrug 3 mm, wobei sich selten mehr als eine Wurzel bildete. Die mittlere Länge der hier gewachsenen Wurzeln betrug $0,5 \pm 0,7$ mm pro Keimling. Auch bei Sorte J konnten in 600 mOsm viele Keimlinge überhaupt keine Wurzeln ausbilden. Hier betrug das Maximum an Gesamtwurzellänge pro Keimling 6 mm und die mittlere Wurzellänge betrug $1,7 \pm 1,7$ mm, was jedoch bei der hohen Streuung nicht signifikant höher war, als bei der Sorte L. Auch hier konnten sich fast nie drei Keimwurzeln ausbilden.

In 800 mOsm NaCl konnten die Keimlinge der Sorte L wie erwartet nur noch sehr vereinzelt Wurzeln ausbilden. Die meisten Keimlinge veränderten sich äußerlich betrachtet in den 24 Stunden überhaupt nicht, bildeten überhaupt keine Wurzeln aus. Einige Keimlinge bildeten minimal sichtbare Wurzelansätze, die höchste gesamte Wurzellänge pro Keimling betrug 3 mm. Der Mittelwert der Wurzellängen pro Keimling lag jedoch bei nur noch $0,3 \pm 0,4$ mm.

Bei Sorte J konnten noch etwas mehr Keimlinge Wurzeln ausbilden, hier lag die maximale Wurzellänge bei 6 mm, der Mittelwert betrug $0,5 \pm 0,8$ mm Wurzellänge pro Keimling.

Der Vollständigkeit halber wurden auch die in 1000 mOsm NaCl gesetzten Weizenkörner auf ihr Wurzelwachstum untersucht. Bei Sorte L war bei 4 von 36 Weizenkörnern ein minimaler Ansatz von Wurzeln sichtbar, die restlichen 32 Karyopsen hatten sich äußerlich betrachtet seit dem Zeitpunkt des Überführens in die Petrischalen überhaupt nicht verändert. Die durchschnittliche Wurzellänge betrug hier $0,1 \pm 0,3$ mm. Bei Sorte J waren es 7 Karyopsen von den untersuchten 36, bei denen ein minimaler Ansatz einer Wurzel sichtbar war. So entstand ein Mittelwert von $0,2 \pm 0,4$ mm Wurzellänge pro Keimling. Praktisch gesehen kann also bei dieser hohen Konzentration von NaCl bei keiner der untersuchten Sorten von Wurzelwachstum mehr gesprochen werden.



Grafik 5: Wurzelzuwachs von L und J nach 24 Stunden in NaCl verschiedener Konzentrationen (ungespült)

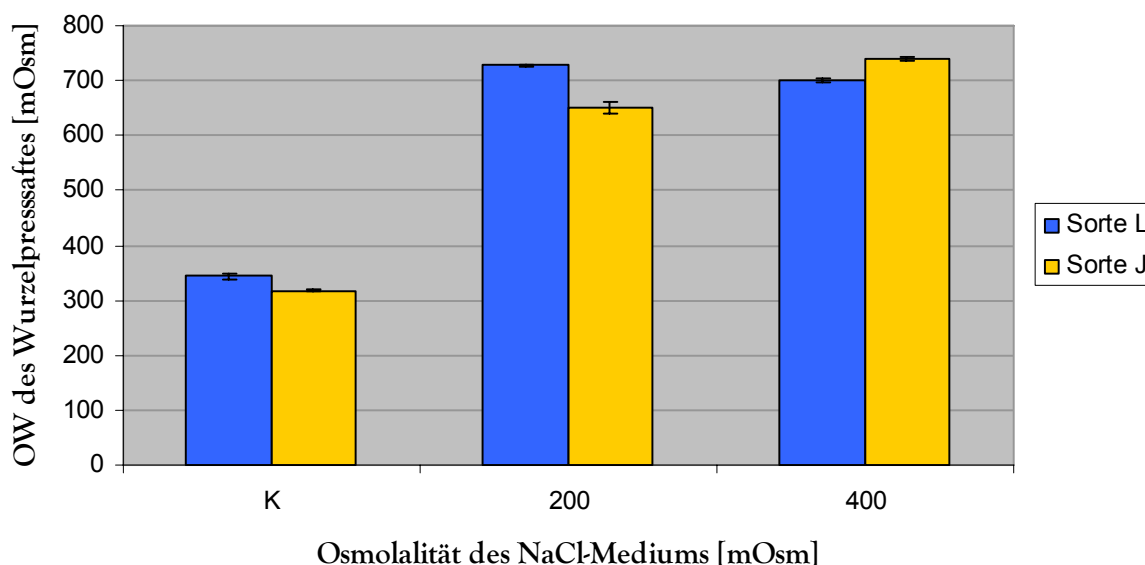
Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass bezüglich des Wurzelwachstums in verschiedenen Konzentrationen von NaCl der Unterschied zwischen den Sorten L und J zwar nicht signifikant war, die Sorte J jedoch in jeder Konzentration im Durchschnitt längere Wurzeln ausbildete als die Sorte L. Mit steigender NaCl-Konzentration sank bei beiden Sorten die mittlere Wurzellänge pro Keimling. Ab 600 mOsm NaCl konnten beide Sorten so gut wie keine Wurzeln mehr ausbilden (siehe Grafik 5).

3.2.4. OW der Wurzeln in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration

Bei den geringen Presssaftmengen, die bei diesem Versuch gewonnen wurden, war es schwierig, den osmotischen Wert genau zu ermitteln. Die Wurzeln wurden bei diesem Versuch vor der Messung des osmotischen Wertes mit A. dest gespült und abgetupft.

Der osmotische Wert der Wurzeln betrug in 200 mOsm NaCl bei der Sorte L $728 \pm 0,7$ mOsm. Die Wurzeln der Sorte J wiesen in derselben Konzentration einen osmotischen Wert von $650 \pm 11,4$ mOsm auf. Beide Sorten wiesen also schon bei dieser Salzkonzentration einen stark erhöhten osmotischen Wert auf.

Auch in 400 mOsm war der osmotische Wert der Wurzeln beider Sorten stark erhöht. Bei Sorte L betrug der osmotische Wert des Wurzelpresssaftes $700 \pm 3,1$ mOsm. Bei Sorte J wurde ein osmotischer Wert von $739 \pm 3,6$ mOsm gemessen.



Grafik 6: Osmotischer Wert der Wurzeln von L und J in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration

Es war auch bei diesem Versuch kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden untersuchten Sorten zu erkennen (siehe Grafik 6). Allerdings fällt auf, dass beide Sorten schon bei einer Osmolalität des Mediums von 200 mOsm einen sehr stark erhöhten osmotischen Wert der Wurzel aufwiesen, welcher sich jedoch bei Verdoppelung der Osmolalität auf 400 mOsm des Mediums kaum mehr veränderte.

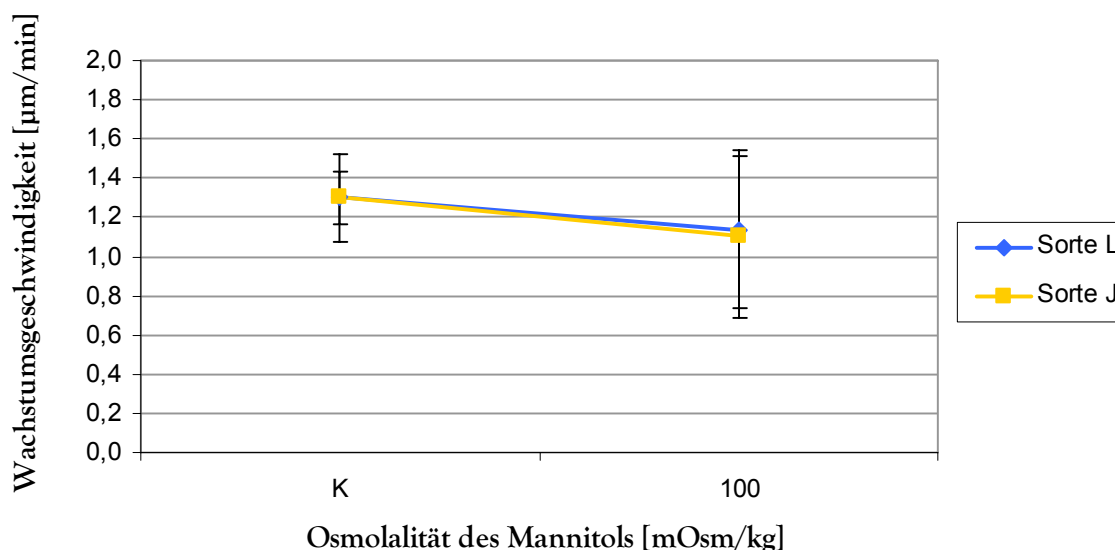
3.3. Vergleichende Analysen des Wurzelhaarwachstums

3.3.1. Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit

Zu Beginn der Arbeit galt es, den osmotischen Wert der Wurzelhaare beider Weizensorten zu ermitteln. Dazu wurden Keimlinge in gestufte Lösungen von Mannitol überführt und beobachtet. Da sich jedoch herausstellte, dass die Wurzelhaare untereinander sehr unterschiedlich auf die jeweilige Konzentration reagierten und sich anhand dieser Untersuchungen keine Aussage über das Verhalten der Wurzelhaare in Mannit machen ließ, wurden in jeder Konzentration rund 10 Wurzelhaare jeweils vor und nach dem Lösungswechsel individuell untersucht. Aus diesem Grund werden die Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit je Konzentration in einer separaten Grafik dargestellt, welche den Mittelwert aus diesen ca. 10 untersuchten Wurzelhaaren je Konzentration darstellt.

3.3.1.1. 100 mOsm

Die untersuchten Wurzelhaare der Sorte L wuchsen im Puffer mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$. Nach dem Lösungswechsel auf 100 mOsm Mannit betrug die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit derselben Wurzelhaare $1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$, also nicht signifikant weniger (siehe Grafik 7).



Grafik 7: Reaktion der Wurzelhaare der Sorten L und J auf 100 mOsm Mannit

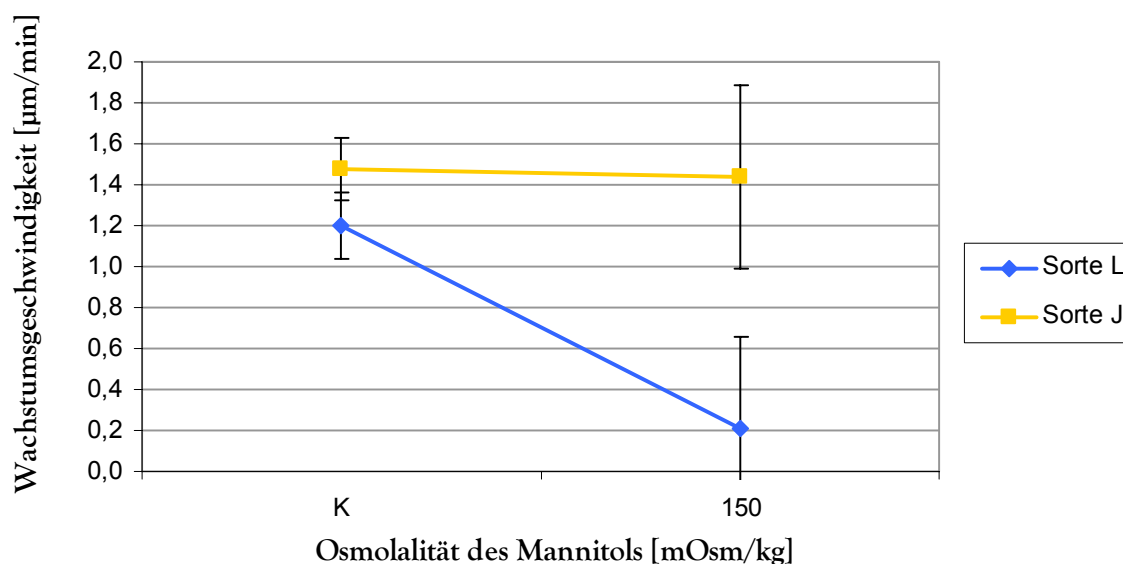
Die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare der Sorte J betrug im Puffer ebenfalls $1,3 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ und nach dem Lösungswechsel wuchsen dieselben Wurzelhaare ebenfalls mit einer Geschwindigkeit von $1,1 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ weiter. Auch die Wurzelhaare dieser Sorte veränderten also ihr Wachstum durch das Mannitol nicht signifikant.

Die Wurzelhaare beider Sorten behielten sowohl ihre verkehrte Springbrunnenströmung, als auch ihre Wachstumsrichtung und -geschwindigkeit bei. Nur sehr wenige Zellen bildeten eine leichte keulenartige Verdickung an ihrer Spitze aus.

3.3.1.2. 150 mOsm

Die Wurzelhaare der Sorte L zeigten hier vor dem Lösungswechsel eine Wachstumsgeschwindigkeit von $1,2 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ und wuchsen danach in der 150 mOsm Mannitlösung mit $0,2 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ signifikant langsamer (Grafik 8).

Die Wurzelhaare der Sorte J hingegen zeigten mit Wachstumsgeschwindigkeiten von $1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ vor, und $1,4 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ nach dem Lösungswechsel keine sofortige Reaktion auf das Osmotikum.



Grafik 8: Reaktion der Wurzelhaare der Sorten L und J auf 150 mOsm Mannit

Auch hier gab es vereinzelt Wurzelhaare, die nach dem Lösungswechsel eine keulenartig verdickte Spitze ausbildeten; einige platzten schließlich an dieser auf (siehe Abb. 18 und Abb. 19).

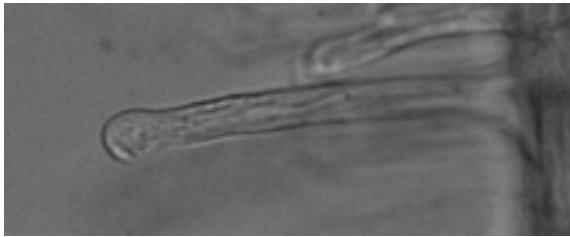


Abb. 18: Wurzelhaar mit keulenförmig verdickter Spitze

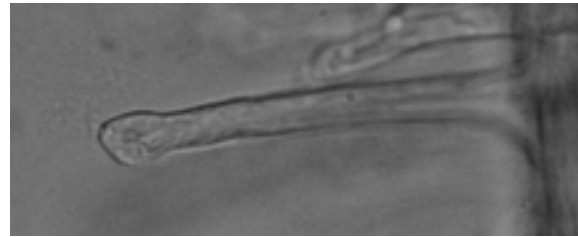
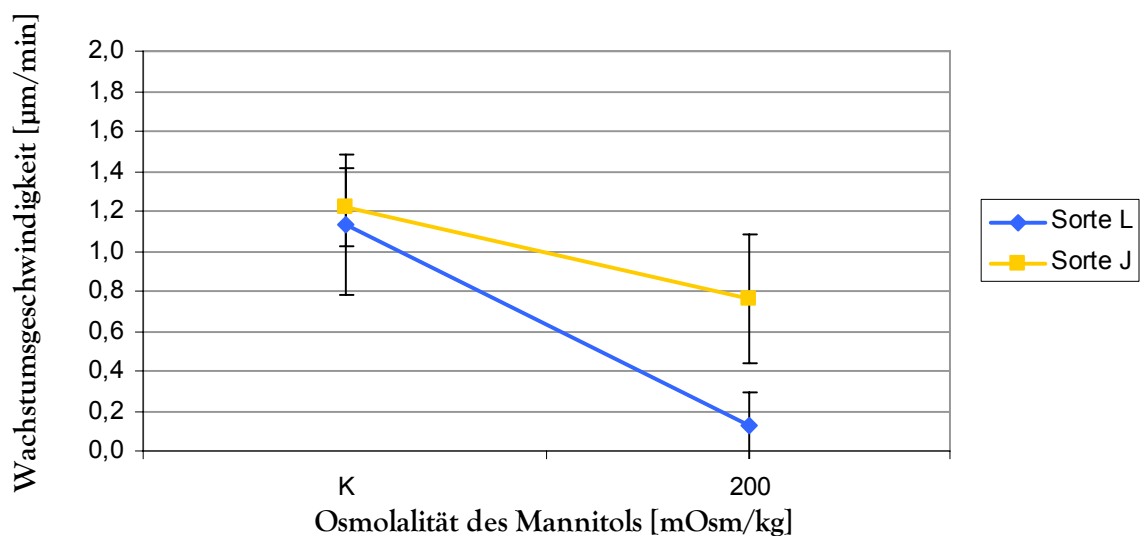


Abb. 19: Wurzelhaar platzt an verdickter Spitze auf

3.3.1.3. 200 mOsm



Grafik 9: Reaktion der Wurzelhaare auf 200 mOsm Mannit

In 200 mOsm war die Reaktion der Wurzelhaare der Sorte L noch deutlicher (siehe Grafik 9): Von einem Wachstum mit durchschnittlich $1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ im Puffer ausgehend reagierten die Wurzelhaare auf das Mannitol mit einer sofortigen Verlangsamung des Wachstums auf durchschnittlich $0,1 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$. Dieser Wert entstand aus dem völligen und sofortigen Wachstumsstopp der meisten Wurzelhaare und dem Weiterwachsen von

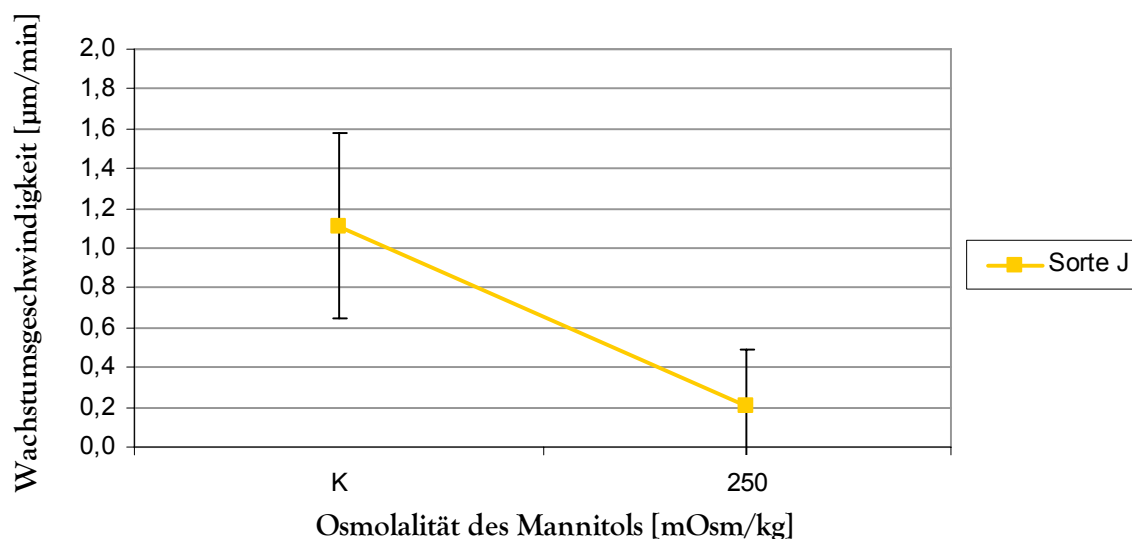
einigen wenigen Wurzelhaaren, welche sich nach 10 bis 15 Minuten nach dem Lösungswechsel „erholten“ und weiterwuchsen. Vereinzelt waren auch hier keulenförmig verdickte Wurzelhaarspitzen zu beobachten.

Die Reaktion der Wurzelhaare der Sorte J fiel weniger stark aus: Im Puffer noch wuchsen sie mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich $1,2 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$. In der Mannitlösung jedoch verlangsamte sich ihr Wachstum auf $0,8 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$. Einige Zellen starben nach dem Lösungswechsel, bei einigen verdickte sich die Zellwand an der Spitze und sie wuchsen, wenn, dann nur noch seitlich davon verzweigt weiter.

3.3.1.4. 250 mOsm

Nach der Überführung der Wurzelhaare vom Phosphatpuffer in 250 mOsm Mannit sind die meisten Wurzelhaare der Sorte L gestorben. Dabei verdickte sich die Wurzelhaarspitze erst keulenartig, bis die Zellwand dem Druck nicht mehr standhielt und an der Spitze platzte.

Die Sorte J verlangsamte in dieser Konzentration ihr Wurzelhaarwachstum sehr stark. Im Durchschnitt wuchsen die Wurzelhaare nach dem Lösungswechsel nur noch mit $0,2 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ anstatt der $1,1 \pm 0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ zuvor im Puffer (Grafik 10).

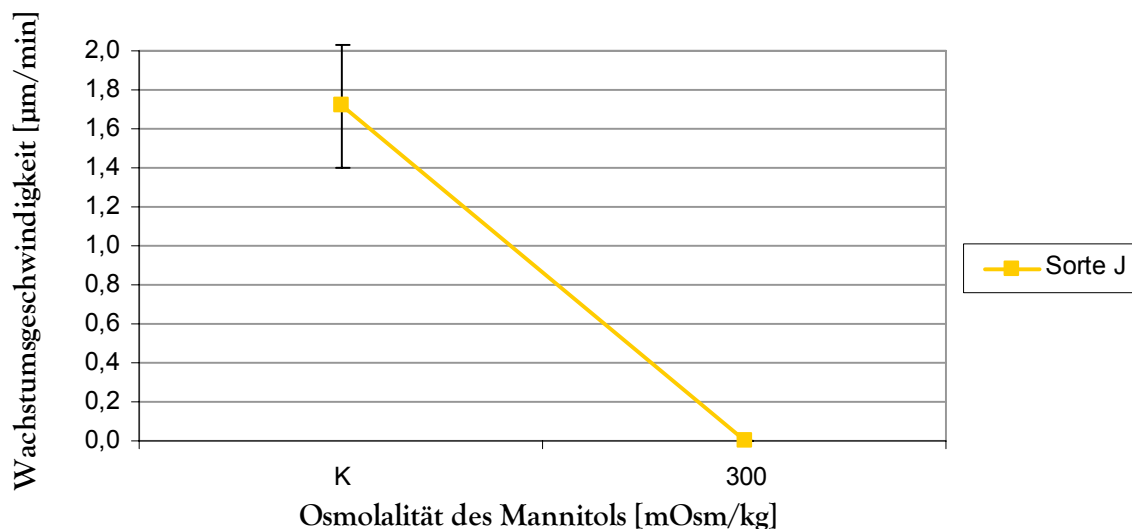


Grafik 10: Reaktion der Wurzelhaare der Sorte J auf 250 mOsm Mannit

3.3.1.5. 300 mOsm

Als Reaktion auf 300 mOsm Mannit stoppte schließlich auch die Sorte J ihr Wurzelhaarwachstum. Die untersuchten Wurzelhaare, welche im Phosphatpuffer noch eine Wachstumsgeschwindigkeit von $1,7 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ aufwiesen, konnten hier überhaupt nicht mehr wachsen (siehe Grafik 11). Direkt nach dem Lösungswechsel verschwand in den Wurzelhaarspitzen die *Vesicle-rich region* und die Vakuole reichte bis ganz in die äußerste Spitze. Die *Vesicle-rich region* konnte sich allerdings nach 15 - 30 Minuten im Osmotikum neu bilden und nach 2 Stunden konnten einige der Wurzelhaare an ihrer alten Spitze wieder weiterwachsen.

Bei beiden Sorten zeigten einige Wurzelhaare nach ca. 30 Minuten in 300 mOsm Mannitol leichte Plasmolyse.



Grafik 11: Reaktion der Wurzelhaare der Sorte J auf 300 mOsm Mannit

3.3.1.6. ≥ 350 mOsm

Da bei 300 mOsm Mannit das Wurzelhaarwachstum beider Sorten stoppte, wurden ab 350 mOsm die Wurzelhaare auf Plasmolyse untersucht. Die Plasmolyseform bei allen untersuchten Wurzelhaaren war konvex (siehe Abb. 20), bei sehr starken Osmotika waren in seltenen Fällen auch Teilprotoplasten zu erkennen (Kap. 1.5.3.2).

In 350 mOsm fand nach ungefähr einer Stunde in den Wurzelhaaren beider Sorten leichte Plasmolyse (welche als Grenzplasmolyse bezeichnet werden kann) statt. Die *Bulges* zeigten in dieser Osmolalität jedoch bei beiden Sorten keine Plasmolyse.

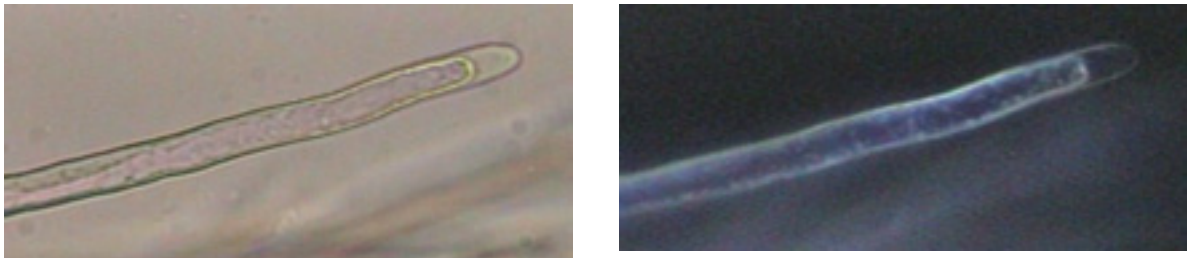


Abb. 20: Plasmolysiertes Wurzelhaar der Sorte L nach 24 Stunden in 400 mOsm Mannit. Hellfeld- und Dunkelfeldaufnahme

Zum Vergleich zu den Wurzelhaaren wurden auch andere Wurzelzellen beobachtet. In 350 mOsm konnte jedoch auch nach einer Stunde weder in den meristematischen Zellen der Wurzelspitze noch in der Kalyptra Plasmolyse beobachtet werden.

Die *Bulges* plasmolysierten auch in 400 mOsm Mannit nicht. Die Plasmolyse der Wurzelhaare erfolgte jedoch bereits schneller als in obiger Konzentration und war bei Sorte J nach 30 Minuten bereits so weit fortgeschritten, dass sich die Protoplasten auch im basalen Teil der Zellen von der Zellwand ablösten (siehe Abb. 21).

Schließlich fand auch in den Kalyptrazellen der Sorte J Plasmolyse statt; die Meristemzellen der Wurzelspitze waren jedoch auch in dieser hohen Konzentration von Mannit weiterhin nicht plasmolysiert (siehe Abb. 22).

Bei einer Osmolalität von 450 mOsm Mannitol war in den Wurzelhaaren beider Sorten sofortige Plasmolyse zu erkennen. Bei Sorte L wurde das Osmotikum mit 3 μ M FM 1 auf die Wurzelhaare gegeben. Der Protoplast hatte sich nach 40 Minuten sogar bis in den basalen Teil der Wurzelhaare zurückgezogen. Sorte J wurde in reines gepuffertes Osmotikum ohne FM 1 gegeben. Hier zog sich der Protoplast bereits nach 20 Minuten bis in den basalen Teil der Rhizodermiszelle zurück.

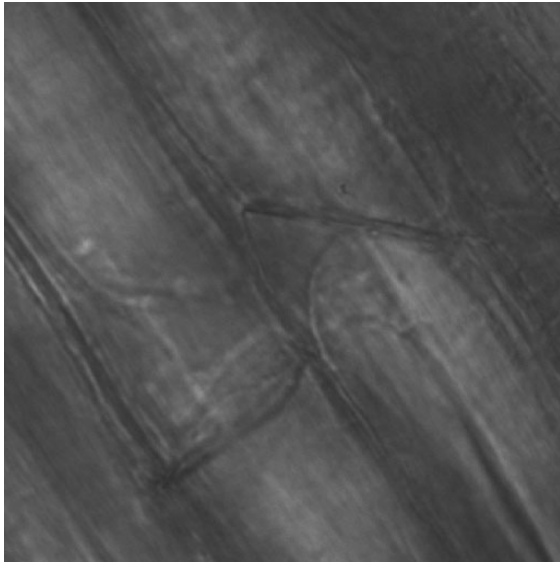


Abb. 21: Plasmolyzierte Rhizodermiszelle der Sorte J in 400 mOsm Mannit und 3 μ M FM 1-43

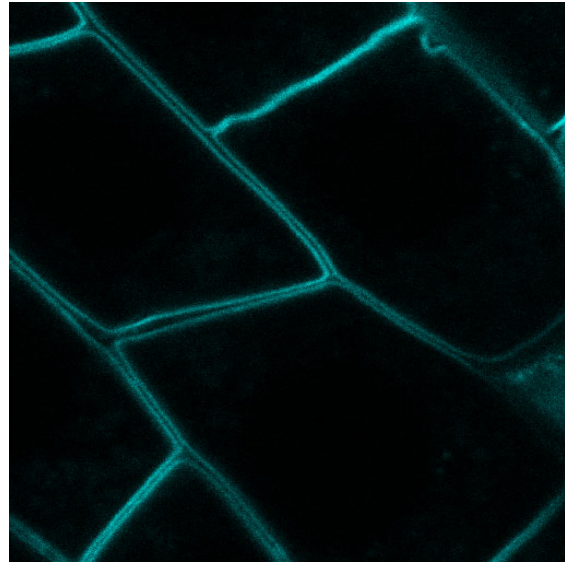


Abb. 22: Unplasmolyzierte meristematische Zellen der Wurzelspitze von Sorte J in 400 mOsm Mannit und 3 μ M FM 1-43

Die meristematischen Zellen der Wurzelspitze blieben auch in 500 mOsm Mannit bei beiden Sorten weiterhin unplasmolyziert.

In 550 mOsm Mannit trat schließlich auch in den meristematischen Zellen der Wurzelspitze der Sorte L Plasmolyse ein.

In 600 mOsm Mannit war auch in den abgeschülferten Kalyptrazellen der Sorte L Plasmolyse zu erkennen. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen den Plasmolysegrad der Rhizodermiszellen und der Wurzelhaare in 600 mOsm Mannit.

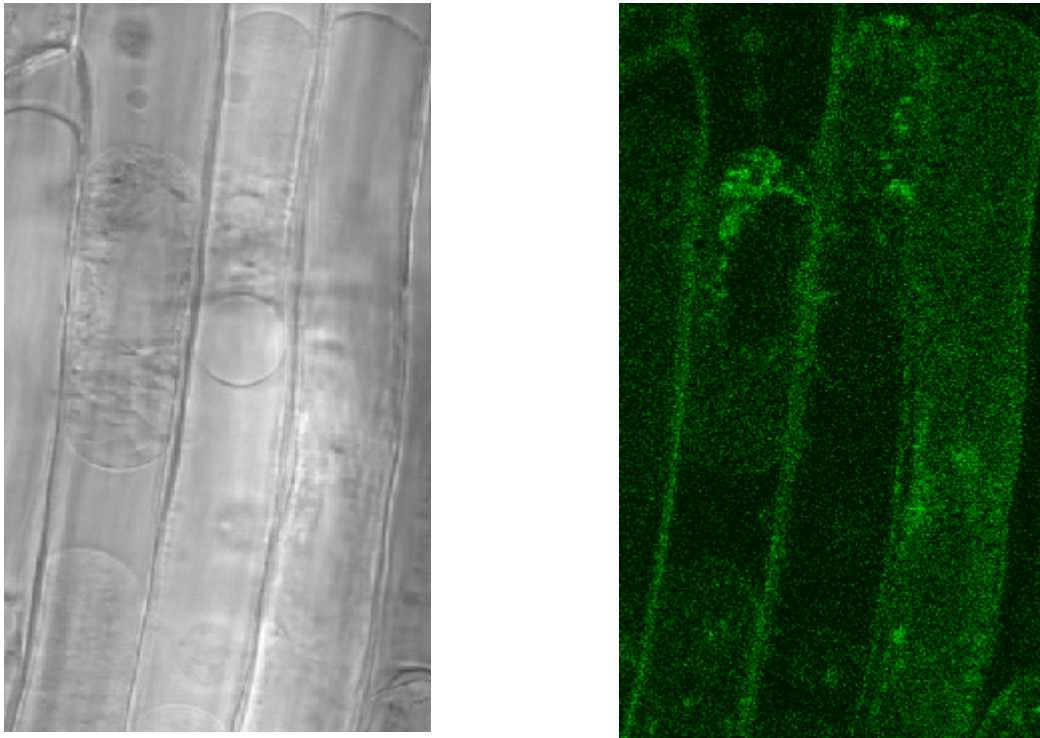


Abb. 23: In 600 mOsm Mannit plasmolysierte Rhizodermiszellen der Sorte L, mit 3 μ M FM 1-43 gefärbt. Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme im CLSM

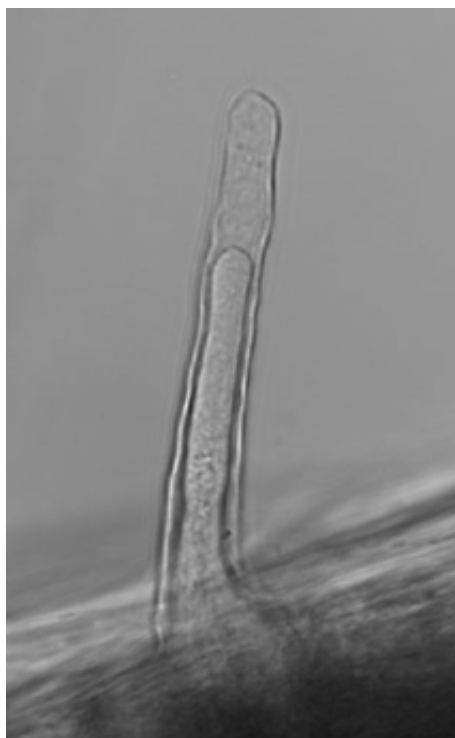
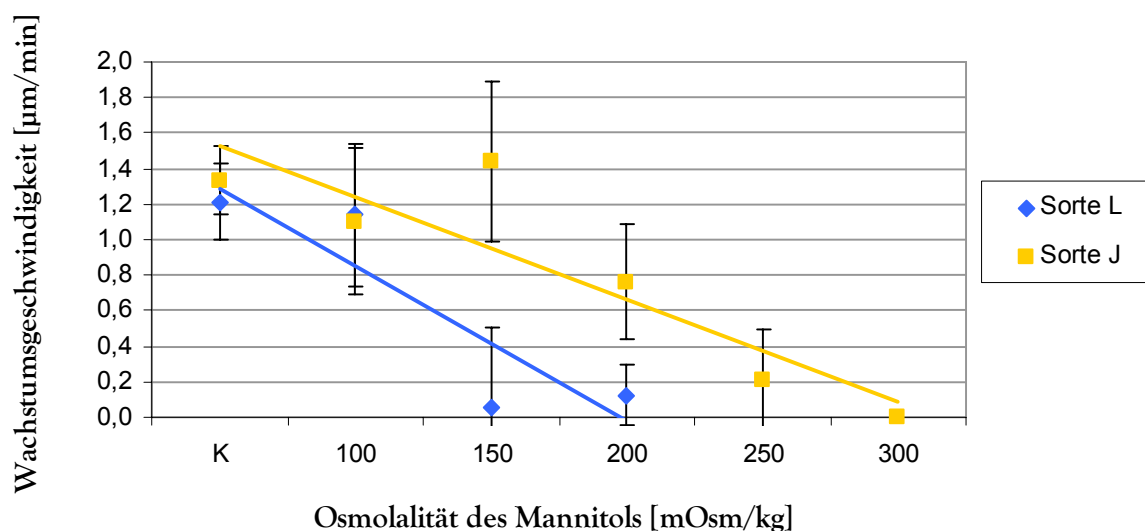


Abb. 24: Plasmolysiertes Wurzelhaar der Sorte L in 600 mOsm Mannit

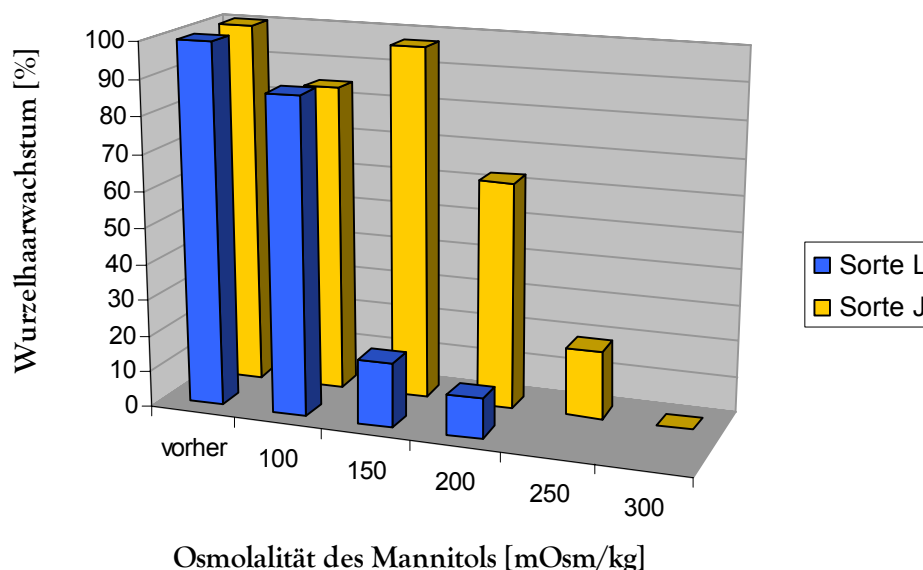
3.3.1.7. Überblick über die Reaktionen der Wurzelhaare auf Mannitol

Werden die Reaktionen der Wurzelhaare der zwei Sorten gegenübergestellt, erkennt man zwar bei beiden eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit bei zunehmender Osmolalität des Mediums, jedoch zeigten dabei die Wurzelhaare der Sorte J generell schnelleres Wachstum in den jeweiligen Konzentrationen, als die der Sorte L. Auch konnten die Wurzelhaare der Sorte J in höheren Konzentrationen von Mannit noch wachsen, in welchen die Wurzelhaare der Sorte L ihr Wachstum bereits gestoppt hatten, obwohl die Wurzelhaare der beiden Sorten in der Kontrolle gleiche Wachstumsgeschwindigkeiten aufwiesen. Die Unterschiede zwischen den beiden Sorten waren ab einer Osmolalität von 150 mOsm signifikant (siehe Grafiken 8 bis 12).



Grafik 12: Zusammenfassung der mittleren Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare der Sorten L und J in steigender Mannitol-Konzentration

Wie aus Grafik 12 ersichtlich ist, wird der Unterschied zwischen L und J mit zunehmender Osmolalität größer. In Grafik 13 wurden die Wachstumsgeschwindigkeiten der Deutlichkeit halber auf relative Geschwindigkeiten umgerechnet. Die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Sorte vor dem Lösungswechsel stellt dabei 100 % dar.



Grafik 13: Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare nach dem Lösungswechsel auf Mannitol im Verhältnis zur Wachstumsgeschwindigkeit vor dem Lösungswechsel

3.3.2. Wachstum der Wurzelhaare in Mannit

Im vorigen Versuch wurde untersucht, wie in Phosphatpuffer gewachsene Wurzelhaare auf plötzliche Überführung in ein Osmotikum reagieren. Jetzt soll in einer vergleichenden Analyse untersucht werden, wie sich Wurzelhaare der beiden Sorten L und J verhalten, die vom *Bulge* an im Osmotikum gewachsen sind, beziehungsweise ob und bis zu welcher Konzentration sie darin wachsen können. Das Ziel dieser Untersuchung ist die Erforschung der langfristigen Wirkung von Osmotika und der Adaptation der Wurzelhaare an osmotischen Stress.

In einer Konzentration von 50 mOsm wuchsen die Wurzelhaare der Sorte L mit einer Geschwindigkeit von $1,0 \pm 0,0 \mu\text{m}/\text{min}$. Die Wurzelhaare der Sorte J wuchsen mit $1,1 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ gleich schnell.

In 100 mOsm konnte bei den Wurzelhaaren der Sorte L eine durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit von $0,8 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ ermittelt werden. Wurzelhaare der Sorte J

wuchsen in diesem Medium ebenfalls mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$.

In 150 mOsm Mannit wuchsen die Wurzelhaare der Sorte L durchschnittlich mit einer Geschwindigkeit von $0,6 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$. Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare von Sorte J betrug hier $0,9 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$.

Im Osmotikum mit 200 mOsm zeigten die Wurzelhaare der Sorte L eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit von $0,3 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$. Die Zellen zeigten keine Abweichung von ihrer normalen Morphologie. Wurzelhaare der Sorte J wuchsen auch in diesem Medium mit $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$. Hier zeigte sich bei einigen Wurzelhaaren eine verdickte Zellwand an der Spitze, doch nach einiger Zeit konnten auch diese Zellen seitlich weiterwachsen.

In 300 mOsm Mannitlösung zeigten die Wurzelhaare der Sorte L eine Wachstumsgeschwindigkeit von nur noch $0,1 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$, wobei manche Wurzelhaare schneller und andere teilweise gar nicht mehr wuchsen. Die Standardabweichung war dadurch stark erhöht. Wurzelhaare der Sorte J hingegen wuchsen auch in dieser Konzentration mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$. Somit wuchsen diese Wurzelhaare signifikant schneller als die der Sorte L.

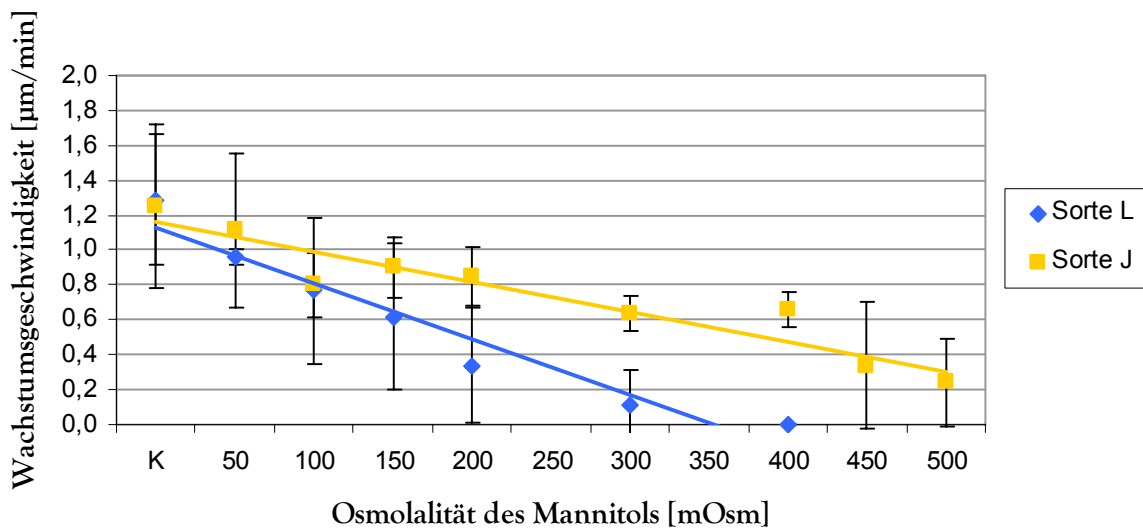
Nach 24 Stunden im 350 mOsm konzentrierten Medium waren ältere Wurzelhaare der Sorte L immer noch plasmolysiert. Es hatten sich allerdings neue Wurzelhaare gebildet, welche unplasmolysiert waren und wuchsen.

In 400 mOsm Mannitol konnten die Wurzelhaare der Sorte L schließlich überhaupt nicht mehr wachsen. Häufig war eine verlangsamte Organellenströmung zu erkennen, vereinzelt war sie auch gar nicht mehr vorhanden. Anders die Wurzelhaare der Sorte J. Diese konnten auch in 400 mOsm Mannitol mit $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$ noch relativ schnell wachsen. Auch zeigten diese Wurzelhaare keine Auffälligkeiten bezüglich ihrer Organellenströmung.

In 450 mOsm wurden nur noch die Werte der Sorte J ermittelt. Hier war die Standardabweichung mit 0,4 relativ groß - einige Wurzelhaare wuchsen fast so schnell wie in der Kontrolle, andere nur langsam oder gar nicht. Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit betrug $0,3 \mu\text{m}/\text{min}$.

In 500 mOsm verlangsamte sich das Wurzelhaarwachstum der Sorte J auf nur noch $0,2 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$, einige Wurzelhaare konnten also sogar noch in dieser starken Konzentration an Mannit (langsam) wachsen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare, die in Mannit gewachsen sind, mit steigender Konzentration des Mediums verlangsamte. Dies gilt für beide Sorten, allerdings wuchsen die Wurzelhaare der Sorte J auch in diesem Versuch jeweils schneller als die der Sorte L. Auch konnten sie in 500 mOsm Mannit noch wachsen, wogegen die Wurzelhaare der Sorte L bereits in 400 mOsm Mannit kein Wachstum mehr aufwiesen (siehe Grafik 14).



Grafik 14: Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare nach 24 Stunden in Mannitol

3.4. Endo- und Exocytose in Wurzelhaaren

3.4.1. Endocytotische Aufnahme von *Lucifer Yellow*

Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob in den Wurzelhaaren von *Triticum aestivum* eine Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes *Lucifer Yellow* durch Endocytose stattfindet.

Dazu wurden verschiedene Farbstoffkonzentrationen und Einwirkzeiten getestet. Die Wurzelhaare konnten in der Färbelösung gut wachsen. Nach 4 Stunden Einwirkzeit von 200 μM *Lucifer Yellow* war die Fluoreszenz des Außenmediums sehr stark, es war jedoch keine Aufnahme des Farbstoffes durch Endocytosevesikel erkennbar (siehe Abb. 25 und 26:). Da die Fluoreszenz des Außenmediums etwaige Fluoreszenzen des Zellinneren überstrahlt und somit stört, wurde bei 400 μM *Lucifer Yellow* nach 24 Stunden Einwirkzeit mit A. dest ausgewaschen (siehe Abb. 27 und 28). Es war jedoch weder in 200 μM noch in 400 μM eine Aufnahme von *Lucifer Yellow* durch Endocytosevesikel zu beobachten. Die Fotos zeigen keine Fluoreszenz innerhalb der Plasmamembran.

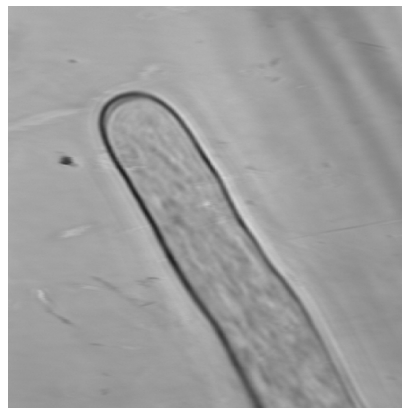


Abb. 25 und 26: Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahme eines Wurzelhaares von *T. aestivum* nach 4 Stunden in 200 μM *Lucifer Yellow*

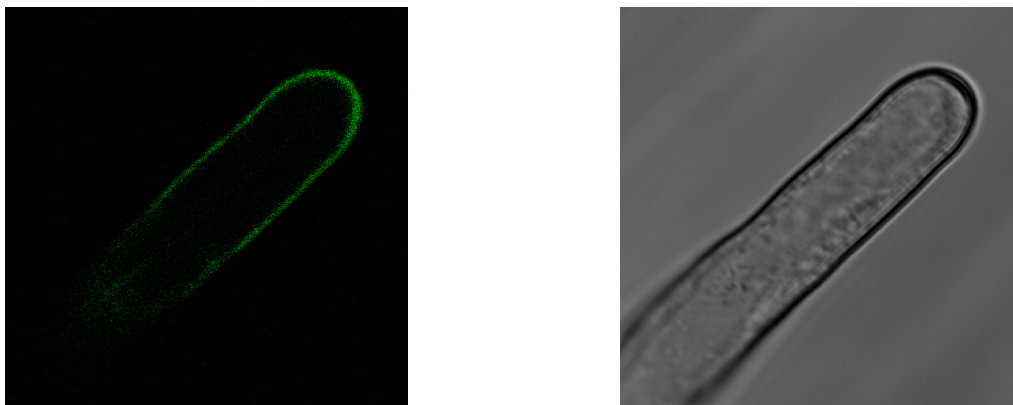


Abb. 27 und 28: Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahme eines Wurzelhaares von *T. aestivum* nach 24 Stunden in 400 μM Lucifer Yellow und anschließendem Auswaschen mit *A. dest.*

3.4.2. Unterbindung der Exocytose

Die Exocytose wurde mit Brefeldin A (BFA) unterbunden, um zu untersuchen, welchen Effekt dies auf die Wurzelhaare hatte. Es wurden verschiedene Konzentrationen von BFA verwendet, teilweise auch in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

BFA-Konzentration	FM-Konzentration	Beobachtung
3,5 μM BFA		Polarität blieb erhalten, Wachstum stoppte nach 30 Minuten.
3,5 μM BFA	4 μM FM 4-64	Vakuole füllte langsam auch die äußerste Spitze aus, es bildeten sich Klumpen im Protoplasten und die Organellenbewegung stoppte - die Wurzelhaare starben. Anm.: In der Fluoreszenzbeobachtung leuchtete das gesamte Plasma, was auf eine zu hohe Farbstoffkonzentration schließen ließ. Der Tod der Wurzelhaare wurde auf die Wirkung des Farbstoffes FM 4-64 zurückgeführt, weshalb im Folgenden

		FM 1-43 als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt wurde.
3,5 μ M BFA	8 μ M FM 1-43	Nach ca. 40 Min. konnten fluoreszierende, sich bewegende, kleinere und größere punktförmige Strukturen (sog. <i>BFA-compartments</i> , (Satiat-Jeunemaitre <i>et al.</i> , 1996) beobachtet werden.
17 μ M BFA	2 μ M FM 1-43	Die <i>BFA-compartments</i> waren nach 40 Minuten - wenn vorhanden - sehr viel kleiner als in 35 μ M BFA.
25 μ M BFA	2 μ M FM 1-43	Wachstumsstopp, <i>BFA-compartments</i> nach ca. 90 Minuten deutlich erkennbar.
35 μ M BFA		Wachstumsstopp; Bildung kleinerer Teilvakuolen, welche auch die Wurzelhaarspitze ausfüllten; nach ca. 30 Minuten deutliche große <i>BFA-compartments</i> .
35 μ M BFA	4 μ M FM 1-43	Nach 90 Minuten in 35 μ M BFA Lösungswechsel. Es bildeten sich gefärbte Endocytosevesikel, welche wuchsen und immer mehr wurden.
35 μ M BFA	2 μ M FM 1-43	Nach 7 - 13 Minuten Bildung von <i>BFA-compartments</i> , Wachstumsstopp. 40 Minuten nach dem Auswaschen mit Phosphatpuffer verringerte sich die Anzahl der <i>BFA-compartments</i> kontinuierlich und es wurden immer mehr kleinere punktförmige Strukturen erkennbar. Auch 30 Minuten nach dem Auswaschen konnte kein erneutes Wachstum der Wurzelhaare beobachtet werden.

<p>35 μM BFA</p>	<p>1 μM FM 1-43</p>	<p>Nach 15 Minuten wanderte die Vakuole näher an die Wurzelhaarspitze, es bildeten sich bewegliche <i>BFA-compartments</i>; das Wachstum der Wurzelhaare stoppte.</p> <p>Endocytose fand auch nach 60 Minuten noch statt.</p>
--	---	---

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bereits eine geringe Konzentration wie 3,5 μM BFA das Wurzelhaarwachstum zum Erliegen brachte und sich die Vakuole bis in die *Vesicle rich region* der Wurzelhaare ausdehnte. Ab einer BFA-Konzentration von 17 μM wurde beobachtet, dass sich innerhalb der Zelle wandernde und immer größer werdende Strukturen, sogenannte *BFA-compartments* bildeten. Die Größe dieser *compartments* nahm mit zunehmender Konzentration von BFA ebenfalls zu. In 35 μM BFA waren sie bereits ca. 10 Minuten nach dem Lösungswechsel deutlich erkennbar. Endocytose konnte trotz gehemmter Exocytose und gestopptem Wachstum noch stattfinden, allerdings erschien sie langsamer bzw. weniger als im Normalfall. Die Wirkung von BFA war reversibel, da auch bei der höchsten Konzentration von 35 μM BFA nach dem Auswaschen die *compartments* kleiner wurden. Eine Wiederaufnahme des Wurzelhaarwachstums war jedoch auch 30 Minuten nach dem Auswaschen noch nicht zu erkennen.

3.4.3. Unterbindung der Exocytose während der Plasmolyse

Dieser Versuch diente zur Optimierung der Methode zur Unterbindung der Exocytose während der Plasmolyse.

Wurzelhaare, welche im Phosphatpuffer gut wuchsen, wurden mit einer gepufferten 35 μM BFA-Lösung versetzt. Innerhalb von 5 Minuten erlag das Wurzelhaarwachstum. Nach einem erneuten Lösungswechsel auf 35 μM BFA und 4 μM FM 1-43 sollte die Fluoreszenz beobachtet werden. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurde erneut mit 35 μM BFA ausgewaschen, es war jedoch fast keine Fluoreszenz sichtbar. Die Organellenströmung war nach wie vor vorhanden.

Um die Fluoreszenz zu verbessern, wurden im nächsten Schritt 35 μM BFA mit 8 μM FM 1-43 verwendet. Es war tatsächlich deutliche Fluoreszenz erkennbar, allerdings platzten die

Wurzelhaare (welche zuvor im Puffer noch mit normaler Geschwindigkeit gewachsen waren) kurz nach dem Lösungswechsel.

Dies wurde auf eine wiederum zu hohe FM 1-43 - Konzentration zurückgeführt, deshalb wurde im folgenden Schritt ein Gemisch aus 35 μM BFA und 4 μM FM 1-43 verwendet, diesmal jedoch ohne den Fluoreszenzfarbstoff auszuwaschen. Die folgenden Bilder (Abb. 29 und 30) entstanden 10 Minuten nach dem Lösungswechsel und zeigen bereits die Bildung von *BFA-compartments*, welche durch diese Konzentration von FM 1-43 deutlich fluoreszieren. Es zeigte sich also, dass kein Auswaschen des Fluoreszenzfarbstoffes notwendig war und dass sogar eine weitere Reduktion der Farbstoffkonzentration auf 2 μM ausreichen könnte.

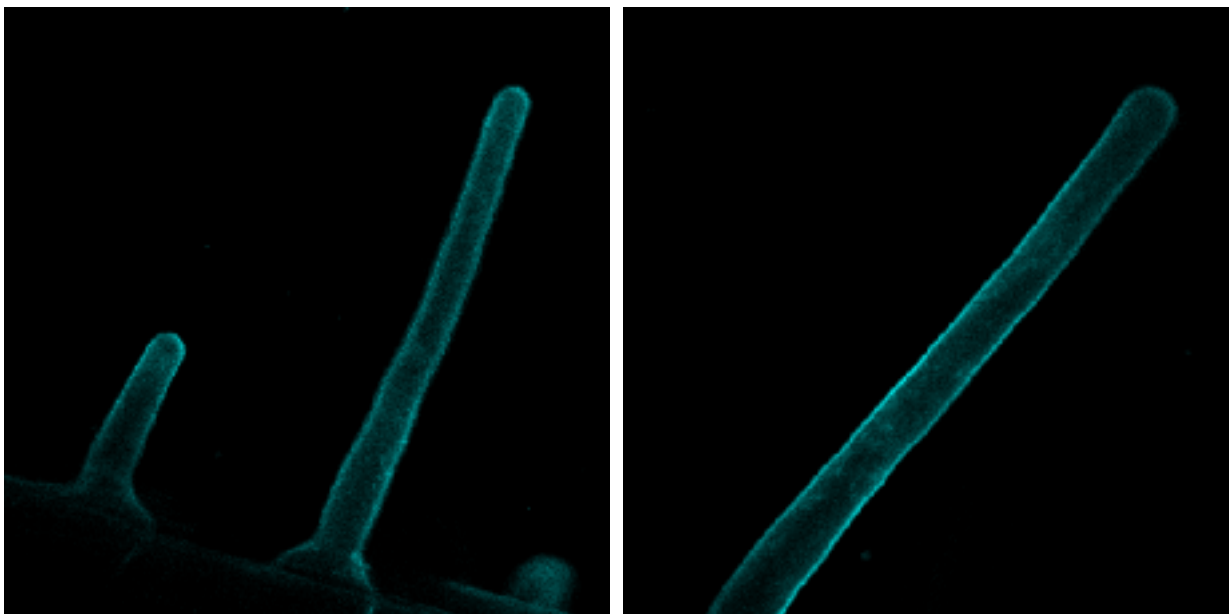


Abb. 29 und 30: Wurzelhaare in 35 μM BFA und 4 μM FM 1-43, 10 Minuten nach Lösungswechsel

Nachdem das optimale Verhältnis von BFA und FM 1-43 ermittelt wurde, konnte das Osmotikum hinzugefügt werden. Es sollten erst Wurzelhaare, die im Puffer normal wuchsen, mit 500 mOsm Mannit plasmolysiert werden, um anschließend mit einem Gemisch von 35 μM BFA und 2 μM FM 1-43 und 500 mOsm Mannit ihre Exocytose zu hemmen und sie im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Die Plasmolyse war jedoch nach Auftragen des Osmotikums so stark (siehe Abb. 31), dass die Zellen bei dem weiteren Lösungswechsel auf 35 μM BFA mit 2 μM FM 1-43 und 500 mOsm Mannit starben.

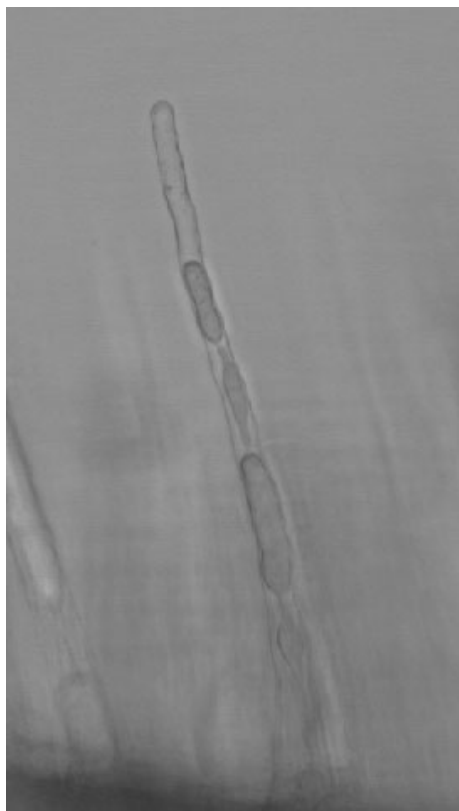


Abb. 31: Stark plasmolysiertes Wurzelhaar mit Teilprotoplasten in 500 mOsm Mannit und BFA

Im folgenden Schritt wurde nach erfolgreicher Prüfung des Wurzelhaarwachstums im Puffer ein Lösungswechsel gleich auf die Mischlösung von 35 μM BFA + 2 μM FM 1-43 + 400 mOsm Mannit vorgenommen. Bereits nach 10 Minuten waren im CLSM Endocytosevesikel zu sehen. Allerdings fand auch 40 Minuten nach dem Lösungswechsel keine Plasmolyse in den Wurzelhaaren statt, obwohl diese in reiner 400 mOsm Mannitlösung (siehe Kapitel 3.3.1.6.) bereits nach wenigen Minuten stattfand. Erste leichte Plasmolyse war erst nach einer Stunde erkennbar. Nach 90 Minuten Einwirkzeit wurde ein erneuter Lösungswechsel auf 35 μM BFA + 400 mOsm Mannit vorgenommen, da wieder eine starke Außenfluoreszenz vorhanden war, welche das Bild störte. 30 Minuten später waren deutliche *BFA-compartments* erkennbar (siehe Abb. 32 und Abb. 33).

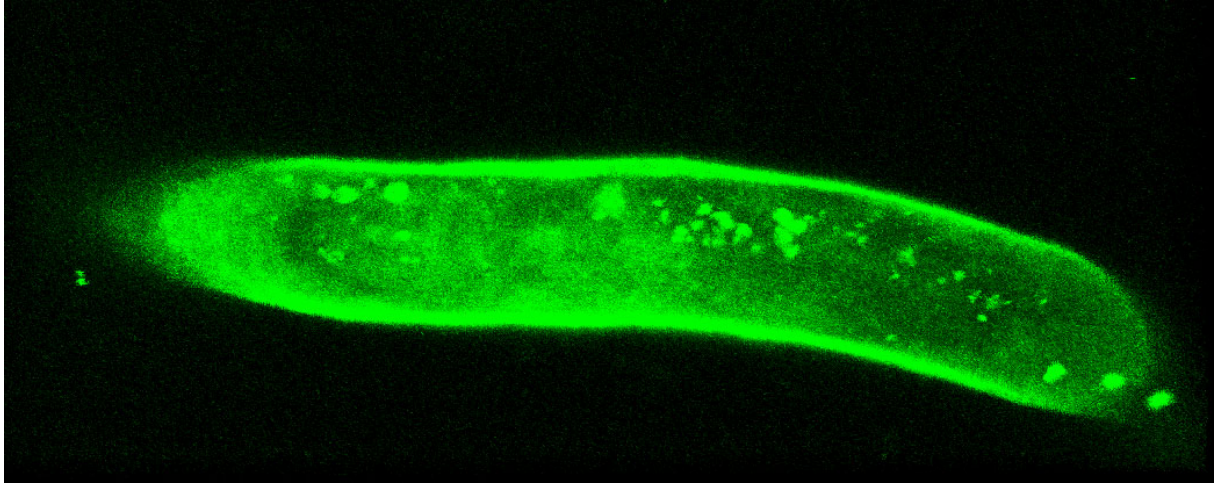


Abb. 32: CLSM-Aufnahme eines Wurzelhaares in 400 mOsm Mannit und BFA



Abb. 33: Univar-Aufnahme eines Wurzelhaares mit BFA-compartments

In der folgenden Tabelle werden die Beobachtungen stichwortartig zusammengefasst:

BFA-Konzentration	FM-Konzentration	Mannit-Osmolalität	Beobachtung
35 μ M BFA	4 μ M FM 1-43 (30 Min. nach Auswaschen)		Wachstumsstopp nach 5 Minuten Organellenströmung vorhanden, Fluoreszenz zu schwach
35 μ M BFA	8 μ M FM 1-43		Deutliche Fluoreszenz, Wurzelhaare platzen jedoch
35 μ M BFA	4 μ M FM 1-43 (ohne Auswaschen)		Bildung von <i>BFA-compartments</i>
35 μ M BFA	2 μ M FM 1-43	500 mOsm Mannit	Starke Plasmolyse
35 μ M BFA	2 μ M FM 1-43	500 mOsm Mannit	Zu stark plasmolysierte Wurzelhaare, Zellen sterben bei Lösungswechsel
35 μ M BFA	2 μ M FM 1-43	400 mOsm Mannit	Endocytosevesikel gebildet, erst nach 60 Minuten leichte Plasmolyse erkennbar
35 μ M BFA		400 mOsm Mannit	30 Minuten nach Lösungswechsel <i>BFA-compartments</i> erkennbar

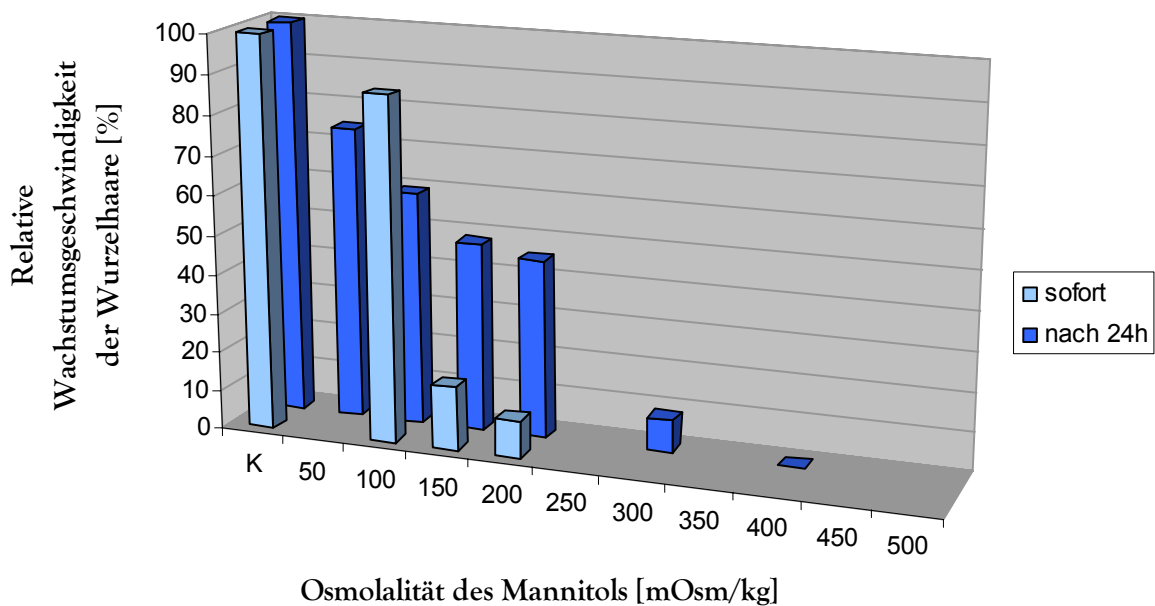
4. DISKUSSION

4.1. Wurzelhaare unter Einwirkung von osmotischem Stress

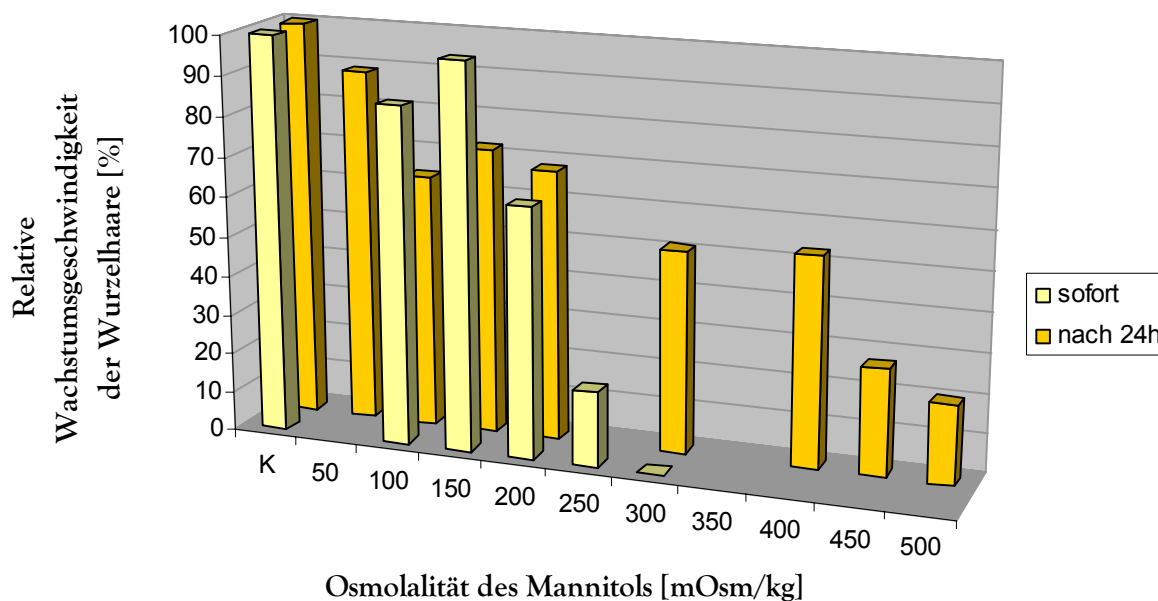
In Phosphatpuffer wachsen Wurzelhaare von Weizen $1,3 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$. Diese Messung wird von Volgger (2004) bestätigt, welcher eine Wachstumsgeschwindigkeit von $1 \mu\text{m}/\text{min}$ bei *Triticum aestivum* beschreibt. Dolan (2001) untersuchte *Arabidopsis* und konnte bei den Wurzelhaaren ebenfalls eine Wachstumsgeschwindigkeit von $1 \mu\text{m}/\text{min}$ feststellen.

Spitzenwachstum benötigt unter anderem Turgordruck (Kropf *et al.*, 1998). Wird der Innendruck der Zellsaftvakuole durch ein hypertonisches Außenmedium verringert, kann daher kein Spitzenwachstum mehr stattfinden. Dies wird auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt: In 300 mOsm oder höher osmotische Mannitlösung überführte Wurzelhaare stoppten ihr Wachstum, welches zuvor im Phosphatpuffer noch mehr als $1 \mu\text{m}/\text{min}$ betragen hatte.

In hypertonischen Medien ist ein Zellwachstum nur möglich, wenn zusätzliche Osmolyte den osmotischen Wert der Vakuole erhöhen und Turgordruck erzeugen. Dies kann entweder durch Zucker aus internen Speichern der Pflanze oder durch Aufnahme osmotisch wirksamer Substanzen von der Außenlösung geschehen. (Zusammengefasst bei Volgger, 2004)

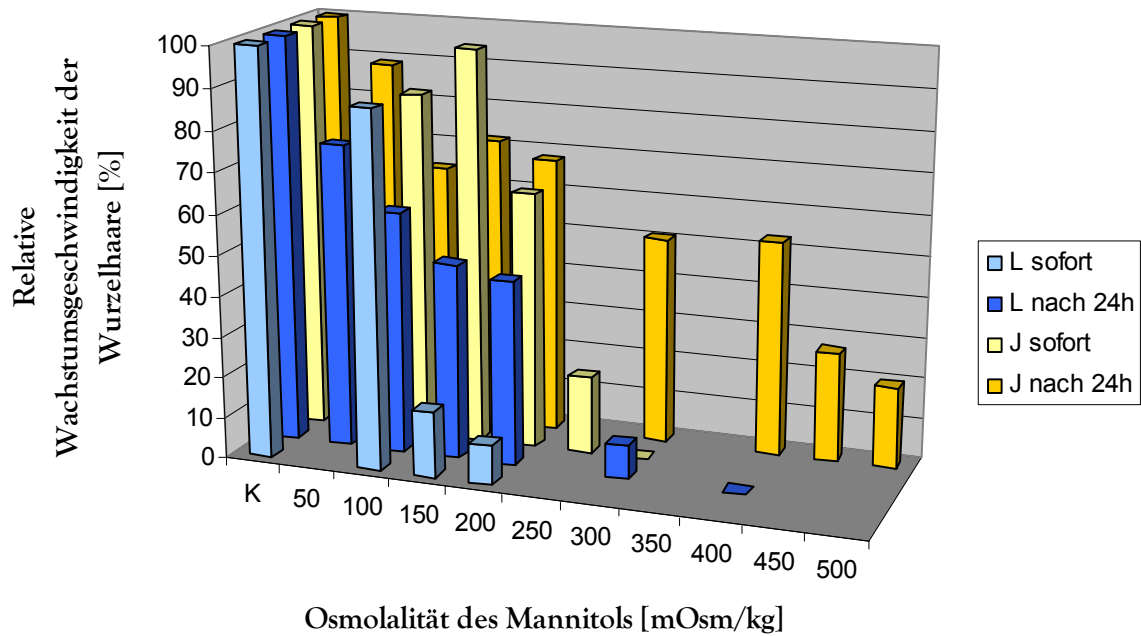


Grafik 15: Vergleich der relativen Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare von Sorte L sofort nach der Überführung bzw. nach 24 Stunden Wachstum in Mannitol



Grafik 16: Vergleich der relativen Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare von Sorte J sofort nach der Überführung bzw. nach 24 Stunden Wachstum in Mannitol

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen (siehe Grafiken 15 bis 17), dass Wurzelhaare, welche sich in Mannit gebildet haben, bis in höhere Osmolalitäten wachsen können, als Wurzelhaare, welche an einen Phosphatpuffer angepasst sind und dann in die jeweilige Mannitol-Lösung gesetzt werden. Wurzelhaare, welche vom Phosphatpuffer in eine hypertonische Mannitol-Lösung überführt werden und dadurch plasmolysieren, können nach 24 Stunden im Mannitol nicht deplasmolysieren und ihr Wachstum nicht erneut aufnehmen. Daher findet man nach 24 Stunden im hypertonischen Mannitol junge, wachsende Wurzelhaare neben älteren plasmolysierten Wurzelhaaren, welche nicht mehr wachsen. Dies kann beispielsweise darauf hindeuten, dass eine Aufnahme von Mannit zur Erhöhung des osmotischen Wertes der Wurzelhaare stattfindet und dass diese Aufnahme bereits in einem früheren Stadium stattfinden muss und später nicht mehr ausreichend Mannit aufgenommen werden kann, um Deplasmolyse und ein erneutes Wachstum zu ermöglichen. Der osmotische Wert der Zellsaftvakuole könnte dabei in einem frühen Stadium (beispielsweise als *Bulge*) festgelegt werden und kann sich womöglich später nicht mehr an stark hypertonische Lösungen anpassen.



Grafik 17: Gegenüberstellung der Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare von L und J sofort nach Lösungswechsel und nach 24 Stunden Wachstum in Mannitol. Um die Werte besser vergleichen zu können, werden die Wachstumsgeschwindigkeiten in % der Wachstumsgeschwindigkeit in der Kontrolle angegeben.

Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Untersuchungsergebnissen von Volgger (2004) überein. Er beschreibt, dass sich die Wurzelhaare nach einer gewissen Zeit an das Medium anpassen und weiterwachsen können. Darum bildet sich ein wurzelhaarfrier Abschnitt auf der Wurzel, welcher mit steigender Konzentration immer länger wird.

Volgger (2004) schreibt jedoch auch, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare in unterschiedlichen Konzentrationen eines osmotischen Mediums konstant bleibt und immer der Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolle entspricht. Dies kann ich nicht bestätigen, denn die vorliegende Untersuchung ergab eine deutliche Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit mit dem Anstieg der Mannitkonzentration. Grafik 17 gibt eine Übersicht darüber, wie schnell die Wurzelhaare im jeweiligen Medium im Verhältnis zur jeweiligen Geschwindigkeit der Kontrolle wuchsen. Bei beiden Sorten und bei beiden Versuchsansätzen ist eine deutliche Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeiten im Vergleich zur Kontrolle eindeutig erkennbar.

Es wurde häufig beobachtet, dass Wurzelhaare, welche vom Phosphatpuffer in Mannitol überführt wurden, sich an ihrer Spitze erst keulenartig verdickten und schließlich platzten.

Bei erster Betrachtung wirkte das verwunderlich, denn wieso platzt ein Wurzelhaar, wenn sein osmotischer Innendruck im Verhältnis zum Außendruck geringer ist als vorher? Eine plausible Erklärung dafür finden wir bei Cram (1984). Er beschrieb, dass die Durchlässigkeit des Plasmalemmas für Mannit höher ist als die des Tonoplasten. Das führt zu einem Anschwellen des Cytoplasmas. In dem vorliegenden Fall schwillt das Cytoplasma so weit an, bis die Zellwand dem entstandenen Druck nicht mehr standhalten kann und schließlich zerplatzt. Diese Beobachtung bei einigen Wurzelhaaren deutet darauf hin, dass Mannit noch schneller aufgenommen wird, als bisher angenommen. Jedoch scheint die Aufnahme von Zelle zu Zelle unterschiedlich schnell stattzufinden. Da Wurzelhaare mit der schnelleren Aufnahme zerplatzen, beinhalten die Ergebnisse nur diejenigen Wurzelhaare, welche Mannit langsamer aufnehmen.

Es ist üblich, zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Zellen die Grenzplasmolyse heranzuziehen. Die hier untersuchten Wurzelhaare der Sorte L stoppten ihr Wachstum bereits bei Überführung in Mannitlösungen zwischen 150 und 200 mOsm. Grenzplasmolyse konnte jedoch erst nach ca. 60 Minuten ab einer Osmolalität von 350 mOsm beobachtet werden. Das bedeutet, dass es einen relativ großen Bereich gibt zwischen der Konzentration, welche einen Wachstumsstopp herbeiführt und der Konzentration, welche Grenzplasmolyse hervorruft. Hier steht das Wurzelhaar sozusagen still; es wächst also nicht mehr, plasmolysiert aber auch noch nicht. Da jedoch das Wachstum nur in hypotonischen Medien stattfinden kann, kann angenommen werden, dass bei 150 - 200 mOsm der isotonische Wert der Zelle erreicht ist. Die relativ große Spanne, bis die Zelle plasmolysiert, könnte auf eine starke Zellwandhaftung des Protoplasten hindeuten. Jedoch übt auch die elastische Zellwand einen Gegendruck auf die Zelle aus, welcher berücksichtigt werden muss. Daher wird angenommen, dass der osmotische Wert der Zelle (in diesem Fall der Wurzelhaare der Sorte L) irgendwo zwischen 150 und 300 mOsm liegt und nicht genau 300 mOsm beträgt. Es ist daher fraglich, ob die Methode der Grenzplasmolyse zur Bestimmung des osmotischen Wertes auch für Wurzelhaare geeignet ist. Auch Volgger (2004) erwähnt, dass die verzögerte Plasmolyse bei Wurzelhaaren die Ergebnisse beeinträchtigen könnte.

4.2. Wurzeln unter Einwirkung von osmotischem Stress

4.2.1. Wurzeln in Mannitol

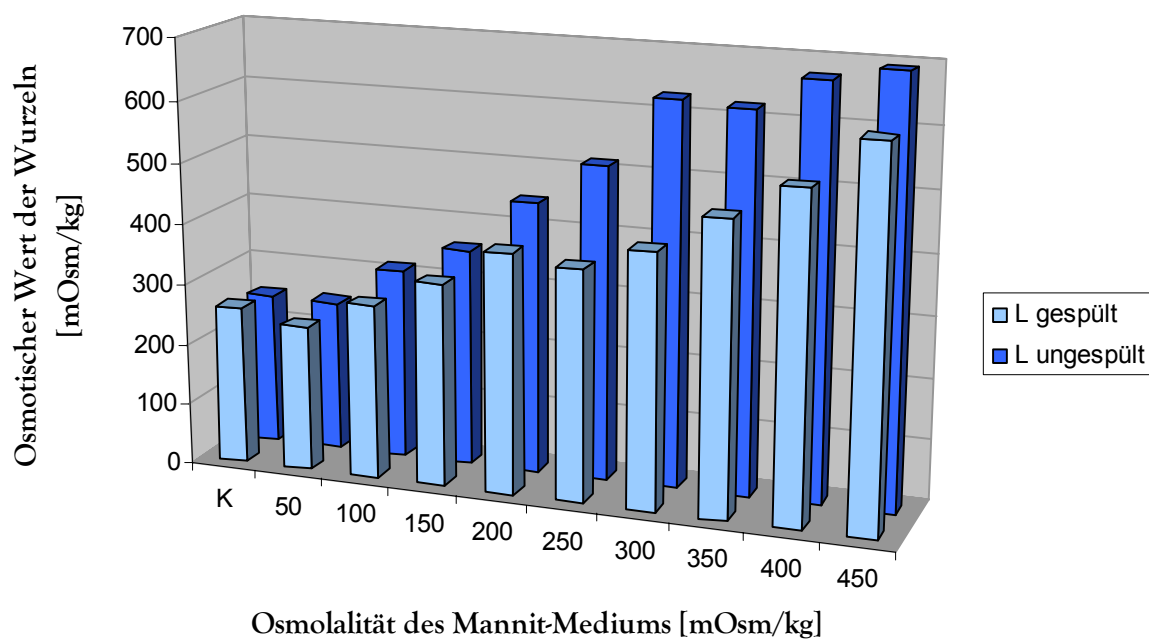
Die Ermittlung des osmotischen Wertes von Wurzeln ist weitaus einfacher als von Wurzelhaaren. Aus Wurzeln kann ein Presssaft gewonnen werden, dessen osmotischer Wert direkt gemessen werden kann. Da jedoch diese Methode von der Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Wurzelhaaren (siehe Kap. 4.1.) stark abweicht, können zwischen den Ergebnissen keine präzisen Vergleiche gemacht werden. Trotzdem erscheint es als wahrscheinlich, dass sich die osmotischen Werte der Wurzeln und der Wurzelhaare nicht maßgeblich voneinander unterscheiden. Da - wie in Kapitel 4.1. behandelt wurde - der osmotische Wert der Wurzelhaare bei Sorte L zwischen 150 und 350 mOsm und bei Sorte J zwischen 250 und 350 mOsm liegt, und die gemessenen osmotischen Werte der Wurzeln (nach 48 Stunden, ungespült) bei Sorte L 250 mOsm, und bei Sorte J 220 mOsm betragen, kann hier zwischen den osmotischen Werten der Wurzeln und der Wurzelhaare kein Unterschied festgestellt werden. Volgger (2004) beschrieb jedoch bei Wurzeln von *Triticum aestivum* einen höheren osmotischen Wert als bei dessen Wurzelhaaren.

Auch im Vergleich der beiden Sorten kann weder in Phosphatpuffer noch in Mannitol ein Unterschied bezüglich der osmotischen Werte der Wurzeln festgestellt werden. Es ist jedoch auffallend, dass der gemessene osmotische Wert der Wurzeln immer deutlich über dem osmotischen Wert des Mediums liegt. Dies ist - wie bereits erwähnt wurde - für das Wachstum, welches Turgordruck benötigt, unbedingt erforderlich. Wie die Grafiken 21 Grafik 21 bis 23 zeigen, lag der osmotische Wert der Wurzeln immer mindestens 100 mOsm über dem des Mediums in welchem die Wurzeln wuchsen.

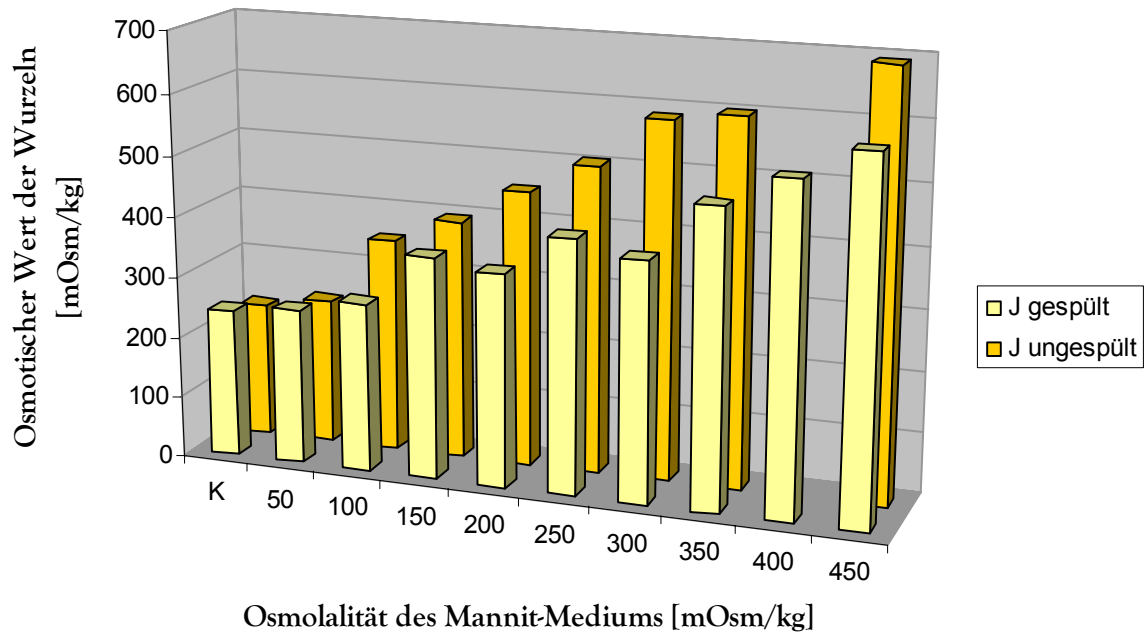
Zwischen den beiden Sorten war kein signifikanter Unterschied bezüglich des Wurzelwachstums festzustellen, jedoch fiel auf, dass beide Sorten in A. dest. deutlich längere Wurzeln ausbildeten als in Phosphatpuffer.

Der methodologische Vergleich bei der Ermittlung des osmotischen Wertes ergab, dass die osmotischen Werte der Wurzeln generell bei Versuch B (ungespülte Wurzeln) höher lagen, als bei Versuch A (gespülte Wurzeln), sich dieser Unterschied jedoch erst ab einer Osmolalität des Mediums von 200 mOsm bzw. 250 mOsm deutlich äußerte. Darunter

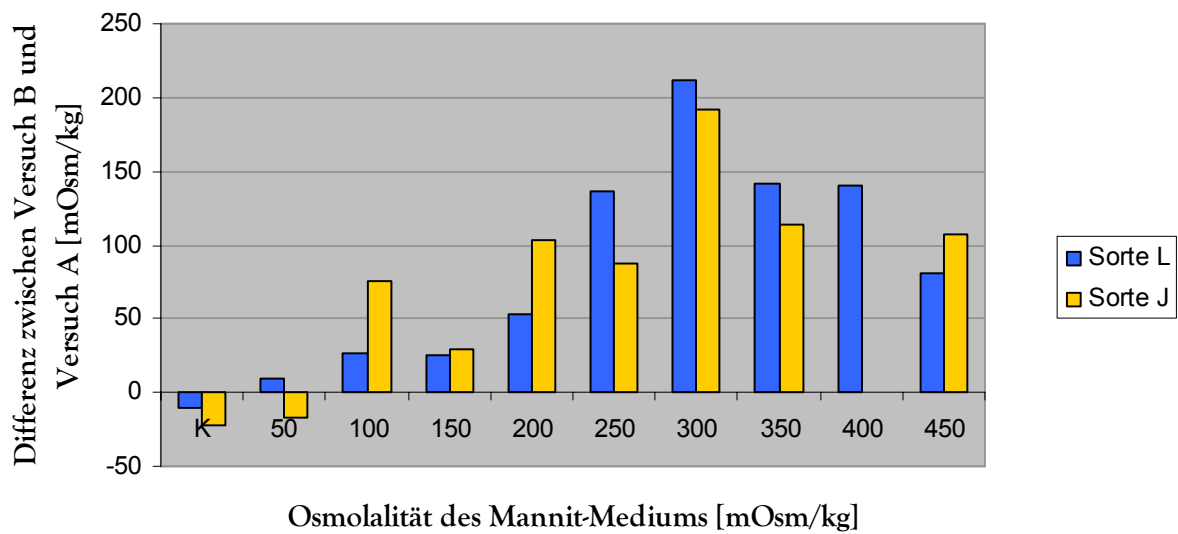
verhielten sich die Wurzelosmolalitäten durchaus ähnlich. Der größte Unterschied zwischen Versuch A und Versuch B war bei beiden Sorten in 300 mOsm Mannit zu erkennen; hier lag bei Versuch B der osmotische Wert bei beiden Sorten um 200 mOsm über dem von Versuch A (siehe Grafik 18 und 19 Grafik 19). Es ist also nicht einfach zu sagen, wie hoch der osmotische Wert der Wurzeln genau ist; wird mit A. dest. gespült, kann trotz anschließendem Abtupfen Wasser auf der Wurzel bleiben und das Ergebnis der Messung nach unten hin verfälschen, wird jedoch nicht gespült, kann auch hier trotz Abtupfen flüssiges Medium an den Wurzeln haften bleiben und so das Ergebnis verfälschen. Es ist daher wichtig, auch hier ein optimales standardisiertes Verfahren zu entwickeln.



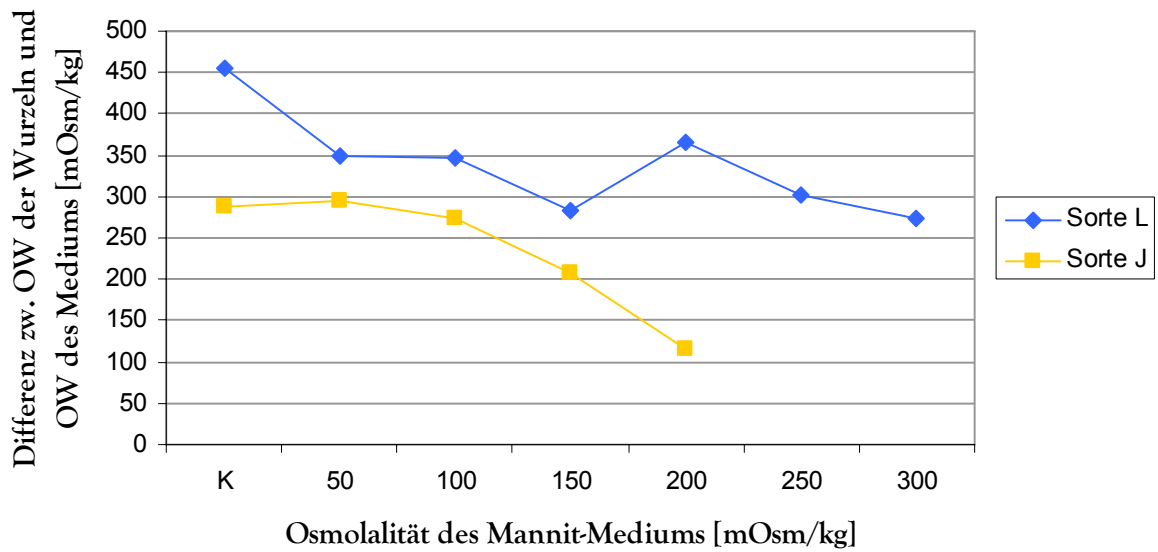
Grafik 18: Osmotische Werte der gespülten und ungespülten Wurzeln der Sorte L nach 48 Stunden



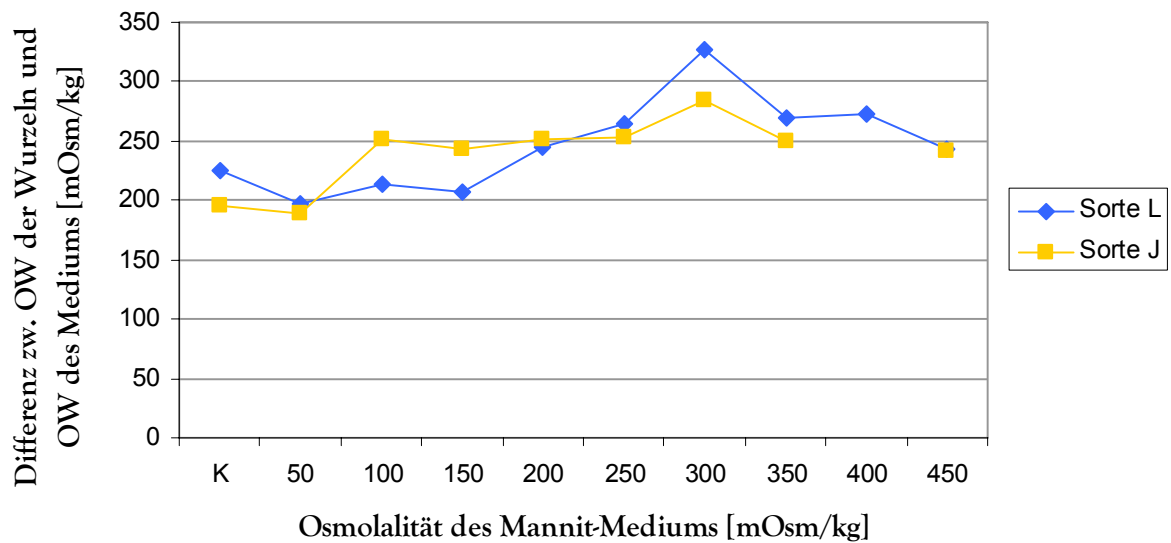
Grafik 19: Osmotische Werte der gespülten und ungespülten Wurzeln der Sorte J nach 48 Stunden



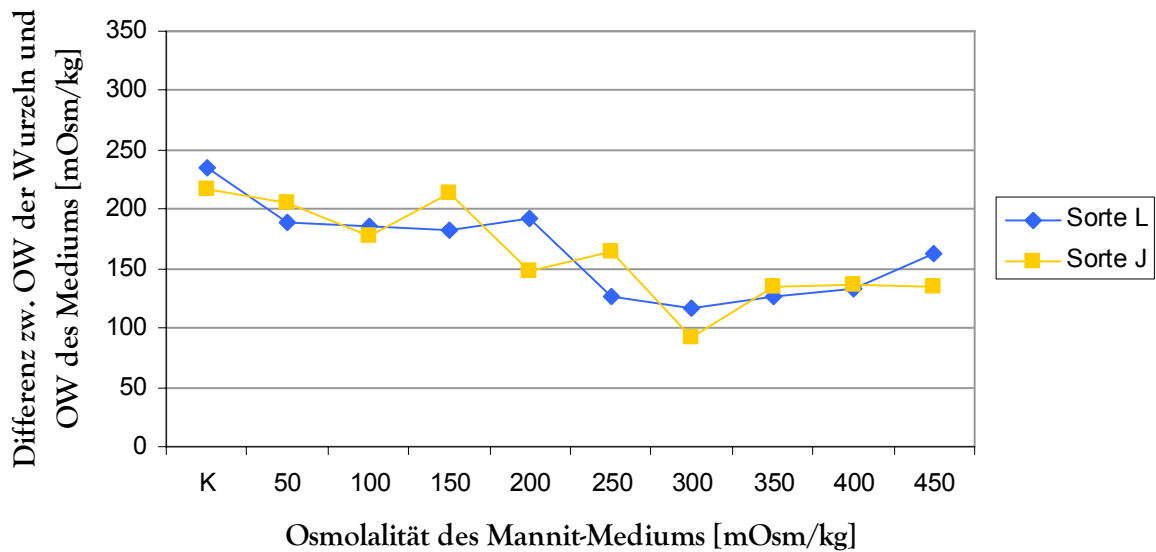
Grafik 20: Differenz zwischen den osmotischen Werten der Wurzeln in Versuch A (gespült) und Versuch B (ungespült) nach jeweils 48 Stunden



Grafik 21: Differenz zwischen dem osmotischen Wert der Wurzeln und dem des jeweiligen Mediums nach 24 Stunden (ungespült)

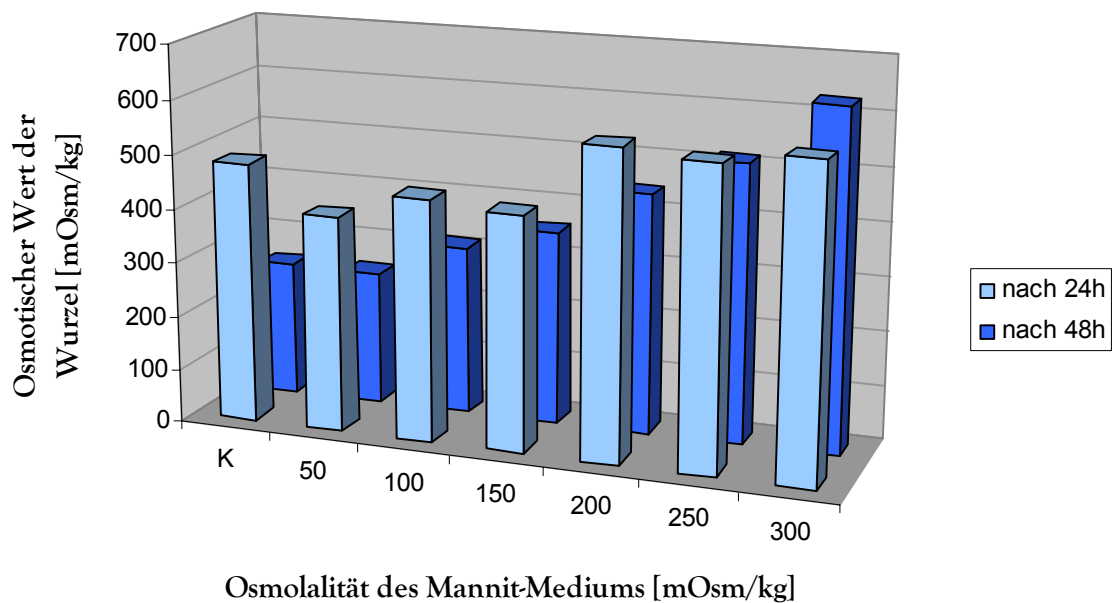


Grafik 22: Differenz zwischen dem osmotischen Wert der Wurzeln und dem des Mediums nach 48 Stunden (ungespült)

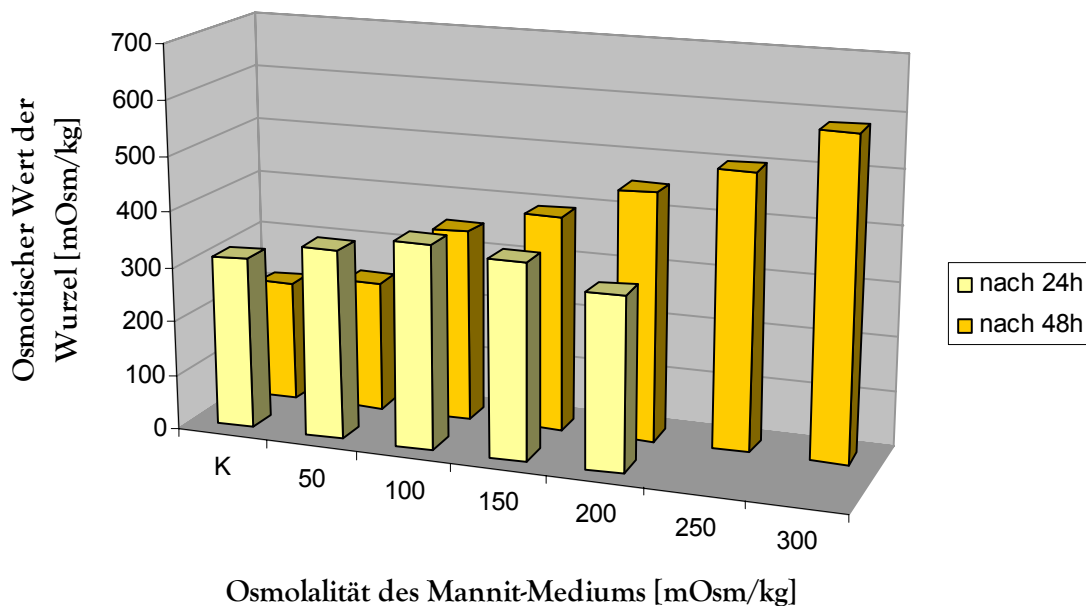


Grafik 23: Differenz zwischen dem osmotischen Wert der Wurzeln und dem des Mediums nach 48 Stunden (gespült)

Es ist ebenfalls zu bemerken, dass bei beiden Sorten die osmotischen Werte der Wurzeln in den niedrigeren Mannit-Konzentrationen nach 24 Stunden höher waren als nach 48 Stunden. In den höheren Konzentrationen nähern sich die Werte aneinander an (siehe Grafik 24 und 25).



Grafik 24: Osmotische Werte der (ungespülten) Wurzeln von Sorte L nach 24 und nach 48 Stunden in Mannit

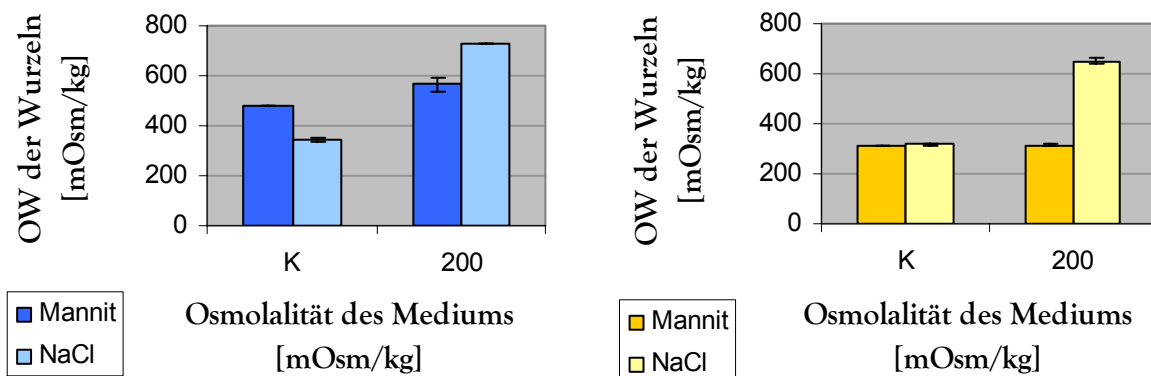


Grafik 25: Osmotische Werte der (ungespülten) Wurzeln von Sorte J nach 24 und nach 48 Stunden in Mannit

Das Wurzelwachstum selbst nimmt in Mannit mit steigender Konzentration kontinuierlich ab. Erst ab 350 mOsm Mannitol ist eine deutlichere Reduktion des Wurzelzuwachses erkennbar. Hierbei verhalten sich beide Sorten gleich, es gibt keine signifikanten Unterschiede, obwohl die Sorte J in fast jeder Konzentration im Durchschnitt etwas längere Wurzeln bilden konnte als die Sorte L.

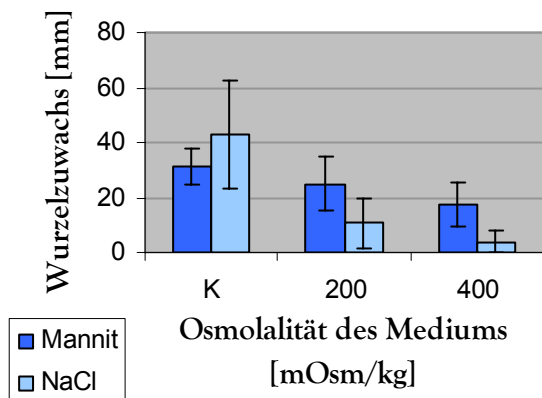
Interessanterweise konnten die Wurzeln beider Sorten nach 24 Stunden bis zur höchsten verwendeten Osmolalität von 450 mOsm Mannit noch wachsen, die Wurzelhaare hingegen wuchsen nach ebenfalls 24 Stunden bei Sorte L nur bis zu Mannitosmolalitäten von 300 - 350 mOsm, diejenigen der Sorte J jedoch bis über 500 mOsm. Das bedeutet, dass bei Sorte L in höheren Konzentrationen des Osmotikums Wurzeln wachsen, diese jedoch keine Wurzelhaare mehr ausbilden können und somit die Wasseraufnahme um ein Vielfaches verringert sein muss, wogegen die Sorte J auch noch in diesen hohen Konzentrationen Wurzeln samt Wurzelhaaren ausbildet und somit mehr Wasser aufnehmen kann. Dies scheint ein plausibler Grund für die höhere Trockenstressresistenz der Sorte J gegenüber der Sorte L zu sein.

4.2.2. Wurzeln in Natriumchlorid

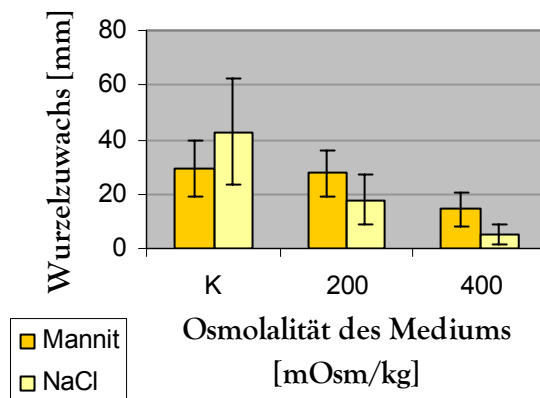


Grafik 26 + 27: Vergleich der osmotischen Werte der Wurzeln von Sorte L (links) und Sorte J (rechts) nach 24 Stunden in Mannitit bzw. Natriumchlorid

Wie auch schon in Mannitol, waren auch in Natriumchlorid die osmotischen Werte der Wurzeln jeweils deutlich höher als die des Mediums. In NaCl zeigte sich sogar ein größerer Unterschied zwischen dem osmotischen Wert des Mediums und dem der Wurzeln als in Mannitol. In Grafik 26 und 27 werden die Ergebnisse gegenübergestellt. Wie bereits oben erwähnt, wird der osmotische Wert der Wurzeln aktiv erhöht. Dies kann zum Beispiel durch Aufnahme der im Medium vorhandenen Ionen erfolgen. Diese Möglichkeit erfordert weitaus weniger Energieaufwand, als den osmotischen Innenwert der Zellen durch Aufbau von Zuckern zu erhöhen. In 200 mOsm Salz ist der osmotische Wert der Wurzeln bei Sorte L um 528 mOsm und bei Sorte J um 450 mOsm höher als der des Mediums. Die Differenz zwischen den osmotischen Werten der Wurzeln und des Mediums ist damit noch höher als in Mannit, wo sie in 200 mOsm nur 367 mOsm bei L und 116 mOsm bei J betrug.



Grafik 28: Wurzelzuwachs der Sorte L



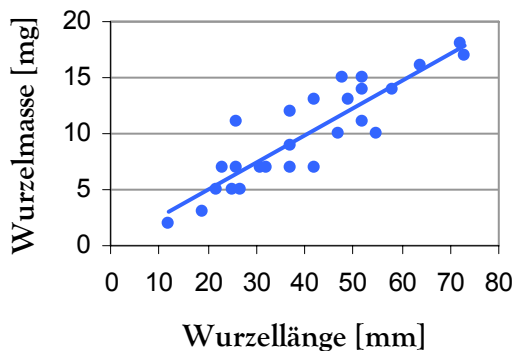
Grafik 29: Wurzelzuwachs der Sorte J

Mit zunehmender Osmolalität des Mediums nahm der Wurzelzuwachs auch in NaCl ab, jedoch geschah dies stärker als in Mannit. Die Wurzelzuwächse beider Sorten lagen in NaCl sowohl in 200 mOsm als auch in 400 mOsm unter denen in Mannit (siehe Grafiken 28 und 29). Dies könnte darauf hindeuten, dass das Salz außer dem osmotischen Stress einen zusätzlichen Stress für die Wurzeln darstellt, womit diese bereits bei vergleichsweise niedrigeren Osmolalitäten weniger wachsen können. Laut Neumann (1995) ist es möglich, dass dies nicht durch die Toxizität von Salz geschieht, sondern dass dieses eine Hemmung der Zellwandexpansion herbeiführt, was das Wurzelwachstum an sich bewirkt. Er beschreibt, dass dies für die Pflanze von Vorteil sei.

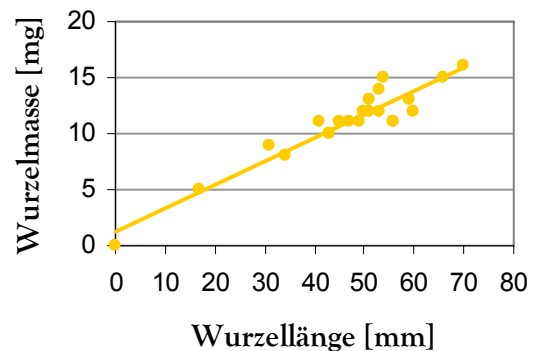
Wie aus den Grafiken 30 bis 35 ersichtlich ist, korrelieren die Wurzellängen der in NaCl gewachsenen Keimlinge bei beiden Sorten linear mit den Wurzelmassen. Es ist jedoch bei Sorte L erkennbar, dass das Verhältnis von Wurzellänge zu Wurzelmasse mit zunehmender Salzkonzentration abnimmt (vergleiche Grafiken 30, 32 und 34). In Grafik 35 wurden die Steigungen der Geraden beider Sorten zusammengefügt, wodurch die Wirkung von NaCl auf das Wurzelwachstum noch deutlicher ersichtlich wird. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Studien, welche besagen, dass NaCl das Wurzelwachstum hemmt (Neumann, 1995). Betrachtet man dazu die Grafiken 28 und 29, in welchen der Wurzelzuwachs der beiden Sorten in Mannit bzw. NaCl dargestellt wird, wird ersichtlich, dass trotz längerer Wurzeln in der Kontrolle der NaCl-Reihe die Wurzelzuwächse in den jeweiligen Mannitkonzentrationen bei beiden Sorten höher lagen. Die hemmende Wirkung von NaCl auf das Wurzelwachstum war somit deutlich stärker, als diejenige von Mannit. Ob es sich bei diesen unterschiedlichen Reaktionen auf Salz und Mannit um eine Hemmung oder vielmehr um eine Adaptation

handelt, kann hier nicht geklärt werden. Untersuchungen von Wang et. al (2008) zeigten jedoch, dass Wurzelhaare von *Arabidopsis thaliana* unter Einwirkung von Salzstress in ihrer Ausbildung (Anzahl der Trichoblasten) und ihrem Längenwachstum stärker gehemmt sind, als unter Mannitstress. Laut Wang et al. ist dies eine Adaptation der Pflanze an Salzstress und führt zur Erhöhung ihrer Salztoleranz. Die Reaktion der Wurzelhaare ist dabei stärker als die von Wurzeln und Spross. (Wang et al., 2008)

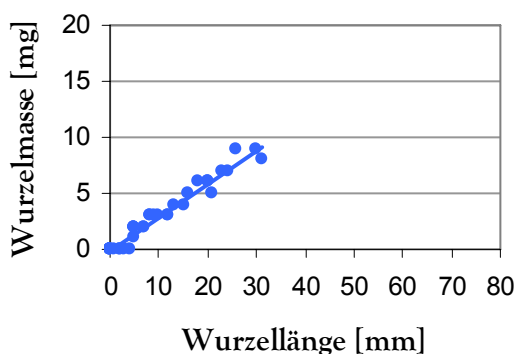
Es wäre interessant in einem weiteren Versuch zu klären, wie sich das Verhältnis von Wurzellänge zu Wurzelmasse in Mannit verhält.



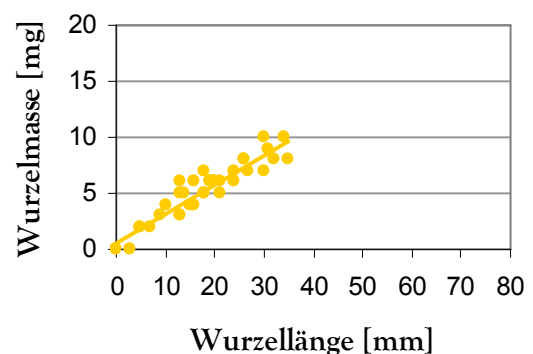
Grafik 30: Zusammenhang zw. Wurzelmasse und Wurzellänge bei Sorte L in A. dest. Die Steigung der Trendlinie beträgt 0,24. $R^2=0,80$



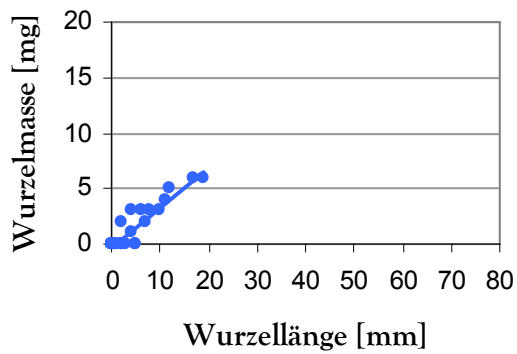
Grafik 31: Zusammenhang zw. Wurzelmasse und Wurzellänge bei Sorte J in A. dest. Die Steigung der Trendlinie beträgt 0,21. $R^2=0,89$



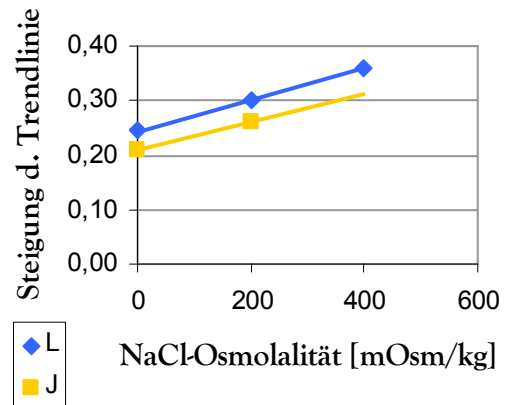
Grafik 32: Zusammenhang zw. Wurzelmasse und Wurzellänge bei Sorte L in 200 mOsm NaCl. Die Steigung der Trendlinie beträgt 0,30. $R^2=0,96$



Grafik 33: Zusammenhang zw. Wurzelmasse und Wurzellänge bei Sorte J in 200 mOsm NaCl. Die Steigung der Trendlinie beträgt 0,26. $R^2=0,88$



Grafik 34: Zusammenhang zw. Wurzelmasse und Wurzellänge bei Sorte L in 400 mOsm NaCl. Die Steigung der Trendlinie beträgt 0,36. $R^2=0,84$

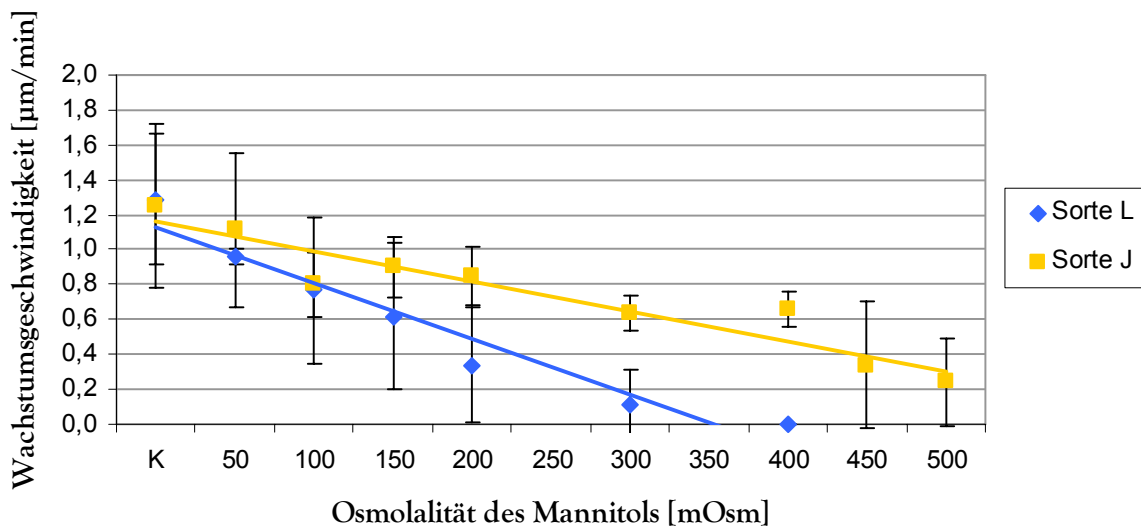


Grafik 35: Zunahme des Verhältnisses von Wurzelmasse zu Wurzellänge mit steigender NaCl-Konzentration

4.3. Vergleiche zwischen den Sorten L und J

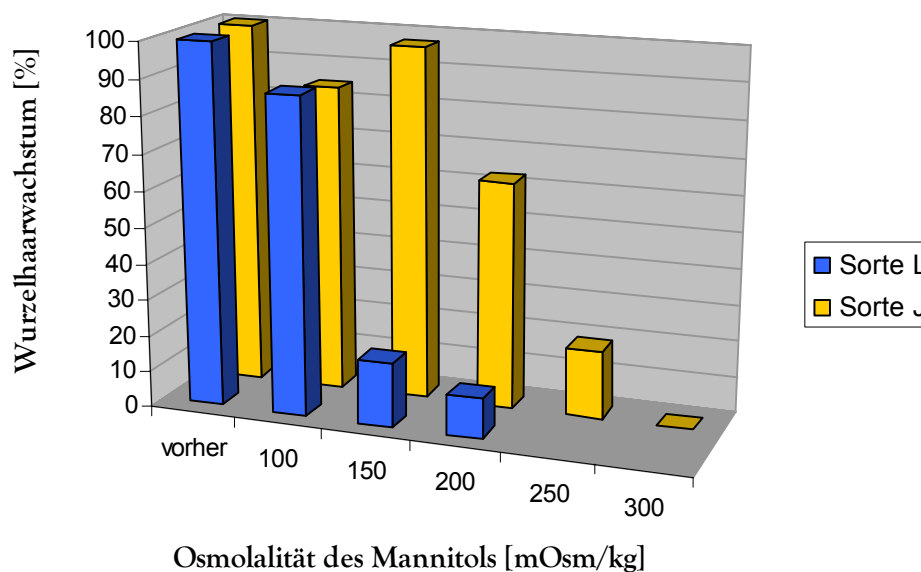
Wie in den obigen Kapiteln bereits erwähnt, verhalten sich die Wurzeln und Wurzelhaare der zwei miteinander verglichenen Sorten in vielen Punkten gleich oder sehr ähnlich. Nun soll auf ihre Unterschiede eingegangen werden.

Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben wurde, kann die Sorte J das Wurzelhaarwachstum nach 24 Stunden bis in über 500 mOsm Mannit aufrechterhalten. Wurzelhaare der Sorte L können hingegen bereits ab einer Osmolalität von 300 mOsm Mannit nicht mehr wachsen (siehe Grafik 36 und 37).



Grafik 36: Wachstumsgeschwindigkeiten der Wurzelhaare nach 24 Stunden in Mannitol

Auch die plötzliche Überführung der Keimlinge vom Kontrollmedium in Mannitol zeigte Unterschiede zwischen den zwei Sorten. Auch hier konnte Sorte J noch in höheren Osmolalitäten gleichbleibende Wachstumsgeschwindigkeit zeigen, wogegen bei Sorte L bereits bei Überführung in 150 mOsm die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare praktisch stoppte. Bei Sorte J war ein Wachstumsstopp erst bei 250 bis 300 mOsm Mannit erreicht.



Grafik 37: Abnahme des Wachstumsgeschwindigkeiten der Sorten L und J mit zunehmender Mannitol-Konzentration

Man kann daher annehmen, dass der osmotische Wert der Wurzelhaare bei Sorte J generell etwas höher liegt, als bei Sorte L, weshalb noch länger Wurzelhaarwachstum stattfinden kann. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Wurzelhaare der Sorte J das im Medium zur Verfügung stehende Osmotikum schneller aufnehmen können als die der Sorte L und somit ihren osmotischen Wert rascher erhöhen können.

Die Ergebnisse aus den 24-Stunden-Untersuchungen der Wurzelhaare lassen ebenfalls mehrere Schlussfolgerungen zu. Man kann aus dem erhöhten osmotischen Wert der Zellen darauf schließen, dass durch die Aufnahme von Mannit in die Wurzelhaare - auch wenn sie bei beiden Sorten gleich schnell bzw. gleich langsam erfolgen sollte - wegen des höheren Ausgangswertes bei der Sorte J in der gleichen Zeit ein höherer osmotischer Wert der Zellen erreicht werden kann als bei Sorte L und dadurch auch nach 24 Stunden Sorte J noch in höheren Konzentrationen Wurzelhaarwachstum zeigen kann als Sorte L. Eine weitere Möglichkeit ist, dass - wie auch oben schon erwähnt - die Sorte J Mannit schneller aufnehmen kann als die Sorte L und deswegen den eigenen osmotischen Wert schneller erhöht.

Jedenfalls kann man daraus schließen, dass im Gegensatz zur Sorte L die Sorte J auch bei erhöhtem osmotischen Stress zur Wurzelhaarbildung und zum Wurzelhaarwachstum befähigt ist. Diese Untersuchung stützt also auch die Angaben der Saatgutfirma, welche Sorte J als trockenstressresistentere der beiden Sorten bezeichnet.

Im Wurzelwachstum in Mannit zeigen die beiden Sorten jedoch keine signifikanten Unterschiede; bei beiden Sorten nimmt der Wurzelzuwachs mit zunehmender Mediumosmolalität ab und können noch bis über 450 mOsm Mannit Wurzeln ausbilden.

In NaCl waren die Wurzeln der Sorte J in jeder Konzentration geringfügig länger als die der Sorte L. Obwohl der Unterschied nicht signifikant ist, stellt sich doch die Frage, ob Sorte J auch eine geringfügige Salztoleranz aufweist. Allerdings ist bei Weizen die Salztoleranz generell gering (Davenport & Tester, 2000). Hierzu wäre es interessant, einen weiteren Versuch mit größerer Stichprobenzahl zu machen und zu sehen, ob hier tatsächlich ein Unterschied in der Salztoleranz vorliegt. Wie bereits erwähnt, ist jedoch das Wurzelwachstum bei beiden Sorten in NaCl geringer als in der jeweiligen Mannit-Konzentration.

4.4. Exo- und Endocytose

Während der Plasmolyse zieht sich der Protoplast von der Zellwand zurück. Daher hat man lange Zeit angenommen, die Plasmamembran würde sich durch osmotisch induzierte Endocytose (auch Osmocytose genannt) verkleinern. Bei isolierten Protoplasten reduziert sich die Oberfläche bei 50%iger Plasmolyse tatsächlich um 40% (Gordon-Kamm & Steponkus, 1984), allerdings gibt es bei isolierten Protoplasten keine Hecht'schen Fäden. Mit der Entdeckung der Hecht'schen Fäden und des Hecht'schen Netzwerkes jedoch stellte sich die Frage, ob während der Plasmolyse tatsächlich weniger Plasmamembran benötigt wird und nicht etwa mehr als in der unplasmolysierten Zelle. Diese Frage ist auch nach 100-jähriger Forschung nicht vollständig geklärt. Oparka berechnete 1994, dass die Oberfläche der Plasmamembran während der Plasmolyse durch die Bildung von Hecht'schen Fäden gleich bleibt.

Laut einer neuen Untersuchung beträgt die Zahl der pro Minute mit der Plasmamembran verschmelzenden Vesikel in wachsenden Wurzelhaaren von *Arabidopsis thaliana* mehr als 9000. Die innerhalb der Zelle vorhandenen Vesikel reichen dabei für 33 Sekunden Wurzelhaarwachstum. (Ketelaar *et al.*, 2008)

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Plasmolyseuntersuchungen auch auf die Funktion der Endo- und Exocytose eingegangen.

Bei Behandlung mit BFA stoppte in jedem Wurzelhaar das Wachstum spätestens nach 30 Minuten. Da BFA in Pflanzenzellen unter anderem zur Verschmelzung von Golgi Apparat und ER und somit auch zur Unterbindung der Exocytose führt (Baluška *et al.*, 2002; Nebenführ *et al.*, 2002), ist der Wachstumsstopp ein Hinweis, dass eine erfolgreiche Exocytose für das Wurzelhaarwachstum notwendig ist. Dies ist zwar plausibel, aber noch nicht schlüssig bewiesen.

Je nach BFA-Konzentration und Einwirkzeit bildeten sich in den Wurzelhaaren immer größer werdende, bewegliche Klumpen, sogenannte *BFA-compartments* (Satiat-Jeunemaitre *et al.*, 1996). Laut Satiat-Jeunemaitre *et al.* (1996) bilden sich diese Kompartimente aus abgetrennten Zisternen von Dictyosomen, deren *trans*-Seite in Richtung der Mitte der *BFA-compartments* liegt. Diese Wirkung von BFA war reversibel, die *BFA-compartments* wurden nach

Entfernen von BFA kleiner und verschwanden schließlich ganz, wie auch bei Satiat-Jeunemaitre *et al.* (1996) beschrieben.

BFA hemmte die Exocytose, hingegen erfolgte auch bei gehemmter Exocytose zumindest noch 60 Minuten nach der Einwirkung von BFA Endocytose. Dies beschrieben auch Baluška *et al.* (2002).

Bei den Versuchen zur Unterbindung der Exocytose während der Plasmolyse zeigte sich, dass eine Lösung mit BFA, FM 1-43 und 400 mOsm Mannit in den Wurzelhaaren keine Plasmolyse hervorruft, obwohl 400 mOsm Mannit ohne BFA und FM 1-43 sofortige starke Plasmolyse bewirkte. Dies lässt darauf schließen, dass entweder BFA oder FM 1-43, oder aber ihre Kombination die Plasmolyse erschwert bzw. verhindert. Bei Versuchen mit Mannitol und FM 1-43 zeigte sich ebenfalls eine verzögerte Plasmolyse. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass FM 1-43 die Fluidität der Membran beeinträchtigt, immerhin ist der Fluoreszenzfarbstoff, wie in Kapitel 2.4.1 dargestellt, ein sehr großes Molekül, welches an die Plasmamembran bindet. Es ist also nicht allein dem BFA zuzuschreiben, dass die Plasmolyse stark gehemmt ist, doch wird sie in Kombination von FM 1-43 und BFA verstärkt gehemmt.

Die Untersuchungen zur Aufnahme von *Lucifer Yellow* mittels Endocytosevesikel zeigten, dass dieser Farbstoff nicht in die Wurzelhaare aufgenommen wird. Zum selben Ergebnis kam auch schon Ismail (2002). Adlassnig (2007) beobachtete, dass *Lucifer Yellow* auch von karnivoren Kesselfallenpflanzen endocytotisch nicht aufgenommen wird. Es liegt also der Schluss nahe, dass *Lucifer Yellow* zur Untersuchung von Endocytose nicht in allen Fällen geeignet ist.

Das Vorhandensein von Endocytose in wachsenden Wurzelhaaren steht jedoch fest, denn die membranselektiven Fluoreszenzfarbstoffe FM 1-43 und FM 4-64 zeigten gefärbte Endocytosevesikel innerhalb der Zelle. Endocytose bei wachsenden Wurzelhaaren dient in erster Linie der Rückführung von überschüssigem Membranmaterial, welches durch Exocytosevesikel beim Aufbau der Zellwand in die Membran eingebaut wird. Daher wird womöglich gar nichts aufgenommen; so auch der extrazelluläre Farbstoff *Lucifer Yellow* nicht.

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl die vorliegende Arbeit Trockenstress thematisiert, wurden die untersuchten Pflanzen mangels anderer, für die Zellbiologie geeigneter Methoden, in Wirklichkeit osmotischem Stress ausgesetzt. Wie in der Einleitung beschrieben, entsteht bei beiden Stresstypen für die Zelle letztendlich Wassermangel, und doch sind sie nicht ganz gleichzusetzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten unter anderem, dass die als trockenstressresistenter bezeichnete Sorte J unter höherem osmotischen Stress noch Wurzelhaarwachstum aufweist, wo hingegen Sorte L bereits keine Wurzelhaare ausbilden kann. Dies führt mit großer Wahrscheinlichkeit dazu, dass Sorte J unter osmotischem Stress mehr Wasser aufnehmen kann als die Sorte L und somit einen größeren Ertrag liefert. Die höhere Saugkraft von Sorte J führt jedoch nicht dazu, dass Salzstress (welcher im Gegensatz zu Mannitolstress in der Natur vorkommt) besser ertragen wird. Dies wird auf die zusätzliche toxische Wirkung von Salz auf die Zelle zurückgeführt. Weitere Versuche müssen jedoch klären, wie Wurzelhaare auf Salzstress im Speziellen reagieren und wie sich Salzresistenzen ausbilden bzw. äußern.

Wie in der Einleitung behandelt, ist eine Erhöhung der Saugkraft bei weitem nicht die einzig mögliche Anpassung an Trockenstress. Dennoch zeigt die vorliegende Arbeit, dass bereits ein einzelner Zelltyp, nämlich das Wurzelhaar, einen entscheidenden Beitrag zur Erhöhung der Stressresistenz auf dem Niveau der ganzen Pflanze leisten kann.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adlassnig W. (2007) *Ökophysiologie karnivorer Kesselfallenpflanzen*. Dissertation, Universität Wien. 541 pp.
- Adlassnig W., Peroutka M., Lambers H. & Lichtscheidl I. (2005) The roots of carnivorous plants. *Plant and Soil*, **275**, 127 - 140.
- Adler W., Oswald K. & Fischer R. (1994) *Exkursionsflora von Österreich*. Eugen Ulmer, Stuttgart, Wien. 1180 pp.
- Avery G. S. J. (1930) Comparative anatomy and morphology of embryos and seedlings of maize, oats, and wheat. *The Botanical Gazette*, **89**, 1 - 39.
- Baluška F., Hlavacka A., Šamaj J., Palme K., Robinson D. G., Matoh T., McCurdy D. W., Menzel D. & Volkmann D. (2002) F-Actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from Brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiology*, **130**, 422 - 431.
- Betz W. J., Mao F. & Smith C. B. (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, **6**, 365 - 371.
- Bibikova T. & Gilroy S. (2003) Root hair development. *Journal of Plant Growth Regulation*, **21**, 383 - 415.
- Briskin D. P. (1990) Ca²⁺-translocating ATPase of the plant plasma membrane. *Plant Physiology*, **94**, 397 - 400.
- Campbell N. A. (1997) *Biologie*. (1. Ed.). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 1440 pp.
- Campbell N. A. & Reece J. B. (2006) *Biologie*. Pearson Studium, München. 1606 pp.
- Chołuj D., Karwowska R., Ciszewska A. & Jasińska M. (2008) Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **30**, 679 - 687.

- Čiamparová M., Dekánová K., Hanáčková Z., Peters P., Ovečka M. & Baluška F. (2003) Structural aspects of bulge formation during root hair initiation. *Plant and Soil*, **255**, 1 - 7.
- Clowes F. A. L. & Juniper B. E. (1968) *Plant cells*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 546 pp.
- Cram W. J. (1980) Pinocytosis in plants. *New Phytologist*, **84**, 1 - 17.
- Cram W. J. (1984) Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells. *Physiologia Plantarum*, **61**, 396 - 404.
- Davenport R. J. & Tester M. (2000) A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiology*, **122**, 823 - 834.
- Derksen J. & Emons A. M. (1990) Microtubules in tip growth systems. In: *Tip Growth in Plant and Fungal Cells* (Ed. Heath I. B.), 147 - 181. Academic Press, San Diego.
- Dittmer H. J. (1937) A quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant (*Secale cereale*). *American Journal of Botany*, **24**, 417 - 420.
- Dittmer H. J. (1949) Root hair variations in plant species. *American Journal of Botany*, **36**, 152 - 155.
- Dolan L. (2001) How and where to build a root hair. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 550 - 554.
- Dolan L., Duckett C. M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S. & Roberts K. (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development*, **120**, 2465 - 2474.
- Emons A. M. C. (2007) *The making of a cell wall texture: an iterative modeling and experimentation approach*. Paper presented at the VII International Botanical Microscopy Meeting, Salzburg.
- Fahn A. (1982) *Plant anatomy*. Pergamon Press, Oxford. 544 pp.
- Galway M. E., Heckman Jr. J. W. & Schiefelbein J. W. (1997) Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta*, **201**, 209 - 218.

- Gilroy S. & Jones D. L. (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science*, **5**, 56 - 60.
- Goebel K. (1933) *Organographie der Pflanzen (insbesondere der Archegoniaten und Samenpflanzen)* (vol. 3). (3. Ed.). Gustav Fischer, Jena. 2078 pp.
- Gordon-Kamm W. J. & Steponkus P. L. (1984) The behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts: Implications in freezing injury. *Protoplasma*, **123**, 83 - 94.
- Hecht K. (1912) Studien über den Vorgang der Plasmolyse. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, **11**, 133 - 189.
- Höfler K. (1920) Ein Schema für die osmotische Leistung der Pflanzenzelle. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **38**, 288 - 298.
- Ismail A. (2001) *Endocytotische Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen in Pflanzenzellen*. Diplomarbeit, Universität Wien. 58 pp.
- Ketelaar T., Galway M. E., Mulder B. M. & Emons A. M. C. (2008) Rates of exocytosis and endocytosis in *Arabidopsis* root hairs and pollen tubes. *Journal of Microscopy*, **231**, 265 - 273.
- Kropf D. L., Bisgrove S. R. & Hable W. E. (1998) Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology*, **10**, 117 - 122.
- Kutschera L. (1960) *Wurzelatlas mitteleuropäischer Ackerunkräuter und Kulturpflanzen*. DLG-Verlag, Frankfurt am Main. 574 pp.
- Lang I., Barton D. A. & Overall R. L. (2004) Membrane-wall attachments in plasmolysed plant cells. *Protoplasma*, **224**, 231 - 243.
- Lösch R. (2001) *Wasserhaushalt der Pflanzen*. Quelle & Meyer, Wiebelsheim. 595 pp.
- Lundegårdh H. (1957) *Klima und Boden*. (5 Ed.). VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 584 pp.
- Movafeghi A. (2000) *Identifizierung und Charakterisierung der Hüllproteine von pflanzlichen COP Vesikeln*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen. 158 pp.
- Nebenführ A., Ritzenthaler C. & Robinson D. G. (2002) Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology*, **130**, 1102 - 1108.

- Neumann P. M. (1995) The role of cell wall adjustments in plant resistance to water deficits. *Crop Science Society of America*, **35**, 1258 - 1266.
- Nultsch W. (2001) *Allgemeine Botanik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 663 pp.
- Oparka K. J. (1994) Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytologist*, **126**, 549 - 719.
- Paredez A. R., Somerville C. R. & Ehrhardt D. W. (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, **312**, 1491 - 1495.
- Raven P. H., Evert R. F. & Eichhorn S. E. (2006) *Biologie der Pflanzen*. Walter de Gruyter, Berlin, New York. 942 pp.
- Read N. D., Hickey P. C., Atkinson H. A. & Swift S. R. (2003) Organelle organisation and dynamics in living fungal hyphae. In: *7th International Botanical Microscopy Meeting*, Lissabon.
- Ritzenthaler C., Nebenführ A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin L. A. & Robinson D. G. (2002) Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using Tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted Green Fluorescent Protein and COPI antisera. *The Plant Cell*, **14**, 237 - 261.
- Roszak R. & Rambour S. (1997) Uptake of Lucifer Yellow by plant cells in the presence of endocytotic inhibitors. *Protoplasma*, **199**, 198 - 207.
- Satiat-Jeunemaitre B., Cole L., Bourett T., Howard R. & Hawes C. (1996) Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *Journal of Microscopy*, **181**, 162 - 177.
- Sato S., Ogasawara Y. & Sakuragi S. (1995) The relationship between growth, nucleus migration and cytoskeleton in root hairs of radish. In: *Structure and Function of Roots*, 69 - 74. Kluwer Academic Publishers.
- Schopfer P. & Brennicke A. (2006) *Pflanzenphysiologie*. (6. Ed.). Elsevier, München. 700 pp.
- Schröter K. & Sievers A. (1971) Wirkung der Turgorreduktion auf den Golgi-Apparat und die Bildung der Zellwand bei Wurzelhaaren. *Protoplasma*, **72**, 203 - 211.
- Schulze E.-D., Beck E. & Müller-Hohenstein K. (2002) *Pflanzenökologie*. Springer, Heidelberg. 846 pp.

- Schwarz F. (1883) Die Wurzelhaare der Pflanzen. Ein Beitrag zur Biologie und Physiologie dieser Organe. *Untersuchungen aus dem Botanischen Institut zu Tübingen*. 1, 135 - 190
- Sievers A. (1963) Über die Feinstruktur des Plasmas wachsender Wurzelhaare. *Zeitschrift für Naturforschung*.
- Strasburger E., Noll F., Schenck H. & Schimper A. F. W. (1983) *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1161 pp.
- Strasburger E., Noll F., Schenck H. & Schimper A. F. W. (2002) *Lehrbuch der Botanik*. (35. Ed.). Gustav Fischer Verlag, Heidelberg. 1123 pp.
- Ude J. & Koch M. (1994) *Die Zelle - Atlas der Ultrastruktur*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart. 309 pp.
- Volgger M. (2004) *Wurzelhaare von Triticum aestivum unter Einwirkung von osmotischem Stress und Salz*. Diplomarbeit, Universität Wien. 141 pp.
- Volkman D. (1984) The plasma membrane of growing root hairs is composed of zones of local differentiation. *Planta*, 162, 392 - 403.
- Volkman D. & Peters P. (1995) Structural basis of root hair formation: Early development of trichoblasts and atrichoblasts. In: *Structure and Function of Roots* (Eds. Baluška F., Čiamparová M., Gasparíková O., & Barlow P. W.), 61 - 67. Kluwer Academic Publishers, Bonn.
- Wang Y., Zhang W., Li K., Sun F., Han C., Wang Y. & Li X. (2008) Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 121, 87 - 96.
- Weaver J. E. (1926) *Root development of field crops*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York. 291 pp.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Flora Hejjas
Geburtsdatum: 26. 12. 1978
Geburtsort: Budapest, Ungarn

Schul Ausbildung

1985 - 1987 Besuch der Volksschule in Budapest
1987 - 1989 Besuch der Volksschule in Wien
1989 - 1993 Besuch des Realgymnasium in Wien XIII
1993 - 1998 Besuch der HBLA Wien XIII für Kulturtouristik
06/1998 Abschluss: Matura (2,0)

Studium

seit 10/1998 Studium der Biologie/Ökologie an der Universität Wien
08/2002 - 08/2003 Auslandsjahr im Rahmen des Studiums an der *Universidad de Barcelona*/Spanien
seit 2005 Diplomarbeit an der Abteilung für Cell Imaging und Ultrastrukturforschung/Fakultät für Lebenswissenschaften

Berufliche Tätigkeiten

06/1995 - 08/1995	Ferialpraxis im Servicebereich im Restaurant Nudelpfandl/Wien
1998 - 2002	Diverse Tätigkeiten in den Bereichen Service, PR, etc.
seit 2003	Gelegentliche Übersetzungsarbeiten (ungarisch und spanisch)
seit 10/2004	Tutorien an der Universität Wien im Rahmen der Lehrveranstaltungen: Biologische Einführungsübungen, Foto-Film-Video: wissenschaftliche Dokumentation in der Biologie
seit 06/2007	Exkursionsleitung im Nationalpark Neusiedler See - Seewinkel
seit 06/2007	Ökopädagogische Projektbetreuung für den WWF Österreich
seit 01/2008	Servicetätigkeit bei Weinverkostungen
seit 03/2008	Tätigkeit als <i>Invigilator/Supervisor</i> beim <i>British Council</i>

Fremdsprachen

Ungarisch	fließend in Wort und Schrift
Spanisch	fließend in Wort und Schrift
Englisch	sehr gut in Wort und Schrift
Französisch	gut in Wort und Schrift