

Wurzelhaare von *Triticum aestivum* unter Einwirkung von osmotischem Stress und Salz

Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Magister der Naturwissenschaften

an der Fakultät für
Lebenswissenschaften
der Universität Wien

eingereicht von
Michael Volgger

Wien 2004

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf meinem bisherigen Weg bedanken.

Meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Irene Lichtscheidl möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und für ihren vielseitigen fachlichen Rat danken. Ich verdanke ihr jede erdenkliche Fürsprache, hilfreiche Unterstützung und anregende Gespräche.

Frau Dr. Ingeborg Lang möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen, weil sie mich in jeder Phase der Arbeit sehr sachkundig und richtungsweisend begleitete, mich stets ermunterte und viel Geduld zeigte.

Ferne möchte ich mich bei meinen Kollegen und der gesamten Abteilung für Zellphysiologie und wissenschaftlichen Film bedanken, die stets hilfsbereit waren und immer für eine freundliche und offene Atmosphäre sorgten.

Ich danke allen meinen Freunden, die auch in den unvermeidlichen Krisen jederzeit für mich da waren.

Schließlich möchte ich allen anderen, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben und hier ungenannt blieben, für ihre erwiesene Hilfe danken.

ZUSAMMENFASSUNG

Wurzeln und Wurzelhaare dienen der Pflanze zur Wasseraufnahme und sind daher als erstes mit Veränderungen im Boden konfrontiert. Über die Reaktionen der Wurzel auf Trockenheit oder Salzbelastung ist bereits viel gearbeitet worden, aber über das Verhalten der Wurzelhaare weiß man noch sehr wenig. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen von osmotischem Stress und Salz auf das Wachstum und die Cytoarchitektur von Wurzelhaaren zu analysieren. Im Zentrum stand die Analyse des Spitzenwachstums und der polaren Organisation der Wurzelhaare. Außerdem sollten die Strömung und die osmotische Situation von Wurzelhaaren dargestellt werden. Infolge dessen galt es herauszufinden, wie verschiedene osmotische Medien und Salze auf die Wurzelhaare wirken.

Zur Durchführung der Versuche wurden 3 Tage alte Keimlinge von *Triticum aestivum* verwendet, welche in Kammern mit Kulturlösung (Phosphatpuffer) gezogen wurden. Zur Erzeugung von osmotischem Stress wurden Glucose, Mannit und Polyethylenglycol in Konzentrationen von 100 bis 500 mOsm verwendet, für Salzstress wurden Natriumchlorid und Kaliumchlorid in den selben Konzentrationen eingesetzt. Die Haftung des Protoplasten an der Zellwand und die Bildung von Endocytosevesikeln wurden durch Färbung der Plasmamembran mit FM1-43, einem membranselektiven nicht permeierenden Styryl-Farbstoff, sichtbar gemacht. Die lebenden Wurzelhaare wurden mittels *confocal laser scanning microscopy* und *video enhanced microscopy* untersucht.

Wurzelhaare reagieren unterschiedlich bei osmotischem Stress und bei Salzbelastung.

Die Untersuchungen zeigten bei osmotischem Stress:

- Der osmotische Wert der Wurzelzellen ist höher (350 mOsm) als in den Wurzelhaaren (150 mOsm). In den Wurzelhaaren nimmt der osmotische Wert während des Wachstums leicht zu.
- Während der Plasmolyse zieht sich der Protoplast in den Wurzelhaaren von der Spitze her zurück und behält dabei seine ursprüngliche Organisation bei; die Cytoarchitektur ist unverändert.
- Neue Zellwand wird kontinuierlich auch während der Plasmolyse gebildet.
- In niedrigen Konzentrationen (250 mOsm) zieht sich der Protoplast so langsam von der Spitze zurück, dass der Plasmolysevorraum mit Zellwandmaterial aufgefüllt wird. Erst ab 300 mOsm hebt sich der Protoplast sichtbar von der Zellwand ab.

- Bei starker Plasmolyse werden zahlreiche Hecht'sche Fäden ausgebildet, das sind Plasmamembran-Zellwandverbindungen, die bis in den vordersten Bereich der Spitze hinein reichen.
- Hypertonische Lösungen verhindern Zellstreckung und damit auch das Wurzelwachstum. Während in Polyethylenglycol die Wurzel entsprechend kurz bleibt, wächst sie in Glucose aber weiter. Dieses Phänomen ist bekannt und geht auf die Aufnahme von Glucose in die Wurzel zurück. Unsere Beobachtungen zeigten, dass auch Mannit in die Wurzel aufgenommen wird.
- Auch die Rhizodermiszellen nehmen aus hypertonischen Zuckerlösungen Glucose und Mannit auf, dadurch ist ein Wurzelhaarwachstum auch in höher osmotischen Medien möglich.
- Die Länge der neugebildeten Wurzelhaare nimmt mit steigender Konzentration des Außenmediums linear ab; Wachstumsgeschwindigkeit und Cytoarchitektur entsprechen dabei aber immer der Kontrolle.
- Während des Wurzelhaarwachstums schnürt die Plasmamembran kleine Endocytosevesikel ins Plasma ab; große Osmocytosevesikel bilden sich während der Plasmolyse.

bei Salzstress:

- Starke Aufnahme von Natrium und Kalium Ionen; dies führt zur Erhöhung des osmotischen Wertes.
- Beschleunigtes Spitzenwachstum der Wurzelhaare in hypotonischen Konzentrationen; die polare Organisation und die Cytoarchitektur bleiben erhalten.
- Keine Veränderungen bei der Endocytose unter Salzeinwirkung.
- Keine Plasmolyse in hypertonischen Konzentrationen aufgrund der Ionenaufnahme, jedoch Zerstörung des Cytoskeletts.
- Veränderung der Membranpermeabilität sowie der Zellwandplastizität; daher keine Neubildung von Wurzelhaaren.

Das Verständnis der Reaktionen von Wurzeln und Wurzelhaaren auf osmotischen Stress und Salzbelastung ist Voraussetzung beispielsweise für die Selektion resistenter Sorten aus der genetischen Variabilität der Pflanzen. Darüber hinaus lassen sich prinzipielle physiologische Parameter des Wurzelhaarwachstums dadurch erklären.

SUMMARY

Roots and root hairs play a pivotal role in supplying the plant with water and minerals, and they are the first to sense environmental changes in the soil. Concerning osmotic and salt stress, relatively much is understood about the reactions of roots; only very little, however, is known about root hairs. This work describes the effects of osmotic stress and salinity on growth and cytoarchitecture of root hairs as well as on their capability to adapt to different osmotic media. Main topics are the analysis of tip-growth and of the polar organisation of the root hairs. In addition, we observed the cytoplasmic streaming and we analysed the osmotic situation of roots and root hairs.

We observed root hairs of 3 days old seedlings of *Triticum aestivum*, cultivated in chambers with culture solution (phosphate buffer). To simulate osmotic stress, the plants were exposed to glucose, mannit or polyethylenglycol solutions of different concentrations (100 – 500 mOsm). To induce salt stress, we used NaCl and KCl of similar concentrations. For the investigation of plasma membrane-cell wall connections as well as of endocytotic vesicles, plasma membranes were labelled with FM1-43 (a membrane selective non permeable styryl dye). Living root hairs were analysed by confocal laser scanning microscopy and by video enhanced light microscopy.

Root hairs react differently to osmotic stress and to salt stress.

Main effects of osmotic stress are:

- The osmotic value of root cells is higher (350 mOsm) than of root hairs (150 mOsm). In root hairs the osmotic value increases during growth.
- During plasmolysis, the protoplast retracts from the cell wall in the tip, but there is no modification in the cytoarchitecture.
- New cell wall is built continuously, even during plasmolysis.
- In lower concentrations (250 mOsm), the protoplast retracts very slowly, so that cell wall material becomes discharged and deposited in the emptying tip, where it builds a thick layer. Plasmolysis proper occurs only in concentrations of 300 mOsm and higher.
- At a stage of strong plasmolysis many Hechtian strands are formed; they represent membrane-cell wall connections which are distributed relatively evenly over the surface of the protoplast including the tip in the very front.

- In hypertonic solutions of polyethylenglycol, roots and root hairs stop growth because cell expansion is not possible. In glucose, however, roots continue to grow. This is a common phenomenon based on the uptake of glucose. In our experiments, we proved that also mannitol, that is considered to be impermeable, is taken up.
- Because of the uptake of glucose and mannitol also the rhizodermis can adapt to high osmotic concentrations, so that new root hairs form even in hypertonic solutions.
- The length of the new root hairs is decreasing linearly with increasing concentration, although growth rate and cytoarchitecture are similar to the control.
- In growing root hairs, small endocytotic vesicles detach from the plasma membrane, bigger osmolytic vesicles form during plasmolysis.

Effects of salt stress:

- During salt stress, there is an uptake of sodium and potassium ions that results in an increase of the osmotic value of the cells.
- The effect of this increase is a faster tip growth in hypotonic solutions, although polar organisation and cytoarchitecture of the root hair remain the same.
- Also the distribution of endocytotic vesicles is similar to the control.
- As a result of the uptake of ions, no plasmolysis occurs in hypertonic salt solutions. The polar organisation of the cytoplasm is lost, suggesting that the cytoskeleton is affected.
- There is also a change in the permeability of the plasma membrane and in the flexibility of the cell wall, which probably is another reason why no new root hairs are formed in salt solutions.

Understanding of the reactions of roots and root hairs to osmotic stress and salinity in the soil is a prerequisite to conceive the ecology of a plant in general and to select for instance resistant varieties from the genetic pool of plants. In addition, principal physiological and cell biological parameters of root hair growth are revealed.

INHALTSVERZEICHNISS

Danksagung.....	2
Zusammenfassung.....	3
Summary.....	5
Inhaltsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	13
1.1. Zielsetzung.....	14
1.2. Allgemein.....	15
1.3. Wurzelhaare.....	16
1.3.1. Entstehung.....	17
1.3.2. Aufbau.....	18
1.3.2.1. tip zone.....	18
1.3.2.1.1. Apikalzone (<i>clear-zone</i>).....	18
1.3.2.1.2. Subapikalzone.....	18
1.3.2.2. vacuolation-zone.....	18
1.3.2.3. foot-zone.....	18
1.3.3. Spitzenwachstum (<i>tip-growth</i>).....	19
1.4. Zellwand.....	20
1.4.1. Zusammensetzung.....	20
1.4.1.1. Pektine.....	20
1.4.1.2. Hemizellulosen.....	21
1.4.1.3. Zellulose.....	21
1.4.2. Entstehung.....	21
1.4.2.1. Primärwand.....	22
1.4.2.2. Sekundärwand.....	22
1.4.3. Zellwandbildung bei Wurzelhaaren.....	22
1.5. Membrantransport.....	24
1.5.1. passiver Transport (Diffusion).....	24
1.5.2. aktiver Transport.....	25
1.6. Endocytose.....	26
1.7. Plasmolyse.....	27
1.7.1. Osmose.....	27
1.7.2. Plasmolyse.....	27

1.7.2.1. Grenzplasmolyse	27
1.7.2.2. Plasmolyseformen	28
1.7.2.3. Hecht'sche Fäden	28
1.7.2.4. Osmocytose	29
1.8. Bodenversalzung	30
1.8.1. natürliche Versalzung	30
1.8.2. künstliche Versalzung	30
2. Material und Methoden	31
2.1. <i>Triticum aestivum</i>	32
2.2. Kultivierung	33
2.3. Mikroskopie	34
2.3.1. Fluoreszenzmikroskopie	34
2.3.1.1. Auflichtfluoreszenz	34
2.3.1.2. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	35
2.3.2. Video Enhanced Light Microscopy (VEC)	35
2.4. Dokumentation	36
2.5. Statistik und Graphiken	36
2.6. Lösungen	37
2.6.1. osmotische Lösungen	37
2.6.1.1. Glucose	37
2.6.1.2. Mannit	37
2.6.1.3. Polyethylenglycol (PEG)	37
2.6.2. Salz-Lösungen	38
2.6.2.1. NaCl	38
2.6.2.2. KCl	38
2.7. Farbstoffe	39
2.7.1. Anilinblau	39
2.7.2. FM1-43	39
3. Ergebnisse	40
3.1. Kultivierung von <i>Triticum aestivum</i> - Versuche zur Optimierung der Wurzelhaarbildung	41
3.1.1. Keimlingswachstum nach unterschiedlicher Samenquellung	41
3.1.1.1. Quellen in Aqua dest.	41
3.1.1.2. Quellen Filterpapier	43

3.1.2. Auswirkung unterschiedlicher Kulturmedien auf die Wurzelhaarbildung	44
3.1.2.1. Leitungswasser	44
3.1.2.2. Aqua dest.	44
3.1.2.3. PIPES.....	44
3.1.2.4. Phosphatpuffer	45
3.1.3. Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Wurzelhaarbildung	45
3.1.3.1. Quellen in Aqua dest. bei 24°C	46
3.1.3.2. Quellen in Aqua dest. bei 4 °C	46
3.1.3.3. Quellen auf Filterpapier bei 24°C	46
3.1.3.4. Quellen auf Filterpapier bei 4°C	46
3.2. <i>Triticum aestivum</i> in der Kontrolle	51
3.2.1. Bildung und Form der Wurzelhaare.....	51
3.2.2. Kernposition in Wurzelhaaren von <i>Triticum aestivum</i>	51
3.2.3. Polarität und Plasmaströmung in Wurzelhaaren	52
3.2.4. Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i>	54
3.3. Auswirkung von osmotischem Stress auf die Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i>	56
3.3.1. Reaktion der Wurzelhaare auf Glucose unterschiedlicher Konzentrationen	56
3.3.1.1. 100 mOsm Glucose	57
3.3.1.2. 150 mOsm Glucose	58
3.3.1.3. 200 mOsm Glucose	59
3.3.1.4. 250 mOsm Glucose	62
3.3.1.5. 300 mOsm Glucose	63
3.3.1.6. 350 mOsm Glucose	64
3.3.1.7. 400 mOsm Glucose	65
3.3.1.8. 1000 mOsm Glucose	66
3.3.1.9. Überblick über die Reaktionen der Wurzelhaare auf ansteigende Konzentrationen von Glucose	67
3.3.1.9.1. Längenwachstum.....	67
3.3.1.9.2. Polarität	67
3.3.1.9.3. Kernpositon	67
3.3.1.9.4. Strömung	67
3.3.1.9.5. Plasmolyse.....	68
3.3.2. Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit unterschiedlicher Konzentrationen	69
3.3.2.1. 150 mOsm Mannit.....	69
3.3.2.2. Plasmolyseverlauf in Mannit.....	70

3.3.3. Dynamik der Vesikelbewegungen in der <i>clear-zone</i> unter osmotischem Stress	71
3.3.3.1. Kontrolle	71
3.3.3.2. 300 mOsm Mannit.....	71
3.3.3.3. 450 mOsm Mannit.....	72
3.3.4. Osmocytose – verändertes Endocytoseverhalten während der Plasmolyse.....	73
3.3.5. Zellwandbildung und Zellwandhaftung des Protoplasten während der Plasmolyse...	74
3.3.6. Adaptierung der Wurzel an erhöhte osmotische Bedingungen.....	77
3.3.6.1. Wurzelwachstum in Mannit	77
3.3.6.2. Wurzelwachstum in Polyethylenglycol.....	78
3.3.6.3. Vergleich des Wurzelwachstums in Mannit und Polyethylenglycol	79
3.3.7. Adaptierung der Wurzelhaare an erhöhte osmotische Bedingungen	80
3.3.7.1. Wurzelhaarbildung in Mannit	80
3.3.7.2. Wurzelhaarbildung in Polyethylenglycol.....	84
3.3.7.3. Vergleich der Wurzelhaarbildung in Mannit und Polyethylenglycol	87
3.4. Beeinflussung der Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i> durch Salze.....	88
3.4.1. Reaktion der Wurzelhaare auf Natrium-Chlorid unterschiedlicher Molaritäten.....	88
3.4.1.1. 50 mM NaCl.....	88
3.4.1.2. 75 mM NaCl.....	89
3.4.1.3. 100 – 200 mM NaCl.....	90
3.4.1.4. Überblick über die Reaktionen der Wurzelhaare auf ansteigende Molaritäten von Natriumchlorid	91
3.4.1.4.1. Längenwachstum.....	91
3.4.1.4.2. Polarität	91
3.4.1.4.3. Kernpositon	91
3.4.1.4.4. Strömung	91
3.4.1.4.5. Plasmolyse.....	92
3.4.2. Reaktion der Wurzelhaare auf Kaliumchlorid unterschiedlicher Molaritäten	92
3.4.3. Rasche Aufnahme von Ionen zum Konzentrationsausgleich.....	92
3.4.4. Adaptierung der Wurzel an Salzstress	93
3.4.4.1. Wurzelwachstum in Natriumchlorid	93
3.4.5. Adaptierung der Wurzelhaare an Salzstress.....	94
3.4.5.1. Wurzelhaarbildung in Natriumchlorid	94
3.4.6. Dynamik der Vesikelbewegungen in der <i>clear-zone</i> unter Salzstress	96
3.4.6.1. Kontrolle	96
3.4.6.2. 50 mM NaCl.....	96

3.4.7. veränderte Endocytose unter Einwirkung von Natriumchlorid.....	97
4. Diskussion	98
4.1. Kultivierung von <i>Triticum aestivum</i> zur Beobachtung von Wurzelhaaren.....	99
4.2. Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i> in der Kontrolle	100
4.3. Wurzelhaare unter Einwirkung von osmotischem Stress und Salz.....	103
4.4. Reaktionen auf die Einwirkung von osmotischem Stress	105
4.5. Unterschiedliche Aufnahme von Polyethylenglycol, Mannit und Glucose	111
4.6. Anpassung an verschiedene Konzentrationen von Mannit und Polyethylenglycol	113
4.7. Reaktionen auf die Einwirkung von Salzstress	117
4.8. Anpassung an verschiedene Konzentrationen von NaCl	120
4.9. offene Fragen.....	121
5. Anhang	122
5.1. Bildtafel – Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen Mannit	123
5.2. Bildtafel – Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen PEG	126
5.3. Bildtafel – Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen NaCl	128
Abbildungsverzeichnis	131
Graphikverzeichnis.....	135
Literaturverzeichnis.....	136
Lebenslauf.....	141

Beilage:

eine Compact Disk mit folgendem Inhalt

- einer PDF-Version der Diplomarbeit

- mit Filmbeispielen zum Text:

Filmbeispiel 01:	Wurzelhaar in der Kontrolle.....	Seite 52
Filmbeispiel 02:	Wachstum eines Wurzelhaars in der Kontrolle.....	Seite 55
Filmbeispiel 03:	Vakuole in der clear-zone nach 5 Minuten bei 300 mOsm Glucose	Seite 63
Filmbeispiel 04:	Abschnürung eines Teilprotoplasten mit Vakuole nach 50 Minuten bei 350 mOsm Glucose	Seite 64
Filmbeispiel 05:	Plasmolyse bei 1000 mOsm Glucose	Seite 66
Filmbeispiel 06:	Vesikelbewegung in der clear-zone bei einem Kontroll-Wurzelhaar.....	Seite 71
Filmbeispiel 07:	Vesikelbewegung in der clear-zone nach 20 Minuten in 300 mOsm Mannit	Seite 71
Filmbeispiel 08:	Vesikelbewegung in der clear-zone nach 20 Minuten in 450 mOsm Mannit	Seite 72
Filmbeispiel 09:	neu gebildetes Wurzelhaar nach 30 Stunden in 250 mOsm Mannit.....	Seite 82
Filmbeispiel 10:	neu gebildetes Wurzelhaar nach 30 Stunden in 400 mOsm Mannit.....	Seite 82
Filmbeispiel 11:	Wachstumsgeschwindigkeit in der Kontrolle (Zeitraffer 1sec = 1 min)	Seite 88
Filmbeispiel 12:	Wachstumsgeschwindigkeit in 50 mOsm NaCl (Zeitraffer 1sec = 1 min)	Seite 88
Filmbeispiel 13:	Platzen der Tonoplastenmembran sowie der Zellwand nach 25 Minuten in 50 mOsm NaCl	Seite 88
Filmbeispiel 14:	Vesikelbewegung in der clear-zone bei einem Kontroll-Wurzelhaar.....	Seite 96
Filmbeispiel 15:	Vesikelbewegung in der clear-zone nach 30 Sekunden in 50 mOsm NaCl	Seite 96
Filmbeispiel 16:	Vesikelbewegung in der clear-zone nach 15 Minuten Sekunden in 50 mOsm NaCl.....	Seite 96

- mit Videoplayer - Winamp 2.91 zur Installation

1. EINLEITUNG

1.1. ZIELSETZUNG

Grundlage, für die Versuche dieser Arbeit war die Frage, wie Wurzelhaare auf zellulärer Ebene auf osmotischen Stress und Salz reagieren, und bis zu welchem Grad sie sich an diese Stressfaktoren anpassen können.

Zu diesem Zweck waren mikroskopische Untersuchungen an Wurzelhaaren notwendig. Als erstes war eine geeignete Methode zur Kultivierung von *Triticum* Wurzelhaaren zu finden, um ein stabiles Wurzelhaarwachstum in hydroponischer Kultur zu erreichen.

Bei den zellphysiologischen Fragestellungen stand die Analyse des Spitzenwachstums unter Einwirkung von osmotischem Stress und Salz im Mittelpunkt. Es war zu klären, wie sich die polare Organisation des Wurzelhaares, die Strömung und die Kernposition bei osmotischem Stress und Salzstress verhalten. Zugleich sollte auch die osmotische Situation von Wurzelhaaren dargestellt werden.

Es sollte geklärt werden, ob verschiedene osmotische Medien und Salze die Reaktion oder Anpassung der Wurzelhaare beeinflussen können. In diesem Zusammenhang sollte auch festgestellt werden, ob und wie stark Zucker oder Ionen aufgenommen werden.

Außerdem galt es herauszufinden, wie ausgeprägt die Zellwandhaftung des Protoplasten ist, und welche Aufschlüsse diese über die Zellwandstruktur geben könnte. Ferner sollten Veränderungen bei der Endocytose unter osmotischem Stress und Salz-Einwirkung untersucht werden, um Rückschlüsse auf Membranfluss und Vesikelbewegung ziehen zu können.

1.2. ALLGEMEIN

Um überleben zu können, braucht jede Pflanze spezielle Anpassungen an die Umwelt. Aus dem breiten Spektrum der Stressfaktoren, denen Pflanzen ausgesetzt sein können, ist osmotischer Stress ein sehr bedeutender, denn eine gesicherte Wasser- und Nährstoffaufnahme ist die Grundlage für ein erfolgreiches Wachstum und somit auch für das Überleben.

Zuständig für die Wasseraufnahme der Pflanze ist die Wurzel. Um diese Aufgabe bestmöglich zu erfüllen ist eine möglichst große Oberfläche vorteilhaft. Dazu bildet die Rhizodermis einzellige Haare, sogenannte Wurzelhaare, aus. Diese feinen Strukturen spielen eine zentrale Rolle bei der Wasser- und Nährstoffaufnahme. Aus diesem Grund sind die Resistenz und das Anpassungsvermögen dieser Zellen für die gesamte Pflanze von enormer Bedeutung.

Ein Verständnis der physiologischen Anpassungsmechanismen ist in Anbetracht der zunehmenden Desertifikation von landwirtschaftlichen Flächen, einem weltweiten ökologischen sowie auch ökonomischen Problem, Voraussetzung beispielsweise für die Selektion resistenter Sorten aus der genetischen Variabilität der Pflanzen.

1.3. WURZELHAARE

Wurzelhaare dienen der Vergrößerung der Wurzeloberfläche. Bestätigt wurde dies durch eine von Dittmer (1937) bei einer Roggenpflanze durchgeführte Messung. Diese ergab eine Wurzeloberfläche von 235 Quadratkilometern (Haupt- und Seitenwurzeln). Dazu kommt noch mit 400 Quadratkilometern die Oberfläche von 14 Milliarden lebenden Wurzelhaaren.

Um eine bessere Wasser- und Nährstoffaufnahme zu erreichen, haben die Wurzelhaare engen Kontakt zu den Bodenpartikeln und sind auch oft mit diesen „verwachsen“; dies geschieht durch gallertartige Absonderungen der Wurzelhaubenzellen, wahrscheinlich einem Pektin, von dem die Partikel festgehalten werden. Diese Gallerthülle bietet zusätzlich noch einen Austrocknungsschutz für die Wurzelspitze und die Wurzelhaare. Sie ermöglicht auch eine bessere Verteilung der von der Wurzel abgegebenen Säuren in der Rhizosphäre, wodurch die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Pflanze verbessert wird. Der Stofftransport wird durch diese Schicht jedoch nicht beeinflusst (Raven *et al.*, 2000; Schwarz, 1883).

Wurzelhaare sind Bildungen der Rhizodermiszellen. Entweder können alle Zellen der Rhizodermis Wurzelhaare bilden, oder es sind nur spezielle Zellen dazu in der Lage; diese werden als Trichoblasten bezeichnet. Trichoblasten und Atrichoblasten sind oft in einem regelmäßigen Muster angeordnet.

Im Längsverlauf der Wurzel befindet sich die Wurzelhaarzone nahe der Wurzelspitze hinter der Streckungszone. Im Zuge des Wurzelwachstums werden immer neue Wurzelhaare gebildet, die aber bereits nach wenigen Tagen wieder absterben, die Lebensdauer eines Wurzelhaares ist somit relativ kurz. Eine Ausnahme stellen die Wurzelhaare der Fabaceae dar, bei denen eine Infektion mit Rhizobien erfolgt.

Die Anzahl der gebildeten Wurzelhaare ist nicht konstant und sehr stark von der umgebenden Feuchtigkeit abhängig. Die höchste Anzahl an Wurzelhaaren wird in feuchter Luft gebildet, was etwa den natürlichen Verhältnissen im Boden gleichkommt. In wässriger Umgebung werden normalerweise nur wenige oder gar keine Wurzelhaare gebildet (Schwarz, 1883). Diese Anpassungsfähigkeit ermöglicht der Pflanze, bei leichter Verfügbarkeit der Nährstoffe Energie und Baumaterial zu sparen.

1.3.1. Entstehung

Zu Beginn der Wurzelhaarbildung entsteht am unteren Ende (Richtung Wurzelspitze) der Rhizodermiszelle ein *bulge*, eine Wölbung der Zelle. Die Rhizodermiszelle selbst besitzt wenig Plasma in einem dünnen Wandbelag, die Organellen bewegen sich sehr langsam in rotationsförmiger Strömung.

Um nun diese Ausbuchtung in der Zellwand zu ermöglichen muss die Zellwand aufgeweicht werden, dies geschieht durch einen lokal niedrigen pH-Wert und eine hohe Ca^{2+} -Konzentration, zusätzlich werden auch corticale Microtubuli reduziert (Baluška *et al.*, 2000; Gilroy and Jones, 2000).

In dem jungen Wurzelhaar wird die Polarität des Cytoplasmas immer deutlicher und manifestiert sich. Diese Vorgänge sind von Aktin abhängig. Versuche von Baluška *et al.* (2000) zeigten, dass bei fehlendem F-Aktin das Wurzelhaarwachstum und die polare Organisation gehemmt werden.



Abbildung 1: *bulge*



Abbildung 2: junges Wurzelhaar

1.3.2. Aufbau

Das Wurzelhaar kann in mehrere Zonen unterteilt werden (Volkman, 1984):

1.3.2.1. tip zone

Diese Zone kann in zwei Abschnitte unterteilt werden (Galway *et al.*, 1997).

1.3.2.1.1. Apikalzone (clear-zone)

Dort befindet sich eine polare Anhäufung von Plasma mit kleinen Vesikeln (Sievers, 1963), die sich meist ungerichtet in Brownscher Bewegung bewegen, nur manchmal kommt es über kurze Strecken zu einer gerichteten Bewegung von Vesikeln. Hier findet an der Spitze das Wachstum des Wurzelhaares statt.

1.3.2.1.2. Subapikalzone

Hier befinden sich auch größere Organellen wie ER, Mitochondrien und Golgi-bodies, die sich in einer verkehrten Springbrunnenströmung (*reverse fountain streaming*) bewegen, dabei strömen die Organellen an den Außenseiten nach vorne, kehren aber vor der *clear-zone* um und strömen in der Mitte durch Plasmastränge wieder zurück. Organisiert werden diese Bahnen ebenfalls von Aktinfilamenten, an denen sich dann die Organellen bewegen (Tominaga *et al.*, 2000). Der Zellkern befindet sich ebenfalls in diesem Bereich und wird bei vielen Pflanzen während des Wachstums von Mikrotubulibündeln in einem relativ gleichbleibendem Abstand zur Spitze gehalten (Sato *et al.*, 1995).

1.3.2.2. vacuolation-zone

In diesem Bereich füllt die Vakuole die gesamte Zelle aus, sodass nur mehr ein dünner Plasmawandbelag mit Rotationsströmung übrig bleibt. Der Druck, den die Vakuole ausübt ist, für das Wachstum von größter Bedeutung.

1.3.2.3. foot-zone

Die *foot-zone* ist der hinterste Abschnitt des Wurzelhaares, nahe der Rhizodermis. Dieser Bereich ist zur Gänze mit Vakuole ausgefüllt.

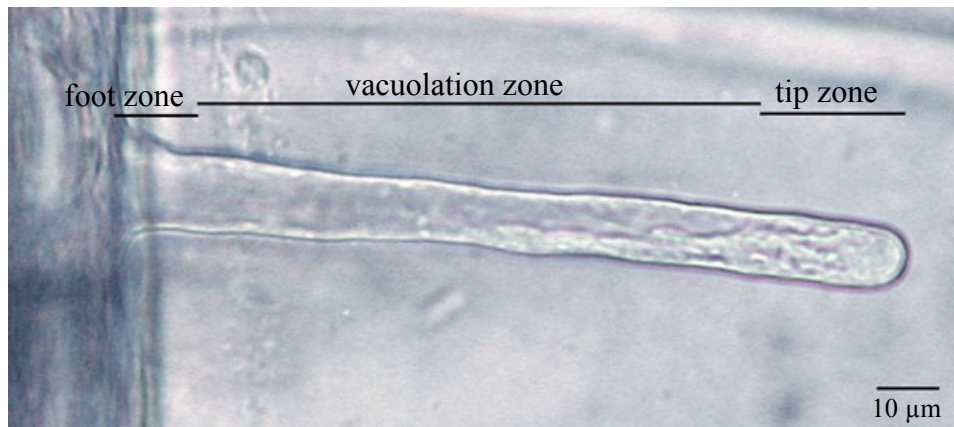


Abbildung 3: Wurzelhaarzonierung

1.3.3. Spitzenwachstum (*tip-growth*)

Die Wachstumszone eines Wurzelhaares liegt ganz vorne in der Apikalzone, dem *dome*. Dort verschmelzen die Membran- und Zellwandmaterial enthaltenden Golgivesikel mit der Plasmamembran und bilden somit neue Membran und Zellwand. Der Druck des Tonoplasten verteilt sich gleichmäßig über die gesamte Zellwand. Da die neue Zellwand an der Spitze noch besonders dünn und elastisch ist, kann sie dort dem Turgordruck nachgeben während sie in älteren Teilen des Wurzelhaares, also in den Flanken, schon zu fest ist. Durch diese unterschiedliche Zellwandfestigkeit kann sich die Zelle nur nach vorne ausdehnen, man spricht daher von „Spitzenwachstum“.

Im Gegensatz zu normalem Zellwachstum, bei dem Zellulosefibrillen, von corticalen Mikrotubuli gelenkt, die Zellwand bilden, ist beim *tip-growth* F-Aktin von Bedeutung. Es bildet Stränge durch das Wurzelhaar bis weit in die Spitze hinein und transportiert so die Vesikel in den sich ausdehnenden *dome* (Kropf *et al.*, 1998; Ruijter *et al.*, 2001; Sievers, 1963).

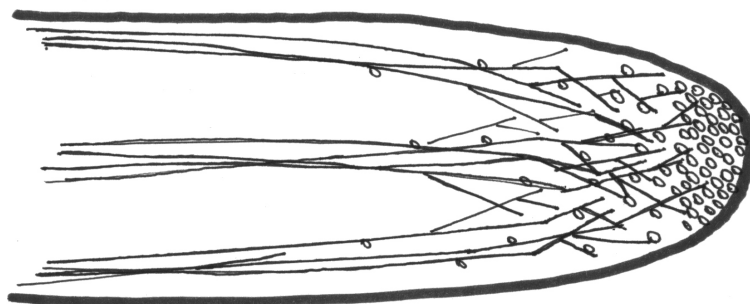


Abbildung 4: Wurzelhaarspitze mit Aktinfilamenten

1.4. ZELLWAND

Pflanzliche Zellen besitzen im Gegensatz zu tierischen eine Zellwand, die den Protoplasten umgibt. Sie ist für Pflanzen von größter Bedeutung, denn zum einen bietet sie Schutz vor äußeren Einflüssen, zum anderen hält sie dem Druck des Tonoplasten stand. Dieser osmotische Druck in der Vakuole ist für die Pflanzen notwendig, um Wasser aufnehmen zu können. Ohne Zellwand würden die Zellen aufgrund übermäßiger Wasseraufnahme platzen.

1.4.1. Zusammensetzung

Die Zellwand von Pflanzen besteht zum überwiegenden Teil aus Kohlenhydraten sowie eingelagerten Proteinen (Frey-Wyssling, 1959; Lüttge *et al.*, 1988; Raven *et al.*, 2000).

Bei den Kohlenhydraten könne drei Gruppen unterschieden werden:

- Pektine
- Hemizellulosen
- Zellulose

1.4.1.1. Pektine

Pektine bestehen aus einem Gemisch von sauren Polysacchariden mit dem Grundbaustein Galakturonsäure, aus welcher durch Polymerisation α -1-4-Polygalakturonsäure (Pektinsäure) gebildet wird. In der Pflanze werden die meisten der Carboxylgruppen mit Methylalkohol verestert, so entsteht Pektin. Durch diese Veresterungen besitzen Pektine auch ein extrem hohes Wasserhaltevermögen.

Pektine werden durch Ca^{2+} Ionen in einem *eggbox*-Muster zusammengehalten und bilden gemeinsam mit den Hemizellulosen die Matrix der Zellwand. Durch Senken des pH-Wertes in der Zellwand wird Ca^{2+} durch H^{+} Ionen ersetzt und es kommt zum Auflösen der Verbindung zwischen den Pektinen; die Zellwand wird wieder verformbar, plastisch.

1.4.1.2. Hemizellulosen

Hemizellulosen stellen ebenfalls ein Gemisch von Polysacchariden dar, jedoch nicht von sauren wie bei Pektin, sondern von neutral reagierenden. Hauptbestandteile sind Pentosane und Hexosane (Abkömmlinge von Fünfer- und Sechszuckern). Eine Gruppe bildet immer die Hauptkette, die andere die Seitenkette.

Hemizellulosen sind durch Wasserstoffbrücken eng an die Zellulosefibrillen geknüpft.

1.4.1.3. Zellulose

Zellulose ist ebenfalls ein Polysaccharid, welches aber nur aus einem Zucker aufgebaut ist, der β -D-Glucose. Durch glycosidische β -1-4-Bindung von 300-3500 Glucoseuntereinheiten entsteht ein unverzweigtes Makromolekül, die Zellulose.

1.4.2. Entstehung

Die Bestandteile der Zellwandmatrix (Pektine und Hemizellulosen) werden in den Dictyosomen (Gesamtheit ist der Golgiapparat) der Zelle produziert und mittels Golgivesikeln zur Plasmamembran transportiert. Dort verschmelzen die Vesikel mit der Membran (Exocytose) und geben den Inhalt nach außen ab.

In der Zellmembran befinden sich die Zellulosesynthase-Komplexe; diese bestehen aus 6 rosettenartig angeordneten Proteinen. In der Mitte dieser Rosette erzeugen die Proteine aus den vom Cytoplasma angelieferten UDP-Glucose Molekülen mehrere Zellulosefasern.

Die einzelnen Zellulosefasern verbinden sich zu Mikrofibrillen, welche dann die Zellwand durchziehen. Gesteuert wird der Verlauf der Zellulosefasern durch corticale Mikrotubuli; diese befinden sich direkt unter der Plasmamembran und sind mit den Zellulosesynthase-Komplexen verbunden. So können die Synthase-Komplexe entlang der Mikrotubuli bewegt werden (Raven *et al.*, 2000).

1.4.2.1. Primärwand

Die Primärwand ist das erste Stadium der Zellwandbildung. Die Hauptbestandteile sind Pektine und Hemizellulosen, die von Golgivesikeln ausgeschüttet werden. Zellulose ist nur zu etwa 10% vorhanden. Die Zellulosefasern sind verstreut angeordnet (Streutextur) und bilden noch keine feste Struktur. In diesem Stadium ist die Zellwand noch stark verformbar und dehnbar.

1.4.2.2. Sekundärwand

Im weiteren Verlauf der Zellwandbildung wird immer mehr Zellulose gebildet, wodurch die Zellwand immer dicker wird. Parallel verlaufende Zellulosefasern (Paralleltextur) bewirken eine hohe Stabilität der Zellwand. Die Richtung der Zellulosefasern bestimmt normalerweise die Richtung des Streckungswachstums und somit die Form der Zelle.

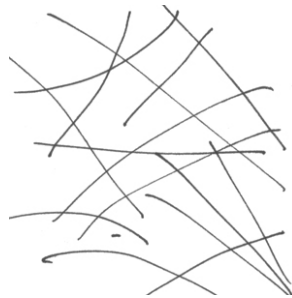


Abbildung 5: Primärwand

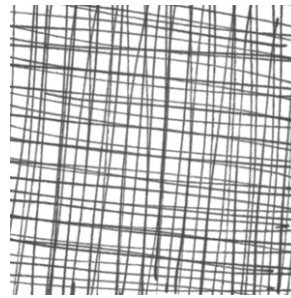


Abbildung 6: Sekundärwand

1.4.3. Zellwandbildung bei Wurzelhaaren

Die Zellwandbildung ist bei Wurzelhaaren gleich wie bei anderen Zellen, nur dass sie nicht über die gesamte Oberfläche gleichmäßig (isolateral) erfolgt, sondern unilateral/polar, also von der Spitze weg zur Basis hin (Sievers, 1963; Volkmann, 1984). An der Spitze verschmelzen die Golgivesikel mit der Plasmamembran und geben Pektine und Hemizellulosen nach außen ab, so bilden sie eine sehr verformbare Zellwand, die nur mit wenig Zellulose verstärkt ist, dies ermöglicht noch eine Zellstreckung nach vorne.

Unterhalb der Spitze an den Flanken bildet sich schon mehr Zellulose und verstärkt die Zellwand, wodurch höhere Stabilität entsteht und keine Ausdehnung der Zelle zur Seite hin möglich wird. Der Zellulosegehalt der Zellwand sowie die gerichtete Anordnung der Fasern nehmen zur Wurzelhaarbasis hin zu. In der *foot-zone* ist dann eine fertige sekundäre Zellwand vorhanden.

In der Graphik unten sind schematische Ausschnitte der Zellwand aus verschiedenen Regionen des Wurzelhaares dargestellt. In der *tip-zone* ist die Zellwand sehr locker und verformbar, in der *vacuolation-zone* und der *foot-zone* wird sie immer dichter und fester.

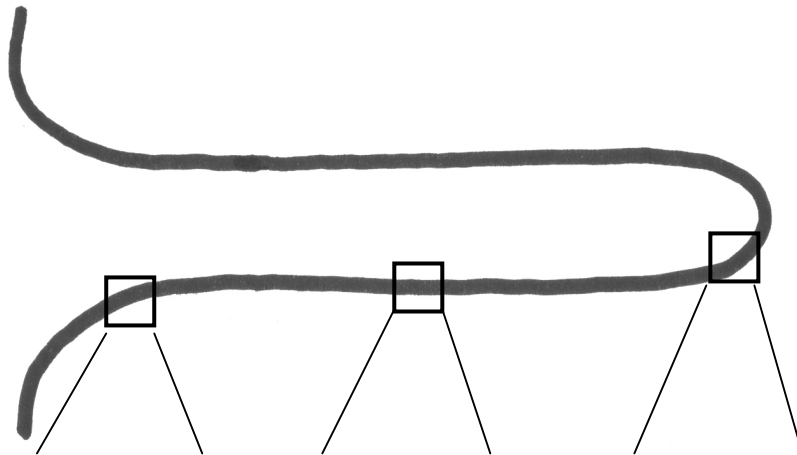


Abbildung 7: Zellwandstruktur bei Wurzelhaaren:
schematische Darstellung von Menge und Anordnung der Zellulose -
Mikrofibrillen in verschiedenen Abschnitten des Wurzelhaares

1.5. MEMBRANTRANSPORT

Die Plasmamembran grenzt die Zelle nach außen ab und schränkt somit auch den Stoffaustausch mit der Umgebung ein. Die Membranen besitzen daher einige Transportsysteme, die einen selektiven Stoffaustausch ermöglichen. Es können 2 Gruppen von Transportsystemen unterschieden werden (Harrison and Lunt, 1977):

1.5.1. passiver Transport (Diffusion)

Aufgrund eines Konzentrationsgefälles zwischen dem Umgebungsmedium und dem Zellinhalt (Vakuole) kann es zu einem Stofffluss durch die Membran kommen.

Kleine unpolare Moleküle können die Membran frei passieren. Für polare Moleküle sind die Membranen mit Poren ausgestattet, welche die lipophile Doppelschicht durchziehen, oder die polaren Substanzen werden zusammen mit kleinen lipidlöslichen Molekülen durch die Membran transportiert. Für Wassermoleküle gibt es spezielle Kanäle, sogenannte „Aquaporine“; diese beschleunigen den Transport von Wassermolekülen, blockieren aber Ionen und andere Stoffe (Raven *et al.*, 2000).

Neben den Transportkanälen gibt es noch Transportmoleküle (Carrier-Proteine), mit deren Hilfe Stoffe durch die Membran geschleust werden. Dabei bindet an der Außenseite eine Substanz an den Carrier und bildet mit diesem einen Komplex, dieser diffundiert aufgrund des Konzentrations-Gefälles durch die Membran spaltet sich an der Innseite wieder auf. Dabei wird die Substanz nach innen abgegeben, der Carrier wandert danach wieder an die Außenseite der Membran. Dieser Weg ist energetisch günstiger und bewirkt daher auch eine höhere Transportrate. Diese hängt jetzt aber nicht nur vom Konzentrationsgefälle sondern auch von der Menge an Carrier-Proteinen ab. Mittels Carrier werden zum Beispiel Ionen und Glucose aufgenommen.

1.5.2. aktiver Transport

Substanzen können durch Diffusion nicht gegen einen Gradienten durch die Membran diffundieren, daher ist in diesem Fall ein aktiver Transport unter Energieaufwand erforderlich. Als Beispiel können hier Ionenpumpen genannt werden. Diese befördern unter ATP Aufwand H^+ Ionen aus dem Cytoplasma an die Außenseite der Plasmamembran, wodurch ein Konzentrationsgefälle aufgebaut wird. Gemeinsam mit den durch Diffusion wieder eindringenden Ionen können auch andere Substanzen transportiert werden, dieser Vorgang wird als Cotransport bezeichnet (Raven *et al.*, 2000).

1.6. ENDOCYTOSE

Größere Moleküle wie Proteine und Polysaccharide können nicht mittels Transportsystemen durch die Plasmamembran geschleust werden. Sie müssen durch die Bildung einer „Tasche“ in der Membran aufgenommen werden. Diese Einbuchtung in der Membran wird in Form eines Bläschens, Vesikel genannt, abgeschnürt (Endocytose). Diese Vesikel enthalten die von außen aufgenommenen Substanzen und können in der Zelle transportiert werden sowie mit anderen Zellorganellen verschmelzen und ihren Inhalt dort entleeren.

Dieser Vorgang funktioniert auch in umgekehrter Richtung und wird dann als Exocytose bezeichnet. Beide Vorgänge können als Vesikeltransport zusammengefasst werden (Raven *et al.*, 2000).

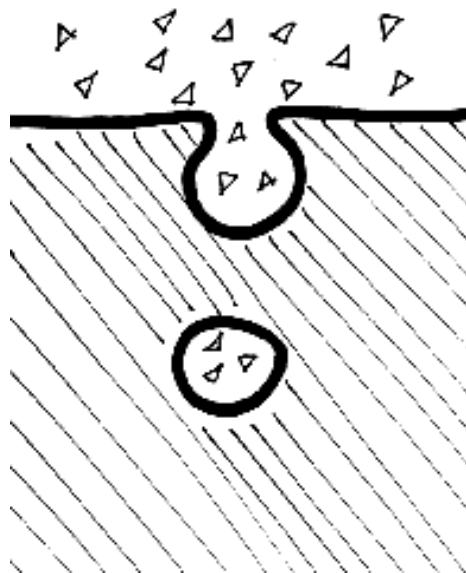


Abbildung 8: Endocytose

1.7. PLASMOLYSE

1.7.1. Osmose

Unter Osmose versteht man den passiven Transport von Wassermolekülen durch eine semipermeable Membran. Ausgelöst wird dieser, durch einen Konzentrationsunterschied der Lösungen an Innen- und Außenseite der Membran. Der Wasserfluss erfolgt von der Seite mit der niedrigeren Konzentration (hypotonisches Medium) auf die mit der höheren (hypertonisches Medium). Der Wassertransport erfolgt solange, bis ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen den beiden Seiten herrscht, oder bis der Turgordruck der Zellwand gleichgroß ist wie der Saugdruck der Vakuole. Die Richtung der Osmose ist unabhängig von der Größe der gelösten Teilchen, sondern ausschließlich von der Gesamtkonzentration aller Teilchen (Raven *et al.*, 2000).

1.7.2. Plasmolyse

Pflanzenzellen reichern in ihren Vakuolen eine Vielzahl von Zuckern, Salzen, organischen Säuren und Aminosäuren an. Durch Osmose füllt sich die Vakuole unter normalen Bedingungen mit Wasser. Die Zelle kann solange Wasser aufnehmen, bis entweder der Druck der Vakuole gegen die Zellwand zu groß wird, oder die Konzentration des Außenmediums gleich oder höher der in der Vakuole ist (Raven *et al.*, 2000).

Liegt eine isotonische Konzentrationsverteilung vor, lässt der Druck der Vakuole auf die Zellwand nach. Ist die Außenlösung hypertonisch beginnt sie Wasser aus der Vakuole nach außen zu saugen. Durch den Wasserverlust zieht sich die Vakuole und somit der gesamte Protoplast zusammen, und es geht der Kontakt zur Zellwand verloren. Dieser Vorgang wird als Plasmolyse bezeichnet. Die Plasmolyse stoppt sobald die Vakuole wieder isotonisch ist mit dem Außenmedium. Sie ist reversibel; wenn man die Zellen in ein hypotonisches Medium überführt, kommt es zur Deplasmolyse.

1.7.2.1. Grenzplasmolyse

Liegt der osmotische Wert des Außenmediums nur gering über dem der Vakuole, löst sich der Protoplast nur ganz leicht. Es entstehen meist an den Ecken schmale Bereiche, in denen kein Zellwandkontakt mehr vorhanden ist. Diesen Zustand nennt man Grenzplasmolyse. Sie kann verwendet werden, um den osmotischen Wert einer Zelle zu bestimmen.

1.7.2.2. Plasmolyseformen

Je nach Zelltyp und Konzentration des Plasmolytikums kann es zu verschiedenen Formen der Plasmolyse kommen (Oparka, 1994):



Abbildung 9: konvexe Plasmolyse



Abbildung 11: konkave Plasmolyse



Abbildung 10: Band-Plasmolyse

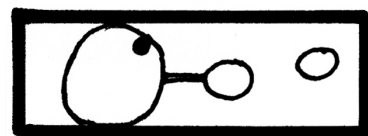


Abbildung 12: Teilprotoplasten

1.7.2.3. Hecht'sche Fäden

Bei der Plasmolyse bildet sich, wie schon von Hecht (1912) beschrieben, ein Netz von protoplasmatischen Fäden zwischen Zellwand und Plasmamembran; die sogenannten Hecht'schen Fäden.

Der Ursprung der Hecht'schen Fäden ist noch nicht vollständig geklärt. Zum einen könnten Hecht'sche Fäden auf Plasmodesmata zurückzuführen sein, damit eine Verbindung zu den Nachbarzellen erhalten bleibt. Oder sie beruhen auf der starken Verankerung von Zellulosesynthese-Komplexen in der Plasmamembran. Beim Zurückziehen des Protoplasten bleibt der Zellulosesynthese-Komplex durch die produzierte Zellulosefaser in der Wand hängen und hält die Plasmamembran fest (Oparka, 1994).

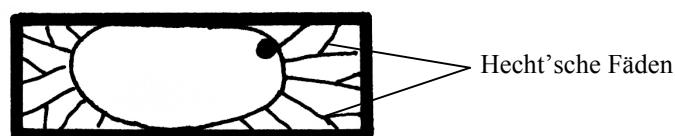


Abbildung 13: Hecht'sche Fäden

Wie von Oparka (1994) festgestellt, dienen Hecht'sche Fäden auch dem Erhalt der Membranoberfläche während der Plasmolyse. Der schrumpfende Protoplast verliert beträchtlich an Oberfläche; da die Membranen nicht sehr elastisch sind können sie sich nicht einfach zusammenziehen, sondern müssen eben durch die Bildung von Hecht'schen Fäden erhalten werden.

1.7.2.4. Osmocytose

Ein weiter Mechanismus zur Membranreduktion ist die Osmocytose. Dabei wird die Membranoberfläche während der Plasmolyse durch die Bildung von Endocytosevesikeln verkleinert.

Ein Versuch von Oparka (1990) zeigt, dass bei der Plasmolyse Gruppen von Endocytosevesikeln entstehen, die bei sofortiger Deplasmolyse wieder mit der Plasmamembran verschmelzen. Mit der Zeit werden sie aber mobiler im Cytoplasma und können auch mit der Kernmembran und anderen Organellen verschmelzen (Oparka, 1994).

1.8. BODENVERSALZUNG

Unter Bodenversalzung ist die Anreicherung von leicht löslichen Salzen wie zum Beispiel Natriumchlorid (NaCl) in den oberen Bodenschichten zu verstehen. Der Salzgehalt im Boden wird mittels Leitfähigkeitsmessung ermittelt.

Die Versalzung der Böden ist in der heutigen Zeit ein weltweit zunehmendes Problem in der Landwirtschaft, denn der Boden wird durch die Salze stark geschädigt. Durch den steigenden osmotische Druck im Bodens wird es für die Pflanzen immer schwieriger, genügend Wasser aufzunehmen. All diese Faktoren führen schließlich zu einer Verminderung der Bodenfruchtbarkeit und damit auch der Erträge (von der Ruhren, 2003).

Der Grund für die Versalzung kann natürlichen und künstlichen Ursprungs sein (Alt, 1993; Uhlenbrock, 2002):

1.8.1. natürliche Versalzung

Diese Art der Versalzung tritt vor allem in ariden Gebieten oder in Gebieten mit hoher Evaporation und Transpiration auf. Dort kommt es zu einem ständigen Verdunstungssog im Bodenwasser, wodurch die darin gelösten Salze an die Oberfläche transportiert werden, an der sie sich anreichern und sogar eine Salzkruste bilden können. Als Beispiel kann hier das Salzlakengebiet im Seewinkel (Burgenland, Österreich) genannt werden. Besonders stark kann dies bei Böden mit hoher Grundwasserbeeinflussung ausgeprägt sein.

1.8.2. künstliche Versalzung

Die Hauptursachen sind hier der starke Streusalzeinsatz sowie die unsachgemäße Bewässerung in ariden Gebieten. Durch die Bewässerung werden die Salze in den unteren Bodenschichten gelöst; erfolgt keine Ableitung dieses Wassers so kommt es durch die Wärme zu einem Aufsteigen des Bodenwassers, wodurch die Salze wieder in den oberen Schichten abgelagert werden. Falsche Bewässerung hat große Gebiete von Indien, Irak, Ägypten, Australien und den USA zerstört.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. *TRITICUM AESTIVUM*

Aufgrund der guten Wurzelhaarbildung und der geringen Verpilzungsgefahr wurde Weizen (*Triticum aestivum*) als Versuchspflanze gewählt. Ein weiterer Grund war die Bedeutung von *Triticum* als Kulturpflanze; ihre Reaktionen auf Trockenheit und Salzstress sind für die Menschen von besonderem Interesse.

Triticum ist ein hexaploides, einjähriges, meist unbegranntes Ährengras mit einer Chromosomenzahl von $2n=42$. Bevorzugt wächst *Triticum* auf schweren nährstoffreichen Böden mit hoher Wasserhaltekapazität (Franke, 1997).

Das Korn bildet bei der Keimung meist 3 Keimwurzeln aus, denen noch zahlreiche sprossbürtige Wurzeln folgen. Das ausgedehnte Wurzelsystem kann eine Tiefe bis zu 160 cm erreichen (Kutschera, 1960).

Die Wurzelhaare von *Triticum aestivum* erreichen in Kultur etwa eine Länge von 1 - 1,5 mm bei einem Durchmesser von $\sim 10 \mu\text{m}$. Es scheint, als ob alle Rhizodermiszellen dazu in der Lage sind Wurzelhaare auszubilden; es ist keine abwechselnde Anordnung von Trichoblasten und Atrichoblasten zu erkennen.

2.2. KULTIVIERUNG

Die Weizenkörner wurden in Aqua dest. bei 4°C für 24 Stunden gequollen. Zur Keimung setzten wir die gequollenen Körner für 24 Stunden bei 24°C auf feuchtes Filterpapier in schräg gestellte Petrischalen. Zur Adaptierung an flüssiges Medium wurden die Keimlinge für 24 Stunden in einem Phosphatpuffer (18,4ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ p.a. Firma Merck Darmstadt und 81,6ml KH_2PO_4 p.a. Firma LOBA Feinchemie Fischamend) mit einem pH von 6,2 und einem osmotischem Wert von ~25 mOsm gezogen. Dazu sind Kammern aus einem Objektträger und einem Deckglas gefertigt worden, zwischen denen an den Seiten sechs Schichten Parafilm als Abstandhalter dienten. Die Kammern mit den Keimlingen wurden senkrecht in Behälter mit der Kulturlösung gestellt (siehe Abbildungen unten). Ab der Keimung erfolgte die gesamte Kultivierung unter Dauerbeleuchtung.



Abbildung 14: Quollen bei 4°C



Abbildung 15: Keimen bei 24°C

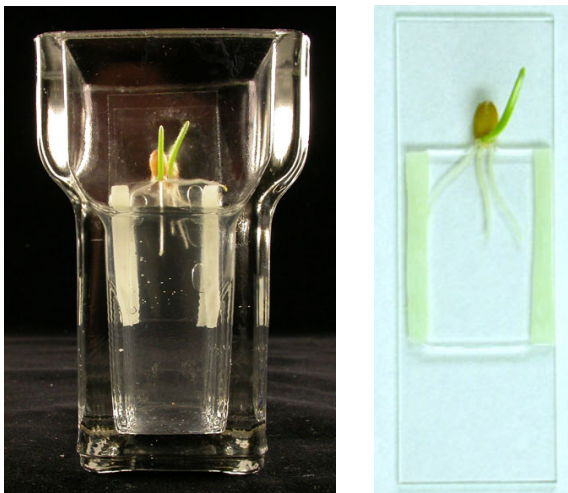


Abbildung 16: Adaptierung bei 24°C und Kammer

2.3. MIKROSKOPIE

Die Beobachtungen im Hellfeld wurden mit einem Mikroskop von NIKON (Labophot 2) durchgeführt. Verwendet wurden folgende Objektive: Olympus 2x/0,08, Leitz 4x/0,10, Nikon 10x/0,25, Nikon 20x/0,40, Nikon 40x/1,30. Für die Beobachtung der gesamten Wurzel wurde ein Stereomikroskop (Nikon SMZ-U) benutzt.

2.3.1. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelten Objekte wurden Auflichtfluoreszenz und *confocal laser scanning microscopy* verwendet.

2.3.1.1. Auflichtfluoreszenz

Die Auflichtfluoreszenz wurde für die Beobachtung der Autofluoreszenz der Zellwand sowie für den Kallosenachweis mit Anillinblau herangezogen. Für beides wurde UV-Anregung mit blau beziehungsweise gelb Fluoreszenz verwendet.

Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit einem NIKON Labophot 2 mit Auflichtfluoreszenz-Einrichtung; dabei wird das Präparat nicht von unten mit Licht durchstrahlt, sondern von oben durch das Objektiv beleuchtet. Durch einen Anregungsfilter wird Licht einer Bogenlampe auf den gewünschten Wellenlängenbereich eingegrenzt. Der Lichtstrahl wird dann über einen dichroischen Spiegel, der Licht kürzer Wellenlänge ablenkt und Licht mit längerer Wellenlänge passieren lässt, durch das Objektiv auf das Präparat gestrahlt. Das vom Präparat abgegebene längerwellige Fluoreszenzlicht kann den dichroischen Spiegel passieren und wird von einem Sperrfilter wieder auf einen bestimmten Bereich eingeschränkt. Anregungsfilter, dichroischer Spiegel und Sperrfilter sind in einem Würfel zusammengesetzt, der in den Strahlengang gebracht wird. Für die UV-Anregung wurde hier ein Nikon UV-2A/DM400 Fluoreszenzwürfel verwendet.

Vorteil der Auflichtfluoreszenz ist eine etwas verringerte diffuse Strahlung, da nicht das gesamte Präparat durchleuchtet wird, sondern nur der Teil von der Oberfläche bis zur Fokusebene.

2.3.1.2. Confocal Laser Scanning Microscopie (CLSM)

Vom Prinzip her ist die CLSM der Auflichtfluoreszenz sehr ähnlich, nur dass im Gegensatz zu dieser bei der CLSM das Präparat nicht mit einer Lampe beleuchtet, sondern durch einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge Punkt für Punkt abgerastert wird. Durch einen Detektor kann das Bild aufgefangen und auf einem Bildschirm dargestellt werden.

Der große Vorteil der CLSM liegt in der klaren Darstellung des Fluoreszenzbildes. Da immer nur ein kleiner Punkt angeleuchtet wird, entsteht kaum diffuse Fluoreszenzstrahlung.

Für die Darstellung der kleinen Endocytose- und Osmocytosevesikel sowie der feinen Hecht'schen Fäden wurde das Confocal Laser Scanning Mikroskop LEICA DMIRE2 mit einem Leica PlanApo 63x/1,32-0,6 Objektiv verwendet.

2.3.2. Video Enhanced Light Microscopy (VEC)

Mit dieser Methode können Strukturen dargestellt werden, die unter der Auflösungsgrenze des menschlichen Auges liegen. Das Prinzip liegt darin, dass die gesamte numerische Apertur des Objektivs ausgenutzt wird, um möglichst viel Information und damit eine hohe Auflösung zu bekommen. Dieser Informationsgewinn ist aber mit einem Verlust an Kontrast gekoppelt, so dass man mit bloßem Auge keine Strukturen erkennen kann. Um dieses Kontrastproblem zu überwinden, wird das Bild mit einer hochauflösenden Kamera aufgefangen und anschließend über einen Bildbearbeitungscomputer geschickt. In diesem können Kontrast und Helligkeit so nachreguliert werden, dass man ein hochaufgelöstes und dennoch kontrastreiches Bild erhält (Lichtscheidl, 1995).

In dieser Arbeit wurde VEC zur Beobachtung der Vesikelbewegungen in der *tip-zone* angewandt. Verwendet wurde dafür das Forschungsmikroskop Univar der Firma REICHERT-JUNG mit einem Reichert PlanApo 40x/1,00 Objektiv und einer Hamatsu C2400 Kamera.

2.4. DOKUMENTATION

Zur Dokumentation der Mikroskopie am Nikon Labophot 2 wurde eine Ikegami CCD Color Camera ICD-703P verwendet und über einen Recorder auf ein MiniDV-Band aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der VEC erfolgte ebenfalls auf MiniDV-Band. Für die Bearbeitung des Filmmaterials am Computer wurde Adobe Premiere 6.5 verwendet

Die Gesamtüberblicke von Keimlingen und Wurzeln, im Stereomikroskop oder direkt, wurden mit einer Nikon Coolpix 990 fotografiert.

Die gesamte Bildbearbeitung erfolgt im Adobe Photoshop 7.0.

2.5. STATISTIK UND GRAPHIKEN

Für die Auswertung der Daten und deren graphische Darstellung wurden Microsoft Access und Excel (Office 2000) sowie SPSS verwendet.

2.6. LÖSUNGEN

2.6.1. osmotische Lösungen

2.6.1.1. Glucose

Zur Herstellung der Glucoselösungen wurde D(+)-Glucose Monohydrat der Firma Merck Darmstadt verwendet. Die Glucose wurde in Phosphatpuffer (siehe Kultivierung) gelöst und auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Der osmotische Wert der Lösung wurde mit Hilfe eines Osmometers auf +/- 5 mOsm eingestellt.

verwendete Konzentrationen:

100 mOsm / 150 mOsm / 200 mOsm / 250 mOsm / 300 mOsm / 350 mOsm / 400 mOsm / 450 mOsm / 500 mOsm / 550 mOsm / 1000 mOsm

2.6.1.2. Mannit

Für die Herstellung der Mannitlösungen wurde D(-)-Mannit der Firma Merck Darmstadt ebenfalls in Phosphatpuffer gelöst und auf die entsprechenden Konzentrationen +/- 5 mOsm eingestellt.

verwendete Konzentrationen:

150 mOsm / 200 mOsm / 250 mOsm / 300 mOsm / 350 mOsm / 400 mOsm / 450 mOsm / 500 mOsm / 550 mOsm

2.6.1.3. Polyethylenglycol (PEG)

Für die PEG-Lösungen wurde Polyethylenglycol der Firma Dr. Theodor Schuchardt München verwendet. Wie bei den vorherigen Lösungen wurde auch PEG in Phosphatpuffer gelöst und mittels Osmometer auf die jeweiligen Konzentrationen +/- 5 mOsm eingestellt.

verwendete Konzentrationen:

150 mOsm / 250 mOsm / 350 mOsm

2.6.2. Salz-Lösungen

Wie bei den osmotischen Lösungen wurden auch die Salze in Phosphatpuffer gelöst und auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt.

2.6.2.1. NaCl

Firma Merck Natriumchlorid krist. p.a.

verwendete Konzentrationen:

50 mM = 100 mOsm / 75 mM = 150 mOsm / 100 mM = 200 mOsm / 125 mM = 250 mOsm /
150 mM = 300 mOsm / 175 mM = 350 mOsm / 200 mM = 400 mOsm / 400 mM = 800 mOsm

2.6.2.2. KCl

Firma LOBA Feinchemie Fischamend Kaliumchlorid p.a.

verwendete Konzentrationen:

50 mM = 100 mOsm / 75 mM = 150 mOsm

2.7. FARBSTOFFE

2.7.1. Anilinblau

Anilinblau ist wasserlöslich und wird zum Nachweis von Kallose eingesetzt. Mit Anilinblau gefärbte Kallose erscheint im Hellfeld blau und zeigt bei UV-Anregung gelbe Fluoreszenz.

Summenformel: $C_{32} H_{25} N_3 Na_2 O_9 S_3$

Molekülmasse: 737,74 g/mol

Arbeitslösung: 1%ig in Wasser

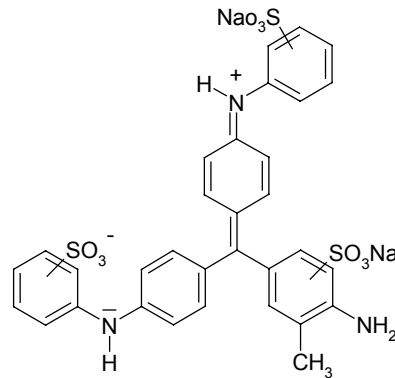


Abbildung 17: Strukturformel von Anilinblau

2.7.2. FM1-43

FM1-43 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-dibutylamino)styryl]pyridiniumdibromide] ist ein Styryl-Farbstoff, der zur Färbung von Biomembranen verwendet wird. Styryl-Farbstoffe fluoreszieren erst wenn sie an eine Membran binden. Durch die Struktur des Moleküls ist eine passive Diffusion durch eine Membran nicht möglich. Eine Aufnahme in die Zelle kann daher nur durch Endocytose von gefärbter Membran erfolgen (Betz *et al.*, 1996).

Summenformel: $C_{30} H_{49} Br_2 N_3$

Molekülmasse: 611,54 g/mol

Anregungswellenlänge: 480 nm

Emmisionswellenlänge: Maximum bei ~620nm

Firma: Molecular Probes

Stammlösung: 160 μ M/ml in Dimethyl Sulfoxid

Arbeitslösung: Stammlösung auf 8 μ M/ml oder 16 μ M/ml verdünnt
Mit gewünschter osmotischer Lösung, Salzlösung oder Puffer.

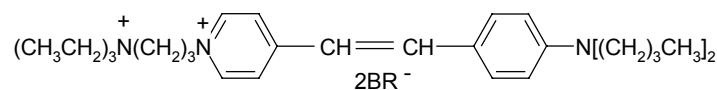


Abbildung 18: Strukturformel von FM1-43

3. ERGEBNISSE

3.1. KULTIVIERUNG VON *TRITICUM AESTIVUM*

-VERSUCHE ZUR OPTIMIERUNG DER

WURZELHAARBILDUNG

Zu Beginn der Arbeit stellte sich das Problem, dass Wurzeln in wässrigem Medium keine oder nur sehr wenige Wurzelhaare ausbilden. Eine Adaptierung an flüssiges Medium ist aber für die mikroskopischen Untersuchungen notwendig. Daher wurde versucht, durch unterschiedliche Quell-Methoden sowie durch Wahl der Medien und pH Werte eine Optimierung und Stabilisierung der Wurzelhaarzahl und –länge zu erreichen.

3.1.1. Keimlingswachstum nach unterschiedlicher

Samenquellung

Durch die Art der Quellung können Wurzelhaarbildung sowie Wachstum der Wurzel für die darauf folgenden Tage stark beeinflusst werden (siehe auch Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Wurzelhaarbildung). Zum einen wurde angestrebt einen Weg zu finden, möglichst viele gleich große Keimlinge zu erhalten, zum anderen sollten möglichst viele Wurzelhaare gebildet werden. Die Entscheidung für die endgültige Kultivierungsmethode wurde erst unter Berücksichtigung sämtlicher Versuchsergebnisse getroffen.

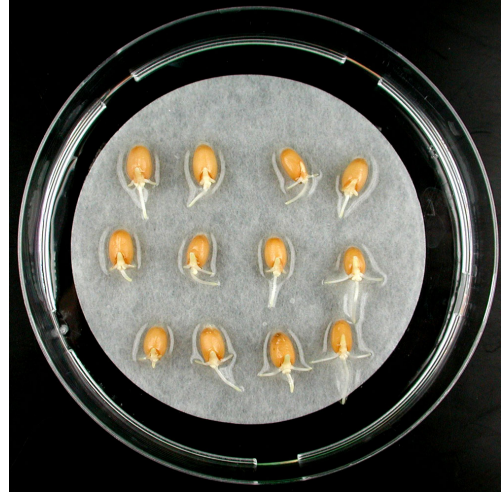
3.1.1.1. Quellen in Aqua dest.

Hier wurden die trockenen Samen von *Triticum aestivum* in eine Schale mit Aqua dest. gelegt und für 24 Stunden bei unterschiedlicher Temperatur gequollen. Anschließend wurden die gequollenen Samen auf feuchtes Filterpapier gelegt und für 24 Stunden bei 24°C angekeimt. Es wurden 2 Versuchsansätze durchgeführt, einer bei 24°C und einer bei 4°C (siehe Bildtafel nächste Seite).

Bei beiden Ansätzen sind die Keimlinge annähernd gleich groß und damit die Unterschiede nur sehr gering. Zu bemerken ist jedoch, dass Keimlinge, die bei 4°C gequollen wurden, noch eine Zeit lang etwas langsamer wachsen, bei diesen Keimlingen kann dann eine höhere Anzahl von Wurzelhaaren verzeichnet werden. Daher wurde die Variante bei 4°C letzten Endes auch als Standardmethode gewählt.

Aqua dest. 24°C

Quellen in Aqua dest. bei 24°C



24 Stunden gekeimt auf Filterpapier bei 24 °C

Aqua dest. 4°C

Quellen in Aqua dest. bei 4°C



24 Stunden gekeimt auf Filterpapier bei 24 °C

Abbildung 19: Bildtafel - Keimungsversuche Quellung in Aqua dest. bei 24°C/4°C

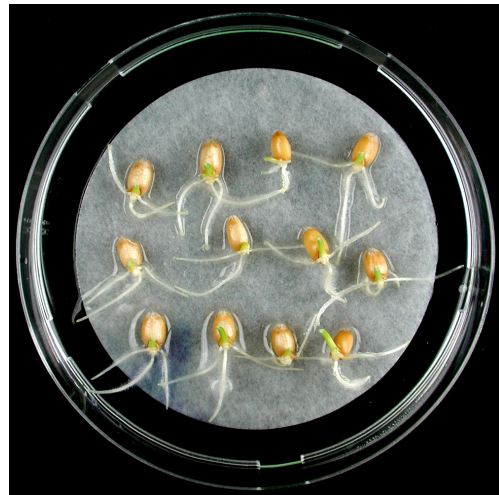
3.1.1.2. Quellen Filterpapier

Der Versuchsansatz war hier derselbe wie zuvor, nur dass die Samen zum Quellen auf feuchtes Filterpapier gelegt wurden. Wie bei Aqua dest. gab es auch hier zwei Ansätze mit 24°C und 4°C. Das Ergebnis ist im Wesentlichen gleich wie bei Aqua dest., nur dass die Unterschiede hier viel deutlicher zu erkennen sind (siehe Bildtafel unten). Die Samen, die bei 24°C gequollen werden, bilden nach 24 Stunden Keimung bereits sehr lange Wurzeln aus, welche für die weiter Kultivierung nicht geeignet sind. Die kühl gequollenen Samen sind im Gegensatz dazu noch kaum gekeimt und daher für die nachfolgende Kultivierung ebenfalls nicht geeignet.

Filterpapier 24°C



Quellen auf Filterpapier bei 24°C



24 Stunden gekeimt auf Filterpapier bei 24 °C

Filterpapier 4°C



Quellen auf Filterpapier bei 4°C



24 Stunden gekeimt auf Filterpapier bei 24 °C

3.1.2. Auswirkung unterschiedlicher Kulturmedien auf die Wurzelhaarbildung

Wie anfangs schon erwähnt ist die Bildung von Wurzelhaaren in flüssigem Medium sehr schlecht. Deshalb wurden zunächst verschiedene Medien erprobt, um eine besser Wurzelhaarbildung zu erreichen. Die gekeimten Samen wurden dazu in Kammern gesetzt (siehe Material und Methoden – Kultivierung) und in unterschiedlichen Medien für weitere 24 Stunden bei 24°C gezogen.

3.1.2.1. Leitungswasser

Der pH-Wert des verwendeten Leitungswassers liegt bei 8,1. Unter diesen Bedingungen können keine Wurzelhaare gebildet werden.

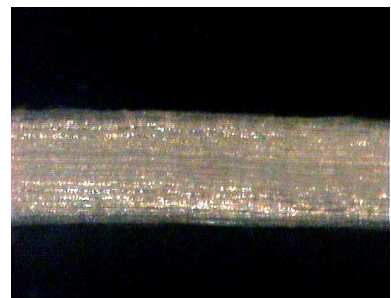


Abbildung 21: Wurzel in H₂O

3.1.2.2. Aqua dest.

Der pH-Wert von Aqua dest. liegt bei 7,2 und ist somit niedriger als der von Leitungswasser, was sich auch in der Wurzelhaarbildung bemerkbar macht. Es können zwar nicht viele aber immerhin einige kurze Wurzelhaare dokumentiert werden.

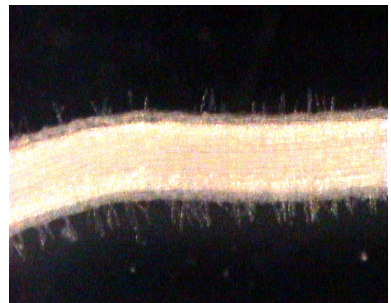


Abbildung 22: Wurzel in Aqua dest.

3.1.2.3. PIPES

Eine 80mM Stammlösung aus 10ml 0,5M Piperazin-N,N'-bis[2-Ethansulfonsäure] (PIPES - Firma Sigma) und 50ml 0,1M KOH mit einem pH von 5,5 wird 1:8 auf eine 10mM Arbeitslösung verdünnt. Das Ergebnis mit diesem Puffer ist ebenfalls schlecht; es werden nur sehr wenige und kurze Wurzelhaar gebildet.

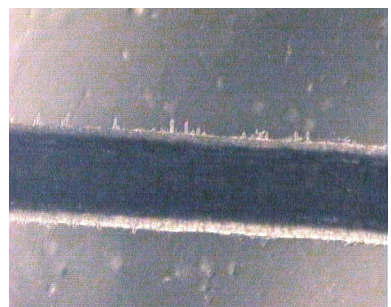


Abbildung 23: Wurzel in PIPES

3.1.2.4. Phosphatpuffer

Bei diesem Versuch wurde ein Phosphatpuffer mit pH 5,6 verwendet. Dazu wurde eine Stammlösung aus 4,9 ml 1/15 M Na₂HPO₄ und 95,1 ml 1/15 M KH₂PO₄ hergestellt (Chemikalien siehe Material und Methoden – Kultivierung). Dieser Stammpuffer wurde dann 1:5 beziehungsweise 1:10 verdünnt.

Dieser Puffer ist der optimalste für die Kultivierung von Wurzelhaaren. In beiden Verdünnungen werden Wurzelhaare gebildet. Die geringere Verdünnung von 1:5 ist aber zu bevorzugen, da in dieser Konzentration mit Abstand die meisten und längsten Wurzelhaare wachsen.

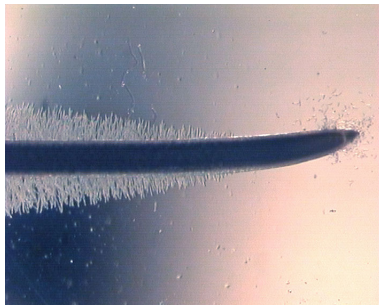


Abbildung 24: Wurzel in Phosphatpuffer 1:5

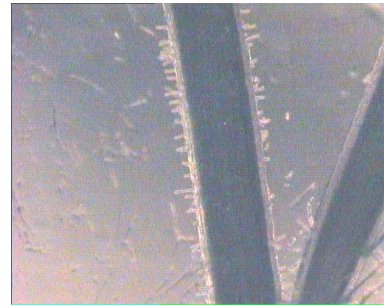


Abbildung 25: Wurzel in Phosphatpuffer 1:10

3.1.3. Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Wurzelhaarbildung

Im vorherigen Versuch zeichnet sich bereits eine Abhängigkeit der Wurzelhaarbildung nicht nur vom Medium sondern auch vom pH-Wert ab. Um einen passenden pH-Wert für die Kulturlösung festlegen zu können, wurden Phosphatpuffer mit den pH-Werten 4,65 / 5,3 / 5,75 / 6 / 6,5 und 7 getestet. Diese Versuchsreihe wurde für jede der 4 Arten der Samenquellung durchgeführt. Der Versuchsaufbau entspricht dabei dem zuvor für Kulturmedien.

3.1.3.1. Quellen in Aqua dest. bei 24°C

Wie auf der Bildtafel auf Seite 40 zu sehen, werden in jedem pH-Wert Wurzelhaare gebildet. Im sauren Bereich (4,65 - 5,3) sind die Wurzelhaare allerdings sehr kurz. Ist der Puffer zu basisch (6,5 - 7) ist die Anzahl ebenfalls reduziert. Ein optimaler Bereich liegt hier um den pH-Wert von 6, wobei aber auch hier die Wurzelhaare nicht besonders lang sind.

3.1.3.2. Quellen in Aqua dest. bei 4 °C

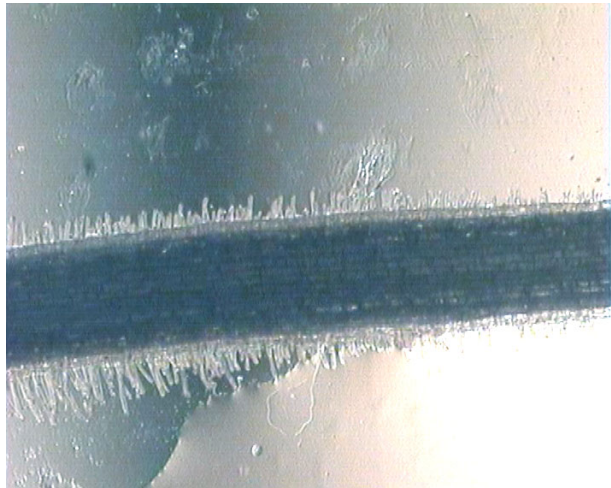
Die Wurzelhaare sind hier im Vergleich zu Variante 1 viel länger und dichter, auch noch in den etwas saueren Bereich von 5,3 hinein. Darunter sind die Wurzelhaar wieder nur sehr spärlich vorhanden. Im etwas basischerem Bereich nimmt die Anzahl und Länge der Wurzelhaare ebenfalls wieder ab. Ein optimaler Bereich liegt hier zwischen pH 5,5 und 6,5 (siehe Bildtafel auf Seite 41).

3.1.3.3. Quellen auf Filterpapier bei 24°C

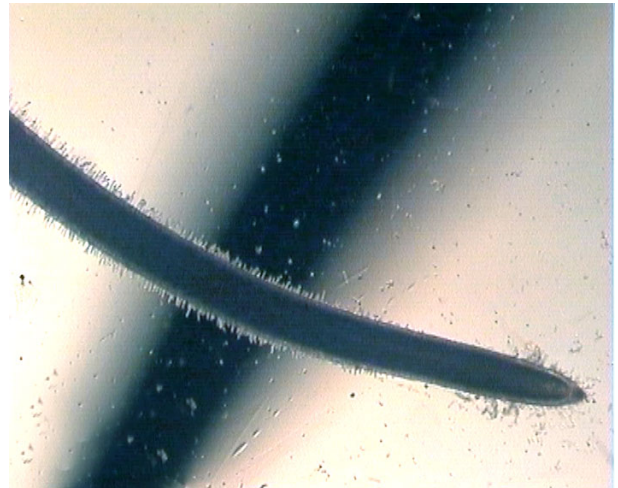
Bei dieser Variante sind bei allen pH-Werten kaum Wurzelhaare ausgebildet und die Vorhandenen sind extrem kurz (siehe Bildtafel auf Seite 42). Nur bei pH 5,75 sind die Wurzelhaare etwas länger und dichter; sie entsprechen etwa den schlechten Exemplaren der vorhergehenden Varianten. Aufgrund dieses Ergebnisses ist diese Möglichkeit der Samenquellung strikt abzulehnen.

3.1.3.4. Quellen auf Filterpapier bei 4°C

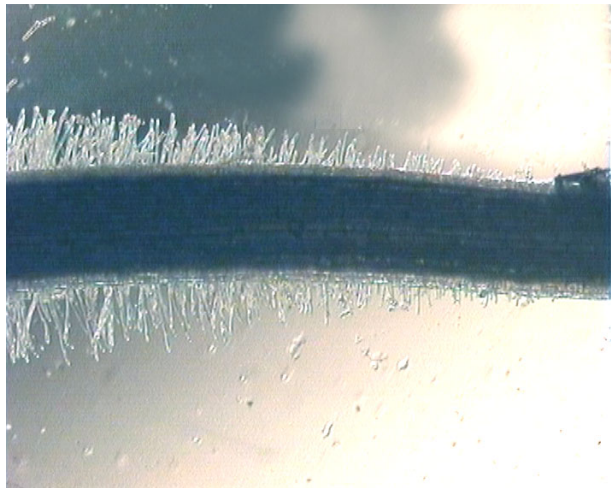
Wie schon bei der Variante 2 (Quellen in Aqua dest. bei 4°C) sind auch hier wieder durchgehend sehr schöne Wurzelhaare ausgebildet (siehe Bildtafel auf Seite 43). Ein eindeutiges Optimum liegt wieder um pH 6.



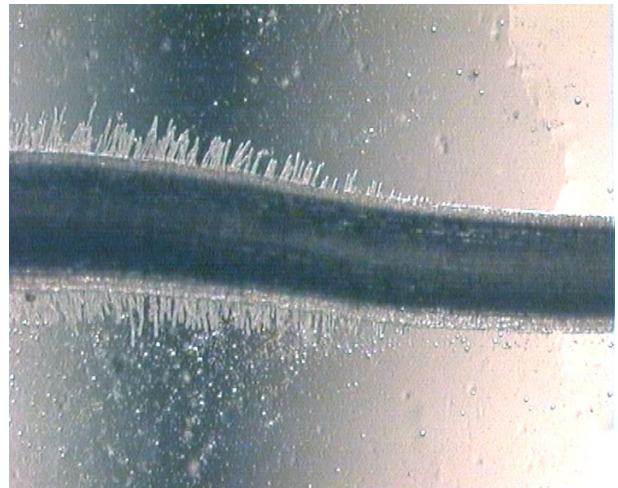
pH 4,65



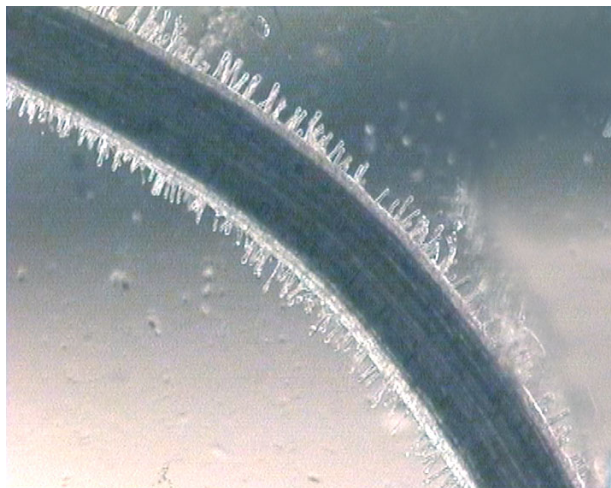
pH 5,3



pH 5,75



pH 6

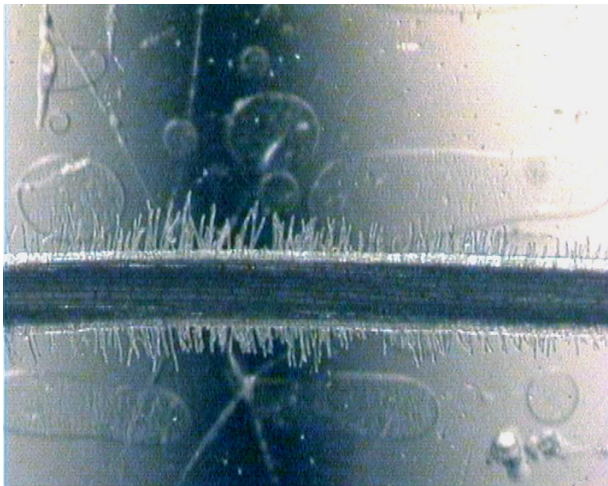


pH 6,5

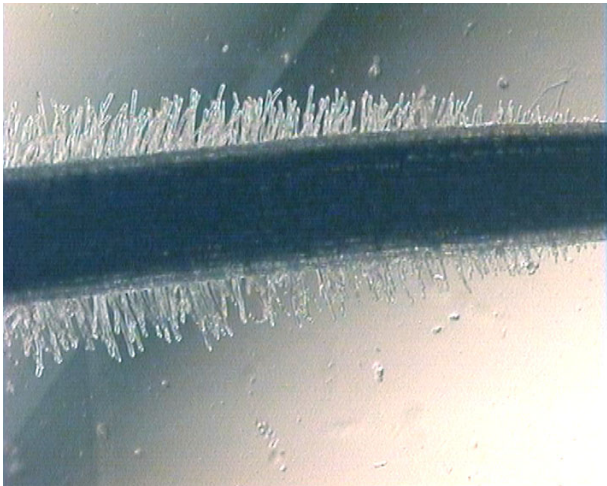


pH 7

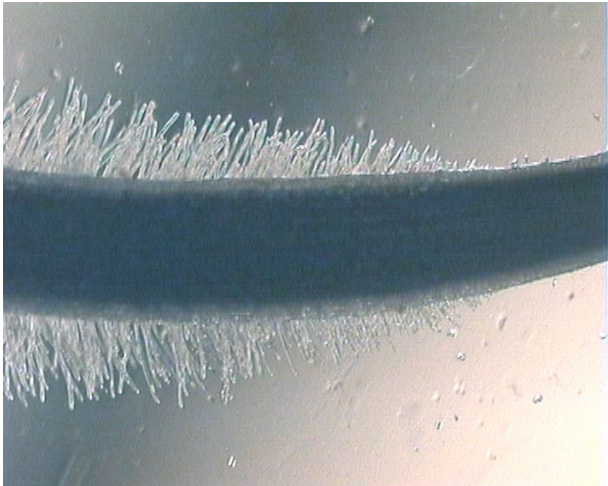
Abbildung 26: Bildtafel – pH Versuche / Quellen in Aqua dest. bei 24°C Adaptierung in Phosphatpuffer



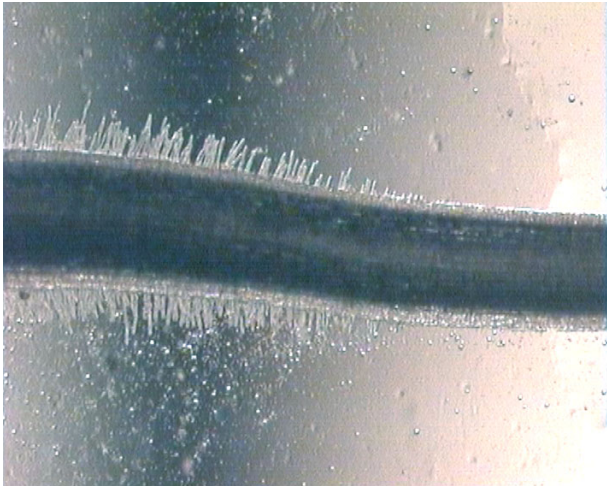
pH 4,65



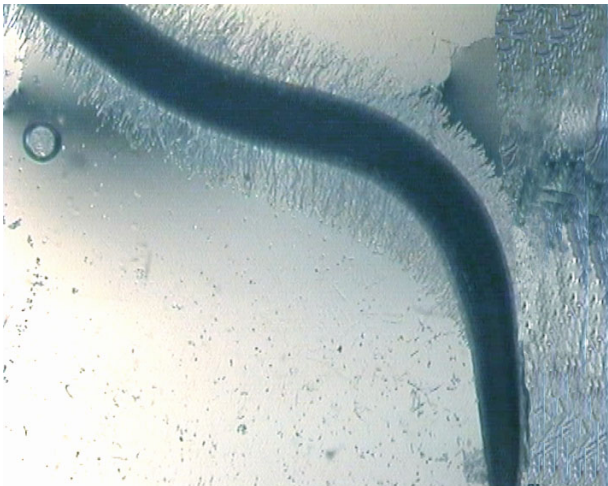
pH 5,3



pH 5,75



pH 6

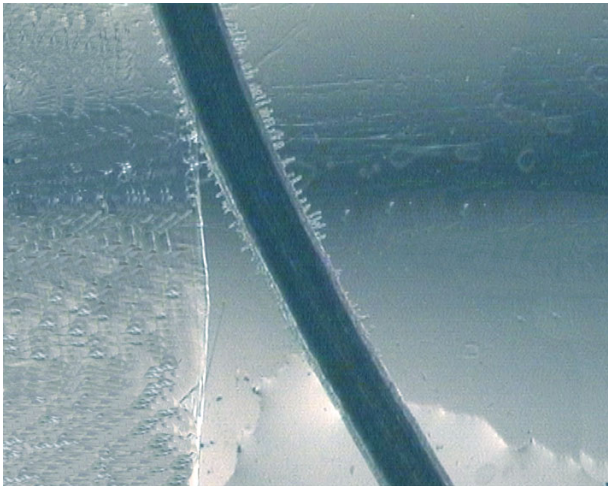


pH 6,5

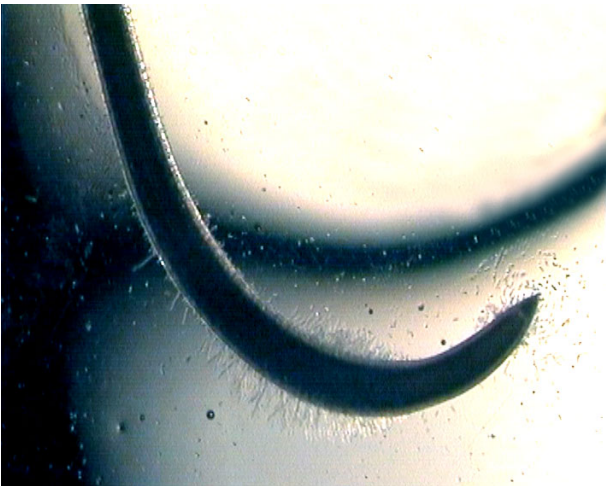


pH 7

Abbildung 27: Bildtafel – pH Versuche / Quellen in Aqua dest. bei 4°C Adaptierung in Phosphatpuffer



pH 4,65



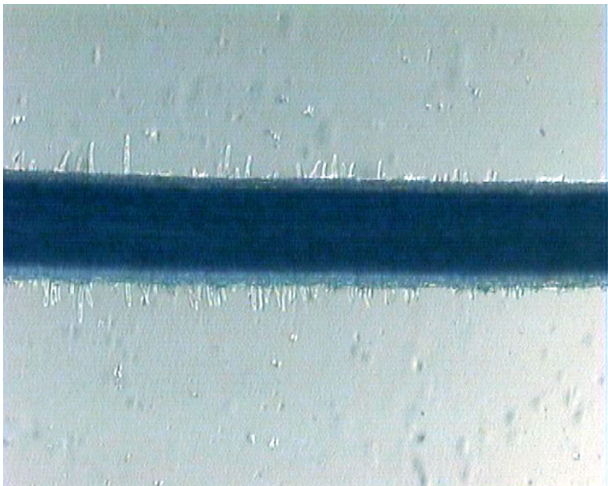
pH 5,3



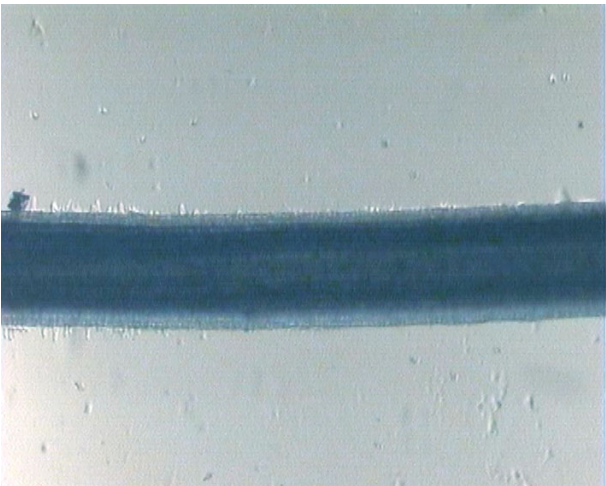
pH 5,75



pH 6

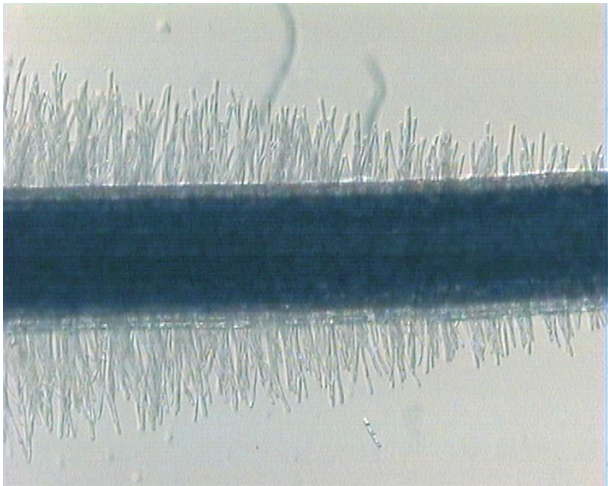


pH 6,5

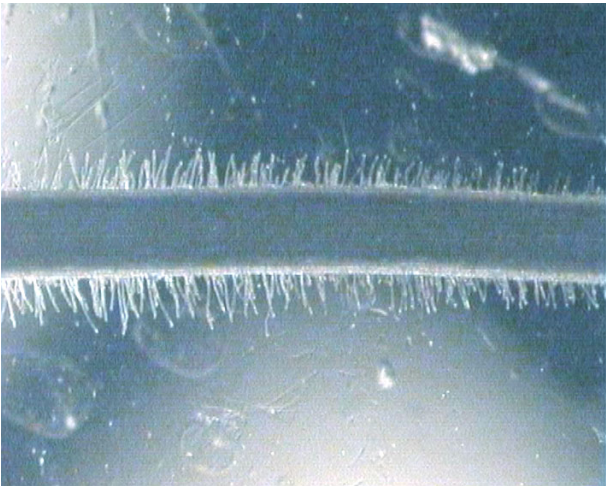


pH 7

Abbildung 28: Bildtafel – pH Versuche / Quellen Filterpapier bei 24°C Adaptierung in Phosphatpuffer



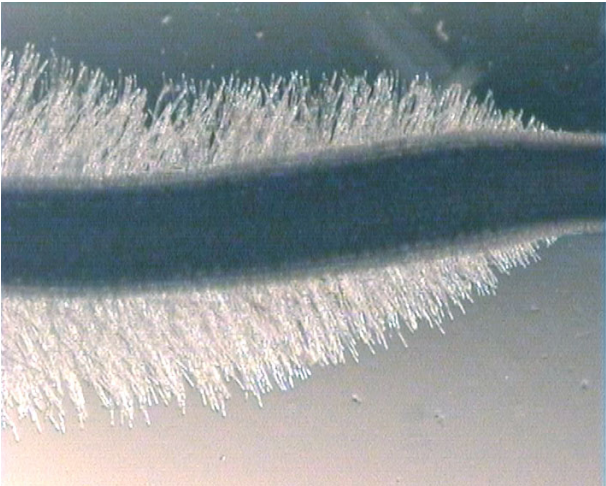
pH 4,65



pH 5,3



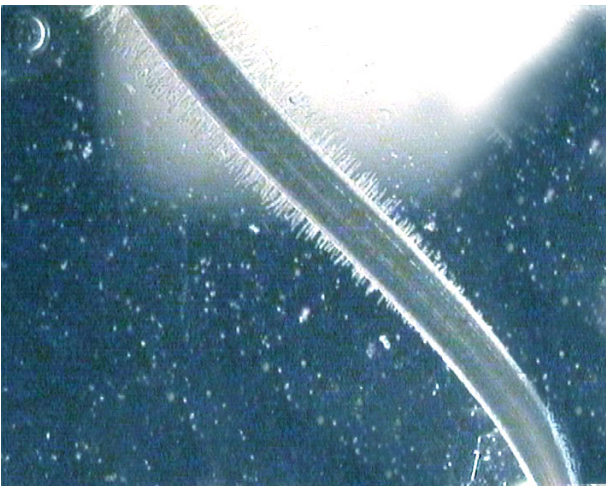
pH 5,75



pH 6



pH 6,5



pH 7

Abbildung 29: Bildtafel – pH Versuche / Quellen Filterpapier bei 4°C Adaptierung in Phosphatpuffer

3.2. *TRITICUM AESTIVUM* IN DER KONTROLLE

3.2.1. Bildung und Form der Wurzelhaare

Die Bildung und Zonierung der Wurzelhaare von Weizen entspricht dem allgemeinen Schema (siehe Einleitung – Wurzelhaare). Die Wurzelhaare von *Triticum aestivum* bilden gerade Schläuche mit einem Durchmesser von 12 μm . Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Wurzelhaare gegenüber mechanischem Stress kommt es durch das Hantieren mit den Kammern beim Mikroskopieren gelegentlich zu verzweigten oder leicht verkrüppelten Exemplaren. Diese wurden aber nie für Untersuchungen verwendet.

3.2.2. Kernposition in Wurzelhaaren von *Triticum aestivum*

Vor der Bildung des Wurzelhaares kann keine einheitliche Position des Zellkerns in der Rhizodermiszelle festgestellt werden; er befindet sich jedoch zumeist im unteren Bereich der Zelle.

Beginnt sich ein *bulge* zu formieren, so liegt der Zellkern bei *Triticum aestivum* stets oberhalb des *bulge*. Im Verlauf des Längenwachstums des Wurzelhaares wandert der Kern in den Wurzelhaarschlauch hinein und bleibt während des Wachstums immer mehr oder weniger nahe der Spitze. Der Abstand zwischen Zellkern und Spitze des Wurzelhaares schwankt sowohl im Verlauf des Wachstums als auch zwischen den einzelnen Wurzelhaaren. Nach dem Einstellen des Wachstums und dem Abbau der polaren Organisation des Wurzelhaares wandert der Zellkern wieder in die Rhizodermiszelle zurück. Die Form des Zellkerns ist zu Beginn rund und wird im Verlauf des Streckungswachstums ei- bis spindelförmig.

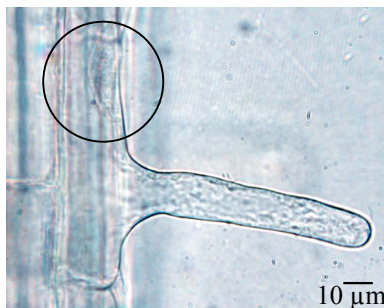


Abbildung 30: Zellkern in Rhizodermis



Abbildung 31: runder Zellkern



Abbildung 32: spindelförmiger ZK

3.2.3. Polarität und Plasmaströmung in Wurzelhaaren

Wachsende Wurzelhaare von *Triticum aestivum* besitzen eine polare Organisation des Plasmas. Diese polare Orientierung wird bis zum Ende der Wachstumsphase und noch einige Zeit darüber hinaus beibehalten. Erst bei Wurzelhaaren, die ihr Wachstum schon länger eingestellt haben, geht dann auch die Polarität wieder verloren.

An der Spitze, der *tip-zone*, welche zur Gänze mit Plasma gefüllt ist, befinden sich nur sehr kleine Vesikel, die im konventionellen Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden können (*clear-zone*). In diesem Bereich kann die Strömung nur mittels VEC analysiert werden. Die Vesikel bewegen sich in keiner gerichteten Strömung, sondern durcheinander. Einzelne Vesikel bewegen sich allerdings auch gerichtet über längere Strecken, meist auf die Membran zu. Oft ist ein Anheften der Vesikel an die Plasmamembran zu erkennen; manche Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran; andere berühren sie nur und bewegen sich anschließend wieder davon weg (siehe CD - Filmbeispiel 6 und 14).

Die weiter hinten liegenden Abschnitte des Wurzelhaares werden zunehmend mit Vakuole ausgefüllt, die von Plasmasträngen durchzogen ist. Hier kann man eine verkehrte Springbrunnenströmung erkennen. Die Strömungsgeschwindigkeit beträgt etwa 1,5-2 $\mu\text{m}/\text{sec}$, wobei zu bemerken ist, dass die Strömungsgeschwindigkeit innerhalb des Wurzelhaares leicht variiert; weiter vorne ist die Strömung etwas schneller als an der Basis. Zur Demonstration der Strömung ist auf der CD das Filmbeispiel 1 beigefügt.

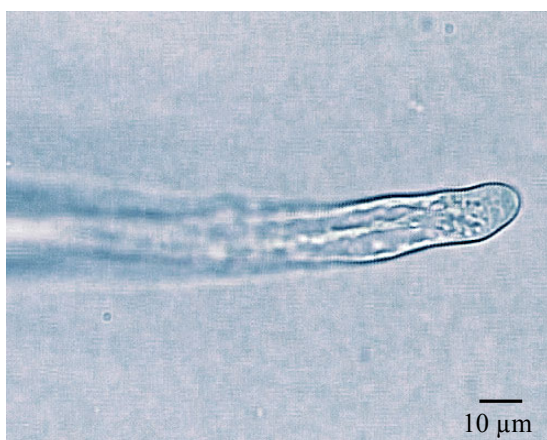


Abbildung 33: Strömung im Hellfeld 20x

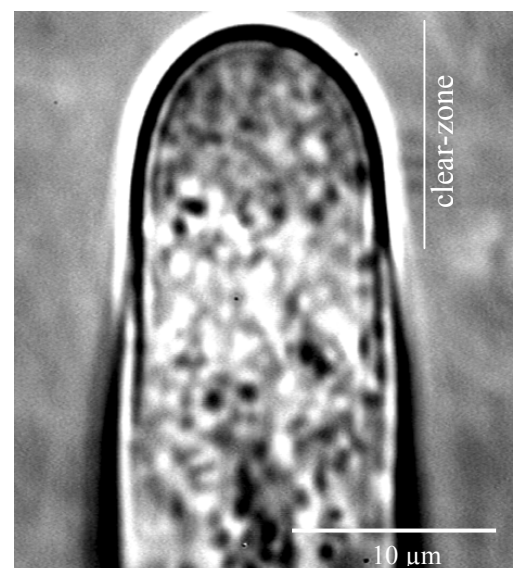


Abbildung 34: *clear-zone* mit Vesikeln

Diese starke Polarität und Zonierung ist bei den *bulges* noch nicht so extrem ausgeprägt, jedoch schon deutlich erkennbar. Die Strömung des Plasmas verläuft aber mehr in Form einer Zirkulationsströmung.

Im Gegensatz zu den *bulges* und den wachsenden Wurzelhaaren ist bei den ausgewachsenen keine Polarität mehr ausgebildet. Die Vakuole geht bis zur Spitze vor, und das Plasma bildet rundherum einen dünnen Wandbelag, in dem die Organellen gleichmäßig verteilt sind. Sie bewegen sich in Rotationsströmung mit ähnlicher Geschwindigkeit, wie in wachsenden Wurzelhaaren ($1,5 - 2 \mu\text{m}/\text{sec}$).

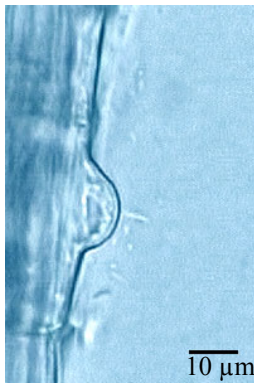


Abbildung 35:
Kontrolle – *bulge*

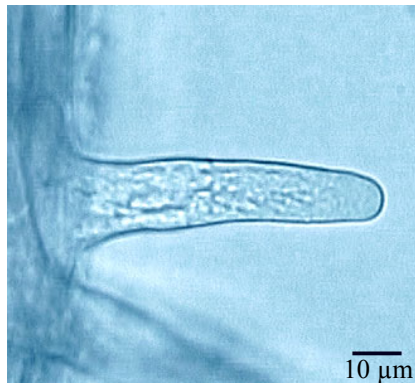


Abbildung 36: Kontrolle –
wachsendes Wurzelhaar

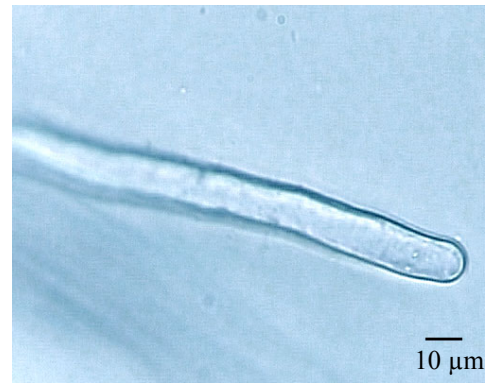
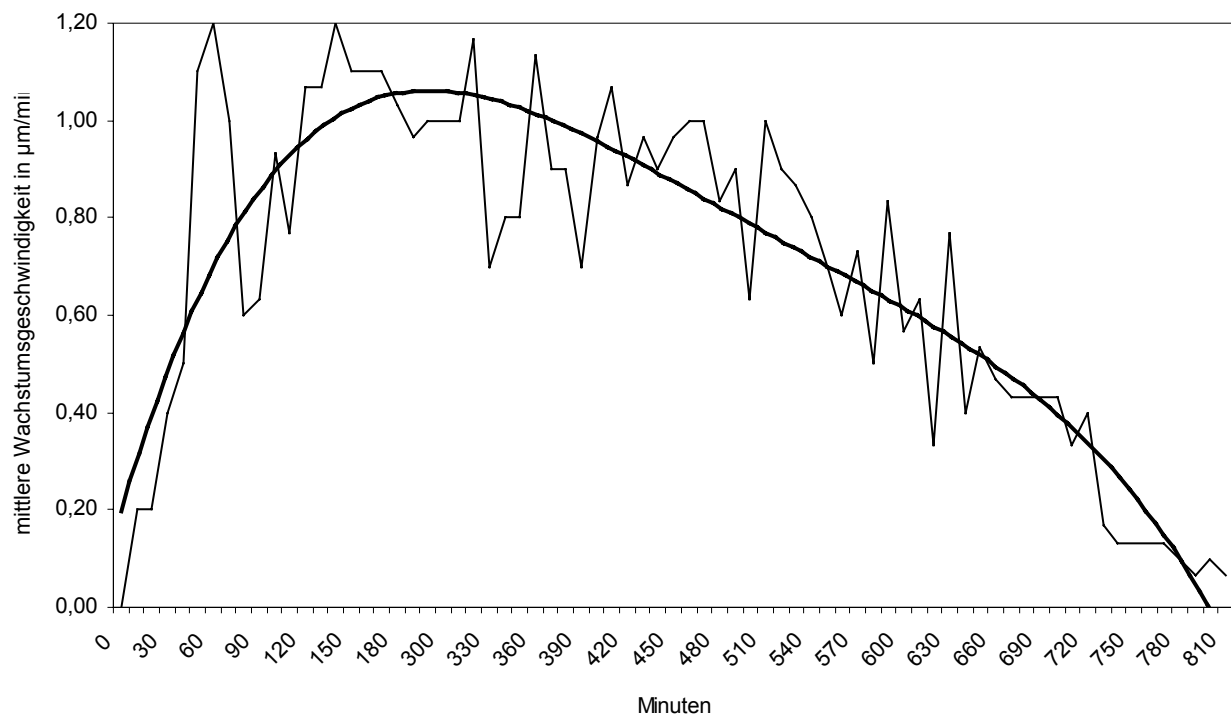


Abbildung 37: Kontrolle –
ausgewachsenes Wurzelhaar

3.2.4. Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare von *Triticum aestivum*

Zur Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit wurde die erste Stunde lang alle 5 Minuten eine Messung der Wurzelhaarlänge durchgeführt, danach nur mehr alle 10 Minuten.

Diese Messungen ergaben, dass die Wachstumsgeschwindigkeit über den gesamten Verlauf des Streckungswachstums nicht einheitlich ist. Bei der *bulge*-Bildung wächst die Zelle nur sehr langsam mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,1 - 0,2 $\mu\text{m}/\text{min}$. Bei einer Wurzelhaarlänge von 5 μm bis 35 μm steigt die Wachstumsgeschwindigkeit kontinuierlich auf 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ an. Diese Geschwindigkeit wird dann über einige Zeit beibehalten. Ab etwa der Hälfte der Wachstumsphase beginnt die Wachstumsgeschwindigkeit wieder leicht aber stetig abzunehmen, bis sie zum Ende hin wieder zum Stillstand kommt.



Graphik 1: Wachstumsverlauf der Wurzelhaare bei *Triticum aestivum*

Aufgrund der starken Stressbelastung für die Wurzelhaare während der langen Beobachtungsdauer ist anzunehmen, dass das Wachstum bereits früher eingestellt wurde, aber der prinzipielle Verlauf der Wachstumskurve konnte auch durch weitere Stichproben bestätigt werden.

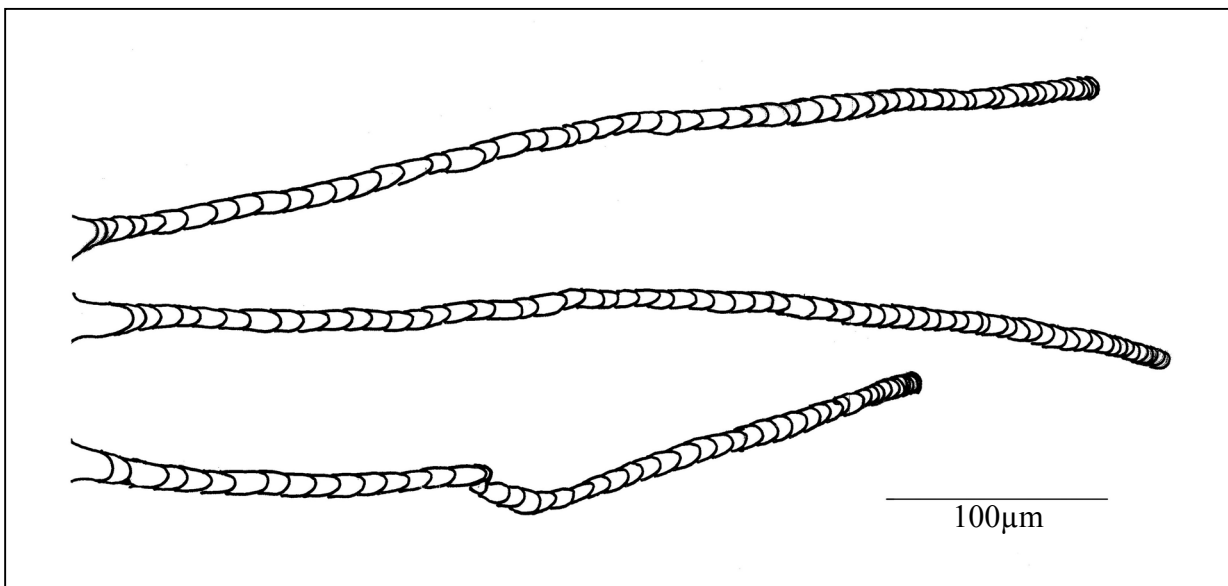
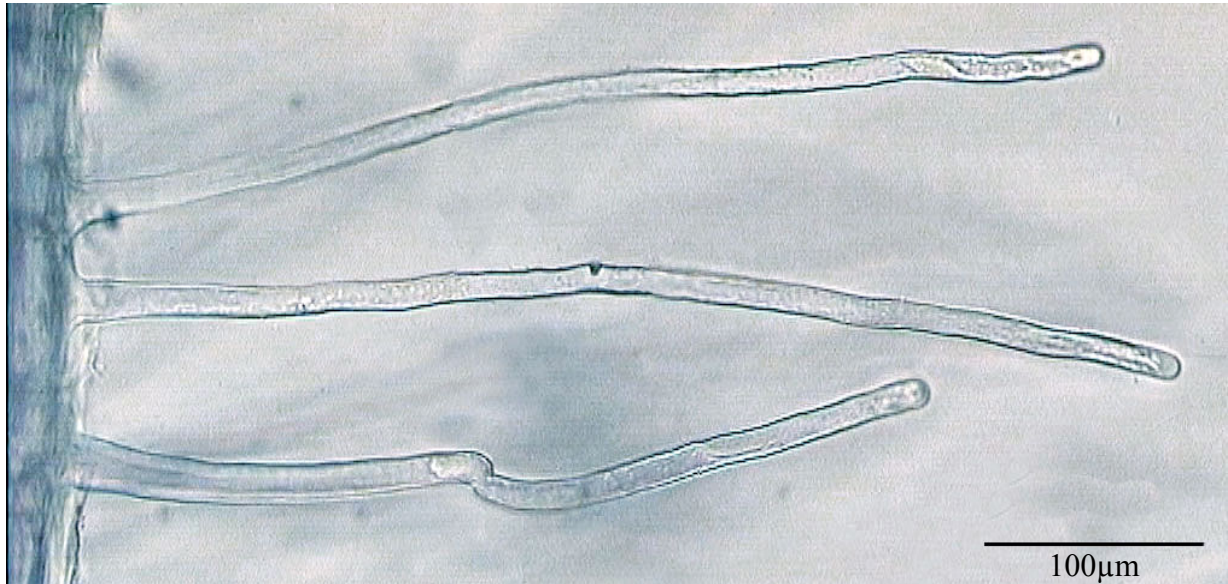


Abbildung 38: ausgewachsene Wurzelhaare von *Triticum aestivum*

Abbildung 39: Schema der Wachstumsmessung (10 Minuten Intervalle)

Zur Veranschaulichung des Wachstumsverlaufs, der Plasmaströmung sowie der Änderung der Kernposition ist ein Videoclip (Filmbeispiel 2) auf der CD beigefügt.

3.3. AUSWIRKUNG VON OSMOTISCHEM STRESS AUF DIE WURZELHAARE VON *TRITICUM AESTIVUM*

In diesem Kapitel wurden die Auswirkungen von Glucose und Mannit unterschiedlicher Konzentrationen auf das Wachstum und die Cytoarchitektur von Wurzelhaaren analysiert, sowie die Anpassungsfähigkeit der Wurzel und die Bildung neuer Wurzelhaare unter erhöhten osmotischen Bedingungen. Durch diese Beobachtungen können Rückschlüsse auf die Toleranz und die Anpassungsfähigkeit an osmotischen Stress sowie über die Zellwandstruktur und die Zellwandhaftung des Protoplasten gezogen werden.

3.3.1. Reaktion der Wurzelhaare auf Glucose unterschiedlicher Konzentrationen

Die Reaktion der Wurzelhaare auf osmotische Medien innerhalb der ersten 2 bis 5 Stunden soll Aufschluss über die Toleranz gegen osmotischen Stress geben. Als Medium wurde Glucose verwendet, welche im Gegensatz zu Mannit schneller aufgenommen wird.

Für die Versuche wurde die Kulturlösung in den Kammern gegen Glucoselösungen unterschiedlicher Konzentration getauscht. Die Beobachtung erfolgte durchgehend die ersten 2 Stunden. Danach im Intervall von 30 Minuten noch weitere 3 bis 5 Stunden. Die untersuchten Wurzelhaare waren zwischen 100 μm und 300 μm lang und hatten in der Kulturlösung eine Wachstumsgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{m}/\text{min}$.

3.3.1.1. 100 mOsm Glucose

Bei einer Konzentration von 100 mOsm Glucose können über den gesamten Beobachtungszeitraum weder Änderungen bei der Wachstumsgeschwindigkeit noch bei der Organisation des Plasmas, der Kernposition oder der Strömung festgestellt werden. Die Wurzelhaare setzen ihr Wachstum von 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ in der Kulturlösung übergangslos in der Glucoselösung fort.

Bei der Wurzelhaarneubildung kann ebenfalls keine Unterbrechung festgestellt werden, es werden fortwährend neue *bulges* angelegt und Wurzelhaare ausgebildet. Im Unterschied zur Kontrolle sind die *bulges* hier aber stark aufgebläht und ohne polarer Organisation des Plasmas (siehe Abbildung 40). Diese Aufblähung könnten durch die Aufnahme von Glucose begründet sein (siehe auch „Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit unterschiedlicher Konzentrationen“).

Nach etwa 90 Minuten beginnt sich bei den aufgeblähten *bulges* das Plasma polar zu organisieren. Im Anschluss daran ist auch ein normal gestaltetes und polar organisiertes Wurzelhaar vorhanden, welches sich von einem Wurzelhaar im Kontrollmedium nicht unterscheidet (siehe Abbildung 41 und 42).

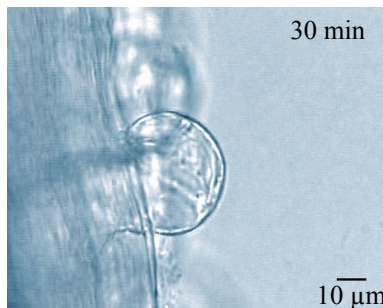


Abbildung 40: 100 mOsm
Glucose – aufgeblähter *bulge*

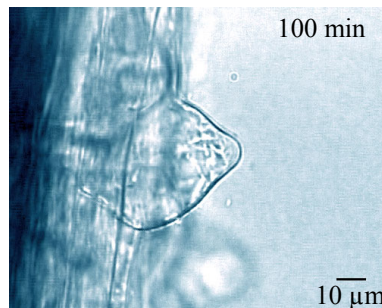


Abbildung 41: 100 mOsm Glucose
– beginnende Polarität

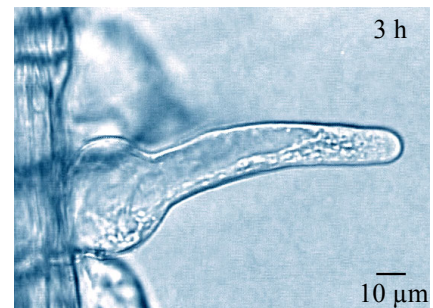


Abbildung 42: 100 mOsm Glucose
neues Wurzelhaar

3.3.1.2. 150 mOsm Glucose

Nach dem Überführen der Keimlinge in 150 mOsm Glucose teilt sich die Reaktion der Wurzelhaare in 2 Gruppen:

Gruppe 1:

Bei dieser Gruppe setzt sich das Wachstum ungehindert mit $1\mu\text{m}/\text{min}$ fort und es ist wie bei 100 mOsm Glucose keine Änderung in der Organisation des Plasmas, der Strömung und der Kernposition zu erkennen.

Gruppe 2:

Hier zeigt sich ein etwas anders Bild. Die Wurzelhaare stoppen ihr Wachstum für einige Minuten, sobald sie in das osmotische Medium gebracht werden. In dieser Zeit beginnt sich die Spitze des Wurzelhaares etwas aufzublähen. Nach 20 bis 30 Minuten beginnt am Ende des *dome* (Kuppe an der Spitze) das Wurzelhaar erneut mit $1\mu\text{m}/\text{min}$ weiterzuwachsen. Die Polarität sowie die Strömung bleiben während der gesamten Zeit unverändert.

Dieses unterschiedliche Verhalten der Wurzelhaare lässt darauf schließen, dass der osmotische Wert der Wurzelhaare bei etwa 150 mOsm liegt. Dieser osmotische Wert ist aber nicht in allen Wurzelhaaren gleich, sodass einige darüber liegen (Gruppe 1) und einige darunter (Gruppe 2).

Die Gruppe 2, deren osmotischer unter 150 mOsm liegt, kann zu Beginn ihr Wachstum nicht fortsetzen. Durch die Aufnahme von Glucose steigt aber der Druck in der Vakuole über 150 mOsm an und das Wachstum kann wieder fortgesetzt werden. Da in der kurzen Zeit die Zellwand an der Spitze zu fest wird, kann das Wurzelhaar nur mehr an einer etwas weicheren Zellwandstelle durchbrechen, diese liegt am unteren Ende des *dome* (siehe Abbildung 46).

Die Wurzelhaarneubildung geht hier im osmotischem Medium ebenfalls ohne Unterbrechung weiter. Das Aufblähen der *bulges* ist nicht ganz so stark wie bei 100 mOsm Glucose, aber immer noch deutlich erkennbar, was wiederum auf die Aufnahme von Glucose hindeutet. Durch den höheren osmotischen Wert des Außenmediums kann aber in der Zelle nicht so schnell ein ausreichend hoher Druck in der Vakuole aufgebaut werden wie bei 100 mOsm Glucose, daher ist bei 150 mOsm die Aufblähung der *bulges* geringer. Ansonsten verläuft das weitere Wurzelhaarwachstum wieder wie bei der Kontrolle.

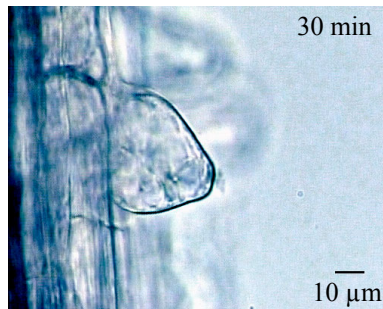


Abbildung 43: 150 mOsm Glucose
- leicht aufgeblähter *bulge*



Abbildung 45: 150 mOsm Glucose
- leicht aufgeblähte Wurzelhaarspitze

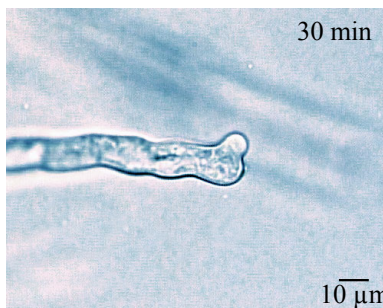


Abbildung 44: 150 mOsm Glucose
- Beginn seitliches Auswachsen
des Wurzelhaares

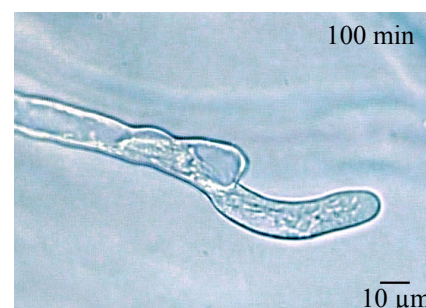


Abbildung 46: 150 mOsm Glucose
- seitlich ausgewachsenes Wurzelhaar

3.3.1.3. 200 mOsm Glucose

In 200 mOsm Glucose endet das Wachstum der Wurzelhaare sofort. Nach wenigen Minuten beginnt sich die Spitze des Wurzelhaares leicht aufzublähen, es kommt jedoch zu keinem seitlichen Auswachsen. Ältere Wurzelhaare können noch etwa 30 Minuten ihr Wachstum aufrecht erhalten, was mit hoher Wahrscheinlichkeit an ihrem höheren osmotischem Wert liegt. Bei der Strömungsgeschwindigkeit und der Kernposition treten keine Veränderungen auf. Die Polarität bleibt erhalten; es sind aber nach etwa 90 Minuten immer wieder kleinere Vakuolenteile in der Apikalzone zu finden. Diese sind aber nur temporär und ziehen sich nach einigen Minuten wieder zurück in die *vacuolation-zone*.

Die Wurzelhaarneubildung wird nach der Überführung in 200 mOsm Glucose gestoppt und setzt erst nach etwa 2 Stunden langsam wieder ein. Die neuen *bulges* sind wie schon bei den geringeren Konzentrationen stark aufgebläht. Das weitere Wurzelhaarwachstum verläuft dann wieder wie bei der Kontrolle. Hier tritt allerdings schon eine Einschränkung im Längenwachstum auf. Die in den ersten paar Stunden neu angelegten Wurzelhaare erreichen nur eine Länge von etwa 150µm.

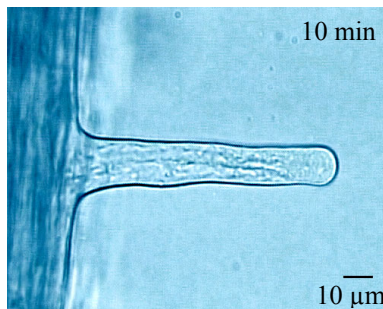


Abbildung 47: 200 mOsm Glucose
- aufgeblähte Wurzelhaarspitze

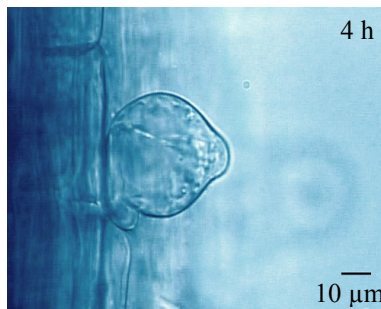


Abbildung 48: 200 mOsm Glucose
- aufgeblähter *bulge*

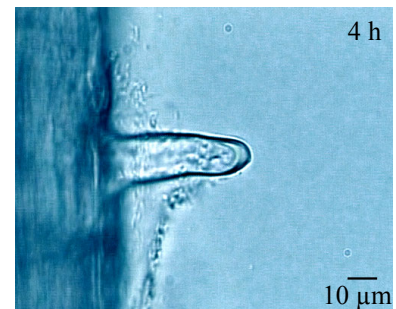


Abbildung 49: 200 mOsm Glucose
- verdickte Zellwand an der Spitze

Nach 2 Stunden in 200 mOsm Glucose beginnt sich eine sichtbar dickere Zellwand an der Spitze zu bilden (siehe Abbildung 49), möglich ist dies durch ein langsames Zurückweichen des Protoplasten von der Zellwand an der Spitze.

Während dessen verschmelzen weiterhin Vesikel mit Zellwandbestandteilen mit der Plasmamembran und geben ihren Inhalt nach außen ab. Dadurch wird der Plasmolysevorraum mit Zellwandbestandteilen aufgefüllt. Die Struktur dieser verdickten Zellwand ist nicht so dicht und fest wie die einer normalen Zellwand. Eine kompakte Zellwand wird erst gebildet, wenn der Protoplast nicht mehr schrumpft (siehe Abbildung 52).

Durch Färbung dieser dicken Zellwand mit Anilinblau konnte punktuelle Bildung von Kallose nachgewiesen werden (siehe Abbildung 53). Es wird jedoch aufgrund des lockeren Erscheinungsbildes dieser Zellwand vermutet, dass der überwiegende Teil aus Pektinen und Hemizellulosen besteht. Bei UV-Anregung emittiert die Zellwand eine blaue Autofluoreszenz.



Abbildung 50: Autofluoreszenz der Zellwand mit UV-Anregung (Kontrolle)

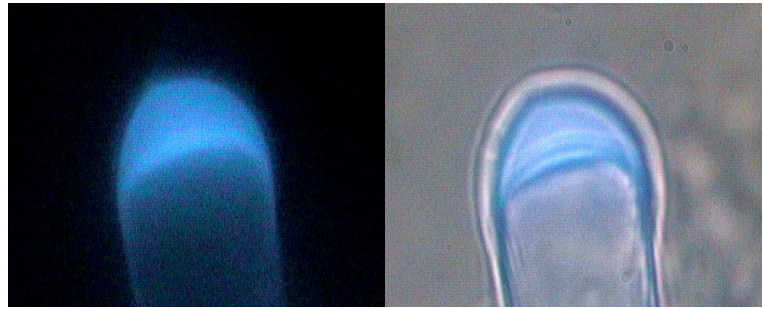


Abbildung 51: Autofluoreszenz der Zellwand bei UV-Anregung (verdickte Zellwand nach Zurückweichen des Protoplasten in osmotischem Medium)

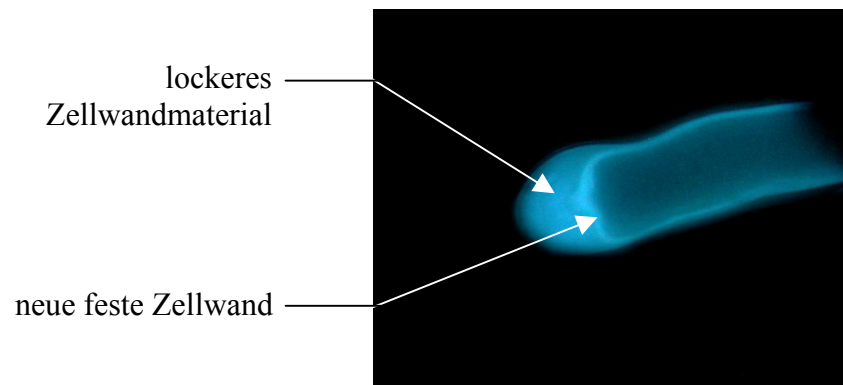


Abbildung 52: neue feste Zellwand nach Rückzug des Protoplasten

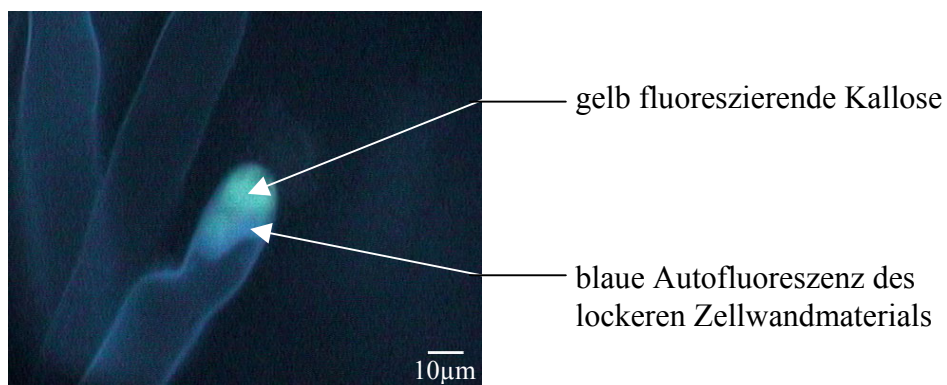


Abbildung 53: Kallose Nachweis in der verdickten Zellwand durch Anilinblau mit UV-Anregung

3.3.1.4. 250 mOsm Glucose

Wie bei 200 mOsm Glucose kommt es auch hier zu einem sofortigen Wachstumsstopp bei den jüngeren Wurzelhaaren; nur ältere können noch etwa 20 - 30 Minuten etwas weiter wachsen, allerdings mit einer etwas geringeren Geschwindigkeit als die Kontrollzellen.

Strömung und Polarität bleiben zu Beginn bei allen Wurzelhaaren unbeeinflusst, erst nach 1,5 bis 2 Stunden ist eine leichte Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit auf etwa $1\mu\text{m}/\text{sec}$ zu verzeichnen. Die polare Organisation bleibt aber weiterhin erhalten, mit Einschränkung von kleineren Vakuolenteilen, die wie bei 200 mOsm nach 1 - 2 Stunden in die *tip-zone* vordringen. Ausgewachsene Wurzelhaare zeigen keine Beeinflussung durch 250 mOsm Glucose.

Der Abhebung des Protoplasten von der Spitze her setzt hier schon bedeutend früher ein als in 200mOsm Glucose; bereits nach 15 Minuten ist schon eine deutlich verdickte Zellwand zu erkennen.

Bis zur Neubildung von Wurzelhaaren dauert es in dieser Konzentration zwischen 3 und 4 Stunden. Die neu gebildeten *bulges* sind wie auch schon in den anderen Konzentrationen aufgebläht, bilden aber im Verlauf ein normales Wurzelhaar aus. Das Längenwachstum dieser ersten Wurzelhaare ist auf etwa $100\mu\text{m}$ beschränkt; ansonsten sind die polare Organisation und die Strömungsform und -geschwindigkeit normal.

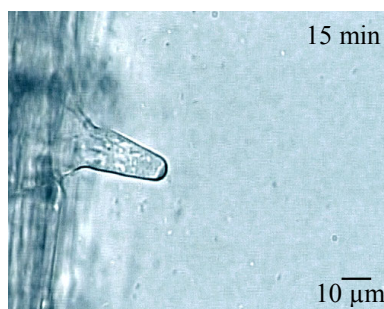


Abbildung 54: 250mOsm Glucose
- dicke Zellwand nach 15 Minuten

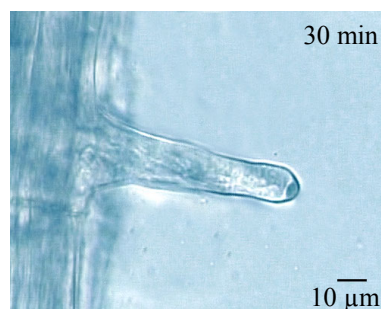


Abbildung 55: 250mOsm Glucose
- dicke Zellwand nach 30 Minuten

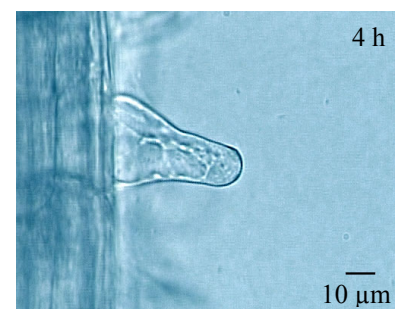


Abbildung 56: 250mOsm Glucose
- neues Wurzelhaar nach 4 Std.

3.3.1.5. 300 mOsm Glucose

Bei einer Konzentration des osmotischen Mediums von 300 mOsm wird das Spitzenwachstum bei allen Wurzelhaaren sofort gestoppt. Wie bei den niedrigeren Konzentrationen wird auch hier die Zellwand an der Spitze dicker. Der Protoplast zieht sich bei 300 mOsm jedoch viel schneller von der Spitze zurück, wodurch es bereits nach etwa 15 bis 30 Minuten an der Spitze zu einer Abhebung des Protoplasten von der Zellwand kommt. In dieser kurzen Zeit wird aber fortwährend Zellwandmaterial in der Spitze deponiert.

Bei den älteren und ausgewachsenen Wurzelhaaren setzt die Plasmolyse erst nach etwa einer Stunde, und nur sehr schwach ein. Die Plasmolyse dauert bei allen Wurzelhaaren mit etwa 45 Minuten auffällig lange.

Während der gesamten Zeit sind keine Veränderungen in Bezug auf polare Organisation, Strömungsform oder -geschwindigkeit sowie Kernposition festzustellen.

Allerdings sind bereits nach 5 bis 10 Minuten immer wieder kleinere und auch etwas größere Vakuolenteile in der *tip-zone* zu finden (siehe Filmbeispiel 3 auf der CD).

Eine Wurzelhaarneubildung setzt erst nach 4 bis 5 Stunden ein.

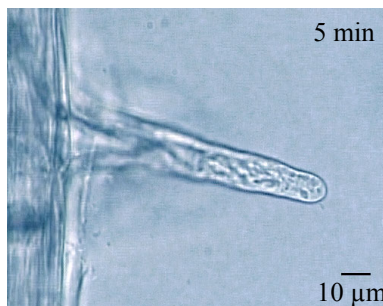


Abbildung 57: 300 mOsm Glucose
- Vakuole in der Spitze nach 5 Min.

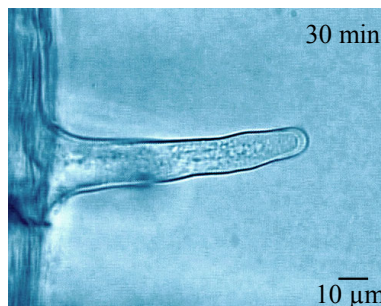


Abbildung 58: 300 mOsm Glucose
- dicke Zellwand nach 30 Min.

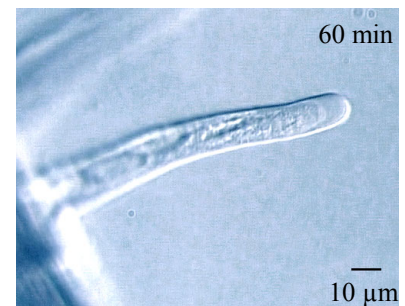


Abbildung 59: 300 mOsm Glucose
- dicke Zellwand nach 60 Minuten



Abbildung 60: 300 mOsm Glucose
- Plasmolyse nach 45 Minuten

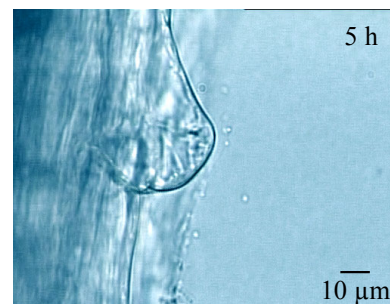


Abbildung 61: 300 mOsm Glucose
- *bulge* nach 5 Stunden

3.3.1.6. 350 mOsm Glucose

Das Längenwachstum wird bei 350 mOsm ebenfalls sofort gestoppt, es kommt bei allen Wurzelhaaren sowie bei den *bulges* zu einem sofortigen Abheben des Protoplasten an der Spitze. Die Plasmolyse dauert auch hier etwa 40 Minuten, der Protoplast zieht sich aber viel schneller zurück als in den vorherigen Konzentrationen und erreicht daher ein relativ stark plasmolysiertes Stadium. Nach circa 30 Minuten bilden sich kleine Teilprotoplasten; diese werden beim Zusammenziehen des Protoplasten an der Spitze abgeschnürt und sind oft mit Vakuole ausgefüllt (siehe Filmbeispiel 4 auf der CD). Die Plasmolyse des Wurzelhaares erfolgt hier nicht nur von der Spitze weg sondern gleichzeitig auch an den Seiten, dort jedoch nicht so stark wie an der Spitze. In dieser relativ hohen Plasmolyselösung kann nach etwa 2 Stunden auch Grenzplasmolyse in der Rhizodermis beobachtet werden.

Eine Änderung bei der Strömungsform ist erst nach 2 Stunden festzustellen; die verkehrte Springbrunnenströmung geht langsam in eine Zirkulationsströmung über. Die Polarität bleibt bis auf ein kurzzeitiges Vordringen der Vakuole gleich zu Beginn etwa 2 bis 3 Stunden unbeeinflusst, danach wird die *tip-zone* deutlich kürzer, wird aber nicht aufgelöst. Die Kernposition sowie die Strömungsgeschwindigkeit bleiben konstant. Eine spärliche Wurzelhaarneubildung setzt erst nach 5 Stunden ein; die neuen Wurzelhaare erreichen eine Länge von rund 50µm. Die neuen bulges besitzen noch keine Polarität.

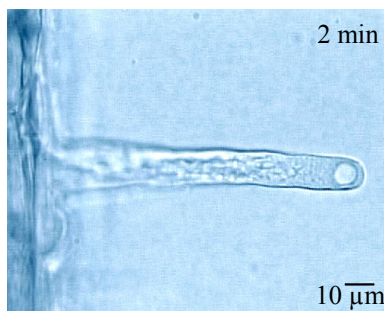


Abbildung 62: 350 mOsm Glucose
- Vakuole in der Spitze nach 2 Min.

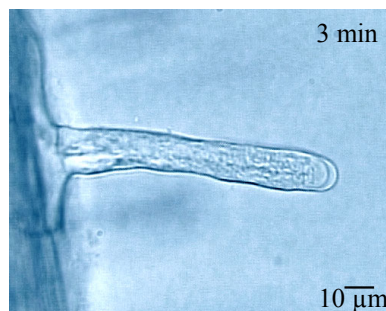


Abbildung 63: 350 mOsm Glucose
- Plasmolyse nach 3 Min.

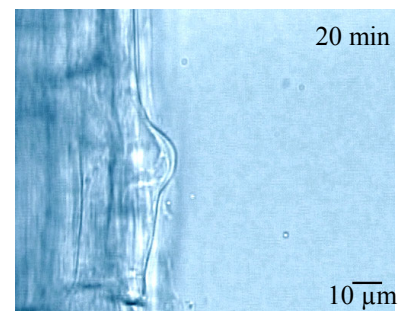


Abbildung 64: 350 mOsm Glucose
- plasmolysierter *bulge*

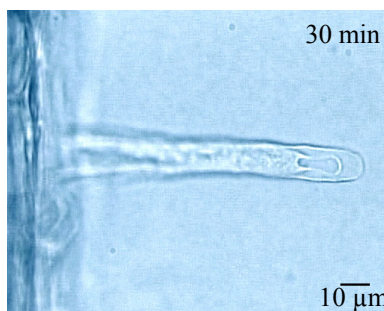


Abbildung 65: 350 mOsm Glucose
- Einschnürung an der Spitze



Abbildung 66: 350 mOsm Glucose
- Teilprotoplast

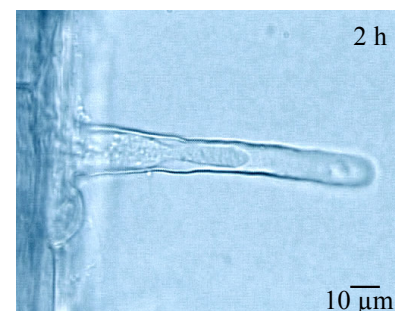


Abbildung 67: 350 mOsm Glucose
- seitliche Plasmolyse

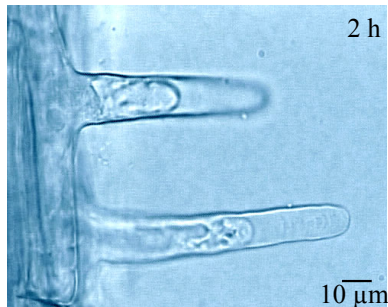


Abbildung 68: 350 mOsm Glucose
- Plasmolyse nach 2 Stunden und
geringe Polarität

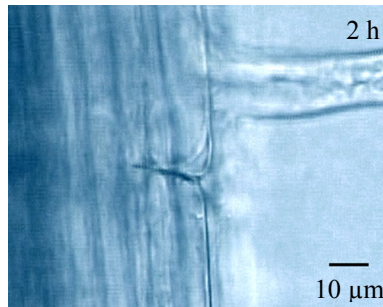


Abbildung 69: 350 mOsm Glucose
- plasmolysierte Rhizodermis

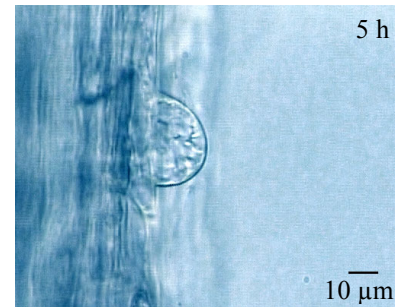


Abbildung 70: 350 mOsm Glucose
- neuer *bulge* nach 5 Stunden

3.3.1.7. 400 mOsm Glucose

Bei 400 mOsm Glucose hebt sich der Protoplast, bei allen Wurzelhaaren sowie bei der Rhizodermis, sofort und stark von der gesamten Zellwand ab. Dabei dringt die Vakuole in die *tip-zone* vor; die Polarität aber bleibt noch eine Stunde lang erhalten. Durch die starke Plasmolyse bilden sich nach etwa 20 Minuten auch Teilprotoplasten, außerdem sind auch kleine Plasmabrocken im Plasmolysevorraum zu finden.

Die Strömungsform ändert sich nach 30 Minuten, ab diesem Zeitpunkt dominiert eine Zirkulationsströmung. Die Strömungsgeschwindigkeit nimmt nach einer Stunde rapide ab und kommt kurz darauf zum Stillstand.

Obwohl sich bei den jüngeren Wurzelhaaren der Protoplast bis fast in die Rhizodermis zurückzieht, ist keine Änderung der Kernposition festzustellen. Eine Neubildung von Wurzelhaaren tritt innerhalb der ersten 6 Stunden nicht ein.

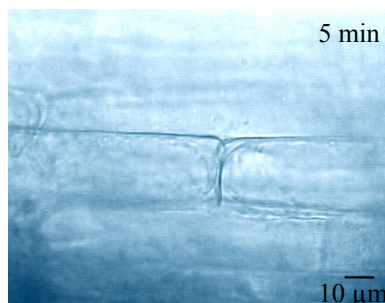


Abbildung 71: 400 mOsm Glucose
- plasmolysierte Rhizodermis nach 5 Min.

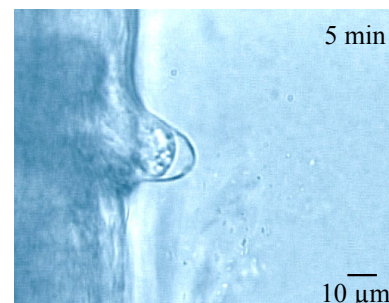


Abbildung 72: 400 mOsm Glucose
- plasmolysierter *bulge* nach 5 Min.



Abbildung 73: 400 mOsm Glucose
- Plasmolyse nach 5 Minuten

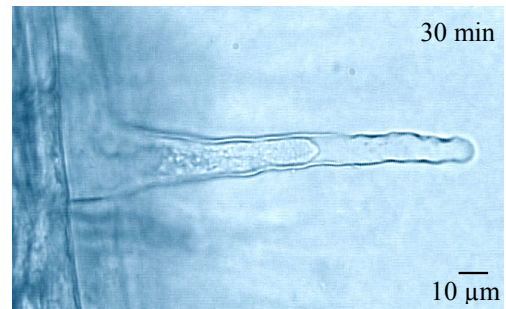


Abbildung 74: 400 mOsm Glucose
- Plasmolyse nach 30 Minuten

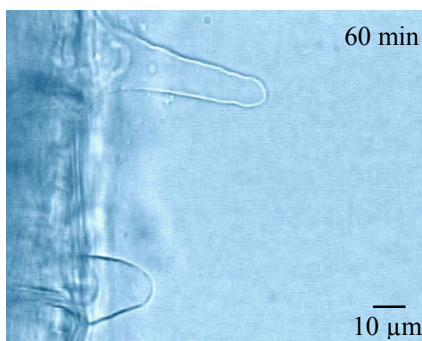


Abbildung 75: 400 mOsm Glucose
- Plasmolyse nach 60 Minuten

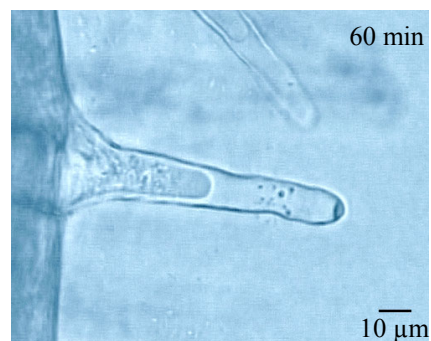


Abbildung 76: 400 mOsm Glucose
- Plasmabrocken im Plasmolysevorraum

3.3.1.8. 1000 mOsm Glucose

Eine osmotische Lösung von 1000 mOsm Glucose zeigt eine sofortige starke konkave Plasmolyse entlang des gesamten Wurzelhaares. Gleichzeitig kommt es zu einer Zerstörung des Plasmas und somit auch der Polarität. Die Wurzelhaare sind nach 1-2 Minuten tot.

(siehe Filmbeispiel 5 auf der CD)

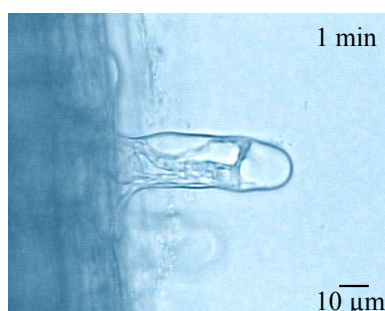


Abbildung 77: 1000 mOsm Glucose
- konkave Plasmolyse

3.3.1.9. Überblick über die Reaktionen der Wurzelhaare auf ansteigende Konzentrationen von Glucose

3.3.1.9.1. Längenwachstum

Längenwachstum der Wurzelhaare ist nur bis zu einer isotonischen Konzentration von rund 150 mOsm möglich. Etwas darüber kann in kurzer Zeit genügend Glucose aufgenommen werden um eine Adaptierung des osmotischen Wertes der Vakuole und damit ein erneutes Wachstum zu erreichen. Wobei zu bemerken ist, dass ältere Wurzelhaare generell einen etwas höheren osmotischen Wert besitzen als jüngere. Ab 200 mOsm wird das Spitzenwachstum zuerst bei den jüngeren Wurzelhaaren und ab 300 mOsm dann bei allen unwiderruflich eingestellt.

3.3.1.9.2. Polarität

Die polare Organisation der Wurzelhaare ist sehr stabil und wird erst ab 400 mOsm wirklich zerstört. Zwischen 200 mOsm und 350 mOsm erfolgt nur eine temporäre Störung durch Vakuolenteile, die in die *tip-zone* vordringen. Unter 200 mOsm bleibt die Polarität gänzlich unbeeinflusst.

3.3.1.9.3. Kernposition

Eine Veränderung der Kernposition durch osmotischen Stress ist bei keiner der getesteten Konzentrationen festzustellen.

3.3.1.9.4. Strömung

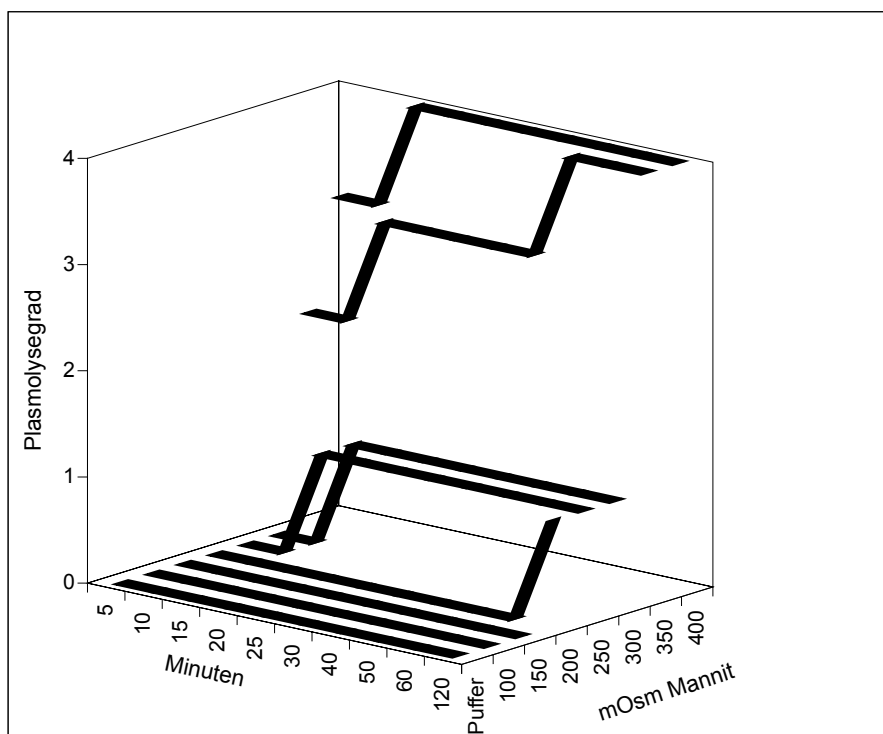
Die Strömung ist wie die Polarität in Form und Geschwindigkeit ebenfalls sehr stabil. Erst ab 350 mOsm tritt eine Änderung der Strömungsform von *reverse fountain streaming* zu einer Zirkulationsströmung auf. Die Strömungsgeschwindigkeit nimmt erst kurz vor dem Absterben des Wurzelhaares ab, dies geschieht erstmals bei 400 mOsm nach 1 bis 2 Stunden. Bis dahin beträgt die Strömungsgeschwindigkeit konstant um die 1,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$.

3.3.1.9.5. Plasmolyse

Die Wurzelhaare besitzen mit rund 150 mOsm nur einen sehr geringen osmotischen Wert und sind daher besonders sensibel gegenüber osmotischem Stress. Längenwachstum ist nur bis zu einer isotonischer Konzentration möglich. Bei hypertonen Lösungen kommt es durch Wasserentzug aus der Vakuole zum Zusammenziehen des Protoplasten. Bis etwa 300 mOsm geschieht dies sehr langsam, wodurch es zum Auffüllen des Plasmolysevorraums mit Zellwandmaterial kommt. Erst ab 300 mOsm erfolgt eine wirkliche Abhebung des Protoplasten von der Zellwand. Die Plasmolyse verläuft generell sehr langsam und dauert etwa 45 Minuten. Dieses Verhalten lässt auf eine gute Wandhaftung des Protoplasten schließen (siehe Kapitel Zellwandhaftung) oder auch auf Mechanismen, die den Wassertransport durch die Membran reduzieren.

In der nachfolgenden Graphik ist der Plasmolyseverlauf in den ersten zwei Stunden für die getesteten Konzentrationen dargestellt.

- Plasmolysegrade:
- 0 nicht plasmolysiert
 - 1 dicke Zellwand an der Spitze
 - 2 leichte Abhebung der Protoplasten
 - 3 leichte Plasmolyse
 - 4 starke Plasmolyse



Graphik 2: Plasmolyseverlauf in ansteigender Glucosekonzentration

3.3.2. Reaktion der Wurzelhaare auf Mannit unterschiedlicher Konzentrationen

Mit Mannit wurden die gleichen Konzentrationen wie bei Glucose getestet. Dabei ergeben sich bezüglich der Polarität, der Kernposition und der Strömung keine Unterschiede. Abweichungen sind nur beim Längenwachstum in einer isotonischen Lösung sowie beim generellen Plasmolyseverlauf zu beobachten. Besonders auffällig ist allerdings das Fehlen einer Aufblähung bei den neu gebildeten *bulges*. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Aufnahme von Mannit nicht oder nur extrem langsam möglich ist.

3.3.2.1. 150 mOsm Mannit

Wie schon erwähnt besitzen nicht alle Wurzelhaare den gleichen osmotischen Wert, sie schwanken etwas um 150 mOsm. Überführt man die Wurzelhaare in 150 mOsm Mannit, so ergeben sich wie bei Glucose wiederum 2 Gruppen:

Gruppe 1

Bei dieser Gruppe, deren osmotischer Wert etwas über 150 mOsm liegt, setzt das Wachstum, ungehindert mit 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ fort.

Gruppe 2

Wurzelhaare mit einem osmotischem Wert unter 150 mOsm stoppen ihr Wachstum. In Mannit ist der Wachstumsstopp im Gegensatz zu Glucose aber unwiderruflich (siehe Abbildungen auf der nächsten Seite), dies deutet wiederum darauf hin, dass Mannit nicht oder nur sehr langsam von den Wurzelhaaren aufgenommen wird. Bei einigen nicht mehr wachsenden Wurzelhaare ist nach 40 bis 60 Minuten eine leichte Aufblähung der Wurzelhaarspitze zu erkennen, was auf eine langsame aber doch vorhandene Mannitaufnahme hindeutet. Die Aufnahme ist aber so langsam, dass in der Zwischenzeit die Zellwand an der Spitze zu fest wird, um ein Weiterwachsen zu ermöglichen.

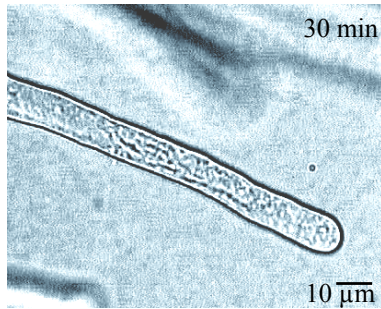


Abbildung 78: 150 mOsm Mannit
- Wurzelhaar nach 30 Min

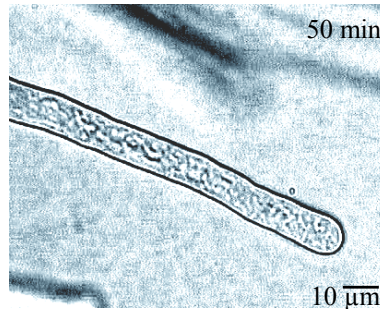


Abbildung 79: 150 mOsm Mannit
- Wurzelhaar nach 50 Min

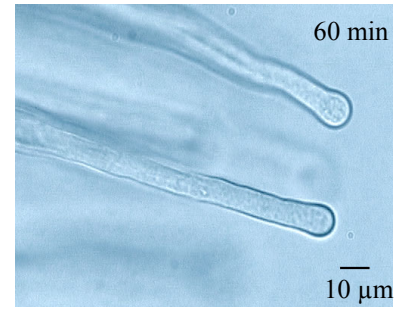


Abbildung 80: 150 mOsm Mannit
- aufgeblähte Wurzelhaarspitze

3.3.2.2. Plasmolyseverlauf in Mannit

Am Ende der Plasmolyse zeigt sich bei Mannit und Glucose das gleiche Bild, mit dem Unterschied, dass die Plasmolyse bei Mannit etwas verzögert einsetzt. Das bedeutet, dass die Bildung einer dicken Zellwand an der Spitze bei Mannit bis 350 mOsm deutlich ausgeprägt ist. Eine Abhebung des Protoplasten kann bei 300 mOsm erst nach 20 bis 30 Minuten erwartet werden. Auch bei 400 mOsm Mannit ist die Zeit bis zur Abhebung des Protoplasten von der Spitze länger als bei Glucose. In dieser Konzentration konnte auch festgestellt werden, dass bei Mannit der Protoplast während der Plasmolyse häufig an der Zellwand zurückgehalten wird, infolge bleiben kleine Plasmabrocken an der Zellwand hängen (siehe Kapitel „Zellwandbildung und Zellwandhaftung des Protoplasten während der Plasmolyse“).



Abbildung 81: 300 mOsm Mannit
- 30 Min. / leicht verdickte Zellwand



Abbildung 82: 300 mOsm Glucose
- 30 Min. / plasmolysiertes Wurzelhaar

3.3.3. Dynamik der Vesikelbewegungen in der *clear-zone* unter osmotischem Stress

Die *clear-zone* entspricht dem vordersten Bereich der *tip-zone*, sie ist unter normalen Bedingungen nur mit kleinen Vesikeln gefüllt. Um die Auswirkung von osmotischem Stress auf diese sehr sensible Organisation zu analysieren, wurden die Wurzelhaare in 300 oder 450 mOsm Mannit überführt und dabei die *clear-zone* mittels VEC beobachtet.

3.3.3.1. Kontrolle

Bei der Kontrolle befinden sich in der *clear-zone* ausschließlich kleine Vesikel, die sich ohne einheitliche Strömung durcheinander bewegen. Nur bei einzelnen ist eine gerichtete Bewegung zu beobachten. Entlang der Membran kann man Vesikel beobachten die an die Membran andocken, teils mit ihr verschmelzen und teils wieder weiterströmen (siehe CD Filmbeispiel 6 und 14).



Abbildung 83: *clear-zone* in der Kontrolle

3.3.3.2. 300 mOsm Mannit

Bei 300 mOsm wird, wie auf der Abbildung zu sehen, eine dicke Zellwand an der Spitze gebildet. Die Vesikelbewegung verläuft jedoch wie in der Kontrolle. Temporär kommt es allerdings auch hier zum Vordringen von Vakuolenteilen in die *clear-zone*. (siehe CD Filmbeispiel 7).



Abbildung 84: *clear-zone* in 300 mOsm Mannit nach 20 Minuten

3.3.3.3. 450 mOsm Mannit

Bei 450 mOsm kommt es zum sofortigen Zurückziehen des Protoplasten von der Spitze. Aber auch in diesem Fall treten außer der vordringenden Vakuole keine Veränderungen bei der Vesikelbewegung auf (siehe CD Filmbeispiel 8).

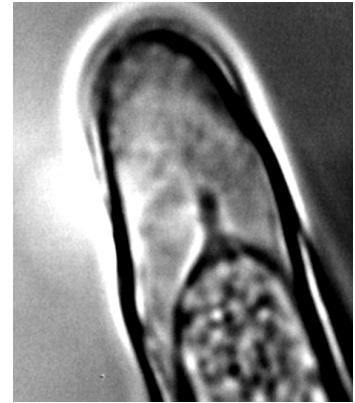


Abbildung 85: *clear-zone*
in 450 mOsm Mannit
nach 20 Minuten

3.3.4. Osmocytose – verändertes Endocytoseverhalten während der Plasmolyse

Während der Plasmolyse kann sich das Volumen des Protoplasten auf bis zu 15% des ursprünglichen Volumens reduzieren, ohne dass dabei die Semipermeabilität der Plasmamembran verloren geht (Palta and Lee- Stadelmann, 1983). Infolge der Volumsverkleinerung nimmt auch die Oberfläche des Protoplasten ab. Um die Semipermeabilität zu erhalten, muss die Plasmamembran aber immer gespannt sein; dies stellt ein besonderes Problem dar, da die Plasmamembran nicht besonders elastisch ist (Wolfe *et al.*, 1985). Es stellt sich daher die Frage, was mit der überschüssige Plasmamembran während der Plasmolyse passiert.

Zum einen kann sie in Form von Hecht'schen Fäden (siehe dazu auch Kapitel „Zellwandbildung und Zellwandhaftung des Protoplasten während der Plasmolyse“) erhalten bleiben, oder sie wird durch vermehrte Bildung von Endocytosevesikeln in das Plasma zurückgenommen; diesen Vorgang nennt man Osmocytose (Oparka, 1994; Oparka *et al.*, 1990). Um die Osmocytose in Wurzelhaaren während der Plasmolyse zu analysieren, wurden die Wurzeln für 3-4 Minuten mit 8 μm FM1-43 in 350 mOsm Mannit oder Puffer gefärbt, danach in entsprechende Lösungen ohne FM1-43 überführt und im CLSM beobachtet.

Bei der Kontrolle zeigen sich kleine Endocytosevesikel an der Spitze. Diese verschmelzen mit der Tonoplastenmembran, wodurch diese nach einiger Zeit auch fluoresziert. Die Verteilung der Vesikel im gesamten Wurzelhaar ist jedoch nur sehr gering (siehe Abbildung unten).

Bei Plasmolyse mit 350 mOsm Mannit zeigt sich ein ganz anderes Bild. Osmocytosevesikel werden schon viel früher gebildet und sind größer als in der Kontrolle. Nach einiger Zeit ist zwar auch eine fluoreszierende Tonoplastenmembran zu finden, die Osmocytosevesikel werden aber auch stark im gesamten Wurzelhaar verteilt (siehe Abbildung unten).

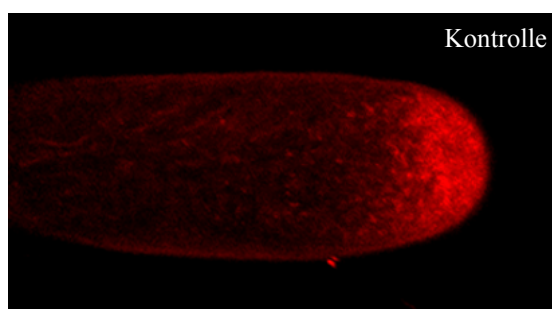


Abbildung 86: Endocytosevesikel in der Kontrolle nach 20 Minuten

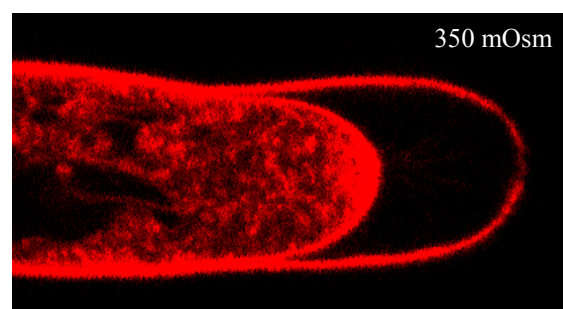


Abbildung 87: Endocytose- / Osmocytosevesikel in 350 mOsm Mannit nach 20 Minuten

3.3.5. Zellwandbildung und Zellwandhaftung des Protoplasten während der Plasmolyse

Neue Zellwand wird bei Wurzelhaaren fortwährend an der Spitze gebildet. Setzt man ein Wurzelhaar osmotischem Stress aus, beginnt sich der Protoplast von der Spitze her zurückzuziehen, je nach osmotischem Wert des Mediums mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (siehe auch Auswirkung von osmotischem Stress auf die Wurzelhaare von *Triticum aestivum*). Während der gesamten Zeit wird aber kontinuierlich neues Zellwandmaterial an der Spitze des Protoplasten abgegeben. Dies führt bei einem sehr langsamen Zurückweichen des Protoplasten (200 – 300 mOsm) dazu, dass der Plasmolysevorraum in der Spitze mit sehr lockerem Zellwandmaterial gefüllt wird. Dabei dürfte es sich vorwiegend um Pektine und Hemizellulosen handeln (Schröter and Sievers, 1971), teilweise konnten wir auch Spuren von Kallose nachweisen (siehe 200 mOsm Glucose). Zellulose dürfte in dieser lockeren Zellwand kaum vorhanden sein. Auf Abbildung 105 ist eine VEC-Aufnahme dieser lockeren Zellwand nach weiterer starker Plasmolyse zu sehen.

Bei schneller verlaufender Plasmolyse (ab ~350 mOsm) kann keine geschlossene Zellwandschicht mehr gebildet werden, es ist jedoch immer noch ringförmig abgelagertes Zellwandmaterial im Plasmolysevorraum zu finden (siehe Abbildung 89).

Eine kompakte Zellwand wird erst wieder nach Ende der Plasmolyse gebildet. Auf der Abbildung 90 ist an der Spitze des Protoplasten eine neugebildete kompaktere Zellwand zu sehen. Die Abbildung 91 zeigt dieselbe Zellwand nach weiter Plasmolyse.

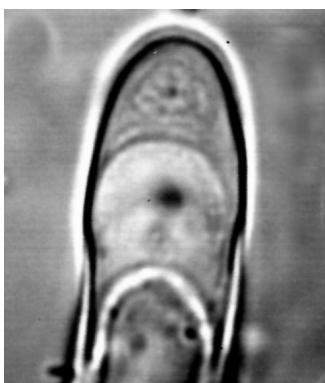


Abbildung 88: lockere Zellwand an der Spitze des Wurzelhaares

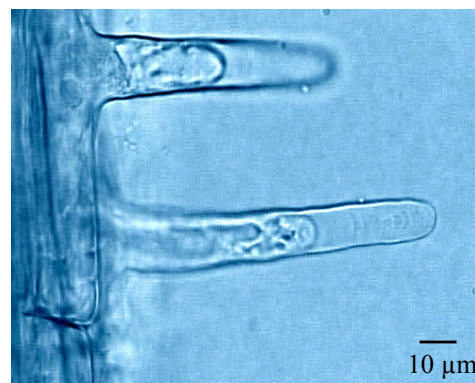


Abbildung 89: schichtförmige Ablagerungen von Zellwandmaterial im Plasmolysevorraum

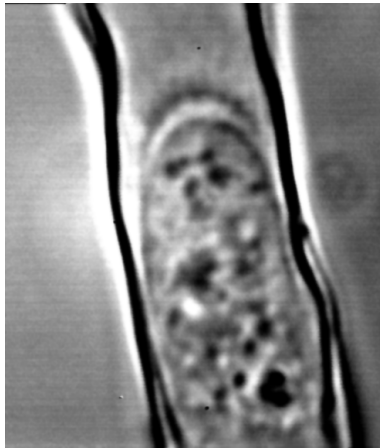


Abbildung 90: kompakte Zellwand
nach Ende der Plasmolyse



Abbildung 91: kompakte Zellwand
nach weiterer Plasmolyse

Bei starker Plasmolyse (400 mOsm) zieht sich der Protoplast so schnell zurück, dass keine geschlossene Zellwandschicht gebildet wird. In dieser Situation ist es möglich, durch Färbung der Membranen Verbindungen der Plasmamembran zur Zellwand zu beobachten (Hecht'sche Fäden). Zur Färbung der Membranen wurden die Wurzeln für 3-4 Minuten in $8\mu\text{m}$ FM1-43 in Puffer gelegt und anschließend der Farbstoff mit Puffer ausgewaschen. Die Plasmolyse wurde mit 400 mOsm Mannit durchgeführt. Im CLSM sind bei starker Plasmolyse sehr schön die Hecht'schen Fäden sehen. Diese Membran Fäden zeigen eine starke Verbindung zwischen der Plasmamembran und der Zellwand.

In Wurzelhaaren findet Hecht'sche Fäden über die gesamte Zellwand verteilt. Erstaunlich war allerdings, dass sie auch, wie in den Abbildungen 92 und 93 zu sehen, bis ganz in den vordersten Bereich der Spitze hinein reichen, in der eigentlich nur sehr dünne und verformbare Zellwand vermutet wird. Auch abgeschnürte Teilprotoplasten sind rundherum mit Hecht'schen Fäden umgeben (siehe Abbildungen 94 und 94).

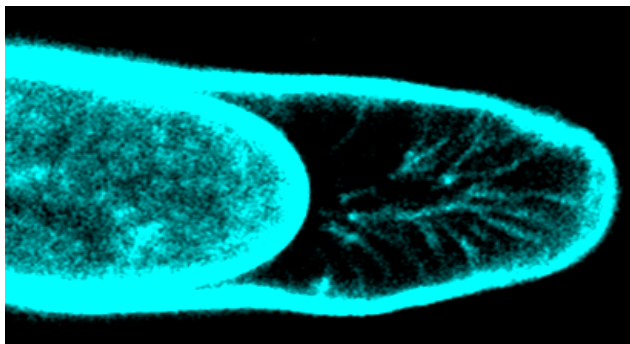


Abbildung 92: Hecht'sche Fäden in der Wurzelhaarspitze

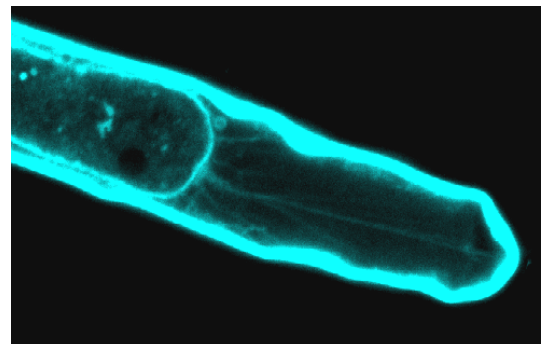


Abbildung 93: Hecht'sche Fäden in der
Wurzelhaarspitze

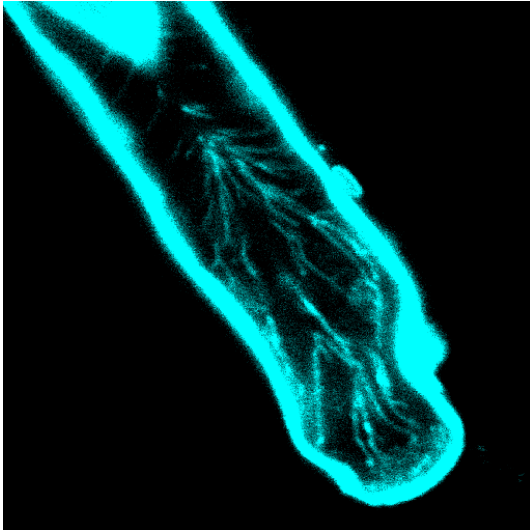


Abbildung 94: Hecht'sche Fäden im Wurzelhaar

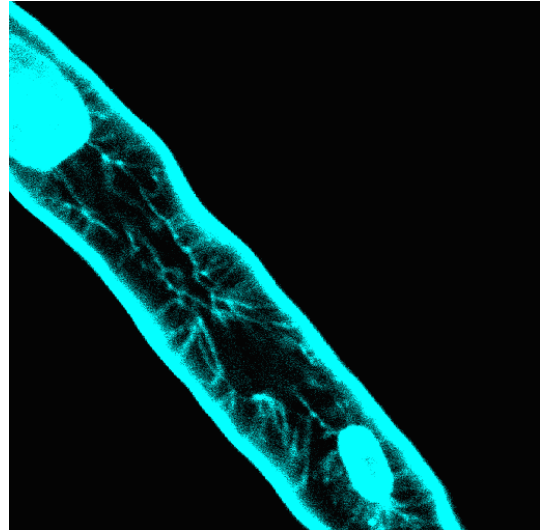


Abbildung 95: Hecht'sche Fäden im Wurzelhaar mit Teilprotoplast

Während der Plasmolyse wird der Protoplast auch durch diese Verbindungen zurückgehalten, dabei bekommt die Spitze des Protoplasten eine leicht spitze Form (siehe Abbildung 96 und 97). Erst wenn die Spannung des Fadens durch den sich weiter zurückziehenden Protoplasten zu groß wird, reißt die Verbindung; die Plasmolyse kann danach wieder mit normaler Geschwindigkeit fortgesetzt werden.

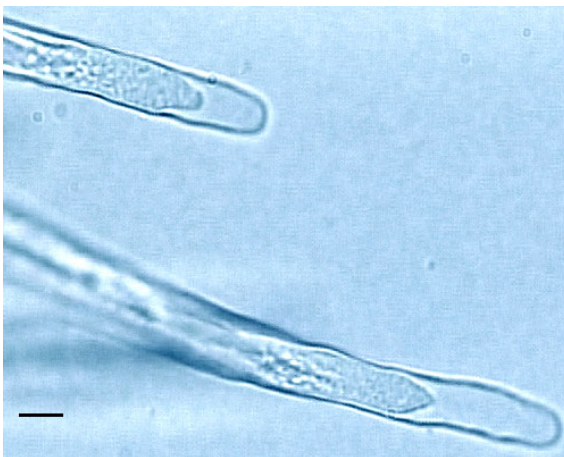


Abbildung 96: Anheftung des Protoplasten an der Zellwand

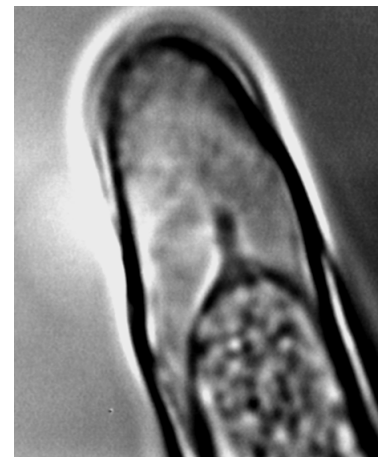


Abbildung 97: Anheftung des Protoplasten durch einen Hecht'schen Faden an der Zellwand (im VEC)

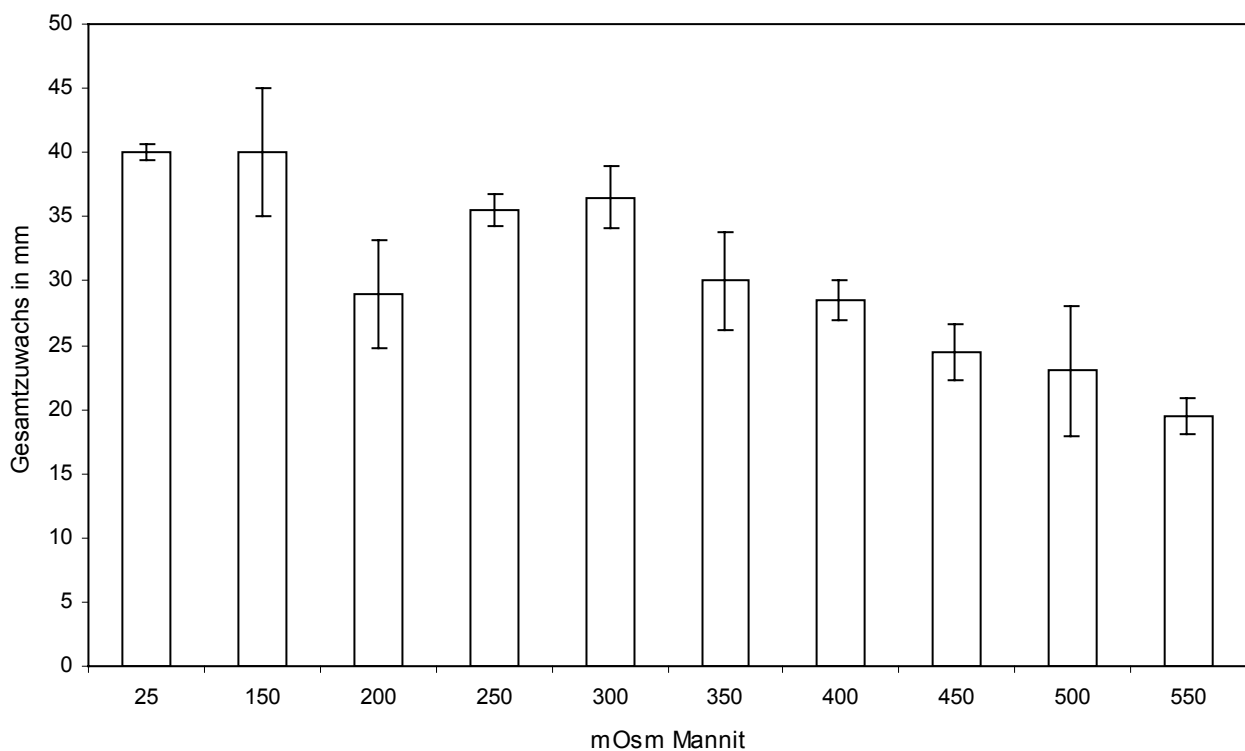
3.3.6. Adaptierung der Wurzel an erhöhte osmotische Bedingungen

Um die Auswirkung von osmotischem Stress auf das Wurzel- und Wurzelhaarwachstum darzustellen, wurden die Keimlinge direkt vom Filter in die verschiedenen Mannit- oder Polyethylenglycol Lösung gesetzt und darin für 30 Stunden kultiviert.

Die Wurzeln wurden vor und nach dem Einsetzen in die Lösungen vermessen. Zur Berechnung der Gesamtwurzellänge sind die Längen der Hauptwurzel sowie der rechten und linken Seitenwurzel addiert worden. Aus 3 Keimlingen je Konzentration wurde ein Mittelwert für den Gesamtzuwachs berechnet.

3.3.6.1. Wurzelwachstum in Mannit

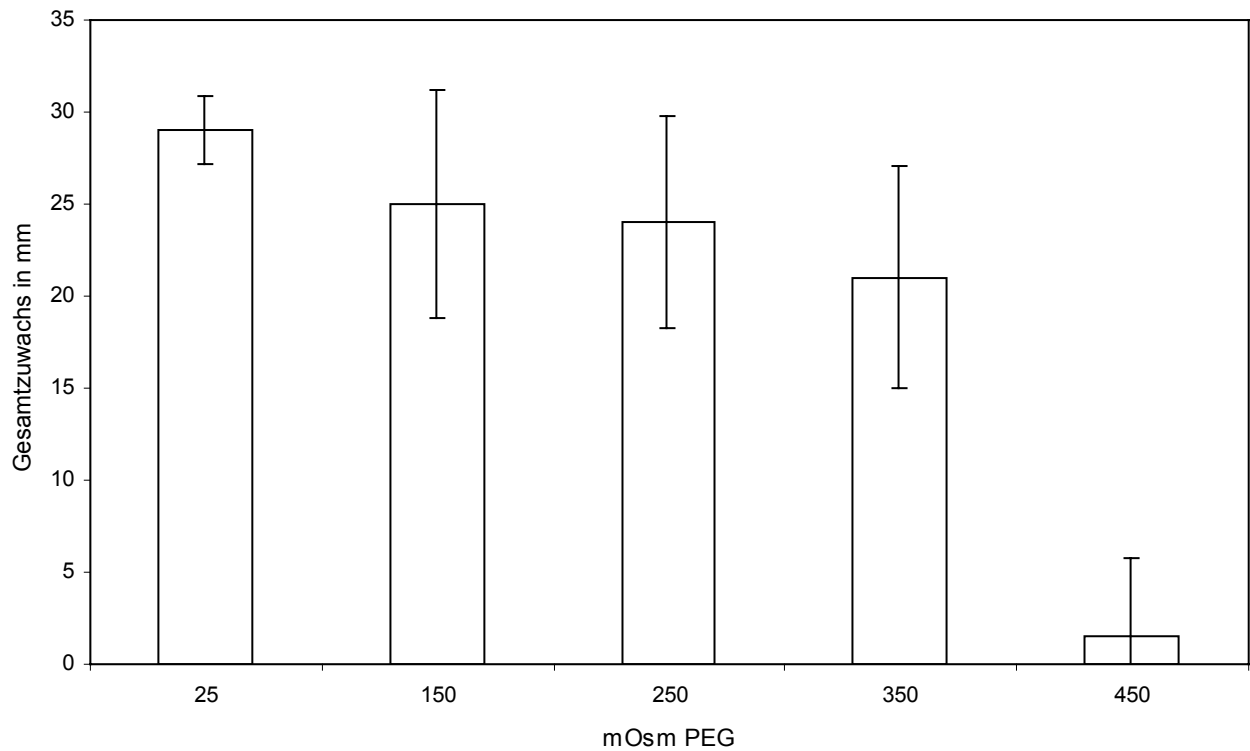
Wie in der Graphik und der Bildtafel im Anhang (Seite 123) zu erkennen ist, kann die Wurzel auch in höher osmotischen Medien noch wachsen. Es ist jedoch mit steigendem osmotischen Wert eine signifikante Abnahme des Längenwachstums zu verzeichnen ($r = -0,936$, $p = <1\%$). Wie auf der Bildtafel im Anhang (Abbildung 123) zu sehen, wird auch das Wachstum der Coleoptile mit steigender Konzentration zunehmend beeinflusst.



Graphik 3: Adaptierung der Wurzeln an verschiedene Mannit - Konzentrationen

3.3.6.2. Wurzelwachstum in Polyethylenglycol

Bis zu einer Konzentration von 350 mOsm nimmt die Gesamtwurzellänge kontinuierlich etwas ab, vergleichbar mit der Situation bei Mannit. Bei 450 mOsm kommt es, wie auf der Graphik unten zu sehen, zu einem starken Einbruch des Längenwachstums der Wurzel. Doch nicht nur die Wurzel ist bei 450 mOsm PEG in ihrem Wachstum gestört, sondern auch die Coleoptile, wie anhand der Bildtafel im Anhang (Seite 126) zu erkennen ist.

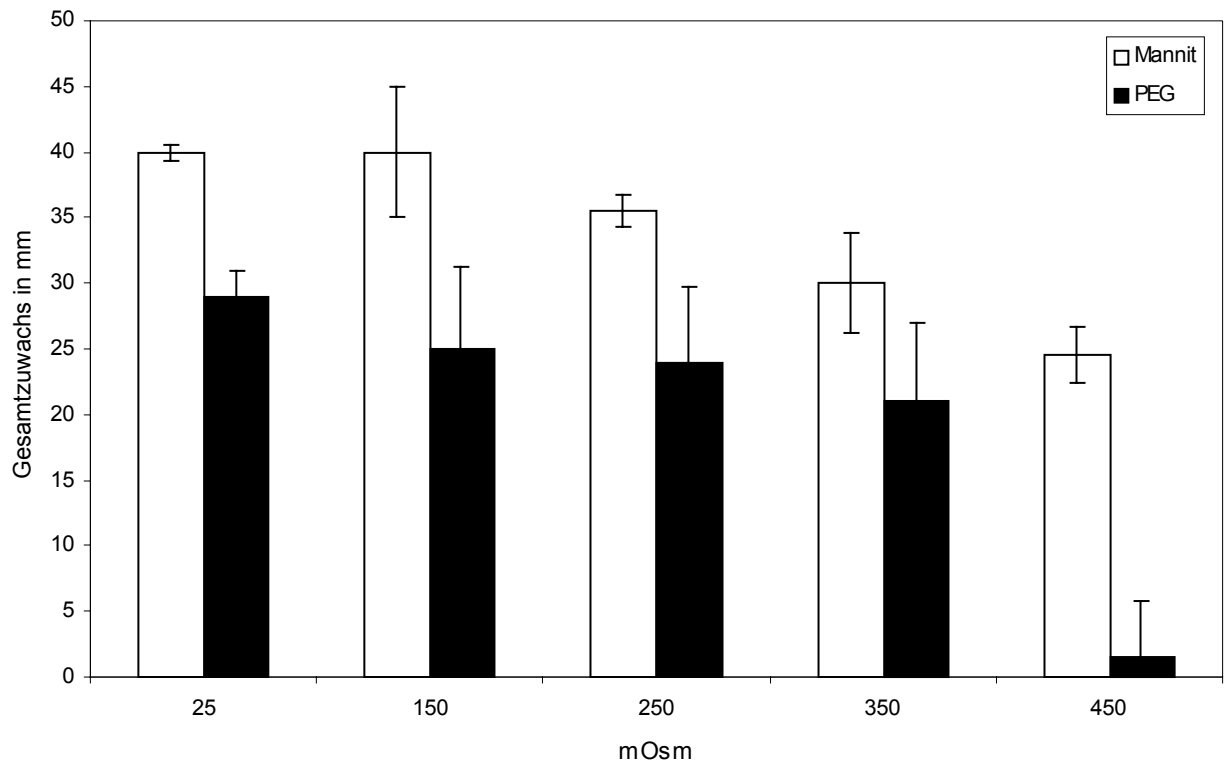


Graphik 4: Adaptierung der Wurzeln an verschiedene PEG - Konzentrationen

3.3.6.3. Vergleich des Wurzelwachstums in Mannit und Polyethylenglycol

In der folgenden Graphik sind die Gesamtzuwächse von Mannit und PEG eingetragen. Dies verdeutlicht die in etwa gleiche Abnahme der Gesamtwurzellänge bis 350 mOsm, sowie bei 450 mOsm die starke Abweichung bei PEG.

Das durchgehend geringere Wurzelwachstum bei PEG ist auf eventuell leicht abweichende Wachstumsbedingungen im Labor zurückzuführen



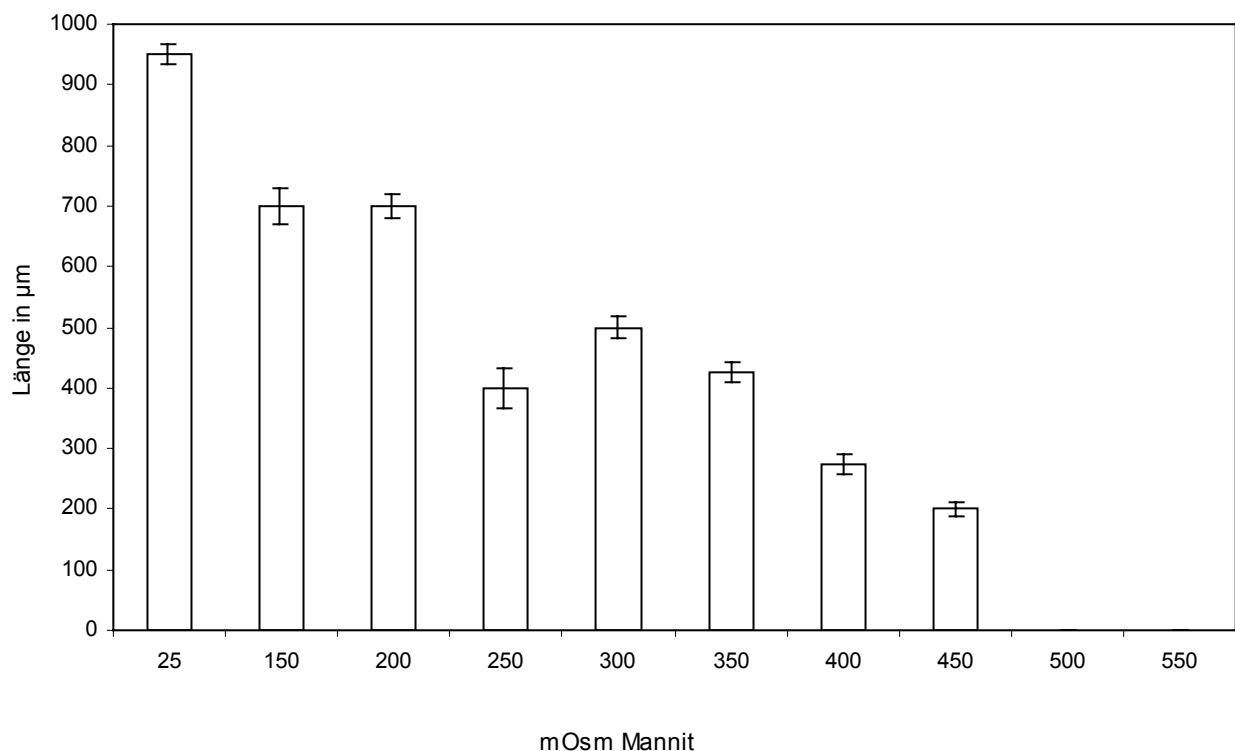
Graphik 5: Vergleich des Wurzelwachstums in Mannit und Polyethylenglycol

3.3.7. Adaptierung der Wurzelhaare an erhöhte osmotische Bedingungen

Für die Untersuchung der Wurzelhaarneubildung unter osmotischem Stress wurde der gleiche Versuchsansatz wie im Kapitel zuvor für die Wurzeln verwendet. Die Keimlinge wurden für 30 Stunden den verschiedenen Mannit und Polyethylenglycol Konzentrationen ausgesetzt und anschließend im Lichtmikroskop analysiert.

3.3.7.1. Wurzelhaarbildung in Mannit

Es zeigt sich, dass bis zu 500 mOsm, also auch in Konzentrationen in denen Wurzelhaare und Rhizodermiszellen normalerweise plasmolysieren, noch neue Wurzelhaare gebildet werden. Wurzelhaarlänge und -dichte nehmen jedoch mit steigender Konzentration des Mediums ab. Die Korrelation mit dem osmotischen Wert ist bei der Wurzelhaarlänge viel stärker als bei der Wurzellänge; der Zusammenhang ist fast linear und hoch signifikant. ($r = -0,976$, $p = <1\%$). Anhand der unten stehenden Graphik sowie der Bildtafel auf der nächsten Seite kann man sehr schön die Abnahme der Wurzelhaarlänge sowie der Wurzelhaardichte beobachten.



Graphik 6: Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene Mannit - Konzentrationen

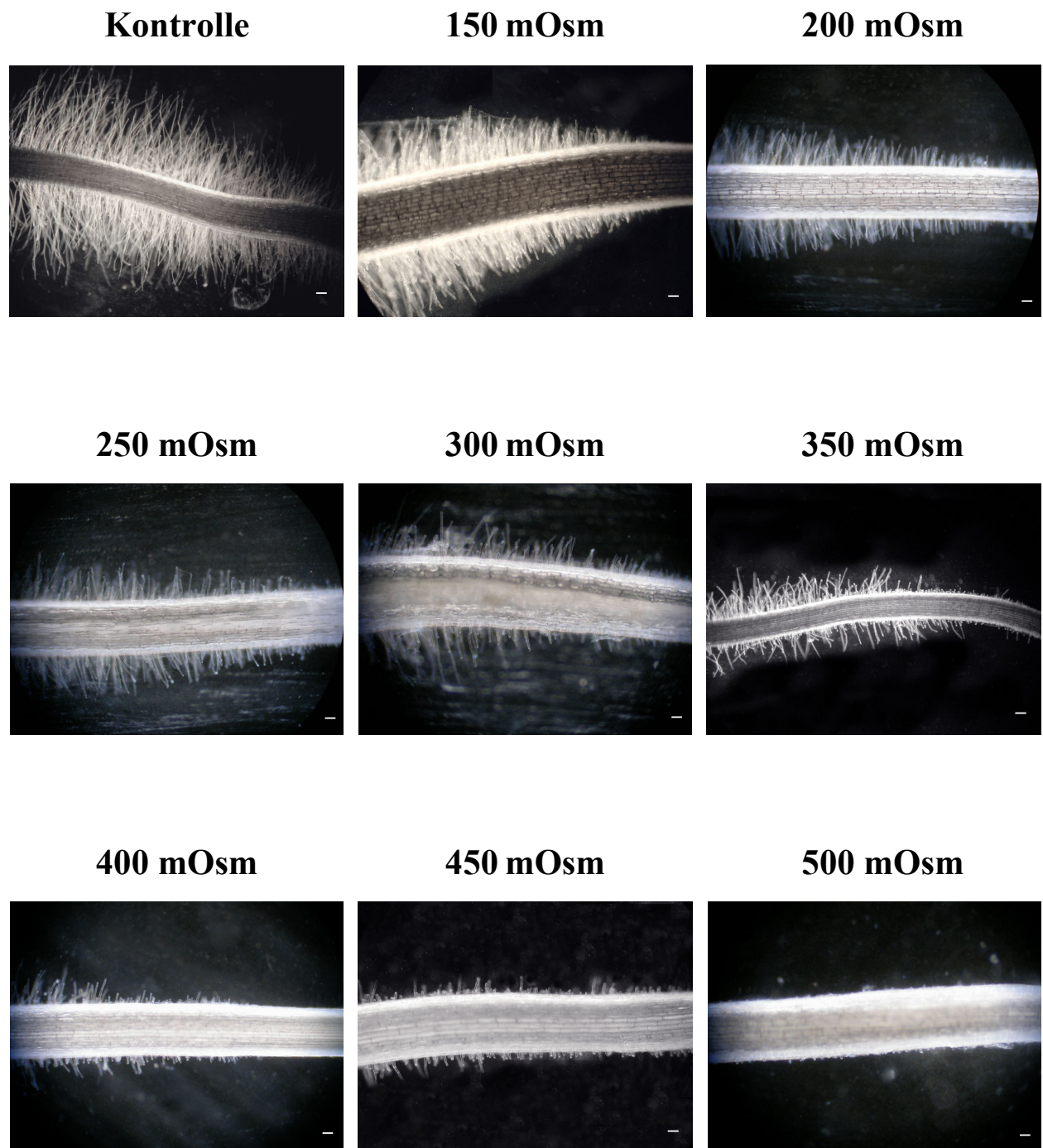


Abbildung 98: Bildtafel – Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene Konzentrationen Mannit

Die neu gebildeten Wurzelhaare wurden auch auf ihre Cytoarchitektur und Wachstumsgeschwindigkeit hin untersucht. Dabei ist festzustellen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit, unabhängig von der Konzentration des Mediums, ident mit der Kontrolle ist. Bei der Cytoarchitektur ist erst ab 400 mOsm eine Veränderung feststellbar. Ab dieser Konzentration ist keine Polarität des Plasmas mehr ausgebildet; die Wurzelhaare erreichen kaum mehr als 50µm – 100µm Länge (siehe Filmbeispiel 9 für 250 mOsm und Filmbeispiel 10 für 400 mOsm).

Versucht man Wurzelhaare aus erhöhten osmotischen Medien zu plasmolysieren, stellt man fest, dass die Plasmolysegrenze viel höher liegt als bei der Kontrolle (etwa 200 mOsm über der jeweiligen osmotischen Kulturlösung). Eine genaue Grenzplasmolyse ist jedoch nur sehr schwierig zu ermitteln, da die Wurzelhaare erst nach 30 – 40 Minuten zu plasmolysieren beginnen, was auf eine erhöhte Zellwandhaftung hindeutet.

Erstaunlich ist die Beobachtung, dass ab 300 mOsm die neu gebildeten, bereits ausgewachsenen Wurzelhaare wieder leicht zu plasmolysieren beginnen, wodurch sich eine dicke Zellwand an der Spitze bildet (siehe Abbildungen unten und auf der nächsten Seite).

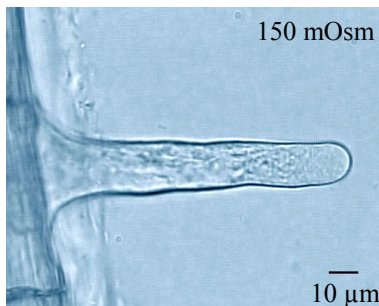


Abbildung 99: neues Wurzelhaar
in 150 mOsm Mannit

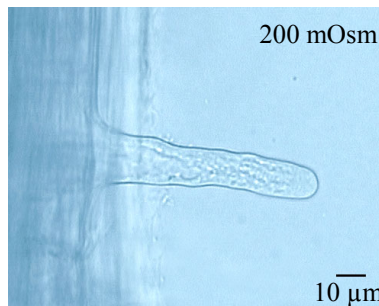


Abbildung 100: neues
Wurzelhaar
in 200 mOsm Mannit

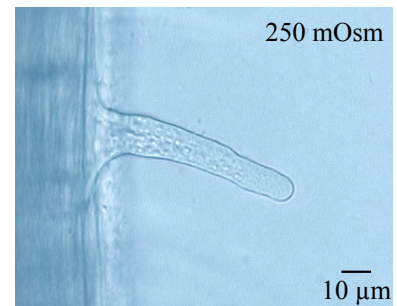


Abbildung 101: neues
Wurzelhaar
in 250 mOsm Mannit



Abbildung 102: neues Wurzelhaar
in 300 mOsm Mannit

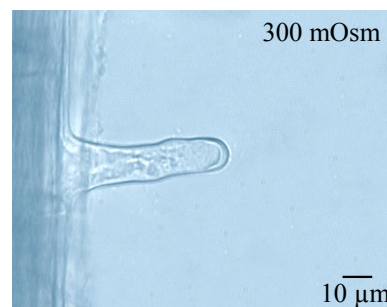


Abbildung 103: neues Wurzelhaar
in 300 mOsm Mannit - plasmolysiert

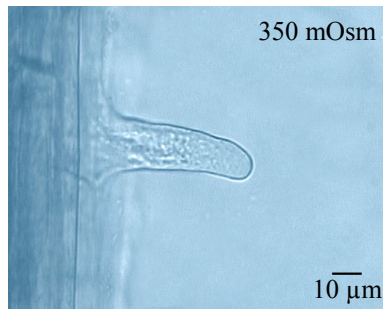


Abbildung 104: neues Wurzelhaar
in 350 mOsm Mannit

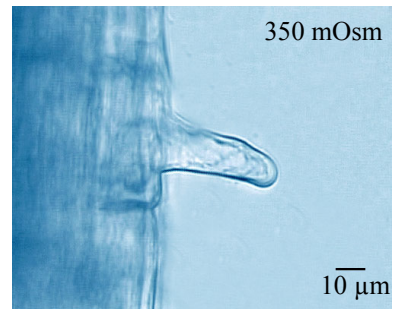


Abbildung 105: neues Wurzelhaar
in 350 mOsm Mannit - plasmolysiert

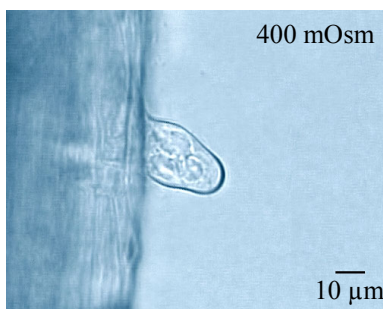


Abbildung 106: neues Wurzelhaar
in 400 mOsm Mannit

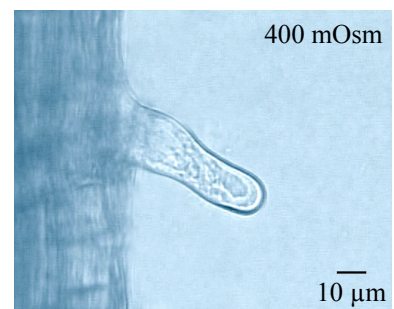


Abbildung 107: neues Wurzelhaar
in 400 mOsm Mannit - plasmolysiert

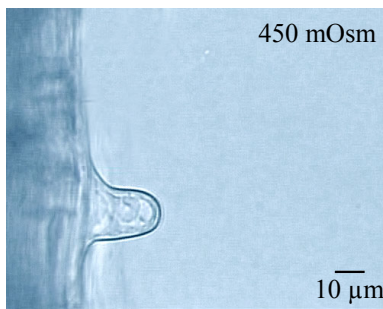


Abbildung 108: neues Wurzelhaar
in 450 mOsm Mannit

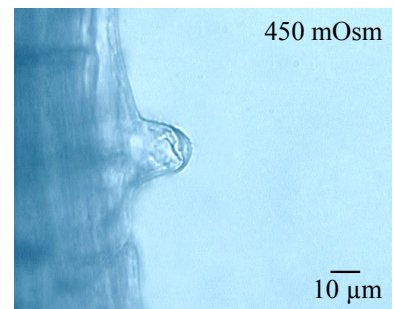
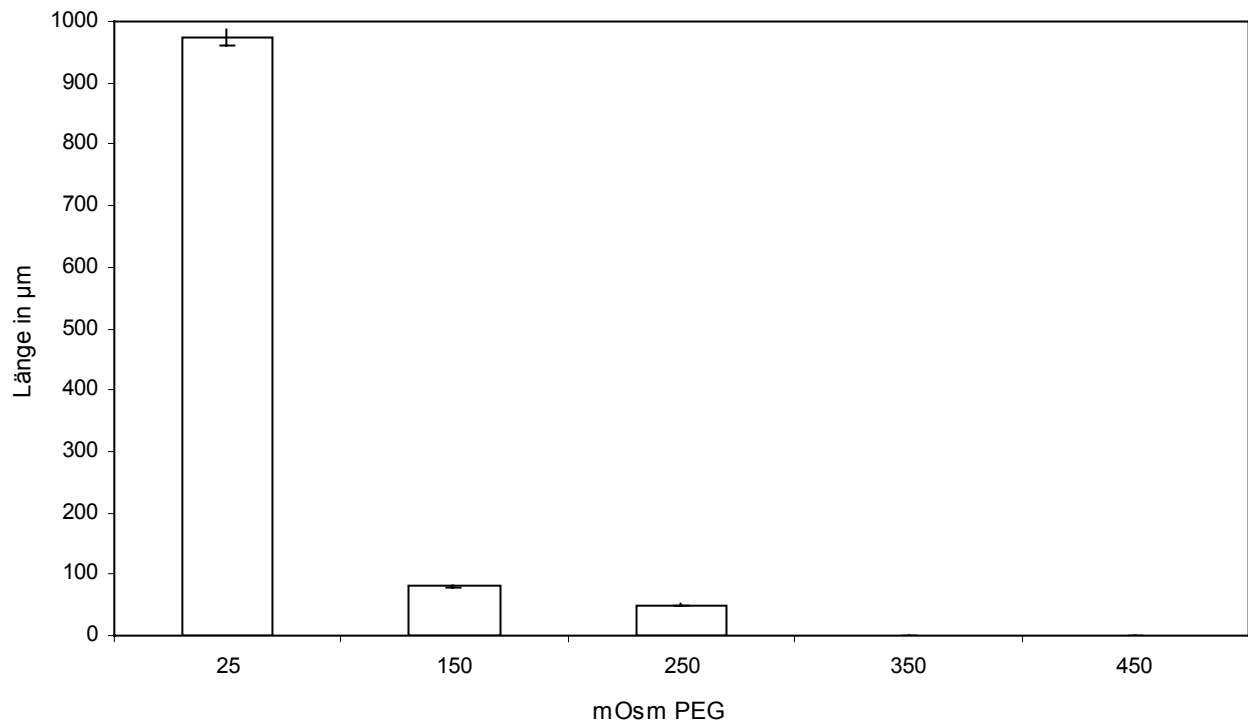


Abbildung 109: neues Wurzelhaar
in 450 mOsm Mannit - plasmolysiert

3.3.7.2. Wurzelhaarbildung in Polyethylenglycol

Die Wurzelhaarbildung in PEG ist nur in sehr niedrigen Konzentrationen möglich. Schon bei einer isotonischen Konzentration von 150 mOsm ist das Längenwachstum, wie aus dem Diagramm ersichtlich, massiv eingeschränkt. Über 150 mOsm erfolgt zusätzlich eine drastische Reduktion der Anzahl an Wurzelhaaren. Anhand der Bildtafel auf der nächsten Seite ist deutlich zu erkennen, dass bei 150 mOsm noch zahlreiche Wurzelhaare vorhanden sind, bei 250 mOsm hingegen ist die Anzahl an Wurzelhaare bereits stark reduziert. In einer Konzentration von 350 mOsm sind nur sehr vereinzelt und extrem kurze Wurzelhaare ($\sim 20 \mu\text{m}$) zu finden. Bei höheren Konzentrationen werden keine neuen Wurzelhaare gebildet



Graphik 7: Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene PEG - Konzentrationen

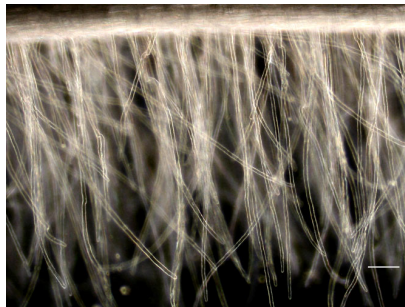
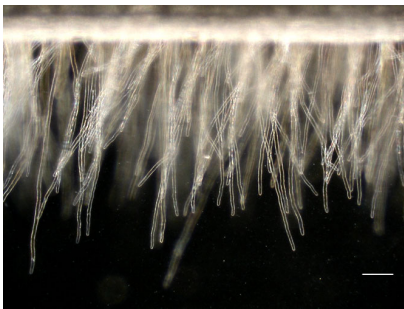
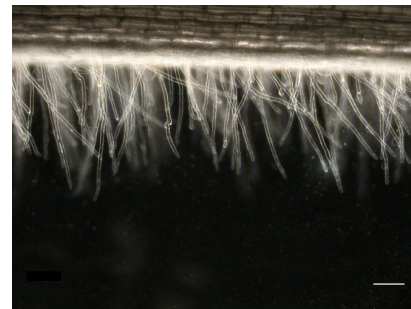
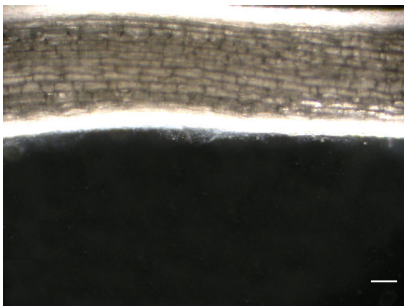
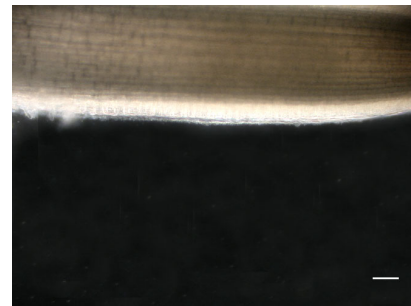
Kontrolle**150 mOsm****250 mOsm****350 mOsm****450 mOsm**

Abbildung 110: Bildtafel – Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene Konzentrationen PEG

Die in Konzentrationen bis 250 mOsm PEG gebildeten Wurzelhaare besitzen mit der Kontrolle idente polare Organisation und Strömung; Wurzelhaare die in 350 mOsm PEG gebildet werden, sind jedoch kaum noch polar organisiert (siehe Abbildung 114). Das Wachstum und die Wachstumsgeschwindigkeit verlaufen bei allen aber normal. Bei keiner der untersuchten Konzentrationen sind aufgeblähte *bulges*, wie bei Glucose, zu finden.

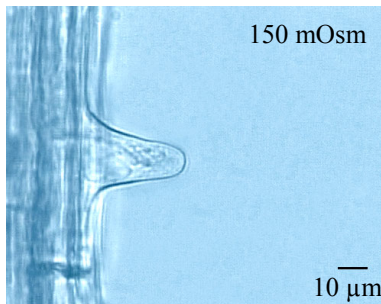


Abbildung 111: 150 mOsm PEG
keine Aufblähung der neuen Wurzelhaare

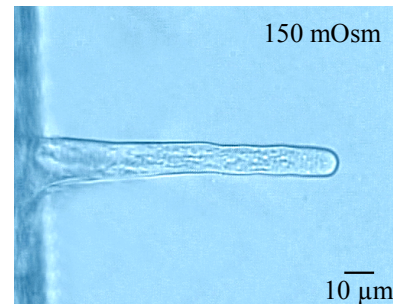


Abbildung 112: 150 mOsm PEG
Wurzelhaar mit normaler Polarität

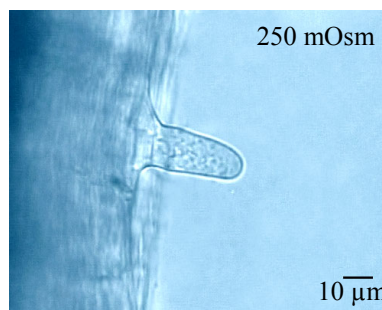


Abbildung 113: 250 mOsm PEG
Wurzelhaar mit normaler Polarität

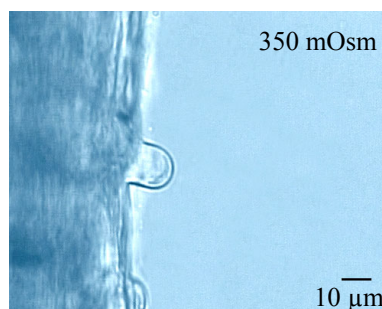
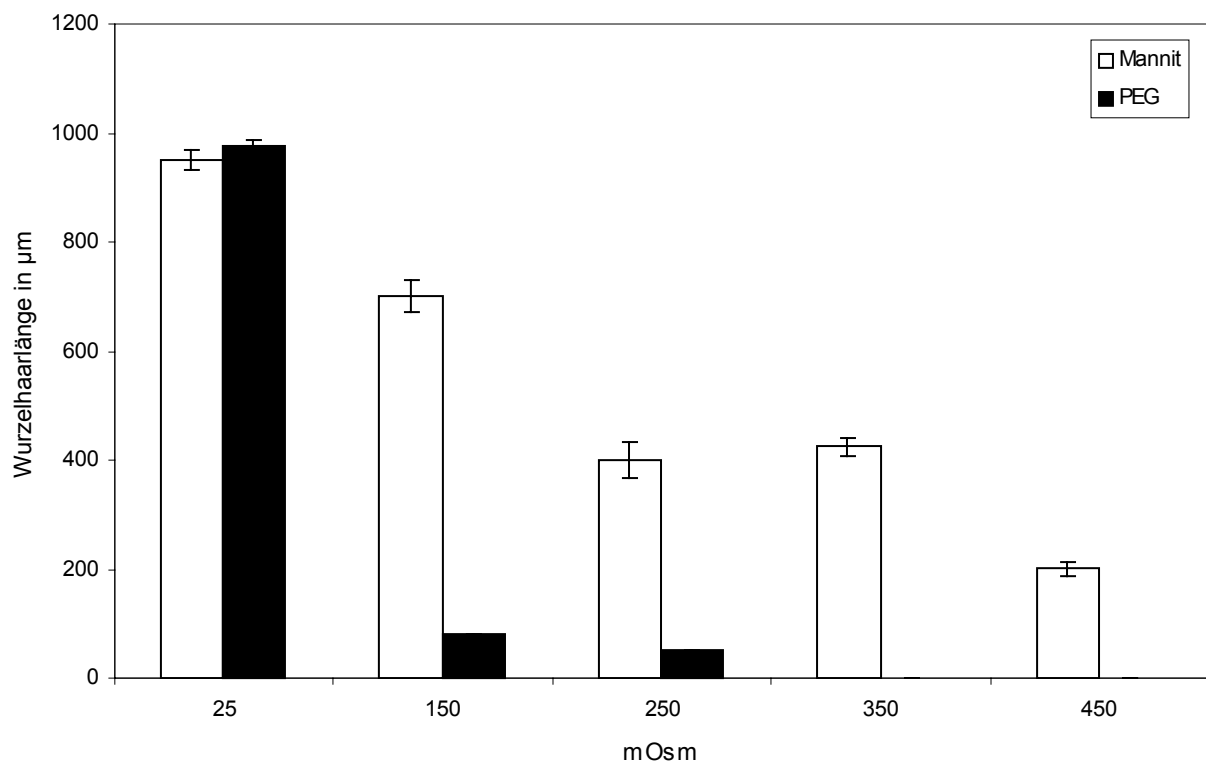


Abbildung 114: 350 mOsm PEG
Wurzelhaar mit gestörter Polarität

3.3.7.3. Vergleich der Wurzelhaarbildung in Mannit und Polyethylenglycol

Während bei Mannit mit ansteigender Konzentration eine kontinuierliche Reduktion der Wurzelhaarlänge zu beobachten ist, kommt es bei PEG schon in einer Konzentration von 150 mOsm zu einer massiven Einschränkung des Wurzelhaarwachstums. In 250 mOsm werden bei PEG, im Vergleich zu Mannit, nur äußerst wenige Wurzelhaare ausgebildet. Ab 350 mOsm ist bei PEG die Wurzelhaarbildung komplett eingestellt, während sich bei Mannit noch Wurzelhaare in beträchtlicher Anzahl und Länge bilden.



Graphik 8: Vergleich der Wurzelhaarbildung in Mannit und Polyethylenglycol

3.4. BEEINFLUSSUNG DER WURZELHAARE VON *TRITICUM AESTIVUM* DURCH SALZE

Salze haben eine zweifache Wirkung auf Pflanzenzellen, zum einen die Wirkung der Ionen selbst und zum anderen durch den von ihnen ausgeübten osmotischen Druck. Um den Effekt der Ionen aufzuzeigen, wurden die Molaritäten der Salze so gewählt, dass ihr osmotischer Wert denen der osmotischen Medien aus den Versuchen mit Zuckern entspricht. Analysiert wurden das Wachstum und die Cytoarchitektur der Wurzelhaare, sowie die Anpassungsfähigkeit der Wurzel und die Bildung neuer Wurzelhaare unter Salzstress.

3.4.1. Reaktion der Wurzelhaare auf Natrium- Chlorid unterschiedlicher Molaritäten

In diesem Kapitel sind die Reaktionen der Wurzelhaare auf unterschiedliche Molaritäten von Natriumchlorid innerhalb der ersten 5 Stunden aufgezeigt. Der Versuchsaufbau erfolgte in gleicher Weise wie bei den Versuchen zum osmotischem Stress.

3.4.1.1. 50 mM NaCl

Bei dieser 100 mOsm entsprechenden Konzentration ist nach einem kurzen Wachstumsstopp (etwa 2 Minuten), bei dem die Vakuole nach vorne dringt und sich die Spitze leicht aufbläht, ein beschleunigtes Wachstum zu beobachten. Das Wurzelhaar wird durch Aufblähung der Spitze während des Wachstumsstopps etwas dicker; beim erneuten Einsetzen des Wachstums wird dieser Durchmesser beibehalten. Die neue Wachstumsgeschwindigkeit ist mit 2 – 2,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ mehr als doppelt so schnell wie in der Kontrolle. Eine Zeitraffung von 1 Minute = 1 Sekunde ist bei den Filmbeispielen 11 und 12 auf der beiliegenden CD zu sehen. Nach 20 – 30 Minuten kommt es durch Platzen der Tonoplastenmembran zur Degenerierung des Plasmas beziehungsweise zum Aufplatzen des gesamten Wurzelhaares und somit zum Austritt des Plasmas (siehe Filmbeispiel 13 auf der beiliegenden CD).

Während des beschleunigten Wachstums treten keine Veränderungen in der Polarität und der Strömungsgeschwindigkeit auf. Der Kern hingegen scheint zu Beginn ein kleines Stück weiter nach vorne zu wandern, ein konkreter Zusammenhang ist aber nicht feststellbar.

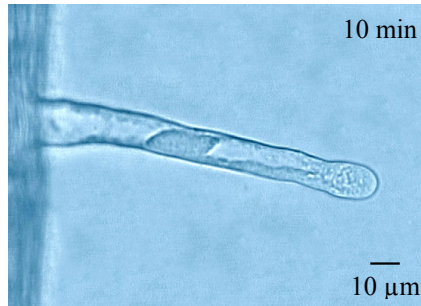


Abbildung 115: 50 mM NaCl
- aufgeblähte Spitze nach 10 Minuten

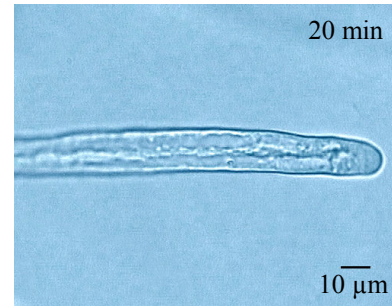


Abbildung 116: 50 mM NaCl
- polare Organisation nach 20 Minuten

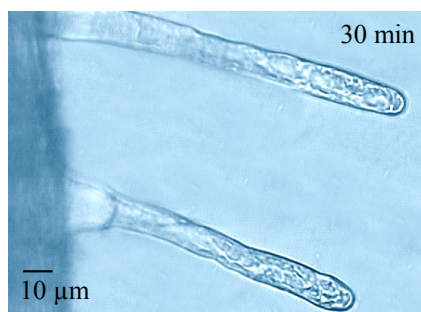


Abbildung 117: 50 mM NaCl
- degeneriertes Plasma

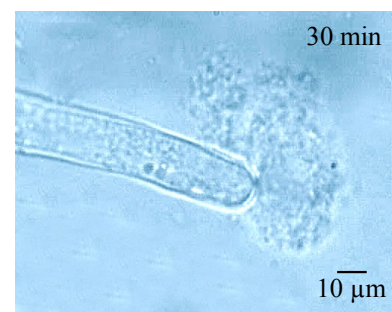


Abbildung 118: 50 mM NaCl
- geplatzt Wurzelhaar

3.4.1.2. 75 mM NaCl

Die Reaktion auf 75 mM NaCl ist im Wesentlichen ident mit der von 50 mM. Ein kleiner Unterschied besteht nur am Beginn; bei 75 mM NaCl dauert der Wachstumsstopp mit ~15 Minuten etwas länger, wodurch eine stärker aufgeblähte Spitze ausgebildet wird. Die Tonoplastenmembran hält etwas länger stand und platzt erst nach rund 90 Minuten.

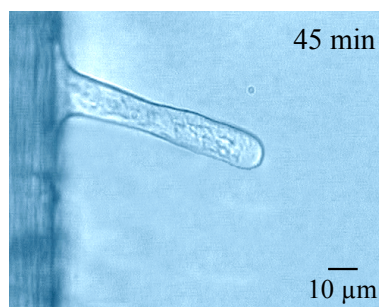


Abbildung 119: 75 mM NaCl
- aufgeblähtes Wurzelhaar

3.4.1.3. 100 – 200 mM NaCl

Ab einer Konzentration von 100 mM NaCl (200 mOsm) kommt es zu einem irreversiblen Stopp des Längenwachstums und die Spitze bläht sich bei den meisten Wurzelhaaren leicht auf. Bei allen Konzentrationen treten sofort Vakuolenteile in der *tip-zone* auf. Mit steigender Konzentration manifestiert sich die Vakuole in der Spitze immer früher; bei 100 mM etwa nach 40 Minuten, bei 200 mM schon nach 10 Minuten. Ebenso nimmt die Polarität immer schneller ab, infolge wird das Wurzelhaar immer mehr mit Vakuole ausgefüllt; hier liegt die Zeitspanne zwischen 2 Stunden bei 100 mM und 45 Minuten bei 200 mM. Gleichzeitig mit dem Verlust der Polarität verändert sich die Strömung von *reverse fountain streaming* zu einer Rotationsströmung. Die Strömungsgeschwindigkeit bleibt generell konstant, erst kurz vor dem totalen Stillstand der Strömung wird sie etwas langsamer. Wie bei den beiden vorherigen Konzentrationen ist auch hier keine signifikante Änderung der Kernposition zu bemerken.

Sehr überraschend ist allerdings, dass bis 200 mM (400 mOsm) weder Plasmolyse noch die Bildung einer dicken Zellwand auftreten (siehe auch „Rasche Aufnahme von Ionen zum Konzentrationsausgleich“). Erst mit 400mM NaCl (800 mOsm) kann eine sofortige und infolge stark verlaufende Plasmolyse erreicht werden, die Wurzelhaare sterben dabei nach 30 bis 40 Minuten ab (siehe dazu Abbildungen auf der nächsten Seite oben).

Generell ist zu sagen, dass dieser gesamte Prozess eine sehr hohe Schwankungsbreite besitzt; es ist daher schwierig exakte Abläufe und Zeitpunkte festzulegen. Der grobe Verlauf der Stressreaktion ist jedoch konstant und ändert sich mit steigender Konzentration nur in seiner Geschwindigkeit.

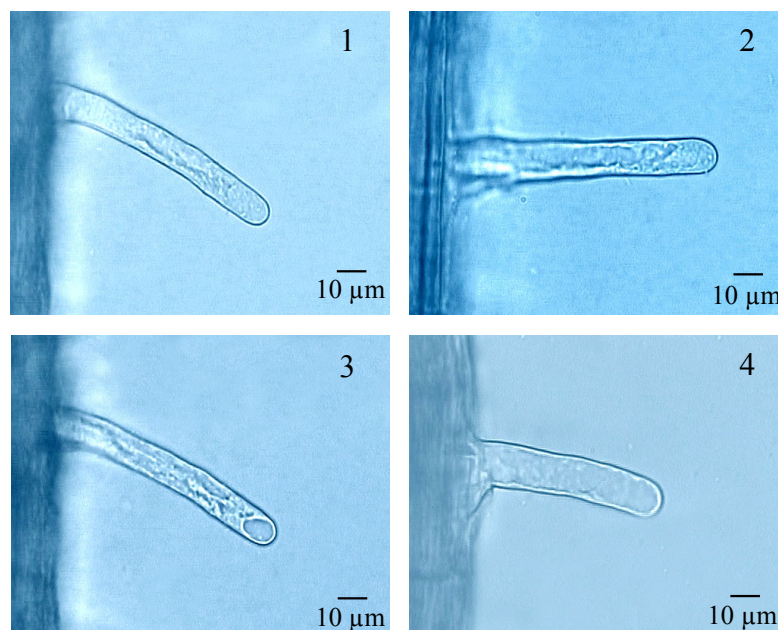


Abbildung 120: schematischer Verlauf des Polaritätsverlustes



Abbildung 121: 400 mM NaCl
- Plasmolyse nach 3 Minuten

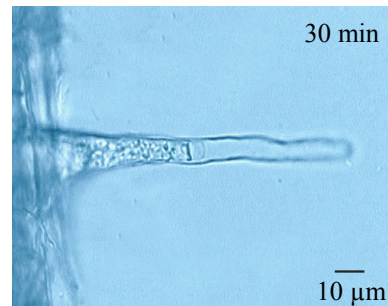


Abbildung 122: 400 mM NaCl
- Plasmolyse nach 30 Minuten

3.4.1.4. Überblick über die Reaktionen der Wurzelhaare auf ansteigende Molaritäten von Natriumchlorid

3.4.1.4.1. Längenwachstum

Bis zu 75 mM NaCl, dies entspricht einer isotonischen Konzentration von 150 mOsm, liegt ein beschleunigtes Wachstum von etwa 2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ vor, höhere Konzentrationen führen zu einem irreversiblen Wachstumsstopp.

3.4.1.4.2. Polarität

Bis 75 mM bleibt die Polarität bis zum Platzen der Tonoplastenmembran erhalten. In höheren Konzentrationen nimmt sie im Verlauf der Salzeinwirkung ab. Der Verlust der Polarität geht mit steigender Molarität der Salzlösung immer schneller vor sich.

3.4.1.4.3. Kernposition

Bei allen Konzentrationen konnte andeutungsweise eine leichte Bewegung des Kernes Richtung Spitze beobachtet werden.

3.4.1.4.4. Strömung

Parallel zum Verlust der Polarität verlagert sich die Strömungsform von *reverse fountain streaming* zu einer Rotationsströmung. Die Strömungsgeschwindigkeit wird erst nach einigen Stunden, kurz vor dem Absterben des Wurzelhaares, etwas langsamer.

3.4.1.4.5. Plasmolyse

Bis 200 mM NaCl (400 mOsm) kann keine Plasmolyse beobachtet werden. Erst in bedeutend höher konzentrierten Lösungen von etwa 400 mM (800 mOsm) kommt es zu starker Plasmolyse.

3.4.2. Reaktion der Wurzelhaare auf Kalium-Chlorid unterschiedlicher Molaritäten

Das Reaktionsmuster entspricht dem von Natriumchlorid, mit dem Unterschied, dass Kaliumchlorid eine etwas stärkere Wirkung zeigt. Bei 50 mM KCl kann bereits nach 15 Minuten eine Zerstörung der Tonoplastenmembran registriert werden, dies deutet auf eine wesentlich schnellere Aufnahme der Kalium-Ionen hin. In Bezug auf Cytoarchitektur, Strömung oder Kernposition sind keine Abweichungen von Natriumchlorid zu beobachten.

3.4.3. Rasche Aufnahme von Ionen zum Konzentrationsausgleich

Um eine Aufnahme von Ionen aus der umgebenden Lösung nachzuweisen, wurden die Wurzeln aus der Kulturlösung zuerst für 30 Minuten in 50 mM NaCl gelegt. Nach dieser Zeit wurde versucht die Wurzelhaare mit 300 mOsm und 500 mOsm Mannit zu plasmolysieren. Bei 300 mOsm kann zwar keine Wachstums mehr gemessen werden, es war aber auch keine verdickte Zellwand noch eine Abhebung des Protoplasten zu sehen. Dies zeigt, dass der osmotische Wert des Wurzelhaares von etwa 150 mOsm in der Kulturlösung auf etwa 300 mOsm gestiegen sein muss, denn eine starke Plasmolyse tritt erst bei 500 mOsm ein.

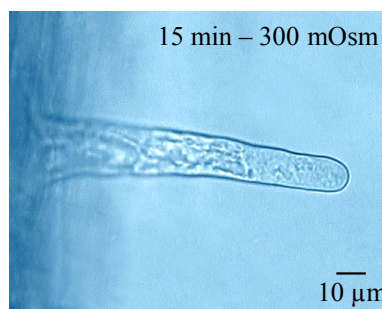


Abbildung 123: 15 Min. Plasmolyse mit 300 mOsm Mannit nach 30 Minuten 50 mM NaCl

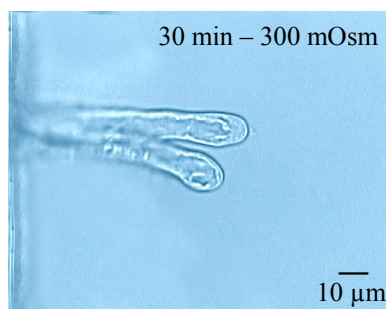


Abbildung 124: 30 Min. Plasmolyse mit 300 mOsm Mannit nach 30 Minuten 50 mM NaCl

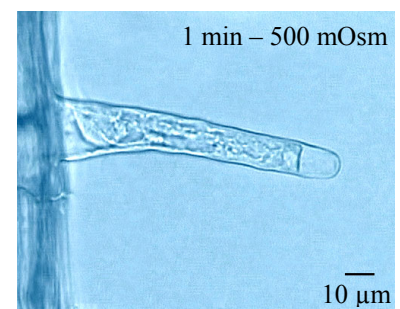


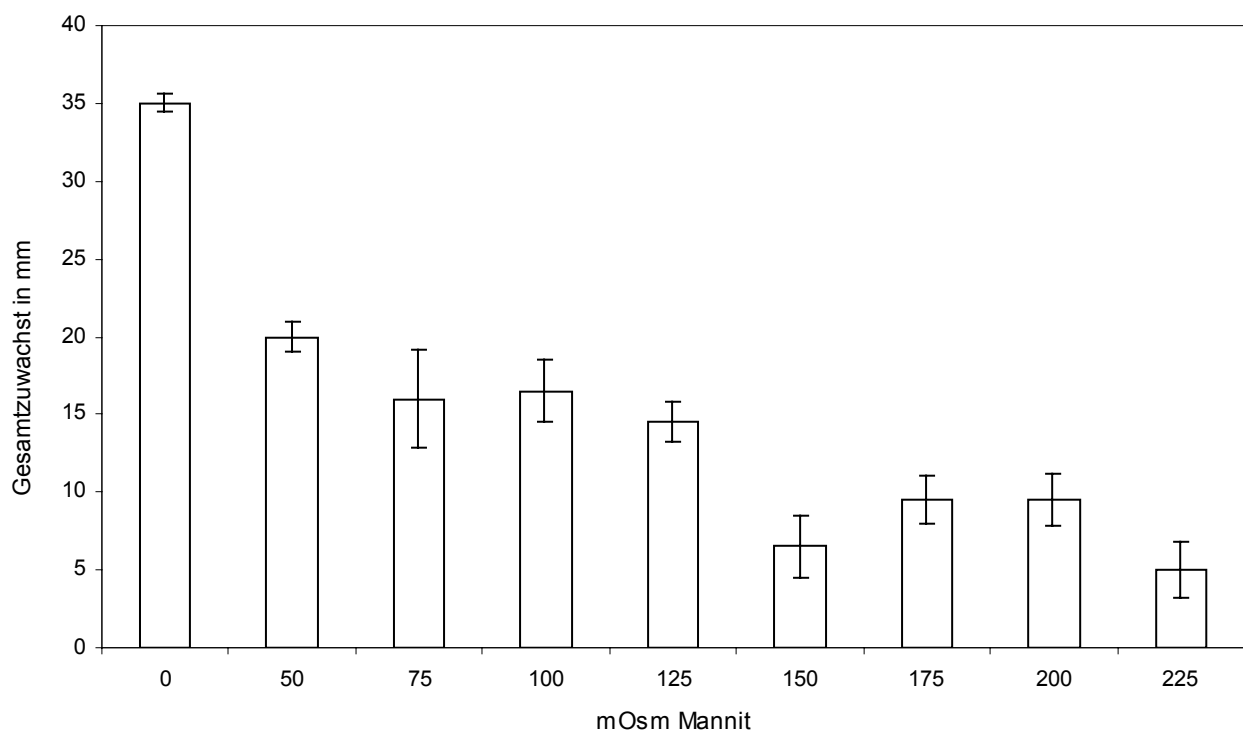
Abbildung 125: 1 Min. Plasmolyse mit 500 mOsm Mannit nach 30 Minuten 50 mM NaCl

3.4.4. Adaptierung der Wurzel an Salzstress

Wie aus vorangegangenen Versuchen bekannt, können sich Wurzel und auch Wurzelhaare an erhöhte osmotische Bedingungen anpassen. Da aber Salz nicht nur eine osmotische sondern auch eine ionische Wirkung ausübt, wurde in diesem Versuch getestet wie weit sich Wurzel und Wurzelhaare an Salzstress adaptieren können. Dazu wurden die Keimlinge vom Filterpapier direkt in die verschiedenen Konzentrationen von NaCl gestellt und für 30 Stunden kultiviert. Die Messung und Auswertung erfolgte identisch mit dem Versuch für die Adaptierung an osmotischen Stress.

3.4.4.1. Wurzelwachstum in Natriumchlorid

In der nachfolgenden Graphik ist sehr deutlich die starke Reduktion der Wurzellänge unter Salzstress zu sehen. Auffällig ist die massive Reduktion schon zu Beginn bei 50 mM, also einer sehr niedrigen Konzentration, die noch keinen osmotischen Stress verursacht. In den höheren Konzentrationen entspricht der Grad der weiteren Wurzellängenabnahme etwa dem bei osmotischem Stress. Das Keimlingswachstum ist auch im Anhang auf einer Bildtafel (Seite 128) dargestellt.



Graphik 9: Adaptierung der Wurzeln an verschiedene Natriumchlorid - Konzentrationen

3.4.5. Adaptierung der Wurzelhaare an Salzstress

Zur Analyse der Adaptierung von Wurzelhaaren an Salzstress wurde der gleiche Versuchsaufbau wie im vorherigen Kapitel verwendet. Die Beobachtung der Wurzeln und Wurzelhaare erfolgte im Lichtmikroskop.

3.4.5.1. Wurzelhaarbildung in Natriumchlorid

Im Gegensatz zum osmotischen Stress wachsen in Natriumchlorid nur bei 50 mM vereinzelte und extrem kurze Wurzelhaare mit etwa 20µm Länge. In allen anderen Konzentrationen sind keine Wurzelhaare mehr ausgebildet.

Auffällig ist auch eine leichte Änderung der Form der neu gebildeten Wurzelspitze. Diese erscheint unter Salzstress gestaucht und etwas dünner als in der Kontrolle. Die Wurzelspitze wirkt auch mit zunehmender Salzkonzentration immer etwas dunkler (siehe Bildtafel auf der nächsten Seite).

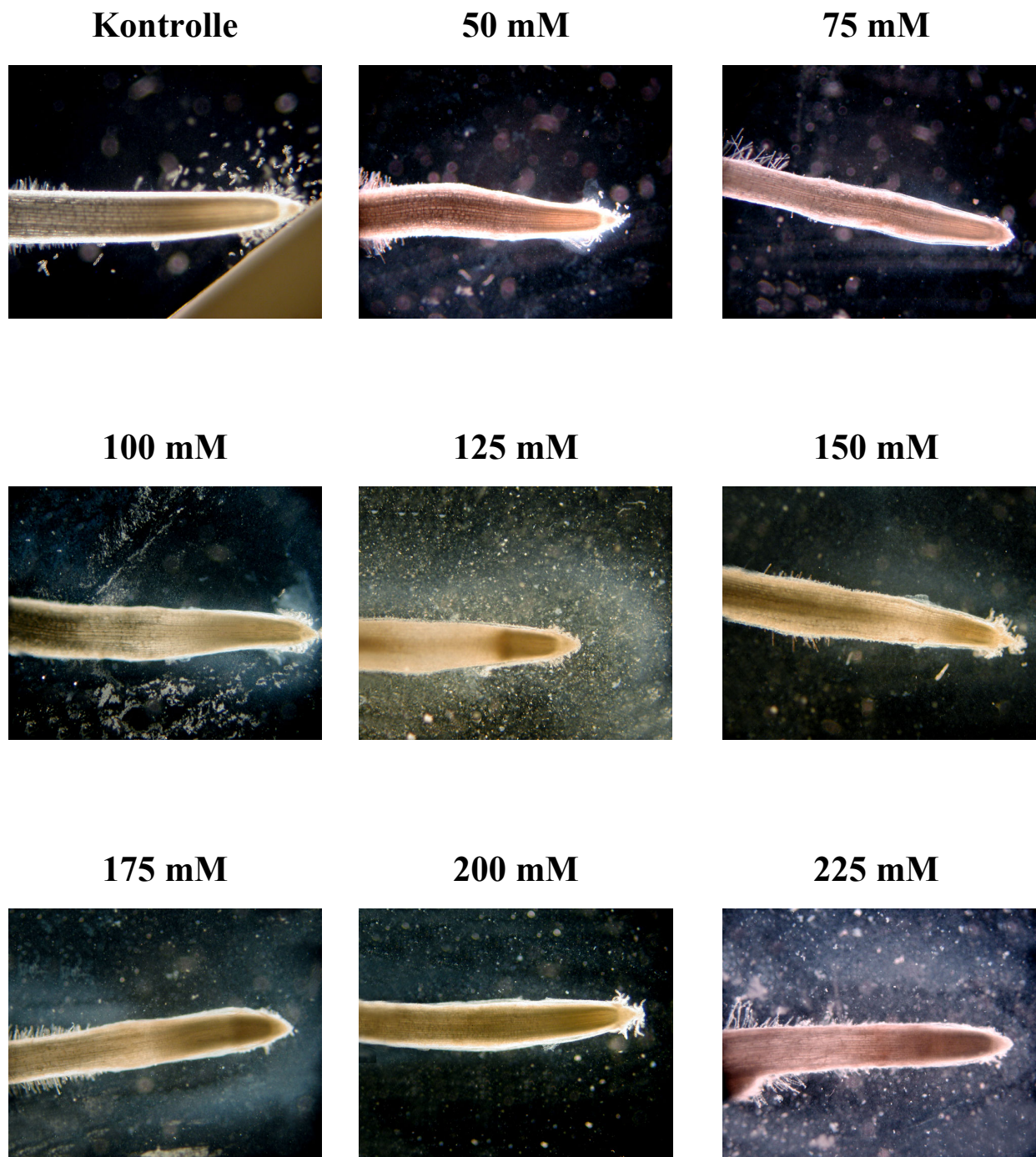


Abbildung 126: Bildtafel - Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene NaCl Konzentrationen

3.4.6. Dynamik der Vesikelbewegungen in der *clear-zone* unter Salzstress

Wie aus lichtmikroskopischen Untersuchungen bekannt, wächst das Wurzelhaar in hypotonischen Salzkonzentrationen doppelt so schnell wie in der Kontrolle. Unter diesen Bedingungen war für uns die Vesikelbewegung in der *clear-zone* von besonderem Interesse. Dazu wurden die Wurzeln in 50 mM NaCl überführt und sofort im VEC beobachtet.

3.4.6.1. Kontrolle

In der *clear-zone* der Kontrolle befinden sich ausschließlich kleine Vesikel, die sich ohne einheitliche Strömung durcheinander bewegen. Nur bei einzelnen vollziehen eine gerichtete Bewegung. Entlang der Membran docken Vesikel an, die teils mit der Membran verschmelzen und teils wieder weiterströmen (siehe CD Filmbeispiel 14).

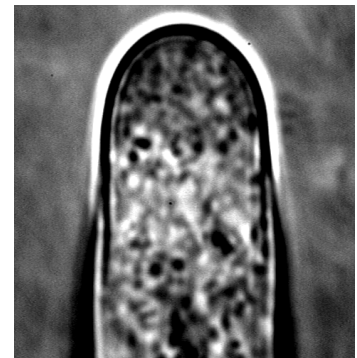


Abbildung 127: *clear-zone* in der Kontrolle

3.4.6.2. 50 mM NaCl

Sofort beim Überführen der Wurzelhaare vom Kulturmedium in eine 50 mM NaCl Lösung kommt es zu einer kurzfristigen Umstrukturierung der *clear-zone*. Es sind plötzlich auch größere Organellen wie Endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien in der Spitze zu sehen (siehe Abbildung 128 und Filmbeispiel 15). Dieser Zustand wird aber nach ein paar Minuten wieder aufgelöst und es beginnt sich die normale Vesikelorganisation zu regenerieren (siehe Abbildung 129 und Filmbeispiel 16).

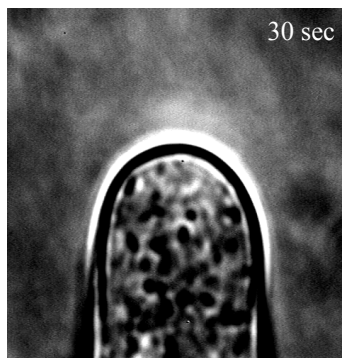


Abbildung 128: *clear-zone* in 50 mM NaCl
- nach 30 Sekunden

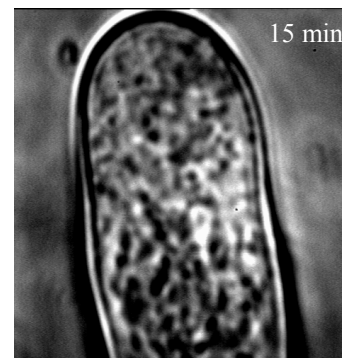


Abbildung 129: *clear-zone* in 50 mM NaCl
- nach 15 Minuten

3.4.7. veränderte Endocytose unter Einwirkung von Natriumchlorid

Zur Untersuchung der Endocytose bei Salzstress wurde eine Konzentration von 50 mM NaCl gewählt, welche zum beschleunigtem Wachstum der Wurzelhaare führt. Die Wurzeln wurden dazu für 3-4 Minuten mit 8 μ m FM1-43 in 50 mM NaCl oder Puffer gefärbt und danach in entsprechende Lösungen ohne FM1-43 überführt und im CLSM beobachtet.

Wieder zeigen sich bei der Kontrolle kleine Endocytosevesikel an der Spitze; die auch nach einiger Zeit mit der Tonoplastenmembran verschmelzen, die Verteilung der Vesikel im gesamten Wurzelhaar ist sehr gering.

Überraschenderweise zeigt sich bei 50 mM NaCl ein identes Bild wie bei der Kontrolle. Auch hier sind nur in der Spitze kleine Vesikel zu finden, die kaum im Wurzelhaar verteilt werden. Beim Platzen des Wurzelhaares nach etwa 20 bis 30 Minuten kommt es zum Eindringen des Farbstoffes in das Plasma (siehe Abbildung 132)

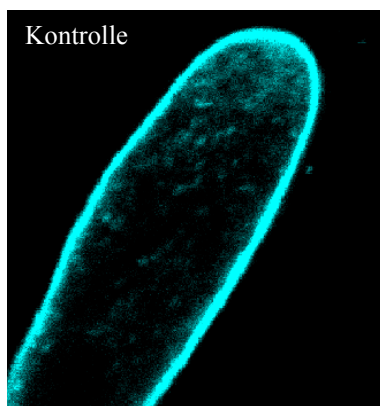


Abbildung 130: Endocytosevesikel
in der Kontrolle nach 20 Minuten

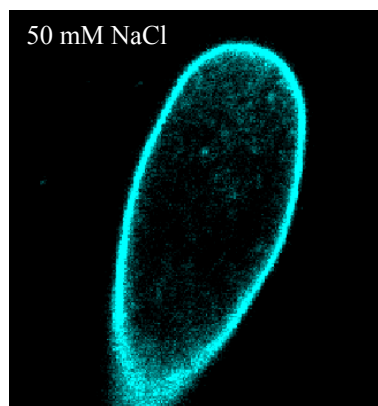


Abbildung 131: Endocytosevesikel
in 50 mM NaCl nach 20 Minuten

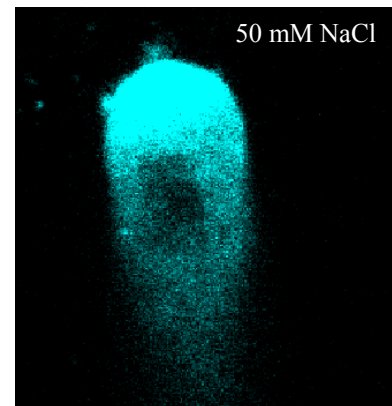


Abbildung 132: geplatzt
es Wurzelhaar mit FM1-43 im Plasma

4. DISKUSSION

4.1. KULTIVIERUNG VON *TRITICUM AESTIVUM* ZUR BEOBACHTUNG VON WURZELHAAREN

Für die lichtmikroskopische Analyse der Wurzelhaare ist es notwendig die Zellen in flüssigem Medium zu kultivieren. Es ist aber ein generelles Problem, dass Wurzeln in Wasser keine oder nur sehr wenige Wurzelhaare ausbilden (Schwarz, 1883). Diese Beobachtung wurde von uns auch für *Triticum aestivum* bestätigt. Werden Wurzelhaare in flüssigem Kulturmedium gezogen, sind die Wurzelhaare, je nach Medium, sehr unterschiedlich ausgebildet. Das liegt zum Teil am Sauerstoffgehalt der Lösung, denn es ist bekannt, dass Wurzelhaare in gut durchlüfteten Böden besser wachsen als bei Sauerstoffmangel und Staunässe. Ein zweiter wichtiger Faktor ist der pH-Wert der Kulturlösung, wie aus unseren Versuchen hervorgeht.

Unsere Kultivierungsversuche zeigen, dass das Wurzelhaarwachstum größtenteils vom pH-Wert des Mediums bestimmt wird. Hohe pH Werte über 7 behindern die Ausbildung von Wurzelhaaren am stärksten. In Medien mit einem leicht sauren pH Wert um 6 wachsen bei *T. aestivum* die meisten Wurzelhaare.

Der Grund für dieses Phänomen liegt am Beginn der *bulge*-Bildung. Dabei wird die Zellwand durch ein starkes Absenken des pH Wertes aufgeweicht. Inhibiert man diese Ansäuerung durch einen pH Puffer, so kommt es zur Hemmung der *bulge*-Bildung (Bibikova *et al.*, 1998). Verwendet man eine zu basische Kulturlösung, besteht daher die Gefahr, dass ein Absenken des pH Wertes verhindert wird und die Rhizodermiszelle sich nicht zu einem neuen Wurzelhaar strecken kann. Der optimale pH-Wert der Kulturlösung ist jedoch stark von der jeweiligen Pflanzenart beziehungsweise bei Kulturpflanzen sogar von der Sorte abhängig.

Darüber hinaus wird das Wurzelhaarwachstum noch durch die Optimierung der Samenquellung begünstigt. Bei *T. aestivum* trägt eine kühlere Quelltemperatur von 4°C zur Verbesserung der Wurzelhaarbildung bei. Ob die Quellung auf Filterpapier oder in Aqua dest. erfolgt ist für die Wurzelhaarbildung von geringer Bedeutung.

4.2. WURZELHAARE VON *TRITICUM AESTIVUM* IN DER KONTROLLE

Wurzelhaare sind Zellen mit Spitzenwachstum, die Zellstreckung und Zellwandbildung findet nur an der Spitze des Wurzelhaares statt. Von Interesse war für uns, wodurch dieses Wachstum angetrieben und wie es gesteuert wird. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Turgordruck ein wichtiger Faktor für das Spitzenwachstum ist. Es sind jedoch noch weitere Faktoren beteiligt, so etwa der Zellkern, der im Zuge des Spitzenwachstums immer weiter nach vorne wandert, oder die polare Organisation des Plasmas.

Die osmotische Situation des Wurzelhaares und der Rhizodermis

Betrachtet man die Reaktionen von Rhizodermiszellen, *bulges*, wachsenden Wurzelhaaren und ausgewachsenen Wurzelhaaren auf verschiedene Konzentrationen eines osmotischen Mediums, so erhält man sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während *bulges* und wachsende Wurzelhaare viel empfindlicher auf osmotischen Stress reagieren und daher auch schon in niedrigeren Konzentrationen plasmolysieren, sind Rhizodermiszellen und ausgewachsene Wurzelhaare bei weitem resistenter; infolge dessen kommt es erst in höheren Konzentrationen zur Plasmolyse.

Der osmotische Wert der Lösung, bei dem die ersten Zeichen von Plasmolyse auftreten, kann als ungefähre osmotischer Wert des Zellsaftes angesehen werden. Diese Methode ist generell sehr gut geeignet, um den osmotischen Wert von Zellen festzustellen. Bei Wurzelhaaren ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Plasmolyse oft erst sehr verzögert einsetzt; die Ergebnisse könnten dadurch beeinträchtigt werden.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ein unterschiedlicher osmotischer Zustand der Wurzelhaare und der Rhizodermiszellen ableiten. Bei einem in Phosphatpuffer (25 mOsm) wachsendem Wurzelhaar ist ein osmotischer Wert von 150 mOsm zu erwarten. Der tatsächliche Wert schwankt etwas von Wurzelhaar zu Wurzelhaar. Dies belegen Versuche mit 150 mOsm Mannit, bei denen Wurzelhaare gleicher Länge ein unterschiedliches Wachstum zeigen. Wurzelhaare, deren osmotischer Wert etwas über 150 mOsm liegt, haben einen Turgordruck und können daher mit normaler Geschwindigkeit wachsen. Liegt der osmotische Wert des Wurzelhaares etwas unter 150 mOsm ist kein Turgordruck und somit auch kein Wachstum vorhanden. Diese Versuche zeigen, dass der Turgordruck für das Wurzelhaarwachstum wichtig ist, und dass der osmotische Wert selbst innerhalb gleich alter Wurzelhaare leicht schwanken kann.

Wurzelhaare, die sich in der Wachstumsphase befinden, beginnen bei 200 – 250 mOsm eine dicke Zellwand in der Spitze zu bilden, also leicht zu plasmolysieren. Bei älteren und ausgewachsenen Wurzelhaaren tritt dies erst bei 300 – 350 mOsm ein. Daraus lässt sich ein Anstieg des osmotischen Wertes im Verlauf des Wachstums ableiten. Der niedrige osmotische Wert bei jungen Wurzelhaaren lässt sich möglicherweise damit erklären, dass durch den geringen Turgordruck das Platzen des Wurzelhaares mit seiner noch sehr dünner Zellwand (Sievers, 1963; Volkmann, 1984) verhindert wird.

Betrachtet man die Rhizodermis, so ist eine leichte Plasmolyse erst bei 350 mOsm zu beobachten. Es muss daher vor dem Beginn der *bulge*-Bildung der osmotische Wert in der Rhizodermiszelle abgesenkt werden, damit es beim Aufweichen der Zellwand durch Absenken des pH-Wertes (Baluška *et al.*, 2000; Gilroy and Jones, 2000) nicht zum Platzen der Zelle kommt.

Turgordruck als Motor des Spitzenwachstums

Durch Versuche mit osmotischen Medien verschiedener Konzentrationen konnte nachgewiesen werden, dass *tip-growth* bereits bei geringer Überschreitung der isotonischen Konzentration nicht mehr möglich ist. Diese Beobachtungen bestätigen die Versuche von Kropf *et al.* (1998) in welchen der Turgordruck als Motor für das Spitzenwachstum verantwortlich gemacht wird. Die Wachstumsgeschwindigkeit hingegen ist, wie im Kapitel „Anpassung an verschiedene Konzentrationen von Mannit und Polyethylenglykol“ genauer erörtert, unabhängig von der Höhe des osmotischen Wertes und des Turgordrucks. Zusätzlich zum Turgordruck der Vakuole braucht die Zelle auch eine polare Organisation des Plasmas, also Aktinfilamente, die eine *tip-zone* aus kleinen Vesikeln aufbauen und erhalten; diese Cytoarchitektur ist jedoch unabhängig vom osmotischen Wert.

Verlauf der Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit verläuft zwischen *bulge* und ausgewachsenem Wurzelhaar nicht gleichmäßig sondern kurvenförmig. Zu Beginn, bei der Bildung der *bulges*, ist die Wachstumsgeschwindigkeit des Wurzelhaares mit 0,1-0,2 $\mu\text{m}/\text{min}$ sehr gering, kurz darauf erfolgt jedoch ein rapider Anstieg auf etwa 1 $\mu\text{m}/\text{min}$. Dieser Wert stimmt auch mit Messungen von Dolan (2001) an *Arabidopsis* überein. Die Wachstumsgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ wird über längere Zeit beibehalten. Bevor das Längenwachstum vollständig zum Stillstand kommt wird die Wachstumsgeschwindigkeit langsam aber fortlaufend reduziert.

Änderung der Kernposition zur Steuerung des Spitzenwachstums

Während des Wachstums kann sich, wie von Schmiedel and Schnepf (1980) bei *Funaria* beschrieben, auch bei Weizen die Kernposition während des Wachstums verändern. Eine konkrete Korrelation mit dem Spitzenwachstum konnte aber nicht erkannt werden. So war bei verschiedenen Wurzelhaaren mit gleicher Wachstumsgeschwindigkeit eine unterschiedliche Kernposition zu beobachten. Wir bemerkten allerdings immer, dass der Kern umso näher an der Spitze liegt, je älter die Wurzelhaare sind. Daraus lässt sich ableiten, dass der Kern zum Spitzenwachstum der Wurzelhaare zwar benötigt wird, aber auf Dauer in keinem genauen Abstand zu Spitze stehen muss.

4.3. WURZELHAARE UNTER EINWIRKUNG VON OSMOTISCHEM STRESS UND SALZ

Wachsende Wurzelhaare besitzen eine polare Organisation des Cytoplasmas. Dabei kann eine Einteilung in *tip-zone*, *vacuolation-zone* und *foot-zone* vorgenommen werden. Die *tip-zone* liegt an der Spitze des Wurzelhaares und kann in zwei Bereiche unterteilt werden: ganz an der Spitze befinden sich nur kleine Vesikel, die sich ohne gerichtete Strömung bewegen und im herkömmlichen Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden können. Daher wird dieser Bereich der *tip-zone* auch *clear-zone* genannt. Dahinter liegt ein Bereich der ebenfalls zur Gänze mit Plasma gefüllt ist, in dem aber auch größere Organellen zu finden sind. Anschließend an die *tip-zone* liegt ein stark vakuolierter Bereich des Wurzelhaares, die *vacuolation-zone*. Dieser Abschnitt ist von Plasmasträngen durchzogen, in denen sich das Plasma in verkehrter Springbrunnenströmung (*reverse fountain streaming*) bewegt. An der Basis des Wurzelhaares ist die *foot-zone* zu beschreiben, welche vollständig mit Vakuole ausgefüllt ist und nur mehr einen Plasmawandbelag besitzt.

Das Wachstum der Wurzelhaare erfolgt ausschließlich an der Spitze des Wurzelhaares. Dabei verschmelzen Golgivesikel mit der Membran und geben Zellwandmaterial nach außen ab. Durch den Turgordruck erfolgt eine Dehnung der jungen Zellwand und es kommt zum Streckungswachstum des Wurzelhaares. Überschüssiges Membranmaterial, das durch Exocytose von Golgivesikeln in die Plasmamembran eingebaut wird, wird durch Endocytose von Vesikeln wieder in das Plasma zurückgenommen.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener osmotischer Medien (Glucose, Mannit und Polyethylenglycol) und Salze (Natriumchlorid und Kaliumchlorid) auf die Organisation des Plasmas analysiert. Damit konnten Rückschlüsse auf die Cytoarchitektur, die Zellwandbildung, die Zellwandhaftung des Protoplasten, die Bildung von Endocytosevesikeln sowie die Wasseraufnahme gezogen werden. Ebenso wurden Versuche gemacht, um die Anpassungsfähigkeit der Wurzel und der Wurzelhaare an osmotische und ionische Bedingungen zu testen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es durch osmotischen Stress nur zu einer sehr geringen Beeinflussung der Cytoarchitektur und der Zellwandbildung kommt. Auch bei bereits plasmolysierenden Wurzelhaaren ist die *clear-zone* erhalten und die Bildung der Zellwand wird kontinuierlich fortgesetzt. Die Plasmolyse dauert allerdings in allen Konzentrationen erstaunlich lange, was auf eine hohe Zellwandhaftung und/oder eine Reduzierung des Wassertransports durch die Membran schließen lässt. Während der Plasmolyse kann auch eine vermehrte Bildung von Endocytosevesikeln beobachtet werden, dieser Vorgang wird als „Osmocytose“ bezeichnet.

Bei Salzstress hingegen kommt es, bis zu einer isotonischen Konzentration, zu einem beschleunigten Spitzenwachstum, hervorgerufen durch einen raschen Anstieg des Turgordrucks infolge der schnellen Aufnahme von Natrium oder Kalium Ionen. In höheren Konzentrationen wird das Wachstum zwar sofort eingestellt, es kommt aber zu keiner Plasmolyse. Die Endocytose verläuft auch bei beschleunigtem Spitzenwachstum wie bei der Kontrolle.

Durch die Aufnahme von Ionen kommt es zur Störung des Ionen-Milieus im Plasma und in den Membranen, dies führt nach einiger Zeit zur Zerstörung der polaren Organisation sowie zum Platzen der Tonoplastenmembran.

Bei der Anpassung an osmotischen Stress und Salz ergeben sich große Unterschiede. In osmotischen Medien hängt die Neubildung von Wurzelhaaren stark von der Aufnahme von Zuckern ab. So sind in Glucose und Mannit Wurzelhaare bis zu einer Konzentration von 450 mOsm ausgebildet, während bei Polyethylenglycol die Wurzelhaarbildung bereits bei 250 mOsm endet. Unter Einwirkung von Natriumchlorid ist die Neubildung von Wurzelhaaren in allen Konzentrationen nicht vorhanden. Bei beiden scheinen aber die Plastizität der Zellwand und die Permeabilität der Membran die limitierenden Faktoren zu sein.

4.4. REAKTIONEN AUF DIE EINWIRKUNG VON OSMOTISCHEM STRESS

Erhalt von Strömung und polarer Organisation des Cytoplasmas

Bis zu einer Konzentration von 300 mOsm sind keine Veränderungen bei der Strömungsform, der Strömungsgeschwindigkeit sowie der polaren Organisation des Plasmas festzustellen. Erstaunlich ist die Erhaltung der Vesikel-Organisation in der *clear-zone*. Diese Zone reagiert normalerweise besonders sensibel auf Stresseinwirkung. Erste Veränderungen sind ab einer Konzentration von 350 mOsm zu erkennen; hier kommt es nach mehreren Stunden zum Abbau der Polarität und einer Verlagerung der Strömungsform von *reverse fountain streaming* zu Zirkulationsströmung. Starke und schnelle Veränderungen sind erst bei sehr hohen Konzentrationen über 600 mOsm nachzuweisen. Hier führt die starke Plasmolyse zu einer sofortigen Zerstörung des Plasmas.

Grund für die lange Erhaltung der Polarität und der Strömung könnte die Stabilität der Aktinfilamente sein. Diese sind, wie in der Einleitung erwähnt, für den Aufbau und die Erhaltung der polaren Organisation und der Strömung verantwortlich. Eine von Lang-Pauluzzi and Gunning (2000) durchgeführte Untersuchung an Zwiebelzellen zeigte eine geringe Beeinflussung der Struktur von Aktinfilamenten während der Plasmolyse. Das Verhalten der Wurzelhaare unter osmotischem Stress deutet darauf hin, dass diese Widerstandsfähigkeit der Aktinfilamente auch in Wurzelhaaren gegeben ist. Eine gewisse Schädigung der Aktinstruktur ist, wie bei Lang-Pauluzzi and Gunning (2000) erwähnt, jedoch gegeben, was den Abbau von Polarität und Strömung in den höheren Konzentrationen und nach langer Stressbelastung erklärt. Mit der zunehmenden Schädigung des Cytoskeletts wird es auch für die Vakuole möglich in den vorderen Bereich des Wurzelhaares, die *tip-zone*, vorzudringen.

Die Kernposition erscheint auch unter osmotischem Stress sehr stabil, obwohl es im Zuge der Verkleinerung des Protoplasten während der Plasmolyse auch zu einer Verlagerung des Kerns kommen kann. Besonders bei sehr starken osmotischen Lösungen kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Verlagerung des Kerns aktiv durch das Cytoskelett oder passiv durch die Verkleinerung des Protoplasten erfolgt. Bei schwach osmotischen Lösungen kann allerdings keine Änderung der Kernposition beobachtet werden, was die Meinung zulässt, dass auch Mikrotubuli, welche den Kern in Position halten (Sato *et al.*, 1995), bei geringem osmotischem Stress sehr stabil sind.

Zellwandbildung während des gesamten Plasmolyseverlaufs

In Zusammenhang mit der Erhaltung des Cytoskeletts und somit der polaren Struktur steht auch die fortwährende Bildung von neuer Zellwand. Durch den geringen osmotischen Wert der Wurzelhaare kommt es schon bei niedrigen Konzentrationen (200 – 250 mOsm), zum Zurückweichen des Protoplasten von der Zellwand an der Spitze. Infolge der stabilen Polarität des Plasmas wird die Abgabe von Zellwandmaterial an der Spitze des Protoplasten durch Golgi-Vesikel permanent fortgesetzt und neue Zellwand gebildet. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen von Schnepf *et al.* (1986) bei der Plasmolyse von *Funaria*.

In Konzentrationen bis 300 mOsm schreitet die Plasmolyse so langsam voran, dass der gesamte Plasmolysevorraum während des langsamen Zurückweichens des Protoplasten von der Zellwand mit lockerem Zellwandmaterial aufgefüllt wird. An den lateralen Zellwänden bildet sich jedoch keine zusätzliche Zellwand. In stärker osmotischen Konzentrationen kommt es aufgrund der hohen Plasmolysegeschwindigkeit nur mehr zur ringförmigen Ablagerung von neuem Zellwandmaterial. Eine kompakte Zellwand wird erst wieder nach dem Stillstand der Plasmolyse gebildet.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Schnepf *et al.* (1986) und Schröter and Sievers (1971) belegen die lockere Konsistenz des während der Plasmolyse abgelagerten Zellwandmaterials und bestätigen die vermutete Zusammensetzung aus überwiegend Pektin und Hemicellulosen. Die in dieser Arbeit positiv durchgeführten Kallosenachweise im abgelagerten Zellwandmaterial werden ebenfalls bei Schröter and Sievers (1971) durch PAS Färbung (Periodic-Acid-Schiff-Reaktion) bestätigt. Schnepf *et al.* (1986) stellten außerdem fest, dass während der Plasmolyse temporär die Zellulosesynthase-Komplexe reduziert werden. Diese befinden sich in Wurzelhaaren hauptsächlich an den Längswänden unterhalb der Spitze. In der Spitze selbst findet sich bei wachsenden Wurzelhaaren nur wenig Zellulose. Auch bei Plasmolyse ist der Anteil an Zellulose in der neu gebildeten Zellwand daher sehr gering.

Starke Zellwand – Plasmamembran Verbindungen

Durch Färbung der Plasmamembran mit FM1-43 und starker Plasmolyse kann die Ausbildung von Hecht'schen Fäden in Wurzelhaaren gezeigt werden. Diese Zellwand – Plasmamembran Verbindungen sind über die gesamte Oberfläche des Protoplasten verteilt. Erstaunlicherweise können solche Plasmafäden auch bis in die vorderste Spitze des Wurzelhaares hinein nachgewiesen werden.

Bisher wurde an der Spitze des Wurzelhaares eine Zellwand aus amorphem Material mit nur wenigen und sehr kurzen Zellulosefasern vermutet (Volkman, 1984). Die aufgezeigten Hecht'schen Fäden deuten aber darauf hin, dass an der Spitze des Wurzelhaares bereits eine stabilere Zellwand vorhanden sein muss, in der die Zellulosefasern fest verankert sind. Denn nur so ist es möglich, dass Hecht'sche Fäden auch an der Spitze des Wurzelhaares ansetzen können.

Generell ist zu sagen, dass wachsende Zellen eine höhere Wandhaftung besitzen als ausgewachsene. Diese unterschiedliche Wandhaftung wurde schon von Strüger (1934) anhand wachsender Rhizodermiszellen von *Lemna minor* beschreiben. Seine Versuche zeigen, dass sich der Protoplast von ausgewachsenen Zellen während der Plasmolyse ohne Ausbildung von Hecht'schen Fäden abkugelt, während bei wachsenden Zellen die Ausbildung von zahlreichen Hecht'schen Fäden und eine starke Wandhaftung an den Querwänden zu beobachten ist. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei wachsenden Wurzelhaaren; hier kommt es bei Plasmolyse zu einer Abhebung des Protoplasten unter Ausbildung von zahlreichen Hecht'schen Fäden vor allem im vorderen Bereich des Wurzelhaares. An den Seiten des Wurzelhaares erfolgt eine Abhebung des Protoplasten von der Zellwand nur in höheren Konzentrationen ab 350 bis 400 mOsm.

Ursache für die Entstehung und Verankerung der Hecht'schen Fäden könnte die Zellulosebildung in der Plasmamembran sein. Wurzelhaare, so wie andere wachsende Zellen auch, haben zahlreiche Zellulosesynthese-Komplexe in der Plasmamembran, aus denen Zellulosemikrofibrillen in die Zellwand hinein synthetisiert werden. Diese Komplexe könnten, wie bei Oparka *et al.* (1994) beschrieben, als Ankerpunkte für die Hecht'schen Fäden und somit auch als Grundlage für die starke Zellwandhaftung dienen.

Langsame Plasmolyse – Zellwandhaftung und Aquaporine

Bei allen Versuchen konnte beobachtet werden, dass der Plasmolysevorgang sehr lange dauert; vor allem in Konzentrationen zwischen 200 und 300 mOsm zieht sich der Protoplast nur sehr langsam zurück, vom Einsetzen der Plasmolyse bis zu deren Stillstand vergehen etwa 45 Minuten. Diese Zeit ist unabhängig von der Konzentration des Mediums. Die Stärke der Plasmolyse jedoch korreliert mit dem osmotischen Wert der Lösung; der Protoplast wird umso kleiner, je höher die Konzentration ist; die Geschwindigkeit der Plasmolyse wird damit auch schneller.

Es stellt sich die Frage, was der Grund für die langsame Plasmolyse ist. Zum einen kommt eine starke Zellwandhaftung in Frage; die zuvor genannten Hecht'schen Fäden können dabei den Protoplasten bis zu einem gewissen Grad zurückhalten. Dieser Vorgang kann sogar im VEC beobachtet werden. Hecht'sche Fäden werden auch von anderen Zellen ausgebildet, zum Beispiel der Innenepidermis von *Allium cepa* (Lang-Pauluzzi, 2000). Hier verläuft die Plasmolyse jedoch bedeutend schneller als bei den Wurzelhaaren von *Triticum*. Es muss daher noch einen anderen Faktor geben, der die Plasmolysegeschwindigkeit beeinflusst.

Es könnte die Regulierung des Wassertransports durch die Membran mittels Aquaporinen eine bedeutende Rolle spielen. Aquaporine sind spezielle Kanäle in der Plasma- oder Tonoplastenmembran, welche den Transport von Wassermolekülen fördern und regulieren (Agre *et al.*, 1995). Die Funktion dieser Kanäle kann von osmotischen Gradienten gesteuert werden (Hara-Nishimura and Maeshima, 2000). Zusätzlich sind die Aquaporine auch noch von anderen Transportern und Ionenkanälen abhängig; „Aquaporine function, dependent on osmotic gradients, is a passive element. Thus, the rate of the aquaporine-mediated water transport depends upon the other active transporters and ion channels“ (Hara-Nishimura and Maeshima, 2000). Durch diesen Funktionsmechanismus der Aquaporine lässt sich die starke Verzögerung der Plasmolyse besser erklären. Außerdem wurde von Hara-Nishimura and Maeshima (2000) nachgewiesen, dass zahlreiche Aquaporine in der Tonoplastenmembran als Plasmolyseschutz dienen können. Noch nicht bekannt ist jedoch in welcher Anzahl Aquaporine in den Membranen von Wurzelhaaren vorhanden sind und welche genaue Rolle sie beim Wassertransport spielen.

Eine interessante Beobachtung wurde im Zusammenhang mit Mannit gemacht: Der Beginn der Plasmolyse verläuft bei allen Mannit Konzentrationen langsamer als bei Glucose (siehe dazu auch Kapitel „Unterschiedliche Wirkung von Glucose und Mannit“). Grund dafür könnte die Beeinflussung des Wassertransports durch die Membran sein. Ob dies durch ein Blockieren von Aquaporinen geschieht oder die Membranpermeabilität auf andere Weise beeinflusst wird, ist noch nachzuweisen. Dass die Permeabilität durch äußere Faktoren gesteuert wird, konnten Dainty and Ginzburg (1964) mit Versuchen belegen, in denen sie durch Rohrzucker eine Verringerung der Permeabilität für Harnstoff nachwiesen. Eine Abhängigkeit der Permeabilität von der Temperatur konnte Ya-e (1968) zeigen.

Osmocytose – Verstärkte Endocytose während der Plasmolyse

Die Endocytosevesikel in der Kontrolle entstehen durch den normalen Membran Kreislauf. An der Spitze des Wurzelhaares wird durch die mit der Plasmamembran verschmelzenden Golgivesikel mehr Membranmaterial eingebaut, als für die Vergrößerung der Oberfläche benötigt wird. Um diesen Membran-Überschuss zu beseitigen erfolgt die Bildung von Endocytosevesikeln, vermutlich an der Basis des *dome* (Kropf *et al.*, 1998). Wie bei Färbeversuchen mit FM1-43 zu sehen ist, kommt es zur Verschmelzung der Endocytosevesikel mit der Tonoplastenmembran. Eine sichtbare Anhäufung von Vesikeln ist nur in der Spitze des Wurzelhaares nachzuweisen.

Infolge der Plasmolyse kommt es zu einer Verkleinerung der Membranoberfläche des Protoplasten. Der dadurch entstehende Membranüberschuss wird unter anderem durch die verstärkte Bildung von Endocytosevesikeln ausgeglichen (Oparka *et al.*, 1993). Diese verstärkte Vesikelbildung während der Plasmolyse, auch Osmocytose genannt, kann deutlich durch Färbung mit FM1-43 belegt werden. Im Unterschied zur Kontrolle sind diese Vesikel meist größer. Außerdem verbleiben sie nicht nur in der Spitze, sondern werden nach einiger Zeit mit der Plasmaströmung im gesamten Wurzelhaar verteilt; sie verschmelzen dabei ebenfalls mit der Tonoplastenmembran. Somit entspricht die Osmocytose in Wurzelhaaren in etwa der in Epidermiszellen von *Allium*, bei ihnen machten Oparka *et al.* (1990) analoge Beobachtungen.

Unterschiedliche Wirkung von Glucose und Mannit

Vergleicht man die Reaktionen auf Glucose und Mannit, so ist am Beginn der Plasmolyse eine Abweichung zu erkennen. Während in hohen Konzentrationen (300 – 450 mOsm) die Plasmolyse bei Glucose sofort einsetzt, kommt es bei Mannit zu einer leichten Verzögerung. Der Grund für diese Verzögerung kann möglicherweise, wie im Kapitel „Langsame Plasmolyse – Zellwandhaftung und Aquaporine“ erörtert, auf eine Blockade oder Störung der Aquaporine durch Mannit zurückzuführen sein. Ob und wie dieser Mechanismus funktionieren könnte ist jedoch noch unbekannt.

Weitere Unterschiede sind durch die ungleiche Aufnahmegeschwindigkeit von Glucose und Mannit begründet. Sehr deutlich ist dies anhand der Wurzelhaarneubildung in Konzentrationen bis 250 mOsm erkennbar. Bei Glucose kommt es, wahrscheinlich durch die rasche Aufnahme von Glucosemolekülen, zu einem schnellen Anstieg des Turgordrucks in der Rhizodermiszelle und damit zu einer starken Aufblähung der neu gebildeten *bulges*. Bei Mannit hingegen ist nur eine leichte Aufblähung der *bulges* zu erkennen, welche mit der bei Glucose nicht vergleichbar ist. Grund dafür könnte sein, dass Mannit von den Zellen viel langsamer oder überhaupt nicht aufgenommen wird. Eine ausführliche Diskussion über die unterschiedliche Aufnahme von Glucose und Mannit wird im Kapitel „Unterschiedliche Aufnahme von Polyethylenglykol, Mannit und Glucose“ gegeben.

Trotz der unterschiedlichen Aufnahme von Glucose und Mannit zeigen sich bei beiden Zuckern die gleichen Reaktionen auf osmotischen Stress.

4.5. UNTERSCHIEDLICHE AUFNAHME VON POLYETHYLENGLYCOL, MANNIT UND GLUCOSE

Anhand der durchgeführten Versuche kann eine unterschiedliche Aufnahme von Polyethylenglycol, Mannit und Glukose festgestellt werden. Glucose wird sehr rasch aufgenommen. Das zeigt sich in einer isotonischen Lösung von 150 mOsm bereits nach ein bis zwei Stunden. Bei Wurzelhaaren, deren osmotischer Wert knapp unter dem der Außenlösung von 150 mOsm liegt, kommt es zu keinem dauerhaften Wachstumsstopp, wie dies bei Mannit und Polyethylenglykol der Fall ist. In Glucose stoppen diese Wurzelhaare ihr Wachstum zwar kurz, können aber bald darauf ausreichend Glucosemoleküle aufnehmen und erneut einen Turgordruck aufbauen. Dieser Vorgang dauert etwa 20 Minuten, danach kommt es zu einem neuerlichen Auswachsen des Wurzelhaares knapp unter dem *dome*; an dieser Stelle ist die Zellwand offensichtlich noch plastischer als an der Spitze.

Die Aufnahme von Glucose wird auch durch die Bildung von Wurzelhaaren bis zu einer Konzentration von 450 mOsm belegt. Hohe osmotische Lösungen bewirken in der Kontrolle eine Plasmolyse der Wurzelhaare, aufgrund des somit fehlenden Turgordrucks dürfte es zu keiner weiteren Zellstreckung kommen. Unsere Versuche zeigen aber ein Wurzelhaarwachstum bis 450 mOsm, was eine Aufnahme von Glucose und somit eine Erhöhung des osmotischen Wertes voraussetzt.

Ein weiteres Beispiel für die Glucoseaufnahme stellen die in hohen Glucoselösungen neu gebildeten, kugelig aufgeblähten *bulges* dar. Durch die rasche Aufnahme von Glucose kommt es zum rapiden Anstieg des Turgordrucks in der Rhizodermiszelle. Die für die *bulge*-Bildung aufgeweichte Zellwand ist zu plastisch, um dem erhöhten Druck des Tonplasten entgegen zu wirken. Dieses Ungleichgewicht zwischen Plastizität der Zellwand und Turgordruck führt zu einer Aufblähung der *bulges*. Im Verlauf des Wachstums dürfte es zu einer Verfestigung der Zellwand an der Spitze kommen, wodurch sich wieder ein Gleichgewicht zwischen Plastizität und Turgordruck einstellt (Kropf *et al.*, 1998). Das weitere Längenwachstum erfolgt daher in gewohnter schlauchartiger Form.

Bei den ersten Versuchen mit Mannit hatte es den Anschein, dass es, wie aus der Literatur bekannt, von den Wurzelhaaren nicht aufgenommen wird. Erst ein Parallelversuch mit Polyethylenglykol machte den großen Unterschied bei der Neubildung von Wurzelhaaren in den beiden Medien deutlich.

Während bei Mannit bis 450 mOsm Wurzelhaare gebildet werden, sind bei Polyethylenglykol nur bis 150 mOsm (einer isotonischen Konzentration) Wurzelhaare nachweisbar. Die Wurzelhaarbildung in Mannit kann also darauf zurückgeführt werden, dass Mannit zwar langsam aber doch in ausreichender Menge aufgenommen wird. Polyethylenglykol hingegen kann nicht in die Zelle eindringen, wodurch Wurzelhaare nur bis zu einer isotonischen Konzentration ausgebildet sind; neue Wurzelhaare können sich aufgrund des fehlenden Turgordrucks nicht entwickeln.

4.6. ANPASSUNG AN VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN VON MANNIT UND POLYETHYLENGLYCOL

Turgordruck, Aufnahme von Zuckern und Zellwandplastizität sind für die Wurzelhaarbildung notwendig

Polyethylenglycol und Zucker zeigen sehr gegensätzliche Wirkungen auf die Wurzelhaarbildung. Polyethylenglycol als Plasmolytikum, das unter keinen Umständen von den Zellen aufgenommen werden kann, bewirkt einen totalen Ausfall der Neubildung von Wurzelhaaren über 200 mOsm. Nur bis zu einer isotonischen Konzentration von 150 mOsm ist eine annähernd normale Wurzelhaarbildung möglich. Dieses Ergebnis zeigt, dass ohne Turgordruck ein Wurzelhaarwachstum nicht möglich ist.

In Glucose und Mannit wachsen Wurzelhaare immerhin bis zu einer Konzentration von 400 mOsm, die in Wurzelhaaren der Kontrolle Plasmolyse bewirkt. Eigentlich dürfte es in plasmolytischen Konzentrationen aufgrund des fehlenden Turgordrucks zu keiner Zellstreckung kommen. Unsere Versuche belegen aber in Glucose und Mannit ein Wurzelhaarewachstum und somit eine Zellstreckung bis zu einer Konzentration von 400 mOsm.

In hypertonischen Medien kann Turgordruck nur generiert werden, wenn durch zusätzliche Osmolyte der osmotische Wert der Zellsaftvakuole erhöht wird. Dafür können Zucker entweder aus internen Speichern der Pflanze verwendet oder von der Außenlösung aufgenommen werden. Wenn interne Zuckerreserven für die Anpassung des osmotischen Wertes verbraucht werden, stehen sie laut Neumann (1995) unter Umständen nicht in ausreichender Menge für die Neubildung von Zellwand zur Verfügung; die Zellen blieben relativ klein. In unseren Versuchen war für die Wurzeln ausreichend Zucker im Medium vorhanden; es lässt sich daraus ableiten, dass Glucose und Mannit in die Rhizodermis und die Wurzelhaare aufgenommen wird. Erstaunlich ist dies vor allem bei Mannit, von dem bis jetzt angenommen wurde, dass es von Wurzeln nicht aufgenommen wird (Denes Dudits, persönliche Mitteilung).

Die Wurzel benötigt eine gewisse Zeit, um sich an die Konzentration des Außenmediums anzupassen. Es entsteht ein Wurzelabschnitt, an dem keine Wurzelhaare ausgebildet sind.

Beim Überführen der Wurzeln in eine isotonische Lösung schließt die Wurzelhaarbildung nahtlos an die vorhandene Wurzelhaarzone an. Mit steigender Konzentration des Außenmediums wird diese Wurzelhaar freie Zone immer länger.

Der Ausfall der Wurzelhaarbildung in der Adaptierungsphase wurde schon von Schröter and Sievers (1971) bei *Tradescantia* beschrieben. Dieser Abschnitt kann als Phase betrachtet werden, welche die Wurzel benötigt, um sich an die neuen osmotischen Bedingungen anzupassen. In dieser Zeit können ausreichend Zucker aufgenommen werden, um ein erneutes Wurzelhaarwachstum zu ermöglichen.

Abhängigkeit der Wurzelhaarlänge vom osmotischen Wert des Mediums

Mit ansteigender Mannit oder Glucose Konzentration sind die Wurzelhaare kürzer. Diese Abnahme der Wurzelhaarlänge verläuft annähernd linear mit der Zunahme der Außenkonzentration, was auf einen starken Zusammenhang mit dem osmotischem Wert, dem Turgordruck und vielleicht auch der Zellwandplastizität hindeutet.

osmotischer Wert:

Da in unseren Medien ausreichend Zucker vorhanden waren und auch aufgenommen wurden, konnte sich der osmotische Wert wahrscheinlich an das hypertonische Medium anpassen; die geringere Länge der Wurzelhaare in hypertonischen Medien ist wahrscheinlich nicht durch Zuckermangel bedingt.

Turgordruck:

Es könnte sein, dass hypertonischen Medien die Wasserpermeabilität von Wurzelhaaren so verändern, dass kein Turgor aufgebaut werden kann. Eine Vermutung ist, dass Aquaporine und auch andere Kanäle mit steigender Mannit Konzentration in ihrer Funktion immer stärker gestört werden. Dadurch kann für das Wachstum nicht mehr ausreichend Wasser in die Zelle aufgenommen werden und es kommt zum Wachstumsstopp.

Untersuchungen von Wu *et al.* (1998) zeigten bei *Spartania patens* unter Einwirkung von Salzstress eine Veränderung der Membranpermeabilität sowie der Membranfluidität. Diese werden durch Änderungen der Sterol- und Glycolipidmengen und -arten gesteuert. Mechanismen dieser Form könnten auch bei der Adaptierung an osmotischen Stress eine bedeutende Rolle spielen.

Struktur der Zellwand:

Es könnte auch sein, dass sich die Struktur der Zellwand verändert; die Plastizität der Zellwand könnte eingeschränkt sein (Neumann, 1995).

Welche Faktoren und welche Mechanismen tatsächlich für die Reduktion der Wurzelhaarlänge in Zuckerlösungen verantwortlich sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht festgelegt werden. Weitere Untersuchungen über die Verteilung und Funktion von Aquaporinen in Wurzelhaaren sowie detaillierte Analysen der Zuckeraufnahme könnten helfen, dieses Problem zu lösen.

Keine Beeinflussung der Cytoarchitektur durch osmotischen Stress

Unabhängig von der Art des osmotischen Mediums und der Konzentration entsprechen die neu gebildeten Wurzelhaare in Cytoarchitektur und Wachstum der Kontrolle. Ebenso können keine Veränderungen bei der Strömung und der Kernposition festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass sich das Cytoskelett auch unter osmotischem Stress normal ausbildet.

Stabile Wachstumsgeschwindigkeit

Wurzelhaare, die in unterschiedlichen Konzentrationen eines osmotischen Mediums wachsen, zeigen immer eine Wachstumsgeschwindigkeit, welche je nach Wurzelhaarlänge der Wachstumskurve der Kontrolle entspricht. Es stellt sich daraus die Frage, wie Wurzelhaare deren osmotischer Wert zwischen 150 mOsm und etwa 450 mOsm variiert, eine gleichbleibende Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen können. Die Antwort darauf liegt vermutlich in der Plastizität der Zellwand an der Wurzelhaarspitze. „Die Zellwand des *domes* muss plastisch genug sein um sich unter dem Turgordruck dehnen zu können aber gleichzeitig auch fest genug sein um nicht zu reißen“ (Kropf *et al.*, 1998).

Steigt nun der Turgordruck im Wurzelhaar bei der Kultivierung in einem höher osmotischem Medium an, so muss es zu einer Verringerung der Plastizität der Zellwand an der Spitze kommen, damit eine normale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird und die Zelle unter dem hohen Turgordruck nicht platzt. Versuche von Money (2001) mit Oomyceten belegen ebenfalls diese Abhängigkeit der Zellwandplastizität von der Höhe des Turgordrucks.

Verzögerte Plasmolyse – erhöhte Zellwandhaftung

Bei Wurzelhaaren mit erhöhtem Turgordruck haftet der Protoplast stärker an der Zellwand. Versucht man, diese Wurzelhaare zu plasmolysieren, so gelingt dies mit einem im Vergleich zur osmotischen Kulturlösung um 200 mOsm höheren Plasmolytikum erst nach 30 bis 40 Minuten. Nach dieser Zeit plasmolysiert der Protoplast dann sehr viel schneller als dass normalerweise bei Wurzelhaaren der Fall ist.

Ob diese Plasmolyseverzögerung tatsächlich durch erhöhte Wandhaftung hervorgerufen wird oder ob der Grund dafür in der Einschränkung des Wassertransportes durch die Blockade von Aquaporinen oder anderen Kanälen liegt, ist noch zu untersuchen. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre hier die Färbung von Zellulosesynthase-Komplexen im *dome* beziehungsweise der gezielte Nachweis von Zellulose in der Spitze.

Wurzellänge kaum beeinflusst

Im Gegensatz zu der starken Beeinflussung der Wurzelhaare durch osmotischen Stress ist die Gesamtlänge der Wurzel mit steigender Konzentration nur wenig reduziert, da die Wurzelzellen von vornherein schon einen höheren osmotischen Wert (350 mOsm) haben, was eine Zellstreckung auch noch in höher osmotischen Medien ermöglicht.

Über dieser isotonischen Konzentration dürfte man eigentlich kein Wurzelwachstum erwarten, weil die Zellen keinen Turgordruck mehr haben und sich daher auch nicht strecken können. In Polyethylenglycol, das von den Zellen nicht aufgenommen wird, ist das auch tatsächlich der Fall; die Wurzel wächst in hypertonischen Konzentrationen nicht. Glucose und Mannit hingegen werden von den Zellen aufgenommen, Wurzelwachstum ist daher auch in hypertonischen Konzentrationen möglich.

4.7. REAKTIONEN AUF DIE EINWIRKUNG VON SALZSTRESS

Beschleunigtes Spitzenwachstum – Erhöhter Turgordruck und Störung des Ca^{2+} Haushalts

In NaCl Konzentrationen bis 75 mM, dies entspricht einer isotonischen Konzentration von 150 mOsm, ist ein beschleunigtes Spitzenwachstum zu erkennen. Die Wachstumsgeschwindigkeit steigt innerhalb der ersten 5 Minuten von den üblichen 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ auf rund 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ an. Versuche Halperin *et al.* (2003) zeigten bei *Arabidopsis thaliana* ein starken Anstieg der Na^+ Konzentration im Wurzelhaar. Durch diese rasche Aufnahme von Na^+ Ionen kommt es zum plötzlichen Anstieg des Turgordrucks; die Zellwand und die Membranen können sich allerdings nicht schnell genug an die neuen Verhältnisse anpassen und es kommt zu einer stärkeren Dehnung der Zellwand an der Spitze. Ermöglicht wird die rasche Natriumaufnahme durch sogenannte *non-selectiv cation channels* (NSCCs) (Halperin and Lynch, 2003). Wie von ihnen auch beschrieben können diese Kanäle durch Ca^{2+} blockiert werden. Unter Einwirkung von Salzstress kommt es aber zur Verdrängung von Ca^{2+} und K^+ Ionen in den Zellen, wodurch diese Blockade außer Kraft gesetzt wird. Während des beschleunigten Wachstums können keine Veränderungen bei der polaren Organisation sowie der Strömungsgeschwindigkeit festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es zu keiner sofortigen Schädigung des Cytoskeletts kommt.

Nach 20 bis 30 Minuten kommt es zum Platzen der Tonoplastenmembran und damit zur Zerstörung des Plasmas. In manchen Fällen kann es anschließend auch zum Aufreißen des Wurzelhaares an der Spitze kommen. Als Ursachen für das Platzen der Tonoplastenmembran können zwei Punkte genannt werden. Zum einen steigt der Druck in der Vakuole durch die massive Ionenaufnahme stark an und zum anderen wird die Membranzusammensetzung durch die Verdrängung von Ca^{2+} durch Na^+ Ionen verändert (Wu *et al.*, 1998). Dazu wird im Kapitel „Anpassung an verschiedene Konzentrationen von NaCl“ näher eingegangen.

Verlust der polaren Organisation und Änderung der Strömung

In stärkern NaCl Konzentrationen, zwischen 100 und 200 mM, ist der osmotische Wert der Lösung so hoch, dass es zum sofortigen und irreversiblen Wachstumsstopp kommt. Durch die Salzeinwirkung wird die polare Organisation innerhalb von 2 Stunden bis 45 Minuten abgebaut, dabei kommt es auch zu einer Verlagerung der Strömungsform vom üblichen *reverse fountain streaming* zu einer Rotationsströmung. Vermutet wird, dass es hier zu einer langsamen Zerstörung der Aktinfilamente kommt, die für die Aufrechterhaltung der Polarität verantwortlich sind. Solange allerdings noch eine polare Organisation vorhanden ist, verläuft die Strömung in Form und Geschwindigkeit wie in der Kontrolle.

Auch die Vesikelbewegung in der *clear-zone* zeigt während dieser Zeit keine Veränderungen. Nur zu Beginn sind temporär auch größere Organellen, wie ER oder Mitochondrien, in der *clear-zone* nachzuweisen. Möglicherweise ist dies ein Effekt verringerter Plasmaviskosität. Durch das Überangebot von Na⁺ Ionen kommt es zur Verdrängung von Ca²⁺ Ionen aus dem Plasma (Halperin and Lynch, 2003), was zu einer niedrigeren Viskosität führt (Ambrose and Easty, 1970).

Als weitere Reaktion auf die Salzbelastung konnte bei allen Konzentrationen zu Beginn eine leichte Kernbewegung in Richtung Wurzelhaarspitze beobachtet werden. Diese Veränderung der Kernposition war allerdings nicht bei allen Wurzelhaaren nachzuweisen. Aus diesem Grund kann nicht mit Sicherheit festgelegt werden, ob es sich um eine echte Stressreaktion handelt.

Vergleicht man die Reaktionen der Wurzelhaare auf Salzstress mit denen auf osmotischen Stress, so kann der relativ schnelle Verlust der Polarität sowie das beschleunigte Wachstum in Salzen im Vergleich zu Zuckern, als ionischer Effekt der Salze gesehen werden, welcher offenbar wirksamer ist als deren osmotische Effekt.

Rasche Aufnahme von Natrium Ionen

Das beschleunigte Spitzenwachstum lässt uns vermuten, dass Na⁺ Ionen rasch aufgenommen werden. Wir analysierten dies indem wir Wurzelhaare, die für 30 Minuten in 50 mM NaCl, also 150 mOsm, ausgesetzt waren plasmolysierten. Der Versuch zeigte, dass bei 300 mOsm Mannit zwar ein Wachstumsstopp eintritt, aber noch keine Plasmolyse, welche in der Kontrolle zu erwarten wäre. Eine Abhebung des Protoplasten von der Zellwand konnte erst mit 500 mOsm Mannit erreicht werden.

Dies zeigt, dass es innerhalb kurzer Zeit eine massive Aufnahme von Ionen geben muss. Bestätigt wird dies auch durch Versuche von Halperin *et al.* (2003), die bei *Arabidopsis thaliana* bereits innerhalb der ersten 5 Minuten einen markanten Anstieg der Na⁺ Konzentration im Cytosol nachweisen konnten. Die Aufnahme von Natrium Ionen erfolgt, wie bereits erwähnt, über *non-selective cation channels*.

Unveränderte Endocytose bei Einwirkung von Salz

Im Zuge der Zellwandbildung an der Wurzelhaarspitze kommt es zur Verschmelzung von Golgivesikeln mit der Plasmamembran; der dabei entstehende Membranüberschuss in der Plasmamembran wird durch Endocytose von Vesikeln wieder ins Plasma zurückgenommen.

Analysiert man diesen Vorgang durch eine Membranfärbung mit FM1-43 unter Einwirkung von 50 mM NaCl, so kann keine Abweichung von der Kontrolle festgestellt werden. Verwunderlich erscheint dies, da eine Konzentration von 50 mM NaCl zu einem beschleunigtem Spitzenwachstum führt und anzunehmen wäre, dass es dabei auch zu einem höheren Membranbedarf an der Spitze kommt. Aus diesem Verhalten lässt sich ableiten, dass die Zelle in der Lage ist auch während des beschleunigten Wachstums genügend Zellwandmaterial zu produzieren und dieses durch Golgi-Vesikel an der Spitze abzugeben.

Vergleichbare Wirkung von NaCl und KCl

Beim Vergleich der Effekte die NaCl oder KCl bewirken, kann kein Unterschied festgestellt werden. Eine Abweichung tritt nur bei der Stärke der Wirkung auf, bei 50 und 75 mM KCl kommt es etwas früher zum Platzen der Tonoplastenmembran als bei gleichen Konzentrationen NaCl. Daraus kann eine schnellere Aufnahme von Kalium-Ionen abgeleitet werden. Erklären lässt sich dies durch spezielle Kanäle für Kalium-Ionen in der Membran, damit kann Kalium besonders effizient aufgenommen werden. Natrium-Ionen hingegen müssen durch unspezifische Kanäle (*non-selective cation channels*) aufgenommen werden (Halperin and Lynch, 2003). Diese Kanäle sind für Natrium-Ionen zwar sehr gut geeignet, aber eben nicht so effektiv wie die speziell angepassten Kanäle für Kalium.

4.8. ANPASSUNG AN VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN VON NaCl

Keine Wurzelhaarbildung unter Salzstress

In keiner der untersuchten NaCl Konzentrationen kann eine Ausbildung von Wurzelhaaren beobachtet werden. Eine Ausnahme bilden 50 mM NaCl, in dieser hypotonischen Lösung sind sehr vereinzelt, etwa 20 µm lange Wurzelhaare zu finden. Dieses Ergebnis wird auch in einer Arbeit von Halperin *et al.* (2003) bestätigt. Gründe für das fehlende Wurzelhaarwachstum könnten eine starke Reduktion der Zellwandplastizität, sowie die Veränderung der Membranzusammensetzung sein.

Bei Salzstress kommt es in der Membran zu einer Reduktion des Phospholipid- und Sterolgehalts, sowie zu einem Anstieg des Glycolipidgehalts. Glycolipide bewirken eine stärkere Bindung der Proteine an die Lipidköpfchen der Membran, was zu einer Membranstabilisierung führt (Wu *et al.*, 1998). Die Permeabilität der Membran wird durch Sterole, vor allem Campesterol und Sitosterol, beeinflusst. Es kommt gesamt betrachtet zwar zu einer Reduktion der Sterole, aber gleichzeitig zu einem Ansteigen von Sitosterol. Dies führt zu einer starken Reduktion der Membranpermeabilität, wodurch die Wurzelzellen genügend Wasser zurückhalten können, um den Turgordruck aufrecht zu erhalten (Wu *et al.*, 1998).

Da es trotz des somit vorhandenen Turgordrucks zu keiner Wurzelhaarbildung kommt, müssen andere Faktoren für die Unterdrückung der Wurzelhaarbildung verantwortlich sein. Neumann (1995) erklärt eine unter Salzstress generell fehlende Zellexpansion bei vorhandenem Turgordruck durch eine Reduktion der Zellwandplastizität. Er beschreibt weiters, dass eine verringerte Zellwandbildung ausreichend Zuckerreserven verfügbar macht, um den osmotischen Wert der Zelle aufrecht zu erhalten. Seine Beobachtungen zeigten unter Einwirkung von Salzstress eine Reduktion der Wurzeldicke sowie eine Abnahme der Zellexpansion. Auch in unseren Versuchen ist eine Reduktion des Wurzeldurchmessers nachzuweisen, wodurch man auch das fehlende Wurzelhaarwachstum in diesem Zusammenhang verstehen kann.

Welche Faktoren aber konkret zur Unterdrückung der Wurzelhaarbildung führen, muss erst durch vertiefende Versuche geklärt werden.

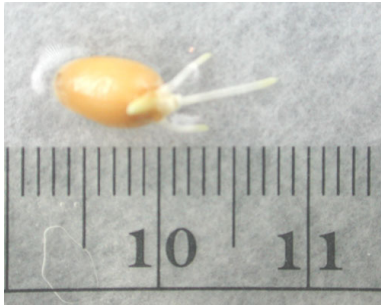
4.9. OFFENE FRAGEN

- Was passiert während der Plasmolyse mit dem Cytoskelllet? Wie stabil ist es?
- Wie ist die Anordnung von Aquaporinen in Wurzelhaaren? Was ist ihre Funktion bei der Wasserpermeabilität? Können sie durch osmotischen Stress beeinflusst werden, und wenn ja wie?
- Wie ist die Zellwand bei Wurzelhaaren aufgebaut? Kommt es zu Veränderung bei der Plastizität oder der Zusammensetzung unter Stresseinwirkung?
- Wie verändert sich die Membranzusammensetzung bei Wurzelhaaren unter osmotischem Stress oder Salzstress? Welche Auswirkungen hat dies auf das Wachstum?
- Wie funktioniert die Membranreduktion an der Spitze. Werden eigene Endocytosevesikel abgeschnürt, oder verschmelzen die Exocytosevesikel gar nicht mit der Plasmamembran und lösen sich sofort wieder ab? Entstehen bei der Plasmolyse dann separate Osmocytosevesikel?

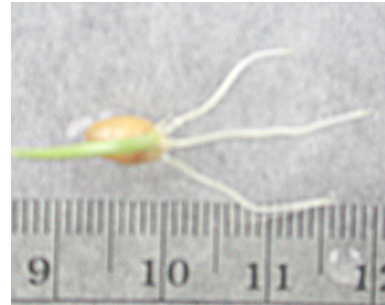
5. ANHANG

5.1. BILDTADEL – ADAPTIERUNG DER WURZEL AN VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN MANNIT

Kontrolle

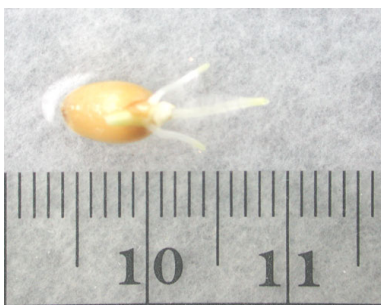


vor dem Einsetzen

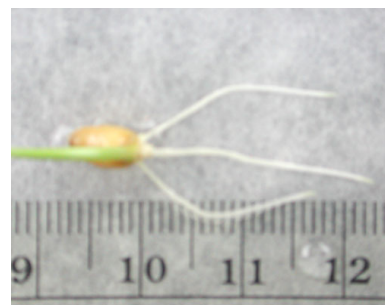


nach 30 Stunden Puffer

150 mOsm Mannit



vor dem Einsetzen

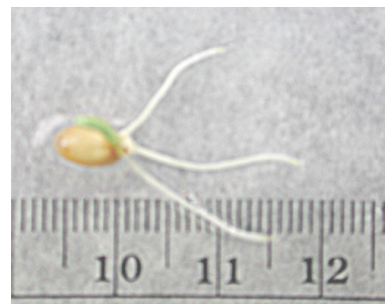


nach 30 Stunden

200 mOsm Mannit



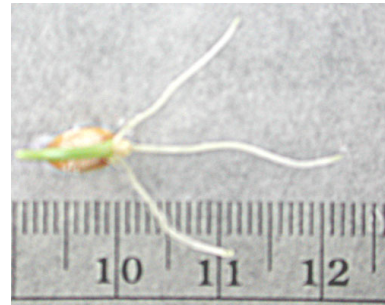
vor dem Einsetzen



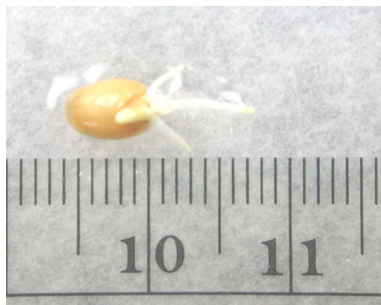
nach 30 Stunden

250 mOsm Mannit

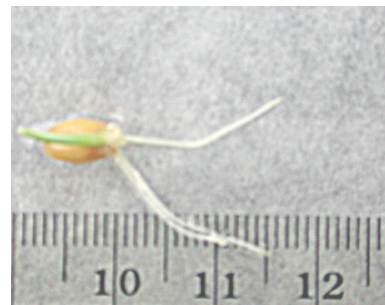
vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

300 mOsm Mannit

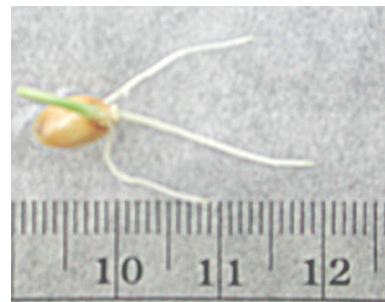
vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

350 mOsm Mannit

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

400 mOsm Mannit

vor dem Einsetzen



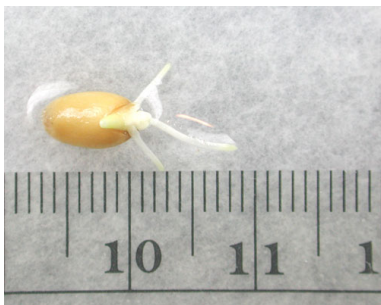
nach 30 Stunden

450 mOsm Mannit

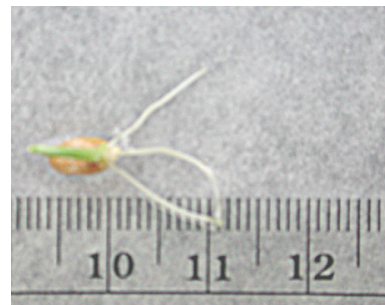
vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

500 mOsm Mannit

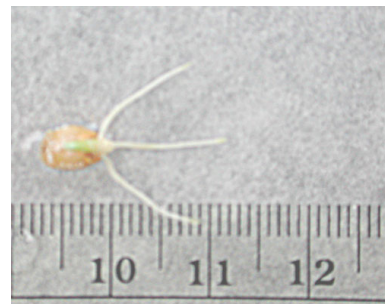
vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

550 mOsm Mannit

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

Abbildung 133: Bildtafel - Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen Mannit

5.2. BILDTAFEL – ADAPTIERUNG DER WURZEL AN VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN POLYETHYLENGLYCOL

Kontrolle



vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden Puffer

150 mOsm PEG



vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

250 mOsm PEG



vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

350 mOsm PEG

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

450 mOsm PEG

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

Abbildung 134: Bildtafel – Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen Polyethylenglycol

5.3. BILDTADEL – ADAPTIERUNG DER WURZEL AN VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN NATRIUMCHLORID

Kontrolle



vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden Puffer

50 mM NaCl



vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

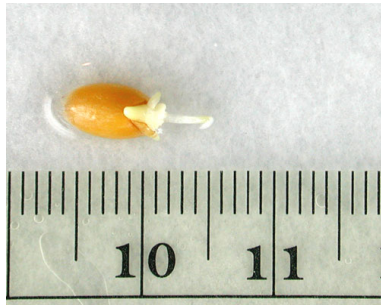
75 mM NaCl



vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

100 mM NaCl

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden Puffer

125 mM NaCl

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

150 mM NaCl

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

175 mM NaCl

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden Puffer

200 mM NaCl

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

225 mM NaCl

vor dem Einsetzen



nach 30 Stunden

Abbildung 135: Bildtafel - Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen Natriumchlorid

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>bulge</i>	17
Abbildung 2: junges Wurzelhaar.....	17
Abbildung 3: Wurzelhaarzonierung.....	19
Abbildung 4: Wurzelhaarspitze mit Aktinfilamenten.....	19
Abbildung 5: Primärwand.....	22
Abbildung 6: Sekundärwand.....	22
Abbildung 7: Zellwandstruktur bei Wurzelhaaren: schematische Darstellung von Menge und Anordnung der Zellulose - Mikrofibrillen in verschiedenen Abschnitten des Wurzelhaares.....	23
Abbildung 8: Endocytose.....	26
Abbildung 9: konvexe Plasmolyse.....	28
Abbildung 10: Band-Plasmolyse.....	28
Abbildung 11: konkave Plasmolyse.....	28
Abbildung 12: Teilprotoplasten.....	28
Abbildung 13: Hecht'sche Fäden.....	28
Abbildung 14: Quellen bei 4°C.....	33
Abbildung 15: Keimen bei 24°C.....	33
Abbildung 16: Adaptierung bei 24°C und Kammer.....	33
Abbildung 17: Strukturformel von Anilinblau.....	39
Abbildung 18: Strukturformel von FM1-43.....	39
Abbildung 19: Bildtafel - Keimungsversuche Quellung in Aqua dest. bei 24°C/4°C.....	42
Abbildung 20: Bildtafel – Keimungsversuche Quellung auf Filterpapier bei 24°C/4°C.....	43
Abbildung 21: Wurzel in H ₂ O.....	44
Abbildung 22: Wurzel in Aqua dest.....	44
Abbildung 23: Wurzel in PIPES.....	44
Abbildung 24: Wurzel in Phosphatpuffer 1:5.....	45
Abbildung 25: Wurzel in Phosphatpuffer 1:10.....	45
Abbildung 26: Bildtafel – pH Versuche / Quellen in Aqua dest. bei 24°C Adaptierung in Phosphatpuffer.....	47
Abbildung 27: Bildtafel – pH Versuche / Quellen in Aqua dest. bei 4°C Adaptierung in Phosphatpuffer.....	48
Abbildung 28: Bildtafel – pH Versuche / Quellen Filterpapier bei 24°C Adaptierung in Phosphatpuffer.....	49

Abbildung 29: Bildtafel – pH Versuche / Quellen Filterpapier bei 4°C	
Adaptierung in Phosphatpuffer	50
Abbildung 30: Zellkern in Rhizodermis.....	51
Abbildung 31: runder Zellkern.....	51
Abbildung 32: spindelförmiger ZK.....	51
Abbildung 33: Strömung im Hellfeld 20x.....	52
Abbildung 34: <i>clear-zone</i> mit Vesikeln	52
Abbildung 35: Kontrolle – <i>bulge</i>	53
Abbildung 36: Kontrolle – wachsendes Wurzelhaar.....	53
Abbildung 37: Kontrolle – ausgewachsenes Wurzelhaar	53
Abbildung 38: ausgewachsene Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i>	55
Abbildung 39: Schema der Wachstumsmessung (10 Minuten Intervalle).....	55
Abbildung 40: 100 mOsm Glucose – aufgeblähter <i>bulge</i>	57
Abbildung 41: 100 mOsm Glucose – beginnende Polarität.....	57
Abbildung 42: 100 mOsm Glucose neues Wurzelhaar	57
Abbildung 43: 150 mOsm Glucose - leicht aufgeblähter <i>bulge</i>	59
Abbildung 44: 150 mOsm Glucose - Beginn seitliches Auswachsen des Wurzelhaares.....	59
Abbildung 45: 150 mOsm Glucose - leicht aufgeblähte Wurzelhaarspitze.....	59
Abbildung 46: 150 mOsm Glucose - seitlich ausgewachsenes Wurzelhaar	59
Abbildung 47: 200 mOsm Glucose - aufgeblähte Wurzelhaarspitze.....	60
Abbildung 48: 200 mOsm Glucose - aufgeblähter <i>bulge</i>	60
Abbildung 49: 200 mOsm Glucose - verdickte Zellwand an der Spitze.....	60
Abbildung 50: Autofluoreszenz der Zellwand mit UV-Anregung (Kontrolle).....	61
Abbildung 51: Autofluoreszenz der Zellwand bei UV-Anregung (verdickte Zellwand nach Zurückweichen des Protoplasten in osmotischem Medium).....	61
Abbildung 52: neue feste Zellwand nach Rückzug des Protoplasten	61
Abbildung 53: Kallose Nachweis in der verdickten Zellwand durch Anilinblau mit UV-Anregung	61
Abbildung 54: 250mOsm Glucose - dicke Zellwand nach 15 Minuten.....	62
Abbildung 55: 250mOsm Glucose - dicke Zellwand nach 30 Minuten.....	62
Abbildung 56: 250mOsm Glucose - neues Wurzelhaar nach 4 Std.	62
Abbildung 57: 300 mOsm Glucose - Vakuole in der Spitze nach 5 Min.....	63
Abbildung 58: 300 mOsm Glucose - dicke Zellwand nach 30 Min.....	63
Abbildung 59: 300 mOsm Glucose - dicke Zellwand nach 60 Minuten.....	63
Abbildung 60: 300 mOsm Glucose - Plasmolyse nach 45 Minuten	63

Abbildung 61: 300 mOsm Glucose - <i>bulge</i> nach 5 Stunden	63
Abbildung 62: 350 mOsm Glucose - Vakuole in der Spitze nach 2 Min.....	64
Abbildung 63: 350 mOsm Glucose - Plasmolyse nach 3 Min.	64
Abbildung 64: 350 mOsm Glucose - plasmolysierter <i>bulge</i>	64
Abbildung 65: 350 mOsm Glucose - Einschnürung an der Spitze	64
Abbildung 66: 350 mOsm Glucose - Teilprotoplast	64
Abbildung 67: 350 mOsm Glucose - seitliche Plasmolyse	64
Abbildung 68: 350 mOsm Glucose - Plasmolyse nach 2 Stunden und geringe Polarität	65
Abbildung 69: 350 mOsm Glucose - plasmolysierte Rhizodermis.....	65
Abbildung 70: 350 mOsm Glucose - neuer <i>bulge</i> nach 5 Stunden	65
Abbildung 71: 400 mOsm Glucose - plasmolysierte Rhizodermis nach 5 Min.....	65
Abbildung 72: 400 mOsm Glucose - plasmolysierter <i>bulge</i> nach 5 Min.....	65
Abbildung 73: 400 mOsm Glucose - Plasmolyse nach 5 Minuten	66
Abbildung 74: 400 mOsm Glucose - Plasmolyse nach 30 Minuten	66
Abbildung 75: 400 mOsm Glucose - Plasmolyse nach 60 Minuten	66
Abbildung 76: 400 mOsm Glucose - Plasmabrocken im Plasmolysevorraum	66
Abbildung 77: 1000 mOsm Glucose - konkave Plasmolyse.....	66
Abbildung 78: 150 mOsm Mannit - Wurzelhaar nach 30 Min	70
Abbildung 79: 150 mOsm Mannit - Wurzelhaar nach 50 Min	70
Abbildung 80: 150 mOsm Mannit - aufgeblähte Wurzelhaarspitze	70
Abbildung 81: 300 mOsm Mannit - 30 Min. / leicht verdickte Zellwand	70
Abbildung 82: 300 mOsm Glucose - 30 Min. / plasmolysiertes Wurzelhaar	70
Abbildung 83: <i>clear-zone</i> in der Kontrolle	71
Abbildung 84: <i>clear-zone</i> in 300 mOsm Mannit nach 20 Minuten	71
Abbildung 85: <i>clear-zone</i> in 450 mOsm Mannit nach 20 Minuten	72
Abbildung 86: Endocytosevesikel in der Kontrolle nach 20 Minuten.....	73
Abbildung 87: Endocytose- / Osmocytosevesikel in 350 mOsm Mannit nach 20 Minuten	73
Abbildung 88: locker Zellwand an der Spitze des Wurzelhaares	74
Abbildung 89: schichtförmige Ablagerungen von Zellwandmaterial im Plasmolysevorraum.....	74
Abbildung 90: kompakte Zellwand nach Ende der Plasmolyse.....	75
Abbildung 91: kompakte Zellwand nach weiterer Plasmolyse.....	75
Abbildung 92: Hecht'sche Fäden in der Wurzelhaarspitze.....	75
Abbildung 93: Hecht'sche Fäden in der Wurzelhaarspitze.....	75
Abbildung 94: Hecht'sche Fäden im Wurzelhaar	76
Abbildung 95: Hecht'sche Fäden im Wurzelhaar mit Teilprotoplast	76

Abbildung 96: Anheftung des Protoplasten an der Zellwand	76
Abbildung 97: Anheftung des Protoplasten durch einen Hecht'schen Faden an der Zellwand (im VEC).....	76
Abbildung 98: Bildtafel – Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene Konzentrationen Mannit.....	81
Abbildung 99: neues Wurzelhaar in 150 mOsm Mannit.....	82
Abbildung 100: neues Wurzelhaar in 200 mOsm Mannit.....	82
Abbildung 101: neues Wurzelhaar in 250 mOsm Mannit.....	82
Abbildung 102: neues Wurzelhaar in 300 mOsm Mannit.....	82
Abbildung 103: neues Wurzelhaar in 300 mOsm Mannit - plasmolysiert.....	82
Abbildung 104: neues Wurzelhaar in 350 mOsm Mannit.....	83
Abbildung 105: neues Wurzelhaar in 350 mOsm Mannit - plasmolysiert.....	83
Abbildung 106: neues Wurzelhaar in 400 mOsm Mannit.....	83
Abbildung 107: neues Wurzelhaar in 400 mOsm Mannit - plasmolysiert.....	83
Abbildung 108: neues Wurzelhaar in 450 mOsm Mannit.....	83
Abbildung 109: neues Wurzelhaar in 450 mOsm Mannit - plasmolysiert.....	83
Abbildung 110: Bildtafel – Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene Konzentrationen PEG	85
Abbildung 111: 150 mOsm PEG keine Aufblähung der neuen Wurzelhaare.....	86
Abbildung 112: 150 mOsm PEG Wurzelhaar mit normaler Polarität	86
Abbildung 113: 250 mOsm PEG Wurzelhaar mit normaler Polarität	86
Abbildung 114: 350 mOsm PEG Wurzelhaar mit gestörter Polarität.....	86
Abbildung 115: 50 mM NaCl - aufgeblähte Spitze nach 10 Minuten	89
Abbildung 116: 50 mM NaCl - polare Organisation nach 20 Minuten	89
Abbildung 117: 50 mM NaCl - degeneriertes Plasma	89
Abbildung 118: 50 mM NaCl - geplatzt Wurzelhaar.....	89
Abbildung 119: 75 mM NaCl - aufgeblähtes Wurzelhaar	89
Abbildung 120: schematischer Verlauf des Polaritätsverlustes	90
Abbildung 121: 400 mM NaCl - Plasmolyse nach 3 Minuten.....	91
Abbildung 122: 400 mM NaCl - Plasmolyse nach 30 Minuten.....	91
Abbildung 123: 15 Min. Plasmolyse mit 300 mOsm Mannit nach 30 Minuten 50 mM NaCl.....	92
Abbildung 124: 30 Min. Plasmolyse mit 300 mOsm Mannit nach 30 Minuten 50 mM NaCl.....	92
Abbildung 125: 1 Min. Plasmolyse mit 500 mOsm Mannit nach 30 Minuten 50 mM NaCl.....	92
Abbildung 126: Bildtafel - Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene NaCl Konzentrationen.....	95

Abbildung 127: <i>clear-zone</i> in der Kontrolle	96
Abbildung 128: <i>clear-zone</i> in 50 mM NaCl, nach 30 Sekunden	96
Abbildung 129: <i>clear-zone</i> in 50 mM NaCl, nach 15 Minuten	96
Abbildung 130: Endocytosevesikel in der Kontrolle nach 20 Minuten	97
Abbildung 131: Endocytosevesikel in 50 mM NaCl nach 20 Minuten	97
Abbildung 132: geplatzt Wurzelhaar mit FM1-43 im Plasma.....	97
Abbildung 133: Bildtafel - Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen Mannit	125
Abbildung 134: Bildtafel - Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen PEG....	127
Abbildung 135: Bildtafel - Adaptierung der Wurzel an verschiedene Konzentrationen NaCl...	130

GRAPHIKVERZEICHNIS

Graphik 1: Wachstumsverlauf der Wurzelhaare bei <i>Triticum aestivum</i>	54
Graphik 2: Plasmolyseverlauf in ansteigender Glucosekonzentration.....	68
Graphik 3: Adaptierung der Wurzeln an verschiedene Mannit - Konzentrationen.....	77
Graphik 4: Adaptierung der Wurzeln an verschiedene PEG - Konzentrationen.....	78
Graphik 5: Vergleich des Wurzelwachstums in Mannit und Polyethylenglycol	79
Graphik 6: Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene Mannit - Konzentrationen.....	80
Graphik 7: Adaptierung der Wurzelhaare an verschiedene PEG - Konzentrationen.....	84
Graphik 8: Vergleich der Wurzelhaarbildung in Mannit und Polyethylenglycol	87
Graphik 9: Adaptierung der Wurzeln an verschiedene Natriumchlorid - Konzentrationen	93

LITERATURVERZEICHNIS

- Agre, P., D. Brown, and S. Nielsen. 1995. Aquaporin water channels: Unanswered questions and unresolved controversies. *Current Opinion in Cell Biology*. 7:472-783.
- Alt, F. 1993. Bodenversalzung. Vol. 2004.
<http://www.sonnenseite.oekoserve.net/fp/archive/RUBoden/Bodenversalzung.php>.
- Ambrose, E.J., and D.M. Easty. 1970. Zellbiologie. Thomas Nelson and Sons Ltd., Longen.
- Baluška, F.e., J. Salaj, J. Mathur, M. Braun, F. Jasper, J. Šamaj, N.-H. Chua, P.W. Barlow, and D. Volkmann. 2000. Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshwork accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology*. 227:618-632.
- Betz, W.J., F. Mao, and C.B. Smith. 1996. Imaging exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*. 6:365-371.
- Bibikova, T.N., T. Jacob, I. Dhase, and S. Gilroy. 1998. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 125:2925-2934.
- Dainty, J., and B.Z. Ginzburg. 1964. The Permeability of the cell membranes of *Nitella translucens* to urea, and the effect of high concentrations of sucrose on this permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 79:112-121.
- 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.
- Dolan, L. 2001. How and where to build a root hair. *Curr. Op. CellBiol*. 4:550-554.
- Franke, W. 1997. Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Frey-Wyssling, A. 1959. Die pflanzliche Zellwand. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

- Galway, M.E., J.W. Heckman Jr, and J.W. Schiefelbein. 1997. Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta*. 201:209-218.
- Gilroy, S., and D.L. Jones. 2000. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science*. 5:56-60.
- Halperin, S.J., S. Gilroy, and J.P. Lynch. 2003. Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 54:1269-1280.
- Halperin, S.J., and J.P. Lynch. 2003. Effects of salinity on cytosolic Na⁺ and K⁺ in root hairs of *Arabidopsis thaliana*: in vivo measurements using the fluorescent dyes SBFI and PBFI. *Journal of Experimental Botany*. 54:2035-2043.
- Hara-Nishimura, I., and M. Maeshima. 2000. Vacuolar processing enzymes and aquaporins. In *Vacuolar Compartments*. Vol. 5. D.R. Robinson and J.C. Rogers, editors. Sheffield Academic Press, Sheffield. 20-42.
- Harrison, R., and G.G. Lunt. 1977. *Biologische Membranen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Hecht, K. 1912. Studien über den Vorgang der Plasmolyse. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 11.
- Kropf, D.L., S.R. Bisgrove, and W.E. Hable. 1998. Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Curr. Op. CellBiol*. 10:117-122.
- Kutschera, L. 1960. *Wurzelatlas*. DLG-Verlags-GMBH, Frankfurt am Main.
- Lang-Pauluzzi, I. 2000. The behavior of the plasma membrane during plasmolysis: a study by UV microscopy. *Journal of Microscopy*. 198:188-198.
- Lang-Pauluzzi, I., and B.E.S. Gunning. 2000. A plasmolytic cycle: the fate of cytoskeletal elements. *Protoplasma*. 212:174-185.

- Lichtscheidl, I. 1995. An introduction to the video microscopy of plant cells: principles of modern light microscopical techniques and their application for the study of plant cells. *Wissenschaftlicher Film (Wien)*. 47:11-40.
- Lüttge, U., M. Kluge, and G. Bauer. 1988. Botanik. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Deutschland).
- Money, N.P. 2001. Functions and evolutionary origin of hyphal turgor pressure. *In Cell biology of plant and fungal tip growth*. A. Geitmann and e.a. (Eds.), editors. IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC.
- Neumann, P.M. 1995. Inhibition of root growth by salinity stress: Toxicity or an adaptive biophysical response. *In Structure and Function of Roots*. F.e. Baluška and e.a. (eds.), editors. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 299-304.
- Oparka, K.J. 1994. Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytologist*. 126:571-591.
- Oparka, K.J., D. Prior, and J. Crawford. 1994. Behavior of plasma membrane, cortical ER and plasmodesmata during plasmolysis of onion epidermal cells. *Plant Cell Environmental*. 17:163-171.
- Oparka, K.J., D. Prior, and N. Harris. 1990. Osmotic induction of fluid-phase endocytosis in onion epidermal cells. *Planta*. 180:555-561.
- Oparka, K.J., K.M. Wright, E.A. Murrant, and E.J. Allan. 1993. Fluid-phase endocytosis: Do plants need it? *Journal of Experimental Botany*. 44:247-255.
- Palta, J.P., and O.Y. Lee- Stadelmann. 1983. Vacuolated plant cells as ideal osmometers. Reversibility and limits of plasmolysis and estimation of protoplasm volume in control and water stress tolerant cells. *Plant Cell Environment*. 6:601-610.
- Raven, P.H., R.F. Evert, and S.E. Eichhorn. 2000. Biologie der Pflanzen. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

- Ruijter, N.C.A., J.J. Esseling, and A.M.C. Emons. 2001. The roles of calcium and actin cytoskeleton in regulation of root hair tip growth by rhizobial signal molecules. *In Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*. G. A. and e.a. (Eds.), editors. IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC. 55-67.
- Sato, S., Y. Ogasawara, and S. Sakuragi. 1995. The relationship between growth, nucleus migration and cytoskeleton in root hairs of radish. *In Structure and Function of Roots*. B.F.e.a. (eds.), editor. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 69-74.
- Schmiedel, G., and E. Schnepf. 1980. Polarity and growth of caulonema tip cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *Planta*. 147:405-413.
- Schnepf, E., G. Deichgräber, and M. Bopp. 1986. Groth, cell wall formation and differentiation in the protonema of the moss, *Funaria hygrometrica*: Effects of plasmolysis on the developmental programm and its expression. *Protoplasma*. 133:50-65.
- Schröter, K., and A. Sievers. 1971. Wirkung der Turgorreduktion auf den Golgi-Apparat und die Bildung der Zellwand bei Wurzelhaaren. *Protoplasma*. 72:203-211.
- Schwarz, F. 1883. Die Wurzelhaare der Pflanze. *In Untersuchungen aus dem botanischem Institut Tübingen*. W. Pfeffer, editor. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig. 135-190.
- Sievers, A. 1963. Über die Feinstruktur des Plasmas wachsender Wurzelhaare. *Zeitschrift für Naturforschung*. 18b:830-836.
- Strugger, S. 1934. Beiträge zur Physiologie des Wachstums. *Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik*. Band LXXIX:406-471.
- Tominaga, M., E. Yokota, L. Vidali, S. Sonobe, P.K. Hepler, and T. Shimmen. 2000. The role of plant villin in the organisation of the actin cytoskeleton, cytoplasmic streaming and the architecture of the transvacuolar strand in root hair cells of *Hydrocharis*. *Planta*. 210:836-843.
- Uhlenbrock, K. 2002. Aufstieg von Bodensalzen durch Kapillarwasser. Vol. 2004. <http://www.klett-verlag.de/geographie/extra>.

- Volkman, D. 1984. The plasma membrane of growing root hairs is composed of zones of local differentiation. *Planta*. 162:392-403.
- von der Ruhren, N. 2003. Infoblatt Bodendegradation. Vol. 2004. <http://www.klett-verlag.de/geographie/terra-extra>.
- Wolfe, J., M.F. Dowgert, and P.L. Steponkus. 1985. Dynamics of membrane exchange of the plasma membrane and the lysis of isolated protoplasts during rapid expansions in area. *Journal of Membrane Biology*. 86:127-138.
- Wu, J., D.M. Seliskar, and J.L. Gallagher. 1998. Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. *Physiologia Plantarum*. 102:307-317.
- Ya-e, M. 1968. Study on the deplasmolysis time in epidermal cells from leaves of *Saxifraga stolonifera*. *Memoirs of the Faculty of Education, Kumamoto University*. 16:45-55.

LEBENS LAUF

Name: Michael Volgger

Geburtsdatum: 12. März 1977

Geburtsort: Ried/Innkreis, OÖ

Studium:

Dezember 2004	Diplomprüfung
2003 - 2004	Diplomarbeit an der Abteilung für „Zellphysiologie und Wissenschaftlicher Film“
1999 - 2004	Biologie / Studienzweig Botanik an der Universität Wien
1998 – 1999	Pädagogik an der Universität Wien
1997 - 1999	Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zivildienst: 01. Oktober 1996 - 31. August 1997 beim Roten Kreuz

Schulbildung:

1996	Matura an der BHAK Ried/Innkreis
1995	Landwirtschaftliche Facharbeiterprüfung
1991 - 1996	Bundeshandelsakademie in Ried/Innkreis inkl. Ausbildung zum landwirtschaftlicher Facharbeiter
1987 - 1991	Gymnasium in Ebenau/Salzburg
1983 - 1987	Volkschule in Ried/Innkreis