

DIE WIRKUNG DER SCHWERMETALLE
KUPFER UND ZINK
AUF WURZELN UND WURZELHAARE VON
TRITICUM AESTIVUM* UND *ARABIDOPSIS
THALIANA

SOWIE

ETABLIERUNG VON NÄHRMEDIEN ZUR
KULTIVIERUNG VON WURZELHAAREN

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Magistra rer. nat.

an der

Abteilung für Zellphysiologie und Wissenschaftlichen Film

Institut für Ökologie und Naturschutz

Universität Wien

eingereicht von

Julia Strobl

2004

Betreuerin: a.o. Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
2	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	V
3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
4	EINLEITUNG.....	1
4.1	Zielsetzung.....	1
4.2	Schwermetalle	2
4.2.1	Allgemeines und Vorkommen	2
4.2.2	Wirkung der Schwermetalle auf die Pflanze	2
4.2.2.1	Schadwirkung der Schwermetalle auf die Pflanze	3
4.2.2.2	Schutzmechanismen der Pflanze	4
4.2.3	Kupfer	6
4.2.3.1	Kupfer und seine Verfügbarkeit	6
4.2.3.2	Die Wirkung des Kupfers auf die Pflanze	7
4.2.4	Zink.....	9
4.2.4.1	Zink und seine Verfügbarkeit.....	9
4.2.4.2	Die Wirkung des Zinks auf die Pflanze.....	9
4.3	Wurzel.....	11
4.3.1	Wurzel: Bau der Primärwurzel.....	11
4.3.2	Rhizodermis	13
4.4	Wurzelhaare.....	13
4.4.1	Allgemeines zu Wurzelhaaren	14
4.4.2	Funktion.....	14
4.4.3	Bildung und Wachstum.....	16
4.4.3.1	<i>Bulge</i>	16
4.4.3.2	Initiierung des Spitzenwachstums	17
4.4.3.3	Das wachsende Wurzelhaar.....	17
4.4.3.4	Das ausgewachsene Wurzelhaar.....	19

4.4.4	Cytoarchitektur des Wurzelhaares	19
4.4.4.1	Apikale Region.....	20
4.4.4.2	Subapikale Region.....	20
4.4.4.3	Wurzelhaarschlauch	20
4.4.4.4	Die Cytoarchitektur des ausgewachsenen Wurzelhaares.....	21
4.4.5	Cytoskelett	21
4.5	Zellkern.....	22
4.5.1	Aufbau und Funktion	22
4.5.2	Zellkern in Wurzelhaaren.....	22
4.6	Plasmamembran	23
4.6.1	Aufbau	23
4.6.2	Ionenfluss.....	23
4.7	Zellwand	24
4.7.1	Aufbau der Zellwand	24
4.7.2	Zellwand der Wurzel.....	26
4.7.3	Zellwand der Wurzelhaare	26
4.8	Bedeutung von Medienversuchen.....	27
5	MATERIAL UND METHODE	28
5.1	Versuchspflanzen.....	28
5.2	Keimung	29
5.3	Kammern.....	29
5.4	Färbung	31
5.4.1	Fixierung.....	31
5.4.2	Färbung der Zellkerne mit DAPI	32
5.4.3	Färbung der Zellwand	32
5.4.3.1	Färbung von Cellulose mit Calcofluor White.....	32
5.4.3.2	Färbung von Callose mit Anilinblau	34
5.4.3.3	Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung von Pektin	35
5.5	Präparation für die Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	37

5.6	Mikroskopie	38
5.6.1	Untersuchungsmethoden.....	38
5.6.2	Mikroskope	38
5.6.3	Dokumentation.....	38
5.7	Videomikroskopie	39
6	ERGEBNISSE	40
6.1	Kultivierungsversuche	40
6.1.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
6.1.1.1	Keimung	41
6.1.1.2	Wachstumsmedien.....	43
6.1.2	Kultivierung von <i>Triticum aestivum</i>	46
6.2	Schwermetallversuche	47
6.2.1	Kupferversuche bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
6.2.1.1	Kupfersulfat in Agar.....	47
6.2.1.2	Kupfersulfat in Lösung.....	51
6.2.2	Kupferversuche bei <i>Triticum aestivum</i>	61
6.2.2.1	Wirkung von Kupfersulfat auf die Keimung von <i>Triticum aestivum</i>	61
6.2.2.2	Wirkung von Kupfersulfat auf die Wurzel von <i>Triticum aestivum</i>	65
6.2.2.3	Morphologie der Wurzelspitze	70
6.2.2.4	Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i>	79
6.2.3	Zinkversuche bei <i>Triticum aestivum</i>	100
6.2.3.1	Wirkung von Zinksulfat auf die Keimung von <i>Triticum aestivum</i>	100
6.2.3.2	Wirkung von Zinksulfat auf Wurzeln von <i>Triticum aestivum</i>	104
6.2.3.3	Wirkung von Zinksulfat auf Wurzelhaare von <i>Triticum aestivum</i>	110
7	DISKUSSION	122
7.1	Kultivierungsversuche	123
7.1.1	Keimung.....	123
7.1.2	Kultivierung.....	125
7.1.2.1	Generelle Wachstumsbedingungen	125

7.1.2.2	Kulturlösungen	126
7.2	Schwermetallversuche.....	127
7.2.1	Klimaregime	127
7.2.2	Die Keimung bei <i>Triticum aestivum</i>	129
7.2.3	Wirkung der Schwermetalle auf die Wurzel	131
7.2.3.1	Wurzelwachstum	132
7.2.3.2	Wurzelspitzen	134
7.2.3.3	Rhizodermis.....	134
7.2.3.4	Infektionen.....	135
7.2.3.5	Wurzelhaarbildung	136
7.2.4	Wirkung der Schwermetalle auf die Wurzelhaare	138
7.2.4.1	Morphologie und Wachstum	138
7.2.4.2	Maximallänge und Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare	140
7.2.4.3	Pulsierendes Wachstum bei <i>Triticum aestivum</i>	142
7.2.4.4	Zellwand.....	144
7.2.5	Strömung, Plasma, Cytoskelett	146
7.2.5.1	Zellkerne.....	148
8	ZUSAMMENFASSUNG	152
9	AUSBLICK	154
10	LITERATUR.....	A
11	ANHANG.....	S
12	LEBENS LAUF.....	T

2 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Häufig anzutreffende Schwermetallgehalte (in mg/kg) an natürlichen Standorten, Horak (1996) sowie Toxizitätsgrenzbereiche für Schwermetalle in µg/g TS (Sauerbeck, 1982; Yamauchi, 1989).....	4
Tabelle 2: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Ergebnisse der Wachstumsversuche (Werte)	44
Tabelle 3: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wirkung von Kupfersulfat (in Agar) auf Wurzel und Wurzelhaare	48
Tabelle 4: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wirkung von Kupfersulfatlösungen auf Wurzel und Wurzelhaare	52
Tabelle 5: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzelhaare.....	57
Tabelle 6: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzeln.....	67
Tabelle 7: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzelhaare	81
Tabelle 8: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelhaarwachstumsgeschwindigkeiten in Kupfersulfat	84
Tabelle 9: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Zinksulfat auf Wurzeln	105
Tabelle 10: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Zinksulfat auf Wurzelhaare	112
Tabelle 11: <i>Triticum aestivum</i> : Keimung in Schwermetalllösungen.....	129
Tabelle 12: <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Triticum aestivum</i> : Wurzeln in Schwermetalllösungen	131
Tabelle 13: <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelhaare in Schwermetalllösungen	138
Tabelle 14: <i>Arabidopsis thaliana</i> : adaptierte MS-Medien (nach Gamborg (1968); Murashige und Skoog (1962))	S
Abbildung 1: Aufbau der Primärwurzel (nach Campbell (1997)).....	12
Abbildung 2: <i>Triticum aestivum</i> : REM-Darstellung von <i>bulge</i> -Region und <i>bulges</i>	16
Abbildung 3: <i>Triticum aestivum</i> : REM-Darstellung von jungen Wurzelhaaren	17

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4: Cytoarchitektur eines wachsenden Wurzelhaars	19
Abbildung 5: Aufbau der primären Zellwand.....	25
Abbildung 6: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Kammern zur Kultivierung in Lösung.....	30
Abbildung 7: <i>Triticum aestivum</i> : Küvetten und Kammern zur Kultivierung in Lösung	30
Abbildung 8: Strukturformel der Cellulose	32
Abbildung 9: Strukturformel des Pektins	35
Abbildung 10: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Erklärung zu den Wachstumsparametern	43
Abbildung 11: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Bilder der Keimwurzel in den vier MS-Medien .	44
Abbildung 12: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Ergebnisse aus den Medienversuchen	45
Abbildung 13: <i>Arabidopsis thaliana</i> : gesammelte Ergebnisse aus den Medienversuchen	45
Abbildung 14: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wurzelhaare in 10^{-5} M Kupfersulfat.....	58
Abbildung 15: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wurzelhaare in 10^{-3} M Kupfersulfat.....	59
Abbildung 16: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wurzelhaare in 10^{-2} M Kupfersulfat.....	59
Abbildung 17: <i>Arabidopsis thaliana</i> : Wurzelhaare in 10^{-1} M Kupfersulfat.....	59
Abbildung 18: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Kupfersulfat auf die Keimrate.....	62
Abbildung 19: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Kupfersulfat auf das Wachstum der Keimwurzel.....	63
Abbildung 20: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelspitze nach Keimung in Kupfersulfat	64
Abbildung 21: <i>Triticum aestivum</i> : Keimung in Kupfersulfat.....	64
Abbildung 22: <i>Triticum aestivum</i> : REM-Aufnahme der Kontrollwurzel mit <i>bulges</i> und Wurzelhaaren	65
Abbildung 23: <i>Triticum aestivum</i> : Wachstum der Wurzel in Kupfersulfat.....	69
Abbildung 24: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelspitzen in Kupfersulfat.....	70
Abbildung 25: <i>Triticum aestivum</i> : Rhizodermiszellen in Kupfersulfat.....	71
Abbildung 26: <i>Triticum aestivum</i> : Rhizodermiszellen in Kupfersulfat.....	72
Abbildung 27: <i>Triticum aestivum</i> : frisch geteilte Rhizodermiszellen in Kupfersulfat...	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 28: <i>Triticum aestivum</i> : REM- und LM-Aufnahmen der Wurzelspitze mit Spitzenzellen:.....	74
Abbildung 29: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelspitze mit Wurzelspitzenzellen	74
Abbildung 30: <i>Triticum aestivum</i> : abgeschülferte Wurzelspitzenzellen in Kupfersulfat	75
Abbildung 31: <i>Triticum aestivum</i> : Distanz der <i>bulges</i> zur Wurzelspitze in Kupfersulfat	76
Abbildung 32: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelspitze mit <i>bulge</i> - und Wurzelhaaransatz in Kupfersulfat	77
Abbildung 33: <i>Triticum aestivum</i> : Distanz der Wurzelhaare zur Wurzelspitze in Kupfersulfat	78
Abbildung 34: <i>Triticum aestivum</i> : Distanz von <i>bulges</i> in Relation zu den ersten Wurzelhaaren in Kupfersulfat.....	78
Abbildung 35: <i>Triticum aestivum</i> : REM-Aufnahme von Wurzelhaaren in Kupfersulfat	83
Abbildung 36: <i>Triticum aestivum</i> : geplatze Wurzelhaare in Kupfersulfat.....	84
Abbildung 37: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelhaarwachstumsgeschwindigkeit in Kupfersulfat	85
Abbildung 38: <i>Triticum aestivum</i> : Maximallänge neu gebildeter Wurzelhaare in Kupfersulfat	87
Abbildung 39: <i>Triticum aestivum</i> : Morphologie eines Kontrollwurzelhaares	87
Abbildung 40: <i>Triticum aestivum</i> : Morphologie von Wurzelhaaren in 10^{-5} M Kupfersulfat	88
Abbildung 41: <i>Triticum aestivum</i> : Morphologie von Wurzelhaaren in 10^{-4} M Kupfersulfat	88
Abbildung 42: <i>Triticum aestivum</i> : Morphologie von Wurzelhaaren in 10^{-3} und 10^{-2} M Kupfersulfat	88
Abbildung 43: <i>Triticum aestivum</i> : Cellulosenachweis mit Calcofluor White (CFW)....	92
Abbildung 44: <i>Triticum aestivum</i> : Callose-Nachweis mit Anilinblau.....	93
Abbildung 45: <i>Triticum aestivum</i> : Pektinnachweis mit RGII	94

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 46: <i>Triticum aestivum</i> : Position des Zellkerns in Kupfersulfat	97
Abbildung 47: <i>Triticum aestivum</i> : Zellkernform und Position in Kupfersulfat	99
Abbildung 48: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Zinksulfat auf die Keimrate.....	101
Abbildung 49: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Zinksulfat auf das Wachstum der Keimwurzel.....	102
Abbildung 50: <i>Triticum aestivum</i> : Keimung in Zinksulfat.....	103
Abbildung 51: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelwachstum in Zinksulfat	106
Abbildung 52: <i>Triticum aestivum</i> : Distanz der <i>bulges</i> von der Wurzelspitze in Zinksulfat	108
Abbildung 53: <i>Triticum aestivum</i> : Distanz der ersten Wurzelhaare von der Wurzelspitze in Zinksulfat.....	108
Abbildung 54: <i>Triticum aestivum</i> : Distanz der <i>bulges</i> und der ersten Wurzelhaare von der Wurzelspitze in Zinksulfat.....	109
Abbildung 55: <i>Triticum aestivum</i> : Wirkung von Zinksulfat auf die Morphologie der Wurzelhaare	114
Abbildung 56: <i>Triticum aestivum</i> : Maximallänge neu gebildeter Wurzelhaare in Zinksulfat	115
Abbildung 57: <i>Triticum aestivum</i> : Wurzelhaare in 10^{-3} M $ZnSO_4$	116
Abbildung 58: <i>Triticum aestivum</i> : Callose-Nachweis mit Anilinblau.....	117
Abbildung 59: <i>Triticum aestivum</i> : Position des Zellkerns in Zinksulfat	121

3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CFW:	Calcofluor White
CMF:	Zellulosemikrofibrillen
CLSM:	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
DAPI:	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ER:	Endoplasmatisches Reticulum
FB-Aktin:	Aktin-Einzelfilamente
FR:	freie Radikale
LM:	Lichtmikroskop
K:	Kontrolle, Puffer
MS-Medium:	Murashige & Skoog-Medium
PBS:	phosphatgepufferte Saline
REM:	Rasterelektronenmikroskop
RGII:	Rhamnogalacturonsäure II
ROS:	reaktiven Sauerstoffformen
SW:	Schwarzweiß
TEM:	Transmissionselektronenmikroskop
TRITC:	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
TS:	Trockensubstanz
Wuha:	Wurzelhaar
WS:	Wintersemester

4 EINLEITUNG

4.1 Zielsetzung

Schwermetalle sind für die Pflanze notwendige Mikronährstoffe, in großen Konzentrationen wirken sie jedoch toxisch. In manchen Böden ist die Konzentration an Schwermetallen natürlich oder anthropogen bedingt sehr stark. In den letzten Jahrzehnten ist die Belastung der Böden durch Schwermetalle durch menschliche Nutzung stark gestiegen und auch landwirtschaftliche Böden sind davon betroffen. Deshalb ist es sehr wichtig, die Auswirkung der Schwermetalle, speziell auch auf die landwirtschaftlich genutzten Pflanzen, zu erfassen.

Die Wurzel und besonders die Wurzelhaare sind die erste Kontaktzone für Substanzen aus dem Boden. Wir haben uns nun *Triticum aestivum* (den Sommerweizen), als wichtiges landschaftlich genutztes Getreide für die Untersuchung der negativen, aber auch der positiven Wirkung der Schwermetalle auf die Wurzel gewählt. *Arabidopsis thaliana* (die Schmalwand), das Standardobjekt der Zellbiologie und Genetik, wurde zum Vergleich herangezogen.

Besonderes Interesse galt der Beeinflussung des Wachstums von Wurzeln und Wurzelhaaren, sowie der Veränderung der Zellwand in hohen Kupferkonzentrationen.

Dabei zeigte sich, dass die Kultur der Keimlinge für die Versuche ganz wichtig ist. Die Literatur zeigt vor allem zur Aufzucht von *Arabidopsis thaliana* viele stark in ihrem Angebot an Makro- und Mikronährstoffen und im pH-Wert differierende Medien auf. Diese Parameter haben einen Einfluss auf das Wachstum der Wurzel und Wurzelhaare.

Wir probierten daher unterschiedliche Keim- und Kultivierungslösungen, sowie verschiedene Substrate, um optimale Bedingungen für Keimung der Samen und das Wachstum der Keimlinge zu erreichen.

4.2 Schwermetalle

4.2.1 Allgemeines und Vorkommen

Schwermetalle sind laut physikalischer Definition Metalle mit einer Dichte über 5 g pro cm^3 (Holleman and Wiberg, 1985). Dazu gehören etwa 40 Elemente (Zenk, 1996). Davon sind die Schwermetalle Zink, Blei, Quecksilber, Kupfer, Cadmium, Nickel, Molybdän, Thallium, Chrom und Kobalt umweltrelevant. Arsen als Halbmetall wird in manchen Einteilungen ebenfalls dazugezählt. Normalerweise liegen Schwermetalle im Boden in sehr geringen Konzentrationen vor.

Erhöhte Schwermetallgehalte finden sich in Böden auf Grund von natürlichem Vorkommen und durch anthropogenene Einträge. Diese können Rückstände von Erzaufbereitung oder auf industriellen Altstandorten sein. Häufig stammen sie aber auch aus Klärschlämmen, Abfällen oder werden durch Verkehr, Industrie und Hausbrand in den Boden eingetragen (Horak, 1996).

Problematisch ist dabei, dass die Schwermetalle im Boden akkumuliert werden und dort auf unbestimmte Zeit bleiben (Taiz and Zeiger, 2000).

4.2.2 Wirkung der Schwermetalle auf die Pflanze

Zink, Kupfer, Mangan, Molybden und Nickel sind für die Pflanze essentielle Mikroelemente, ohne sie kann die Pflanze nicht ihren kompletten Lebenszyklus durchlaufen. Weiters sind Kobalt und Vanadium wachstumsförderlich. Andere Schwermetalle wie Blei, Cadmium, Chrom, und Quecksilber gelten bis heute als nicht essentiell (Bollard, 1983; Foy et al., 1978; Marschner, 1995; Woolhouse, 1983).

Die oben genannten Mikroelemente sind Bestandteil organischer Strukturen, dienen der Übertragung elektrischer Ladungen, sind integrale Proteinbestandteile, aktivieren Enzyme und haben eine wichtige Funktion in der Osmoregulation.

Die Mikroelemente sind in der Regel im Boden nur schwach konzentriert. Um nun eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten, besitzt die Pflanze aktive Transportmechanismen zu deren Aufnahme aus der Bodenlösung; die Mikroelemente werden

dabei gegenüber der Außenlösung akkumuliert (Fitter and Hay, 1987). Nach der Aufnahme müssen die Nährstoffe in eine physiologisch tolerierbare und verwertbare Form gebracht werden. Die Pflanze kann in der Regel die Aufnahme nicht regulieren, im Überschuss aufgenommene Ionen müssen daher in metabolisch inaktive Form gebracht werden (Zenk, 1996).

Bei extremem Überangebot in der Bodenlösung wird die unangepasste Pflanze nun von Schwermetall-Ionen förmlich überschwemmt, kann sie diese nicht inaktivieren, werden die Zellen und damit die Pflanze geschädigt oder getötet.

Manche, an erhöhte Schwermetallkonzentrationen im Boden angepasste Pflanzen können mit Hilfe von energieaufwendigen Prozessen die Schwermetalle entgiften oder ihre Aufnahme einschränken. Dieser Energieaufwand macht sich allerdings durch eine Wachstumsdepression und Produktionseinbuße bemerkbar („Nanismus“).

4.2.2.1 Schadwirkung der Schwermetalle auf die Pflanze

Die toxische Wirkung von Schwermetallen wird von Fodor (2002) in 5 Phasen eingeteilt.

Zur ersten gehören Interaktionen mit den Komponenten des Boden oder der Lösung, sowie in der Zellwand und der Plasmamembran. Durch die Bindung an die Zellwand und an Chelate wird die Aufnahme anderer Nährstoffe vermindert. In der Zellwand werden reaktive Sauerstoffarten gebildet (Stroinski, 1999), die die Elektronentransportkette und die Membranproteine und Lipide stören.

In der zweiten Phase wirken die Schwermetalle im Symplasten. Sie binden an Moleküle oder verdrängen essentielle Kationen im Cytoplasma und in den Zellorganellen (Stroinski, 1999). Dadurch inhibieren sie den Stoffwechsel und regulatorische Prozesse.

In der dritten Phase sind Transportprozesse sowie Stoffwechsel und Gleichgewichtszustände betroffen. Durch verringerte Saugkraft der Pflanze und verschlechterte hydraulische Leitung (Cseh et al., 2000) nimmt die Transpiration (Barceló and Poschenrieder, 1990) und damit die Mineralstoffaufnahme ab. Die Atmung und die Photosynthese sind durch gestörte Proteinsynthese, zerstörte Enzyme und Zerstörung des Photosynthetischen Apparats verringert. Zellteilung und Zelllängenwachstum sind inhibiert (Eun et al., 2000; Wozny and Jerczynska, 1991).

Die vierte Phase ist jene in der sichtbare Symptome wie Wachstumsdepression oder Chlorose auftreten, die fünfte Phase ist der Tod der Pflanze.

Element	Gehalt im Boden (in mg/kg)	Gehalt in Pflanzen (in mg/kg)	toxische Konzentration (in µg/g TS)
Eisen (Fe)	10000-50000	50-200	500
Vanadium (V)	30-150	0,2-1	nicht bekannt
Zink (Zn)	20-100	20-100 (60)	150-200
Nickel (Ni)	10-50 (20-60)	0,2-2	20-30
Chrom (Cr)	10-50	0,1-0,5	1-2
Kupfer (Cu)	10-40 (50)	3-12	15-20
Blei (Pb)	10-30	0,1-0,5	10-20
Kobalt (Co)	2-10	0,02-0,5	10-20
Arsen (As)	1-10	0,1-0,5	nicht bekannt
Molybdän (Mo)	0,5-2	0,1-4	nicht bekannt
Cadmium (Cd)	0,05-1	0,05-0,5	5-10
Quecksilber (Hg)	0,05-0,5	0,010-0,05	0,5-1
Thallium (Tl)	0,02-0,5	<0,005-0,05	20-30

Tabelle 1: Häufig anzutreffende Schwermetallgehalte (in mg/kg) an natürlichen Standorten, Horak (1996) sowie Toxizitätsgrenzbereiche für Schwermetalle in µg/g TS (Sauerbeck, 1982; Yamauchi, 1989)

4.2.2.2 Schutzmechanismen der Pflanze

Pflanzen können im Allgemeinen höhere Schwermetallkonzentrationen als Tiere tolerieren (Kartusch, 2003). Ab einer gewissen, vom jeweiligen Schwermetall und der Pflanze abhängigen Konzentration wird allerdings die Toxizitätsschwelle überschritten. Die Pflanze kann die Ionen nicht rasch genug inaktivieren, sie greifen in den Stoffwechsel ein, die toxische Wirkung des Schwermetalls kommt zum Tragen:

Die Ionen verursachen die Bildung freier Radikalen (FR) und reaktiver Sauerstoffformen (ROS). ROSs und FR binden an SH-Gruppen und zerstören dadurch Membranen, Enzyme und die DNA (Dietz et al., 1999; Gwózdź et al., 2004). Die Schwermetall-Ionen verdrängen außerdem andere Metalle aus Organo-Metallkomplexen und es erfolgt auch Wechselwirkung mit Nährstoffen.

In Folge dessen treten optisch sichtbare Schadsymptome auf und schließlich kann es zum Tod der Zellen beziehungsweise der Pflanze kommen.

Nun haben die Pflanzen verschiedene Mechanismen entwickelt, sich auf schwermetallreichen Böden gegen die toxische Wirkung von Schwermetallen zu schützen (Kartusch, 2003). Diese Möglichkeiten werden unterschiedlich zusammengefasst und beschrieben.

➤ Nach Ernst et al. (1983) gibt es zwei verschiedene Strategien:

- Manche Pflanzen schützen sich durch „**Vermeidung**“, das heißt, die Aufnahme der Schwermetalle in die Zellen wird verhindert.

Dabei zeigt Horak (2001) folgende Mechanismen auf:

Ausschlussmechanismen (Vermeidungsstrategien):

- Ausscheidung von chelatbildende Liganden
 - Bildung einer Redoxbarriere
 - Ausbildung eines pH-Gradienten in der Rhizosphäre
 - Festlegung von Metallen in der Zellwand
 - Einschränkung der Schwermetallaufnahme durch Ektomykorrhiza
-
- Andere Pflanzen sind Schwermetallen gegenüber tolerant, man spricht von „**Toleranz**“. Sie verhindern durch spezielle Mechanismen die Schädigung empfindlicher Kompartimente durch Schwermetalle. Schwermetalle werden aufgenommen und anschließend entgiftet.

Toleranzmechanismen (Horak, 1993; Kartusch, 2003):

Die Pflanzen schützen sich vor der toxischen Wirkung durch Ionensequestering-mechanismen, organische Säuren als Chelatbildner, Bindung an Thiometalle oder an Zellwandbestandteile (Kartusch, 2003).

- In der Wurzel erfolgt dies durch intrazelluläre Kompartimentierung und die Bindung der Schwermetalle an Polypeptide, Metallothioneine und Phytochelatine.
- Auch eine Akkumulation im Spross, vor allem aber in Blättern kommt häufig vor.

➤ Eine andere Einteilung bietet Baker (1981; 1987) nach dem Schwermetallgehalt der Pflanze gegenüber dem umgebenden Boden:

Ist der Gehalt der Pflanze geringer, nennt er sie Excluder, ist er höher, bezeichnet er sie als Akkumulatoren oder Hyperakkumulatoren (Baker and Brooks, 1989).

4.2.3 Kupfer

4.2.3.1 Kupfer und seine Verfügbarkeit

Kupfer ist ein Metall, das meist zweiwertig, in Redoxsystemen ($Cu^{2+} + e^{-} \leftrightarrow Cu^{+}$) allerdings auch einwertig, auftritt.

Kupfer wird durch Erzgewinnung und – verarbeitung, Klärschlämme und industrielle Abwässer, Kompost sowie Schweine- und Rindergülle in den Boden eingebracht (Taiz and Zeiger, 2000). Darüber hinaus ist es in vielen Pestiziden enthalten, beispielsweise werden *Bordeaux mixture* und *Copperoxychlorid* als Fungizide (Pimentel and Marques, 1969) und Kupfersalze als Insektizide eingesetzt.

Kupfer ist in Ökosystemen mäßig mobil, da es zur Komplexbildung neigt. Bis zu 98% des Kupfers bilden in der Bodenlösung Komplexe mit organischen Bestandteilen und Bodenkolloiden und sind damit nicht für die Pflanzen zugänglich (Burton et al., 1983; Fox and Guerinot, 1998; Marschner, 1995; Sanders et al., 1986). In unbelasteten Böden

liegt der Kupfergehalt in unbelasteten Böden zwischen 10^{-4} und 10^{-9} M, aber nur ein geringer Anteil davon ist für die Pflanzen verfügbar (Rehm and Schmitt, 1996). Horak und Rebler (1982) sprechen von durchschnittlichen $3,6 \cdot 10^{-6}$ M verfügbarem Cu^{2+} .

Die Verfügbarkeit hängt von der Struktur des Bodens und des pH-Wert ab: je feiner der Boden strukturiert ist und je niedriger der pH-Wert ist, desto höher ist die Kupferverfügbarkeit (Baker and Senft, 1995; Rehm and Schmitt, 1996; Robinson and Reute, 1981).

4.2.3.2 Die Wirkung des Kupfers auf die Pflanze

Kupfer wird in erster Linie in Form von Ionen aufgenommen (Marschner, 1995). In nichtionischer Form wird es meist an stickstoffhaltige Gruppen der Zellwandproteine gebunden (Cutsem and Gillet, 1982; Harrison et al., 1999).

4.2.3.2.1 Kupfer als Mikroelement

Kupfer ist aufgrund seiner oxidativ-reduktiven Wirkungsweise ein wichtiger Bestandteil von Redoxenzymen und ist ein struktureller und katalytischer Cofaktor (Evans and Sorger, 1966).

Es ist Bestandteil von Schlüsselenzymen in vielen biologischen Prozessen, zum Beispiel bei der Atmung (Cytochrom-Oxidase und Ascorbat-Oxidase (Shorrocks and Alloway, 1985), der Photosynthese (Plastocyanin, ATP-Synthase und Sauerstofftransport (Harrison et al., 1999)), der Ligninbildung (Phenol-Oxidase), dem Phenolstoffwechsel (Phenolase), und der Proteinsynthese. Es ist auch in Enzymen, die der Entgiftung von Radikalen dienen (Superoxid-Dismutase), enthalten (Shorrocks and Alloway, 1985).

Außerdem initiiert Kupfer Blütenbildung (Graves and Sutcliffe, 1974; Hillman, 1961; Hillman, 1964), hat eine wichtige Rolle bei der Produktion und Ausbildung von Samenkörnern und bei der Bildung von Chlorophyll (Rehm and Schmitt, 1996), verhindert die Bildung und den Transport von Auxin (Bould et al., 1983) und katalysiert die Synthese von Pigmenten (Shkolnik, 1984).

Die Anwesenheit von Kupfer erhöht außerdem die Resistenz gegen Pilzinfektionen.

Bei Kupfermangel erfolgt eine Akkumulation von Phenolen durch den Mangel an Phenolasen, der Gehalt der löslichen Kohlenhydrate sinkt durch Hemmung der Photosynthese, da einige dafür notwendige Enzyme fehlen. Die Ligninbildung ist

gestört, was zu starken anatomischen Veränderungen und zu Welkeerscheinungen führt, da die Zellwände der Xylemgefäße zu wenig lignifiziert sind. Kümmerwuchs („Nanismus“) tritt auf Grund genereller schwacher Lignifizierung der Zellwände auf. Weiteres verhindert Kupfermangel die Bildung von neuem Gewebe und verlangsamt die Seneszenz (Agarwal et al., 1987; Marschner, 1995).

Auch die Pollenbildung und ihre Fertilität sind eingeschränkt. Junge Blätter sind chlorotisch, alte sterben ab.

Der kritische Mangelbereich von Kupfer liegt bei 3-5 mg pro kg Trockensubstanz.

4.2.3.2.2 Kupfer als Schadstoff

Kupfer ist ein für die Pflanze stark toxisches Element. Auf Grund seiner geringen Mobilität wird es vor allem in der Wurzel akkumuliert. Diese stellt die erste funktionelle Barriere für Kupferionen dar (Berglund et al., 2000).

Bei hohen Konzentrationen hat es auf viele physiologische Prozesse der photosynthetischen Gewebe eine schädigende Wirkung (Sgherri et al., 2002). Die Schädwirkung ist vor allem auf durch Kupfer erzeugte aktivierte Sauerstoffverbindungen wie Superoxide, Peroxide oder Hydroxylradikale zurückzuführen (Sgherri et al., 2002).

Kupfertoxizität bei nichttoleranten Pflanzen wird mit einer Störung der Mitose in Verbindung gebracht (Fiskesjö, 1988; Jiang et al., 2000), es kommt zur Inhibierung der Wurzelelongation, zur Schädigung der Rhizodermis und der Wurzelzellmembranen (Ouzounidou et al., 1995; Wainwright and Wolhouse, 1977, 1977).

Auf zellulärem Niveau bemerkt man eine Schädigung der Organellen und eine Inhibierung der metabolischen Aktivität. Das führt wiederum zu Wachstumsdepression (Berglund et al., 2000).

4.2.4 Zink

4.2.4.1 Zink und seine Verfügbarkeit

Zink kommt ausschließlich in zweiwertiger Form vor und ist daher (anders als Kupfer) kein Redoxelement. Zink bildet tetraedrische koordinierte Komplexe mit N-, O- und S-haltigen Liganden. Diese können löslicher (gebunden an Amino-, Organo- und Fulvosäuren) oder unlöslicher Natur (gebunden an Huminsäuren) sein (Hock, 1995).

Zink ist in ökologischen Kreisläufen relativ mobil und wird diffus verbreitet. Laut Horak und Rebler (1982) sind in der Bodenlösung eines durchschnittlichen Bodens 50 µg pro Liter oder $3,6 \cdot 10^{-6}$ M Zink gelöst. Die Verfügbarkeit des Zinks nimmt mit steigendem Boden-pH ab. Hohe Konzentrationen von Calcium oder Phosphor senken ebenfalls die Verfügbarkeit.

Anthropogener Eintrag in den Boden erfolgt aus der Schweine- und Rindermast, aus Erzgewinnung und -verarbeitung, aus Siedlungsabfällen (Klärschlämme und Kompost), Reifenabrieb und Verbrennungsprozessen (Holz, fossile Abfälle) sowie verzinkten Stahlkonstruktionen und kommunalem Regenwasser (verzinkte Dachrinnen) (Horak, 2001).

4.2.4.2 Die Wirkung des Zinks auf die Pflanze

4.2.4.2.1 Zink als Mikroelement

Zink wird als Zn^{2+} oder $ZnOH^+$ von der Pflanze aufgenommen (Hock, 1995).

Es wird von mehr als 200 Enzymen auf Grund seiner katalytisch-cokatalytischen, strukturellen und regulierenden Funktion benötigt und ist daher ein sehr essentieller Mikronährstoff. Es spielt eine wichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel, im Auxin- und im RNA-DNA-Stoffwechsel, bei der Lipid- und bei der Proteinsynthese und in der Zellteilung (Marschner, 1995; Pahlsson, 1989).

Wichtige Zinkenzyme sind die Carboanhydrase, die Superoxid-Dismutase, Phospholipase, Carboxypeptidase, alkalische Phosphatasen, Transphosphorylasen, Isomerasen,

Aldolasen, Polymerasen und Dehydrogenasen (zum Beispiel die Alkoholdehydrogenase).

Zinkmangel liegt laut Horak (2001) bei weniger als 15-20 mg pro kg Trockensubstanz vor und führt auf Grund des P-Zn-Antagonismus im Boden zu einem Phosphorüberschuss. Häufig ist er mit Fe-Mangel assoziiert.

Mangel macht sich durch Verkürzung der Internodien, Kleinblättrigkeit durch den Auxinmangel, Chlorosen und Blattrandnekrosen auf Grund des Phosphatüberschusses (Taiz and Zeiger, 2000) bemerkbar.

4.2.4.2 Zink als Schadstoff

Zink ist ein stark phytotoxisches Element. Es ist innerhalb der Pflanze nur wenig mobil, weshalb auch die stärkste Anreicherung in der Wurzel und in der Sprossachse erfolgt (Hock, 1995). Wird es in zu großer Menge akkumuliert, hat es inhibierende Effekte auf die Photosynthese (da es die CO₂-Fixierung und die Elektronentransportkette behindert) (Assche and Clijsters, 1986), die Biosynthese von Chlorophyll (Doncheva et al., 2001) und auf die Membranfestigkeit (Vos et al., 1991). Ein Überangebot an Zink kann sich auch negativ auf die Mineralstoffversorgung auswirken, da es andere Nährstoffe verdrängt (Chaoui et al., 1997). Bei *Phaseolus vulgaris* L. wurde beispielsweise Ertragsverminderung, Senkung des Gewebewassergehalts und eine Abnahme des Proteingehalts festgestellt (Chaoui et al., 1995).

Die toxische Konzentration von Zink variiert stark von 64 bis 2000 µg / Liter (Ohki, 1984).

4.3 Wurzel

Wurzeln dienen der Verankerung der Pflanze im Boden und der Aufnahme und Weiterleitung von Wasser und Nährstoffen. Weiters speichern sie organische Depotstoffe.

Die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen erfolgt vor allem im Bereich der Wurzelspitze, wo die Wurzel wasserdurchlässig ist, da noch keine Endodermis ausgebildet ist, vor allem aber über die Wurzelhaare. Weiters können Mykorrhizzapilze die Absorption erhöhen (Campbell, 1997).

4.3.1 Wurzel: Bau der Primärwurzel

Die Wurzel teilt sich in mehrere ineinander übergehende Zonen:

Die Wurzelspitze ist von der fingerhutartigen **Kalyptra** aus Parenchymzellen bedeckt, die dazu dient, das **Apikalmeristem** der Wurzel vor mechanischer Schädigung durch Bodenpartikel zu schützen, während die Wurzel wächst und sich im Boden vorschiebt. Die Zellen geben Polysaccharide ab, die das Gleiten der Wurzelspitze erleichtern.

Das Längenwachstum der Wurzel erfolgt nahe der Wurzelspitze in den drei ineinander übergehenden Zonen des Primärwachstums. Die der Wurzelspitze am nächsten liegende Zone ist die Teilungszone, es folgen die Streckungszone und die Differenzierungszone.

In der **Teilungszone** befinden sich das Apikalmeristem und die aus diesem gebildeten primären Meristeme Protoderm, Procambium und Grundmeristem, aus denen sich später die Rhizodermis, die Stele und der Cortex der Wurzel entwickeln.

In der Mitte des Apikalmeristems sitzt das ruhende Zentrum, eine sich sehr langsam teilende Zellpopulation, welche wahrscheinlich als Reserve für den Fall einer Schädigung des Meristems dient.

Die **Streckungszone** ist der Bereich, der für das eigentliche Längenwachstum der Wurzel verantwortlich ist, da sich hier die Zellen bis zum zehnfachen ihrer Ausgangslänge dehnen. Bereits in dieser Zone werden Wurzelhaare gebildet.

In der **Differenzierungszone** beginnen die Zellen, noch bevor die Streckung beendet ist, ihre Spezialisierung in Struktur und Funktion. Hier bilden sich die Rhizodermis, die Stele und der Cortex aus. Die innerste Schicht des Cortex ist die Endodermis, ein durch Zellwandverstärkungen hydrophober Ring. Die Zellwandverstärkungen werden als Casparische Streifen bezeichnet und bestehen aus Suberin, Lignin und anderen inkrustierenden Substanzen. Diese Differenzierungszone ist weiters die Hauptzone der Wurzelhaare.

Im **ausdifferenzierten Bereich** der Wurzel werden laterale Seitenwurzeln aus dem Perizykel, einer meristematischen Zellschicht an der Innenseite der Endodermis, gebildet. Die laterale Wurzel durchstößt zuerst den Cortex und dann die Primärwurzel (Campbell, 1997).

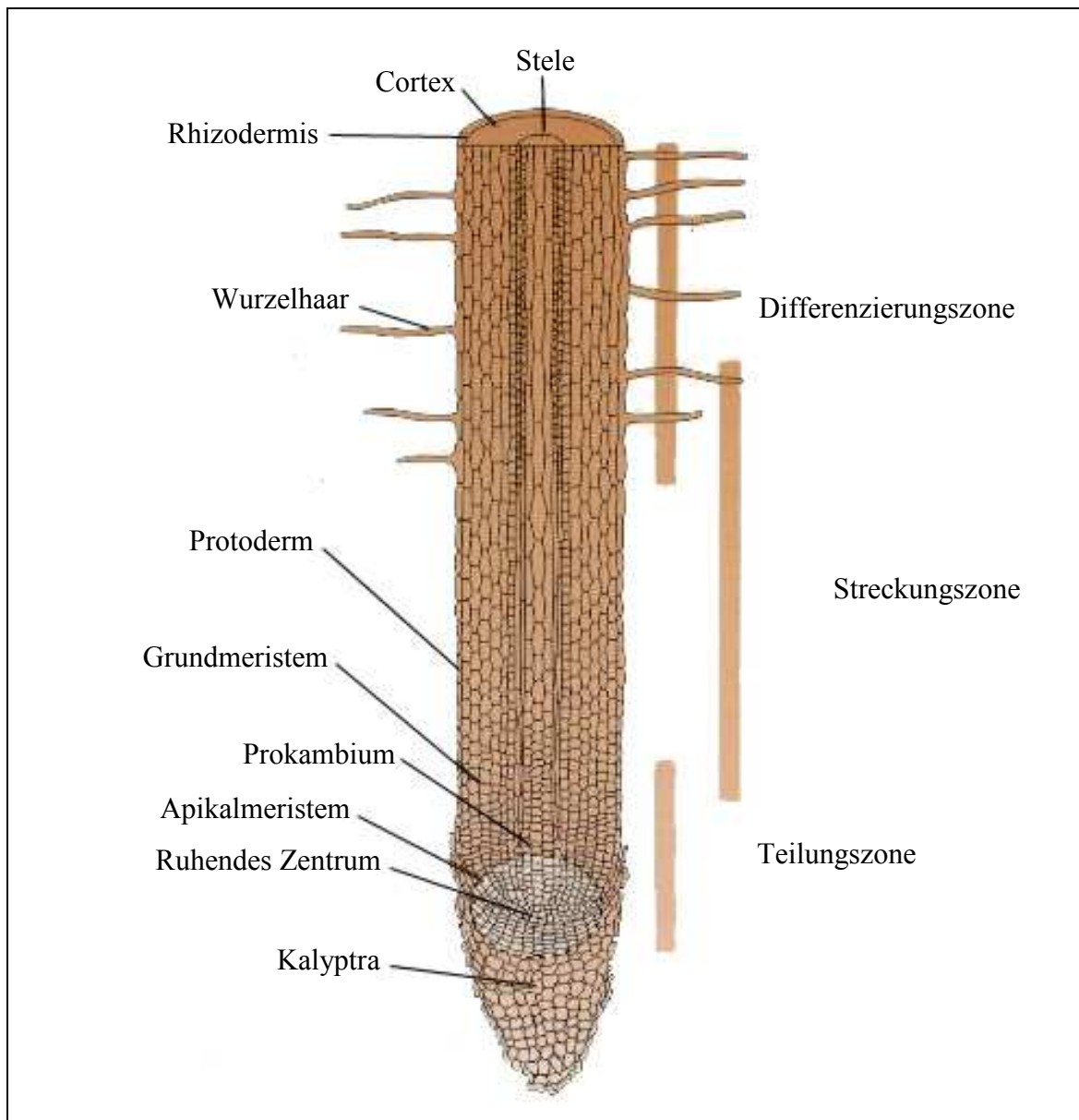


Abbildung 1: Aufbau der Primärwurzel (nach Campbell (1997))

4.3.2 Rhizodermis

Die Rhizodermis setzt sich aus zwei Zelltypen zusammen, den Trichoblasten (Leavitt, 1904), welche Wurzelhaare ausbilden, und den Atrichoblasten, die dies nicht tun. Die Verteilung und das Verhältnis von Atrichoblasten und Trichoblasten ist hoch reguliert (Bibikova et al., 1998) und variiert je nach Pflanzenart und nach Wachstumsbedingungen. Man kennt zwei Organisationsformen der Rhizodermiszellen: bei den Brassicaceen und einigen Schwesterfamilien sowie bei den Caryophylliales findet man eine streifenartige Anordnung von Trichoblasten und von Atrichoblasten. Bei den meisten anderen dicotylen Arten kann jede Rhizodermiszelle Wurzelhaare ausbilden (Dolan, 2001).

Rhizodermiszellen sterben in der Regel (Ausnahme z.B. Fabaceen) nach wenigen Tagen ab, wobei sich die Zellwand suberinisiert und lignifiziert (Fahn, 1982). Daher sind nur die jüngeren Abschnitte der Wurzel (die ersten Zentimeter nach der Spitze) mit lebenden Wurzelhaaren besetzt (Kutschera, 1960).

4.4 Wurzelhaare

Wurzelhaare sind schlauchförmige Ausstülpungen der Rhizodermiszellen (Fahn, 1982).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen weisen Wurzelhaare ein polares Wachstum auf. Die Zelle dehnt sich nicht gleichmäßig aus oder wächst an zwei Seiten, sondern nur in eine Richtung und zwar ausschließlich an der Spitze der Zelle, die auch als „*tip*“ oder „*apex*“ bezeichnet wird. Diese Form des Wachstums nennt man auch Spitzenwachstum.

Dieses Phänomen macht Wurzelhaare als Untersuchungsobjekt besonders interessant, da man davon ausgehen kann, dass alle Prozesse, die sich an der Spitze des Haares abspielen, direkt oder indirekt mit Wachstum verknüpft sind (Derksen and Emons, 1990). Daher ist das Wurzelhaar ein Modellsystem für die Untersuchung von Wachstumsprozessen in der Zellphysiologie.

Neben Wurzelhaaren zeigen auch Pollenschläuche, Pilzhyphen und Moosprotonemata polares Wachstum.

4.4.1 Allgemeines zu Wurzelhaaren

Die meisten Gefäßpflanzen bilden Wurzelhaare aus (Schwarz, 1883). Diese sind unter natürlichen Bedingungen 80-1500 μm lang und weisen einen Durchmesser von 5-17 μm auf. Wurzelhaare älterer Wurzeln sind zumeist länger als jene von jüngeren (Dittmer, 1949).

Die Anzahl der Wurzelhaare ist von der Pflanzenart, der Belüftung und dem Wasser- und Nährstoffgehalt der Lösung abhängig. Im Allgemeinen scheinen Gräser mehr Wurzelhaare zu besitzen als Kräuter und holzige Pflanzen und ermöglichen diesen dadurch besonders guten Halt im Boden (Kutschera, 1960).

Manche Pflanzen bilden jedoch keine Wurzelhaare oder nur kurze Ausstülpungen aus. Schwarz (1883) erklärt das Fehlen durch eine ununterbrochene Zufuhr von Wasser und Nährstoffen (häufig bei Wasser- und Sumpfpflanzen) oder durch verringerte Transpiration (viele Koniferen).

Wurzelhaare sind auf Grund ihrer an der Spitze dünnen, permeablen Zellwand sehr empfindlich und kollabieren daher leicht, wobei sie sich dann braun verfärben.

Das Absterben erfolgt aber auch ohne äußere Einflüsse noch vor der Peridermbildung, meist bereits 6-10 cm hinter der Wurzelspitze. Im feuchten Raum sterben Wurzelhaare üblicherweise nach 4-5 Tagen ab (Schwarz, 1883).

Langlebige Wurzelhaare, zum Beispiel der Winterweizen aus Nebraska (Weaver, 1925) bekommen verdickte Zellwände und verlieren die Fähigkeit der Wasseraufnahme (Artschwager, 1925; Cormack, 1949). In Mais gibt es selbst 20 cm nach der Wurzelspitze noch turgeszente Wurzelhaare (Schwarz, 1883).

4.4.2 Funktion

Wurzelhaare dienen der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus dem Boden. Durch die Wurzelhaare wird eine gewaltige Oberflächenvergrößerung erzielt. Sie bieten der Pflanze die Möglichkeit, ihre Oberfläche durch die Anzahl der produzierten Wurzelhaare je nach Bedarf zu variieren (Schwarz, 1883).

Weiters fixieren die Wurzelhaare die Pflanze im Substrat. Vor allem für die Keimlinge ermöglichen sie eine rasche Festigung im Boden, was häufig durch einen Kranz von Wurzelhaaren an der Bodenoberfläche geschieht (Dittmer, 1937; Schwarz, 1883).

Durch das Fehlen der Wurzelhaare an der Spitze und in der Wachstumszone bleiben diese Regionen beweglich (Kutschera, 1960). Durch die Fixierung der Wurzel in den darüber liegenden Zonen wirkt sich Wachstumsdruck nur auf die Spitze aus, wenn die Wurzelspitze auf Widerstand stößt (Kramer, 1949; Schwarz, 1883).

Zu Beginn wächst das Haar gerade, sobald es aber auf ein Hindernis trifft, schmiegt es sich an dieses an und umwächst es. Dabei verbreitert es sich und bleibt dadurch kürzer, als ein in Lösung gewachsenes Haar. Zusätzlich verschleimt die äußere Lamelle des Haares (Dittmer, 1937; Schwarz, 1883).

Die Bodenlösung ist üblicherweise stark verdünnt, die Wurzeln können aber die unentbehrlichen Nährstoffe akkumulieren und eine 100 bis 1000fach höhere Konzentration als in der Bodenlösung erreichen (Campbell, 1997).

Erdpartikel, welche von Wasser und darin gelösten Ionen getränkt sind, haften an den Wurzelhaaren. Die Bodenlösung fließt ungehindert in die Zellwände der Rhizodermiszellen ein und bewegt sich frei über den Apoplasten des Cortex. Dadurch werden die Parenchymzellen des Cortex mit Bodenlösung getränkt, und eine viel größere Absorptionsfläche von Wasser und Mineralstoffen in das Cytoplasma, als über die Rhizodermis alleine, ist gewährleistet. Auch symplastischer Transport von Wasser und Ionen findet in den Wurzelhaaren nach selektiver Aufnahme über die Plasmamembran statt (Campbell, 1997).

In den Wurzelhaaren werden Mineralstoffe vermehrt an der Spitze aufgenommen: dort ist die Wand sehr permeabel und dünn, und die meisten Transportproteine sitzen in der Plasmamembran der Wurzelhaarspitze. Die Wasseraufnahme findet verstärkt an der Basis statt. Allerdings sind die Aufnahmezonen auch von Umwelteinflüssen und der Pflanzenart abhängig und daher nicht immer in gleicher Verteilung anzutreffen (Frey-Wyssling and Mühlethaler, 1949; Kutschera, 1960).

4.4.3 Bildung und Wachstum

Wurzelhaare bilden sich oberhalb der meristematischen Region der jungen Wurzeln, in der die Rhizodermiszellen noch wachsen (Fahn, 1982).

Zur Ausbildung eines Wurzelhaars sind 2 genetisch unterschiedliche Prozesse, die Wurzelhaarinitiation (*bulge*-Bildung) und das Spitzenwachstum dieser Vorwölbung nötig (Fahn, 1982; Ridge, 1995).

4.4.3.1 *Bulge*

Bulges erscheinen als kleine, stark lokalisierte Protuberanzen nahe dem unteren Ende der Rhizodermiszellen (Fahn, 1982; Leavitt, 1904). Es sind lokale Zellwandexpansionen an der lateralen Wand der Rhizodermiszelle (Fahn, 1982).

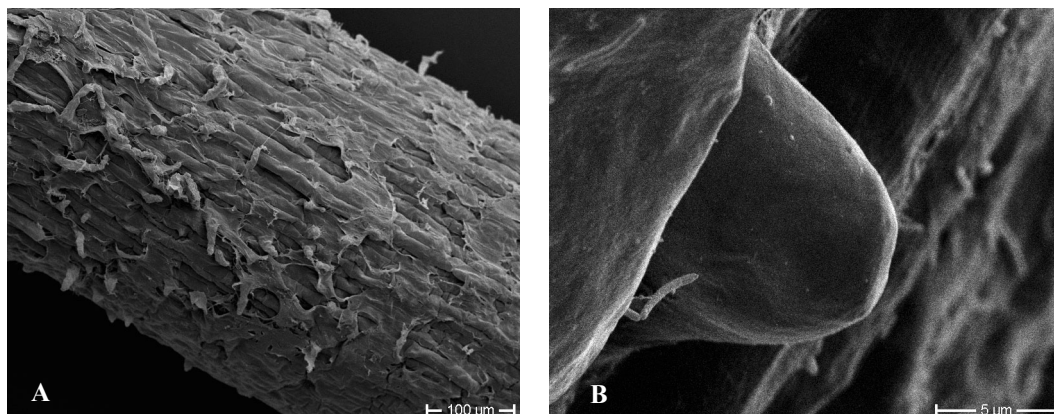


Abbildung 2: *Triticum aestivum*: REM-Darstellung von *bulge*-Region und *bulges*

A: *bulge*-Region überzogen mit dem Schleim der Wurzelhaarspitze; **B:** *bulge*

Das Wachstum ist in dieser Phase langsam und nicht polar. Die Zellwand wölbt sich nach außen, im Lichtmikroskop kann man dabei nicht beobachten, dass die Zellwand dünner würde. Die Organellen, die in der Rhizodermiszelle gleichmäßig verteilt sind, wandern in diese Ausbuchtung ein. Dabei beobachtet man, dass es hauptsächlich kleine sekretorische Vesikel sind, die sich hier akkumulieren. In diesem Zustand verharrt die Zelle bei optimalen Bedingungen 30 Minuten lang (Bibikova et al., 1998), bis dann das eigentliche Wurzelhaarwachstum einsetzt. Der *bulge* stellt somit einen Übergang vom diffusen, longitudinalen Wachstum der Rhizodermiszelle zum stark lokalisierten, hoch regulierten Wachstum des Wurzelhaares dar (Bibikova et al., 1998).

4.4.3.2 Initiierung des Spitzenwachstums

Um die Umstellung vom *bulge* zum wachsenden Wurzelhaar mit polarem Wachstum zu erreichen, sind mehrere Faktoren nötig: Es bilden sich ein pH- und ein Ca^{2+} -Gradient aus, das Cytoplasma an der Wurzelhaarspitze wird alkalisch und hat eine hohe Konzentration von Ca^{2+} (Bibikova et al., 1998; Dolan, 2001). Hierbei wird das Calcium durch hyperpolarisationsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle transportiert. Die Aktivität dieser Kanäle ist in der Spitze am größten und nimmt dann ab. In nicht wachsenden Wurzelhaaren fehlen der Gradient und die Aktivität der Kanäle (Dolan, 2001).

Eine Ansäuerung der Zellwand an der Initiationsstelle des Wurzelhaars ist für die Initiierung des polaren Wachstums nötig, verschwindet aber wieder, sobald das Spitzenwachstum eingesetzt hat.

Der cytoplasmatische pH (er steigt von pH 7,3 auf pH 7,7 an) ist nicht für die Initiierung, aber für das Wachstum des Wurzelhaars essentiell (Bibikova et al., 1998).

4.4.3.3 Das wachsende Wurzelhaar

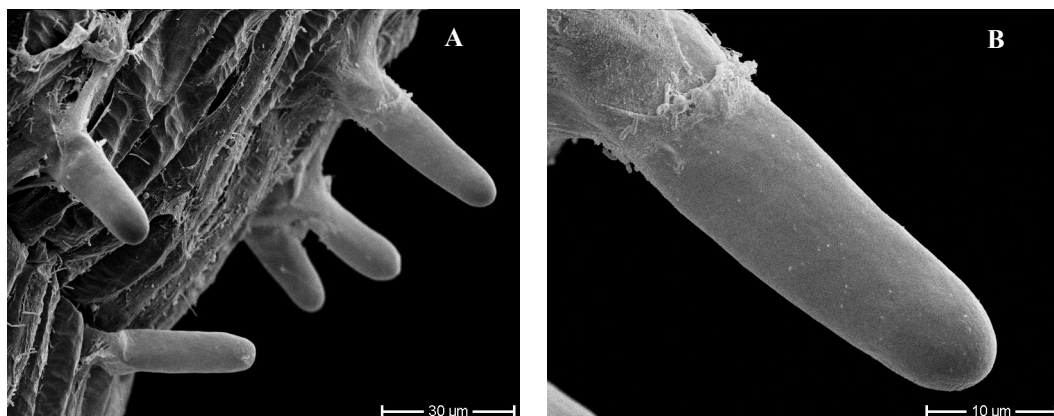


Abbildung 3: *Triticum aestivum*: REM-Darstellung von jungen Wurzelhaaren

A: Rhizodermisabschnitt mit jungen Wurzelhaaren; B: junges Wurzelhaar

Mit dem Beginn des eigentlichen Spitzenwachstums steigt die Wachstumsgeschwindigkeit stark an, das Wachstum ist gerichtet (Dolan, 2001).

Das Wachstum erfolgt ausschließlich in der Spitze, da hier die Zellwand noch weich und dünn ist (Clowes and Juniper, 1968; Fahn, 1982). Die Plasmamembran kann sich maximal 2% ausdehnen (Wolfe and Steponkus, 1981), für stärkere Oberflächen-

vergrößerung ist der Einbau neuen Materials notwendig (Clowes and Juniper, 1968). Die Volumenzunahme der Zelle erfolgt dabei durch osmotische Wasseraufnahme der Vakuole, die Menge an Cytoplama bleibt gleich (Sitte, 1965).

Die wachsende Zellwand ist noch relativ dünn und sehr plastisch, sie wird daher durch den osmotischen Druck der Zellsaft-Vakuole ausdehnt. Dies macht aber nur einen Teil der Vergrößerung aus, denn Wurzelhaare wachsen durch Exocytose (Roberts, 1994). Die Exocytose ist ein hochregulierter Prozess, bei dem Inhaltsstoffe der Zelle an deren Außenseite gelangen (Miller et al., 1997).

Bei der Exocytose docken Golgivesikel an der Plasmamembran an und fusionieren mit dieser nach einigen Minuten. Die Membran der Vesikel bildet hierbei die neue Plasmamembran und bringt Cellulose-synthetisierende Komplexe heran (Ketelaar and Emons, 2001). Der Inhalt der Vesikel, Bestandteile der Zellwandmatrix und Zellwand-synthetisierende Enzyme, werden in die neu gebildete Zellwand abgegeben (Battey and Blackbourn, 1993). Im Gegensatz zur semifluiden Plasmamembran, ist in der Zellwand kein horizontaler Shift möglich, weshalb die Exocytose stets dort stattfindet, wo dann die Zellwand auch wächst (Ketelaar and Emons, 2001).

Durch die Exocytose verlängert sich also das Wurzelhaar an seiner Spitze (Bibikova et al., 1998). Gleichzeitig findet aber in der subapikalen und in der apikalen Region auch Endocytose statt. Hierbei werden aus der Membran Vesikel abgeschnürt, die überschüssiges Membran- und Zellwandmaterial und Ca^{2+} -Kanäle entfernen, wenn diese nicht mehr an der Spitze sitzen und daher der Bildung des Ca^{2+} -Gradienten entgegenwirken würden.

Daher muss die Exocytose mehr Material liefern, als für das Wachstum nötig wäre. Bei den sehr großen Wurzelhaaren von *Equisetum* sp. wurde die Zahl der Vesikel, die pro Minute in die Plasmamembran integriert werden, ermittelt. Es wurden 445 Vesikel gemessen, innerhalb von 30 Minuten erfolgte ein vollständiger Austausch der Membran der Wurzelhaarspitze (Emons and Traas, 1986). Bei *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* gibt es hierzu keine Daten.

4.4.3.4 Das ausgewachsene Wurzelhaar

Nach einem regelmäßigen Wachstum von mehreren Stunden wächst das Wurzelhaar sukzessive langsamer, dann wird die RNA Translation und damit die Proteinsynthese gestoppt. Die vesikelreiche Plasmaspitze bildet sich zurück, dann erst wird das Wachstum eingestellt.

4.4.4 Cytoarchitektur des Wurzelhaares

Das Wurzelhaar besteht aus der apikalen und der subapikalen Region (Bonnett and Newcomb, 1966; Galway et al., 1997; Ridge, 1988; Sherrier and VandenBosch, 1994; Volkmann, 1984) sowie aus dem Wurzelhaarschlauch, welcher aus der Rhizodermis entspringt.

Das Cytoplasma besteht im Allgemeinen aus Plastiden, Mitochondrien, Dictyosomen, Endoplamarischem Reticulum, Proteinen, Enzymen, Lipiden, Phosphatiden, Reservestoffen, Mikrotubuli und Aktinfilamenten und zu 60-80% aus Wasser. Das Plasmagefüge wird ständig umgebaut.

In jungen Zellen gibt es viele kleine Vakuolen, die sich durch osmotische Wasseraufnahme vergrößern und nach einiger Zeit zu einer großen, die Zelle bis zur Zellwand ausfüllende Zentralvakuole, verschmelzen (Sitte, 1965).

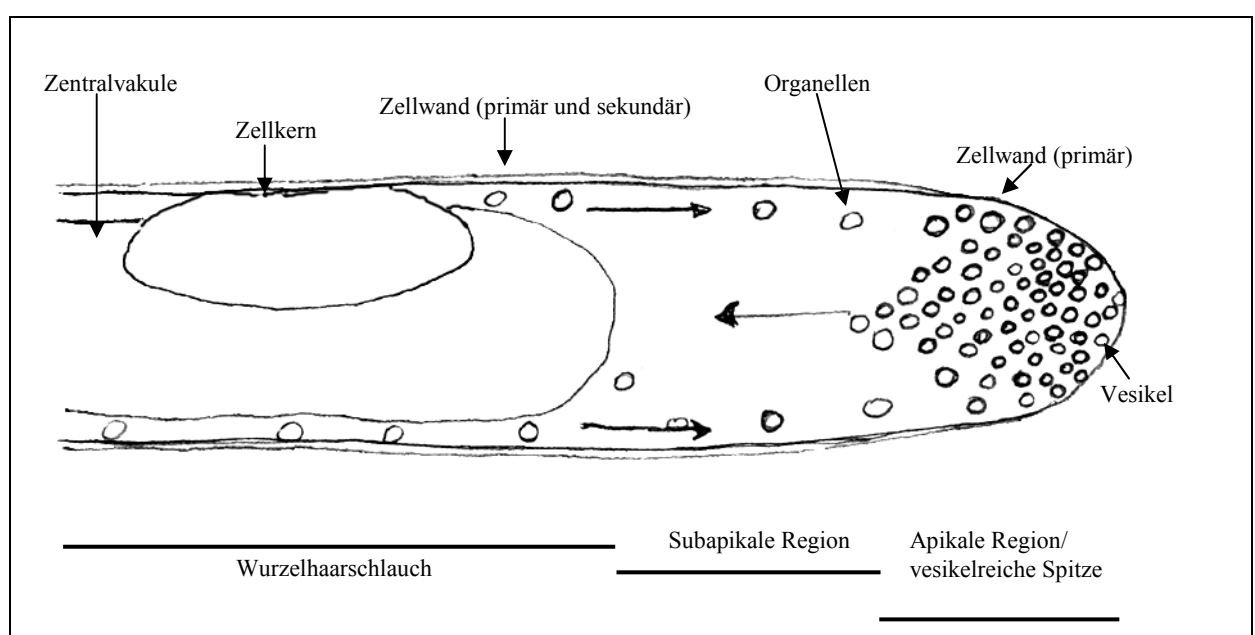


Abbildung 4: Cytoarchitektur eines wachsenden Wurzelhaars

4.4.4.1 Apikale Region

In der apikalen Region wird neue Zellwand sekretiert und auch die Plasmamembran expandiert. Der Bereich wird von kleinen Vesikeln und Ribosomen erfüllt (Emons, 1987; Galway et al., 1997; Ridge, 1988) ; über 50% davon sind Golgivesikel (Sievers, 1963a), welche mit den Zellwandbausteinen Xyloglucan und Polygalacturonsäure gefüllt sind (Sherrier and VandenBosch, 1994). Die Golgivesikel geben die Zellwandbausteine durch Exocytose in die Zellwand ab und auch die Plasmamembran expandiert durch Exocytose. Dabei vergrößert sich die Zellwandoberfläche und durch den Turgordruck des Haares dehnt sie sich aus, sodass das Wurzelhaar wächst.

4.4.4.2 Subapikale Region

Auch die subapikale Region enthält viele Golgivesikel mit Proteinen und Polysacchariden für die Zellwand, denn die Region ist der Ort ihrer Biosynthese. Dazu kommen aber ER und Mitochondrien für die Energieversorgung und weiters Clathrin-coated Vesikel vor, selten findet man auch Plastiden. Aktinfilamente und cortikale Mikrotubuli (Bonnett and Newcomb, 1966; Galway et al., 1997; Ridge, 1988; Sherrier and VandenBosch, 1994; Sievers, 1963a; Sievers, 1963b; Volkmann, 1984) bilden das Cytoskelett.

4.4.4.3 Wurzelhaarschlauch

Im Schlauch des Wurzelhaares gibt es eine oder mehrere große Vakuolen (Fahn, 1982), welche den Großteil des Raumes ausfüllen. Hier strömen alle Organellen der Zelle im cortikalen Cytoplasma, welches nur einen dünnen Randbelag ausmacht. Die in wachsenden Wurzelhaaren angetroffene Strömungsform wird als umgekehrte Springbrunnenströmung bezeichnet (Iwanami, 1956), da das Cytoplasma entlang der Plasmamembran zur Spitze strömt und vor der apikalen Zone umdreht und in der Mitte des Wurzelhaares wieder zur Basis zurückströmt (Miller et al., 1997; Peterson and Farquhar, 1996; Ridge, 1996).

Der Zellkern sitzt im Übergangsbereich zwischen der vakuolisierten Zone und dem subapikalen Plasma (Galway, 2000; Galway et al., 1997).

4.4.4.4 Die Cytoarchitektur des ausgewachsenen Wurzelhaares

In ausgewachsenen Wurzelhaaren gibt es keine vesikelreiche Spitze mehr, die Organellen sind bis zur äußersten Spitze anzutreffen, das Plasma bildet einen dünnen Belag zwischen Vakuole und Plasmamembran. Die Zentralvakuole ist weit vorne in der Spitze, der Zellkern wandert durch die Zelle und zieht sich dann in die Rhizodermiszelle zurück. Organellen strömen bis vor zur Spitze, Plasmastränge durchziehen aber auch die Vakuole, weshalb man von Zirkulationsströmung spricht (Iwanami, 1956; Miller et al., 1997).

4.4.5 Cytoskelett

Die Cytoskelettbausteine Aktinfilamente und Mikrotubuli spielen eine wichtige Rolle bei Initiierung und Wachstum der Wurzelhaare. Beide liegen im corticalen Plasma des Wurzelhaarschlauchs in longitudinalen Kabeln (Dolan, 2001), Mikrotubuli können auch helikal angeordnet sein (Ketelaar et al., 2002).

Mikrotubuli sind notwendig, um die Wachstumsrichtung der Wurzelhaare zu regeln (Dolan, 2001; Ridge, 1988). In der Wurzelhaarspitze sind sie willkürlich angeordnet (Emons, 1989), im Wurzelhaarschlauch liegen sie entlang der primären Zellwand parallel zu den Cellulosemikrofibrillen (Wymer and Lloyd, 1996).

In wachsenden Wurzelhaaren sind Aktinfilamente in allen cytoplasmatischen Strängen enthalten. Sie dünnen sich in der subapikalen Regionen zu feineren Bündeln bis zu Einzelfilamenten aus (FB-Aktin), welche am Wachstum durch den Transport und die Abgabe von Golgivesikeln in die apikale Region beteiligt sind. In der äußeren Spitze, der cytoplasmareichen Region der „*tip*“ konnten bis jetzt keine Aktinfilamente nachgewiesen werden (Miller et al., 1999).

Am Initialisierungspunkt der „*bulges*“ ist F-Aktin für das Wachstum von Wurzelhaaren unabdingbar (Dolan, 2001).

In ausgewachsenen Wurzelhaaren reichen die Aktinbündel bis knapp zur Spitze und verdünnen sich nicht. Die vesikelreiche Zone der Wurzelhaarspitze fehlt, die subapikale Region des Cytoplasmas ist wenig ausgebildet und enthält kleine Vakuolen und zahlreiche cytoplasmatische Stränge. Die Organellen bewegen sich in Zirkulationsströmung.

4.5 Zellkern

4.5.1 Aufbau und Funktion

Der Zellkern dient der Zelle als Archiv der genetischen Information. Mit der DNA wird der Bau der Enzymmoleküle festgelegt, die den Erhalt, die Vermehrung und Differenzierung der Zelle festlegen. Er ist daher essentiell für Entwicklung und Wachstum einer Zelle (Sitte, 1965).

4.5.2 Zellkern in Wurzelhaaren

Der Zellkern ist in Wurzelhaaren ein migrierendes Organell (Ketelaar et al., 2002), er wandert während des Wurzelhaarwachstums aus der Rhizodermiszelle in Richtung Spitze (Schmiedel and Schnepf, 1980; Schnepf, 1982). Dort bleibt er in einer bestimmten Entfernung von der Wurzelhaarspitze, bis das Wachstum eingestellt wird (Fahn, 1982).

Bei einigen Pflanzen hat man in wachsenden Wurzelhaaren den Zellkern in einer exakten **Position** im Bezug zur Wurzelhaarspitze gefunden. Zuständig für die Position des Zellkernes sind nicht die Mikrotubuli, sondern subapikale, feine F-Aktin Bündel zwischen Zellkern und Apex. In **Rettich** zum Beispiel liegt der Zellkern 50-150 μm von der Spitze entfernt (Sato et al., 1995). Ketelaar et al. (2002) beschreiben, dass sich in wachsenden Wurzelhaaren von *Arabidopsis* der Zellkern $77 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$ hinter der Spitze der Zelle befindet. Die Position des Zellkernes ist für das Wachstum des Wurzelhaares entscheidend.

In Folge eines **Wachstumsstopps** wird der Rückzug des Zellkernes in Richtung Basis initiiert, er wandert mit einer variablen Geschwindigkeit zwischen 0 und 60 μm pro Minute. Diese Bewegung erfordert ein intaktes Aktincytoskelett im Schlauch des Wurzelhaars, die Mikrotubuli spielen jedoch keine Rolle.

In **ausgewachsenen** Wurzelhaaren befindet sich der Zellkern in einer beliebigen Position ($247 \pm 134 \mu\text{m}$ von der Wurzelhaarspitze entfernt) (Ketelaar et al., 2002).

4.6 Plasmamembran

4.6.1 Aufbau

Die Plasmamembran ist ein semi-fluider Lipidbilayer mit intrinsischen und extrinsischen Proteinen. Der Bilayer besteht aus Sterolen und polaren Lipiden, weitere sind vor allem Phospholipide mit polarem, hydrophilen Kopf und mit zwei hydrophoben Fettsäureketten daran.

An die Kopfgruppe ist eine Hydrathülle assoziiert. Lipidköpfe können ionisch miteinander verknüpft sein oder mit intrinsischen Proteinen interagieren, häufig tragen sie auch Ladungen. Die Fettsäuren sind gesättigt oder ungesättigt und ragen in das Innere der Membran. Je mehr ungesättigte Fettsäuren vorhanden sind, desto dünnflüssiger ist der Bilayer. Bei niedrigen Temperaturen machen ungesättigte Fettsäuren daher einen großen Anteil aus.

Die Sterole sind flache Moleküle mit einem kleinen polaren und einem großen hydrophoben Anteil. Sie liegen zwischen den Fettsäureschwänzen und sind kaum mit den intrinsischen Proteinen assoziiert. Ihr Anteil ist abhängig vom Zellalter und steigt mit deren Reife oder Seneszenz.

Intrinsische Proteine, also jene welche mit dem hydrophoben Inneren der Membran assoziiert sind, sind außen mit den polaren Köpfen und innen mit den Schwänzen verknüpft. Besonders häufig sind sie in Membranen mit hoher Fluidität, ihre Aktivität wird stark durch die Membranfluidität beeinflusst. Intrinsische Proteine sind stark mit der Membran verbunden und können nur schwer entfernt werden. Die extrinsischen Proteine werden bei geringem osmotischen Schock freigegeben und sitzen nur an der Membranoberfläche, da ihr hydrophile Teil überwiegt. Wahrscheinlich sind sie mit intrinsischen Proteinen an deren polarem Ende assoziiert und dienen der Bindung von Ionen (Clarkson, 1985).

4.6.2 Ionenfluss

Der Ionenfluss ist mit Konfigurations- oder Positionsänderungen der intrinsischen Proteine verknüpft. Dabei ist der Fettsäureschwanz hinderlich; wenn er zu starr ist, ist

die Einschränkung zu stark und die Aktivität des Proteins eingeschränkt. Calciumbrücken sind hier besonders wichtig, um das Austreten von gelösten Stoffen zu verhindern. Andere Moleküle wie Cd^{2+} oder Al^{3+} verknüpfen noch stärker, senken damit aber die Permeabilität der Membran stark und inaktivieren teils auch membran-gebundene Enzyme.

ATP-gesteuerte Ionenkanäle bestehen aus zwei intrinsischen Proteinen und bilden einen polaren Kanal. Die Bindung des Ions verursacht (mit Energieaufwand) eine gewisse Umstrukturierung des Proteins, die Außenseite der Pore schließt sich, die Innenseite öffnet sich. Auch Diffusion durch Kanäle ist möglich. Eine gewisse Selektivität erfolgt durch den Kanaldurchmesser, nur Moleküle mit bestimmter Größe und Ladung können durchtreten. Außen auf den intrinsischen aufsitzende extrinsische Proteine können an Ionen binden, was eine Konformationsänderung des intrinsischen Proteins verursacht und den Durchtritt des Ions ermöglicht.

Die „*driving force*“ des Ions erfolgt in Richtung des Gradienten („*down*“) passiv, gegen den Gradienten („*up*“) ist ein aktiver Transport mit Energieverbrauch nötig. Der Transport erfolgt mit Hilfe von elektrischen Kräften. Es erfolgt also eine „elektrische Diffusion“ (Clarkson, 1985).

4.7 Zellwand

Die Zellwand muss dem Druck der Vakuole widerstehen und den Turgordruck aufbauen. Weiters muss sie sich dem Zellwachstum entsprechend ausdehnen. Die Zellwand ist in der Regel der einzige Teil der Zelle, der das Absterben der Zelle überdauert (Clowes and Juniper, 1968).

4.7.1 Aufbau der Zellwand

Die Zellwand setzt sich aus Mittellamelle, primärer Zellwand und sekundärer Zellwand zusammen. Die Mittellamelle und die älteste Zellwandschicht werden zum Zeitpunkt der Zellteilung aufgebaut, die neuen Schichten werden daran angelagert.

Die Zellwand wird aus einem Cellulosemikrofibrillen-Netzwerk, welches in eine Matrix von Proteinen und Polysacchariden eingebettet ist, aufgebaut (Clowes and Juniper,

1968; Dolan, 2001). Die Cellulosefibrillen werden in der Plasmamembran synthetisiert (Dolan, 2001).

Die Matrix wird von endomembranen Systemen (ER, Golgi) in die Wand sekretiert (Dolan, 2001). Sie besteht bei höheren Pflanzen aus Hemicellulosen und pektinartigen Substanzen (Northcote, 1963). Weiters können Lignin, Fette, Wachse, Tannine, Pigmente, Terpenoide, Proteine, Gummi und Schleime vorkommen (Clowes and Juniper, 1968).

Die Zusammensetzung der Polysaccharide variiert stark zwischen verschiedenen Familien beziehungsweise Arten, vor allem aber besteht ein großer Unterschied zwischen Gräsern und dicotylen Pflanzen; bei letzteren unterscheiden sich die Leguminosen von allen anderen. Zu den Polysacchariden zählen Galacturonsäure, Glucuronsäure, und nicht-celluloseartige Zucker (Mort and Grover, 1988).

Die **Mittellamelle** besteht hauptsächlich aus Pektinen, die in verschiedenem Grade verestert sind. Die **primäre Zellwand** setzt sich aus einem Netz wenig polymerisierter Cellulose (etwa 40%) (Clowes and Juniper, 1968), dazu Hemicellulosen und Glycoproteine zusammen. Die **sekundäre Zellwand** besteht hauptsächlich aus hochpolymerisierter Cellulose. Der Gehalt an Hemicellulosen und Glycoproteinen ist deutlich geringer.

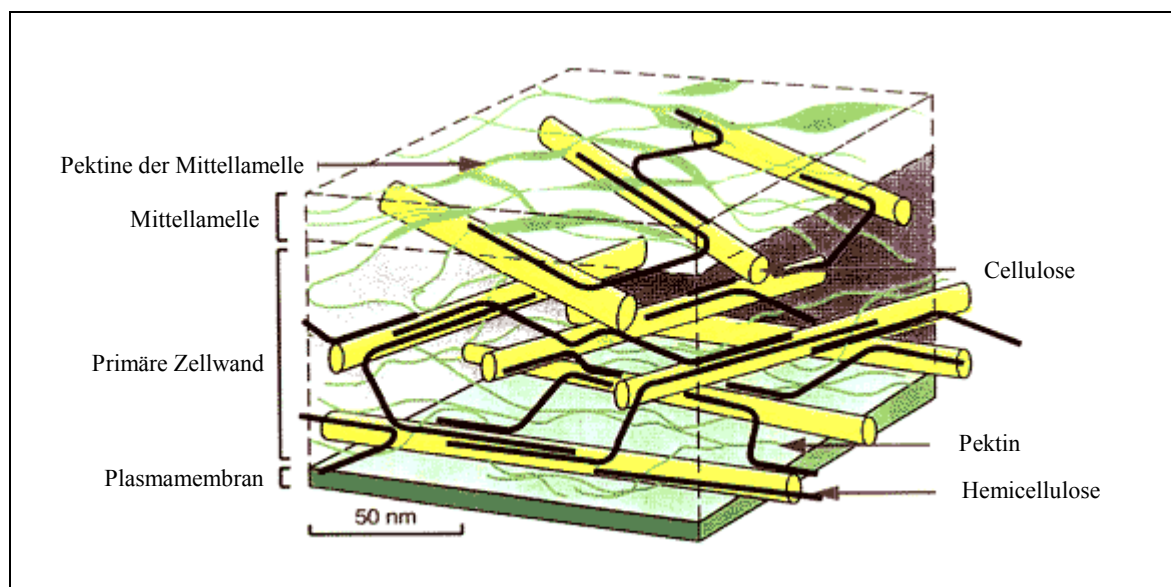


Abbildung 5: Aufbau der primären Zellwand

(Quelle: www.ippa.info/basics/cell-wall.gif)

In der primären und der sekundären Zellwand gibt es Zwischenräume, die Zellwand stellt daher keine Barriere für kleine Moleküle dar. Für größere Moleküle sind die Poren aber zu klein. Zellwände sind üblicherweise negativ geladen. Deshalb kommt es zur Akkumulation von Kationen im „*apparent free space*“, dem extracellulären Teil der Wurzel, in den gelöste Stoffe ohne Barriere eindringen können (Clarkson, 1974). Er ist der Wurzelabschnitt außerhalb der Endodermis und besitzt eine hohe Kapazität, Ionen zu absorbieren (Fodor, 2002).

Die Zellwandzusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften der Zellwand sind von mehreren Faktoren abhängig: der Temperatur (Dawson et al., 1995; Klein et al., 1995), dem Licht (Cheng and Huber, 1997; Parvez et al., 1996; Parvez et al., 1997), dem Nährstoffangebot (Findeklee et al., 1997; Hay et al., 1998; Tan and Hogan, 1995), von osmotischem (Hirasawa et al., 1997; Wakabayashi et al., 1997), oder Schwermetallstress (Aidid and Okamoto, 1993; Degenhardt and Gimmler, 2000).

Nährstoffe gehen nicht einfach durch die Zellwand hindurch, sondern werden häufig an der Zellwand absorbiert oder fixiert (Sattelmacher, 2001). Die Fixierung der Ionen beeinflusst die Nährstoffversorgung (Ae and Otani, 1997; Thornton and Macklon, 1989) und die Toleranz der Zelle gegenüber toxischen Substanzen (Horst, 1995).

4.7.2 Zellwand der Wurzel

Die Zellwand der Wurzel ist negativ geladen, sie wirkt daher anziehend auf Kationen und abstoßend auf Anionen (Clarkson, 1993). Dies gilt besonders für zwei- und mehrwertige Ionen (Haynes, 1980), denn für große Moleküle ist das Eindringen über die Poren schwierig (Thornton and Macklon, 1989).

4.7.3 Zellwand der Wurzelhaare

Die Zellwand von wachsenden Wurzelhaaren besteht an der Spitze ausschließlich aus primärer Zellwand, die locker strukturierte, zufällig verteilte Cellulosemikrofibrillen (CMF) besitzt.

Ab der subapikalen Region sind die CMF in der äußeren Schicht der Primärwand längs angeordnet. Die sekundäre Zellwand wird bereits kurz nach der Spitze aufgebaut und ist dicht mit CMFs bepackt. Sie besteht aus zwei Lagen: Die äußere, an die primäre

Zellwand anschließende Schicht enthält axial angeordnete CMFs, in der inneren sind die Mikrofibrillen helikal angeordnet (Beobachtungen an *Arabidopsis thaliana*) (Emons and Mulder, 1998; Franssen-Verheijen et al., 2003).

4.8 Bedeutung von Medienversuchen

Bei den Untersuchungen von Wurzelhaaren finden sich in der Literatur stark differierende Ansätze zur Kultivierung von Wurzelhaaren, die auch deutlich abweichende Ergebnisse liefern. Um nun eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu ermöglichen, wurden vorerst die optimalen Wachstumsbedingungen für Wurzelhaare getestet.

Wurzelhaare reagieren sehr empfindlich auf äußere Einflüsse wie Temperaturschwankungen, mechanischen Stress, Veränderung der Feuchtigkeit und vieles mehr (Schwarz, 1883).

Verbogenes, verzweigtes, geschlängeltes, blasiges oder fingerförmiges Wachstum kann zum Beispiel durch das umgebende Medium hervorgerufen werden (Schwarz, 1883).

Daher ist es entscheidend, optimale Wachstumsbedingungen für Wurzelhaare zu schaffen, um dann die Auswirkung des untersuchten Stressfaktors von anderen Stressoren unterscheiden zu können.

5 MATERIAL UND METHODE

5.1 Versuchspflanzen

Es wurden zwei Versuchspflanzen verwendet: *Arabidopsis thaliana*, als allgemein verwendete Modellpflanze, bei der die Wurzelhaare allerdings oft nicht gut wachsen, und *Triticum aestivum*, das bei entsprechendem Nährmedium immer gleichmäßige Wurzelhaare ausbildet.

Arabidopsis thaliana (Schmalwand)

Arabidopsis thaliana ist eine ein- bis zweijährige, dicotyle Pflanze und gehört zu den schotenfrüchtigen Brassicaceen (Fischer, 1994). Sie besitzt eine dünne spindelförmige Primärwurzel und mehrere längere Seitenwurzeln mit gelblichweißer Färbung (Kutschera, 1960). Die Pflanze wird 5 bis 30 cm hoch (Fischer, 1994), die von uns betrachteten Keimlinge hatten eine Sprosslänge von 5-9 mm.

Als Versuchsobjekt ist sie aus mehreren Gründen optimal geeignet. Sie hat einen sehr regelmäßigen Aufbau und daher sind Veränderungen generell gut ihrer Ursache zuweisbar. Sie ist auch innerhalb weniger Tage leicht aus Samen zu kultivieren, keimt in Petrischalen ohne großen Platzbedarf am Fensterbrett und benötigt nur die sehr kurze Zeit von etwa einem Monat bis zu Blüte und Fruchtreife.

Daher dient *Arabidopsis thaliana* als Modell für Untersuchungen über Formbildung und Morphogenese der Pflanzenzellen (Dolan, 2001).

Auch die Wurzelhaare verhalten sich laut Literatur sehr gleichförmig, sodass sich Veränderungen gut auf Mutationen zurückführen lassen (Ketelaar et al., 2002).

Triticum aestivum (Sommerweizen)

Triticum aestivum gehört zu den Ährengräsern der Gramineen und ist einjährig. Die Pflanze wird 70 bis 160 cm hoch (Fischer, 1994), die Keimlinge hatten eine Sprosslänge von 0,5 bis 4 cm.

Triticum aestivum hat meist 3 Keimwurzeln (bis zu 7 sind möglich) (Weaver, 1926) und zahlreiche sprossbürtige Wurzeln, welche weißlich bis graubräunlich gefärbt sind.

Triticum aestivum bildet viele, vor allem bei Trockenheit lang erhalten bleibende Wurzelhaare (Kutschera, 1960). Wurzeln und Wurzelhaare zeigen eine große Variationsbreite, was sie für genetische Versuche weniger leicht zugänglich macht, und auch der hexaploide Chromosomensatz ist für genetische Untersuchungen ein Problem. Die Wurzelhaare zeigen aber den typischen polaren Aufbau einer an der Spitze wachsenden Zelle ganz hervorragend.

Triticum aestivum benötigt laut Bergmann (1992) und Marschner (1995) 20-70 µg Zink und 5-10 µm Kupfer pro kg Trockensubstanz (des Sprosses) um die Pflanze ausreichend zu versorgen. Von Kupfer wird allerdings der größte Anteil in der Wurzel zurückgehalten (1981).

5.2 Keimung

Samen wurden desinfiziert (*Arabidopsis thaliana*) oder unsteril (*Triticum aestivum*) auf Agarplatten oder durchfeuchtetes Filterpapier gesetzt und dann 2 Tage (*Arabidopsis thaliana*) beziehungsweise 1-5 Tage (*Triticum aestivum*) bei 4° C im Dunkeln quellen gelassen. Dadurch wurde eine Synchronisation der Keimung erreicht. Dann wurden die Platten leicht schräg aufgestellt und die Pflänzchen bei permanenter Beleuchtung und 25-30 °C Lufttemperatur keimen gelassen. Die Keimung erfolgte nach 2-3 Tagen (*Arabidopsis thaliana*) beziehungsweise nach 1 Tag (*Triticum aestivum*).

5.3 Kammern

Nach der Keimung wurden die Pflanzen in Mikroskopierkammern aus Objektträger und Deckglas, mit Hitze fixiertem Parafilm als Abstandhalter, gesetzt. Bei *Arabidopsis thaliana* wurden 2 Parafilmstreifen (0,3 mm Abstand), bei *Triticum aestivum* 8 Parafilmstreifen (1,2 mm) verwendet.

Diese Kammern wurden quer (*Arabidopsis thaliana*) oder aufrecht (*Triticum aestivum*) in mit Lösung gefüllte (Färbe-) Küvetten gestellt. Darin wurden sie 6-18 Stunden (*Arabidopsis thaliana*) beziehungsweise 12-24 Stunden (*Triticum aestivum*) bei 25-

MATERIAL UND METHODE

30° C und permanenter Beleuchtung an das Wachstum in Lösung adaptiert. In dieser Zeit konnten die Wurzeln neue Wurzelhaare ausbilden, welche dann untersucht wurden.

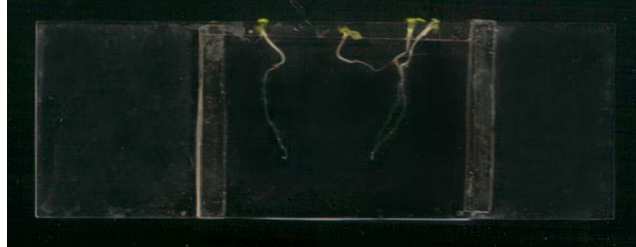


Abbildung 6: *Arabidopsis thaliana*: Kammern zur Kultivierung in Lösung

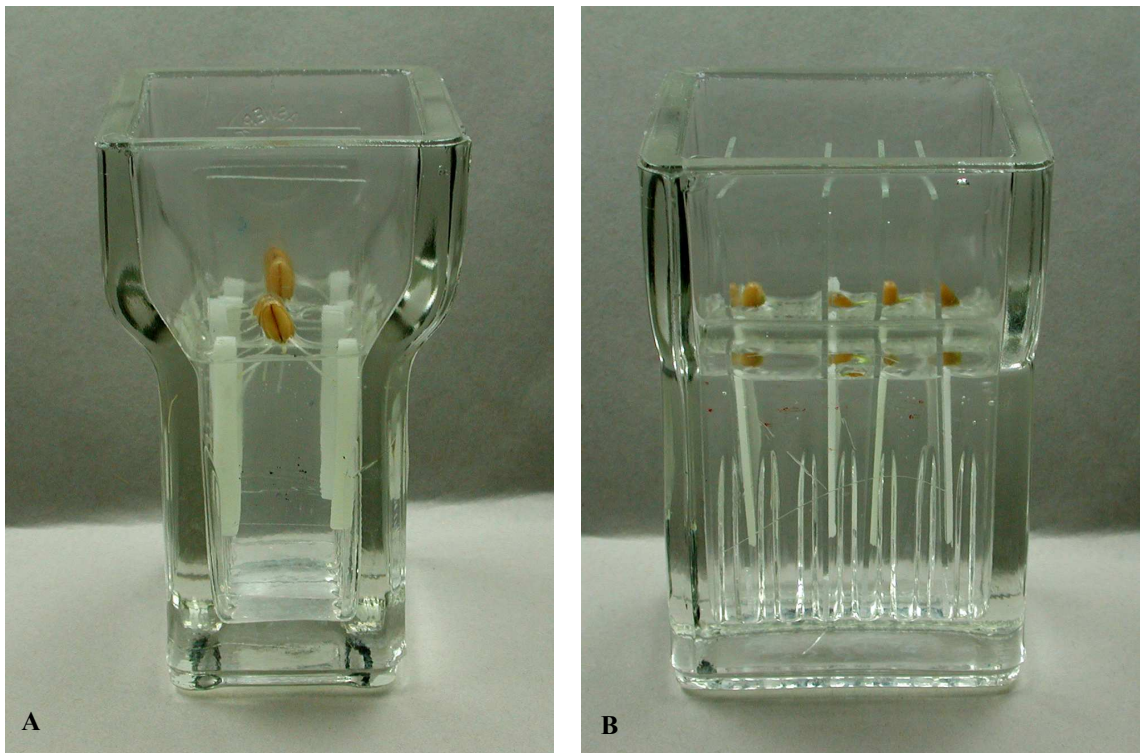


Abbildung 7: *Triticum aestivum*: Küvetten und Kammern zur Kultivierung in Lösung

A, B: Färbeküvetten mit Glaskammern, gefüllt mit Phosphatpuffer

5.4 Färbung

Für die Darstellung der Zellkerne und von Zellwandbestandteilen wurde eine Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Dafür mussten die Zellen oft vorher fixiert werden, damit die Farbstoffe durch die Plasmamembran an die Organellen kommen konnten.

5.4.1 Fixierung

Fixierlösung 1 (für REM, Calcofluor White):

4% Formaldehyd

1/ 90 M Na_2HPO_4

1/90 M KH_2PO_4

pH 6,2

Fixierlösung 2 (für Immunfluoreszenz):

4% Paraformaldehyd

0,5% Glutaraldehyd

1/ 90 M Na_2HPO_4

1/90M KH_2PO_4

pH 6,2

Fixierlösung 3 (für DAPI, Anilinblau und TEM):

4% Paraformaldehyd

0,5% Glutaraldehyd

Na_2HPO_4

pH 7,2

5.4.2 Färbung der Zellkerne mit DAPI

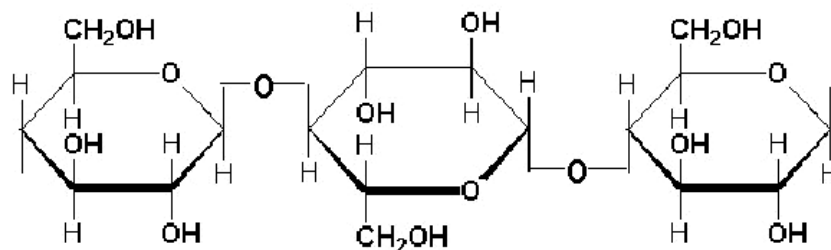
Zur Verdeutlichung des Zellkernes wurden Wurzeln 60 Minuten lang fixiert, mit Posphatpuffer gewaschen und mit DAPI (2 µg/l) gefärbt. Die Beobachtung erfolgte nach 10 Minuten. In UV-Anregung fluoreszieren die Zellkerne blau. Das Signal war stark, weshalb die Autofluoreszenz der Wurzelhaare nicht nachteilig ist.

5.4.3 Färbung der Zellwand

Um die Bestandteile der Zellwand zu identifizieren wurden Färbungsmethoden zur Detektion verschiedener Zellwandkomponenten durchgeführt.

5.4.3.1 Färbung von Cellulose mit Calcofluor White

Cellulose ist das häufigste Makromolekül der Erde, man findet sie bei höheren Pflanzen, Algen, Pilzen und Bakterien.



β-1,4 verknüpfte Glukoseeinheiten

Abbildung 8: Strukturformel der Cellulose

Quelle: www.bioag.byu.edu/aghost/514pres/polymer/sld001.htm

Cellulose kann großen mechanischen Kräften widerstehen. Diese Eigenschaften erhält sie durch ihren Aufbau: sie ist eine lineare Kette aus β-D-Glukose. Jeweils 2 an C₁ und C₄ durch Glykosidbindung verknüpfte Glukosemoleküle (β-1,4 Verknüpfung) bilden das Disaccharid Cellobiose, 3.000 bis 10.000 Moleküle sind dann zu einer Glucankette

verknüpft (Clowes and Juniper, 1968), die bis 5 μm lang werden kann (Hirsch et al., 1973). Innerhalb der Kette gibt es weitere Verknüpfungen zwischen C_2 und C_6 , sowie zwischen dem Sauerstoff des Ringes und C_3 (Clowes and Juniper, 1968).

Jeweils 100 Ketten werden weiter mit Wasserstoffbrücken verknüpft und bilden eine Elementarfibrille oder Micelle. 20 Micellen bauen eine Mikrofibrille, die Basiseinheit der Cellulose, auf: die Micellen assoziieren durch van der Waals Kräfte und Wasserstoffbrücken. Dieser Vorgang läuft im Cellulose-Synthase-Komplex, einer Partikelrosette in der Plasmamembran. Der Komplex verlängert die Mikrofibrillen und wandert dabei durch die Plasmamembran (Emons and Mulder, 1998). Der Einbau der Mikrofibrillen in die Zellwand erfolgt dann durch Wechselwirkung mit den Matrixpolymeren (Brett, 2000).

In der primären Zellwand sind nur etwa 30% Mikrofibrillen, welche ungeordnet in der Matrix liegen. Man spricht von Streutextur. Die Sekundärwand besteht zu über 60% aus Mikrofibrillen, die regelmäßig, in mehreren gegeneinander verdrehten Lagen angeordnet sind (Paralleltextur). Die Mikrofibrillen können 10-30 nm dick werden (Clowes and Juniper, 1968). Bei Störung kann der Komplex auch Callose ausbilden (Brett, 2000).

Aus 35 mg Calcofluor White (Tinopal 5BM, $C_{40}H_{44}N_{12}O_{10}S_2$), 1 ml TritonX-100 in 10 ml Lösung (pH 10-11) mit 990 ml Tris/HCl-Puffer (pH 9) wurde die Calcofluor White-Arbeitslösung hergestellt. Diese wurde 3 Minuten lang auf die Probe einwirken gelassen und dann gut ausgewaschen.

Calcofluor White färbt spezifisch Cellulose, diese leuchtet bei UV-Anregung intensiv weiß-blau. Autofluoreszenz ist auf Grund der großen Leuchtkraft des Fluoreszenzfarbstoffes zu vernachlässigen.

Calcofluor White polymerisiert mit den Glucanketten, während diese an den Cellulose Synthase Komplexen synthetisiert werden (Roberts et al., 1982).

5.4.3.2 Färbung von Callose mit Anilinblau

Callose ist der Cellulose sehr ähnlich, sie ist unverzweigtes β -1,3 verknüpftes Glucan. Sie hat allerdings eine schraubige Struktur. Callose ist amorph und bildet eine sehr dichte Sekundärstruktur, weshalb sie für Ionen kaum durchdringbar ist (Hirsch et al., 1973). Meist wird sie in den Zellen in Form einer homogenen Masse abgelagert, sie kann aber auch „Knöpfe“ ausbilden (Clowes and Juniper, 1968).

Callose zählt (außer bei Pollenschläuchen) nicht zu den direkten Zellwandbestandteilen und ist auch wesentlich seltener. Sie ist aber häufig mit der primären und der sekundären Zellwand assoziiert. In intakten Geweben gibt es sie in Siebplatten, Zellplatten teilender Zellen und in den Plasmodesmata (McCormack et al., 1997).

Bei Verwundung, pathogenen Angriffen oder mechanischem Druck wird sie mit auffälliger Geschwindigkeit gebildet und kann auch rasch wieder abgebaut werden. Hier bildet sie eine schützende Barriere gegenüber Umweltstress (Clowes and Juniper, 1968).

Callose wird von der Callose-Synthase (β -Glucan-Synthase), einem Transmembranprotein in der äußeren Membran, synthetisiert (McCormack et al., 1997; Ray, 1979). Sie kann aber auch bei Stress von der Cellulose-Synthase gebildet werden (Brett, 2000).

Zur Darstellung von Callose wurden fixierte (und in Phosphatpuffer gewaschene) beziehungsweise unfixierte Wurzeln 10 Minuten lang 1%iger Anilinblaulösung ausgesetzt, dann ausgewaschen und anschließend in UV-Licht beobachtet. Autofluoreszenz erscheint blau, Callose fluoresziert gelb. Im Hellfeld leuchtet Callose blau, bei Zugabe von 1%iger Essigsäure erscheint die übrige Zellwand rot.

Anilinblaulösung (Braune et al., 1999)

Auf 100 ml 1%ige Anilinblau

1 ml Essigsäure

und 5 ml 1%iges Eosin

5.4.3.3 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung von Pektin

Pektin gehört zu den wichtigsten Bestandteilen der Zellwand und ist laut Vincken et al. (2003) wahrscheinlich das komplexeste Makromolekül in der Natur. Es ist aus 17 verschiedenen Monosacchariden zusammengesetzt, welche die drei Polysaccharide Homogalacturonsäuren, sowie Rhamnogalacturonsäuren I und II aufbauen (O'Neill et al., 1990). Diese werden im Golgiapparat zusammengesetzt und mit Golgivesikeln an die Plasmamembran gebracht, wo sie fusionieren (Ridley et al., 2001).

Die Polysaccharide sind kovalent verknüpft und bilden das Pektinnetzwerk der Matrix von primärer Zellwand und Mittellamelle. Ihr Verteilungsmuster ist abhängig vom Gewebe und von dessen Entwicklungszustand (McCann et al., 2001; Ridley et al., 2001; Willats et al., 2001).

Pektine sind amorph, plastisch und höchst hydrophil. Daher sind sie wichtig für die Feuchtigkeit der Zellwand und machen die junge Zellwand flexibel (Clowes and Juniper, 1968). Sie sind außerdem an „*feedback loops*“ beteiligt, die Ungleichgewichte anderer Zellwandbestandteile ausgleichen.

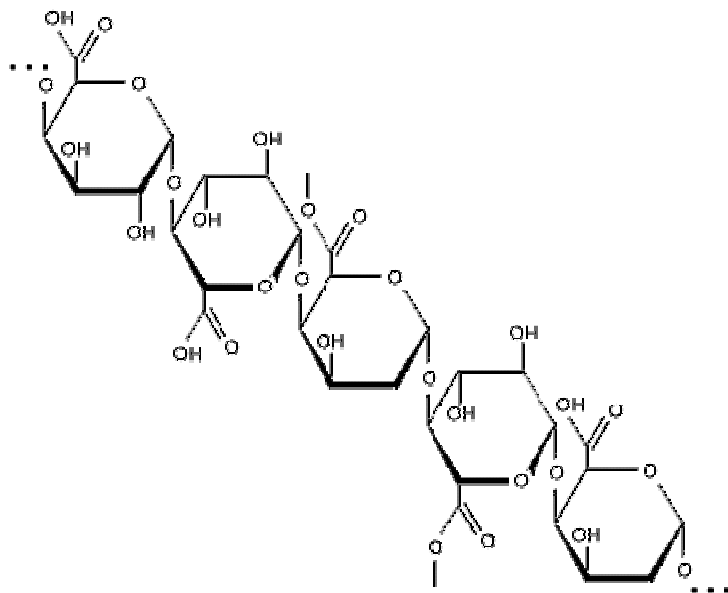


Abbildung 9: Strukturformel des Pektins

Quelle: Internet: www.bioag.byu.edu/ahghost/514pres/polymer/sld006.htm

Der häufigste Bestandteil, Homogalacturonsäure, ist eine lineare Kette und kann in verschiedenem Ausmaß methylverestert sein. Er ist für die Festigkeit und die Adhäsion

der Zellwand an benachbarte Zellen verantwortlich. Homogalacturonsäure ist häufig mit Ca^{2+} verknüpft, wodurch seine Konsistenz gelartig und besonders fest und klebrig wird (Willats et al., 2001).

Rhamnogalacturonsäure I stellt ein häufiges, heterogenes Polysaccharid aus Disaccharideinheiten dar und ist glycosidisch mit Homogalacturonsäure verknüpft. Ob Rhamnogalacturonsäure I mit Methyl verestert sein kann ist nicht geklärt (Willats et al., 2001).

Rhamnogalacturonsäure II (RGII) ist ein häufiges, verzweigtes Polysaccharid und ist mit Homogalacturonsäure glycosidisch verknüpft. RGII ist ein hochkonserviertes Molekül (dies weist auf eine wichtige biologische Funktion hin) und besitzt keine signifikante Strukturdiversität oder Modulation (Williams et al., 1996).

Sie tritt in der primären Zellwand auf, fehlt aber manchmal in der Mittellamelle. Häufig ist RGII als Dimer mit Boratester verknüpft (O'Neill et al., 1996). Das Dimer in der Zellwand ist allerdings basenunbeständig (Matoh et al., 1998; Williams et al., 1996). Über die Funktion von RGII ist noch relativ wenig bekannt, auf Grund von Versuchen mit Mutanten wird allerdings angenommen, dass das mit Borat verknüpfte Dimer eine wichtige Rolle für das Wachstum der Pflanze und die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Zellwand spielt (O'Neill et al., 2001).

Eine Verknüpfung mit Ca^{2+} verbessert vermutlich die Zellwandfestigkeit, indem es die Borateverknüpfung stabilisiert (Fleischer et al., 1999). Verknüpfung von RGII mit Proteinen verbessert wahrscheinlich ebenfalls die Zellwandfestigkeit (Bonilla et al., 1997). Auch von RGII ist nicht bekannt, ob Veresterung mit Methyl vorkommt (Willats et al., 2001).

Zur Analyse von Pektin wurden RGII Antikörper eingesetzt. Diese binden spezifisch an mit Borat veresterte RGII-Dimere. Durch die Kopplung des Antikörpers mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC wurde RGII im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Die Wurzeln wurden eine Stunde lang fixiert und dann drei Mal 5 Minuten lang in Puffer gewaschen. Zur Verbesserung der Erhaltung der Wurzelhaare wurden die Wurzeln mit 1%iger „low-gelling“ Agarose auf einem Deckglas befestigt. Durch kurzes Tauchen in flüssigen Stickstoff wurden die Zellwände aufgebrochen, um den Antikörpern das Eindringen in die Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden die

Proben in PBS (phosphat-buffered saline) aufgetaut. Um auch die Plasmamembran durchlässig zu machen, wurden die Wurzeln 30 Minuten lang 0,2%igem Triton ausgesetzt und dann 4 Mal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Über Nacht (circa 12 Stunden lang) wurden die Proben mit dem Antikörper RGII (1:200 verdünnt in PBS) in einer Feuchtkammer aufbewahrt. Nach weiteren vier fünfminütigen Waschschritten mit PBS wurde der fluoreszenz-markierte 2. Antikörper (TRITC-anti rabbit IgG, 1:40) aufgebracht und eine Stunde lang bei 37 °C in Dunkelheit einwirken gelassen. Abschließend wurde wieder 4 Mal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Kontrollen wurden ohne Antikörper beziehungsweise ausschließlich mit Antikörper I oder II durchgeführt.

Die Betrachtung der Fluoreszenz erfolgte im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) bei 547 nm Anregung.

5.5 Präparation für die Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Wurzeln 2 Stunden lang mit 4%igem Paraformaldehyd (in Phosphatpuffer) fixiert und dann zwei Mal mit Phosphatpuffer und drei Mal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Dann wurde die Probe in einer Verdünnungsreihe in Alkohol entwässert und anschließend Kritsch-Punkt-getrocknet. Abschließend wurde sie mit Gold bedampft und dann im Raster-Elektronenmikroskop (Jeol JSM 35CF) untersucht.

5.6 Mikroskopie

5.6.1 Untersuchungsmethoden

Hellfeld

Dunkelfeld

Fluoreszenz

Rasterelektronenmikroskopie

5.6.2 Mikroskope

Labophot, Nikon Instruments, Yokohama, Japan

4-fach, 10-fache, 20-fache, 40-fache (Öl) Vergrößerung

Fluoreszenzwürfel

Nikon UV-1A DM 400 (UV-Anregung)

Konfokales Laser Scanning Mikroskop, DMIRE2, Leica Microsystems, Heidelberg,
Deutschland mit Bildverarbeitungscomputer CTRMIC, Leica Microsystems,
Heidelberg, Deutschland

Stereomikroskop: SMZ-U, Nikon Instruments, Yokohama, Japan

0,75-fache bis 7,5-fache Vergrößerung im Objektiv

Univar, Reichert-Leica, Wien, Österreich

5.6.3 Dokumentation

Videokameras

CCD Color Kamera, Ikegami Tsushinki CO, Japan

Intensivierte Schwachlicht-Röhrenkamera (SW), Photonic Science, Milham, UK zur
Dokumentation der Fluoreszenz

Photokamera

Coolpix 990, Digitalkamera, Nikon Instruments, Yokohama, Japan

Die Aufzeichnung erfolgte auf Mini-DV-Band. Die Bildnachbearbeitung erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop 7.0

5.7 Videomikroskopie

Mikroskop

Univar, Reichert-Leica, Wien, Österreich

Videocomputer

Polyprocessor frame memory unit DVS 3000, Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland

Videokamera

Chanicon, hochauflösende Kamera (SW) C1000.1, Hamamatsu Photonics KK, Herrsching, Deutschland

6 ERGEBNISSE

6.1 Kultivierungsversuche

Zunächst versuchten wir, für die beiden Versuchspflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* passende Kulturmedien für reproduzierbare Daten zu finden.

Maximale Wurzelhaarbildung findet man bei folgenden Voraussetzungen: optimale Temperatur, Überschuss von organischen Nährstoffen, geringer Wachstumswiderstand des Bodens und günstiges Verhältnis zwischen Luftzutritt und Feuchtigkeit. Außerdem ist das Optimum von der Reaktionsfähigkeit und der Empfindlichkeit der Pflanze abhängig.

Am Deutlichsten ist jedoch die Abhängigkeit von der Feuchtigkeit und die dadurch erleichterte oder erschwerte Aufnahme von Nährstoffen. Wurzeln, welche permanent in Wasser wachsen, bilden häufig keine Wurzelhaare. Dies gilt für Wasserpflanzen, aber auch für in Lösung gezogene terrestrische Pflanzen (Schwarz, 1883).

6.1.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Für die Keimung und das Wachstum in Lösung wurden die nun folgenden, aus der Literatur gewählten Nährlösungen eingesetzt. Mit Ausnahme von destilliertem Wasser (pH 6,5 bis 7,0) hatten alle Medien den pH-Wert 5,8 vor dem Autoklavieren (120 °C, 20 Minuten).

Destilliertes Wasser

Murashige and Skoog Medium (MS-Medium) (siehe Anhang)

Das Murashige Skoog Basal Medium (MS bas) (Gamborg et al., 1968; Murashige and Skoog, 1962) und die Murashige and Skoog Basal Salts Mixture (MS salt) (Murashige and Skoog, 1962) dienen als Basis zur Optimierung der Nährlösung. Sie unterscheiden sich durch das Vorhandensein (MS bas) oder Fehlen (MS salt) von Vitaminen.

Zusätzlich wurden 2 Varianten mit jeweils der Hälfte der Chemikalien (mit Ausnahme der Saccharose) eingesetzt ($\frac{1}{2}$ MS bas, $\frac{1}{2}$ MS salt).

6.1.1.1 Keimung

*Arabidopsis*samen wurden 10 Minuten lang in 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend 3 Mal je 5 Minuten mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Arabidopsis thaliana wurde auf Agarplatten, auf feuchtem Filterpapier oder in Mikroskopierkammern mit verschiedenen Nährlösungen angekeimt.

6.1.1.1.1 Ergebnisse zu den Methoden

Agarplatten

Die Agarplatten ermöglichten eine gleichmäßige Keimung nach 3 Tagen. Der Keimling war stets gut durchfeuchtet und ließ sich leicht in die Glaskammer übertragen. Weiters breiteten sich Infektionen nur langsam aus.

Allerdings konnten deutliche Unterschiede zwischen der Dichte und der Länge der Wurzelhaare im Agar und später in der Lösung beobachtet werden. Dies lässt sich wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Nährstoffe und auf unterschiedlich starken mechanischen Widerstand in Lösungen und in festen Substraten zurückführen.

Infektionskeime konnten über undicht abschließenden Parafilm häufig an Austrittsstellen von Lösungen auf die Keimplatte gelangen.

Filterpapier

Auf mit Lösung getränktem Filterpapier erfolgte die Keimung nach 3 Tagen. Es wurden keine Veränderungen der Dichte und der Länge der Wurzelhaare beobachtet, was sich durch ein gleichartiges Nährstoffangebot auf dem Filterpapier und in der Küvette erklären lässt.

Allerdings trat häufig bei nicht ausreichender Durchfeuchtung des Filterpapiers ein Verkleben der Wurzelspitze und der Wurzelhaare mit dem Filterpapier auf. Daraus resultierte dann eine Störung der Wurzelspitze. Weiters breiteten sich auf Filterpapier Infektionen wesentlich rascher auf andere Pflänzchen aus als in Agar.

Mikroskopierkammern

In den Mikroskopierkammern kam es nicht zur Keimung. Es ist anzunehmen, dass die Samen entweder völlig von Lösung überdeckt und daher zu wenig mit Sauerstoff versorgt waren oder keinen Kontakt zur Lösung hatten und daher nicht genügend mit Feuchtigkeit versorgt waren.

Aus diesen Versuchen hat sich ergeben, dass sich die Keimung auf Agar und die Keimung auf Filterpapier als verbleibende Möglichkeit anbietet. Allerdings resultieren aus der Keimung auf Agar häufiger gesunde, regelmäßig wachsende Pflänzchen.

6.1.1.2 Ergebnisse zu den Keimmedien

Destilliertes Wasser

In Wasser kam es nach 2 Tagen zur Keimung. Zu Beginn wuchs die Wurzel regelmäßig und geradlinig. Nach bereits 24 Stunden aber verlangsamt sich ihr Wachstum und sie wuchs in engen Schlaufen schlangelinienartig. Die Wurzelhaare wuchsen zu Beginn locker und regelmäßig, dann aber bildeten sie eine Rosette in der Nähe der Wurzelspitze. Dabei erreichten sie nur eine geringe Länge.

Dies lässt sich nach Schwarz (1883) so erklären: abhängig von den im Samen gespeicherten Reservestoffen kann die Wurzel eine Zeitlang ohne zusätzliche Nährstoffversorgung ungestört wachsen. Nehmen nun die Reservestoffe ab, reduziert die Pflanze zuerst die Bildung von Wurzelhaaren, dann verlangsamt sie das Wurzelwachstum.

Murashige and Skoog Medium (MS-Medium)

In allen 4 auf dem MS-Medium basierenden Nährlösungen erfolgte Keimung mit anschließendem regelmäßigem Wachstum nach etwa 3 Tagen. In allen 4 Lösungen erschien die Wurzel normalwüchsig, die Wurzelhaardichte und die Wurzelhaarlänge hatten ein natürliches Aussehen. Auch die Unterschiede zwischen den Varianten waren, im Vergleich zur relativ hohen Streuung innerhalb der Versuchspflanzen einer Nährlösung, gering.

Die Wahl wurde schließlich nach den geringsten Unterschieden zwischen Keimlösung und Wachstumslösung getroffen und fiel auf die 0,5-fach konzentrierte Murashige and Skoog Basal Salts Mixture ($\frac{1}{2}$ MS salt-Medium).

6.1.1.2 Wachstumsmedien

Zur Bewertung des Wachstumsmediums wurden das generelle Erscheinungsbild und die Gesundheit der Pflanze, der Wachstumserfolg der Wurzel, die Distanz der ersten Wurzelhaare zur Wurzelspitze, die Dichte der Wurzelhaare und die maximale Wurzelhaarlänge nach 24 Stunden bewertet. Die untersuchten Parameter sind in **Abb. 10** beschrieben.

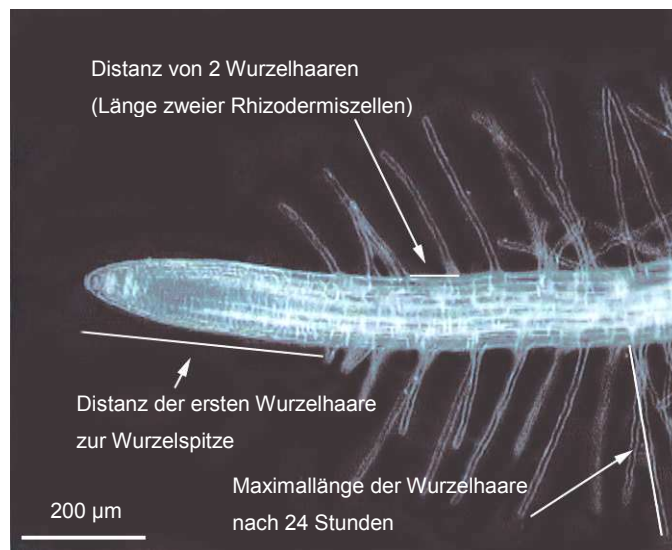


Abbildung 10: *Arabidopsis thaliana*: Erklärung zu den Wachstumsparametern

Ein normalwüchsiges Erscheinungsbild und die Gesundheit der Wurzel waren bei allen MS-Medien gegeben.

In destilliertem Wasser ging die Wurzel vom anfänglichen gesunden Wachstum rasch in ein verringertes Wachstum über. Die Elongation der Rhizodermiszellen war deutlich herabgesetzt, die Wurzelhaare bildeten einen dichten Kranz nahe der Wurzelspitze aus, teils kam es zu einer Verdickung der Wurzel. Die Wurzelhaare waren häufig stark verkürzt, teils nur stummelartig.

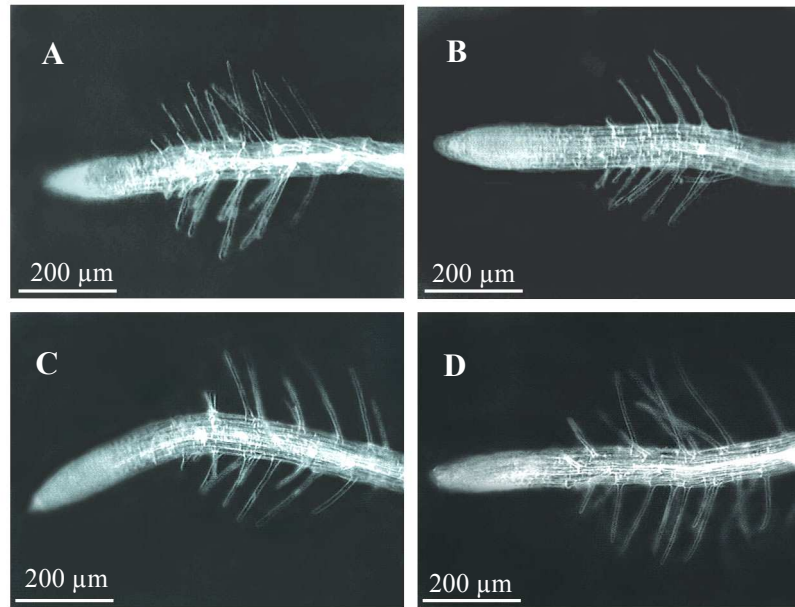


Abbildung 11: *Arabidopsis thaliana*: Bilder der Keimwurzel in den vier MS-Medien
Arabidopsis-Wurzel in **A**: MS bas; **B**: MS salt; **C**: ½ MS bas; **D**: ½ MS salt

Zwischen den Varianten des MS-Mediums (**Abb. 11**) waren die Ergebnisse nicht signifikant verschieden, da die Variation zwischen den einzelnen Pflänzchen einer Küvette teils größer als zwischen den verschiedenen Lösungen war.

Allerdings lagen beim ½ MS salt-Medium (**Abb. 11D**) die Mittelwerte aller gemessenen Parameter deutlich über den Werten der anderen drei Varianten. Die drei anderen unterscheiden sich nur geringfügig.

Die nachfolgende Tabelle und die beiden Diagramme (**Abb. 12** und **Abb. 13**) fassen die gemessenen Parameter zusammen.

Mittelwerte	Wurzelhaar-maximallänge	Wurzelhaar-dichte	Distanz der Wurzelhaare zur Spitze	Wurzelwachstum
MS bas	130±34 µm	65±12 µm	270±70 µm	600±270 µm
MS salt	130±24 µm	65±10 µm	270±70 µm	550±85 µm
½MS bas	130±55 µm	70±9 µm	270±50 µm	550±135 µm
½MS salt	175±34 µm	75±13 µm	330±55 µm	800±140 µm

Tabelle 2: *Arabidopsis thaliana*: Ergebnisse der Wachstumsversuche (Werte)

ERGEBNISSE: KULTIVIERUNG VON *ARABIDOPSIS THALIANA*

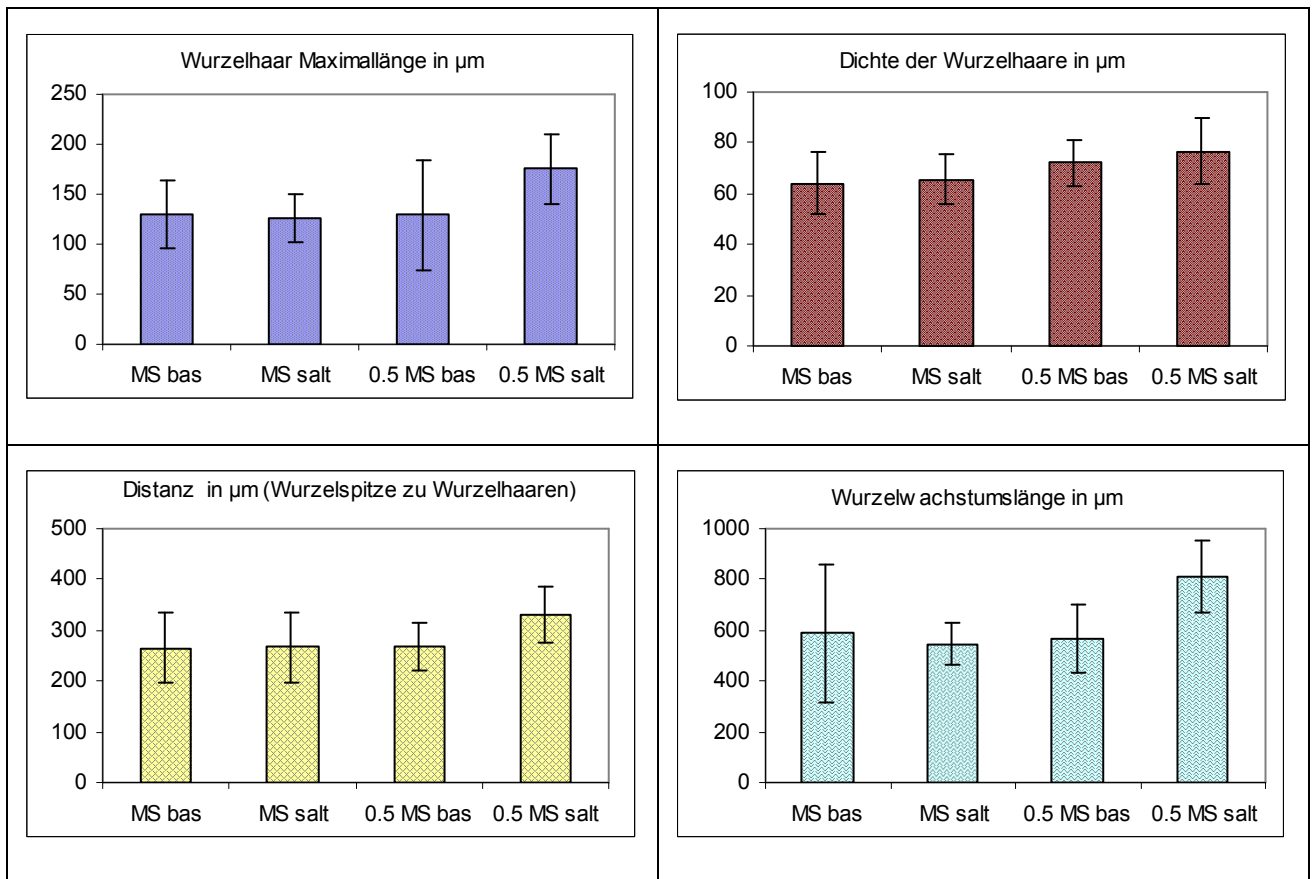


Abbildung 12: *Arabidopsis thaliana*: Ergebnisse aus den Medienversuchen

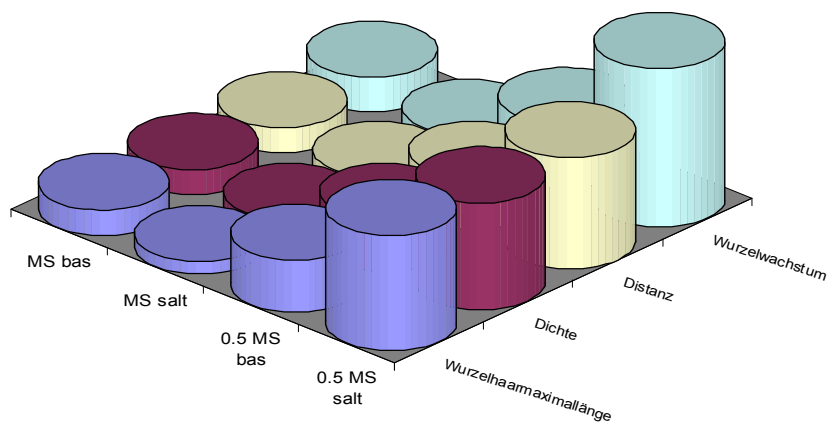


Abbildung 13: *Arabidopsis thaliana*: gesammelte Ergebnisse aus den Medienversuchen

Diesen Ergebnissen zufolge kann man nun aussagen, dass die 0,5-fach konzentrierte Murashige and Skoog Basal Salts Mixture ($\frac{1}{2}$ MS salt) dem Trend nach am besten geeignet ist, die anderen drei Medien aber ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden.

Destilliertes Wasser eignet sich nicht zur Kultivierung.

6.1.2 Kultivierung von *Triticum aestivum*

Die Bedingungen zur optimalen Kultivierung von *Triticum aestivum* wurden von meinem Kollegen, Michael Volgger, ermittelt, ich habe sie unverändert übernommen.

Die Samen wurden (bei nicht sterilen Konditionen) mindestens 24 Stunden in destilliertem Wasser quellen gelassen und dann auf mit destilliertem Wasser getränktem Filterpapier angekeimt.

Die Adaption an das Wachstum in Lösung erfolgte in mit Phosphatpuffer gefüllten Küvetten. Der Phosphatpuffer aus 2,04 mM Na_2HPO_4 und 9,07 mM KH_2PO_4 in destilliertem Wasser hatte einen pH-Wert von 6,2 und 16 mOsm.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Kultivierung von *Triticum aestivum* war ein konstantes Klimaregime. Schwankungen der Temperatur und wahrscheinlich auch des Sauerstoffgehalts der Luft und der Lösung, führten zu einer Verschiebung der, durch die Schwermetalle ausgelösten, Ergebnisse. Die Ergebnisse entsprachen dann denen, die bei anderen Schwermetallkonzentrationen erzielt worden waren, ohne allerdings grundsätzlich abzuweichen.

Dies bedeutet, dass Konzentrationen die bei wachstumsförderlicher Temperatur und Sauerstoffgehalt noch nicht inhibierend wirkten, bei zu hoher Temperatur und zu geringem O_2 -Gehalt toxisch sind.

6.2 Schwermetallversuche

Die Wirkung von Kupfer und Zink wurden an den beiden Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* getestet. Dazu wurden die Schwermetalle als Sulfate in gestuften Lösungen angeboten.

Bereits in der Kontrolle zeigte sich, dass das Wachstum der Wurzel und der Wurzelhaare sich stark zwischen den verschiedenen Versuchen unterschied. Es gibt also eine breite biologische Streuung.

6.2.1 Kupferversuche bei *Arabidopsis thaliana*

Die Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzeln und Wurzelhaare wurde in zweierlei Versuchsansätzen untersucht. Einerseits wurde CuSO_4 in Agarplatten integriert, andererseits wurden die Wurzeln CuSO_4 -Lösungen ausgesetzt. Für beide Ansätze wurde Kupfersulfat (CuSO_4) gestuft zwischen 10^{-1} und 10^{-6} M in halbkonzentriertem MS-Medium ohne Vitamine gelöst.

6.2.1.1 Kupfersulfat in Agar

Die Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* waren sehr empfindlich gegenüber Infektionen. Diese führten zu Störung und verfrühtem Einstellen des Wurzel- und Wurzelhaarwachstums. Agarplatten hatten nun den Vorteil, dass sie mit einer deutlich geringeren Keimzahl als die Lösungen eine längere Beobachtung über mindestens 5 Tage ermöglichten. Andererseits war es in Agarplatten schwierig die Verfügbarkeit des Kupfersulfats zu bewerten und damit die Wirkung mit der entsprechenden Konzentration zu verbinden.

Hierfür wurden Samen von *Arabidopsis thaliana* auf MS-Agar angekeimt und anschließend auf Agarplatten mit $5 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-4}$ M CuSO_4 , gelöst in $\frac{1}{2}$ MS salt-Medium, übertragen und alle 24 Stunden beobachtet.

	$5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	Kontrolle
Wachstum	nein	<4 Tage	<5 Tage	>5 Tage	>5 Tage	>5 Tage
Absterben nach	<24h	<5 Tage	>5 Tage	>5 Tage	>5 Tage	>5 Tage
Wachstumserfolg (5 Tage)	nein	2,5mm	8,5 mm	16mm	33 mm	19mm
Seitenwurzel- bildung	nein	einige, werden sehr lang, leben etwas länger als Hauptwurzel	einige, wachsen länger, werden länger als Hauptwurzel; kümmerlich, Wurzelhaare wachsen zuerst locker, dann ebenfalls verdichtet	einige, Seitenwurzeln haben längere, lockerer verteilte Haare als Hauptwurzel	häufig Seitenwurzeln sind gleich gebildet wie Hauptwurzel	häufig Seitenwurzeln sind gleich gebildet wie Hauptwurzel
Wurzelspitze	braun, normale Form, wird langsam abgebaut	stark verdickt, klobig, vorne rund	Hauptwurzel stumpf	normal	normal	normal
Distanz der Wurzelhaare zur Spitze		sehr stark verkürzt (um 3/5)	Haupt- und Seitenwurzeln leicht verkürzt (um 1/5)	Hauptwurzel leicht verkürzt, Seitenwurzeln normal	normal	normal
Dichte (neue Wurzelhaare)		sehr stark verdichtet (um $\frac{3}{4}$)	stark verdichtet (um 1/2)	Hauptwurzel verdichtet (um 1/5), Seitenwurzel normal	normal	normal
Wurzelhaarlänge (neue Haare)		kurz, stoppelig	etwas verkürzt	Hauptwurzel: etwa so lang wie K, Seitenwurzeln: längere Wurzelhaare als K	länger als K	normal

Tabelle 3: *Arabidopsis thaliana*: Wirkung von Kupfersulfat (in Agar) auf Wurzel und Wurzelhaare

Wachstumserfolg

Das Wachstum der Wurzel wurde in niedrigen Kupferkonzentrationen gesteigert, in starken Konzentrationen vermindert oder arretiert.

In der Kontrolle wuchsen die Wurzeln über 5 Tage gleichmäßig durchschnittlich 3,8 mm pro Tag.

In $5 \cdot 10^{-6}$ M konnte eine Wachstumssteigerung um 73% beobachtet werden, die Wurzeln wuchsen etwa 6,6 mm pro Tag. Bei $5 \cdot 10^{-5}$ M erfolgte ein konstantes Wurzelwachstum während der 5 Tage Beobachtungszeitraum, dieses war gegenüber der Kontrolle, mit 3,2 mm pro Tag, um 15% vermindert. In $1 \cdot 10^{-4}$ M CuSO_4 war der Wachstumserfolg vom ersten Tag an deutlich gesenkt und die Wurzel verlangsamte ihre Wachstumsgeschwindigkeit stetig. Bis zum 4. Tag stellte sie das Wachstum völlig ein. Ab $5 \cdot 10^{-4}$ M wurde das Wachstum ab dem Kontakt mit CuSO_4 gestoppt.

Wachsende Wurzeln bildeten auch Seitenwurzeln aus. In Konzentrationen zwischen $5 \cdot 10^{-5}$ und $2 \cdot 10^{-4}$ M wuchsen diese zu Beginn deutlich besser als die Hauptwurzel, passten aber nach einigen mm ihre Wachstumsgeschwindigkeit der Hauptwurzel an.

Distanz der ersten Wurzelhaare zur Wurzelspitze

In Kupfersulfat kam es in Konzentrationen zwischen $5 \cdot 10^{-5}$ und $2 \cdot 10^{-4}$ M zu einer Annäherung der *bulges* und ersten Wurzelhaare an die Wurzelspitze.

In der Kontrolle waren die ersten *bulges* 220 bis 320 μm nach der Wurzelspitze zu finden, die ersten Wurzelhaare zeigten sich μm dahinter. In $5 \cdot 10^{-5}$ M waren bei der Hauptwurzel die *bulges* etwas der Wurzelspitze angenähert, allerdings nicht signifikant. Bei den Seitenwurzeln konnte keine verringerte Distanz beobachtet werden.

In $1 \cdot 10^{-4}$ M CuSO_4 waren die ersten *bulges* um 20% der Wurzelspitze angenähert, in $2 \cdot 10^{-4}$ M sogar um 60% näher der Spitze, also 130 bis 190 μm hinter der Wurzelspitze zu beobachten. Außerdem bildeten die Wurzelhaare bei $2 \cdot 10^{-4}$ M eine Rosette langer Wurzelhaare, die *bulge*-Region fiel also aus.

Wurzelhaardichte

In der Kontrolle wuchsen die Wurzelhaare in einer durchschnittlichen Dichte von 70 μm . Werte zwischen 61 und 79 μm wurden beobachtet.

Diese Dichte, und damit diese Länge der Rhizodermiszellen, konnte bei $5 \cdot 10^{-6}$ M an Haupt- und Seitenwurzeln, aber auch bei den Seitenwurzeln von $5 \cdot 10^{-5}$ M beobachtet werden. Die Rhizodermiszellen der Hauptwurzeln waren bei $5 \cdot 10^{-5}$ M hingegen etwas verkürzt. Die Verkürzung betrug 21%.

In $1 \cdot 10^{-4}$ M saßen die Wurzelhaare bereits doppelt so dicht, wie in der Kontrolle, die Rhizodermiszellen hatten also eine Länge von durchschnittlich 35 bis 40 μm .

In $2 \cdot 10^{-4}$ M war die Zelllänge auf 25%, beziehungsweise 15-20 μm reduziert.

Wurzelhaarlänge

Wurzelhaare der Kontrolle erreichten nach 24 Stunden eine Länge von durchschnittlich 130 μm , maximal 185 μm .

In $5 \cdot 10^{-6}$ M erreichten die Wurzelhaare eine längere Endlänge mit durchschnittlichen 158 μm , maximalen 205 μm , also eine Steigerung um 21%. In $5 \cdot 10^{-5}$ M erreichten die Wurzelhaare der Hauptwurzel eine der Kontrolle vergleichbare Maximallänge. Die Wurzelhaare der Seitenwurzeln wuchsen jedoch länger, mit etwa 18% Steigerung.

In stärkeren Kupferkonzentrationen wurde das Wachstum vermindert, und zwar bei $1 \cdot 10^{-4}$ M nur geringfügig (um 15%, durchschnittlich 110 μm), bei $2 \cdot 10^{-4}$ M jedoch stark. Hier erreichten die Wurzelhaare maximal 30 μm .

6.2.1.2 Kupfersulfat in Lösung

Lösungen haben nun den Vorteil einer guten Verfügbarkeit der Schwermetall-Ionen und damit einer präziseren Zuordnung der Wirkung auf eine jeweilige Konzentration. Dagegen erlaubten die vermehrt auftretenden Infektionen allerdings einen maximalen Beobachtungszeitraum von 3 Tagen. Infektionen können trotz desinfizierten Samen und autoklaviertem Material auftreten, da die Küvetten nicht keimfrei verschlossen werden dürfen, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Keimlinge zu gewährleisten.

6.2.1.2.1 Mittelfristige Wirkung von Kupfersulfat auf die Wurzel und die Wurzelhaare

Vergleichend zu den Versuchen in Agar wurden Messungen in Kupfersulfatlösungen durchgeführt. Die Parameter Wurzelwachstum und Morphologie der Wurzel, Wurzelhaardichte, Distanz der Wurzelhaare zur Wurzelspitze und die Länge von ausgewachsenen Wurzelhaaren wurden qualitativ bewertet.

Hierfür wurde *Arabidopsis thaliana* auf ½ MS salt-Agarplatten gekeimt und anschließend in $5 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-5}$ M Lösungen transferiert.

In der anschließenden Tabelle sind die Ergebnisse zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst.

	Kontrolle	5*10⁻⁶ M	5*10⁻⁵ M	1*10⁻⁴ M	2*10⁻⁴ M	5*10⁻⁴ M
Wachstum	normal	normal	2 Tage normal, 3. Tag wenig	<24 Stunden	nein, oder <16 Stunden	nein
Wachstums- erfolg	5,0-7,0 mm (1,7-2,3 mm pro Tag)	6,5-8,8 mm (2,2-2,9 mm pro Tag)	2,5-3,6 mm (1,3-1,8 mm pro Tag)	1,5-2,0 mm (1,5-2,0 mm pro Tag)	0 mm	0 mm
Absterben nach	nein	nein	nein	<48 Stunden	<24 Stunden	sofort
Zustand (nach 3 Tagen)	lebend	lebend	lebend	tot	tot	tot
Spitze (3 Tage)	normal	normal	etwas gekrümmt, verdickt	tot, braun verfärbt, gekrümmt, verdickt	tot, braun, abgebaut	tot, braun, abgebaut
neue Wurzelhaare	ja	ja, länger als K	ja, kürzer	nein oder nur Stummel	nein	nein
Wurzel- haardichte	normal	normal	normal	normal		

Tabelle 4: *Arabidopsis thaliana*: Wirkung von Kupfersulfatlösungen auf Wurzel und Wurzelhaare

Wurzelwachstum

In Lösung trat der toxische Effekt von Kupfer bereits in niedrigerer Konzentration zu Tage. Die Wachstumssteigerung bei $5 \cdot 10^{-6}$ M war gegenüber der Kontrolle weniger bedeutend als im Agar, generell war der Wachstumserfolg geringer.

Schon bei $5 \cdot 10^{-5}$ M wurde das Wachstum der Wurzel deutlich eingeschränkt, am dritten Tag war das Wurzelwachstum nur noch gering. Bei $1 \cdot 10^{-4}$ M wurde das Wachstum innerhalb der ersten 24 Stunden eingestellt, die Wurzel starb nach weniger als 48 Stunden ab. In **stärkeren** Konzentrationen erfolgte in der Regel kein Wachstum mehr.

Die Wurzelspitze war ebenfalls bei $5 \cdot 10^{-5}$ M deutlich gestört. Sie war gekrümmt und verdickt. In **stärkeren** Konzentrationen nahm die Beeinträchtigung weiter zu, **ab** $1 \cdot 10^{-4}$ M war die Wurzel nach 3 Tagen tot, braun verfärbt und teilweise abgebaut.

Neue Wurzelhaare

In $5 \cdot 10^{-6}$ M CuSO_4 wurden neue Wurzelhaare gebildet, diese wurden länger als Wurzelhaare in der Kontrolle. In $5 \cdot 10^{-5}$ M wurden ebenfalls neue Wurzelhaare gebildet, diese erreichten aber nur eine geringere Länge als die Kontrollwurzelhaare.

In $1 \cdot 10^{-4}$ M wurden dagegen meist keine Haare mehr gebildet, oder stellten ihr Wachstum rasch wieder ein, sodass sie nur kurz und stummelartig blieben.

In **stärkeren** Konzentrationen wurden niemals neue Wurzelhaare gebildet.

Wurzelhaardichte

In der Kontrolle wuchsen Wurzelhaare in einer Dichte zwischen 61 und 79 μm .

Neue Wurzelhaare wuchsen in allen Kupfersulfatkonzentrationen ($5 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M) in der Dichte, welche der Kontrolle entsprach.

6.2.1.2.2 Direkte Wirkung von Kupfersulfatlösungen auf die Wurzelhaare

Die Wirkung des Kupfersulfats auf die Wurzelhaare wurde bei Wurzeln, welche 16 bis 24 Stunden in $\frac{1}{2}$ MS salt-Medium gewachsen waren, an in Lösung neu gebildeten Wurzelhaaren untersucht.

Die Wurzeln wurden vor der Untersuchung 30 Minuten lang in frisches Medium gesetzt, um Unterschiede durch verschiedenen Nährstoff- oder Sauerstoffgehalt gegenüber der Kupfersulfatlösung auszugleichen. Dann wurden die Kupfersulfatlösungen zugesetzt und ihre Wirkung innerhalb der ersten Stunde, beziehungsweise nach 24 Stunden analysiert.

	Kontrolle	10^{-6}M CuSO_4	10^{-5}M CuSO_4	10^{-4}M CuSO_4	10^{-3}M CuSO_4	10^{-2}M CuSO_4	10^{-1}M CuSO_4
Wachstumsstopp nach	nicht eingestellt	nicht eingestellt	nicht eingestellt	innerhalb von 2 Stunden nicht eingestellt	circa 5 Minuten	sofort	sofort
tot nach	einigen Stunden	einigen Stunden	einigen Stunden	> 2 Stunden	45 Minuten	20 Minuten	15 Minuten
wachsende Wurzelhaare nach 24 h	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein
Aussehen, Zustand (24 h)	intakt, wachsend, turgeszent, gerade	intakt, wachsend, turgeszent, gerade	intakt, wachsend, turgeszent, gerade	intakt, nicht wachsend, aber noch strömend, turgeszent, gerade	tot, verschrumpelt (nach circa 60 Minuten), gerade	tot, stark verschrumpelt (nach circa 30 Minuten), gerade	tot, stark verschrumpelt (nach circa 25 Minuten), gerade
Zellwand (24 h)	dünnwandig, intakt	dünnwandig, intakt	dünnwandig, intakt	dünnwandig, intakt	dünnwandig, intakt, verschrumpelt	dünnwandig, intakt, verschrumpelt	dünnwandig, intakt, verschrumpelt
Plasma (24h)	das Plasma strömt über die Zeit gleichmäßig schnell, „segelartig“, in der Spitze langsamer als im Wurzelhaarschlauch; bei Wachstumsstopp fließt es langsamer und wird vollständig in die Wurzelhaarbasis zurückgezogen	wie Kontrolle: gleichmäßige „segelartige“ Strömung, Rückzug des Plasmas bei Wachstumsstopp in die Wurzelhaarbasis	die Strömung ist gleichmäßig „segelartig“, die Organellen sind vor Beendigung des Wurzelhaarwachstums locker verteilt	nach Zugabe segelartig fließend, dann wieder feiner, perlschnurartig; Strömung verlangsamt sich mit der Zeit	zu Beginn gleichschnell wurmartig strömend, dann verlangsamt es mit Ende der Wurzelhaarwachstums, und verschwindet vollständig in der Wurzelhaarbasis	beginnt sich segelartig und gleichschnell (wie Kontrolle) strömend zurückzuziehen, wird dann perlschnurartig, Plasmareste koagulieren im Wurzelhaarschlauch	zuerst segelartig gleichschnell strömend, koaguliert an Ort und Stelle nach 5-15 Minuten

<p>Vakuole (24h)</p>	<p>während des Wachstums ist die Vakuole im basalen Bereich der subapikalen Zone; bei Wachstumsstopp bilden sich kleine Vakuolen in der Spitze, die Zentralvakuole wandert vor in die Spitze</p>	<p>wie Kontrolle: während des Wachstums ist die Vakuole im basalen Drittel des Haars; bei Wachstumsstopp sind kleine Vakuolen in der Spitze, die Zentralvakuole wandert vor</p>	<p>wie Kontrolle: während des Wachstums ist die Vakuole im basalen Drittel des Haars; bei Wachstumsstopp sind kleine Vakuolen in der Spitze, die Zentralvakuole wandert vor</p>	<p>kleine Teilvakuolen tauchen in der Spitze mehrfach auf und verschwinden wieder, verschmelzen schließlich zur Zentralvakuole; auch während des Wachstums sind Teilvakuolen in der Spitze vorhanden</p>	<p>kleine Teilvakuolen tauchen auf und verschwinden wieder, schließlich kommt die Zentralvakuole in die Spitze</p>	<p>Vakuolisierung beginnt sofort, zuerst gibt es Teilvakuolen, dann die Zentralvakuole in der Spitze (nach circa 8 Minuten); nach 20 Minuten Brownsche Bewegung in der Vakuole</p>	<p>nach 0,5-3 Minuten sind Vakuolen in der Spitze, zuerst Teilvakuolen, dann die Zentralvakuole; nach wenigen Minuten Brownsche Bewegung in der Vakuole</p>
<p>Zellkern (24h)</p>	<p>Zellkernabstand bleibt während des Wachstums konstant in Bezug auf die Wurzelhaarspitze und wandert nach Stopp Richtung Wurzelhaarbasis</p>	<p>wie Kontrolle: Zellkernabstand bleibt während des Wachstums konstant in Bezug auf die Wurzelhaarspitze und wandert nach Stopp Richtung Wurzelhaarbasis</p>	<p>Zellkernabstand zur Wurzelhaarspitze vergrößert sich während des Wachstums etwas, da Zellkern nicht mit vor kommt, mit Wachstumsstopp wird der Zellkern länglicher; Rückzug des Zellkernes erfolgt 25 Minuten nach Beendigung des Wurzelhaarwachstums</p>	<p>springt zu Beginn etwas zurück, mit Wachstumswiederaufnahme geht er an seine Ausgangsposition zurück, springt beim nächsten Stopp wieder zurück und geht wieder vor; 40 Minuten nach endgültigem Wachstumsstopp wandert er zur Basis zurück</p>	<p>wird nach 30 Minuten länglicher, wandert geringfügig Richtung Spitze, klebt an der Wand, dehydriert dann</p>	<p>bleibt an seiner Position in Bezug auf die Spitze, nach 20 Minuten dehydriert er und koaguliert dann</p>	<p>bleibt auf seiner Position beziehungsweise rutscht etwas vor Richtung Wurzelhaarspitze, koaguliert und dehydriert nach 15 Minuten</p>

	Kontrolle	10^{-6}M CuSO_4	10^{-5}M CuSO_4	10^{-4}M CuSO_4	10^{-3}M CuSO_4	10^{-2}M CuSO_4	10^{-1}M CuSO_4
Verhalten nach Kupferzugabe (1-3h)		wächst gleichmäßig weiter, Spitze bleibt erhalten, wie Kontrolle	wächst gleichmäßig weiter, Spitze bleibt erhalten, ein Einstellen des Wachstums passiert, ist wahrscheinlich aber nicht früher als in der Kontrolle	zu Beginn erfolgt Wachstumsstopp, nach 5 Minuten wird das Wachstum wieder aufgenommen, Haar wächst einige Zeit, stellt teils auch zwischendurch mehrfach Wachstum ein, aber keine Wachstumsrichtungswechsel dann endgültig eingestellt	hört nach Zugabe sofort zu wachsen auf, wächst weiter, stellt es nach 5 Minuten wieder ein, dann verlangsamt sich die Strömung mit Beendigung des Wurzelhaarwachstums; es erfolgt Vakuolisierung und (fast) vollständiger Leerung	das Wurzelhaar beginnt sofort sich zu leeren, eine weitgehende Leerung ist möglich, nur ein Plasmaspitzenbereich und ein Randbelag bleiben	reagiert sofort, Vakuole vorne, Plasma beginnt sich zurückzuziehen, fällt dann aber aus und Zellkern zerfällt,
Strömungstyp (Zugabe bis 24h)	springbrunnenartig	springbrunnenartig	springbrunnenartig	springbrunnenartig	nach einigen Minuten Zirkulationsströmung, dann eingestellt	sofort Zirkulationsströmung, dann eingestellt	

Tabelle 5: *Arabidopsis thaliana*: Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzelhaare

Wurzelhaarwachstum

Das Wachstum der Wurzelhaare war in der Kontrolle 0,5-0,7 μm pro Minute. Bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M Kupfersulfat gab es in einem Zeitraum von 24 Stunden wachsende Wurzelhaare. In 10^{-4} M reagierten die Wurzelhaare direkt nach der Zugabe gestresst, wuchsen dann regelmäßig während der ersten 2 Stunden weiter, dann verlangsamte sich das Wachstum und wurde schließlich eingestellt. Nach 24 Stunden gab es weder neue noch alte wachsende lebende Wurzelhaare. In 10^{-3} M wurde das Wachstum nach etwa 5 Minuten eingestellt.

In diesen Konzentrationen (10^{-6} bis 10^{-4} M langfristig, 10^{-3} M während der ersten Minuten) wuchsen die Wurzelhaare gerade und regelmäßig.

In **stärkeren** Konzentrationen stoppte das Wurzelhaarwachstum, sobald das Haar in Kontakt mit der Lösung kam.

Zellwand

In der Kontrolle und in den Kupferlösungen konnten in der Regel keine Verdickung der Zellwand beobachtet werden (weder an der Spitze noch entlang des Wurzelhaarschlauches).

Plasma

In der Kontrolle sowie in Konzentrationen **bis zu 10^{-4} M** CuSO_4 (Abb. 15) strömte das Plasma in großen Plasmaklumpen entlang von Plasmasträngen und erschien wellenartig zu strömen. Diese Plasmaströmung wird daher als „wellen“- oder „segelartig“ bezeichnet. Bei der Einstellung des Wurzelhaarwachstums strömten die Organellen mehr und mehr einzeln und bewegten sich dann schließlich perlschnurartig entlang des Cytoskeletts.

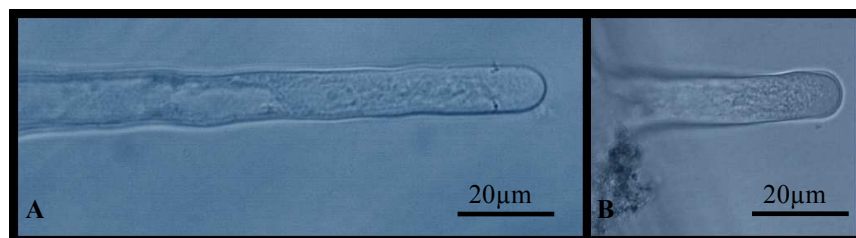


Abbildung 14: *Arabidopsis thaliana*: Wurzelhaare in 10^{-5} M Kupfersulfat

A, B: nach 30 Minuten in Kupfersulfat: die Wurzelhaarspitze ist intakt, die Haare wachsen

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *ARABIDOPSIS THALIANA*

In 10^{-3} M (Abb. 15) stellte das Wurzelhaar rasch das Wachstum ein. Die Wachstumsbeendigung folgte aber demselben Muster wie in der Kontrolle.

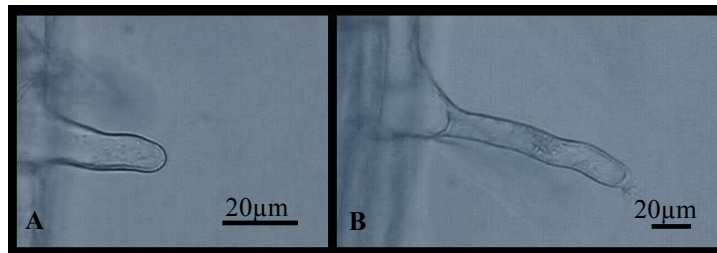


Abbildung 15: *Arabidopsis thaliana*: Wurzelhaare in 10^{-3} M Kupfersulfat

A, B: nach 30 Minuten in Kupfersulfat: kein Wachstum mehr, die Wurzelhaare sind vakuolisiert, das Plasma wird in den Wurzelhaarschlauch zurückgezogen

In **stärkeren** Konzentrationen (Abb. 16 und Abb. 17) reichte die Zeit nicht für eine völlige Entleerung des Wurzelhaares. Das Plasma koagulierte noch im Wurzelhaarschlauch, einzelne Organellen gingen in Brown'sche Bewegung über, was auf einen Zusammenbruch des Cytoskeletts hinweist.

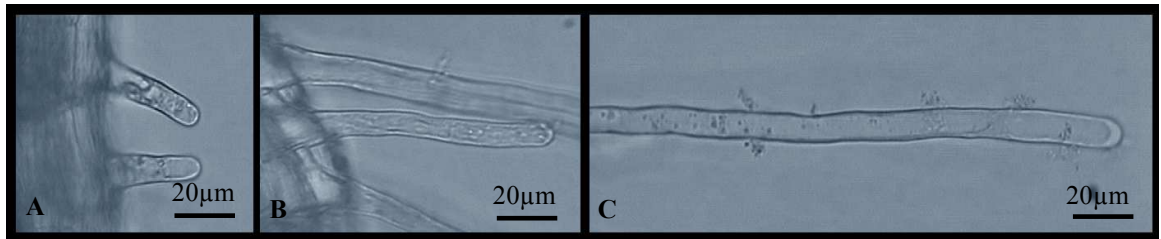


Abbildung 16: *Arabidopsis thaliana*: Wurzelhaare in 10^{-2} M Kupfersulfat

A, B,C: nach 30 Minuten in Kupfersulfat: die Wurzelhaare sind vollständig vakuolisiert, nur noch wenig Plasma oder einzelne Organellen befinden sich im Wurzelhaarschlauch



Abbildung 17: *Arabidopsis thaliana*: Wurzelhaare in 10^{-1} M Kupfersulfat

A, B,C: nach 30 Minuten in Kupfersulfat: das Wurzelhaar ist tot und vakuolisiert, das Plasma ist rasch gestockt und daher im Wurzelhaar

Zellkern

Der Zellkern saß in der Kontrolle $77 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$ von der Wurzelhaarspitze entfernt. Konzentrationen **bis 10^{-5} M** CuSO_4 hatten keinerlei Einfluss auf die Lage des Zellkernes. **10^{-4} M** führten aber dazu, dass sich der Zellkern wiederholt von der Wurzelhaarspitze etwas zurückzog und dann wieder annäherte. Schließlich zog er sich völlig in die Wurzelhaarbasis zurück. In **10^{-3} M** wanderte er etwas in Richtung Wurzelhaarspitze. Ab dieser Konzentration schrumpfte der Zellkern nach einigen Stunden und erhielt dabei eine körnige Struktur.

Strömung

In der Kontrolle sowie in Konzentrationen **bis 10^{-4} M** blieb bis zur Einstellung des Wurzelhaarwachstums die umgekehrte Springbrunnenströmung erhalten. In stärkeren Kupfersulfatlösungen ging nach einigen Minuten (**10^{-3} M**) oder sofort (**ab 10^{-2} M**) die Strömung in eine Zirkulationsströmung über und wurde dann eingestellt.

6.2.2 Kupferversuche bei *Triticum aestivum*

Untersuchungen über die Kupfertoleranz von *Triticum aestivum* wurden von Bálint et al. (2002) durchgeführt. Es wurden *Triticum aestivum* ssp. *spelta*, *T. monococcum*, *T. dinkajae*, *T. timonovum*, *T. timopheevii*, *T. zhugovskyi* und *T. tricale* cv. *presto* analysiert. Es ergab sich, dass bei *Triticum* sp. zwar häufig Toleranz, nicht aber Resistenz gefunden wird. Die Auswirkung des Kupfers auf junge Keimlinge blieb dabei aber ungeklärt.

Wir untersuchten daher den Einfluss des Schwermetalls auf die Keimung, sowie auf das Wachstum der Wurzel und Wurzelhaare mit gestuften Kupfersulfatlösungen zwischen 10^{-1} und 10^{-9} M CuSO₄, gelöst in Phosphatpuffer.

6.2.2.1 Wirkung von Kupfersulfat auf die Keimung von *Triticum aestivum*

Um die Keimung in Schwermetalllösungen zu erfassen, wurden die Keimlinge nach der Quellung in destilliertem Wasser auf mit Schwermetalllösung getränktes Filterpapier gesetzt. In jedem von vier Versuchsansätzen wurden je etwa 15 Pflanzen 48 Stunden lang gezogen. Die Keimung erfolgte wie in Wasser nach circa 24 Stunden.

Allgemein trifft man bei den Wurzeln von *Triticum aestivum* eine starke Variation der Wachstumsgeschwindigkeit an, die 1.Keimwurzel wächst zumeist etwas langsamer als die zweite und dritte, sowie die später erscheinenden Wurzeln.

6.2.2.1.1 Keimrate

Der Keimerfolg lag bei der Kontrolle zwischen 80 und 93 %. Die Wurzellänge war (48 Stunden nach der Quellung der Samen) etwa 18 mm, Extreme zwischen 7 und 40 mm waren allerdings möglich.

Bei Keimung in Kupfersulfat konnte man eine Änderung des Keimungserfolges und der Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel beobachten (siehe **Abb. 18** und **Abb. 21**).

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

War die Konzentration des Kupfersulfates 10^{-4} M oder geringer, konnten keine signifikanten Unterschiede des Keimungserfolgs beobachtet werden. Bei 10^{-3} M erfolgt bei zwei Versuchsansätzen nur die Keimung einer von 15 Pflanzen, bei den zwei anderen entsprach der Keimerfolg der Kontrolle. Bei Konzentrationen von 10^{-2} M CuSO_4 oder mehr erfolgte keine Keimung.

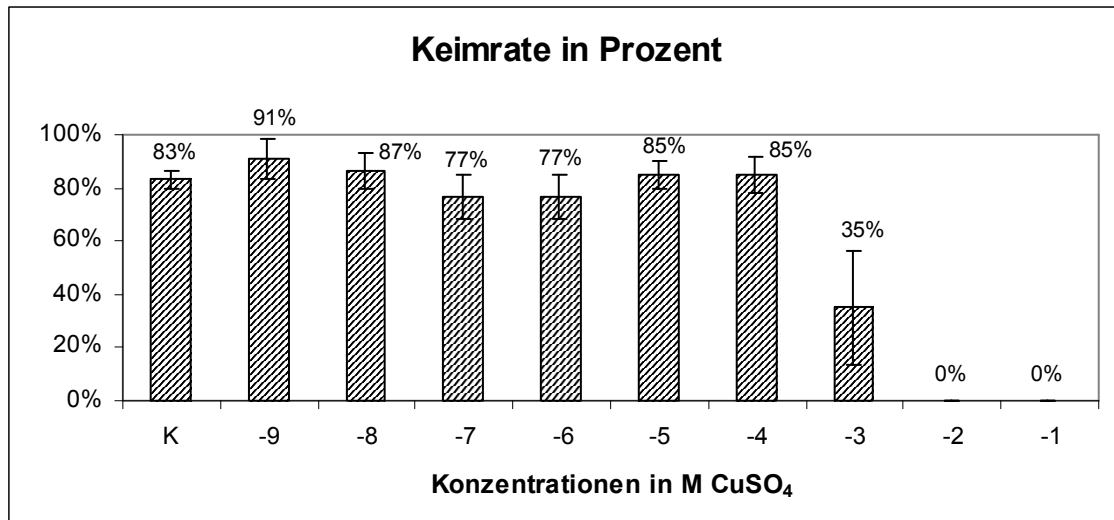


Abbildung 18: *Triticum aestivum*: Wirkung von Kupfersulfat auf die Keimrate

6.2.2.1.2 Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel

Bei Kupferkonzentrationen bis zu 10^{-5} M CuSO_4 gab es (48 Stunden nach der Quellung der Samen) keinen erkennbaren Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeit zur Kontrolle. Eine gewisse, relativ deutliche Minderung des Wachstumserfolgs konnte bei 10^{-4} M CuSO_4 in den Mittelwerten beobachtet werden. Allerdings war sie auf Grund der starken Variabilität des Wachstumserfolgs nicht signifikant. Bei 10^{-3} M CuSO_4 war aber (falls die Pflänzchen gekeimt waren) ein stark vermindertes Wachstum beobachtbar. Die Abnahme des Wachstumserfolgs betrug im Mittel 68% der Kontrolle.

Das mittlere Wurzelwachstum sowie die Standardabweichung sind im nachstehenden Diagramm (Abb. 19) zu sehen.

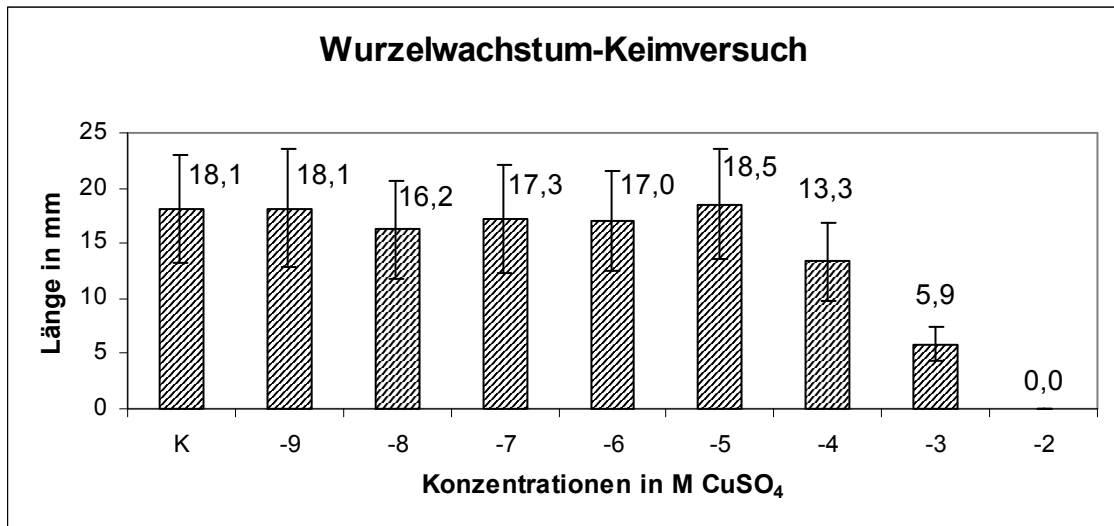


Abbildung 19: *Triticum aestivum*: Wirkung von Kupfersulfat auf das Wachstum der Keimwurzel
Wachstumserfolg 48 Stunden nach Quellung

6.2.2.1.3 Distanz der Wurzelhaare von der Wurzelspitze

In der Kontrolle und in Kupferkonzentrationen bis 10^{-4} M befanden sich die ersten *bulges* durchschnittlich $1800 \mu\text{m}$ von der Wurzelspitze entfernt, die ersten Wurzelhaare etwa 50 bis $100 \mu\text{m}$ dahinter.

In 10^{-3} M waren *bulges* und Wurzelhaare aber deutlich näher bei der Wurzelspitze nämlich in einer Distanz zwischen 400 und $1150 \mu\text{m}$, durchschnittlich $800 \mu\text{m}$ von der Wurzelspitze entfernt. Die Wurzelhaare begannen sehr abrupt maximal $50 \mu\text{m}$ später.

6.2.2.1.4 Wurzelhaare

Wurzelhaare wurden bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M CuSO₄ gebildet und unterschieden sich weder in der Maximallänge noch in der Dichte der Wurzelhaare von der Kontrolle.

Die einzige Ausnahme bildeten die Wurzelhaare in der spitzennahen Region der Konzentration 10^{-3} M (Abb. 20). Diese Wurzelhaare waren dicht, fast büschelartig und waren bis vor zu den ersten Wurzelhaaren gleich lang gewachsen, Die *bulge*-Region entfiel also, die Rhizodermiszellen waren verkürzt. Die Wurzelhaare erreichten aber eine deutlich geringere Endlänge. Die Wurzelhaarregion war nur sehr kurz, was aber auch auf den geringen Wachstumserfolg der Wurzel zurückgeführt werden kann.

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*



Abbildung 20: *Triticum aestivum*: Wurzelspitze nach Keimung in Kupfersulfat
Wurzelspitze der Kontrolle und nach Keimung in 10^{-3} M Kupfersulfat

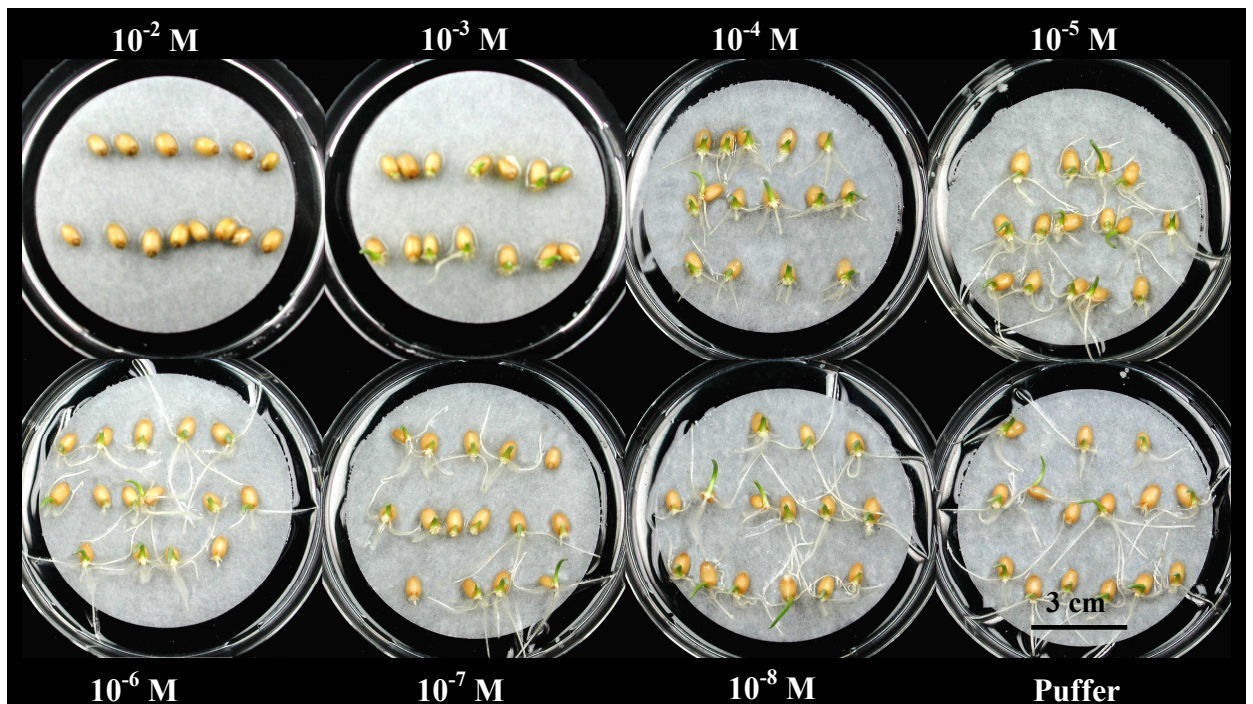


Abbildung 21: *Triticum aestivum*: Keimung in Kupfersulfat

6.2.2.2 Wirkung von Kupfersulfat auf die Wurzel von *Triticum aestivum*

Keimlinge wurden vom Filterpapier in Kupfersulfatlösungen gesetzt. Nach 12-24 Stunden wurde der Effekt des Schwermetalls untersucht.

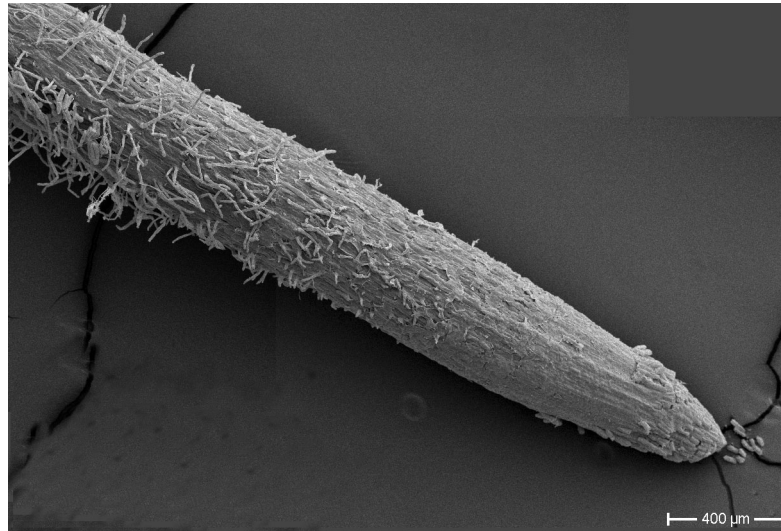


Abbildung 22: *Triticum aestivum*: REM-Aufnahme der Kontrollwurzel mit *bulges* und Wurzelhaaren

In der nun folgenden Tabelle sind Ergebnisse der untersuchten Wurzelparameter zusammengefasst.

	Kontrolle	10^{-9} - 10^{-6} M CuSO ₄	10^{-5} M CuSO ₄	10^{-4} M CuSO ₄	10^{-3} M CuSO ₄	10^{-2} M CuSO ₄
Wachstum (nach 24h)	ja	ja	ja	nein	nein	nein
Stopp nach	konstantes Wachstum	konstantes Wachstum	konstantes Wachstum	einigen Stunden (12h)	sofort	sofort
Absterben nach	nie	nie	nie	einigen Stunden	<1 Stunde	<1 Stunde
Zustand (24h)	lebend	lebend	lebend	tot	tot	tot
Spitze (24h)	gelblich-weiß, spitz	gelblich-weiß, spitz	etwas bräunlich, spitz	gelb-orange, etwas verdichtet, teils Spitze etwas abgeflacht	bräunlich, ocker, sehr dicht, teils Spitze etwas abgeflacht	intensiv gelb, sehr dicht, teils Spitze etwas abgeflacht
Spitzenzellen, abgeschülfert (24h)	große runde Organellen, Zellkern rund	große runde Organellen, Zellkern rund	große runde Organellen, Zellkern rund, selten Zellkern etwas kontrahiert und braun	brauner, kontrahierter Zellkern; braunes, koaguliertes Plasma Protoplast abgehoben	brauner, kontrahierter Zellkern, braunes koaguliertes Plasma, Protoplast abgehoben	brauner, kontrahierter Zellkern, braunes koaguliertes Plasma, Protoplast abgehoben
Rhizodermiszellen (im Gewebe, nach 24h)	hell, schließen dicht aneinander	hell, schließen dicht aneinander	braun, stark abgerundet, daher keine gerade Wurzelspitzenoberfläche, lange nur <i>bulges</i> , unregelmäßig angeordnet	braun, unregelmäßig angeordnet, herausgewölbt, einzelne <i>bulges</i>	braunschwarz, geplatzt, Plasmaauflage	braunschwarz, geplatzt, Plasmaauflage
Schleimschicht (24h)	wenig mächtig	wenig mächtig	weniger mächtig	fehlt bzw. dünn	dick	dick
Bakterienbefall (24h)	mittelmäßig	mittelmäßig	mittelmäßig	stark	mittelmäßig	gering

Distanz der ersten Wurzelhaaren (24h)	normal	normal	stark vergrößert	stark vergrößert	keine Neubildung von Wurzelhaaren	keine Neubildung von Wurzelhaaren
Distanz der ersten bulges (24h)	normal	normal	normal	vergrößert	keine Neubildung von <i>bulges</i>	keine Neubildung von <i>bulges</i>
Längenwachstum der Zellen des Grundmeristems (24h)	normal, längliches Aussehen	normal, längliches Aussehen	etwas abgeschwächt, daher quadratisches Aussehen, teils sogar abgerundet, polsterartig	abgeschwächt, daher quadratisches Aussehen der Zellen,	nein	nein
Zellen des Grundmeristems (24h)	die neu gebildeten Zellen des Grundmeristems nehmen rasch an Volumen zu und sind hell	die neu gebildeten Zellen des Grundmeristems nehmen rasch an Volumen zu und sind hell	die neu gebildeten Zellen des Grundmeristems nehmen langsamer an Volumen zu und sind meist hell	in das Grundmeristem sind regelmäßig klein gebliebene, tote, braune Zellen eingestreut, die polsterförmig sind		

Tabelle 6: *Triticum aestivum*: Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzeln

6.2.2.2.1 Wachstumsgeschwindigkeit

Zur Erfassung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde das innerhalb 24 Stunden neu gebildete Wurzelstück abgemessen (**Abb. 23**). Weiters wurde die Wachstumsgeschwindigkeit in 2-Stunden-Intervallen miteinander verglichen um eine mögliche Ab- oder Zunahme in der Wachstumsgeschwindigkeit wahrzunehmen. Die Versuche wurden an je 20 - 40 Pflanzen in 6 Ansätzen untersucht.

Trotz der auch hier auftretenden starken Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb der einzelnen Konzentrationen ließ sich dennoch etwas aus den Ergebnissen der Wurzelwachstumsversuche ablesen.

Kupfer wirkte stark toxisch auf das Wachstum der Wurzel.

Bis 10^{-6} M gab es keinen signifikanten Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel gegenüber der Kontrolle. Die Wachstumsgeschwindigkeit blieb während der Beobachtung ebenfalls konstant mit einem 2-stündlichen Wachstum zwischen 0,6 und 1,8/2,0 mm und durchschnittlich mit 1,1 mm in 2 Stunden. In 10^{-5} M CuSO_4 wuchs die Wurzel langsamer als in der Kontrolle, zwischen 0,6 und 1,2 mm in 2 Stunden, durchschnittlich 0,8 mm. Die Wachstumsgeschwindigkeit blieb aber im Beobachtungszeitraum von 24 Stunden konstant. Bei 10^{-4} M CuSO_4 wuchs die Wurzel 4 bis 12 Stunden lang mit abgeschwächter Geschwindigkeit (0,2 bis 1,2 mm, durchschnittlich 0,4 mm in 2 Stunden) weiter und stellte dann ihr Wachstum ein.

Bei Konzentrationen ab 10^{-3} M CuSO_4 hörte die Wurzel beim Einsetzen in die Kupferlösung sofort zu wachsen auf.

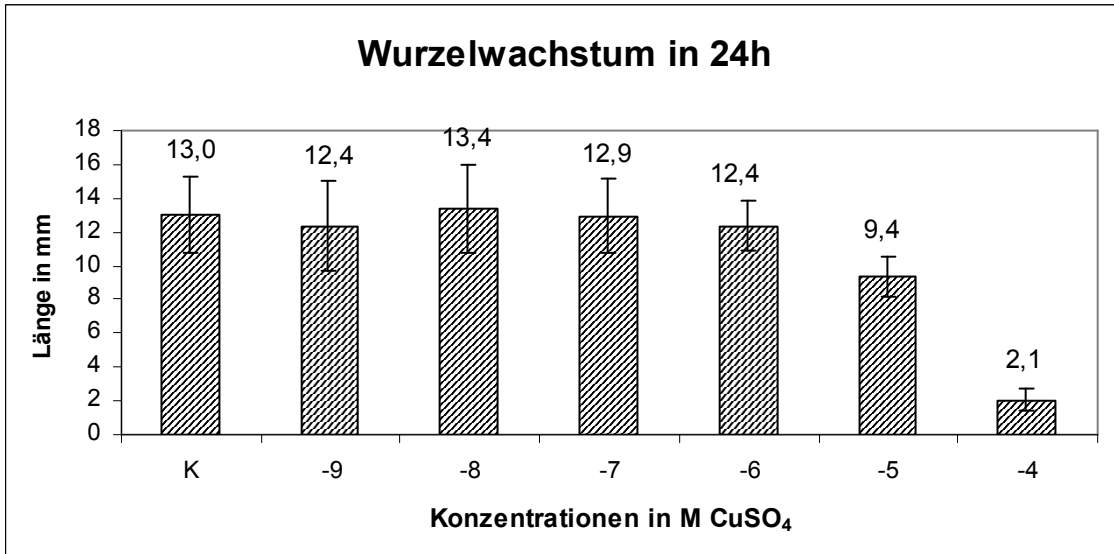


Abbildung 23: *Triticum aestivum*: Wachstum der Wurzel in Kupfersulfat

6.2.2.3 Morphologie der Wurzelspitze

Die Veränderung der Morphologie wurde im Lichtmikroskop und im Stereomikroskop bewertet. Dabei wurde die Wurzeloberfläche, die Farbe der Wurzel, insbesondere der Rhizodermis- und der Wurzelspitzenzellen, die Form der Spitze und die Schleimschicht an jeweils 10 Pflanzen in einem Zeitraum von 24 Stunden beobachtet.

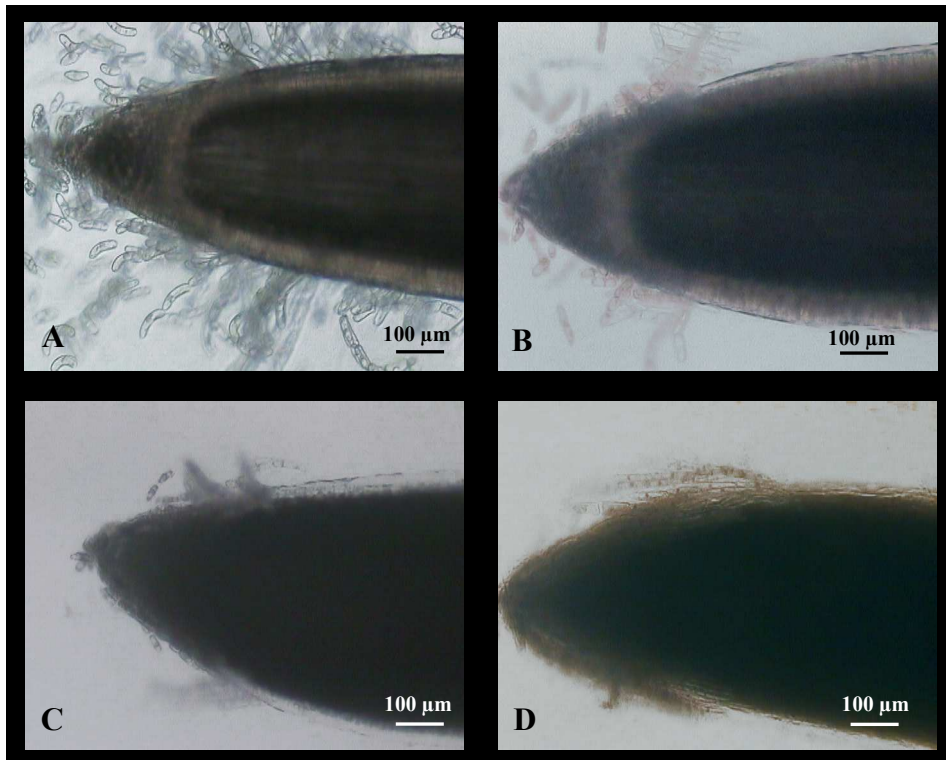


Abbildung 24: *Triticum aestivum*: Wurzelspitzen in Kupfersulfat

nach 24 Stunden in: A: Puffer; B: 10^{-4} M CuSO_4 ; C: 10^{-3} M CuSO_4 ; D: 10^{-2} M CuSO_4

In **geringen** Kupferkonzentrationen **bis 10^{-4} M** (Abb. 24A) blieb die Wurzel innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden lebend. Daher erhielt die Wurzelspitze ihre spitze Form und helle, gut durchleuchtbare Färbung.

Wurzeln in Kupferkonzentrationen von **10^{-4} M oder mehr** (Abb. 24B-D) starben aber nach wenigen Stunden in der Lösung ab. In Folge dessen veränderte die Wurzel ihr Aussehen stark.

Die Wurzelspitze verfärbte sich zuerst gelb, dann braun. Die Verfärbung der Wurzelspitze begann an der äußersten Spitze mit den abgeschülfernten Spitzenzellen und erfasste innerhalb weniger Stunden die ersten Millimeter der Wurzel. Die Braunfärbung war auf die Koagulation des Plasmas und den Abbau des Zellkernes in den

abgeschülfernten Zellen, den Rhizodermiszellen, aber auch im Meristem und der umgebenden Parenchymzellen zurückzuführen. Die Wurzelspitze wirkte abgerundet-stumpf, da die abgeschülfernten Zellen an der Spitze verloren gingen und keine neuen nachgebildet wurden.

Weiters wurde die abgestorbene Wurzel zunehmend durch Bakterien befallen, die Schleimschicht wurde nicht ausgebildet oder stark abgebaut.

Diese Prozesse liefen in den Konzentrationen 10^{-2} und 10^{-3} M nach 1 bis 3 Stunden ab, in 10^{-4} M starb die Wurzel erst nach bis 12 Stunden ab, der Abbau erfolgte anschließend.

6.2.2.3.1 *Rhizodermis*

In Rhizodermiszellen und in den abgestorbenen Spitzenzellen der Wurzel wurden die Zellkerne, der Protoplast, die Organellen und die Zellwand beobachtet.

Die Rhizodermiszellen der Kontrolle und von Konzentrationen bis 10^{-6} M CuSO_4 hatten eine gerade Außenkante, lagen dicht an dicht und bildeten daher eine glatte gemeinsame Oberfläche. Nach 24 Stunden waren sie lebend und intakt.

In 10^{-5} M CuSO_4 waren die Rhizodermiszellen, welche vor dem Kontakt mit Kupfersulfat gebildet worden waren, ebenso ausgebildet wie in der Kontrolle (nicht dargestellt).

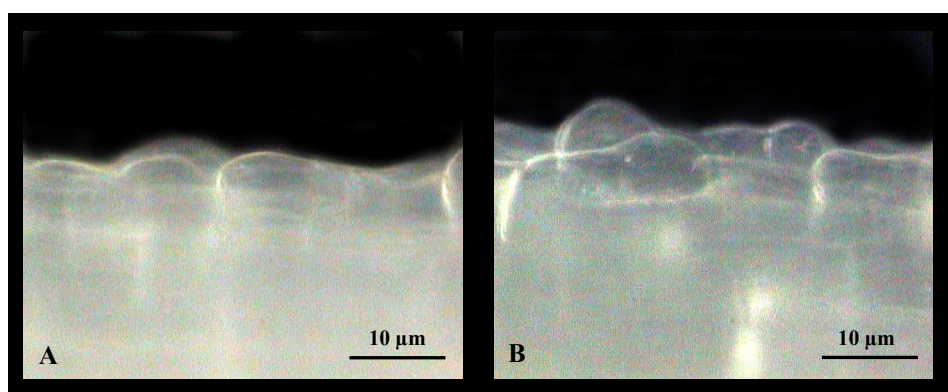


Abbildung 25: *Triticum aestivum*: Rhizodermiszellen in Kupfersulfat

A, B: nach 24 Stunden in 10^{-5} M CuSO_4 (Dunkelfeld)

Bei den Zellen des neu gewachsenen Rhizodermisabschnittes war dieses Bild jedoch anders (Abb. 25). Die Zellen wölbten sich auf, hatten teils Ausstülpungen, die Ecken

der Zellen waren abgerundet, einige Rhizodermiszellen nahmen auch eine blasige, unregelmäßige Form an. Diese Ausstülpungen ließen sich nicht immer von *bulges* unterscheiden, denn einige von ihnen waren sicher unregelmäßige *bulges* an einer beliebigen Position der Rhizodermiszelle. Daher gab es im neu gebildeten Wurzelbereich keine glatte Oberfläche mehr.

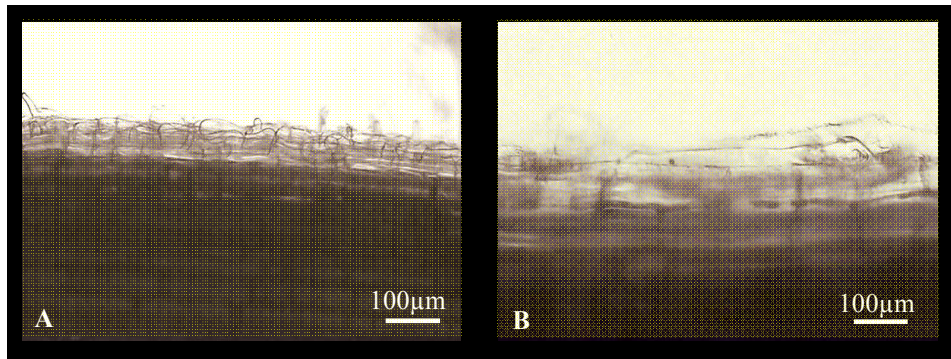


Abbildung 26: *Triticum aestivum*: Rhizodermiszellen in Kupfersulfat

A-B: nach 24 Stunden in 10^{-5} M CuSO_4 (Hellfeld): die Rhizodermiszellen sind geplatzt oder wölben sich vor, Wurzelhaare setzten an einer beliebigen Position an

In 10^{-4} M (Abb. 26) starben die neu gebildeten Rhizodermiszellen nach maximal 16 Stunden ab. Sie verfärbten sich dabei braun, einige Zellen platzten. Bakterien wurden wahrscheinlich durch dass, die Wurzel umgebende Plasma angelockt.

Die Braunfärbung der Rhizodermiszellen war vermutlich auf koaguliertes Plasma und Ausfällungen von Proteinen mit Kupfer zurückzuführen. Falls im ältesten Bereich der Wurzel neue *bulges* oder Wurzelhaare entstanden, saßen diese (wie bei 10^{-5} M) an einer beliebigen Position der Rhizodermiszelle und die Außenwände der Rhizodermiszellen waren dann ebenfalls etwas nach außen gewölbt.

Aus all diesen Vorgängen ergab sich ein „unordentliches“ Erscheinungsbild des neuen Wurzelabschnittes.

Interessanterweise waren vor der Kupferzugabe gebildete Rhizodermiszellen zwar ebenfalls abgestorben, platzten aber nicht.

In **stärkeren** Konzentrationen erfolgte kein Wurzelwachstum, daher wurden nur alte Wurzelabschnitte beobachtet. Hier starben die Rhizodermiszellen rasch ab, sie wurden nach maximal einer Stunde braun. Dabei koagulierte das Plasma, die Zellkerne verloren an Volumen, einige Zellen platzten auch. Daher waren auch die Wurzeln mit koaguliertem Plasma umgeben, was viele Bakterien anzog. Allerdings waren die

Wurzeln weniger mit Bakterien umgeben als bei 10^{-4} M, was möglicherweise mit einem auf die Bakterien toxisch wirkenden Effekt des Kupfers zusammen hing.

6.2.2.3.2 Grundmeristem

In der Kontrolle wuchsen die vom Apikalmeristem neu gebildeten Zellen des Grundmeristems rasch und gewannen an Volumen (**Abb. 27A**). Dabei war die Volumszunahme in alle Zellen gleichmäßig.

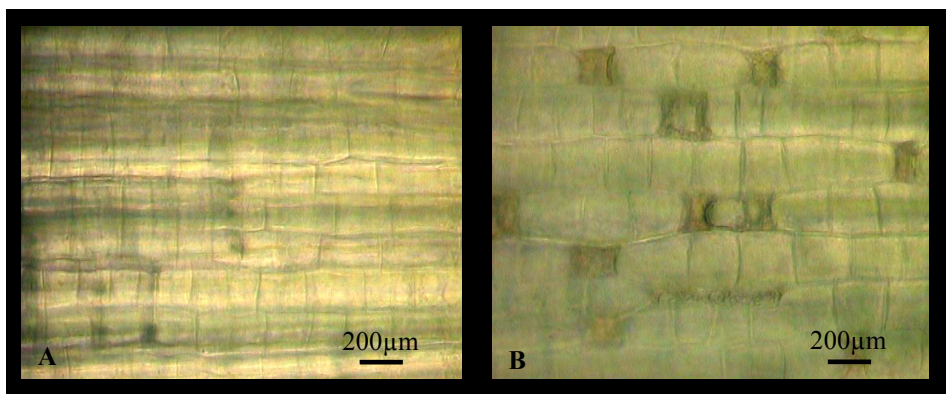


Abbildung 27: *Triticum aestivum*: frisch geteilte Rhizodermiszellen in Kupfersulfat
nach 24 Stunden in: **A**: Puffer, **B**: 10^{-4} M CuSO_4 , „polsterförmige“ Zellen

In 10^{-4} M CuSO_4 (**Abb. 27B**) erfolgte aber im spitzennächsten Abschnitt eine Veränderung der Zellen des Grundmeristems. Einige regelmäßig verteilte Zellen starben nach wenigen Stunden in Kupfersulfat ab und blieben daher kleiner als die anderen. Dabei verloren sie den Turgor und wurden von den Nachbarzellen eingedrückt. Dadurch erhielten sie ein „polsterförmiges“ Aussehen. Häufig war dabei der Protoplast abgehoben.

6.2.2.3.3 Spitzenzellen

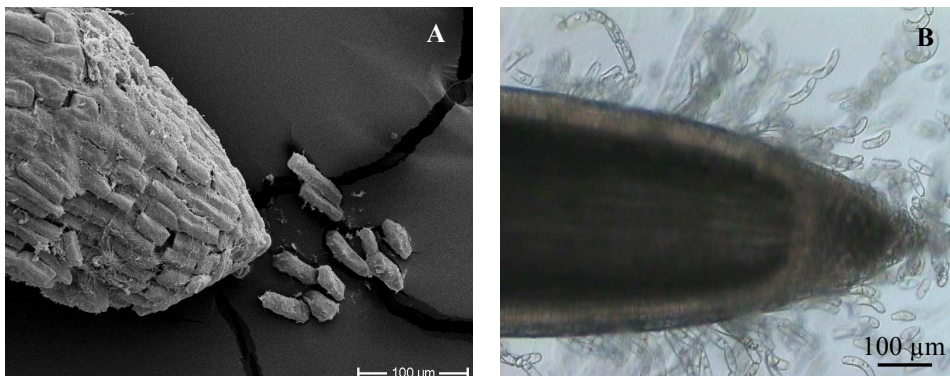


Abbildung 28: *Triticum aestivum*: REM- und LM-Aufnahmen der Wurzelspitze mit Spitzenzellen: Kontrolle: abgeschülfernte Spitzenzellen: A: im REM; B: im LM

Nach 24 Stunden wurde auch der Zustand der abgeschülfernten Zellen an der Wurzelspitze untersucht.

Die abgeschülfernten Zellen der Wurzelspitze waren in der Kontrolle (Abb. 28 und Abb. 29A) sowie in den Konzentrationen bis 10^{-6} M CuSO_4 lebend, der Protoplast füllt die Zelle völlig aus, große Organellen waren über die Zelle verstreut. Kleinere Organellen bewegten sich in Brown'scher Bewegung.

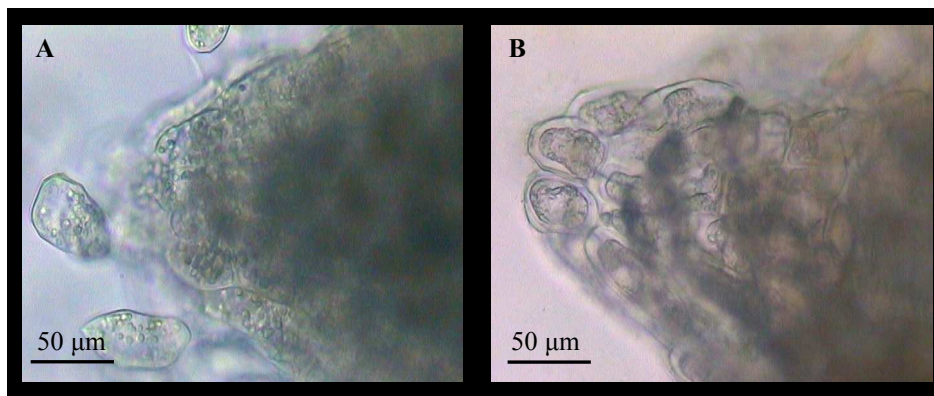


Abbildung 29: *Triticum aestivum*: Wurzelspitze mit Wurzelspitzenzellen

A: Kontrolle; B: nach 24 Stunden in 10^{-4} M CuSO_4

In stärkeren Konzentrationen (Abb. 29B und Abb. 30) hob sich der Protoplast von der Zellwand ab. Die größeren und kleineren Organellen, sowie das Plasma bildeten Klumpen und waren braun verfärbt. Die kleinen Organellen hatten die Brown'sche

Bewegung eingestellt, der Zellkern war geschrumpft, braun und erschien körnig. Der Zeitpunkt dieser Abläufe war abhängig von der Kupferkonzentration; in 10^{-4} M CuSO₄ erfolgten sie nach 10 bis 15 Stunden, in 10^{-3} M nach 3 bis 4 Stunden und in 10^{-2} M schon nach weniger als einer Stunde. Nach 24 Stunden hatten allerdings die Spitzenzellen aller Konzentrationen über 10^{-5} M denselben Zustand.

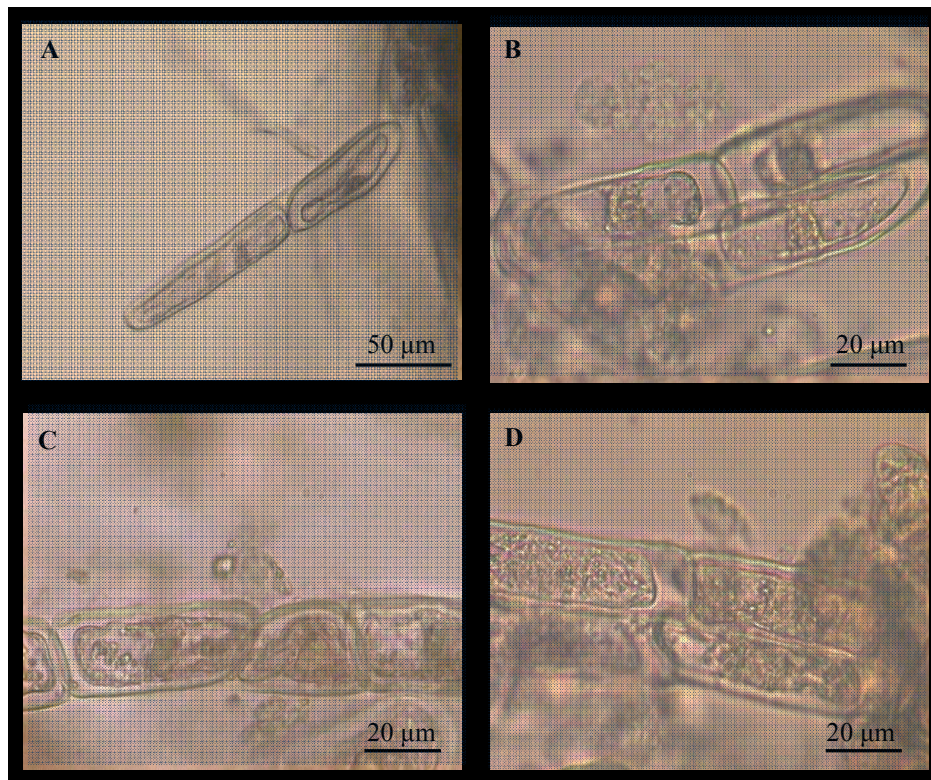


Abbildung 30: *Triticum aestivum*: abgeschülferte Wurzelspitzenzellen in Kupfersulfat

A-D: Spitzenzellen nach 24 Stunden in 10^{-2} M CuSO₄

6.2.2.3.4 *Ansatz der ersten bulges und der ersten Wurzelhaare*

Die Distanz der ersten Wurzelhaare beziehungsweise der Wurzelhaarknospen zur Wurzelspitze wurde herangezogen, um bewerten zu können, ob der Schwermetallstress auf das „*bulging*“ oder auf die Initiierung des Spitzenwachstums inhibierend wirkt. Die Distanz wurde nach 24 Stunden in den jeweiligen Lösungen erfasst. Weitere Schlüsse konnten über die Auswirkungen auf die Zellteilung oder auf das Zellwachstum gezogen werden.

Ansatz der ersten bulges

Das Auftreten der ersten *bulges* (Abb. 31, 32 und 34) variierte stark innerhalb jeder Konzentration und innerhalb jedes Versuchsansatzes.

In der Kontrolle lagen die Werte der Distanz der Wurzelspitze zu den ersten *bulges* zwischen 1350 und 2750 μm . Die durchschnittliche Distanz betrug 1960 μm .

Bei 10^{-9} M CuSO_4 zeigte sich eine geringere Distanz als in der Kontrolle, mit durchschnittlichen 1780 μm , maximal 2150 μm Distanz wurden beobachtet.

Die Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-5} M CuSO_4 unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Allerdings wies 10^{-6} M in den Spitzenwerten eine (nicht signifikant) erhöhte Distanz der *bulges* zur Wurzelspitze auf (durchschnittliche Distanz von 2350 μm , maximal 3650 μm). 10^{-5} M hatte einen etwas niedrigeren Mittelwert (2080 μm), die Senkung war aber wiederum nicht signifikant.

Bei 10^{-4} M CuSO_4 traten die *bulges* durchschnittlich nach 2500 μm und maximal nach 2700 μm auf), das war signifikant später als in schwächeren Konzentrationen.

In stärkeren Konzentrationen zeigten sich ebenfalls dieselben Distanzen wie in der Kontrolle, allerdings war dies durch den sofortigen Wachstumsstopp der Wurzel bedingt.

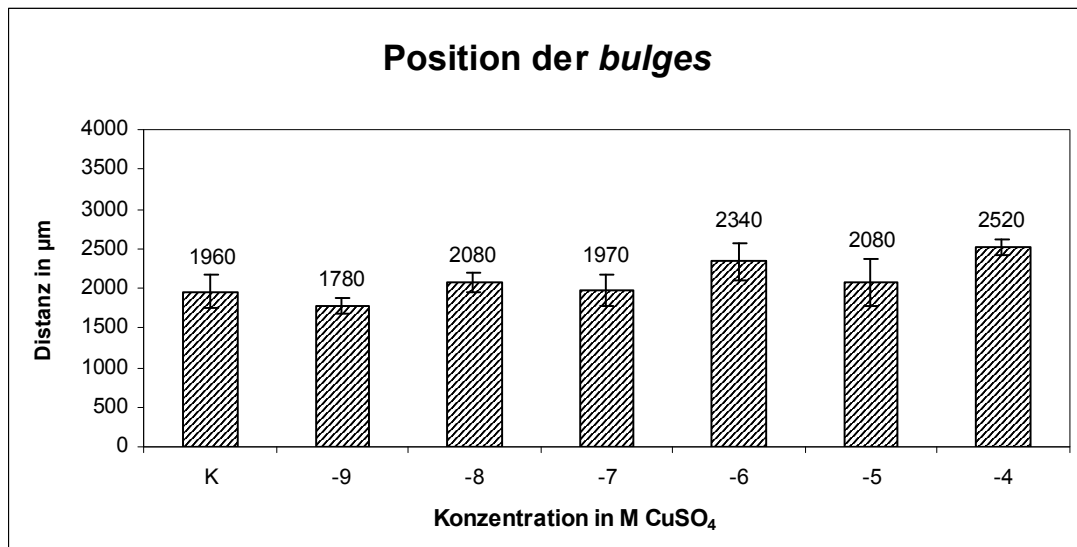


Abbildung 31: *Triticum aestivum*: Distanz der *bulges* zur Wurzelspitze in Kupfersulfat

Ansatz der ersten Wurzelhaare

Anders als beim Ansatz der *bulges* wurden stark differenzierende Werte beim Auftreten der ersten Wurzelhaare beobachtet (Abb. 32, 33 und 34).

In der Kontrolle trafen wir Distanzen zwischen 1400 und 2850 μm und eine durchschnittliche Distanz von 2000 μm . Dies entsprach, leicht versetzt, den bei den *bulges* gemessenen Distanzen, denn in der Kontrolle war die *bulge*-Region nur 50 - 100 μm lang.

Es konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M CuSO_4 festgestellt werden.

Bei 10^{-5} M traten die ersten Wurzelhaare allerdings deutlich weiter hinter der Wurzelspitze auf, was bedeutet, dass die *bulge*-Region wesentlich länger als in schwächeren Konzentrationen war. Die ersten Wurzelhaare lagen zwischen 2000 und 7400 μm von der Wurzelspitze entfernt. Die *bulge*-Region machte daher durchschnittlich 3280 μm aus (Spitzenwerte bis zu 7000 μm).

Bei 10^{-4} M CuSO_4 wurde nur in sehr seltenen Fällen, und ausschließlich bei neu gebildeten *bulges*, Spitzenwachstum eingeleitet. Diese befinden sich vereinzelt in sehr großer Distanz von der Spitze, im ältesten in der Kupferlösung gewachsenen Millimeter. Ein regelmäßiges Auftreten entlang der Wurzel war jedoch nicht gegeben.

Bei Konzentrationen von 10^{-3} M oder mehr wurden niemals neue Wurzelhaare ausgebildet.

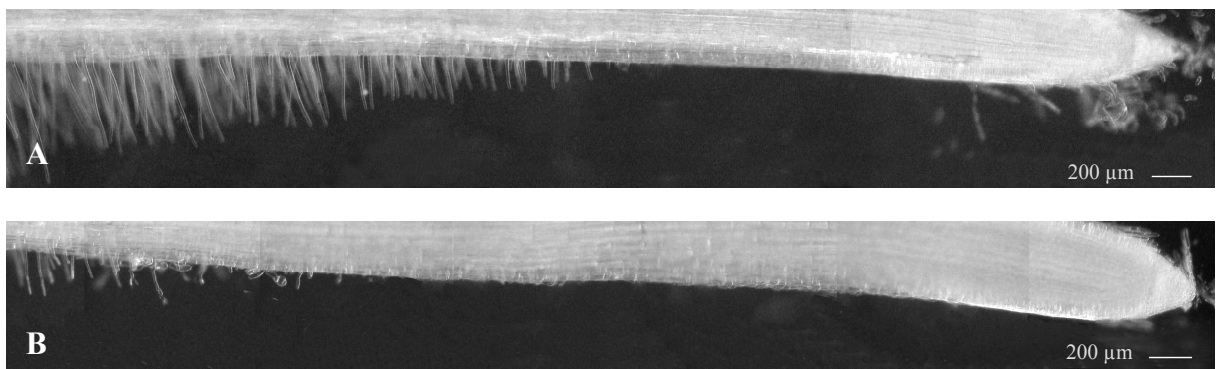


Abbildung 32: *Triticum aestivum*: Wurzelspitze mit *bulge*- und Wurzelhaaransatz in Kupfersulfat nach 24 Stunden in: A: Wachstumsmedium; B: 10^{-5} M CuSO_4

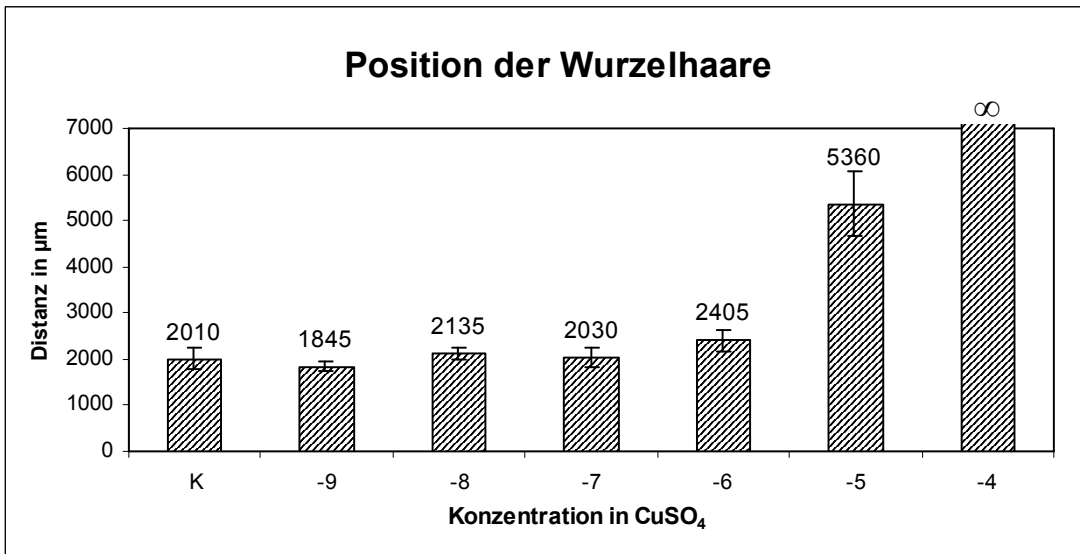


Abbildung 33: *Triticum aestivum*: Distanz der Wurzelhaare zur Wurzelspitze in Kupfersulfat

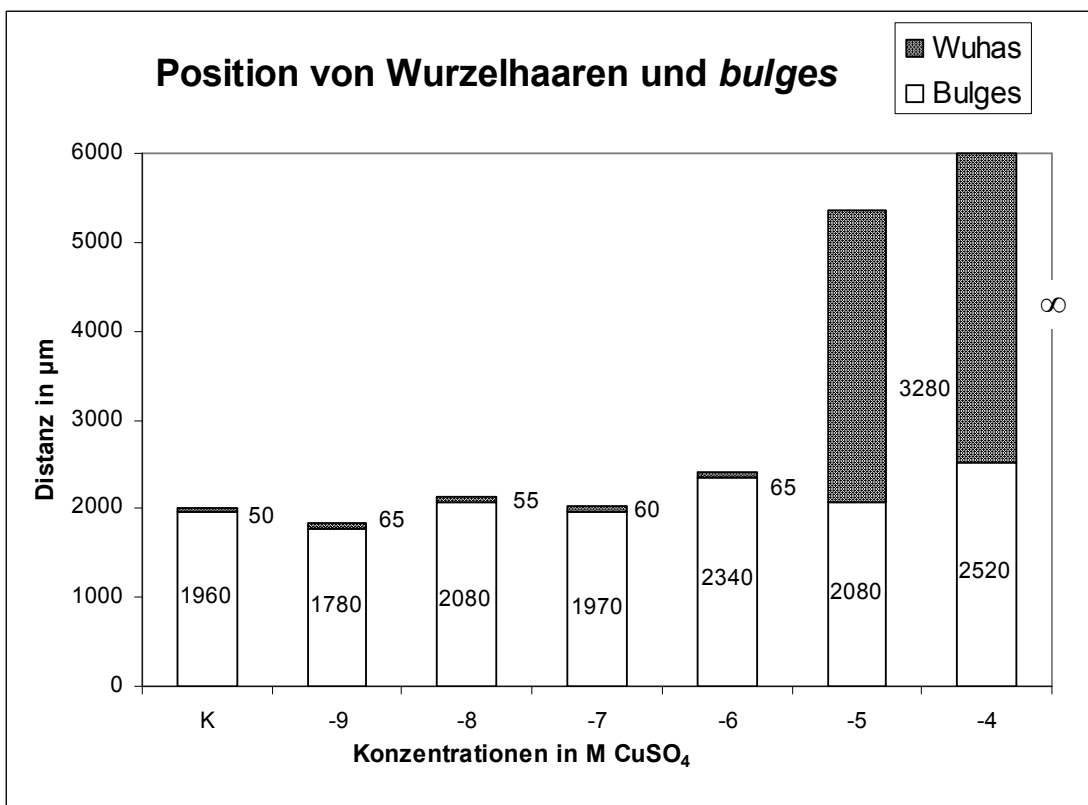


Abbildung 34: *Triticum aestivum*: Distanz von *bulges* in Relation zu den ersten Wurzelhaaren in Kupfersulfat

6.2.2.4 Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzelhaare von *Triticum aestivum*

Zur Bewertung der Wirkung des Kupfers auf die Wurzelhaare wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Bei der ersten wurden je 5-10 Pflänzchen pro CuSO_4 -Konzentration, welche 12-24 Stunden in Puffer gewachsen waren, eine Stunde lang in frischen Puffer gesetzt. Dann wurde der Puffer durch die jeweilige Schwermetalllösungen ersetzt. Hier wurde der sofortige Effekt des Kupfers auf die Wurzelhaare beobachtet. Die Beobachtung dauerte 1 bis 3 Stunden.

Im zweiten Versuchsansatz wurden 20 Keimlinge pro Konzentration vom Filterpapier direkt in die Kupfersulfatlösungen übertragen und dann die durch das Schwermetall hervorgerufenen Veränderungen analysiert. Die Beobachtung dauerte oder erfolgte nach 24 Stunden.

In der nun folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der an den Wurzelhaaren untersuchten Parameter zusammengefasst.

	Kontrolle	10⁻⁶M CuSO₄	10⁻⁵ M CuSO₄	10⁻⁴ M CuSO₄	10⁻³ M CuSO₄	10⁻² M CuSO₄
Wachstumsstopp nach	16 Stunden	16 Stunden	stoppt mehrfach, wächst dann aber weiter, endgültiger Stopp nach circa 3 Stunden	wächst sofort langsamer, stoppt nach maximal 1 Stunden	sofort	sofort
tot nach	nach 24 Stunden sind viele noch lebend	nach 24 Stunden sind viele noch lebend	nach 24 Stunden sind viele noch lebend	sofort bis meist maximal nach 8 Stunden	sofort bis meist nach maximal 1 Stunde	sofort bis 20 Minuten
Bildung neuer Wurzelhaare (24h)	ja	ja	ja	nein	nein	nein
wachsende Wurzelhaare nach 24h	ja	ja	selten	nein	nein	nein
Aussehen, Zustand (24h)	intakt, gerade wachsend	intakt, gerade wachsend	intakt, stufig gewachsen, komplizierte Formen, vakuolisiert	tot; geplatzt oder völlig vakuolisiert, teils meist 1-2 Stufen, einzelne geplatzt	tot; geplatzt oder völlig vakuolisiert, gerade gewachsen	tot; geplatzt, gerade gewachsen
Zellwand (24h)	normal, unverdickt	normal, unverdickt	stark verdickt entlang des Schlauches, an der Spitze und an Stufen	an der Spitze teils stark verdickt	an der Spitze teils leicht verdickt	normal, unverdickt
Plasma (24h)	in der Spitze dicht und fein, Vesikel; in der subapikalen Region sind größere Organellen	wie Kontrolle: in der Spitze dicht und fein, Vesikel; in der subapikalen Region sind größere Organellen	als Randbelag oder in dünnen Plasmasträngen	als Randbelag	als Randbelag, selten koaguliert	koaguliert, außerhalb des Wurzelhaars

Vakuole (24h)	Zentralvakuole im hinteren Drittel	Zentralvakuole im hinteren Drittel	Zentralvakuole in der Spitze/ etwas weiter vorne	Zentralvakuole in der Spitze	Zentralvakuole in der Spitze	Zentralvakuole in der Spitze
Zellkern (1-3h, 24h)	wie Kontrolle: Zellkern sitzt 50 bis 250 µm von der Spitze entfernt; elliptisch	wie Kontrolle: Zellkern sitzt 50 bis 250 µm von der Spitze entfernt; elliptisch	nähert sich Spitze an, etwas verformt	wandert näher zur Spitze, dann zusammengezogen	außerhalb oder nahe der Spitze, Zellkern wandert nicht, stark zusammengezogen	meist außerhalb der Zelle oder in der Entfernung von der Spitze wie vor der Zugabe, stark zusammengezogen
Verhalten nach Kupferzugabe (1-3h)	Wachstum wird gleichmäßig und unverändert fortgesetzt	wie Kontrolle: Wachstum wird gleichmäßig und unverändert fortgesetzt	Wurzelhaar wächst ungestört weiter, stoppt, bildet Zellwandverdickung aus, Plasmaspitze bleibt erhalten, wächst als Nase wieder weiter	mehrere kleinere Vakuole erscheinen, verschwinden wieder, Plasmasegel, große Organellen strömen vor und zurück, Plasma beginnt vorne zu stocken, während es hinten noch weiterströmt, Plasma in dicken Strömen	Wurzelhaar zieht sich zusammen, dann drückt Vakuole stoßartig Plasma aus Wurzelhaarspitze bis Vakuole vorne ist; oder: Vakuole schiebt sich vor, Plasma aus der Spitze wird abgezogen, Plasma wird in den Randbereich gedrückt, ist fein strukturiert	platzt, Vakuole drückt sich vor und schießt Plasma aus der Wurzelhaarspitze; in nicht zerplatzten: große Organellen in der Spitze, Plasmastau, Vakuole schiebt sich vor, Spitze leert sich
Strömungstyp (1-3h, 24h)	umgekehrter Springbrunnen, bei Wachstumsbeendigung mit Zirkulationsströmung	umgekehrter Springbrunnen, bei Wachstumsbeendigung mit Zirkulationsströmung	umgekehrter Springbrunnen, bei Wachstumsbeendigung mit Zirkulationsströmung	umgekehrter Springbrunnen, dann Zirkulationsströmung	sofort Zirkulationsströmung, dann Stopp	sofort Zirkulationsströmung, dann Stopp

Tabelle 7: *Triticum aestivum*: Wirkung von Kupfersulfat auf Wurzelhaare (1-3 Stunden/ 24 Stunden)

6.2.2.4.1 Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare wurde ab der Zugabe der CuSO₄ Lösung in einem Zeitraum von 3 Stunden ermittelt. Dafür wurde in 5 Minuten Abständen die neu gewachsene Strecke der Wurzelhaare an je 10-30 Wurzelhaare erfasst. Die Angaben pro Minute wurden rechnerisch ermittelt.

Die Wachstumsgeschwindigkeit lag bei der Kontrolle zwischen 0,6 und 1,8 µm pro Minute. Durchschnittlich wuchsen die Wurzelhaare 1,2 µm pro Minute. Bereits hier war eine gewisse Oszillation der Wachstumskurve, also ein pulshaftes Ansteigen und Abfallen der Wachstumsgeschwindigkeit bemerkbar. Meist schwankte sie um circa 0,1 µm pro Minute, es kamen aber einzelne Schwankungen bis zu 0,4 µm pro Minute vor, was eine Steigerung von bis zu 66 % bedeutet.

In den ersten drei Stunden nach Zugabe der Kupferlösung

Bei **10⁻⁶ bis 10⁻⁹ M** CuSO₄ wurde eine Wachstumsgeschwindigkeit von 0,8 bis 2 µm pro Minuten beobachtet, das Wachstum blieb über den Beobachtungszeitraum von 3 Stunden hin konstant.

Die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit bei **10⁻⁹ und 10⁻⁸ M** CuSO₄ entsprach der Kontrolle. In **10⁻⁸ M** waren aber extreme Spitzenwerte (2,2 µm pro Minute) und hohe Schwankungen bis zu 1 µm pro Minute zu beobachten, sprunghafte Anstiege und Abfälle wechselten sich mit sehr konstanten Phasen (keine bis 0,1µm Schwankungen) ab. Die meisten Wurzelhaare stellten das Wachstum nach etwa 3 Stunden ein.

In **10⁻⁷ M** war die Wachstumsgeschwindigkeit etwas niedriger als in der Kontrolle. Der Maximalwert lag bei 1,6 µm pro Minute, der Durchschnitt etwa bei 0,8 µm pro Minute. Auffällig waren die starken Schwankungen der Wachstumsgeschwindigkeit, es erfolgten abrupte Abfälle und anschließende Wachstumsbeschleunigung. Zwischen diesen Sprüngen schien die Wachstumsgeschwindigkeit konstant.

Auch in **10⁻⁶ M** lag eine Oszillation, also eine Schwankung der Wachstumsgeschwindigkeit, von durchschnittlich 0,1 µm und bis 0,3 µm vor (ähnlich der Kontrolle). Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit lag bei 1,9 µm pro Minute und

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

wurde etwa 30 Minuten nach Zugabe erreicht. Über den Beobachtungszeitraum war das Wachstum sehr regelmäßig.

Bei 10^{-5} M CuSO_4 lag die Wachstumsgeschwindigkeit zwischen 0 und $1,0 \mu\text{m}$ pro Minute, durchschnittlich aber wie in der Kontrolle etwa bei $0,6 \mu\text{m}$ pro Minute.

Bei dieser Konzentration zeigte sich ein schubartiges Wachstum, welches aber eine wesentlich stärkere Oszillation des Wachstums als die Kontrolle zeigte. Es gab Schwankungen bis zu $0,8 \mu\text{m}$ pro Minute:

Es kam häufig zum vollständigen Wachstumsstillstand; nach circa 10 Minuten nahm das Wurzelhaar das Wachstum wieder auf, allerdings nicht an der ursprünglichen Spitze des Wurzelhaares. Die Spitze verformte sich neben der alten Spitze blasig (*bulge*) und eine neue Spitze entstand im noch dünnwandigen Bereich links oder rechts neben der eigentlichen Spitze (Nase). Während der Verformung und Neuausbildung der Spitze war das polare Wachstum verringert, dann aber wuchs das Haar wieder mit seiner ursprünglichen Wachstumsgeschwindigkeit, also circa $0,6 \mu\text{m}$ pro Minute, weiter. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Meist stellten die Wurzelhaare aber das Wachstum deutlich früher ein als in weniger konzentrierten Kupferlösungen oder im Kontrollmedium (nach 1-3 Stunden).

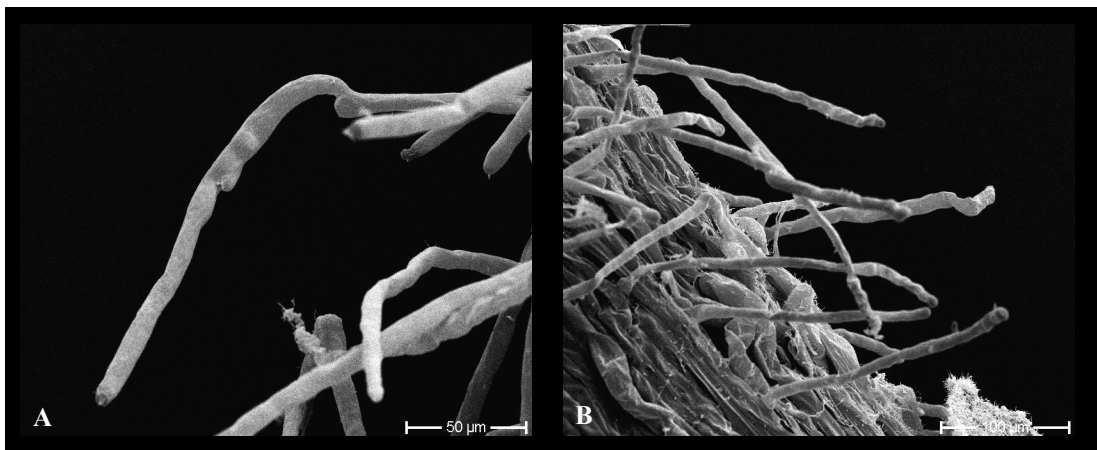


Abbildung 35: *Triticum aestivum*: REM-Aufnahme von Wurzelhaaren in Kupfersulfat

A,B: Wurzelhaare nach 24 Stunden in 10^{-5} M Kupfersulfat

Bei 10^{-4} M CuSO_4 stellten 50 % der Wurzelhaare ihr Wachstum innerhalb der ersten 20 Minuten ein, die anderen wuchsen verlangsamt (circa $1,1$ bis $0,1 \mu\text{m}$ pro Minute) weiter. Nach einer Stunde hatten circa $2/3$ das Wachstum eingestellt, die

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit lag bei $0,5 \mu\text{m}$ pro Minute. Ein allgemeiner Wachstumsstillstand erfolgte nach circa 2,5 Stunden.

In Konzentrationen von 10^{-3} M oder höher zerplatzten die Wurzelhaare innerhalb der ersten zwei Minuten oder stellten das Wachstum abrupt ein (**Abb. 36**).

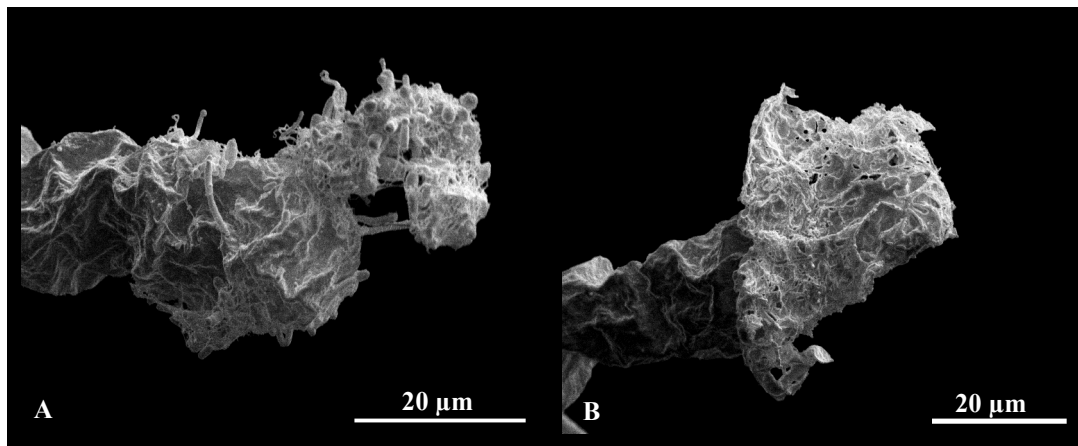


Abbildung 36: *Triticum aestivum*: geplatzte Wurzelhaare in Kupfersulfat

A, B: Wurzelhaare nach 24 Stunden in 10^{-3} M CuSO_4

Die nachfolgende Tabelle (**Tab. 8**) fasst die Werte der Wachstumsgeschwindigkeit zusammen. Abbildung (**Abb. 37**) zeigt die Schwankungen der Wachstumsgeschwindigkeit in den verschiedenen Kupferkonzentrationen.

	Maximal- geschwindigkeit pro Minute	Minimal- geschwindigkeit pro Minute	Durchschnitts- geschwindigkeit pro Minute	maximale Schwankung pro Minute	durchschnittliche Schwankung pro Minute
Kontrolle	$1,8 \mu\text{m}$	$0,6 \mu\text{m}$	$1,2 \mu\text{m}$	$0,4 \mu\text{m}$	$0,1 \mu\text{m}$
10^{-9} M	$1,8 \mu\text{m}$	$0,8 \mu\text{m}$	$1,2 \mu\text{m}$	$0,4 \mu\text{m}$	$0,1-0,2 \mu\text{m}$
10^{-8} M	$2,2 \mu\text{m}$	$0,6 \mu\text{m}$	$1,2 \mu\text{m}$	$1,0 \mu\text{m}$	$0,0-0,1 \mu\text{m}$
10^{-7} M	$1,6 \mu\text{m}$	$0,2 \mu\text{m}$	$0,8 \mu\text{m}$	$1,6 \mu\text{m}$	$0,2 \mu\text{m}$
10^{-6} M	$2,0 \mu\text{m}$	$0,6 \mu\text{m}$	$1,4 \mu\text{m}$	$0,3 \mu\text{m}$	$0,1 \mu\text{m}$
10^{-5} M	$1,0 \mu\text{m}$	$0,0 \mu\text{m}$	$0,6 \mu\text{m}$	$0,8 \mu\text{m}$	$0,2-0,3 \mu\text{m}$
10^{-4} M (nach 20 Minuten)	$1,1 \mu\text{m}$	$0,0 \mu\text{m}$	$0,5 \mu\text{m}$		
10^{-3} M	$0,0 \mu\text{m}$	$0,0 \mu\text{m}$	$0,0 \mu\text{m}$		

Tabelle 8: *Triticum aestivum*: Wurzelhaarwachstumsgeschwindigkeiten in Kupfersulfat

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

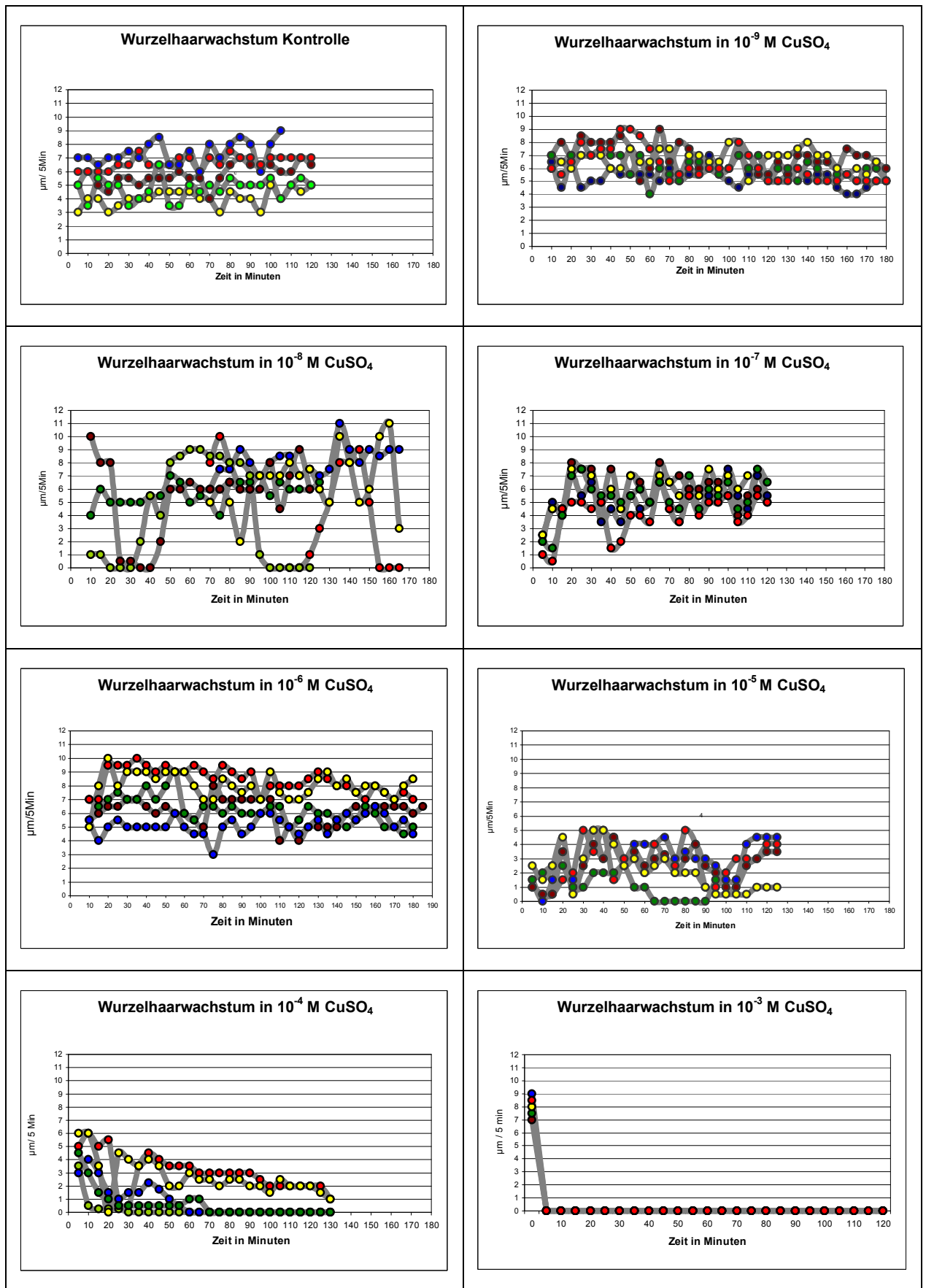


Abbildung 37: *Triticum aestivum*: Wurzelhaarwachstumsgeschwindigkeit in Kupfersulfat

Wachstum in: A: Puffer, B: 10^{-9} M; C: 10^{-8} M; D: 10^{-7} M; E: 10^{-6} M; F: 10^{-5} M; G: 10^{-4} M; H: 10^{-3} M

Nach 24 Stunden in Kupferlösung

Die Wurzelhaare wuchsen in Kupferkonzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-9} M zwischen 0,8 und 2,2 μm pro Minute. Die Wachstumsgeschwindigkeit wich zwischen den Konzentrationen nicht signifikant ab. Die Werte der Kontrolle lagen leicht darunter (0,6-2,0 μm).

In 10^{-5} M CuSO_4 gab es nur noch wenige wachsende Wurzelhaare. Diese zeigten eine deutlich herabgesetzte Wachstumsgeschwindigkeit von 0,2 bis 1,3 μm pro Minute.

In 10^{-4} M CuSO_4 oder höheren Konzentrationen gab es nach 24 Stunden keine wachsenden Wurzelhaare mehr.

6.2.2.4.2 Maximallänge neu gebildeter Wurzelhaare

Die Wurzelhaare von *Triticum* sp. erreichen nach Ekdahl (1953) unter optimalen Bedingungen eine Maximallänge von 2 mm, nach circa 24 Stunden wird das Wachstum des einzelnen Wurzelhaars eingestellt.

Wir wollten nun bei unseren Versuchsbedingungen die maximale Länge der Wurzelhaare erfassen. In unseren Versuchen hörten die Wurzelhaare nach etwas 16 Stunden zu wachsen auf. Um nun sicher zu gehen, dass die Haare ihre endgültige Länge erreicht hatten warteten wir noch einige weitere Stunden und erfassten die Länge der jeweils längsten Wurzelhaare pro Wurzel nach 24 Stunden. Hierbei haben wir sehr starke Variation festgestellt (**Abb. 38**).

Die in unseren Versuchen erfasste Maximallänge der Kontrolle betrug 1300 μm .

Die Konzentrationen 10^{-9} , 10^{-7} und 10^{-6} M CuSO_4 zeigten eine maximale Länge von 1500 μm , also um etwa 15% erhöhte Werte. Die längsten Wurzelhaare mit 1700 μm konnten bei 10^{-8} M gemessen werden. Sie waren um 30% länger als die Kontrolle.

Bei 10^{-5} M CuSO_4 erreichten die Wurzelhaare eine deutlich geringere Maximallänge als in der Kontrolle oder den niedrigeren Kupfersulfatkonzentrationen. Die längsten Wurzelhaare waren etwa 660 μm lang, was eine Minderung um etwa 50% bedeutet.

Bei 10^{-4} M CuSO_4 wurden keine, bzw. in sehr seltenen Fällen extrem kurze neuen Wurzelhaare ausgebildet, deren Länge 150 μm nicht überschritt.

In höheren Konzentrationen wurden niemals neue Wurzelhaare ausgebildet.

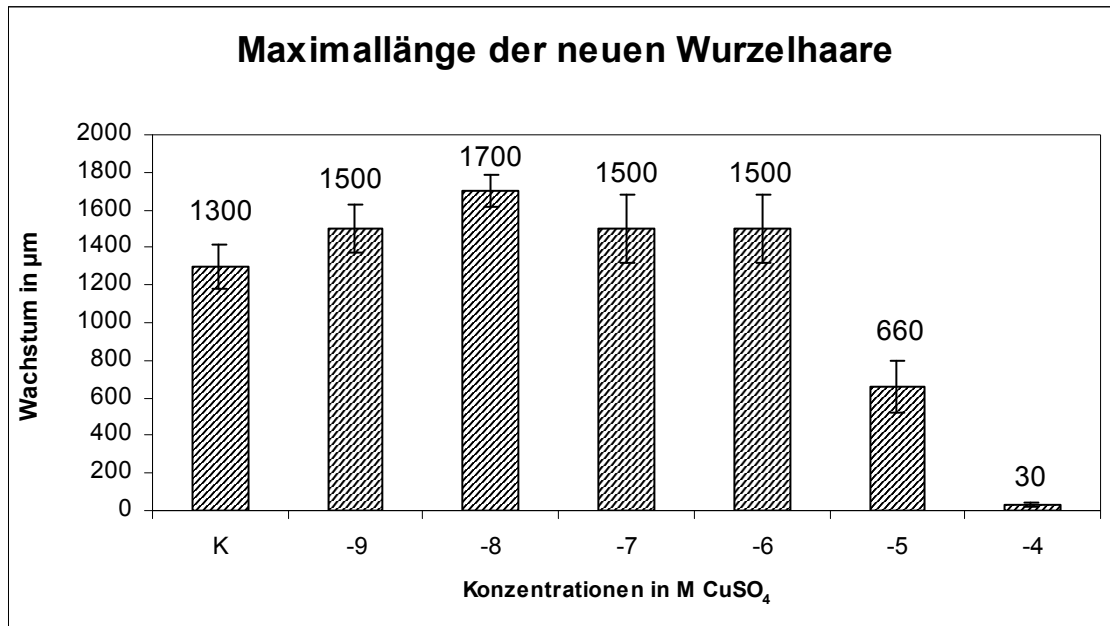


Abbildung 38: *Triticum aestivum*: Maximallänge neu gebildeter Wurzelhaare in Kupfersulfat

6.2.2.4.3 Wurzelhaarmorphologie

Die Morphologie des Wurzelhaares wurde nach 24 Stunden bewertet.

In den Konzentrationen 10^{-6} bis 10^{-9} M CuSO₄ sowie in der **Kontrolle** (Abb. 39) wuchsen die meisten Wurzelhaare völlig gerade. Einzelne aber bildeten Verzweigungen oder Stufen aus (<2%). Alte Wurzelhaare hatten nur selten leicht verdickte Zellwandspitzen.



Abbildung 39: *Triticum aestivum*: Morphologie eines Kontrollwurzelaares

In 10^{-5} M CuSO₄ hatten die meisten Wurzelhaare Verzweigungen (~75%), „Nasen“ und Stufen (Abb. 35 und Abb. 40). Dabei entstanden komplexe Wuchsformen mit bäumchenartigem, knorpeligem Aussehen. Die Spitzen nicht mehr wachsender Wurzelhaare hatten ausgeprägte Zellwandverdickungen.

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

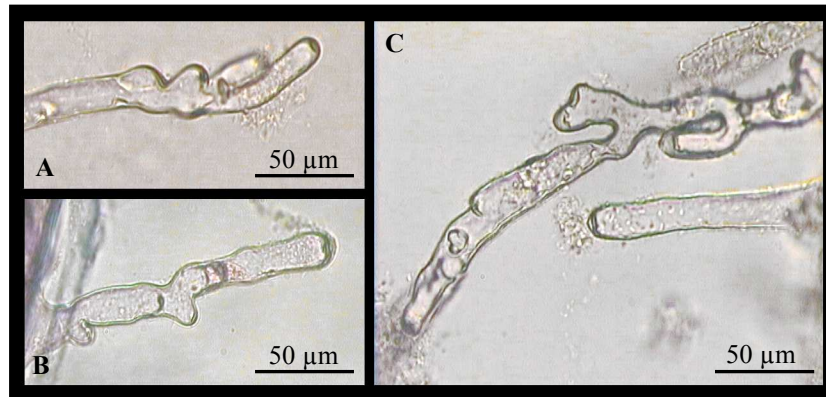


Abbildung 40: *Triticum aestivum*: Morphologie von Wurzelhaaren in 10^{-5} M Kupfersulfat

A-C: Wurzelhaare nach 24 Stunden Wachstum in 10^{-5} M Kupfersulfat machen Verzweigungen und haben eine „knorpelige“ Form

In 10^{-4} M CuSO_4 waren die meisten Wurzelhaare geplatzt. Andere, welche noch eine Zeitlang gewachsen waren, hatten aber 1 bis 2 Stufen ausgebildet (**Abb. 41**).

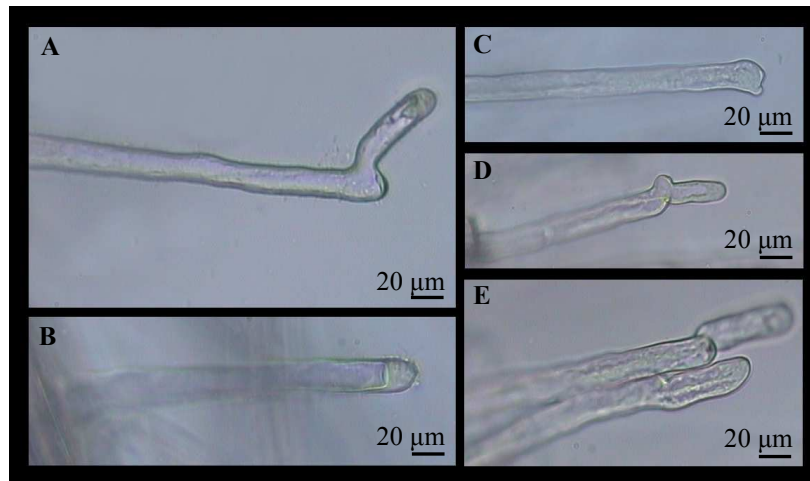


Abbildung 41: *Triticum aestivum*: Morphologie von Wurzelhaaren in 10^{-4} M Kupfersulfat

A-F: Wurzelhaare nach 24 Stunden Wachstum in 10^{-4} M Kupfersulfat wachsen stufenförmig oder bilden dicke Wurzelhaarspitzen

In höheren Konzentrationen gab es nur noch geplatzte oder aber völlig vakuolisierte Wurzelhaare (**Abb. 42**).

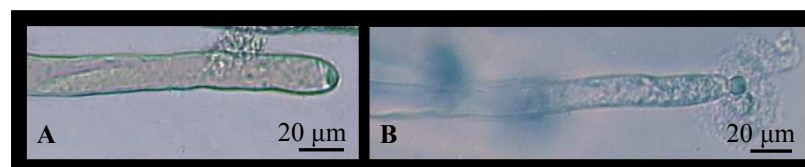


Abbildung 42: *Triticum aestivum*: Morphologie von Wurzelhaaren in 10^{-3} und 10^{-2} M Kupfersulfat

Wurzelhaare nach 24 Stunden Wachstum in A: 10^{-3} ; B: 10^{-2} M Kupfersulfat stoppen das Wachstum sofort und sind gerade, meist platzen sie nach wenigen Minuten

6.2.2.4.4 Zellwand

Nach 24 Stunden wurde auch der Effekt von Kupfer auf die Mächtigkeit und die Zusammensetzung der Zellwand von Wurzelhaaren untersucht.

Zellwanddicke

In der Kontrolle bildeten Wurzelhaare von *Triticum aestivum* eine circa 0,4 µm dicke Zellwand aus. An der Spitze ist die Zellwand dünner, da es sich nur um primäre Zellwand handelt (**Abb. 39**). Bereits in der Kontrolle bildeten sich bei mechanischem oder thermischem Stress Zellwandverdickungen an der Wurzelhaarspitze. Diese können in Folge des Wachstumsstopps des Haares auftreten, aber auch die Folge eines zwischenzeitlichen Stopps mit anschließender Ausbildung einer neuen Spitze sein. Bei guten Wachstumsbedingungen ist der Anteil von Wurzelhaaren mit verdickter Zellwand gering (<2%).

Die Zellwanddicke der Wurzelhaare wurde an Wurzeln, welche 24 Stunden in Kupferlösung gewachsen waren, untersucht.

In schwachen Kupferkonzentrationen bis 10^{-6} M war die Zellwand wie in der Kontrolle dünnwandig ausgebildet.

Bei 10^{-5} M CuSO₄ war eine Verdickung der Zellwand entlang des gesamten Wurzelhaarschlauches erkennbar (**Abb. 40**). Die Zellwanddicke machte dann etwa 1 µm aus, war also circa 2,5mal dicker als in der Kontrolle (Die Kontrolle bildete niemals Verdickungen entlang des Schlauches aus).

Weiters war die Zellwand an der Wurzelhaarspitze sehr verstärkt. Meist waren diese Verdickungen Zellwandkappen, die bis zu 12 µm mächtig sein konnten. Häufig bestanden sie aus 2 Schichten: an der äußeren Spitze aus einer großen gleichmäßigen Kappe, daran angeschlossen eine dünnere (1-2 µm dicke), manchmal knopfartige Schicht. Von dieser Schicht reichte auch manchmal ein Auswuchs weiter in den Wurzelhaarschlauch hinein.

Weitere Zellwandverstärkungen kamen an durch die Kupfereinwirkung gebildeten Verzweigungspunkten und Knicken im Wurzelhaar, also an früheren Wurzelhaarspitzen, vor. Diese Verdickungen waren teils flächig, teils knopfartig ausgebildet. Ihre Mächtigkeit fiel mit 2-6 µm deutlich geringer als bei den Wurzelhaarspitzen aus.

Schließlich gab es auch noch, über die Zellwand verteilt, einzelne punktförmige (1-2 µm Durchmesser) oder länglich-inselartige (4-6 µm Durchmesser) Verdickungen.

Bei 10^{-4} M CuSO₄ hatten die meisten Wurzelhaare keine Zellwandverdickungen, da viele kurz nach der Zugabe des Kupfersulfats geplatzt oder sofort koaguliert waren. Bei einigen jedoch war wie bei 10^{-5} M die Zellwand entlang des Wurzelhaarschlauches und an der Wurzelhaarspitze verdickt. Die Kappen konnten teils Ausmaße von bis zu 16 µm zeigen (**Abb. 41**).

Im Falle von Stufenbildung gab es auch Verdickungen an den ehemaligen Spitzen. Allerdings war Stufenbildung wesentlich seltener und in weniger komplexer Form als in 10^{-5} M zu beobachten und auch die Verdickungen waren weniger stark (maximal 3 µm).

Bei 10^{-3} M kam es in seltenen Fällen zu geringen Verdickungen an der Wurzelhaarspitze. Diese machte aber stets weniger als 2 µm aus. Der Wurzelhaarschlauch blieb dünnwandig (**Abb. 42**).

Bei **stärkeren** Konzentrationen starb das Wurzelhaar so rasch ab, dass keine Zeit zur Bildung von Zellwandverdickungen war.

Zellwandbestandteile

Anschließend an diese Untersuchung wurden nun die Verdickungen mit spezifischen Hellfeld- auf Fluoreszenzfarbstoffen auf ihre Zusammensetzung untersucht. Callose wurde mit Anilinblau, Rhamnogalacturonsäure II Pektin mit fluoreszenzmarkiertem RGII Antikörper und Cellulose mit Calcofluor White gefärbt. Ein zu erwartender Anteil an Hemicellulosen wurde nicht näher untersucht, da diese nur mit komplexen Methoden erfassbar gewesen wären.

Für jeden Ansatz wurden die Wurzelhaare von je 5 Pflanzen in den Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-5} M CuSO₄, sowie der Kontrolle untersucht.

Wurzelhaare der Kontrolle ohne Verdickungen färbten sich vor allem mit Calcofluor White (**Abb. 43D-F**) und nur wenig mit RGII an (nicht fargestellt), bestanden also hauptsächlich aus Cellulose. Verdickungen färbten wie in Kupfersulfatlösungen entstanden Zellwandverstärkungen.

Die Verdickungen waren aus allen 3 untersuchten Substanzen (Cellulose, Callose und Pektin) aufgebaut.

Der verdickte Wurzelhaarschlauch färbte stark mit CFW (**Abb. 43G-L**) und mit RGII (**Abb. 45**), nicht aber mit Anilinblau. Er war also zu einem jeweils hohen Anteil aus Cellulose und Pektin aufgebaut.

Die Verdickungen an der Spitze wiesen zur Innenseite hin eine Schicht Cellulose auf, deren Stärke der Zellwandstärke des Wurzelhaarschlauches entsprach. Daran anschließend wurde häufig ebenfalls Cellulose detektiert, allerdings meist in weitaus geringerer Menge, hier nahm Pektin einen bedeutend größeren Anteil ein. Zusätzlich wurde auch bei einigen Wurzelhaaren Callosedeposition beobachtet (**Abb. 43**). Diese war meist knopfartig, stark eingegrenzt, konnte aber vereinzelt auch einen größeren Teil der Spitze einnehmen. In einzelnen Fällen war der überwiegende Teil der Spitzen aus Cellulose gebildet.

In den größeren Verdickungen entlang des Wurzelhaarschlauches, an den ehemaligen Wurzelhaarspitzen und in den Verzweigungspunkten fand sich wiederum im Innersten eine Schicht Cellulose. An diese schlossen nun ein- oder beidseitig andere Zellwandbausteine an. Pektine waren in den meisten Fällen in großer Menge vorhanden, etwa 30% dieser Verdickungen waren aber auch aus Callose, wiederum in Knopf- oder Linsenform, aufgebaut.

Die über die Zellwand verteilten Depositionen waren aus Pektin oder Callose aufgebaut. Kleine punktförmige Verdickungen („Sand“) bestanden ausschließlich aus Callose.

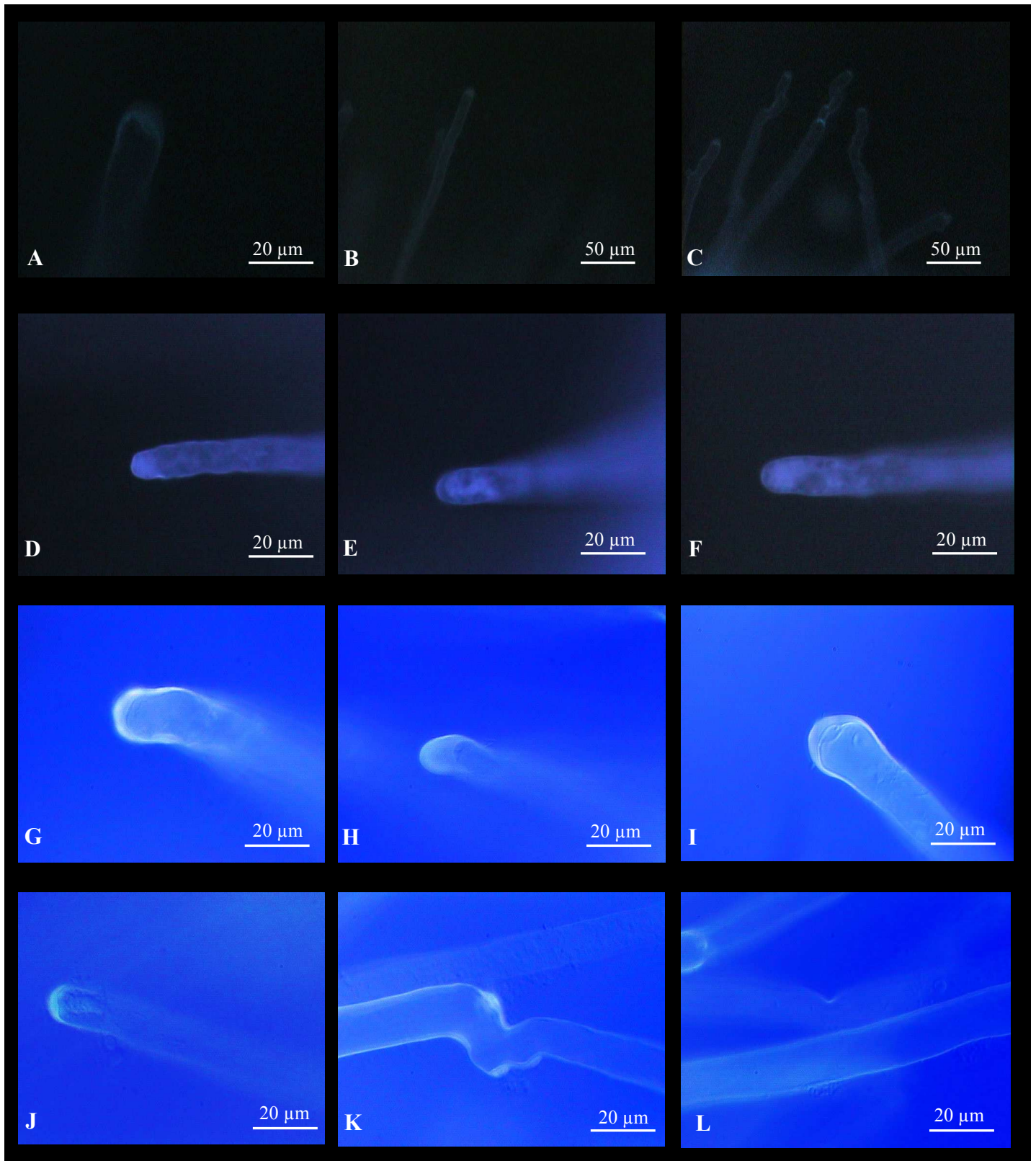


Abbildung 43: *Triticum aestivum*: Cellulosenachweis mit Calcofluor White (CFW)

Wurzelhaare nach 24 Stunden in Puffer oder CuSO_4 : **A-C**: Kontrolle ohne CFW, geringe Autofluoreszenz; **D-F**: Kontrolle mit CFW: keine Zellwandverdickungen, Zellwand färbt deutlich; **G-L**: CFW bei in 10^{-5} M CuSO_4 gewachsenen Pflanzen: deutliche Färbung entlang des Wurzelhaarschlauchs, in der Spitze und an Verzweigungspunkten

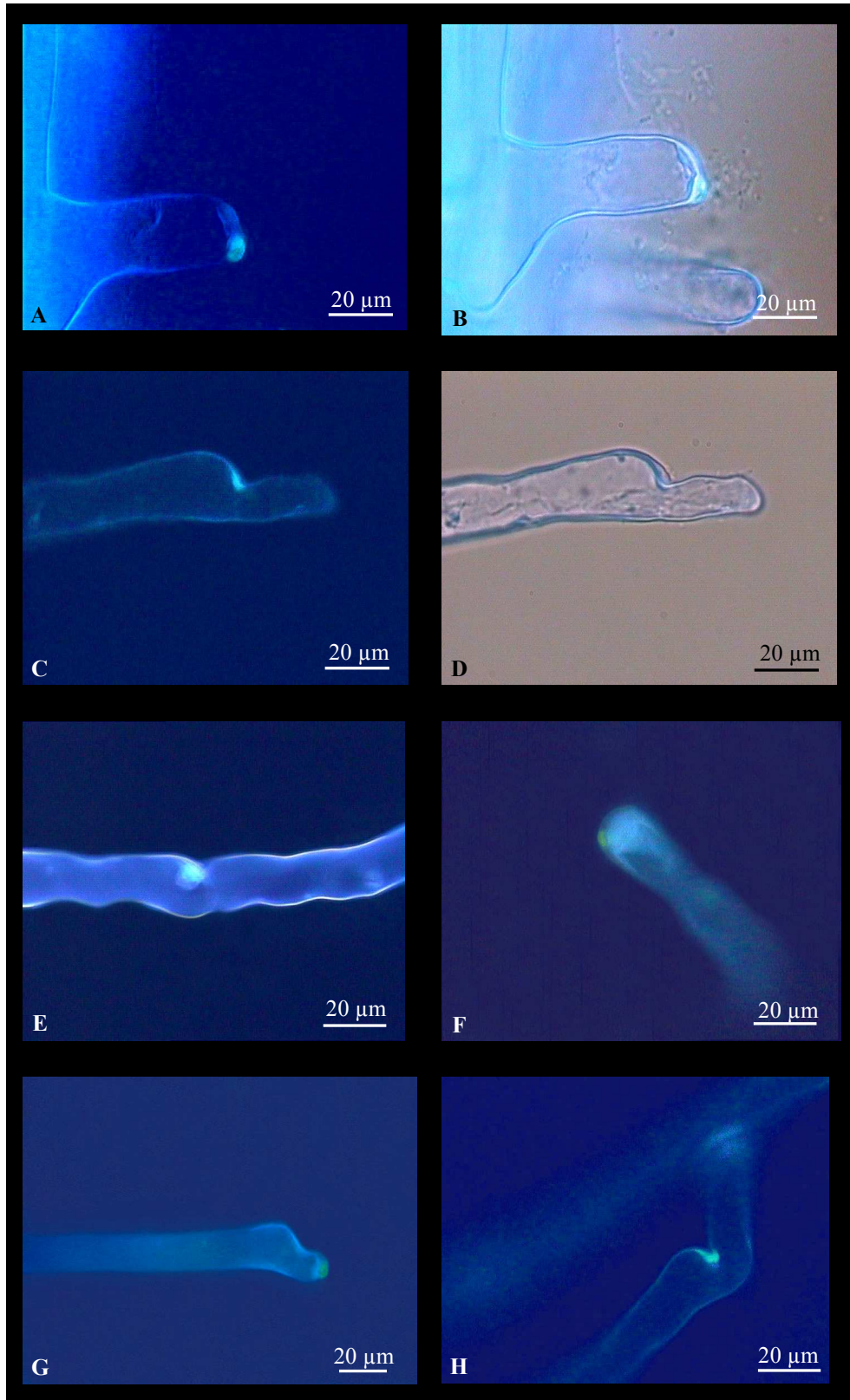


Abbildung 44: *Triticum aestivum*: Callose-Nachweis mit Anilinblau

Wurzelhaare nach 24 Stunden in 10^{-5} M CuSO_4

A+B, C+D: UV-Fluoreszenz, sowie Fluoreszenz und Hellfeld parallel; **E-H:** UV-Fluoreszenz; Autofluoreszenz ist blau, Callose ist gelb

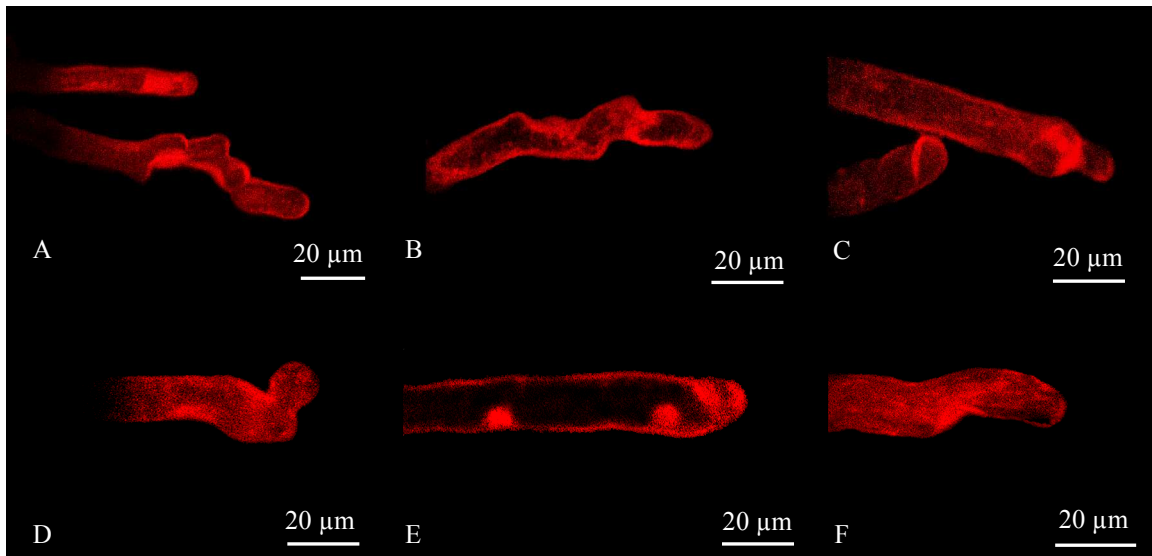


Abbildung 45: *Triticum aestivum*: Pektinnachweis mit RGII

A-F: Wurzelhaare nach 24 Stunden in 10^{-5} M CuSO_4 im CLSM

6.2.2.4.5 Strömung, Plasma, Organellenbewegung

Strömung

Die Strömung wurde in den ersten drei Stunden nach Zugabe von Kupfersulfat beobachtet.

In der Kontrolle sowie in Konzentrationen **bis 10^{-5} M** war an wachsenden Wurzelhaaren in diesem Zeitraum eine umgekehrte Springbrunnenströmung zu beobachten, welche mit Wachstumsende in Zirkulationsströmung überging.

In 10^{-4} M konnte häufig nach wenigen Minuten Zirkulationsströmung, kombiniert mit der Vakuolisierung der Wurzelhaarspitze, beobachtet werden. Nach wenigen Minuten kehrten aber viele Haare wieder zu Wachstum und umgekehrter Springbrunnenströmung zurück. Bis zu 60 Minuten nach endgültigem Wachstumsstopp konnte noch intakte umgekehrte Springbrunnenströmung beobachtet werden.

In **stärkeren** Konzentrationen gab es kein Wachstum und damit in Verbindung, ab der Zugabe der Schwermetalllösung, rasch keine Springbrunnenströmung mehr. In 10^{-3} M erfolgte der Übergang zur Zirkulationsströmung nach etwa 3-5 Minuten, die Strömung stoppte aber erst nach etwa 3 Stunden. In 10^{-2} M gingen die Wurzelhaare innerhalb der ersten 2-3 Minuten in Zirkulationsströmung über und strömten sehr langsam. Nach 20 bis 30 Minuten stellten sie dann das Wachstum völlig ein. In 10^{-1} M CuSO_4 platzten alle Wurzelhaare sofort, sodass in keinem Fall Strömung zu detektieren war.

Plasma

Das Plasma befindet sich bei wachsenden Wurzelhaaren der Kontrolle in der Spitze sowie im vorderen Drittel des Wurzelhaarschlauches. Bei Zugabe von geringen Kupferkonzentrationen blieb diese Verteilung erhalten.

Bei toxischen Konzentrationen zwischen 10^{-4} und 10^{-2} M verschwand die vesikelreiche Region der Wurzelhaarspitze, die Vakuole drängte sich nach vorne und das Plasma begann sich in Richtung Rhizodermiszelle zurückzuziehen. Dabei bildeten sich „Plasmasegel“, tropfenförmige große Plasmaansammlungen, welche sich wellenartig entlang von Plasmasträngen in Richtung Wurzelhaarspitze oder Basis bewegten. Die Geschwindigkeit der Plasmaströmung wurde mit dem Rückzug des Plasmas beschleunigt.

Nach einigen Minuten leerte sich die Spitze, die Plasmastränge wurden dünner und nur noch einzelne Organellen bewegten sich entlang der Cytoskelettbahnen. Schließlich stockte das verbleibende Plasma im Wurzelhaarschlauch. Meist blieben jedoch nur einzelne Organellen zurück, welche „griesartig“ entlang der Plasmamembran klebten, in der Wurzelhaarspitze blieben häufiger auch größere Plasmamengen zurück.

In starken Konzentrationen (10^{-1} und 10^{-2} M CuSO_4) oder bei geplatzen Wurzelhaaren, konnte das Plasma nicht schnell genug und daher nicht vollständig in die Rhizodermis abfließen und stockte deshalb im Wurzelhaar oder (bei den geplatzen Haaren) in der umgebenden Kupfersulfatlösung.

Organellenbewegung

Die regelmäßige Bewegung von Organellen entlang Plasmasträngen blieb bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M erhalten.

In **stärkeren** Konzentrationen gingen die kleineren Organellen nach einigen Minuten in Brown'sche Bewegung über. In 10^{-2} M erfolgte dies nach circa 12 Minuten, in 10^{-1} M bereits nach Minuten. Nur noch wenige Organellen befanden sich entlang der ehemaligen Plasmastränge und vibrierten nur noch leicht.

6.2.2.4.6 Zellkernposition

In Wurzelhaaren hat man generell eine sehr fixe Position des Zellkernes in Bezug auf die Wurzelhaarspitze beobachtet. Bei *Triticum aestivum* ist die Position etwas flexibler, dennoch gibt es in wachsenden Wurzelhaaren einen bestimmten Aufenthaltsbereich des Zellkerns.

Die Beobachtung des Zellkernes erfolgte während der ersten drei Stunden nach Zugabe des Kupfersulfates im Hellfeld, nach 24 Stunden wurde zur verbesserten Wahrnehmung der Zellkernposition und der Form an fixierten Wurzelhaare eine Färbung mit DAPI durchgeführt. Dann wurden mit Fluoreszenzlicht im UV-Bereich die Form und die Position des Zellkernes im Bezug auf die Wurzelhaarspitze und die Haarlänge an je 50–150 wachsenden und ausgewachsenen Wurzelhaaren beobachtet.

In ausgewachsenen oder abgestorbenen Wurzelhaaren hatte der Zellkern einen variablen Abstand von der Spitze. Er war an der Wurzelhaarspitze, an der Basis oder an einer beliebigen Position im Schlauch des Wurzelhaars zu finden. Daher wurde die Reaktion auf Kupfersulfat ausschließlich an wachsenden Wurzelhaaren erforscht.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Wurzelhaarlänge und der Distanz des Zellkernes zur Wurzelhaarspitze festgestellt werden. Allerdings befand sich der Zellkern von jungen Wurzelhaaren der Kontrolle bis zu einer Länge von 300 µm noch in der Rhizodermis.

In der Kontrolle (**Abb. 46** und **Abb. 47E-F**) hielt sich der Zellkern von wachsenden Wurzelhaaren zwischen 54 und 205 µm, durchschnittlich 89 µm von der Wurzelhaarspitze auf. Dieselbe Bandbreite von Distanzen zeigten sich auch bei 10^{-9} bis 10^{-6} M CuSO₄.

Bei wachsenden Wurzelhaaren der Konzentration 10^{-5} M lag der Zellkern jedoch deutlich näher der Spitze (**Abb. 46** und **Abb. 47C-D**). Direkt nach Zugabe der Kupfersulfatlösung (innerhalb der ersten 5 Minuten) wanderte der Zellkern vor zur Wurzelhaarspitze und hielt sich dort bis zum Wachstumsstopp auf. Der Zellkern war 15 -75 µm von dieser entfernt, durchschnittlich lag er etwa 43 µm hinter der

ERGEBNISSE: KUPFERVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

Wurzelhaarspitze. In jungen Wurzelhaaren (ab 45 μm Länge) befand sich der Zellkern, im Gegensatz zur Kontrolle, häufig schon im Wurzelhaar. Nach 24 Stunden, also zum Beobachtungszeitpunkt, gab es in 10^{-4} M CuSO_4 (Abb. 47A-B) keine wachsenden Wurzelhaare mehr. Der Zellkern saß bei vakuolisierten Wurzelhaaren in der Rhizodermis oder an der Basis des Haares, bei koagulierten Wurzelhaaren war er häufig auch nahe der Wurzelhaarspitze anzutreffen.

Bei Beobachtung von noch wachsenden Wurzelhaaren (innerhalb der ersten Minuten nach dem Transfer in die Kupferlösung) hielt sich der Kern jedoch wie bei 10^{-5} M nahe der Spitze auf.

In sehr starken Kupferkonzentrationen (10^{-1} - 10^{-3} M) platzten die meisten Zellen, bei 10^{-1} M sogar alle Zellen. Daher waren die Kerne nicht mehr an ihrer Position, sondern außerhalb des Wurzelhaares oder in dessen Spitze zu finden.

In noch intakten (nicht geplatzten) Haaren saß der Kern in der Rhizodermis oder, seltener, in der Basis des Haares. Bei 10^{-3} und 10^{-2} M war der Kern bereits wenige Minuten nach der Schwermetallzugabe nicht mehr im Schlauch des Wurzelhaares, da er rasch in die Rhizodermiszelle zurückgezogen worden war.

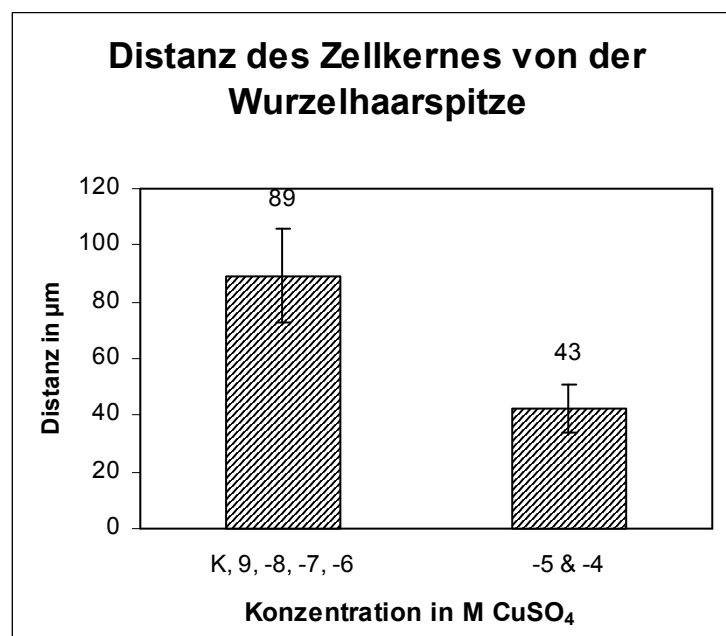


Abbildung 46: *Triticum aestivum*: Position des Zellkernes in Kupfersulfat wachsende Wurzelhaare nach 24 Stunden: Distanz des Zellkernes von der Wurzelhaarspitze

6.2.2.4.7 Zellkernform

Der Zellkern hatte bei wachsenden Wurzelhaaren eine längliche Form, mit einem meist parallelogrammartigen oder rechteckartigen Querschnitt, war aber auch häufig an seinem, der Wurzelspitze zugewandten Ende etwas zugespitzt (**Abb. 47E-F**).

Die Zellkernform ist wahrscheinlich auf ziehende Kräfte, welche bei der Migration des Kernes durch F-Aktinbündel auf diesen wirken, zurückzuführen. Dabei ist die Oberfläche des Zellkern bei wachsenden Wurzelhaaren leicht gekerbt und eingestülpt (Bruaene, 2003).

In Wurzelhaaren, die ihr Wachstum eingestellt hatten, waren die Kerne häufig länglich zugespitzt oder gestaucht, kugelig, in jedem Fall hatten sie aber ein kleineres Volumen. Die Zellmembran hat meist starke Vorsprünge (Bruaene, 2003).

Diese Zellkernformen konnten auch bei schwachen Kupferkonzentrationen bis 10^{-5} M beobachtet werden (**Abb. 47C-D**). In starken Kupferkonzentrationen veränderte sich der Zellkern jedoch.

Bei 10^{-4} M CuSO_4 war der Zellkern sehr vielfältig geformt (**Abb. 47A-B**). Stets war er deutlich zusammengezogen, also kleiner. Er war nun entweder kurz und kompakt oder durch Einschnürungen und Lappen strukturiert. Darüber hinaus beobachteten wir auch Zellkerne, die lang und dünn waren.

Bei noch stärkeren Konzentrationen (10^{-1} bis 10^{-3} M) war der Zellkern so stark geschrumpft oder lag dünn an der Plasmamembran anliegend, dass er oft schwer zu finden war. Die Oberfläche des Zellkernes war körnig und zerklüftet.

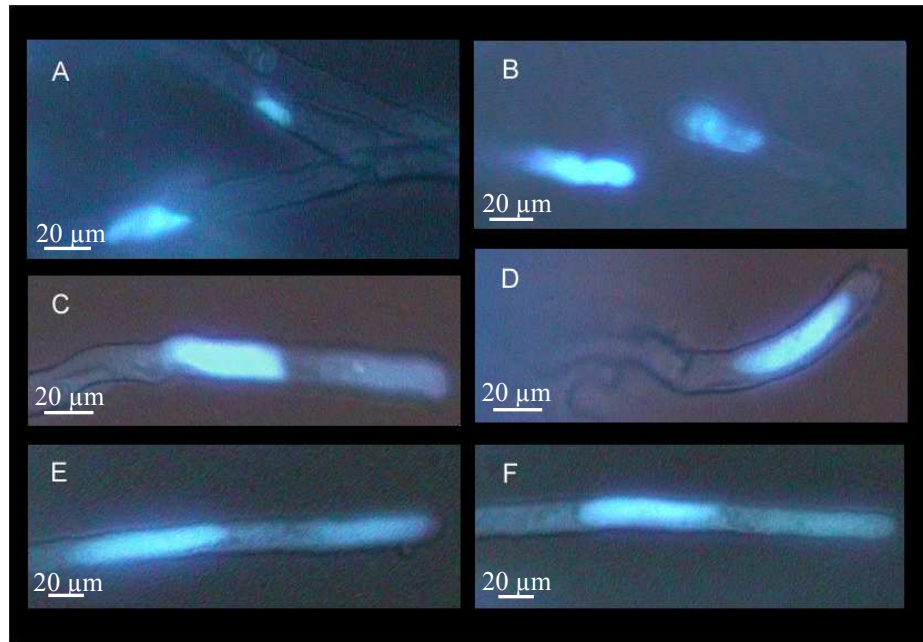


Abbildung 47: *Triticum aestivum*: Zellkernform und Position in Kupfersulfat

nach 24 Stunden in **A, B:** 10^{-4} M CuSO_4 , Zellkern kontrahiert; **C, D:** 10^{-5} M CuSO_4 , Zellkern der Spitze angenähert; **E, F:** Puffer

6.2.3 Zinkversuche bei *Triticum aestivum*

Zink, als häufig vorkommendes und in großen Konzentrationen toxisches Schwermetall, ist in der Landwirtschaft sehr bedeutend, weshalb weltweit nach Kultursorten gesucht wird, die höhere Konzentrationen im Boden ertragen, also tolerant sind. Bei nicht toleranten führt Zink zur Wurzelhaarbildung näher am Meristem, was auf eine geringe Zellteilung zurückgeführt wird (Peterson and Stevens, 2000).

Wir verglichen die Kupferreaktion unserer Weizensorte mit ihrer Reaktion auf Zink.

Zinkversuche wurden mit Zinksulfat (ZnSO_4) gelöst in Phosphatpuffer in den Konzentrationen 10^0 bis 10^{-7} M, durchgeführt. 10^0 M ist bereits gegenüber den Zellen hypertonisch, belastet diese also zusätzlich noch durch osmotischen Stress.

In unseren Versuchen hat sich gezeigt, dass Zink wesentlich weniger toxisch auf die Wurzeln von *Triticum aestivum* wirkt als Kupfer. Es erfolgte in den meisten Fällen eine Verschiebung der toxischen Effekte um ein bis zwei Zehnerpotenzen.

6.2.3.1 Wirkung von Zinksulfat auf die Keimung von *Triticum aestivum*

Wie bei den Kupferversuchen wurden die Keimlinge nach der Quellung in destilliertem Wasser auf mit Schwermetalllösung zwischen 10^{-7} und 1 M getränktes Filterpapier gesetzt. Es wurden in zwei Versuchsansätzen je circa 15 Pflanzen 48 Stunden lang gezogen und anschließend die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel und die Veränderungen an Häufigkeit und Gestalt der Wurzelhaare erfasst. Die Keimung erfolgte nach circa 24 Stunden (**Abb. 50**).

Wie auch in Kupfersulfat variierte die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzeln innerhalb jeder Konzentration, zumal auch zwischen der ersten und den späteren Keimwurzeln, sehr stark (**Abb. 49**).

6.2.3.1.1 Keimrate

Die Keimrate der Kontrolle lag bei 73%, in den Konzentrationen 10^{-7} bis 10^{-3} M $ZnSO_4$ unterschied sich diese nicht signifikant von der Kontrolle (Werte zwischen 73 und 90%).

Bei 10^{-2} M $ZnSO_4$ variierte die Keimrate in einem Versuchsansatz nicht signifikant von der Kontrolle, im zweiten war sie auf nur 17% der Kontrolle abgesenkt.

Bei 10^{-1} M $ZnSO_4$ erfolgte meist keine Keimung, in wenigen Fällen (20%) waren der Ansatz von Hypocotyl und Wurzel sichtbar. Ab einer Konzentration von 1 M $ZnSO_4$ keimte *Triticum aestivum* nie.

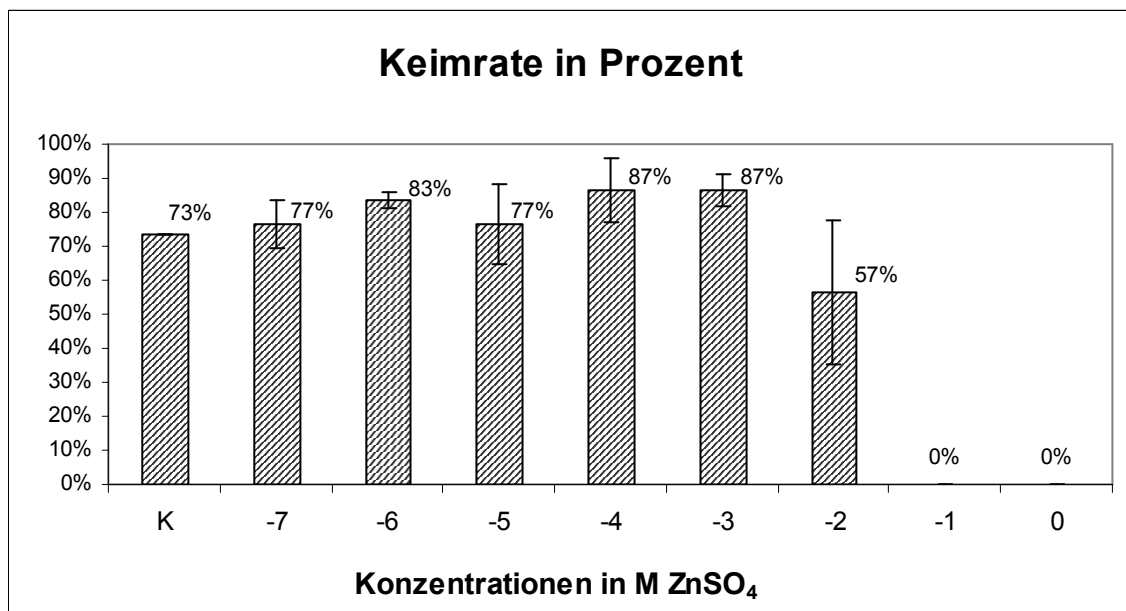


Abbildung 48: *Triticum aestivum*: Wirkung von Zinksulfat auf die Keimrate

6.2.3.1.2 Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel

Der Wachstumserfolg der Kontrolle (48 Stunden nach der Quellung) machte etwa 13,3 mm aus, eine Längenzunahme zwischen 5 und 26 mm war allerdings möglich.

Zwischen den Konzentrationen 10^{-7} und 10^{-3} M $ZnSO_4$ war das Wachstum der Wurzel nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle, die Werte lagen zwischen 5 und 31 mm.

In 10^{-2} M $ZnSO_4$ wich das Wachstum im ersten Ansatz nicht signifikant von der Kontrolle ab, im zweiten war die Längenzunahme aber deutlich geringer mit einem

ERGEBNISSE: ZINKVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

mittleren Wachstum von 3,5 mm. Im Mittel drückt sich das als eine leichte, signifikante Minderung aus.

Ab einer Konzentration von 10^{-1} M ZnSO_4 erfolgte kein Wachstum der Wurzel mehr.

Im nachstehenden Diagramm (Abb. 49) sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel in Zinksulfat dargestellt.

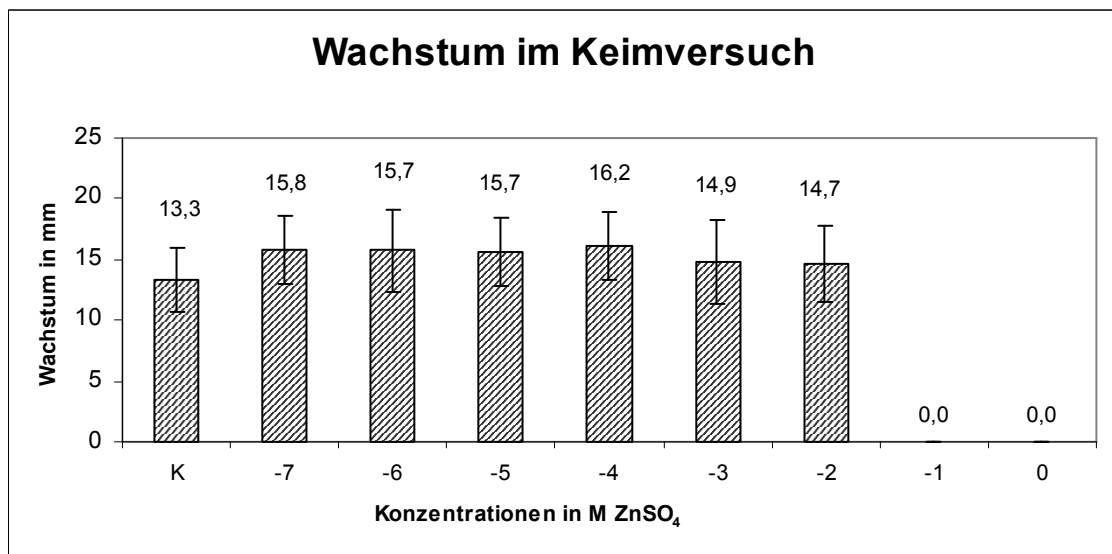


Abbildung 49: *Triticum aestivum*: Wirkung von Zinksulfat auf das Wachstum der Keimwurzel

6.2.3.1.3 Distanz der Wurzelhaare von der Wurzelspitze

In der Kontrolle und in Zinksulfatkonzentrationen bis 10^{-3} M waren die ersten *bulges* durchschnittlich 1800 μm von der Wurzelspitze entfernt, die ersten Wurzelhaare noch etwa 50 bis 100 μm weiter.

In 10^{-2} M waren *bulges* und Wurzelhaare aber deutlich der Wurzelspitze angenähert. *bulges* waren in einer Distanz von durchschnittlichen 1100 μm von der Wurzelspitze zu finden, die Wurzelhaare wie in der Kontrolle 50 bis 100 μm später (nicht abgebildet).

6.2.3.1.4 Wurzelhaare

In der Kontrolle, sowie in den Konzentrationen 10^{-7} bis 10^{-2} M ZnSO_4 waren die Maximallänge und die Dichte der Wurzelhaare gleich.

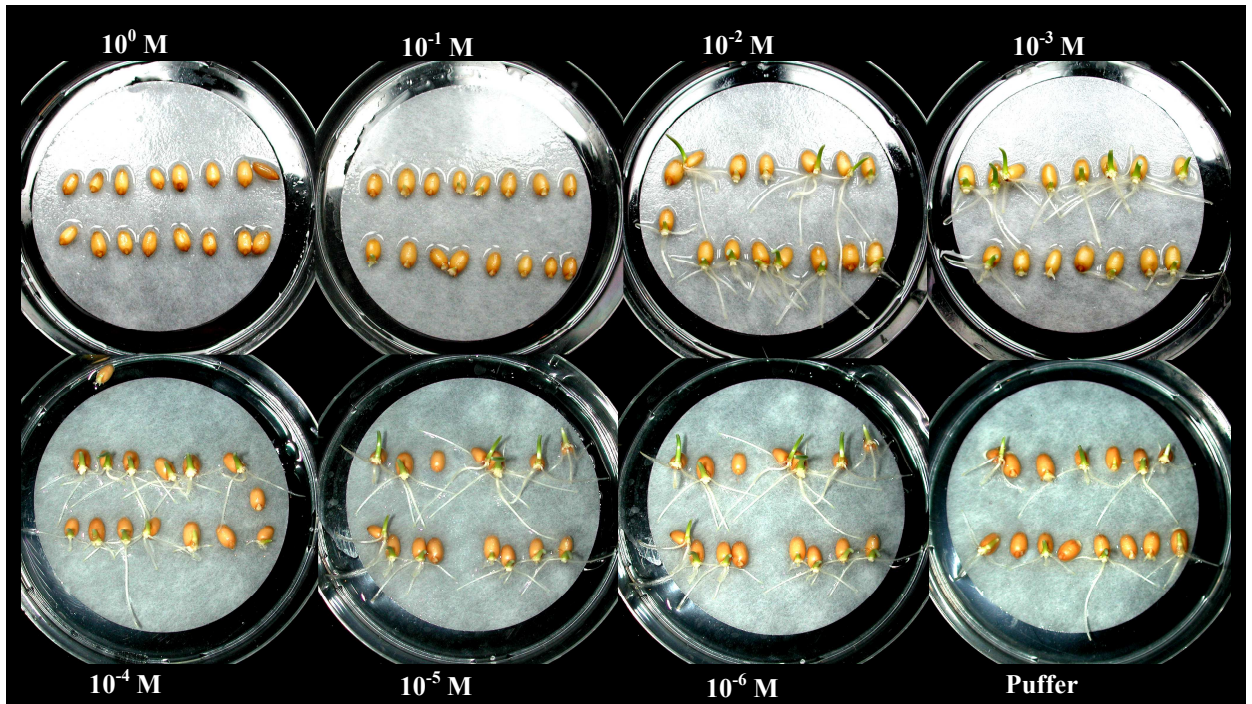


Abbildung 50: *Triticum aestivum*: Keimung in Zinksulfat

6.2.3.2 Wirkung von Zinksulfat auf Wurzeln von *Triticum aestivum*

In destilliertem Wasser gekeimte Pflänzchen wurden in Zinksulfatlösungen von 10^{-7} bis 10^0 M gesetzt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16 und 24 Stunden analysiert.

Hierbei wurden die Wachstumsgeschwindigkeit und die morphologischen Veränderungen der Wurzel sowie das Auftreten von *bulges* und Wurzelhaaren untersucht.

In der nun folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der an den Wurzeln untersuchten Parameter zusammengefasst.

	Kontrolle	10^{-4} bis 10^{-7} M $ZnSO_4$	10^{-3} M $ZnSO_4$	10^{-2} M $ZnSO_4$	10^{-1} M $ZnSO_4$	1 M $ZnSO_4$
Wachstum (24h)	ja	ja	ja	nein	nein	nein
Stopp nach	konstantes Wachstum	konstantes Wachstum	konstantes Wachstum	12 bis 16 Stunden	maximal 6 Stunden	sofort
Absterben nach	nie	nie	nie	14 bis 18 Stunden	maximal 8 Stunden	maximal 1 Stunde
Zustand (nach 24h)	lebend	lebend	lebend	tot	tot	tot
Spitze (nach 24 h)	gelblich-weiß, spitz	gelblich-weiß, spitz	gelblich-weiß, spitz	gelblich-braun, abgerundet	gelblich-braun, abgerundet	gelblich-braun, abgerundet
Distanz zu den ersten Wurzelhaaren (nach 24h)	normal	normal	etwas vergrößert	deutlich vergrößert	keine Neubildung von Wurzelhaaren	keine Neubildung von Wurzelhaaren
Distanz zu den ersten <i>bulges</i> (nach 24h)	normal	normal	etwas vergrößert	deutlich vergrößert	keine Neubildung von <i>bulges</i>	keine Neubildung von <i>bulges</i>

Tabelle 9: *Triticum aestivum*: Wirkung von Zinksulfat auf Wurzeln

6.2.3.2.1 Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel wurde in Zinksulfat an circa 15 Pflanzen pro Konzentration untersucht. Es zeigte sich wiederum eine starke Streuung der Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb der jeweiligen Konzentrationen (**Abb. 51**).

Die Wurzel der Kontrolle wuchs zwischen 0,6 und 1,0 mm in 2 Stunden mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,7 mm.

In niedrigen Zinkkonzentrationen konnte ein rascheres Wachstum als bei der Kontrolle beobachtet werden, allerdings war die Beschleunigung nicht signifikant. Zwischen 10^{-7} und 10^{-3} M $ZnSO_4$ wuchs die Wurzel durchschnittlich 0,9 mm in 2 Stunden.

In 10^{-2} M $ZnSO_4$ war die Wachstumsgeschwindigkeit zu Beginn gleich wie in den anderen Konzentrationen. Nach 8-12 Stunden erfolgte aber eine deutliche Verlangsamung des Wachstums, nach 12-16 Stunden stellte die Wurzel das Wachstum ein.

In 10^{-1} M $ZnSO_4$ verlangsamte das Wurzelwachstum sofort auf durchschnittlich 0,3 mm in 2 Stunden. Nach maximal 6 Stunden erfolgt ein völliger Wachstumsstillstand.

In 10^0 M wuchs die Wurzel ab der Zugabe des Zinksulfats nicht weiter.

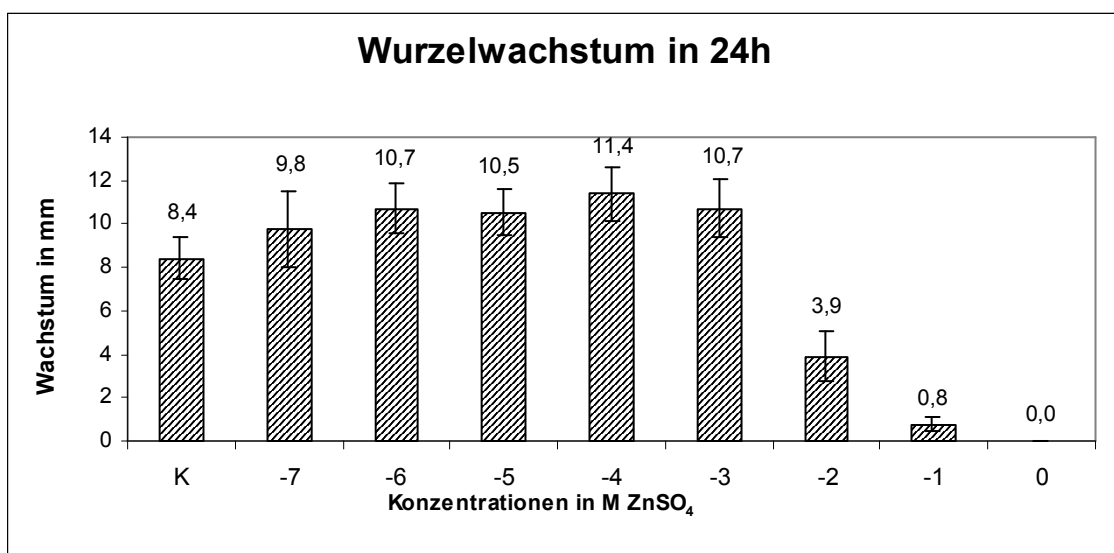


Abbildung 51: *Triticum aestivum*: Wurzelwachstum in Zinksulfat

6.2.3.2.2 *Wurzelspitze*

Die Wurzelspitze war wie in Kupfersulfat nach dem Absterben der Wurzel (in Konzentrationen von 10^{-2} M ZnSO₄ oder **mehr**) gelblich-braun verfärbt (vergleiche **Abb. 24**). Diese Verfärbung erfasste bei 10^{-2} M ZnSO₄ den gesamten neu gewachsenen Bereich, in **stärkeren** Konzentrationen die drei spitzennächsten Millimeter der Wurzel.

Häufig war in 10^{-2} M ZnSO₄ die Wurzel im neu gewachsenen Bereich verdickt.

6.2.3.2.3 *Ansatz der ersten bulges und Wurzelhaare*

Eine Vergrößerung der Distanz zwischen den ersten *bulges* (**Abb. 52 und Abb. 54**) und der Wurzelspitze sowie eine leichte Verzögerung des Auswachsens der *bulges* zu Wurzelhaarschläuchen (**Abb. 53 und Abb. 54**) konnte durch Zinksulfat beobachtet werden:

In der Kontrolle, sowie in den Konzentrationen 10^{-7} bis 10^{-4} M ZnSO₄ erschienen die ersten *bulges* 1350 bis 2750 µm hinter der Wurzelspitze. Die ersten Wurzelhaare begannen 50-100 µm dahinter.

Bei 10^{-3} M begannen die Wurzelhaare deutlich ferner der Wurzelspitze. Im Mittel waren sie 2750 µm, maximal 3500 µm hinter der Wurzelspitze. Das Spitzenwachstum war also leicht verzögert, die Wurzelhaarbildung setzte erst 145 µm hinter den *bulges* ein.

Bei 10^{-2} M wurden häufig keine neuen Wurzelhaare und wenn doch, dann nur wenige und kurze gebildet. Sie waren nur in denen ersten 500 µm, welche nach dem Transfer der Wurzel in die Zinklösung gewachsen waren, zu finden, waren also zwischen 2500 und 7300 µm von der Wurzelspitze entfernt. Auch hier war die Retardierung des Spitzenwachstums nur gering mit durchschnittlich 300 µm hinter der *bulge*-Region.

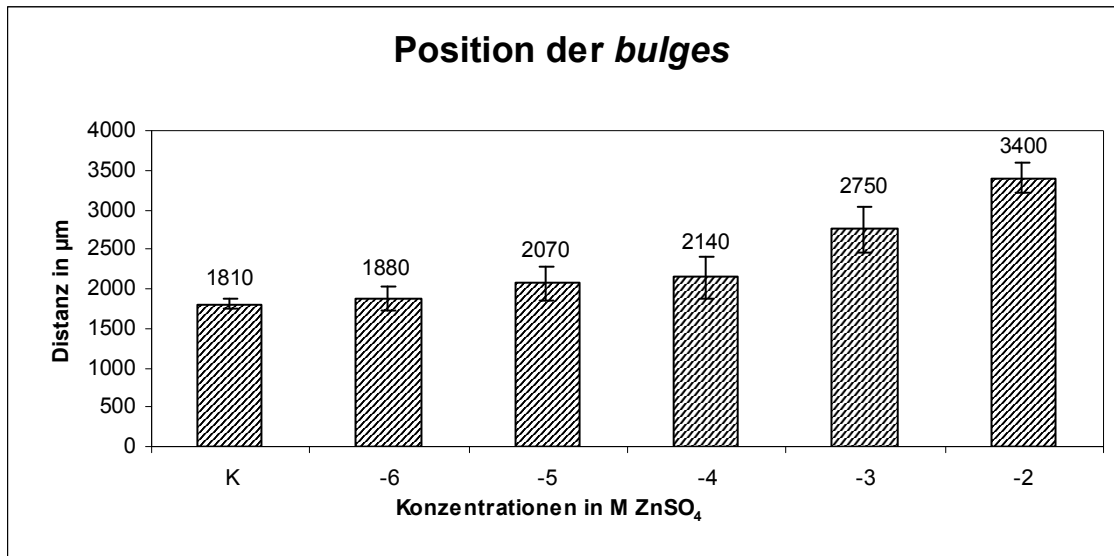


Abbildung 52: *Triticum aestivum*: Distanz der *bulges* von der Wurzelspitze in Zinksulfat

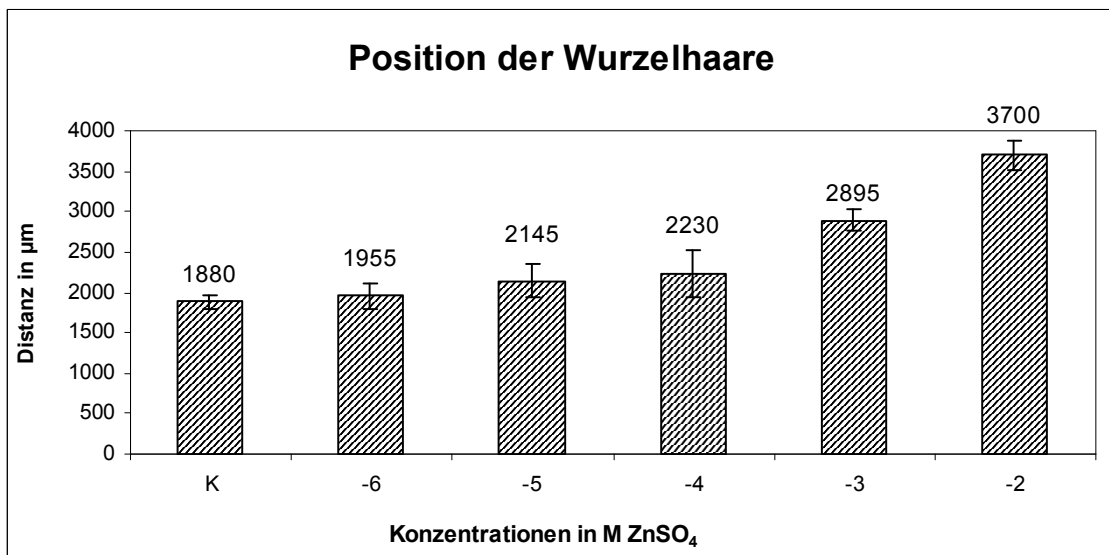


Abbildung 53: *Triticum aestivum*: Distanz der ersten Wurzelhaare von der Wurzelspitze in Zinksulfat

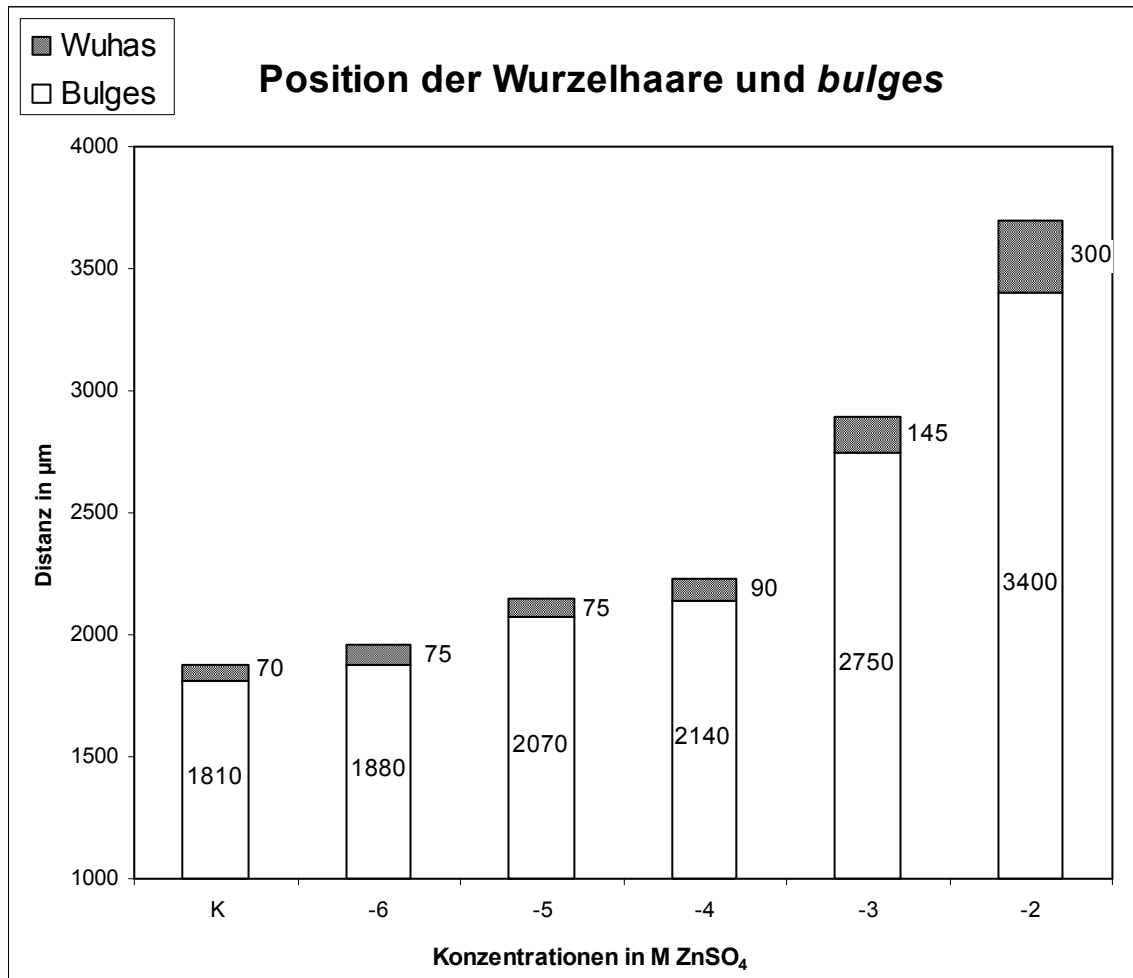


Abbildung 54: *Triticum aestivum*: Distanz der *bulges* und der ersten Wurzelhaare von der Wurzelspitze in Zinksulfat

6.2.3.3 Wirkung von Zinksulfat auf Wurzelhaare von *Triticum aestivum*

Triticum aestivum wurde in destilliertem Wasser gekeimt und in Zinksulfatlösungen von 10^0 bis 10^{-7} M gesetzt. Nach 24 Stunden wurde der mittelfristige Effekt auf Wurzelhaare, welche vor und nach dem Transfer in die Lösung gebildet worden waren, analysiert.

Dabei wurden die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare, ihre Morphologie, Zellwandbeschaffenheit und Cytoarchitektur untersucht.

In der nun folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

	Kontrolle	10⁻⁴–10⁻⁷ M ZnSO₄	10⁻³ M ZnSO₄	10⁻² M ZnSO₄	10⁻¹ M ZnSO₄	1 M ZnSO₄
Wachstumsstopp nach	nach etwa 16 Stunden	nach etwa 16 Stunden	mehrfach, dann weiter gewachsen, endgültig nach <3 Stunden	sofort	sofort	sofort
tot nach	nein	nein	einigen Stunden	alle <4 Stunden	meist nach 1 Stunde, alle <3 Stunden	einigen Minuten (1 Mal Deplasmolyse möglich)
Bildung neuer Wurzelhaare (24h)	ja	ja	ja	ja	nein	nein
wachsende Wurzelhaare (24h)	ja	ja	ja	nein	nein	nein
Aussehen, Zustand (24h)	intakt, gerade gewachsen	intakt, gerade gewachsen	intakt, gerade gewachsen oder leicht stufig, meist vakuolisiert	meist tot; gerade gewachsen, häufig koaguliert	tot, Wurzelhaare geplatzt, Plasma gestockt	tot, Wurzelhaare geplatzt oder plasmolysiert
Zellwand (24h)	normal, unverdickt	normal, unverdickt	normal, unverdickt oder mit Verdickungen an den Stufen und dann auch entlang des Schlauches	einzelne neue haben eine verdickte Spitze, alte haben keine Verdickung	normal	normal
Plasma (24h)	in der Spitze dicht und fein; in der subapikalen Region sind größere Organellen, im Schlauch: gleichmäßiger Plasmastrom	wie Kontrolle: in der Spitze dicht und fein; in der subapikalen Region sind größere Organellen, im Schlauch gleichmäßiger Plasmastrom	in der Spitze dicht und fein aber wenig, in der subapikalen Region sind größere Organellen, im Schlauch gleichmäßiger Plasmastrom	koaguliert, nur wenig Plasma im Wurzelhaar	nach 1 Stunde gestockt	bleibt durch Plasmolyse deutlich länger fein (>8 Minuten), erst mit Tod fällt es aus

Vakuole (1-3h, 24h)	Zentralvakuole bleibt bis zum Wachstumsstopp in den hinteren 2/3 des Haars	wie Kontrolle: bleibt bis zum Wachstums-stopp in den hinteren 2/3 des Haars	Zentralvakuole wandert etwas vor, geht dann wieder zurück auf Anfangsposition	Zentralvakuole wandert nach wenigen Minuten nach vorne, dann wieder weiter nach hinten	rasch Zentralvakuole vorne in der Spitze	nicht erkennbar
Zellkern (1-3h, 24h)	Zellkern sitzt 50 bis 250 µm von der Spitze entfernt	wie Kontrolle: Zellkern sitzt 50 bis 250 µm von der Spitze entfernt	Zellkern nähert sich rasch der Spitze an und bleibt dort bis zu Wachstumsstopp	Zellkern wandert zuerst leicht vor (<5 µm) zur Spitze und zieht sich dann Richtung Rhizodermis zurück	bleibt in der Entfernung von der Spitze wie vor Zugabe; nach 24 Stunden nicht mehr erkennbar	bleibt in der Entfernung von der Spitze wie vor Zugabe; nach 24 Stunden nicht mehr erkennbar
Verhalten nach Zinkzugabe (1-3h)	gleichmäßiges Wachstum bis zum Wachstumsstopp	wie Kontrolle: gleichmäßiges Wachstum bis zum Wachstumsstopp	Zentralvakuole kommt etwas vor, Strömung wird schneller, dann baut sich die Spitze ab, Teilvakuolen entstehen in der Spitze, Zellwand wird verdickt, dann baut sich Spitze wieder auf und das Wachstum wird fortgesetzt	nach wenigen Minuten ist die Zentralvakuole weit vorne, Plasma strömt etwas langsamer entlang Plasmasträngen, einzelne Organellen strömen, Wurzelhaar leert sich zunehmend aber nicht ganz, dann stockt das Plasma	nach weniger als 60 Sekunden ist die Zentralvakuole vorne, die Strömung wird langsamer, nach 1 Stunde haben die meisten ihre Plasmaströmung gestoppt	bereits nach 1 Minute plasmolysiert das Haar an der Spitze, dann auch im Schlauch, verharrt einige Zeit in diesem Zustand ohne abzusterben
Strömungstyp (1-3h, 24h)	umgekehrter Springbrunnen; bei Wachstumsbeendigung Zirkulationsströmung	umgekehrter Springbrunnen; bei Wachstumsbeendigung Zirkulationsströmung	umgekehrter Springbrunnen; bei Wachstumsbeendigung Zirkulationsströmung	wenige Minuten noch Springbrunnen, dann Zirkulationsströmung	sofort Zirkulationsströmung	sofort gestoppt

Tabelle 10: *Triticum aestivum*: Wirkung von Zinksulfat auf Wurzelhaare (1-3Stunden/ 24 Stunden)

6.2.3.3.1 *Wachstum*

In der Kontrolle wachsen Wurzelhaare nach Ekdahl (1953) bis zu 24 Stunden lang. In unseren Untersuchungen wuchsen Wurzelhaare in der Kontrolle maximal 16 Stunden mit einer leicht oszillierenden aber über die Stunden regelmäßigen, Geschwindigkeit.

In Konzentrationen bis 10^{-4} M verhielten sich Wurzelhaare ebenso. Nach Zugabe von Zinksulfat setzten sie ungestört ihr Wachstum mit derselben Wachstumsgeschwindigkeit fort wie in der Kontrolle.

Bei 10^{-3} M (Abb. 55I-K) allerdings wuchsen die Wurzelhaare ab der Zugabe geringfügig langsamer als in der Kontrolle (14-20%). Häufig nahm die Wachstumsgeschwindigkeit dann noch weiter ab, es kam zu einem wesentlich früheren völligen Wachstumsstillstand nach 1 bis 3 Stunden. Die meisten Wurzelhaare wuchsen in diesem Zeitraum regelmäßig und geradlinig. Einzelne stellten das Wachstum aber zwischenzeitlich ein und bildeten nach einigen Minuten eine neue wachsende Spitze aus. Allerdings erfolgte dies bei nur wenigen Wurzelhaaren (~10%) und maximal 5 Mal pro Haar. Das Wachstum der neuen Spitze war dabei um 25 bis 30% langsamer als bei der Kontrolle.

Nach 24 Stunden in Zinksulfat wuchsen neu gebildete Wurzelhaare geradlinig und geringfügig langsamer als die Kontrolle (entsprechend der anfänglichen Wachstumsgeschwindigkeit der alten Wurzelhaare nach Zugabe). Sie stellten das Wachstum deutlich früher als Kontrollwurzelhaare ein.

Ab 10^{-2} M (Abb. 55F-H) stoppte das Wachstum der bereits im Puffer gebildeten Wurzelhaare sofort nach Zugabe der Zinksulfatlösung. Allerdings blieb die umgekehrte Springbrunnenströmung noch bis zu einer Stunde lang erhalten. Dann vakuolisierten die Wurzelhaare, manche leerten sich vollständig bevor das Plasma koagulierte, andere waren zu diesem Zeitpunkt noch vollständig mit Plasma gefüllt.

Es wurden aber in 10^{-2} M auch neue Wurzelhaare gebildet, es erfolgte also Wurzelhaarwachstum. Diese blieben aber häufig nur *bulges* oder Wurzelhaare mit nur geringer Länge (kleiner als 70 μ m) und stellten nach wenigen (<4) Stunden das Wachstum wieder ein.

In 10^{-1} M (Abb. 55C-E) platzte ein Teil der Wurzelhaare in den ersten Minuten nach der Zugabe von Zinksulfat, in den anderen stockte das Plasma meist innerhalb der

ERGEBNISSE: ZINKVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

ersten 60 Minuten, auf jeden Fall aber innerhalb der ersten 3 Stunden. Häufig plasmolysierten die Wurzelhaare auch.

In 10^0 M (Abb. 55A-B) plasmolysierten die Wurzelhaare innerhalb weniger Minuten. Die gesamte Spitze sowie Teile des Protoplasten im Schlauch löste sich dabei ab. Bei manchen Haaren schnürte sich auch ein Teil des Protoplastens ab.

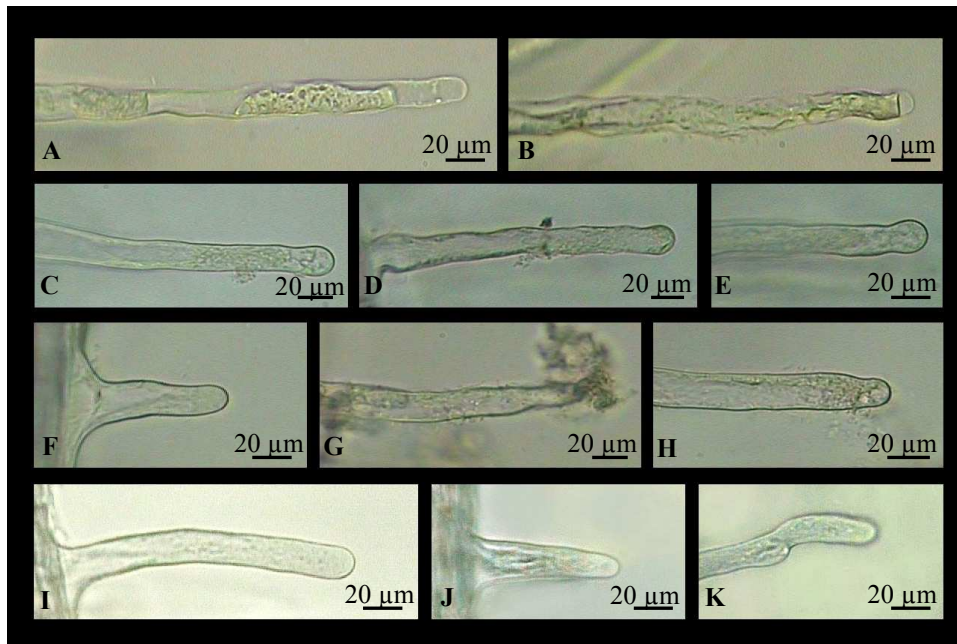


Abbildung 55: *Triticum aestivum*: Wirkung von Zinksulfat auf die Morphologie der Wurzelhaare nach 24 Stunden in A,B: 1 M $ZnSO_4$; C-E: 10^{-1} M $ZnSO_4$; F-H: 10^{-2} M $ZnSO_4$; I-K: 10^{-3} M $ZnSO_4$

6.2.3.3.2 Maximallänge neu gebildeter Wurzelhaare

Zinksulfat wirkte auf die Wachstumsdauer und die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare inhibierend (Abb. 56).

Wurzelhaare, die in schwachen Zinksulfatkonzentrationen bis 10^{-4} M wuchsen, erreichten ebenso wie die Kontrolle eine Länge zwischen 750 und 1150 μm . Im Durchschnitt waren die Haare 880 bis 960 μm lang.

In 10^{-3} M $ZnSO_4$ wurden hatten Wurzelhaare eine wesentlich geringere Endlänge von durchschnittlich 293 μm . In 10^{-2} M waren die Wurzelhaare sehr kurz. Sie erreichten maximal 70 μm und eine durchschnittliche Länge von 28 μm .

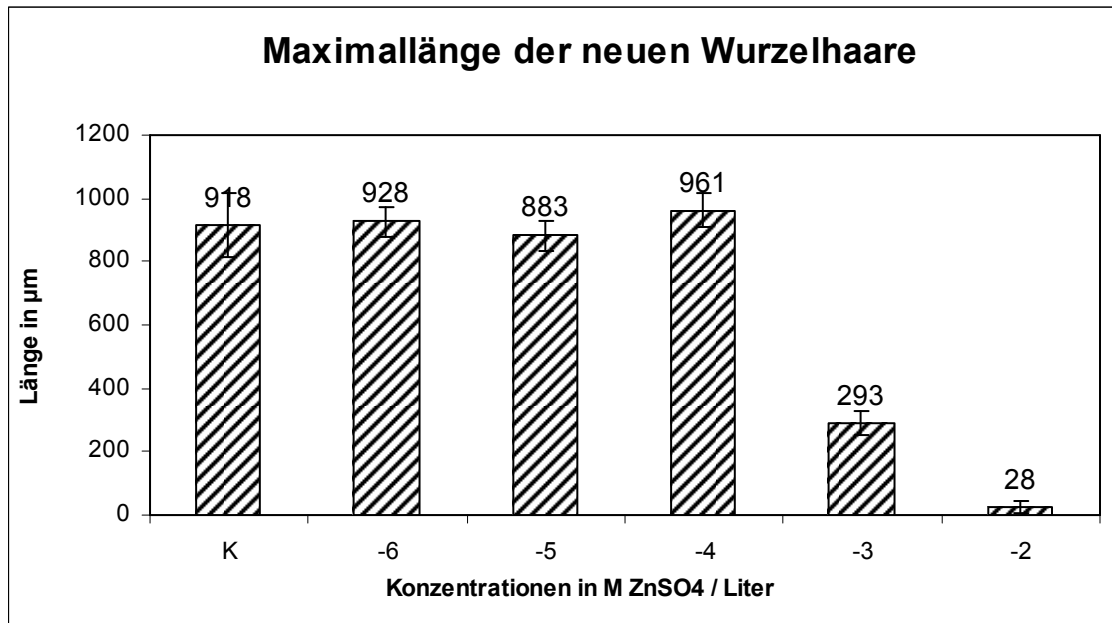


Abbildung 56: *Triticum aestivum*: Maximallänge neu gebildeter Wurzelhaare in Zinksulfat
Messung nach 24 Stunden in ZnSO₄

6.2.3.3 Wurzelhaarmorphologie

Anders als in Kupfersulfat war in Zinksulfat die Morphologie der Wurzelhaare meist unauffällig.

In schwachen Zinkkonzentrationen bis 10^{-4} M wuchsen die Wurzelhaare generell gerade und gleichmäßig wie in der Kontrolle. In 10^{-3} M (Abb. 57) erfolgte allerdings manchmal ein Wachstumsstopp der Wurzelhaarspitze mit einem neuen Auswuchs seitlich davon. Dies fand aber bei nur bei wenigen Wurzelhaaren und wenige Male pro Haar statt. Dabei entstanden einfache, stufige Wurzelhaarformen. Dies erfolgte aber nicht in allen Versuchsansätzen.

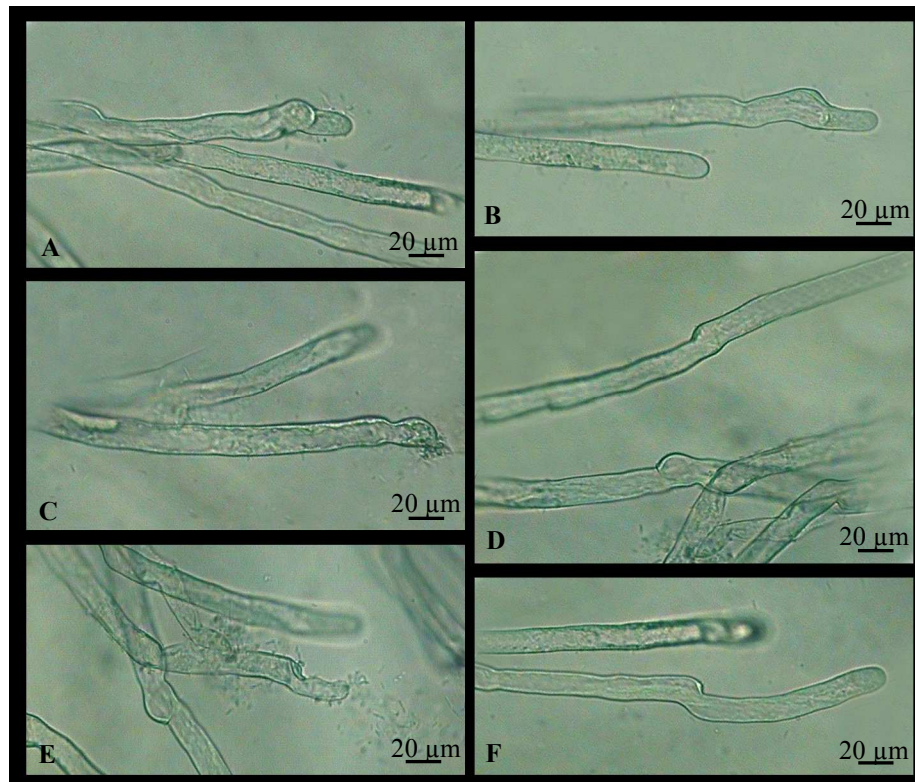


Abbildung 57: *Triticum aestivum*: Wurzelhaare in 10^{-3} M $ZnSO_4$

A-F: nach 24 Stunden in 10^{-3} M $ZnSO_4$

In Konzentrationen **ab 10^{-2} M** wurde das Wachstum schlagartig gestoppt und nicht wieder aufgenommen. Daher veränderten die Wurzelhaare ihre Morphologie nicht mehr. In 10^{-2} M und 10^{-1} M stockte das Plasma rasch aber nur wenige Wurzelhaare platzten und in 10^0 M plasmolysierten die Wurzelhaare.

6.2.3.3.4 Zellwand

Die Zellwand entlang des Wurzelhaarschlauches blieb **bis 10^{-3} M** dünnwandig, bei 10^{-2} M erfolgten vereinzelt auch Verdickungen zwischen 1 und 1,5 μm .

In 10^{-3} und 10^{-2} M $ZnSO_4$ bildete sich bei manchen Wurzelhaaren nach Wachstumseinstellung eine Verdickung der Spitze. Die Mächtigkeit dieser Verdickung konnte in Einzelfällen bis 15 μm ausmachen, war aber meist wesentlich weniger ausgeprägt als in Kupfersulfat und meist weniger als 6 μm dick.

Cellulose konnte entlang des Wurzelhaarschlauches und in den Verdickungen der Wurzelspitze beobachtet werden (nicht dargestellt). Besonders deutlich war aber die Callosebildung bei 10^{-3} M. Die gesamte Zellwand war mit kleineren oder etwas

ERGEBNISSE: ZINKVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

größeren punktförmigen Callosedepositionen übersät (Abb. 58). Auch die Wurzelhaarspitze enthielt häufig Callose in knopfartiger Form. Andere Wurzelhaare hatten keine kleinen Callosepunkte, dafür aber größere Depositionen, welche runde bis ovale Form hatten.

Pektine wurden nicht untersucht.

In höheren oder niedrigeren Konzentrationen konnte keine Zellwandverdickungen beobachtet werden.

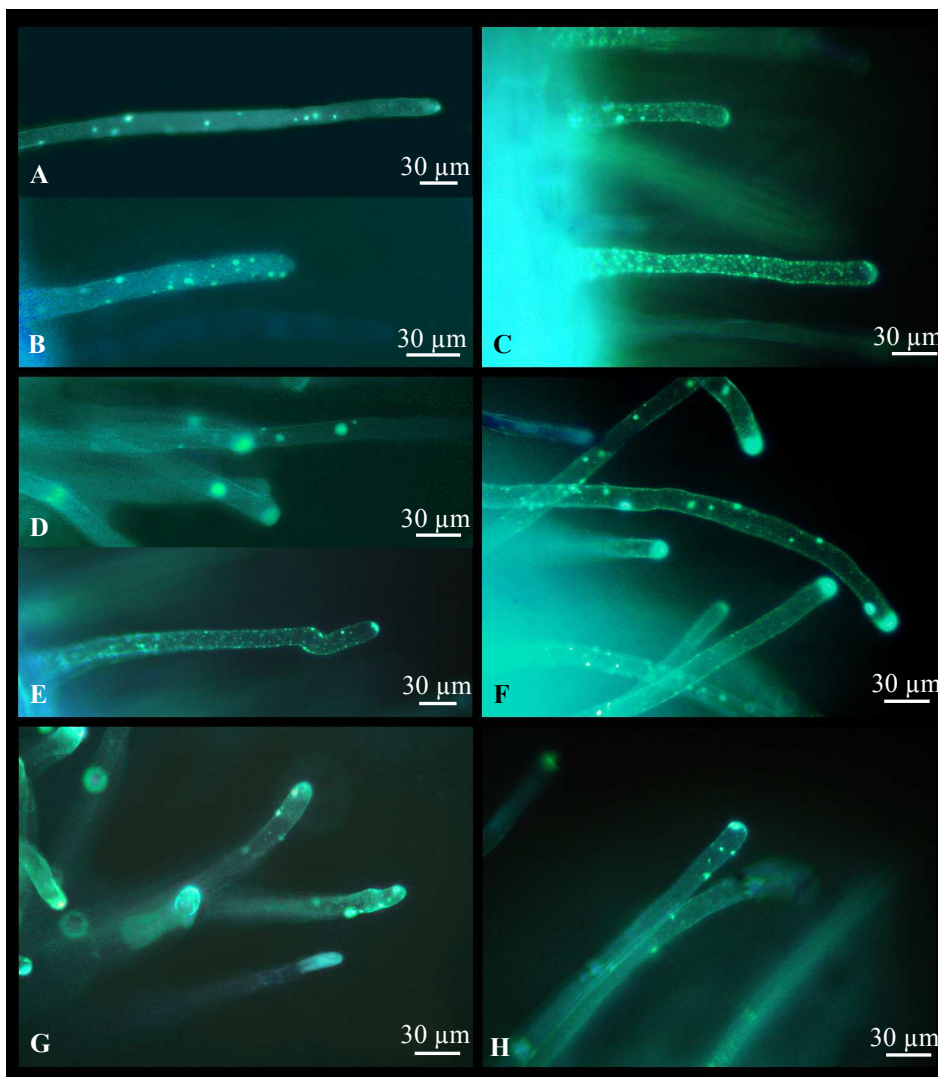


Abbildung 58: *Triticum aestivum*: Callose-Nachweis mit Anilinblau

A-H: Wurzelhaare nach 24 Stunden in 10^{-3} M $ZnSO_4$, UV-Fluoreszenz

6.2.3.3.5 *Strömung, Plasma, Organellenbewegung*

Strömung

In der Kontrolle sowie in Konzentrationen bis 10^{-4} M $ZnSO_4$ konnte in wachsenden Wurzelhaaren verkehrte Springbrunnenströmung mit gleichmäßiger Strömungsgeschwindigkeit beobachtet werden.

Die Organellen bewegten sich als Plasmastrom nahe der Plasmamembran zur Wurzelhaarspitze und in der Mitte des Haares wieder Richtung Basis. Mit Wachstumsende ging die umgekehrte Springbrunnenströmung in Zirkulationsströmung über, wobei sich die Spitze und der Wurzelhaarschlauch zu leeren begannen. Die Organellen strömten schließlich vereinzelt, bis das Wurzelhaar vollständig entleert war.

In 10^{-3} M blieb die verkehrte Springbrunnenströmung 15 bis 20 Minuten lang aufrecht, dann wechselte der Strömungstyp auf Zirkulationsströmung. Diese blieb bei einigen bis zum Wachstumsstopp erhalten, in anderen, „Nasen“ bildenden Wurzelhaaren setzte die Springbrunnenströmung wieder ein und wurde erst mit dem Wachstumsende wieder zur Zirkulation. Die Strömung war zu Beginn rascher als in der Kontrolle, dann verlangsamte sie sich deutlich. Die Strömungsgeschwindigkeit war hierbei geringer als in der Kontrolle.

In 10^{-2} M $ZnSO_4$ wurde nach etwa 2 Minuten Zirkulationsströmung eingeleitet. Die Strömungsgeschwindigkeit war nach 4 bis 5 Minuten deutlich abgesenkt gegenüber der Kontrolle und hörte nach etwa 30 Minuten ganz auf. Nur noch einzelne Organellen bewegten sich. Junge Wurzelhaare strömten etwas länger, hier konnte auch nach 60 Minuten noch Strömung wahrgenommen werden.

In 10^{-1} M $ZnSO_4$ ging die Springbrunnenströmung nach weniger als 2 Minuten in Zirkulationsströmung über. Für einige Minuten wurde in einzelnen Haaren die Springbrunnenströmung wieder aufgenommen, dann aber blieb bis zum Wachstumsstopp Zirkulationsströmung aufrecht, allerdings strömte das Plasma nur im Wurzelhaarschlauch bis zum Zellkern.

In 1 M $ZnSO_4$ plasmolysierten die Wurzelhaare sofort, dabei konnte keine Plasmabewegung mehr beobachtet werden.

Plasma

In wachsenden Wurzelhaaren der Kontrolle sowie bei Zinksulfatkonzentrationen bis 10^{-4} M befand sich das Plasma in der Spitze sowie im vorderen Drittel des Wurzelhaarschlauches. In der Wurzelhaarspitze gab es keine größeren Organellen, dafür aber viele Vesikel. Im Wurzelhaarschlauch bewegten sich die Organellen perlschnurartig oder als Randbelag entlang der Plasmamembran und entlang von Plasmasträngen.

In stärkeren Zinksulfatkonzentrationen verschwand die vesikelreiche, feine Spitzenregion des Wurzelhaares, Organellen konnten in der Spitze beobachtet werden und wurden dann nach und nach in Richtung Rhizodermiszelle zurückgezogen.

In 10^{-3} M $ZnSO_4$ drang die Vakuole nach der Zinksulfatzugabe in die Wurzelhaarspitze vor, die Spitze wurde außerdem mit großen und kleinen Organellen gefüllt. Das Plasma strömte im Wurzelhaarschlauch als gleichmäßiger Randbelag, wellenartig oder perlschnurartig entlang Plasmasträngen oder der Plasmamembran. Auch mit der Zirkulationsströmung blieb dieses Verhalten des Plasmas erhalten. Nach einiger Zeit begann sich dann allerdings in einigen Haaren wieder eine ruhige Spitzenregion, vorerst aus größeren Organellen, auszubilden, die dann schließlich zu einer vesikelreiche Spitze wurde. Diese hatte allerdings nur geringe Ausdehnung.

In anderen Wurzelhaaren, die das Wachstum einstellten, strömte das Plasma in Richtung Rhizodermis ab.

In 10^{-2} M $ZnSO_4$ war die Wurzelhaarspitze nach weniger als einer Minute mit großen Organellen gefüllt. Das Plasma strömte wellenartig oder als gleichmäßiger Randbelag entlang der Plasmamembran durch den Wurzelhaarschlauch. Im Wechsel mit den Plasmawellen konnten auch strömende Einzelorganellen wahrgenommen werden. In dieser Phase waren die Organellen der Wurzelhaarspitze nicht an der Strömung beteiligt sondern bewegten sich wie Billardkugeln in der Spitze hin und her. Nach etwa 20 Minuten begann die Spitze zu vakuolisieren und das Plasma begann seinen Rückzug in die Rhizodermis. Der größte Teil des Plasmas konnte abgezogen werden, einige Plasmahaufen blieben allerdings meist zurück und stockten im Haar entlang der Plasmamembran.

In 10^{-1} M $ZnSO_4$ stockte das Plasma in einigen Wurzelhaarspitzen, in anderen bewegten sich die Organellen dort billardkugelartig und wurde anfangs nicht durch die

Zirkulationsströmung in die Rhizodermiszelle transportiert. Im Wurzelhaarschlauch strömte das Plasma als Plasmasegel entlang der Membran zwischen dem Zellkern und der subapikalen Region. Dabei konnten kaum Einzelorganellen beobachtet werden. Nach einigen Minuten verebbte der Plasmastrom, sodass große und kleine Organellen sichtbar wurden. Vollständige Entleerung des Wurzelhaarschlauches wurde nicht erreicht, Plasmareste stockten im Haar.

In 1 M ZnSO_4 wurde das Plasma durch die Plasmolyse fein, keine Organellen waren darin erkennbar. Der Protoplast hob sich in der Wurzelhaarspitze und entlang des Schlauches ab, entlang des Schlauches blieben etliche Verbindungspunkte mit der Zellwand erhalten.

Organellenbewegung

Die regelmäßige Bewegung von Organellen entlang Plasmasträngen blieb bis zu einer Konzentration von 10^{-1} M erhalten.

Brownsche Bewegung konnte in keiner Konzentrationsstufe bemerkt werden. Die Organellen verlangsamten ihre Bewegungsgeschwindigkeit mehr und mehr und stockten in starken Zinksulfatkonzentrationen oder wurden vollständig in die Rhizodermis zurückgezogen.

6.2.3.3.6 Zellkernposition

In der Kontrolle befand sich der Zellkern bei wachsenden Wurzelhaaren zwischen 50 und 150 μm von der Wurzelhaarspitze entfernt (**Abb. 59**). In ausgewachsenen Haaren nahm er eine beliebige Position zwischen der Wurzelhaarbasis und der Wurzelhaarspitze ein.

In Konzentrationen bis 10^{-4} M ZnSO_4 war der Zellkern wie in der Kontrolle 50 bis 150 μm hinter der Spitze zu finden (**Abb. 59**).

In 10^{-3} M hingegen bewegte sich der Zellkern bei Zugabe der Zinksulfatlösung rasch auf die Wurzelhaarspitze zu und blieb dort 27 bis 77 μm von ihr entfernt bis das Haar sein Wachstum einstellte.

ERGEBNISSE: ZINKVERSUCHE BEI *TRITICUM AESTIVUM*

In durch die Zinkeinwirkung abgestorbenen Wurzelhaaren der Konzentration 10^{-2} M saß der Zellkern wie in ausgewachsenen Wurzelhaaren der Kontrolle an einer beliebigen Position, da genug Zeit für seinen Rückzug in Richtung Rhizodermiszelle geblieben war.

In **stärkeren** Konzentrationen wurde er sofort durch die Zinkeinwirkung arretiert und fand sich in derselben Distanz wie in der Kontrolle beobachtet.

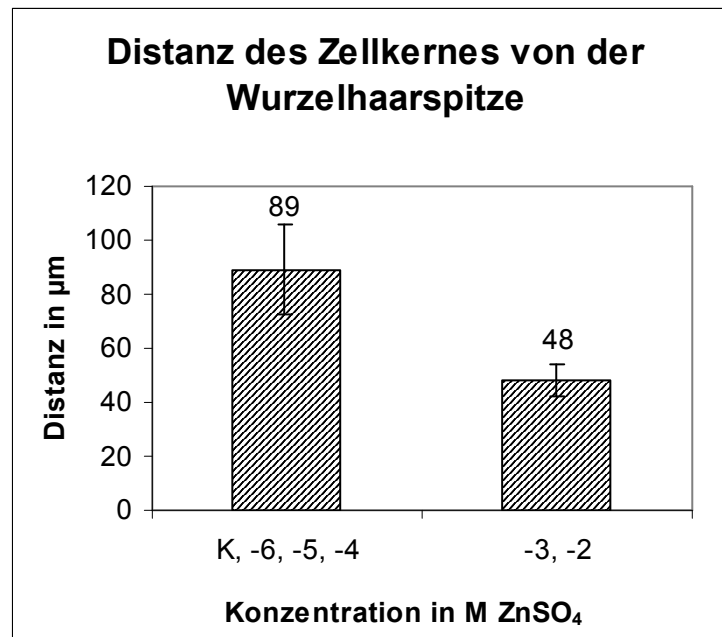


Abbildung 59: *Triticum aestivum*: Position des Zellkerns in Zinksulfat
Messung nach 24 Stunden in ZnSO₄

6.2.3.3.7 Zellkernform

Der Zellkern hatte bei wachsenden Wurzelhaaren der Kontrolle, sowie in Zinkkonzentrationen zwischen 10^{-6} M und 10^{-3} M eine längliche Form, mit einem meist parallelogrammartigen oder rechteckartigen Querschnitt, war aber auch häufig an seinem, der Wurzelspitze zugewandten Ende etwas zugespitzt und war in ausgewachsenen Wurzelhaaren häufig länglich zugespitzt oder gestaucht, kugelig, in jedem Fall hatte er aber ein kleineres Volumen.

In 10^{-3} M ZnSO₄ war der Zellkern auch in wachsenden Wurzelhaaren, hatte also ein kleineres Volumen.

In **stärkeren** Konzentrationen wurde der Zellkern stark kontrahiert und seine Oberfläche erschien körnig und zerklüftet.

7 DISKUSSION

Zentrale Frage dieser Arbeit war, wie die Schwermetalle Kupfer und Zink, die eigentlich essentielle Mikronährstoffe für die Pflanze darstellen, andererseits aber auch sehr toxisch sind, auf Wurzeln und Wurzelhaare wirken. Als Versuchsobjekte wählten wir *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum*. Dabei zeigte sich, dass die Kulturbedingungen wichtig für standardisierbare Ergebnisse sind. Wir suchten daher zunächst die optimalen Bedingungen für die Keimung und die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*. Hierfür wurden verschiedene Nährlösungen sowie Keimsubstrate und Kultivierungskammern probiert.

Der eigentliche Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der wachstumsförderlichen und toxischen Wirkungsweise von Kupfer und Zink auf Wurzel und Wurzelhaare.

Die Schwermetallsalze Zinksulfat und Kupfersulfat wurden in gestuften Lösungen auf *Triticum aestivum* einwirken gelassen. *Arabidopsis thaliana* wurde ausschließlich Kupfersulfatlösungen ausgesetzt.

Für die Untersuchungen im Lichtmikroskop waren die Wurzeln dabei in Mikrokammern in Kulturlösungen getaucht, eine Situation, die Pflanzen in ihrer natürlicher Umgebung nur selten vorfinden.

Wurzelhaare verhalten sich nicht unbedingt gleich in Lösung und im Boden, auch ist Flüssigkeit für das Wurzelhaarwachstum ungünstiger als feuchte Luft. Die Ergebnisse können daher nicht unbedingt auf die Umwelt übertragen werden. Bezüglich der Schwermetallaufnahme kommt hinzu, dass sie genauso wie Nährstoffe im Boden weniger leicht verfügbar sind als in den Versuchslösungen. Dies ist aber auch ein Grund, warum wir flüssige Kulturmedien gewählt haben: Wir konnten so genau die erwünschte Konzentration der Schwermetalle einstellen. Interaktionen zwischen verschiedenen Nährstoffen und mit organischen Verbindungen im Boden sowie mit Mikroorganismen sind ebenfalls bedeutend.

7.1 Kultivierungsversuche

7.1.1 Keimung

Unsere Versuche zur optimierten Keimung zeigten, dass *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* ganz unterschiedliche Keimbedingungen brauchen. Während *Triticum aestivum* optimal auf mit destilliertem Wasser durchfeuchtetem Filterpapier in einer feuchten Kammer wächst, braucht *Arabidopsis thaliana* alle für das Wachstum essentiellen Makro- und Mikronährstoffen. Sie wirken am besten, wenn sie in Agar angeboten werden.

Die so unterschiedlichen optimalen Keimlösungen für die beiden Pflanzen erklären sich mit Nährstoffreserven der Samen: Die für das Wachstum des Keimlings notwendigen Nährstoffe sind in unterschiedlicher Art und Menge in den Samen gespeichert und dienen als Energieversorgung und Rohstoff für die Initiierung des Wachstums. Dicotyle Pflanzen haben ihre Reservestoffe (Polysaccharide und Proteine) in den Cotyledonen gespeichert. Monocotyledone Pflanzen speichern große Mengen an Stärke und Protein in einem eigenen Gewebe, dem Endosperm (Berrie, 1985). *Triticum aestivum*, als monocotyle Pflanze, besitzt also größere Mengen an Reservestoffen und benötigt daher für die Keimung und das erste Wachstum des Keimlings keine zusätzliche Versorgung. *Arabidopsis thaliana* hingegen, als dicotyle Pflanze mit winzigen Samen, muss bereits nach etwa 24 Stunden Nährstoffe aus der Umgebung beziehen, um gut wachsen zu können.

Die Wahl der unterschiedlichen Substrate, also Agarplatten oder Filterpapier in feuchter Kammer, hing mit der Größe und damit mit der Empfindlichkeit des Keimlings zusammen: Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* werden beim Abheben vom Filterpapier stark geschädigt. Weiteres Wachstum in den Kammern wäre daher problematisch. Außerdem vermehren sich Mikroorganismen, die im glukose- und nährstoffreichen MS-Medium (Keimlösung) ebenfalls gut wachsen können, auf dem Filterpapier schnell. Aus diesen Gründen ist Agar das besser geeignete Substrat für *Arabidopsis thaliana*.

Keimlinge von *Triticum aestivum* hingegen reagieren kaum auf die mechanische Belastung durch den Transfer vom Filterpapier in die Kultivierungslösung. Außerdem wachsen im

destillierten Wasser (Keimlösung) nur wenige Mikroorganismen. Daher konnte Filterpapier verwendet werden, was außerdem schneller und einfacher ist.

Nach der Keimung der Samen und der Bildung der ersten Wurzelansätze wurden die Keimlinge für die spätere Mikroskopie in Wachstumskammern transferiert. Sie bestehen aus Objektträger und Deckglas, zwischen die, durch Parafilmstreifen als Abstandhalter ermöglicht, die junge(n) Wurzel(n) hineinwachsen können. Die Keimlinge können sich dadurch an die Kulturlösung anpassen und neue Wurzelhaare ausbilden. Erst diese Wurzelhaare wurden dann im Mikroskop analysiert, ohne weiterem mechanischen Stress ausgesetzt zu werden.

Es wurde auch versucht, die Samen direkt in den Wachstumskammern in den Kulturlösungen anzukeimen. *Arabidopsis thaliana* keimte in der Regel nicht. *Triticum aestivum* keimte selten, wuchs aber nur in wenigen Fällen gerade in die Kammer hinein.

Grund dafür war vermutlich eine falsche Position der Samen in Bezug auf die Lösung, die aus experimentellen Gründen nicht eingestellt werden kann, die Samen fallen in die Lösung hinein oder bleiben zu hoch außerhalb der Lösung kleben:

Generell ist für die Keimung eine gute Durchfeuchtung des Samens notwendig, da der Samen in der Keimruhe (Dormanz) nur etwa zu 15 % aus Wasser besteht. Für diverse Stoffwechselfvorgänge wird deutlich mehr Wasser benötigt, weshalb das Durchbrechen der Keimruhe nur bei ausreichender Durchfeuchtung erfolgt. Ist der Samen also nicht mit Lösung bedeckt, kann er nicht keimen.

Sind die Samen allerdings völlig mit Wasser überdeckt, erfolgt ebenfalls keine Keimung, da durch das Wasser der für den Metabolismus notwendige Sauerstoff nicht zu den Samen gelangen kann (Bell et al., 1991).

7.1.2 Kultivierung

7.1.2.1 Generelle Wachstumsbedingungen

Lösungen sind für mikroskopische Untersuchungen das wichtigste Medium, vor allem bei stärkeren Vergrößerungen. Auch Agar würde sich eventuell anbieten, allerdings wird ein großer Teil der Chemikalien vom Agar gebunden, beziehungsweise durchdringt bei Zugabe nur langsam den Agar. Darüber hinaus ist die optische Qualität der Bilder im Mikroskop vor allem bei starken Vergrößerungen schlecht. Daher wurden für die Untersuchung der Wurzelhaare Lösungen verwendet.

In unseren Versuchen hat sich gezeigt, dass die Keimlinge sehr stark auf Schwankungen im Klima, wie zum Beispiel Temperatur oder Luftzirkulation, reagieren. Es kam dabei zu Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Morphologie der Wurzel. Vor allem auf zu hohe Temperaturen reagieren sie stark mit Wachstumsdepression.

In unserem Labor veränderte sich das Klima mehrfach während der Versuchsperiode. Im Winter waren die Temperaturen teils sehr tief, im Sommer stiegen sie stark an. Bei geringer Luftzirkulation stiegen außerdem die Temperaturen unter der Halogenlampe stark an. Dadurch war das Wurzelwachstum vermindert, die Wurzelhaare waren weniger, kürzer und wuchsen unregelmäßig.

Generell zeigt sich, dass Wurzelhaare in feuchter Luft viel besser wachsen als in Lösung.

Das Problem ist die Sauerstoffversorgung, eine ausreichende Versorgung ist für die Wurzeln essentiell. Im Boden dringt Sauerstoff normalerweise über die Bodenporen in mehrere Meter Tiefe und auch auf Agar oder Filterpapier in feuchter Luft ist er ausreichend vorhanden. Bei Staunässe beziehungsweise in Lösungen sind nur die obersten Zentimeter mit Sauerstoff gesättigt, da Sauerstoff nur über Diffusion weitergegeben wird (Taiz and Zeiger, 1991).

Bei tiefen Temperaturen ist das unproblematisch, bei Temperaturen über 20 °C ist der Sauerstoffverbrauch der Pflanzen dafür zu hoch und auch Mikroorganismen können innerhalb von 24 Stunden den Sauerstoffpool des Bodens oder der Lösung ausschöpfen. Es kommt zu einer Wachstumsdepression der Pflanze, da die Pflanze auf anaerobe Atmung umsteigt, die nur wenig Energie (2ATP pro Mol Hexose) liefert. Um bei hohen Temperaturen bessere

Ergebnisse zu erzielen, müsste die Sauerstoffversorgung durch Durchlüftung, so genanntes „*bubbling*“, verbessert werden.

Ein weiterer Grund für die Problematik von hoher Temperatur ist die Erhöhung der Membranfluidität; dabei gehen physiologische Funktionen verloren. Die Membranzusammensetzung und –struktur verändert sich durch Veränderung von Bindungen, die Membran wird durchlässig, Ionen treten aus. Auch sinkt der zelluläre pH durch verminderten Transport von H^+ -Ionen in die Vakuole, es erfolgt dadurch zuerst eine Störung des Metabolismus mit Wachstumsdepression und dann auch der Tod der Pflanze.

Noch höhere Temperaturen wirken vor allem auf wachsende und sich teilende Zellen inhibierend. Diese werden bei über 45 °C geschädigt, ausgewachsene Zellen ertragen maximal 50 °C. Die hohen Temperaturen senken die Photosyntheserate und inhibieren die Atmung. Sie senken damit also wiederum das Wachstum der Wurzel (Taiz and Zeiger, 1991).

7.1.2.2 Kulturlösungen

An *Arabidopsis thaliana* wurden Kulturlösungen mit verschieden starken Nährstoffkonzentrationen untersucht. Dabei hat sich die schwächer konzentrierte Lösung (halb MS-salt Mixture) als optimal für das Wachstum der Wurzel und der Wurzelhaare erwiesen, Vitamine waren nicht notwendig.

Die Entwicklung der Wurzelhaare ist vom Gleichgewicht und der Versorgung verschiedener Nährstoffe abhängig; es war daher überraschend, dass *Arabidopsis thaliana* bei geringem Nährstoffangebot besser wuchs.

Eine mögliche Erklärung, weshalb schwächere Nährstoffkonzentrationen förderlicher sind, ist, dass geringe Verfügbarkeit von Phosphor die Wachstumsgeschwindigkeit und die Wachstumsdauer von Wurzelhaaren bei *Arabidopsis thaliana* erhöht. Der Grund dafür ist, dass bei Cotransport mit Phosphor der cytoplasmatische pH-Wert sinkt (Bates, 1997; Bates and Lynch, 1996) und die Zellen dadurch gestresst sind.

Die Dichte und die Länge der Wurzelhaare werden durch geringere Versorgung mit Eisen (Schmidt et al., 2000), Zink und Mangan (Ma et al., 2001) ebenfalls beeinflusst; sie werden dichter und länger.

7.2 Schwermetallversuche

Aus den Ergebnissen haben sich Beobachtungen an anderen Pflanzen aus der Literatur bestätigt, dass der toxische Effekt des Kupfers stärker ist, als der des Zinks. Die zwei Metalle haben zwar ähnliche Effekte, wirken aber mit einer Konzentrationsdifferenz von 1-2 Zehnerpotenzen.

Anders als bei Kupfersulfat konnten durch Zinksulfat nicht nur toxische sondern auch förderliche Effekte festgestellt werden. Ein positiver Effekt wäre allerdings viel häufiger zu erwarten gewesen, da die beiden Schwermetalle essentielle Mikronährstoffe sind. Um hier genaue Daten über Mangelercheinungen ohne Kupfer und Zink beziehungsweise über wachstumsfördernde Effekte von Kupfer- und Zinkgaben zu sehen, müssen aber sicherlich längere Beobachtungen der Entwicklung der Keimlinge gemacht werden; für den kurzen Beobachtungszeitraum von zwei Tagen haben die Keimlinge wahrscheinlich genügend Reserven in ihrem Speichergewebe.

Generell gilt, dass Mangel oder Überschuss eines Nährstoffes das Ionengleichgewicht der Zelle in Unordnung bringen. Zink und Phosphor (Reichman, 2000) oder Zink und Kupfer (Punz and Sieghart, 1993) sind Antagonisten, der Mangel des einen führt zum Überschuss des anderen und umgekehrt. Damit kann das jeweils andere Element toxisch auf die Zelle wirken.

7.2.1 Klimaregime

Generell gibt es relativ große Unterschiede zwischen den Pflanzen eines Versuchsansatzes bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit und der Empfindlichkeit gegen die Schwermetalle. Bei *Triticum aestivum* beispielsweise waren die Länge der Wurzeln und die Länge der Wurzelhaare von Jänner bis April deutlich größer als in den Monaten Mai bis Juli. Kurzfristige Temperaturschwankungen bewirkten bei ein und derselben Konzentrationsstufe einer Schwermetalllösung schwächere (optimale Temperatur) oder stärkere (hohe oder tiefe Temperaturen) Störung der Keimlinge.

Eine Überlegung dazu wäre, dass die jahreszeitlich bedingten Schwankungen der Temperatur und Luftzirkulationsschwankungen im Labor einen starken Einfluss auf das Wachstum der Wurzel und Wurzelhaare zeigen. Durch hohe Temperaturen werden die Sauerstoffversorgung und der cytoplasmatischer pH beeinflusst und eine Wachstumsdepression ausgelöst (siehe

7.1.2.1). Tiefe Temperaturen senken die Stoffwechselrate der Zellen und vermindern damit wiederum den Wachstumserfolg.

Es wirken also zum Schwermetallstress zusätzliche Stressfaktoren auf den Keimling und senken die Stressresistenz der Pflanze gegenüber Schwermetall. Daher kann die Pflanze bei hohen Temperaturen geringe Schwermetallkonzentrationen nicht mehr entgiften, welche bei optimalen Klimabedingungen noch verkraftbar gewesen wären.

Hohe Temperaturen steigern außerdem die Transpiration der Pflanze. Dadurch werden mehr Ionen gelöst und damit auch mehr Ionen aufgesaugt. Der Stoffumsatz steigt also, es kommt zu einer schnelleren Anreicherung von Schwermetallen in der Pflanze, vor allem in der Wurzel, sodass rasch toxische Konzentrationen erreicht werden. Durch den raschen Einstrom der Ionen hat die Pflanze auch wenig Zeit zur Entgiftung der Ionen und Radikale und zur Aktivierung von Resistenzmechanismen. Dadurch treten früher und stärker die Symptome der Schwermetalltoxizität beziehungsweise der Tod der Pflanze auf.

7.2.2 Die Keimung bei *Triticum aestivum*

Die nachfolgende Tabelle fasst die wichtigsten Ergebnisse der Keimung zusammen.

	<i>Triticum aestivum</i> in Kupfersulfat	<i>Triticum aestivum</i> in Zinksulfat
Keimung	bis 10^{-3} M	bis 10^{-2} M
Wachstum	bis 10^{-4} M ungestört	bis 10^{-3} M
Wurzelspitze	normal bis 10^{-4} M	normal bis 10^{-3} M
Distanz der <i>bulges</i> und Wurzelhaare von der Spitze	bei 10^{-3} M <i>bulge</i> -Region sehr kurz, Wurzelhaare stark der Spitze angenähert	bei 10^{-2} M <i>bulge</i> -Region sehr kurz, Wurzelhaare stark der Spitze angenähert

Tabelle 11: *Triticum aestivum*: Keimung in Schwermetalllösungen

Hohe Konzentrationen beider Schwermetalle wirkten inhibierend auf die Keimung von *Triticum aestivum*. Geringe Schwermetallmengen hatten keine signifikante Wirkung.

In verschiedenen Versuchsansätzen wurden allerdings stark abweichende Ergebnisse beobachtet, ein Mittelwert stellt diese Ergebnisse also nicht ausreichend dar.

Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten, sind daher sehr große Probenmengen nötig (Orchard, 1977). Das hängt zum Beispiel damit zusammen, dass die Größe der Samen einen großen Einfluss auf die Keimfähigkeit und die Wachstumsgeschwindigkeit des Keimlings hat (Cordazzo, 2002). Aus unseren Versuchen lässt sich deswegen kein diesbezügliches Ergebnis herauslesen.

Allerdings war schon mehrfach die inhibierende Wirkung von Kupfer (Liu and Wang, 2002; Muller et al., 2001; Nimmo et al., 2003) und von Zink (El-Ghamery et al., 2003) auf die Keimrate beobachtet worden und auch bei *Triticum aestivum* war sie schon bemerkt worden (Song et al., 2002). Song et al. (2002) beobachteten weiters, dass die Keimrate weniger stark inhibiert wurde als das Wurzelwachstum. Auch wachstumsfördernde Wirkung durch Kupfer und Zink war schon beobachtet worden (Arora and Katewa, 1999), allerdings gibt es keine Literatur über *Triticum*.

Liu und Wang (2002) führten die hemmende Wirkung von Kupfer auf gesenkte Aktivitäten von Proteasen (Protein abbauende Enzyme) und Diastasen (Stärke abbauende Enzyme) zurück. Daher können die Nährstoffe des Speichergewebes nicht umgesetzt werden, sodass keine oder geringere Keimung erfolgt und die Keimrate, das Wachstum der Wurzel, sowie die Respirationsrate der keimenden Samen gesenkt sind.

Störungen des osmotischen Gleichgewichts, welche durch Überangebot von Zink verursacht werden können, verändern ebenfalls einige metabolische Parameter zu Beginn der Keimung und vermindern dadurch das Wachstum (Esen et al., 1997).

Äußerst interessant war der Vergleich der Empfindlichkeit der Wurzeln und Wurzelhaare in Abhängigkeit vom Keimmedium: wenn Samen in Kupfer oder Zink enthaltenden Lösungen gekeimt wurden, waren sie in den folgenden Schwermetalluntersuchungen weniger empfindlich, als wenn sie ohne Schwermetall vorgekeimt waren.

Es muss sich um eine Adaption des Keimlings an die Schwermetalllösung handeln, die vor oder während der Keimung erfolgt, aber nicht danach. Die Spezialisierung der Zellen und Gewebe beginnt mit der Keimung des Samens bzw. während der Embryogenese (Volkmann and Peters, 1995). Daher kann vermutlich die Adaptierung an die Schwermetalle noch vor dieser Differenzierung stattfinden, später aber nicht mehr.

In Konzentrationen, in denen die Keimrate vermindert war, wuchs die Wurzel langsamer. Weiters war der Haarkranz am Ansatz der jungen Keimwurzel näher zur Wurzelspitze gerückt. Dies erklären El-Ghamery et al. (2003) für Zink mit gesenkter Zellteilung durch verminderte Mitoserate beziehungsweise abnormale mitotische Abläufe, welche er an sich teilenden Spitzenzellen der Wurzel von *Triticum aestivum* beobachtete.

Zink hemmt die Mitose, indem es Zellen in der Interphase (G₂) oder der Prophase arretiert (Borboa and De la Torre, 1996). Dafür verantwortlich ist die gehemmte Synthese von DNA oder von Zellkernproteinen (Esen et al., 1997).

7.2.3 Wirkung der Schwermetalle auf die Wurzel

Die Wurzel ist das Organ, in dem die meisten Schwermetalle akkumuliert werden; ein Transport von der Wurzel weiter in den Spross findet kaum statt. Daher wird die Wurzel stärker und früher gestört als der Spross (Lexmond and Vorm, 1981). Wenn man an oberirdischen Organen Symptome wahrnimmt, dann ist die Pflanze bereits stark geschädigt (Minnich et al., 1987).

Die Wirkung von Kupfersulfat wurde bei den Wurzeln von *Triticum aestivum* und *Arabidopsis thaliana* beobachtet, Zinksulfat wurde allerdings ausschließlich bei *Triticum aestivum* untersucht.

In der folgenden Tabelle sind die Werte zur besseren Übersichtlichkeit nochmals zusammengefasst.

	<i>Arabidopsis thaliana</i> in Kupfersulfat	<i>Triticum aestivum</i> in Kupfersulfat	<i>Triticum aestivum</i> in Zinksulfat
Wachstum	bis $5 \cdot 10^{-5}$ uneingeschränkt, bei 10^{-4} M einige Stunden	bis 10^{-5} M uneingeschränkt, bei 10^{-4} M einige Stunden	bis 10^{-2} M uneingeschränkt, bei 10^{-1} M einige Stunden
Wurzelspitze	normal bis $5 \cdot 10^{-6}$ M, dann verdickt, braun und abgebaut	normal bis 10^{-6} M, 10^{-5} braun dann braun und abgebaut	normal bis 10^{-3} M, dann braun und abgebaut
Distanz der <i>bulges</i> und Wurzelhaare von der Wurzelspitze	bis $5 \cdot 10^{-6}$ normal, ab $5 \cdot 10^{-5}$ M mehr und mehr verkürzt	bei 10^{-5} M ist die Distanz der <i>bulges</i> normal, die Distanz der Wurzelhaare von der Spitze ist vergrößert	bei 10^{-3} und 10^{-2} M sind die Distanz von <i>bulges</i> und Wurzelhaare von der Spitze vergrößert
Dichte der Wurzelhaare	bis $5 \cdot 10^{-6}$ normal, ab $5 \cdot 10^{-5}$ M mehr und mehr verdichtet	in allen Konzentrationen normal	in allen Konzentrationen normal

Tabelle 12: *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*: Wurzeln in Schwermetalllösungen

7.2.3.1 Wurzelwachstum

In starken Konzentrationen wirkten Zink (**ab 10^{-1} M**) und Kupfer (**ab 10^{-4} M**) toxisch auf die Wurzel; das Wachstum war bei beiden Metallen verlangsamt oder wurde sofort beziehungsweise nach kurzer Zeit eingestellt.

Wiederum wirkte Kupfersulfat stärker inhibierend als Zinksulfat. In **Kupfersulfat** wurde das Wachstum bei 10^{-5} M gesenkt und bei 10^{-4} M eingestellt, wogegen **Zinksulfat** erst bei 10^{-2} M das Wachstum verlangsamt und bei 10^{-1} M stoppte. Bei jeweils **stärkeren** Konzentrationen erfolgte kein Wachstum mehr.

Kleinere Konzentrationen von **Kupfer (bis 10^{-6} M)** und **Zink (bis 10^{-7} M)** waren ohne Einfluss, die Wurzel wuchs wie in der Kontrolle.

Die Reaktion des Wurzelwachstums auf Kupfer war bei *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* gleich und hatte ebenfalls keine wachstumsförderliche Wirkung.

Interessanterweise zeigte sich bei mittleren Konzentrationen von **Zink** in *Triticum aestivum*, dass das Wachstum der Wurzel schneller war als in der Kontrolle. Ob das auch bei *Arabidopsis thaliana* so ist, muss in einer weiteren Arbeit untersucht werden.

Toxischer Effekt von Kupfer

Das Wurzelwachstum ist von vielen Faktoren abhängig; ein ganz wesentlicher ist das Wachstumshormon Auxin. Es ist ein Wachstumsregulator und wirkt auf das Wachstum der Wurzelzellen hemmend (Bandurski and Nonhebel, 1985). Daher ist in Wurzelspitzenmeristemen üblicherweise wenig Auxin vorhanden (Libbert, 1987). Überschüssiges Auxin wird durch die Auxinoxidase abgebaut. Diese wird allerdings durch Kupfer inhibiert (Agarwal et al., 1987; Coombes et al., 1976).

Weitere wichtige Gründe für das geringe Wurzelwachstum können die Störung der Membranen, das Aussickern von Ionen und ein höherer Radikalgehalt sein (Cakmak and Marschner, 1988). Die Zellen werden dadurch geschwächt und wachsen deshalb vermutlich ebenfalls langsamer.

Auch auf die Teilungsfähigkeit der Zellen wirken sich hohe Kupferkonzentrationen aus, sie wird deutlich vermindert. Der Grund dafür sind chromosomale Aberrationen und abnormale Zellteilung sowie die Inhibierung der Mitose (Agarwal et al., 1987).

Toxischer Effekt von Zink

Die Hemmung des Wurzelwachstums durch Zink wird durch Störung physiologischer Prozesse sowie durch chromosomale Aberrationen herbeigeführt. Diese verursachen Hemmung der Mitose (Morris et al., 1984; siehe auch 7.2.2).

Wie durch Kupfer wird auch durch starke Zinkkonzentrationen die Teilungsfähigkeit der Zellen gesenkt (Peterson and Stevens, 2000), denn Zinküberschuss verlängert die G1-Phase der Mitose, vermindert das RNA- und das Proteingehalt der Zelle (Rathorne et al., 1972) und verlangsamt dadurch die Zellteilung.

Weiters werden das Membrangleichgewicht und seine Permeabilität bei Zinküberschuss gestört. Ionen treten also aus und der Gehalt an Radikalen ist erhöht (Cakmak and Marschner, 1988). Dadurch werden die Zellen geschwächt und das Wurzelwachstum herabgesetzt.

Wachstumsförderung durch Zink

Die Wachstumsförderung durch starke Zinksulfatkonzentrationen lässt sich durch die Funktion der Schwermetalle als Mikroelement erklären:

Zink wird für die DNA-Replikation, die Regulierung von Genexpression und in diversen Enzymen benötigt (Marschner, 1995).

Sobald die Reservestoffe der Pflanze zu Ende gehen, benötigt die Pflanze zusätzliche Nährstoffe aus ihrer Umgebung. Der Beobachtungszeitraum von 48 Stunden nach der Keimung ist hierfür relativ kurz, da bis zu diesem Zeitpunkt aller Wahrscheinlichkeit nach die Reserven der Pflanze noch nicht aufgebraucht sind, eine zusätzliche Versorgung ist aber dennoch auch bei jungen Keimlingen wachstumsförderlich, wie man den Ergebnissen entnehmen kann.

Zinkmangel wirkt durch das Fehlen oder wegen unzureichender Mengen von Enzymen und Proteinen. Weiters wird der Enzymstoffwechsel zu wenig reguliert. Durch Zinkmangel kann sich auch Phosphorüberschuss toxisch auswirken (Marschner, 1986). Daher laufen Zellteilungen langsamer oder fehlerhaft ab. Auch Zinkmangel stört den Auxinstoffwechsel (Marschner, 1986).

7.2.3.2 Wurzelspitzen

Große Dosen von **Kupfer-** (bei *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* **ab 10^{-4} M**) und **Zinksulfat** (bei *Triticum aestivum* **ab 10^{-2} M**) führten früher oder später zum Absterben der Wurzel. Die abgeschülfernten Zellen der Wurzelspitze gingen bei beiden Schwermetallen zuerst verloren; dadurch erschien die Wurzelspitze stumpf. In den Zellen der Wurzelspitze und den abgeschülfernten Zellen der Kalyptra koagulierte das Plasma, der Zellkern war klein und geschrumpft und beide braun verfärbt.

Auch Agarwal et al. (1987) beobachteten, dass die schädigende Wirkung des Kupfers bei den Wurzelspitzenzellen beginnt.

Eine Verfärbung der Wurzel konnte bei *Triticum aestivum* bei 10^{-5} und 10^{-4} M CuSO_4 und 10^{-2} M ZnSO_4 nur in den neu gebildeten Wurzelabschnitten beobachtet werden, in **stärkeren** Konzentrationen war die Wurzelspitze zur Gänze braun verfärbt.

Die Braunfärbung der Wurzel in starken Kupfer- und Zinkkonzentrationen lässt sich dadurch erklären, dass diese die Denaturierung der Proteine des Plasmas und der Nukleinsäuren des Zellkernes verursachen. Sie gehen mit den Schwermetallen Komplexe ein, welche braun gefärbt sein können (Marschner, 1995). Dies erklärt gut die Braunfärbung unserer Wurzeln in starken Kupfer- und Zinksulfatkonzentrationen.

Hohe Kupferkonzentrationen rufen aber auch Braunfärbung durch ein rotes Pigment (Punz and Sieghart, 1993) oder durch starke Suberinisierung der neu gebildeten Wurzelabschnitte herbei (Mohr, 1983; Patterson and Olsen, 1983). Dies scheint für mittlere Konzentrationen zuzutreffen.

In 10^{-4} M CuSO_4 waren in *Triticum aestivum* kleine, polsterförmige, braune Gebilde in regelmäßigem Abstand gefunden worden. Die Zellen sind kurz, weil sie wahrscheinlich starben, bevor noch das Streckenwachstum einsetzen konnte. Sie haben daher auch keinen Turgor und werden daher entsprechend von den Nachbarzellen eingedrückt.

7.2.3.3 Rhizodermis

In der Kontrolle und in schwachen Kupfer- und Zinksulfatkonzentrationen war die Rhizodermis bei *Triticum aestivum* ungeschädigt und schloss die Wurzeloberfläche als ebene, einheitliche Hülle ab, die Wurzelhaare wuchsen aus dem unteren Drittel der Trichoblasten.

In stärkeren Kupfersulfatkonzentrationen (10^{-5} bis 10^{-4} M) waren die Rhizodermiszellen nach außen aufgewölbt, geschwollen und auch verkürzt. Die Wurzelhaare setzten häufig an einer

beliebigen Position in der Rhizodermiszelle an und wuchsen nicht schlauchförmig gerade, sondern blasig.

In *Arabidopsis thaliana* waren die Rhizodermiszellen in Konzentrationen ab $5 \cdot 10^{-5} \text{ M CuSO}_4$ zwar nicht nach außen gewölbt, aber auch verkürzt, und zwar mit steigender Konzentration immer kürzer. Dadurch saßen die Wurzelhaare dichter.

Die Verkürzung der Rhizodermiszellen hängt mit der durch Kupfer bedingten Verminderung des Längenwachstums der Zellen zusammen (Agarwal et al., 1987). Auch hier dürfte das Auxin eine essentielle Rolle spielen, dessen Gleichgewicht ja möglicherweise gestört ist. Auxinüberschuss wirkt sich auf die Position der Wurzelhaare aus, dabei werden Wurzelhaare näher dem oberen Ende der Rhizodermiszelle ausgebildet (Masucci and Schiefelbein, 1994).

Die Aufwölbung hängt vermutlich mit der Störung der Plasmamembran zusammen: Kupfer und Zink machen die Membranen stärker permeabel (Agarwal et al., 1987) und den Ionentransport unspezifisch (Klobus et al., 2004). Mit den einströmenden Schwermetall-Ionen gelangt auch mehr Wasser in die Zelle, sodass der Druck in der Zelle steigt. Auch die Zellwand verliert an Festigkeit und gibt dadurch dem Turgor der Zelle nach.

In noch stärkeren Konzentrationen platzten Zellen, die Oberfläche der Wurzel war zerstört. Das Absterben der Epidermiszellen wird auf starke Radikalbildung zurückgeführt (Ouzounidou et al., 1992; Vázquez et al., 1992). Durch diese wird die Oberfläche der Wurzel geschädigt.

7.2.3.4 Infektionen

Bei der Kultur von *Triticium aestivum* bildeten sich gleichzeitig auch viele Mikroorganismen, die in der Lösung und auf Wurzeln und Wurzelhaaren wuchsen.

In mittleren Kupferkonzentrationen (dieser Parameter wurde an Zinksulfat nicht beobachtet) waren die Infektionen stärker als in schwachen oder starken Konzentrationen.

Das ist auf zwei Faktoren zurückzuführen: einerseits auf die Nährstoffkonzentration der Lösung, andererseits auf die Toxizität des Kupfers; in niedrigen Konzentrationen ist der Nährstoffgehalt der Lösung gering, sodass sich Mikroorganismen nur wenig entwickeln. In mittleren und starken Konzentrationen platzen Wurzelhaare und Rhizodermiszellen. Das dabei austretende Plasma enthält viele Nährstoffe und bietet daher ein optimales Milieu für Mikroorganismen. Die Schwermetallkonzentration lässt ihr Wachstum noch zu. Hohe

Konzentrationen sind jedoch auch für Bakterien toxisch, sodass sie sich nicht entwickeln können (Agarwal et al., 1987; Jong, 1984).

Daher ist vermutlich die Bakteriendichte in mittleren Konzentrationen am höchsten.

7.2.3.5 Wurzelhaarbildung

Wurzelhaare bilden sich aus Rhizodermiszellen, indem zunächst eine kleine Ausbuchtung der Zelle sichtbar wird, der *bulge*. Dieser wächst recht langsam. Nach einiger Zeit wachsen aus den *bulges* die schlauchförmigen Wurzelhaare. Üblicherweise sind in einer Reihe von Trichoblasten nur wenige *bulges* in den jüngeren Zellen, dann sind sie zu Trichoblasten ausgewachsen.

Die Zone der *bulge*-Bildung und des Auswachsens der Wurzelhaare aus den *bulges* wurde durch die Schwermetalle verändert, die Wirkung von Kupfer und Zink war bei *Triticum aestivum* unterschiedlich:

In schwachen Konzentrationen unterschieden sich weder die Distanz der *bulges* von der Wurzelspitze noch das Auswachsen der Wurzelhaare von der Kontrolle.

Eine geringere Entfernung der *bulges* von der Wurzelspitze wurde bei *Triticum aestivum* aber in 10^{-4} M Kupfersulfat und bei 10^{-3} und 10^{-2} M Zinksulfat beobachtet.

Bei *Arabidopsis thaliana* hingegen setzten die *bulges* und Wurzelhaare in stärkeren Kupfersulfatkonzentrationen (ab $5 \cdot 10^{-5}$ M) deutlich näher der Wurzelspitze an, die Distanz wurde mit jeder Konzentrationsstufe geringer.

Dies hängt vermutlich mit der durch Zink- und Kupferüberschuss hervorgerufenen Schwächung des Zelllängenwachstums zusammen (Agarwal et al., 1987): Die vom Apikalmeristem gebildeten Zellen strecken sich bedeutend langsamer, sodass zwar vermutlich dieselbe Zellgeneration wie in der Kontrolle *bulges* ausbildet, diese aber wesentlich näher der Wurzelspitze liegen, da die Zellen langsamer wachsen.

Auch das Auswachsen der Wurzelhaare aus den *bulges* war bei *Triticum aestivum* bei Kupfer und Zink verändert (bei *Arabidopsis thaliana* wurde dieser Parameter nicht untersucht):

Der Beginn des Spitzenwachstums war in 10^{-3} und 10^{-2} M ZnSO_4 etwas verzögert, die *bulges* benötigten also für die Initiierung des Spitzenwachstums mehr Zeit als in der Kontrolle. Anders war es in Kupfersulfat bei 10^{-5} und 10^{-4} M: hier wurde in den ersten Stunden nach

dem Transfer in die Kupferlösung aus *bulges* nach kleiner Verzögerung ein Schlauch gebildet. Später gebildete *bulges* jedoch konnten keine Wurzelhaare ausbilden, sodass der neu gewachsene Wurzelabschnitt nur mit *bulges* besetzt war. Der Übergang zum Spitzenwachstum war also vollständig inhibiert.

Die Inhibierung des Spitzenwachstums hängt vermutlich zu einem großen Teil mit der Störung der Plasmapermeabilität und der dadurch fehlenden Ca^{2+} - und pH-Gradienten zusammen. Diese beiden sind essentiell um das Spitzenwachstum einzuleiten und aufrecht zu erhalten (siehe 4.4.3.2). Eine geringfügige Verzögerung ist durch eine leichte Störung der beiden Gradienten durch Kupfer und Zink erklärbar.

7.2.4 Wirkung der Schwermetalle auf die Wurzelhaare

Für die Bildung und das Wachstum von Wurzelhaaren sind mehrere Faktoren wichtig.

Die im Folgenden besprochenen werden in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Die Wirkung von Kupfersulfat wurde bei den Wurzelhaaren von *Triticum aestivum* und *Arabidopsis thaliana* beobachtet, Zinksulfat wurde allerdings ausschließlich bei *Triticum aestivum* untersucht.

	<i>Arabidopsis thaliana</i> in Kupfersulfat	<i>Triticum aestivum</i> in Kupfersulfat	<i>Triticum aestivum</i> in Zinksulfat
Wachstum	bis 10^{-4} M	bis 10^{-4} M	bis 10^{-2} M
Zellkernposition	bei 10^{-5} und 10^{-4} M springt er bei Zugabe etwas Richtung Basis und kehrt dann zur Ausgangsposition zurück	bei 10^{-5} und 10^{-4} M an die Spitze angenähert	bei 10^{-3} M an die Spitze angenähert
Bildung neuer Wurzelhaare	bis 10^{-5} M regelmäßig, bei 10^{-4} M nur Stummel	bis 10^{-6} M regelmäßig, bei 10^{-5} M Bildung verzögert	bis 10^{-3} M regelmäßig, bei 10^{-2} M Bildung verzögert
Zellwandverdickungen	keine	bei 10^{-5} bis 10^{-3} M Kappe an der Spitze, an Stufen, entlang des Schlauches, bei 10^{-5} M als Punkte auf dem Schlauch verteilt	bei 10^{-3} und 10^{-2} M an der Spitze, an Stufen, bei 10^{-3} M entlang des Schlauches und als Punkte auf dem Schlauch verteilt
Stufenbildung, Verzweigungen	nein	regelmäßig bei 10^{-5} , vereinzelt 10^{-4} M	vereinzelt bei 10^{-3} M

Tabelle 13: *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*: Wurzelhaare in Schwermetalllösungen

7.2.4.1 Morphologie und Wachstum

Wurzelhaare sind schlauchförmige Ausstülpungen der Rhizodermis und wachsen in der Regel gerade. Das Wachstum des Wurzelhaares macht eine Expansion der Plasmamembran und der Zellwand erforderlich. Die Zellwand wird an der Wurzelhaarspitze aus Pektinen gebildet, die aus Golgivesikeln mittels Exocytose eingebaut werden. In der primären Zellwand sind nur wenige Cellulosefibrillen vorhanden. Bereits kurz nach der Spitze sind in der Plasmamembran

Cellulose-Synthase-Komplexe integriert, welche Cellulosemikrofibrillen synthetisieren. Diese geben der Zellwand Festigkeit und werden kurz nach ihrer Deposition zusätzlich durch oxidatives „*cross-linking*“ gestärkt. Callose wird ebenfalls durch Synthesen in der Plasmamembran gebildet, die entweder regulär und gleichmäßig Callose deponieren (bei Pollenschläuchen) oder bei bestimmten endogenen oder äußeren Signalen aktiv werden.

Das Wurzelhaar wächst mittels Turgordruck, der die Zellwand ausdehnt. Dies kann wegen der Festigung der lateralen Zellwand durch die Cellulose nur an der Spitze des Wurzelhaares erfolgen. Daher bildet sich ein gerader Wurzelhaarschlauch (Bibikova, 2003).

Bei *Arabidopsis thaliana* wuchsen die Wurzelhaare bis zu 10^{-4} M Kupfersulfat gerade. Ab einer Konzentration von 10^{-3} M hörten sie zu wachsen auf, verloren an Volumen und waren verschrumpelt.

Die Wurzelhaare von *Triticum aestivum* wuchsen ebenfalls bis zu einer Konzentration von 10^{-6} M gerade und schlauchförmig.

Bei 10^{-5} M Kupfersulfat jedoch verhielten sich die Wurzelhaare eigenartig: sie wuchsen eine Zeit lang, wurden dann langsamer und hörten ganz auf. Die Zellwand bildete sich jedoch weiter, sodass an der Spitze eine dicke Schicht aus Cellulose, Callose und Pektinen deponiert wurde. Nach einiger Zeit (etwa 30 Minuten) brach dann unterhalb der dicken Zellwandspitze, die sicher nicht mehr durch den Turgordruck dehnbar wäre, eine neue Spitze aus dem Schlauch, das Wurzelhaar verzweigte sich. Dieser Vorgang wiederholte sich häufig, sodass das Wurzelhaar schließlich ein knorpeliges, bäumchenartiges Aussehen hatte. Diese Veränderung fand sich auch in Zinksulfat, allerdings weniger deutlich und bei höheren Konzentrationen (10^{-3} M).

In höheren Konzentrationen (Kupfersulfat bei 10^{-4} und 10^{-3} M, Zinksulfat bei 10^{-2} M) wurden ebenfalls manchmal Zellwandverdickungen an der Wurzelhaarspitze beobachtet, sie bildeten eine dicke Kappe, aber der Wachstumsstopp war irreversibel. Wenn die Zellwand an der Spitze nicht dicker wurde, platzten die Wurzelhaare häufig.

Die toxische Konzentration der beiden Schwermetalle war für Wurzelhaare die gleiche wie für Wurzeln. Die Wirkung setzte aber bei den Wurzelhaaren deutlich früher ein als bei der Wurzel. Dies hängt damit zusammen, dass Wurzelhaare als erstes mit dem Schwermetall in Kontakt kommen und außerdem ihre Zellwand vor allem an der Spitze extrem dünn ist; Schwermetall-Ionen wirken daher rascher auf sie ein als auf andere Wurzelzellen.

In **1 M ZnSO₄** plasmolysierten Wurzelhaare, da diese Konzentration stark hypertonisch ist. Dies ist auch für **1 M CuSO₄** der Fall, aber interessanterweise beobachteten wir hier nie Plasmolyse, die Zellen waren in dieser Konzentration bereits tot.

Das Platzen der Wurzelhaare wird generell auf starke Radikalbildung zurückgeführt (Ouzounidou et al., 1992; Vázquez et al., 1992). Platzen kann die Zelle auch, weil der Aufbau und die Verfestigung der Zellwand durch Kupfer gestört werden. Wird die Festigung der Zellwand verhindert, platzt daher das Wurzelhaar oder schwillt an (Bibikova et al., 2003). Dies könnte auch eine Erklärung für die leicht blasige Form nicht geplatzter Wurzelhaare sein.

Eine weitere Hypothese sagt aus, dass viele kurzfristige Effekte auf Wand- und Zellform auf eine Interaktion mit dem Cytoskelett, und zwar durch veränderte Orientierung sowohl der Mikrotubuli als auch der Aktinfilamente, zurückgeführt werden können. Zum Beispiel konnte durch Aluminium hervorgerufene Schwellung dadurch erklärt werden (Barceló and Poschenrieder, 1999). Auch dies wäre also eine mögliche Erklärung für blasige Wurzelhaarspitzen.

7.2.4.2 Maximallänge und Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare

Die Länge der ausgewachsenen Wurzelhaare ist ein Parameter, welcher von der Wachstumsgeschwindigkeit und der Wachstumsdauer der Haare abhängt. Generell wuchsen die Wurzelhaare von *Triticum aestivum* in unserer Kulturlösung etwa 16 Stunden lang und erreichten dabei eine durchschnittliche Endlänge von 1100 µm. Um nun sicher zu gehen, dass die Wurzelhaare alle ganz ausgewachsen waren, wurden die Messungen daher nach 24 Stunden gemacht.

Wurzelhaare in starken Konzentrationen beider Metalle (**10⁻⁵ M CuSO₄** und **10⁻³ M ZnSO₄** bei *Triticum aestivum*, **10⁻⁴ M CuSO₄** bei *Arabidopsis thaliana*) waren deutlich kürzer als die Kontrolle, kleinere Konzentrationen bewirkten keine Veränderung der Wurzelhaarlänge. Besonders geringe Mengen von Kupfersulfat (**10⁻⁹** und **10⁻⁸ M** bei *Triticum aestivum* und **5*10⁻⁶ M** bei *Arabidopsis thaliana*) wirkten interessanterweise förderlich auf das Wachstum der Wurzelhaare, sie waren länger.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaare wurde nur bei *Triticum aestivum* untersucht. Neu gewachsene Wurzelhaarabschnitte wurden alle fünf Minuten gemessen.

In unserer Kulturlösung wuchsen die Wurzelhaare von *Triticum aestivum* mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1,2 μm pro Minute (die Wurzelhaare von *Arabidopsis thaliana* wachsen durchschnittlich 1 μm pro Minute).

Schnelleres Wurzelhaarwachstum als in der Kontrolle wurde in den **Kupfersulfat**-konzentrationen 10^{-9} und 10^{-8} M beobachtet. In **Zinksulfat** war keine Wachstumsförderung bemerkbar. Mittlere Kupfersulfat- (10^{-7} und 10^{-6} M) sowie schwache und mittlere Zinksulfat-konzentrationen (10^{-7} bis 10^{-4} M) hatten keine langfristige Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Allerdings konnte häufig nach der Zugabe von Schwermetall-lösungen eine Wachstumsdepression beobachtet werden. Nach kurzer Zeit wuchsen die Wurzelhaare aber wieder schneller weiter.

Starke Schwermetallkonzentrationen (**Kupfersulfat ab 10^{-5} M, Zinksulfat ab 10^{-3} M**) wirkten auf das Wachstum inhibierend. Die Wurzelhaare wuchsen zunächst langsamer, dann hörten sie vorzeitig ganz zu wachsen auf.

Entscheidend für das Wachstum von Wurzelhaaren sind vor allem zwei Faktoren:

Wurzelhaare benötigen einen Ca^{2+} -Gradienten für das Wachstum, das heißt, dass die Konzentration von freiem Ca^{2+} im Plasma in der Spitze höher ist als im übrigen Schlauch. Dafür wird ein ständiger Einstrom von Ca^{2+} benötigt, das Ca^{2+} wird dann in intracellulären Kompartimenten gespeichert oder über die Plasmamembran wieder nach außen gebracht (Reiss and Herth, 1979; Ruijter et al., 1998). Da in unserer Kulturlösung kein Ca^{2+} enthalten ist, baut das Haar den Gradienten aus Zellwand- oder intrazellulären Speichern auf (Ryan et al., 2001); bei wachsenden Pollenschläuchen ist das nicht möglich, sie brauchen Calcium in der Kulturlösung.

Auch ein pH-Gradient ist für wachsende Wurzelhaare notwendig; in der Wurzelhaarspitze ist die H^+ -Ionenkonzentration erhöht, der Gradient wird durch Ionenpumpen, die H^+ -ATPase, aufrechterhalten (Bibikova, 1998; Pinton et al., 1993). Durch hohe Zinkkonzentrationen wird die Aktivität der H^+ -ATPase verringert (Hexum, 1974).

Durch starke Schwermetalllösungen wird allerdings die Plasmamembran geschädigt, sodass ihre Eigenschaft als semipermeable Membran verloren geht (Cooke and Burden, 1990). Ionen treten daher aus der Membran aus (Stroinski and Floryszak-Wieczorck, 1993). Daher können

sich vermutlich der für das Wachstum essentielle Ca^{2+} -Gradient und der ebenso wichtige pH-Gradient entlang des Wurzelhaares nicht oder schlecht ausbilden, das Wachstum ist gestört.

Auch beim Wachstum der Wurzelhaare könnte das Wachstumshormon Auxin eine Rolle spielen. Generell fördert Auxin das Wachstum der Wurzelhaare, aber ein Auxinüberangebot, welches bei hohen Kupfer- und Zinkkonzentrationen auftreten kann (siehe 7.2.3.1), wirkt auf das Wachstum von Wurzelhaaren inhibierend (Jackson, 1960). Allerdings kann sich die Pflanze an hohe Auxin-Konzentrationen etwas adaptieren. Dies könnte auch erklären, weshalb Wurzelhaare nach einer anfänglichen Wachstumsdepression bei Schwermetallzugabe nach einigen Minuten wieder rascher weiter wachsen.

Ob Auxin auch für die Stimulierung des Wurzelhaarwachstums durch kleine Kupfer- und Zink-Konzentrationen verantwortlich ist, ist ebenfalls nicht bekannt. In anderen Zellen fördert Auxin durch Ansäuerung und damit durch Auflockerung der Zellwand die Zellstreckung (Katsumi et al., 2000). Ein ähnlicher Mechanismus wäre hier ebenfalls vorstellbar und müsste untersucht werden.

Für die Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-4} M CuSO_4 kommt noch ein weiterer möglicher Grund für die Verlangsamung des Wurzelhaarwachstums hinzu: Für verzweigt wachsende Wurzelhaare gilt, dass sie deutlich langsamer wachsen als gerade wachsende Wurzelhaare. In *Arabidopsis thaliana* war dies bereits an verzweigt wachsenden Mutanten (cow1-2) (Grierson et al., 1997) beobachtet worden. Diese Haare waren dicker, kürzer und wuchsen langsamer als beim Wildtyp (Ketelaar et al., 2002).

7.2.4.3 Pulsierendes Wachstum bei *Triticum aestivum*

Wurzelhaare von *Triticum aestivum* wuchsen nicht gleichmäßig, sondern hatten geringe periodische Schwankung der Wachstumsgeschwindigkeit, ein wellenförmiges Zu- und Abnehmen in 15 Minutenfrequenzen, das wir als Oszillation bezeichnen.

In Kupfer ist dieses pulsierende Wachstum noch deutlicher (in Zink wurde dieser Parameter nicht analysiert): In den Konzentrationen 10^{-9} , 10^{-7} und 10^{-6} M war eine leichte Oszillation ähnlich wie in der Kontrolle zu beobachten. Anders aber war es bei 10^{-8} und 10^{-5} M **Kupfersulfat:**

Bei 10^{-8} M war bei einigen Wurzelhaaren dieses Pulsieren wesentlich stärker ausgeprägt, die langsamen Phasen waren langsamer als in der Kontrolle, die schnellen waren schneller; die Intervalle waren allerdings gleich wie in der Kontrolle.

In 10^{-5} M konnte eine andere Form der Wachstumsschwankung beobachtet werden: Hier wechselten sich Phasen mit regelmäßigem Wachstum mit Phasen vollständigen Wachstumsstillstandes ab. Wenn sich das Haar weniger stark ausdehnt (langsamer wächst), wird die Zellwand an der Spitze dicker, da die Zellwandbildung offenbar nicht reduziert wird. Die dicke Wurzelhaarspitze verhindert eine weitere Elongation des Wurzelhaares, das Wachstum stoppt komplett. Dann aber baut sich offenbar neuerlich starker Turgordruck auf, sodass seitlich ein neuer Ast aus dem Wurzelhaar herauswachsen kann, der dann ebenfalls nach einiger Zeit wieder zu wachsen aufhört, usw. Dies führt zum bäumchenartig verzweigten Aussehen der Wurzelhaare in dieser Kupfer-Konzentration.

Oszillierendes Wachstum wurde bereits mehrfach an Pollenschläuchen (Feijó et al., 2001; Holdaway-Clarke et al., 1997), vereinzelt auch bei Pilzhyphen (López-Franco et al., 1994) beobachtet. Bei Pilzhyphen wird es allerdings angezweifelt (Sampson et al., 2003). In Wurzelhaaren war oszillierendes Wachstum bisher noch nie beschrieben worden.

Im Unterschied zu unseren Untersuchungen an Wurzelhaaren waren die Wachstumsschwankungen bei Hyphen und Pollenschläuchen wesentlich häufiger und zwar mit Pulsen alle 20 bis 40 Sekunden bei Pollenschläuchen (Holdaway-Clarke et al., 1997), und alle 2,3 bis 22 Sekunden bei Hyphen (López-Franco et al., 1994), über längere Zeiträume erschien das Wachstum gleichmäßig. In unseren Untersuchungen dauerten die Pulse 15 Minuten. Es stellt sich die Frage, ob die Oszillation auf den bei Pollen und Hyphen beobachteten Mechanismen beruhen könnte. In Pollenschläuchen pulsieren Wachstumsgeschwindigkeit und cytoplasmische Ca-Konzentration der Wurzelhaarspitze synchron, auch ein Cl^- Ausstrom ist damit assoziiert (Zonia and Feijó, 2003). Beide Ionen spielen eine aktive Rolle beim Pollenwachstum. Eine andere Untersuchung korreliert das oszillierende Wachstum mit der Intaktheit des Aktinskeletts und nicht mit dem cytoplasmatischen Ca-Gradient (Parton et al., 2003).

Die Oszillation könnte die sichtbare Auswirkung von regulatorischen, homöostatischen Zyklen sein. Diese betreffen den Ionenfluss der Plasmamembran, Veränderungen des cytoplasmatischen Protonen-, Ca-, K- und Cl^- -Flusses. Außerdem sind möglicherweise Zellwand-

plastizität, Viskosität, Turgor (Turgorschwankungen könnten hier den Schlauch weiter vorstoßen) und Cytoskelett beteiligt (Feijó et al., 2001).

Für Hyphen wird die Oszillation mit der Zellwandbildung in Verbindung gebracht. Es könnte sich um periodische Synthese von Zellwandmaterial, plötzliche Zellwandausdehnung oder plötzliche Ausschüttung von Vesikeln handeln. Es könnten also synchrone oder asynchrone Verschiebungen von Synthese und Zellwanddehnung sein (López-Franco et al., 1994; Parton et al., 2003).

7.2.4.4 Zellwand

Die Zellwand von wachsenden Wurzelhaaren ist an der Spitze ausschließlich primäre Zellwand, besteht also vor allem aus Pektinen und nur wenigen Cellulosefibrillen. Direkt hinter der Wurzelhaarspitze setzt die Synthese von Cellulosemikrofibrillen ein, die Zellwand des Wurzelhaarschlauches (sekundäre Zellwand) besteht also zu einem hohen Anteil aus Cellulose. Die Zellwand ist daher an der Spitze dünnwandig, im Wurzelhaarschlauch dann etwas dicker (bei *Triticum aestivum* etwa 0,4 µm).

Die Zellwandbestandteile wurden mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen analysiert.

Der oben beschriebene Zellwandaufbau blieb bei *Arabidopsis thaliana* auch in Kupfersulfat erhalten.

In *Triticum aestivum* hingegen veränderten sich sowohl in Kupfer- als auch in Zinksulfat in gewissen Konzentrationen die Zellwandzusammensetzung und ihr Aufbau:

Beide Schwermetalle, aber vor allem Kupfer, bewirkten Zellwandverdickungen entlang des Wurzelhaarschlauches (etwa 1 µm dick) und an der Wurzelspitze. Diese waren aus Cellulose, Callose und Pektinen aufgebaut.

Verdickungen an der Wurzelhaarspitze waren häufig. Besonders mächtig (bis 12 µm) waren sie bei 10^{-5} und 10^{-4} M Kupfersulfat und bei 10^{-3} M Zinksulfat, weniger stark ausgeprägt waren sie bei 10^{-3} M Kupfersulfat und 10^{-2} M Zinksulfat. Diese waren kappenartige Verdickungen aus Cellulose und Pektin. Zusätzlich gab es aber häufig auch knopfartige Verdickungen aus Callose.

Verdickungen entlang des Schlauches oder an den Verzweigungen (ehemaligen Spitzen) konnten nur in den Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-5} M CuSO_4 und 10^{-3} M ZnSO_4 beobachtet werden. Ihr Vorkommen war allerdings in Kupfersulfat häufiger als in Zinksulfat.

Der Aufbau der knopfartigen Verdickungen von ehemaligen Wurzelspitzen entsprach der Wurzelhaarspitze, die Zellwandverdickung war allerdings weniger stark.

Die Verdickungen der lateralen Zellwände des Wurzelschlauches bestanden hauptsächlich aus Cellulose und Pektin. Zusätzlich war aber auch bei manchen Wurzelhaaren Callose als knopf- oder punktartige Deposition aufgelagert. Bei Kupfersulfat waren es meist größere Knöpfe von runder oder ovale Form, in Zinksulfat waren es meist kleine, sandkornartig erscheinende Punkte.

Zellwandverdickungen stellen für das Wurzelhaar eine Möglichkeit dar, Schwermetalle teilweise (entsprechend der Bindungsplätze der Zellwand) am Eindringen zu hindern. Es handelt sich um einen Vermeidungsmechanismus der Pflanze. Laut Iwasaki können bis zu 60% von Kupfer an der Zellwand oder im Raum zwischen der Zellwand und der Plasmamembran gebunden werden (Iwasaki et al., 1990). Kupfer hat eine besonders hohe Affinität für Liganden und adsorbiert daher stark an der Zellwand, aber auch Zink wird stark adsorbiert (Jorgenson, 1966).

Dies erfolgt häufig durch zusätzliche Schichten aus pektinartigen Substanzen oder anderen Kohlenhydraten auf der Zellwand (Kartusch, 2003). Cellulose ist generell der häufigste Bestandteil der Zellwand (Clowes and Juniper, 1968) und dient im ungestressten Wurzelhaar dem Aufbau der Zellwand, anscheinend wird sie aber gemeinsam mit Pektinen auch bei Stress für großflächige Zellwandverdickungen eingesetzt.

Callosedeposition scheint eine spezifische Reaktion auf Stress zu sein und wird meist zur lokalen Verdickung der Zellwand eingesetzt. Sie wird aber nicht von allen Stressoren im selben Ausmaß ausgelöst. Dabei werden Cellulose-Synthase-Komplexe, welche in und unterhalb der Spitzenregion lokalisiert sind, rasch auf die Synthese von Callose umgeschaltet (Brett, 2000).

Die Bildung von Callose erfolgt nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“, wird also ab einem gewissen Schwellenwert unabhängig von der Schwermetall-Konzentration gebildet. Kartusch (2003) hat sie bei *Allium cepa* ab $3,2 \mu\text{M}$ CuSO_4 beobachtet, wobei er auch Cytoplasma-Ansammlungen nahe der Callosedepositionen beobachtete. Dies wäre auch interessant an Wurzelhaaren zu untersuchen.

Besonders interessant ist die Beobachtung, dass auch in Zinksulfat Callosedeposition zu finden ist, da Kartusch (2003) bei *Allium cepa* wohl bei den Elementen Kupfer, Nickel, Chrom, Mangan, Kobalt, Cadmium, Aluminium, Blei, Arsen, Vanadium, Lithium, und Strontium Callosebildung beobachten konnte, nicht aber bei Zink. Es verhinderte in *Allium cepa* sogar die Callosebildung durch Kupfer.

Auch an anderen spitzenwachsenden Zellen, den Apikalzellen von Farn-Protonemata, wurden Zellwandverdickungen aus Callose, lipidhaltigen Substanzen und stark entesterten Pektinen beobachtet, allerdings durch Blei hervorgerufen (Krzslowska et al., 2004). Auch Protonema bildeten wiederholt neue *outgrowth* im noch dünnwandigen, leicht lateral gelegenen Bereich der Spitze. In der dünnwandigen Region fehlten aber die Pektine.

Das Auftreten von Callose und Pektinen bedeutet also, dass ganz allgemein mehrere Schwermetalle ähnliches Verhalten in spitzenwachsenden Zellen auslösen. Daher könnte die Ausbildung von Zellwandverdickungen aus Callose und Pektinen ein genereller oder zumindest häufig angewandter Mechanismus zur Vermeidung von Schwermetallen in diesem System sein. Es könnte andererseits auch ein Ausdruck von unspezifischem Stress-Response sein.

7.2.5 Strömung, Plasma, Cytoskelett

Wachsende Wurzelhaare haben eine charakteristische Cytoarchitektur. Die apikale Region oder vesikelreiche Spitze ist gefüllt mit Ribosomen und Golgivesikeln für den Aufbau der Zellwand an der Wurzelhaarspitze, die Anwesenheit von Cytoskelett konnte noch nicht nachgewiesen werden. Die anschließende subapikale Region enthält zusätzlich diverse Organellen sowie cortikale Mikrotubuli und Aktinfilamente. Der Wurzelhaarschlauch wird hauptsächlich von der Zentralvakuole ausgefüllt, Organellen und Cytoskelett liegen in einer dünnen Schicht der Plasmamembran an. Das Plasma strömt dabei in Form von umgekehrter Springbrunnenströmung durch das Wurzelhaar, fließt also entlang der Plasmamembran zur Wurzelhaarspitze und in einigen weiter innen liegenden Plasmasträngen wieder Richtung Wurzelhaarbasis.

Mit Ende des Wurzelhaarwachstums geht die Strömung in Zirkulationsströmung und schließlich in Rotationsströmung über, wobei die apikale Region verschwindet, da sich die Spitze zuerst mit größeren Organellen füllt. Dann wandert die Vakuole in die

Wurzelhaarspitze vor und alle Organellen bewegen sich zirkulationsförmig durch das ganze Wurzelhaar um die große Zentralvakuole.

Diese Cytoarchitektur und Strömung blieben bei *Arabidopsis thaliana* und bei *Triticum aestivum* in schwachen Kupfer- und Zinksulfatkonzentrationen unverändert. In mittleren Konzentrationen (bei 10^{-4} und 10^{-3} M CuSO_4 sowie 10^{-3} und 10^{-2} M ZnSO_4) blieben die polare Organisation des Wurzelhaares und die umgekehrte Springbrunnenströmung so lange erhalten, wie das Wachstum fortgesetzt wurde. Mit Wachstumsende wurde wie in der Kontrolle Zirkulationsströmung eingeleitet. Die Hauptmenge der Organellen verschwand aus dem Wurzelhaar, sie zog sich möglicherweise in die Rhizodermiszelle zurück. In starken Konzentrationen stockte das Plasma in der Wurzelhaarspitze und entlang des Wurzelhaarschlauchs.

Obwohl das Cytoskelett selbst nicht untersucht wurde, gibt es einige Hinweise darauf, dass es intakt bleibt: Die cortikalen Mikrotubuli orientieren die Cellulosemikrofibrillen in der Zellwand (Gunning and Hardham, 1982) und sind für die Wachstumsrichtung des Wurzelhaares verantwortlich (Dolan, 2001; Ridge, 1988). Da die Wurzelhaare bei *Triticum aestivum* in mittleren Konzentrationen (10^{-5} CuSO_4 und 10^{-3} M ZnSO_4) immer gerade wachsen und außerdem die Zellwand dicker wird, nehmen wir an, dass die Mikrotubuli intakt sind. Solange das Wurzelhaar wächst muss auch das Aktinskelett in Ordnung sein, da es für den Transport der Vesikel zur Wurzelhaarspitze notwendig ist (Miller et al., 1999). Auch die vorhandene Plasmaströmung ist ein Hinweis auf ein intaktes Cytoskelett, vor allem auf funktionierende Aktinfilamente (bis 10^{-2} M beider Schwermetalle und bei beiden Versuchspflanzen).

Brownsche Bewegung, wie sie bei *Arabidopsis thaliana* ab 10^{-2} M CuSO_4 und bei *Triticum aestivum* ab 10^{-3} M CuSO_4 nach einiger Zeit zu beobachten war, deutet hingegen auf Schädigung des Cytoskeletts hin. In Zinksulfat konnte diese Erscheinung nicht bemerkt werden.

Der Rückzug des Zellkernes in die Rhizodermis (mit Ende des Wachstums) erfolgte in allen Kupfersulfatkonzentrationen und Zinksulfatkonzentrationen bis 10^{-2} M und spricht dafür, dass das Aktinskelett zumindest ein Zeit lang erhalten blieb, zumindest so lange bis der Zellkern in die Rhizodermiszelle gewandert war.

Bei 10^{-1} M ZnSO_4 wurde der Zellkern nicht zurückgezogen und die Zellwand wurde nicht dicker, eine Störung des Cytoskeletts wäre also denkbar.

7.2.5.1 Zellkerne

Der Zellkern spielt eine wichtige Rolle für die Regulierung des Wurzelhaarwachstums. Darauf führt man seine kontrollierte Position im Wurzelhaar zurück:

In der Rhizodermis migriert er, hat also keine fixe Position. Mit der Bildung von *bulges* liegt er allerdings an der, dem *bulge* gegenüberliegenden Zellwand. Mit der Initiierung des Spitzenwachstums nähert er sich dem *bulge* und wandert ab einer bestimmten Schlauchlänge in das Wurzelhaar ein. Er bleibt dann während des Spitzenwachstums stets eine gewisse Distanz von der Spitze entfernt, bewegt sich also im Haar mit der Spitze mit. Bei *Arabidopsis thaliana* variiert diese Distanz kaum ($77 \mu\text{m} \pm 15$ (Ketelaar et al., 2002)), bei *Triticum aestivum* ist die Position etwas flexibler (54-205 μm).

In ausgewachsenen Wurzelhaaren beginnt der Zellkern durch das Wurzelhaar zu wandern und zieht sich schließlich in die Rhizodermis zurück.

In schwachen Konzentrationen (bei *Triticium aestivum* bis 10^{-6} M CuSO_4 und bis 10^{-4} M ZnSO_4 , bei *Arabidopsis thaliana* bis $5 \cdot 10^{-6}$ M CuSO_4) behielt der Zellkern seine definierte Position von der Spitze bei. Stärkere Konzentrationen hatten aber einen Einfluss auf seine Lage:

In *Arabidopsis thaliana* folgte der Zellkern bei 10^{-5} und 10^{-4} M Kupfersulfat in den ersten Minuten nach der Zugabe nicht der wachsende Wurzelspitze nach, das heißt die Distanz zur Wurzelhaarspitze vergrößerte sich. Nach wenigen Minuten holte er allerdings wieder auf und hielt seine Distanz konstant bis zum Wachstumsende. Womit dieses Verhalten zusammenhängt, ob es zum Beispiel vom Cytoskelett abhängig ist, wäre interessant in einer weiteren Arbeit zu untersuchen.

Bei *Triticum aestivum* reagierte der Zellkern anders auf Kupfer und Zink: In 10^{-5} bis 10^{-4} M CuSO_4 und 10^{-3} M ZnSO_4 bewegte er sich wenige Minuten nach der Schwermetallzugabe deutlich auf die Wurzelhaarspitze zu und blieb dort, bis das Wachstum eingestellt wurde.

Die Position des Zellkernes wird in Wurzelhaaren durch subapikales F-Aktin (Lloyd et al., 1987), und Mikrotubuli festgelegt. Die Mikrotubuli sind mit ihm in der subapikalen Region verknüpft, F-Aktin fixiert den Zellkern am Apex und verhindert sein Vorrücken zur Spitze. Sato et al. (1995) beobachteten bei *Arabidopsis*, dass die Position des Zellkerns von Aktin abhängt.

Es wäre möglich, dass das Kupfer, welches ja Proteine denaturiert, das Protein Villin abbaut, oder dass Zink dessen Synthese inhibiert. Villin ist ein aktinbündelndes Protein, F-Aktinbündel könnten daher nicht ausgebildet werden oder an Stabilität verlieren. Dadurch kann das Aktin den Zellkern nicht mehr am Vorrutschen hindern (Sato et al., 1995).

Um diese Hypothese zu festigen, wäre es allerdings notwendig, den Einfluss der beiden Schwermetalle auf das Cytoskelett zu untersuchen.

Eine andere mögliche Erklärung für die Annäherung des Zellkerns an die Wurzelhaarspitze wäre, dass sich der Zellkern der Spitze annähert, da diese (auf Grund der Dünnwandigkeit) die empfindlichste und daher am stärksten gestresste Region des Wurzelhaars ist. Er muss daher dort notwendige Prozesse zur Stressbekämpfung steuern.

Auch könnte die Lage des Zellkerns mit der Ausbildung von Zellwandverdickungen zusammenhängen, denn Haberlandt (1887) hat beobachtet, dass der Zellkern sich dabei der Zellwand annähert oder sogar daran zu liegen kommt. Der Zellkern ist dabei lokal an diese assoziiert. An der Alge *Vaucheria sp.* beobachtete er weiters, dass die Ausbildung von „Cellulosemembranen“ nur in Anwesenheit des Zellkerns erfolgt (Haberlandt, 1887). Eine ähnliche Beobachtung wurde an *Allium cepa* ebenfalls in Zusammenhang mit Kupfer gemacht: Der Zellkern zirkulierte bei Kupferzugabe stark. Dort wo sich Callose ausbildete, blieb er dann stehen (Lasselsberger, 2002).

Anders verhielt sich der Zellkern in Konzentrationen bis 10^{-2} M CuSO_4 und ZnSO_4 : der Zellkern wurde bei *Triticum aestivum* (wie bei der Kontrolle) mit Wachstumsende in die Rhizodermiszelle zurückgezogen. In starken Konzentrationen (10^{-1} M CuSO_4 und ZnSO_4 bei *Triticum aestivum*, ab 10^{-3} M CuSO_4 bei *Arabidopsis thaliana*) blieb der Zellkern an seiner Position oder erreichte die Rhizodermiszelle nicht mehr bevor die Strömung eingestellt wurde.

Für die basipetale Bewegung nach Wachstumsende sind Proteinsynthese und funktionsfähiges Aktinskelett im Schlauch notwendig. Fehlt das Aktinskelett (Abbau mit

Cytochalasin D), migriert der Zellkern zwar, kann aber nicht zurückgezogen werden. Wird mit mRNA-Blockern die Synthese der Proteine verhindert, bleibt der Zellkern ebenfalls in der subapikalen Region.

Eine Störung der Proteinsynthese durch Kupfer und Zink ist bekannt, kann daher auf die untersuchten starken Kupfer- und Zinksulfatkonzentrationen zutreffen. Der Zustand der Aktinfilamente bei Kupfer- und Zinkbelastung wäre hier zu analysieren. Durch ein Abreißen der Aktinfasern oder das Fehlen der notwendigen Enzyme für den Rückzug des Zellkernes verharrt der Zellkern an Ort und Stelle.

In den verzweigten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (cow1-2) (Grierson et al., 1997) wurde beobachtet, dass der Zellkern zwischen den beiden Zweigen des Wurzelhaares hin- und her wandert und sich bei durchschnittlich 46 μm hinter der Wurzelhaarspitze aufhält, also näher als beim Wildtyp. Wird eine gewisse Wurzelhaarlänge überschritten, bleibt der Zellkern in einem der beiden Zweige, der andere stellt das Wachstum ein. Die Annäherung an die Spitze wurde auch in den verzweigten Wurzelhaaren von 10^{-5} M CuSO_4 beobachtet.

Zellkernform

Generell hat der Zellkern in Wurzelhaaren eine längliche, am zur Wurzelhaarspitze weisenden Ende etwas zugespitzte Form. Diese entsteht durch ziehende Kräfte, welche bei der Migration des Kernes durch F-Aktinbündel auf diesen wirken.

Dabei ist die Oberfläche des Zellkerns bei wachsenden Wurzelhaaren leicht gekerbt und eingestülpt. In ausgewachsenen Wurzelhaaren weist der Kern dagegen starke Vorsprünge der Zellkernmembran auf (Bruaene, 2003).

In schwachen Konzentrationen von Kupfer- und Zinksulfat blieb diese Zellkernform erhalten.

In mittleren **Kupfer-** (10^{-5} und 10^{-4} M) und **Zinksulfatkonzentrationen** (10^{-3} M) verlor der Zellkern an Volumen, war divers geformt, zum Beispiel kugelig, tropfenförmig oder extrem schmal, und hatte eine grieselig-körnige Struktur. In starken Konzentrationen (**ab 10^{-3} M CuSO_4 , ab 10^{-2} M ZnSO_4**) konnte der Zellkern häufig nach einigen Stunden nicht mehr aufgefunden werden, er ging im koagulierten Plasma unter.

Ein Verlust des Zellkernvolumens durch Zink war schon von Rathorne et al. (1972) beobachtet worden. Kugelige oder gestauchte Form könnte durch das Nachlassen der

ziehenden Kräfte bei der Migration des Zellkernes zustande kommen (Bruaene, 2003). Dies kann durch die Auflösung oder die Verringerung der Verbindung zwischen dem Zellkern und den Aktinbündeln bewirkt werden.

Auch Lasselberger (2002) beobachtet Kerndeformationen nach Behandlung mit Kupfersulfat.

Die grieselig-körnige Oberflächenstruktur deutet auf eine Denaturierung der Proteine des Zellkernes hin. Denaturierung von Proteinen wurde bei beiden Schwermetallen beobachtet (Marscher, 1995). An *Allium cepa* wurde weiters beobachtet, dass durch Kupfer Aminosäuren depolymerisiert werden, wobei der Zellkern fragmentiert wird und Micronuclei bildet. Darüber hinaus muss auch eine Änderung der Chromatinstruktur erwartet werden; nach Agarwal et al. (1987) verursacht Kupfer zum Beispiel die Zerklüftung von Chromatin.

Zink wiederum senkt den RNA- und den Proteingehalt des Zellkernes und inhibiert deren Synthese (Rathorne et al., 1972).

8 ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung der Schwermetalle Kupfer und Zink wurde in Wurzeln und Wurzelhaaren von *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* untersucht. Einerseits sind dies essentielle Mikronährstoffe, andererseits wirken sie in hohen Konzentrationen toxisch auf Pflanzen; die Reaktion der einzelnen Wurzelzellen ist daher von besonderem Interesse.

Es hat sich gezeigt, dass Kupfer- und Zinksulfat häufig gleichartig auf Wurzeln und Wurzelhaare von *Triticum aestivum* wirken, dabei erfolgt aber eine Verschiebung der Schadwirkung um ein bis zwei Zehnerpotenzen; Zink ist weniger toxisch als Kupfer. Beide Schwermetalle senken in starken Konzentrationen die Keimrate, verlangsamen das Wurzelwachstum und vergrößern die Distanz der ersten Wurzelhaare von der Wurzelspitze. Beide Schwermetalle führen zu einer leichten Verzögerung beim Auswachsen der Wurzelhaare aus den *bulges*, in Kupfersulfat allerdings kann das Auswachsen auch gänzlich inhibiert werden.

In hohen Kupfersulfatkonzentrationen (bei Zinksulfat nicht untersucht) ist das Plasma der Wurzelspitzenzellen koaguliert und braun, Rhizodermiszellen sind blasig aufgewölbt oder platzen, die Wurzelhaare setzen an einer beliebigen Position an.

Hohe Kupfer- und Zinksulfatkonzentrationen verhindern weiters die Bildung von neuen Wurzelhaaren, senken oder arretieren das Wachstum und die maximale Länge von bereits gebildeten oder neuen Wurzelhaaren durch verfrühten Wachstumsstopp, das Plasma verhält sich dabei so wie in Kontrollzellen, die ihr Wachstum beenden. In sehr starken Konzentrationen platzen viele Wurzelhaare und das Plasma koaguliert.

Die Schwermetalle führen auch zu einer Annäherung des Zellkerns an die Wurzelhaarspitze und zu Veränderungen der Zellkernform und des Volumen.

Außerdem bewirkt vor allem Kupfersulfat, aber auch Zinksulfat in gewissen Konzentrationen knorpelig-stufiges Aussehen der Wurzelhaare, bedingt durch schubartiges Wachstum und Bildung neuer Wurzelhaarspitzen. Dabei bilden sich Zellwandverdickungen aus Callose, Cellulose und Pektin entlang des Wurzelhaars, an der Spitze und an Verzweigungspunkten, sowie Callosepunkte verteilt auf dem Wurzelhaarschlauch.

Geringe Kupfersulfatkonzentrationen haben eine förderliche Wirkung auf das Wurzel- und Wurzelhaarwachstum, in kleinen Zinksulfatkonzentrationen werden die Wurzelhaare länger.

Arabidopsis thaliana verhält sich zum Teil anders als *Triticum aestivum* in Kupfersulfat: bei *Arabidopsis* wird die Distanz zwischen der Wurzelspitze und den ersten Wurzelhaaren kürzer, bei *Triticum* ist sie größer. Aber ähnlich wie bei *Triticum* wird das Wurzelwachstum in hohen Konzentrationen verringert oder arretiert, in kleinen Kupfersulfatkonzentrationen gesteigert. Auch die Wurzelspitze ist durch Kupfersulfat ähnlich beeinträchtigt und wird stumpf.

Bezüglich der Wurzelhaare hat *Arabidopsis* in Kupfersulfat eine größere Wurzelhaardichte als *Triticum* und der Zellkern ist weiter von der Wurzelhaarspitze entfernt als in der Kontrolle. Wie bei *Triticum* verhindern hohe Kupfersulfatkonzentrationen die Bildung von neuen Wurzelhaaren und inhibieren das Wurzelhaarwachstum. Die Wachstumsbeendigung erfolgt wie in der Kontrolle, in starken Konzentrationen koaguliert allerdings das Plasma. Anders als bei *Triticum* verlieren die Haare ihren Turgor, sie platzen nicht und bleiben dünnwandig und gerade.

9 AUSBLICK

Aus den Versuchen hat sich ergeben, dass Wurzelhaare in Kupfer- und Zinksulfatlösungen verdickte Zellwände ausbilden. Nun wäre es interessant zu wissen, ob zwischen den Verdickungen und der Plasmamembran Verbindungen vorhanden sind. Dies könnte mit Plasmolyse erfasst werden.

Eine detaillierte Analyse der Strömungsgeschwindigkeit in Zusammenhang mit der oszillierenden Wachstumsgeschwindigkeit beziehungsweise mit dem etappenweisen Wachstum bei der Bildung neuer Wurzelhaarspitzen könnte auch aufschlussreich sein.

Weiters sollte verifiziert werden, ob Kupfer und Zink das Cytoskelett schädigen. Dafür könnte man ihre Wirkungsweise mit der durch Cytoskeletthinhibitoren hervorgerufenen Wirkung vergleichen oder Cytoskelettfarbstoffe einsetzen.

Auch wäre es interessant herauszufinden, an oder in welchen Kompartimenten oder Organellen die Metalle gespeichert oder gebunden werden und ob es Schwermetall-Gradienten entlang des Wurzelhaares gibt. Auch, ob mit steigender Konzentration kontinuierlich die Schwermetallkonzentration im Haar zunimmt oder ob, ab einem Schwellenwert, das Wurzelhaar mit Ionen überschwemmt wird. Daten hierüber können mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Scanning-Elektronenmikroskopie erhalten werden.

Wichtig wäre auch, Veränderungen des Ca^{2+} und des pH-Gradientens mit Fluoreszenzfarbstoffen nachzuweisen.

Außerdem sollte der Einfluss der Schwermetalle auf den Auxinstoffwechsel und die dadurch hervorgerufenen Störungen durch zusätzliches Auxin beziehungsweise Auxin Oxidase überprüft werden.

10 LITERATUR

1981. Copper in Soils and Plants. Academic. Press, Sydney.
- Ae, N., and T. Otani. 1997. The role of cell wall components from groundnut roots in solubilizing sparingly soluble phosphorus in low fertility soils. *Plant Soil*. 196:265-270.
- Agarwal, K., A. Sharma, and G. Talukder. 1987. Copper Cytotoxicity. Vol. 30. 131-158.
- Aidid, S., and H. Okamoto. 1993. Response of elongation growth rate, turgor pressure and cell wall extensibility of stem cells of *Impatiens balsamina* to lead, cadmium and zinc. *Biometals*. 6.
- Arora, A., Katewa, SS. 1999. Germination as a screening index of heavy metal tolerance in three ethno food grasses. *J. Environ. Biol.* 20(1):7-14.
- Artschwager, E. 1925. Anatomy of vegetative organs of sugar cane. *J. Agric. Rec.* 30:197-221.
- Assche, F.v., and H. Clijsters. 1986. Inhibition of the photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photophosphorilation. *Physiol. Plant.* 66:717-721.
- Baker, A. 1981. Accumulators and excluders- strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3:643-654.
- Baker, A. 1987. Metal tolerance. *New Phytol.* 106:93-111.
- Baker, A., and R. Brooks. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecov.* 1:81-126.
- Baker, D., and J. Senft. 1995. Copper. In *Heavy Metals in Soils*. B. Alloway, editor. Blackie Acad. & Profess., London. 179-205.
- Bálint, A., G. Kovács, and J. Sutka. 2002. Copper tolerance of *Aegilops*, *Triticum*, *Secale* and triticale seedlings and copper and iron content in their shoots. *Acta Biologica Szegediensis*. 46:77-78.
- Bandurski, R., and H. Nonhebel. 1985. Auxins. In *Advanced Plant Physiology*. M. Wilkins, editor. The Pitman Press, Bath.

- Barceló, J., and C. Poschenrieder. 1990. Plant water relations as effected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13:1-37.
- Barceló, J., and C. Poschenrieder. 1999. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. *In Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems.* M. Prasad and J. Hagemeyer, editors. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Bates, T. 1997. Cytoplasmatic pH gradients in growing *Arabidopsis* root hairs and their effect on growth rate. *In Amer. Soc. Plant Biol.*
- Bates, T., and J. Lynch. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* 19:529-538.
- Bathey, N., and H. Blackbourn. 1993. The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol.* 125:307-338.
- Bell, M., P. Murphy, P. Parker, and I. Ridge. 1991. *Plant Physiology.* Hodder & Stoughton, Open University, London.
- Berglund, A., M. Quartacci, L. Calucci, F. Navari-Izzo, C. Pinzino, and C. Liljeberg. 2002. Alternations of wheat root plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1564:466-472.
- Berglund, A., M. Quartacci, and C. Liljenberg. 2000. Changes in plasma-membrane lipid composition: a strategy for acclimation to copper stress. *Biochem. Soc. Trans.* 28:905-907.
- Bergmann, W. 1992. *Nutritional Disorders in Plants-Development, Visual and Analytical Diagnosis.* G. Fischer Verlag, Jena-Stuttgart.
- Berrie, A. 1985. Germination and dormancy. *In Advanced Plant Physiology.* M. Wilkins, editor. The Pitman Press, Bath.
- Berrie, A., and D. Drennan. 1971. The effect of hydration-dehydration on seed germination. *New Phytol.* 70:135-142.
- Bibikova, T., S. Gilroy, K. Waldron, and C. Brett. 2003. The role of cell wall properties in directing root hair growth.

- Bibikova, T., T. Jacob, I. Dahse, and S. Gilroy. 1998. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Develop.* 125:2925-2934.
- Bollard, E. 1983. Involvement of unusual elements in the plant growth and nutrition. In *Encyclopaedia of Plant Physiology*. Vol. 15B. A. Läuchli and L. Bielecki, editors. Springer-Verlag, Berlin. 695-744.
- Bonilla, I., C. Mergold-Villasenor, M. Campos, N. Sanchez, H. Perez, and L. Lopez. 1997. The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline/ proline rich proteins. *Plant Physiol.* 115:1329-1340.
- Bonnett, H.J., and E. Newcomb. 1966. Coated vesicles and other cytoplasmic components of growing root hairs of radish. *Protoplasma.* 62.
- Borboa, L., and De la Torre, C. 1996. The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytol.* 134:481-486.
- Bould, C., E. Hewitt, and P. Needman. 1983. *Diagnosis of Mineral Disorders in Plants. Principles* HMSO, London.
- Braune, W., A. Leman, and H. Tauber. 1999. *Pflanzenanatomisches Praktikum I: Zur Einführung in Anatomie der Vegetationsorgane der Samenpflanzen.* G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Brett, C. 2000. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 199:161-199.
- Bruaene, N.v. 2003-2004. Nuclear and cytoskeletal dynamics in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. In *Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste biologische Wetenschappen. Universiteit Gent, Gent.* 205.
- Burton, K., E. Morgan, and A. Roif. 1983. The influence of heavy metals upon the growth of sitka-spruce in South Wales forests. I. Upper critical and foliar concentrations. *Plant Soil.* 73:327-336.
- Cakmak, I., and H. Marschner. 1988. Enhanced superoxide radical production in roots of Zn-deficient plants. *J. Exp. Bot.* 39:1449-1460.
- Campbell, N. 1997. *Biologie.* Spektrum Akad. Verl., Heidelberg-Berlin-Oxford.

- Chaoui, A., E. Ferjani, and M. Ghorbal. 1995. Zinc phytotoxicity and induction of stress proteins in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *CR Seances Soc. Biol. Fil.* 189:667-678.
- Chaoui, A., S. Mazhoudi, M. Ghorbal, and E. Elferjani. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127:139-147.
- Cheng, G., and D. Huber. 1997. Carbohydrate solubilization of tomato locale tissue cell walls: parallels with locale tissue liquefaction during ripening. *Physiol. Plant.* 101:51-58.
- Clarkson, D. 1974. Ion Transport and Cell Structure in Plants. Mc Graw-Hill Book Company UK, Maidenhead-Berkshire.
- Clarkson, D. 1985. Ionic relations. *In* Advanced Plant Physiology. M. Wilkins, editor. The Pitman Press, Bath.
- Clarkson, D. 1993. Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 341:5-17.
- Clowes, F., and B. Juniper. 1968. Plant Cells. Blackwell Sci. Pub., Birkenhead, GB.
- Cooke, D., and R. Burden. 1990. Lipid modulation of plasma membrane bound ATPases. *Physiol. Plant.* 78:153-159.
- Coombes, A., N. Lepp, and D. Phipps. 1976. The effect of copper on IAA-oxidase activity in root tissue of barley (*Hordeum vulgare* cv. Zephyr). *Z. Pflanzenphys.* 80:236-242.
- Cordazzo, CV. 2002. Effect of seed mass on germination and growth in three dominant species in southern Brazilian coastal dunes. *Brez. J. Biol.* 62:427-35.
- Cormack, R. 1949. The development of root hairs in angiosperms. *Bot. Rev.* 15:583-612.
- Cseh, E., F. Fodor, A. Varga, and G. Záray. 2000. Effect of lead treatment on the distribution of essential elements in cucumber. *J. Plant Nutr.* 23:1095-1105.
- Cutsem, P.V., and C. Gillet. 1982. Activity coefficients and selectivity values of Cu^{2+} , Zn^{2+} ions absorbed in the *Nitella flexilis* L. cell wall during triangular ion exchanges. *J. Exp. Bot.* 33:847-853.
- Dawson, D., C. Watkins, and L. Melton. 1995. Intermittent warming affects cell wall composition of "Fantasia" nectarines during ripening and storage. *J. Americ. Soc. Horticult. Sci.* 120:1057-1062.

- Degenhardt, B., and H. Gimmler. 2000. Cell wall adaptation to multiple environmental stress in maize roots. *J. Exp. Bot.* 51:595-603.
- Derksen, J., and A. Emons. 1990. Microtubules in tip growth systems. *In* Tip Growth in Plant and Fungal Cells. I.B. Heath, editor. Acad. Press, San Diego. 147-181.
- Devi, S., and M. Prasad. 1999. Membrane lipid alternations in heavy metal exposed plants. *In* Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. M. Prasad and J. Hagemeyer, editors. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Dietz, K.-J., M. Baier, and U. Krämer. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *In* Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. M. Prasad and J. Hagemeyer, editors. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Dittmer, H. 1937. Quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant (*Secale cereale*). *Amer. Jour. Bot.* 24:417-420.
- Dittmer, H. 1949. Root hair variations in plant species. *Amer. Jour. Bot.* 36:152-155.
- Dolan, L. 2001. How and where to build a root hair. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:550-554.
- Doncheva, S., Z. Stoyanova, and V. Velikova. 2001. The influence of succinate on zinc toxicity of pea plant. *J. Plant Nutr.* 24:789-806.
- Ekdahl, I. 1953. Studies on the growth and the osmotic conditions of root hairs. *Symb. Bot. Upsal.* 11.
- El-Ghamery, AA., El-Kholy, MA., and El-Yousser, A. 2003. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ to the germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mut. Res. Gen. Tox. Environ. Mutagen.* 537(1):29-41
- Emons, A. 1987. The cytoskeleton and secretory vesicles in root hairs of *Equisetum* and *Limnobium* and cytoplasmic streaming in root hairs of *Equisetum*. *Ann Bot.* 60:625-632.
- Emons, A. 1989. Helicoidal microfibril deposition in tip-growing cell and microtubule alignment during tip morphogenesis: a dry-cleaving and freeze-substitution study. *Canad. J. Bot.* 67:2401-2408.
- Emons, A., and B. Mulder. 1998. The making of the architecture of the plant cell wall: cells exploit geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7215-7219.

- Emons, A., and J. Traas. 1986. Coated pits and coated vesicles on the plasma membrane of plant cells. *Europ. J. Cell Biol.* 41:57-64.
- Ernst, W., N. Joosse, and N.V. Damme. 1983. Umweltbelastung durch Mineralstoffe, Biologische Effekte. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Espen, L., Pirovano, L. and Coccuci, SM. Effects of Ni²⁺ during the early phases of radish (*Raphanuns sativa*) seed germination. 1997. *Environ. Exp. Bot.* 38:87-197
- Eun, S.-O., H. Youn, and Y. Lee. 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 110:357-365.
- Evans, H., and G. Sorger. 1966. Role of mineral elements, with emphasis on univalent cations. *Ann Rev. Pl. Phys.* 17:47-76.
- Fahn, A. 1982. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- Feijó, J., T. Holdaway-Clarke, Cordeiro, J. Kunkel, and P. Hepler. 2001. Cellular oscillation and regulation of growth. *Bioessays.* 23:86-94.
- Findeklee, P., M. Wimmer, and H. Goldbach. 1997. Early effects of boron deficiency of physical cell wall parameters, hydraulic conductivity and plasmalemma-bound reductase activity in young *C. pepo* and *V. fabaroots*. In Boron in Soils and Plants. R. Bell and B. Rerkasem, editors. Kluwer Acad. Publisher, Dordrecht, NL. 221-227.
- Fischer, M. 1994. Exkursionsflora von Österreich: Bestimmungsbuch für alle in Österreich wildwachsenden sowie die wichtigsten kultivierten Gefäßpflanzen (Farnpflanzen und Samenpflanzen) mit Angaben über ihre Ökologie und Verbreitung. Ulmer Verlag, Stuttgart-Wien.
- Fiskesjö, G. 1988. The allium test- an alternative in environmental studies: the relative toxicity of meal ions. *Mutat. Res.* 197:243-260.
- Fitter, A., and R. Hay. 1987. Environmental Physiology of Plants. Acad. Press, London.
- Fleischer, A., M. O'Neill, and R. Ehwald. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.* 121:829-838.
- Fodor, F. 2002. Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. M. Prasad and K. Strzalka, editors. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.

- Fox, T., and M. Guerinot. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49:669-696.
- Foy, C., R. Chaney, and M. White. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *A Rev. Pl. Physiol.* 29:511-566.
- Franssen-Verheijen, M., A.V. Aelst, A. Emons, and J. Schel. 2003. Cellulose microfibrils in root hairs of *Arabidopsis*- a TEM study.
- Frey-Wyssling, A., and K. Mühlethaler. 1949. Über den Feinbau der Zellwand von Wurzelhaaren. *Mikroskopie.* 4:257-266.
- Galway, M. 2000. Ultrastructure and tip growth. In *Root Hairs: Cell and Molecular Biology*. R. Ridge and A. Emons, editors. Springer-Verlag, Tokyo. 1-15.
- Galway, M., J.H. Jr., and J. Schiefelbein. 1997. Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta.* 201:209-218.
- Gamborg, O., R. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Graves, C., and J. Sutcliffe. 1974. An effect of copper deficiency on the initiation and development of flower buds of *Chrysanthemum morifolium* grown in solution culture. *Ann Bot.* 38:729-738.
- Grierson, C., K. Roberts, K. Feldmann, and L. Dolan. 1997. The *COW1* locus of *Arabidopsis* acts after *RHD2*, and in parallel with *RHD3* and *TIP1*, to determine the shape, rate of elongation, and number of roots hairs produced from each site of hair formation. *Plant Physiol.* 115:981-990.
- Gunning, B., and A. Hardham. 1982. Microtubules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:651-698.
- Gwózdź, E., R. Rucinska, R. Przymusiński, R. Sobkowiak, and J. Deckert. 2004. Plant cells responses to heavy metals. *Acta Phys. Plant.* 26.
- Haberlandt, G. 1887. Über die Lage des Kernes in sich entwickelnden Pflanzenzellen. In *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. Vol. 5. 206-212.
- Harrison, M., C. Jones, and C. Dameron. 1999. Copper chaperons: function, structure and copper-binding properties. *J. Bio. Inorg. Chem.* 4:145-153.

- Hay, A., L. Watson, C. Zhang, and M. McManus. 1998. Identification of cell wall proteins in roots of phosphate-deprived white clover plants. *Plant Physiol. Biochem.* 36:305-311.
- Haynes, B. 1980. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in the ion accumulation by plants. *Bot. Rev.* 46:75-99.
- Hexum, T. 1974. Studies on the reaction catalysed by transport (Na, K) adenosine triphosphate. *Biochem. Pharmac.* 23:3441-3447.
- Hillman, W. 1961. Test-tube studies on flowering: Experiments with the Lemnaceae, or duck weeds. *Bull. Torrey Bot. Club.* 88:327-336.
- Hillman, W. 1964. *The Physiology of Flowering.* Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Hirasawa, T., H. Takahashi, H. Suge, and K. Ishihara. 1997. Water potential, turgor and cell wall properties in elongating tissues of the hydrotropically bending roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Environ.* 20:381-386.
- Hirsch, G., H. Ruska, and P. Sitte. 1973. *Grundlagen der Cytologie.* G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Hock, B. 1995. *Schadwirkungen auf Pflanzen.* Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg- Berlin-Oxford.
- Holdaway-Clarke, T., J. Feijó, G. Hackett, J. Kunkel, and P. Hepler. 1997. Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell.* 9:1999-2010.
- Holleman, A., and E. Wiberg. 1985. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie.* Walter de Gruyter, Berlin. 868 pp.
- Horak, O. 1993. Die Pflanze als Bindeglied des Schadstofftransfers in Nahrungsketten. *In* 6. Sem. f. Toxikologie. Österr. Ges. Tox., Velden am Wörthersee.
- Horak, O. 1996. *Hochschullehrgang Toxikologie, Teil Ökotoxikologie.* Agrarforsch. Biotech., Österr. Forschungsz. Seibersdorf GesmbH.
- Horak, O. 2001. Vorlesung: Schwermetalle, Spurenelemente, Ökophysiologische Bedeutung.
- Horak, O., and R. Rebler. 1982. Die Wasserlöslichkeit von Boden-Schwermetallen. *OEFS-Ber.* 4175.
- Horst, W. 1995. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 158:419-428.

- Iwanami, Y. 1956. Protoplasmatic movement in pollen grains and pollen tubes. *Phytomorph.* 6:288-295.
- Iwasaki, K., K. Sakurai, and E. Takahashi. 1990. Copper binding by the root cell walls of italian ryegrass and red clover. *Soil Sci. Plant Nutr. (Tokyo)*. 36:431-440.
- Jackson, W. 1960. Effect of indoleacetic acid on rate of elongation of root hairs of *Agrostis alba* L. *Physiol. Plant.* 13:36-45.
- Jiang, W., D. Liu, and H. Li. 2000. Effects of Cu^{2+} on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci. Tol. Environ.* 256:56-65.
- Jong, KS. 1984. Effect of copper and cadmium on natural populations of bacteria from surface microlayers. *Misaengmul Hakhoechi.* 22: 243-247.
- Jorgenson, C. 1966. Symmetry and biochemical bonding in copper-containing chromophores. *In The Biochemistry of Copper.* J. Peisach, P. Aisen, and W. Blumberg, editors. Acad. Press, New York.
- Kartusch, R. 2003. On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma.* 220:219-225.
- Katsumi, M., M. Izumo, and R. Ridge. 2000. Root hair hormonal control. *In Root Hair: Cell and Molecular Biology.* R. Ridge and A. Emons, editors. Springer-Verlag, Tokyo.
- Kennedy, C., and E. Gonsalves. 1987. The action of divalent Zn, cadmium, mercury, copper and lead on transroot potential and H^+ efflux of excised roots. *J. Exp. Bot.* 38:800-817.
- Ketelaar, T., and A. Emons. 2001. Tansley review no. 130, The cytoskeleton in plant cell growth: lessons from root hairs. *New Phytol.* 152:409-418.
- Ketelaar, T., C. Faivre-Moskalenko, N.d. Ruijter, J. Esseling, C. Grierson, M. Dogterom, and A. Emons. 2002. Position of the nuclei in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell.* 14:2941-2956.
- Klein, D., J. Hanzon, P. Irwin, N. Shalom, and S. Lurie. 1995. Pectin esterase activity and pectin methyl esterification in heated Golden Delicious apples. *Phytochem.* 39:491-494.
- Klobus, G., M. Burzynski, M. Janicka-Russak, K. Kabala, and M. Reda. 2004. Alternation of plasma membrane and tonoplast proton pumps in cucumber roots stressed with heavy metals. *Acta Phys. Plant.* 26:215.

- Kramer, P. 1949. Plant and Soil Water Relationships. McGraw-Hill Book Co, New York.
- Krzeslowska, M., M. Lenartowska, and A. Wozny. 2004. Lead disturbs tip growth by thickened wall formation in *Funaria hygrometrica* protonemata. *Acta Phys. Plant.* 26.
- Kutschera, L. 1960. Wurzelatlas mitteleuropäischer Ackerunkräuter und Kulturpflanzen. DLG-Verlag-GmbH, Frankfurt a. Main.
- Lasselsberger, A. 2002. Cytoskelett und cytomorphologische Reaktion der Innenepidermiszelle von *Allium cepa* L. nach Inkubation in Kupfersulfat In Fakultät für Naturwissenschaften und Mathematik der Universität Wien, Wien.
- Leavitt, R. 1904. Trichomes of the root in vascular cryptogams and angiosperms. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* 32:273-313.
- Lexmond, T., and P.v.d. Vorm. 1981. The effect of pH on copper toxicity to hydroponical grown maize. *Neth. J. Agric. Sci.* 29:217-238.
- Libbert, E. 1987. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. G. Fischer Verlag, Jena.
- Liu, D., Yang, S., and Shen, H. Effects of copper mine tailings on growth and development and physiological function of wheat. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 12(1):126-128
- Liu, D., and Wang, Y. 2002. Effects of Cu and As on germination and seedling growth of crops. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 13(2):179-182
- Lloyd, C., K. Pearce, D. Rawlins, R. Ridge, and P. Shaw. 1987. Endoplasmatic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of Legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil. Cytoskel.* 8:27-36.
- López-Franco, R., S. Bartnicki-Garcia, and C. Bracker. 1994. Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12228-12232.
- Ma, Z., D. Bielenberg, K. Brown, and J. Lynch. 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24:459-467.
- Marschner, H. 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Acad. Press, New York.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Acad. Press, London. 333-347 pp.
- Masucci, J., and J. Schiefelbein. 1994. The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethelene-associated process. *Plant Physiol.* 106:1335-1346.

- Matoh, T., M. Takasaki, K. Takabe, and M. Kobayashi. 1998. Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 39:483-491.
- McCann, M., M. Bush, D.M. D, and e. al. 2001. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochem.* 57:811-821.
- McCormack, B., A. Gregory, M. Kerry, C. Smith, and G. Bolwell. 1997. Purification of an elicitor-induced glucan synthase (Callose synthase) from suspension cultures of French bean. *Planta.* 203:196-203.
- Miller, D., N.D. Ruijter, T. Bisseling, and A. Emons. 1999. The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.* 17:141-154.
- Miller, D., N.d. Ruijter, and A. Emons. 1997. Review article. From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips. *J. Exp. Bot.* 48:1881-1896.
- Minnich, M., M. McBride, and R. Chaney. 1987. Copper activity in soil solution, II. Relation to copper accumulation in young snapbeans. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 51:573-578.
- Mohr, H. 1983. Wachstum und Schwermetallgehalt von Wurzeln in schwermetallkontaminierten Substraten. In *Wurzelökologie und ihre Nutzenwendung*, Internat. Symposium in Gumpenstein. W. Böhm, L. Kutschera, and E. Lichtenegger, editors, Bundesanstalt Gumpenstein, Irding, Österreich. 127-138.
- Mort, A., and P. Grover. 1988. Characterisation of root hair cell walls as potential barriers to the infection of plants by rhizobia. *Plant Physiol.* 86:638-641.
- Muller, SL. Huggett, DB., and Rodgers, JH. Jr. 2001. Effects of copper sulfate on *Typha latifolia* seed germination and early seedling growth in aqueous and sediment exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40(2):192-197
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:463- 497.
- Nimmo, DW., Preul. MA., Castle, CJ., Self, JR., Pillsbury, RW., and Bergey, EA. 2003. Effects of excess copper on growth of wild rice (*Zizania palustris*) seedlings tested in reconstituted and natural waters. *Environ. Manag.* 32(2)

- Northcote, D. 1963. The biology and chemistry of the cell wall of higher plants, algae and fungi. *Int. Rev. Cytol.* 14:223-265.
- Ohki, K. 1984. Zinc nutrition related to the critical deficiency and toxicity levels for *Sorghum*. *Agron. J.* 76:253-256.
- O'Neill, M., P. Albersheim, and A. Darvill. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 2. P. Dey, editor. Acad. Press, London. 415-441.
- O'Neill, M., S. Eberhard, P. Albersheim, and A. Darvill. 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*. 294:846-849.
- O'Neill, M., D. Warrenfeltz, K. Kates, P. Pellerin, T. Doco, A. Darvill, and P. Albersheim. 1996. Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is cross-linked by a borate ester- in vitro conditions for the formation and hydrolysis of dimer. *J. Biol. Chem.* 271:22923-22930.
- Orchard, T. 1977. Estimating the parameters of plant seedling emergence. *Seed Sci. Technol.* 5:61-69.
- Ouzounidou, G., M. Ciamporová, M. Moustakas, and S. Karataglis. 1995. Response of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress-I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environ. Exp. Bot.* 35:167-176.
- Ouzounidou, G., E. Eleftheriou, and S. Karataglis. 1992. Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Crucifera). *Canad. J. Bot.* 70:947-957.
- Pahlsson, A. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Pollut.* 47:287-319.
- Parton, R., S. Fischer-Parton, A. Trewavas, and M. Watahiki. 2003. Pollen tubes exhibit regular periodic membrane trafficking events in the absence of apical extension. *J. Cell Sci.* 116:2707-2719.
- Parvez, M., K. Wakabayashi, T. Hoson, and S. Kamisaka. 1996. Changes in cellular osmotic potential and mechanical properties of cell walls during light-induced inhibition of cell elongation in maize coleoptiles. *Physiol. Plant.* 96:179-185.

- Parvez, M., K. Wakabayashi, T. Hoson, and S. Kamisaka. 1997. White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. *Physiol. Plant.* 99:39-48.
- Patterson, W., and S. Olsen. 1983. Effects of heavy metals on radicle growth of selected woody species germinated on filter paper, mineral and organic soil substrates. *Can. J. For. Res.* 13.
- Peterson, R., and M. Farquhar. 1996. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *Bot. Rev.* 62:1-40.
- Peterson, R., and K. Stevens. 2000. Evidence for the uptake of non-essential ions and essential nutrient ions by root hairs and their effect on root hair development. *In* Root Hairs: Cell and Molecular Biology. R. Ridge and A. Emons, editors. Springer-Verlag, Tokyo. 179-196.
- Pimentel, J., and F. Marques. 1969. "Vineyard sprayer's lung": a new occupational disease. *Thorax.* 24:678-688.
- Pinton, R., I. Cakmak, and H. Marschner. 1993. Effect of zinc deficiency on proton fluxes in the plasma membrane-enriched vesicles isolated from bean roots. *J. Exp. Bot.* 44:623-630.
- Pitts, R., A. Cernac, and M. Estelle. 1998. Auxin and ethelene promote root hair elongation of *Arabidopsis*. *Plant J.* 16:553-560.
- Punz, W., and H. Sieghart. 1993. The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 33:85-98.
- Rathorne, V., P. Bajaj, and S. Wittwer. 1972. Subcellular localization of zinc and cadmium in bean *Phaseolus vulgaris* L. tissues. *Plant Physiol.* 49:207-211.
- Ray, P. 1979. Maize coleoptile cellular membranes bearing different types of glucan synthetase activity. *Methods Surv. Biochem.* 9:135-146.
- Rehm, G., and M. Schmitt. 1996. Copper for Crop Production. Univ. Minnesota Extens. Serv., Minnesota.
- Reichman, S. 2000. The response of plants to metal toxicity: a review focusing on copper, manganese and zinc. *In* Centre of Mined Land Rehab. University of Queensland, Queensland. 54.

- Reiss, H., and W. Herth. 1979. Calcium gradients in tip growing plant cells visualized by chlorotetracycline fluorescence. *Planta*. 146:615-621.
- Ridge, R. 1988. Freeze-substitution improves the ultrastructural preservation of legume root hairs. *Bot. Mag. (Tokyo)*. 103:87-96.
- Ridge, R. 1995. Recent developments in the cell and molecular biology of root hairs. *J. Plant Res.* 108:399-405.
- Ridge, R. 1996. Root hairs: cell biology and development. *In Plant Roots: The Hidden Half*. Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, editors. Marcel Dekker Inc., New York. 127-147.
- Ridley, B., M. O'Neill, and D. Mohnen. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57:929-967.
- Roberts, E., R. Seaguli, C. Haigler, and R. Brown. 1982. Alternation of cellulose microfibril formation in eukaryotic cells: Calcofluor White interferes with microfibril assembly and orientation in *Oocystis apiculata*. *Protoplasma*. 113:1-9.
- Roberts, K. 1994. The plant extracellular matrix: in a new expansive mood. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:688-694.
- Robinson, A., and D. Reute. 1981. Diagnosis of copper deficiency and toxicity. *In Copper in Soils and Plants*. Vol. Academic Press. L. Robson and R. Graham, editors. Acad. Press, Sydney. 287-312.
- Ruijter, N.d., M. Rook, T. Bisseling, and A. Emons. 1998. Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* 13:341-350.
- Ryan, E., M. Steer, and L. Dolan. 2001. Cell biology and genetics of root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*. 215:140-149.
- Sampson, K., R. Lew, and B. Heath. 2003. Time series analysis demonstrates the absence of pulsatile hyphal growth. *Microbio.* 149:3111-3119.
- Sanders, J., T. Adams, and B. Christensen. 1986. Extractability and bioavailability of zinc, cadmium and copper in three Danish soils sampled five years after application of sewage sludge. *J. Sci. Food. Agric.* 37:1155-1164.
- Sato, S., Y. Ogasawara, and S. Sakurag. 1995. The relationship between growth, nucleus migration and cytoskeleton in root hairs of radish. *In Structure and Function of Roots*.

- F. Baluska, M. Ciamorová, O. Gasparíková, and P. Barlow, editors. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht. 69-74.
- Sattelmacher, B. 2001. Tansley review no. 22: The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* 149:167-192.
- Sauerbeck, D. 1982. Welche Schwermetallgehalte in Pflanzen dürfen nicht übertreten werden, um Wachstumsbeeinträchtigungen zu vermeiden? *Landw. Forsch. Sonderh.* 39:108-129.
- Schmidt, W., J. Tittel, and A. Schikora. 2000. Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 122:1109-1118.
- Schmiedel, G., and E. Schnepf. 1980. Polarity and growth of caulonema tip cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *Planta.* 147:405-413.
- Schnepf, E. 1982. Morphogenesis in moss protonemata. In *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development*. C. Lloyd, editor. NY Acad. Press, London.
- Schwarz, F. 1883. Die Wurzelhaare der Pflanze. Ein Beitrag zur Biologie und Physiologie der Organ. In *Untersuchungen aus dem Botanischen Institut zu Tübingen*. Vol. 1. W. Pfeffer, editor. Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Sgherri, C., M. Quartacci, R. Izzo, and F. Navari-Izzo. 2002. Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiol. Biochem.* 40:591-597.
- Sherrier, D., and K. VandenBosch. 1994. Secretion of cell wall polysaccharides in *Vicia* root hairs. *Plant J.* 5:185.
- Shkolnik, M. 1984. Trace Elements in Plants. Elsevier, Amsterdam.
- Shorrocks, V., and B. Alloway. 1985. Copper in crop nutrition. In *Copper in Plant, Animal and Human Nutrition*. Herts, editor. Copper Development Association Publication TN35, UK.
- Sievers, A. 1963a. Beteiligung des Golgi-Apparatus bei der Bildung der Zellwand von Wurzelhaaren. *Protoplasma.* 56:188-192.
- Sievers, A. 1963b. Über die Feinstruktur des Plasmas wachsender Wurzelhaare. *Z. Naturf.* 18b:830-836.
- Sitte, P. 1965. Bau und Feinbau der Pflanzenzelle. G. Fischer Verlag, Jena.

- Song, Y., Zhou, Q., Ren, L., and Gong, P. 2002. Eco-toxicology of heavy metals on the inhibition of seed germination and root elongation of wheat in soils. *Yong Sheng Tai Xue Bao*. 13(4):459-462
- Stoyanova, Z., and S. Doncheva. 2002. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Braz. Jour. Plant Physiol.* 14.
- Stroinski, A. 1999. Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect, I. Antioxidative systems. *Acta Physiol. Plant.* 21:175-188.
- Stroinski, A., and J. Floryszak-Wieczorck. 1993. Effects of cadmium on the host pathogen system IV. Influence of cadmium and *Phytophthora infestans* on membrane permeability of potato tuber. *J. Plant Physiol.* 142:575-578.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 1991. *Physiologie der Pflanze*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2000. *Physiologie der Pflanze*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Tan, W., and G. Hogan. 1995. Effects of nitrogen limitation on water relations of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Plant Cell Environ.* 18:757-764.
- Thornton, B., and A. Macklon. 1989. Copper uptake by ryegrass seedlings: contribution of cell wall adsorption. *J. Exp. Bot.* 40:1105-1111.
- Toole, E., S. Hendricks, H. Borthwick, and V. Toole. 1956. Physiology of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7:299-324.
- Vázquez, M., J. Barceló, C. Poschenrieder, J. Mádico, P. Hatton, A. Baker, and G. Cope. 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *J. Plant Physiol.* 140:350-355.
- Vincken, J., H. Schols, R. Oomen, M. McCann, P. Ulvskov, A. Voragen, and R. Visser. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132:1781-1789.
- Volkman, D. 1984. The plasma membrane of growing root hairs is composed of zones of local differentiation. *Planta.* 162:392-403.
- Volkman, D., and P. Peters. 1995. Structural basis of root hair formation: Early development of trichoblasts and atrichoblasts. *In* Structure and Function of Roots. F. Baluska, M.

- Ciamorová, O. Gasparíková, and P. Barlow, editors. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht. 61-67.
- Vos, C.D., H. Schat, M.D. Waal, R. Voorja, and W. Ernst. 1991. Increased resistance to copper-induced damage of root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol. Plant.* 82:523-528.
- Wainwright, S., and H. Wolhouse. 1977. Some physiological aspects of copper and zinc tolerance in *Agrostis tenuis* Sibth: Cell elongation and membrane damage. *J. Exp. Bot.* 28:1029-1036.
- Wakabayashi, K., T. Hoson, and S. Kamisaka. 1997. Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 113:967-973.
- Weaver, J. 1925. Investigations on the root habits of plants. *Amer. Jour. Bot.* 12:502-509.
- Weaver, J. 1926. Root Development of Field Crops. McGrawhill Book Co, New York.
- Willats, G., L. McCartney, W. Mackie, and J. Knox. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47:9-27.
- Williams, M., G. Freshour, A. Darvill, P. Albersheim, and M. Hahn. 1996. An antibody Fab selected from a recombinant phage display library detects deesterified pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II in plant cells. *Plant Cell.* 8:673-685.
- Wolfe, J., and P. Steponkus. 1981. The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated protoplasts. *Biochim. Biophysica Acta.* 643:663-668.
- Woolhouse, H. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 12c. O. Lange, P. Nobel, C. Osmond, and H. Ziegler, editors. Springer-Verlag, Berlin. 243-300.
- Wozny, A., and E. Jerczynska. 1991. The effect of lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. *in vitro* conditions. *Biol. Plant.* 33:32-39.
- Wymer, C., and C. Lloyd. 1996. Dynamic microtubules: implications for cell wall patterns. *Trends Plant Sci.* 1:222-228.
- Yamauchi, M. 1989. Rice bronzing in Nigeria caused by nutrient imbalances and its control by potassium sulfate application. *Plant Soil.* 117:275-767.
- Zenk, M. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants: a review. *Gene.* 179:21-30.

Zonia, L., and J. Feijó. 2003. State and spectral properties of chloride oscillations in pollen.
Biophysiol. J. 84:1387-1398.

11 ANHANG

Substanz In mg/L	MS mit Vitaminen (Media including Organics)	MS ohne Vitaminen (Basal Salts Mixtures)	½ MS mit Vitaminen	½ MS ohne Vitamine
NH ₄ NO ₃	1650	1650	820	820
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	3,1	3,1
CaCl ₂	332,2	332,2	166,1	166,1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,0125	0,0125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,0125	0,0125
Na ₂ EDTA	37,26	37,26	18,63	18,63
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	13,9	13,9
MgSO ₄	180,7	180,7	90,35	90,35
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	16,9	8,45	8,45
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,125	0,125
KJ	0,83	0,83	0,415	0,415
KNO ₃	1900	1900	950	950
KH ₂ PO ₄	170	170	85	85
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	4,3	4,3
glicine	2		1	
Myo-Inositol	100		50	
Nicotinsäure	0,5		0,25	
Pyridoxin·HCl	0,5		0,25	
Thiamine·HCl	0,1		0,05	

Tabelle 14: *Arabidopsis thaliana*: adaptierte MS-Medien (nach Gamborg (1968); Murashige und Skoog (1962))

12 LEBENS LAUF

Zur Person

Vor- und Zuname	Julia Maria Strobl
Geburtsdatum und -ort	8. Oktober 1981, Wien
Adresse	Beatrixgasse 25/5 1030 Wien Tel: 0676/534 1958 jstrobl@gmx.at
Staatsangehörigkeit	Österreich

Schulbildung

Volksschule: 1030 Wien, Strohgasse 15	1987-1991
Bundesgymnasium, humanistischer Zweig, 1030 Wien, Kundmanngasse 20	1991-1999
Matura mit gutem Erfolg	7.Juni1999

Hochschulbildung

Immatrikulation an der Universität Wien	10/1999
Hauptfach Ökologie, Wahlfach Mikrobiologie	
Auslandssemester an der Universität „Claude Bernard“, Lyon - Frankreich	9/2002 – 1/2003
Diplomarbeit am Institut für Ökologie und Naturschutz, Abteilung für Zellphysiologie und Wissenschaftlichen Film	seit 5/2003

Praktika, Projekte, Kongresse

Projektpraktikum „Ökologie der Siedlungsräume“	10/2001-6/2002
Freilandpraktikum „Amphibien in den Rückhaltebecken des Wienflusses“	SS 2002
Teilnahme am 7th International Botanical Microscopy Meeting, Portugal – Lissabon	4/2003
Teilnahme am 5th International Congress of Carnivorous Plants- Lyon	6/2004
Teilnahme am 15th Federation of European Societies of Plant Biology Congress - Krakau	8/2004

Bisherige Berufspraxis

Zivilingenieurkanzlei Strobl, 1030 Wien, geringfügig beschäftigt als Kanzleihilfe	10/1996 – 9/2000
TGI Ziviltechniker AG, 1030 Wien, geringfügig beschäftigt als Schreibkraft	1/2001 – 4/2003
Baxter AG, 1220 Wien, Ferialpraktikant und Aushilfskraft in der Personalabteilung mehrfach zwischen 7/2001 und 8/2003	
Bundesdenkmalamt, als freier Mitarbeiter	9/2000
Universität Wien, Institut für Ökologie und Naturschutz	
Tutor, Licht- und Videomikroskopie in der Praxis	3/2003 – 6/2003
Tutor, Zellphysiologische Übungen	10/2003 – 1/2004
Tutor, Photo, Film, Video	3/2004 – 6/2004

Ehrenämter und Vereinsmitgliedschaften

Royal Microscopical Society (seit 3/2003)	
Pfadfinder:	
Leitungsfunktionen (seit 9/2000), Instruktor (seit 12/2003)	
Chormitgliedschaften:	
Konservatorium Wien (1991-1997), Wiener Jeunessechor (1997-2002), Augustinerchor (seit 2003)	