

**Untersuchungen zur Funktion der Exodermis von Gerstenwurzeln
(*Hordeum vulgare* L. cv. Alexis) im Hinblick auf den radialen
Transport anorganischer Ionen im Apoplasten**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Markus Gierth

geboren am 26.11.1968 in Hannover

2000

Referent: Prof. Dr. H. Lehmann
Korreferent: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der Promotion: 26.05.2000

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Wurzelgewebe mit inkrustierten Zellwänden	2
1.2	Der Apoplast als Untersuchungsobjekt.....	5
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Kulturbedingungen und Pflanzenmaterial	9
2.1.1	Pflanzenanzucht.....	9
2.1.2	Bestimmung von Trockengewichten und Wurzellängen	10
2.1.3	Bestimmung der Osmolarität von Wurzelpreßsäften	10
2.2	Histochemische Untersuchungen.....	12
2.2.1	Berberinsulfat/Anilinblau Färbung	12
2.2.2	Phloroglucin/HCl Färbung	12
2.2.3	Sudan III Färbung	12
2.3	Untersuchungen zur Zugänglichkeit des Apoplasten von Gerstenwurzeln	13
2.3.1	Evans Blue als Apoplastenmarker.....	14
2.3.2	Auswaschversuche	14
2.3.3	Lokalisation der Elemente Kalium, Rubidium und Chlor in Zellwänden	15
2.3.3.1	Probenpräparation	16
2.3.3.1.1	Gefrierimmobilisation	16
2.3.3.1.2	Gefriersubstitution.....	18
2.3.3.1.3	Gefrierschneiden	19
2.3.3.2	Analytische Techniken	22
2.3.3.2.1	Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse (EDXA).....	22
2.3.3.2.2	Sekundärionen Massen Spektroskopie (SIMS).....	24
2.3.3.2.3	Atom Absorptions-Spektrometrie (AAS).....	26
2.3.3.2.4	Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (EELS) und Electron-Spectroscopic-Imaging (ESI)	27
2.4	Statistik	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Pflanzenwachstum	30
3.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Histochemie von Gerstenwurzeln	31
3.2.1	Caspary-Steifen in Endo- und Exodermis.....	31
3.2.2	Nachweis von Suberin und Lignin in Endo- und Exodermis.....	34
3.3	Die Zugänglichkeit des Apoplasten für Evans Blue	37
3.4	Bestimmung der Halbwertszeiten für das Auswaschen von Rb ⁺ nach zweiminütiger Inkubation.....	40
3.5	Die Zugänglichkeit des Apoplasten für anorganische Ionen	42

3.5.1	Erscheinungsbild der Kryoschnitte im REM.....	42
3.5.2	Direkte Messungen von Ionen in Zellwänden	48
3.5.2.1	Vergleich von EDX-Analysen von im Block gefrorenen Proben und Kryoschnitten	48
3.5.2.2	EDXA an gefrorenen Wurzelsegmenten mit und ohne Exodermis.....	50
3.5.2.3	Lokalisation von Rb ⁺ in Gefrierschnitten von inkubierten Wurzeln mit der EDX- Analyse.....	51
3.5.2.4	Langsamer Anstieg der Salzkonzentration im Nährmedium.....	54
3.5.2.5	Plötzlicher Anstieg der Salzkonzentration im Nährmedium	56
3.5.2.6	Berechnung der Permeabilität von Exodermiszellwänden.....	59
3.5.2.7	Tracerlokalisierung mit SIMS in Gefrierschnitten.....	61
3.5.2.8	ESI/EELS und EDXA an Schnitten von gefriersubstituierten Wurzeln.....	68
4	Diskussion.....	72
4.1	Pflanzenwachstum	72
4.2	Kryoschnitte	72
4.3	Das Auflösungsvermögen von EDX-Analysen an Kryoschnitten	74
4.4	Die Anwendung von EELS/ESI an gefriersubstituierten Wurzeln	77
4.5	Die Caspary-Streifen in der Exodermis	79
4.6	Die Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde für Evans Blue	81
4.7	Die Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde für K ⁺ (Rb ⁺).....	83
4.7.1	Die Exodermis und Rhizodermis als Diffusionsbarriere	83
4.7.2	Die Permeabilität der Exodermiswände für Rb ⁺	89
4.7.3	Funktion und Auswirkungen einer Diffusionsbarriere in den äußeren Abschlußgeweben der Gerstenwurzel.....	92
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literatur	98
7	Anhang.....	107

Verzeichnis der Abkürzungen

AAS	Atom Absorptions Spektrometrie
AFS	Apparent Free Space
atw	äußere Tangentialwand
bulk frozen	im Block gefroren
CS	Caspary-Streifen
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DFS	Donnan Free Space
ed	Endodermis
EDXA	Energy Dispersive X-Ray Analysis
Ex	Exodermis
GUS	β -Glucuronidase
h.Wsp.	hinter der Wurzelspitze
Hd	Hypodermis
HPF	High Pressure Freezing
itw	innere Tangentialwand
L	Liter
min	Minute
Mu	Mucilage
MW	Mittelwert
Mx/LMx	Metaxylem/spätes Metaxylem
NIH	National Institute of Health
Pz	Perizykel
R	Rinde
R 1	erste auf die Hypodermis folgende Rindenzelle
REM	Raster-Elektronenmikroskop
Rhd	Rhizodermis
s	Sekunde
S/W	Sproß zu Wurzel Verhältnis
SE	Sekundärelektron(en)
SIMS	Sekundärionen Massenspektroskopie
STEM	Scanning Transmission Electron Microscope
ted	tertiäre Endodermis
WFS	Water Free Space
ZZ	Zentralzylinder

Zusammenfassung

Viele Pflanzenarten lagern in den Zellwänden der Exodermis Inkrusten ein, die den Caspary-Streifen der Endodermis ähnlich sind, was zu der Vermutung geführt hat, daß die Exodermis eine ähnliche Funktion wie die Endodermis hat, nämlich den radialen Transport von anorganischen Ionen im Apoplasten von Wurzeln einzuschränken. Für die untersuchten Gerstenpflanzen konnte gezeigt werden, daß Caspary-Streifen in der Exodermis von Nodalwurzeln regelmäßig vorhanden waren, während in den Keimlingswurzeln eine Exodermis mit Caspary-Streifen nicht bzw. nur unvollständig ausgebildet wurde.

Wurde Evans Blue intakten Nodalwurzeln als Marker für den apoplastischen Transport angeboten, so war der Farbstoff in Abschnitten mit ausdifferenzierter Exodermis fluoreszenzmikroskopisch nur in den Zellwänden der Rhizodermis und den äußeren Tangentialwänden der Exodermis nachzuweisen. In den Wurzelspitzen wurde der Farbstoff hauptsächlich in der äußeren Schleimschicht (Mucilage) und den Zellwänden der Rhizodermis nachgewiesen. Wurden die Rhizodermiszellen durch Plasmolyse geschädigt, drang der Farbstoff tiefer in die Wurzelrinde ein.

Da organische Farbstoffmoleküle nicht unmittelbar mit anorganischen Ionen wie K^+ vergleichbar sind, wurden direkte Messungen zur Lokalisation und Quantifizierung von Elementen in den Zellwänden mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgen Mikroanalyse (EDXA) im Raster-Elektronenmikroskop und der Sekundärionen Massenspektroskopie (SIMS) durchgeführt. Um die *in vivo* Verteilung der löslichen Ionen zu erhalten und eine ausreichende Auflösung der Meßtechniken zu erzielen, mußten die Messungen an dünnen Gefrierschnitten von schockgefrorenen Gerstenwurzeln durchgeführt werden.

Wurde intakten Wurzeln vor dem Einfrieren Rb^+ als Tracer für K^+ angeboten, so war das angebotene Rb^+ mit der EDXA in basalen Wurzelabschnitten bis in die äußeren Zellwände der Exodermis nachweisbar, nicht jedoch in den Zellwänden der Rinde. Dasselbe Ergebnis zeigten die Untersuchungen mit der SIMS: auf Rb^+ -Verteilungsbildern endet die Markierung des Apoplasten mit Rb^+ abrupt in den Radialwänden der Exodermis. In Schnitten von der Wurzelspitze konnte angebotenes Rb^+ nur in den äußeren Tangentialwänden der Rhizodermis und in der Mucilage nachgewiesen werden. Lediglich nach mechanischer Verletzung der Exodermis oder nachdem die Wurzeln osmotisch geschockt wurden, war Rb^+ auch in den Zellwänden der Rinde nachweisbar. Anhand der Permeabilitäten einzelner Zellwandabschnitte, die aus den Konzentrationen des angebotenen Tracers in den Zellwänden berechnet wurden, konnten die Radialwände der Exodermis, als die Zellwandabschnitte mit der niedrigsten Permeabilität, ermittelt werden.

Alle Ergebnisse belegen, daß die turgeszenten Zellen der Rhizodermis in der Wurzelspitze und der Exodermis in basalen Wurzelabschnitten den passiven Einstrom sowohl von Ionen als auch von anderen gelösten Substanzen in den Wurzelapoplasten stark einschränken. Die Ergebnisse zeigen andererseits auch, daß die Exodermis bzw. Rhizodermis im Bereich von abgestorbenen oder geschädigten Zellen überwunden werden kann. An diesen Stellen wird der apoplastische Ionentransport hauptsächlich durch die Endodermis kontrolliert. Die Rolle von Rhizodermis und Exodermis wird einerseits als Ergänzung zur Funktion der Endodermis interpretiert, nämlich die freie Bewegung von Ionen im Apoplasten von Wurzeln zu kontrollieren. Andererseits ermöglicht die Barrierefunktion von Rhizo- und Exodermis gleichzeitig die Aufrechterhaltung und Regulation eines von der Außenlösung verschiedenen Wasser- und Ionengleichgewichts innerhalb des Apoplasten der Wurzelrinde.

Schlagworte: Analytische Elektronenmikroskopie, Apoplast, Ionentransport

Abstract

Many plant species develop Casparian Band like structures in the exodermis, leading to the assumption of similar functions for both the endo- and exodermis in limiting radial apoplastic transport of inorganic ions in roots. The investigations on barley plants showed that an exodermis with Casparian bands could be regularly detected in nodal roots while Casparian Bands in the exodermis were absent or incompletely developed in seminal roots.

After treating intact nodal roots with Evans Blue as a tracer for the apoplastic transport, the dye was exceptionally found in the cell walls of the rhizodermis and outer tangential walls of the exodermis in root zones with a mature exodermis. In the root apex the dye was mainly detected within the surfacely adhering mucilage layer as well as in the cell walls of the rhizodermis. When the rhizodermis cells were damaged by plasmolysis, the dye penetrated into the root cortex.

Since organic dye molecules are not fully comparable to inorganic ions as K^+ , direct measurements were carried out to localize and quantify elements in the cell walls by means of energy dispersive X-ray microanalysis (EDXA) in a scanning electron microscope and Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) respectively. The measurements had to be performed on thin cryo-sections of quench-frozen barley roots to get a feasible spatial resolution of the analytical techniques and for maintaining the distribution of soluble ions in site.

When intact roots were treated with Rb^+ as a tracer for K^+ prior to freezing, the tracer was detectable up to the outer cell walls of the exodermis but not in the cortex of basal root zones. The same result was obtained from SIMS measurements: the labelling of the apoplast ends abruptly in the radial cell walls of the exodermis on images of the Rb^+ distribution. In sections from the root apex the Rb^+ tracer was only detected in the mucilage and the outer tangential walls of the rhizodermis. Merely after mechanical disruption of the exodermis or after the roots have been shocked osmotically, Rb^+ could also be detected in the root cortex. From the concentrations of the tracer in the cell walls, the permeability of particular parts of the cell walls was calculated. By this procedure the radial walls of the exodermis were found to have the lowest permeability.

All results show that the peripher root tissues to a large extent limit the passive influx of ions and other solutes into the root apoplast. While the cell walls of the turgescient rhizodermis cells form the outer apoplastic barrier in the root apex, this function is replaced by the exodermis in basal root zones. On the other hand it is also demonstrated, that the exodermis and rhizodermis can be overcome where cells have been damaged or died off. In these places the apoplastic transport of ions is mainly regulated by the endodermis. One general conclusion is that the resistances of the rhizodermis and exodermis are additive to the endodermis in their role of regulating apoplastic ion movement across roots. On the other hand a barrier for apoplastic transport in the rhizo- and exodermis will help to maintain and regulate an ion and water homeostasis in the root apoplast differing from the external solution.

Keywords: analytical electron microscopy, apoplast, ion transport

1 Einleitung

Alle pflanzlichen Zellen sind von einer Zellwand umgeben, die ihnen Stabilität verleiht und sie vom umgebenden Medium abgrenzt. Der Aufbau und die Zusammensetzung der Zellwände kann dabei sehr verschieden sein. So bestehen die Zellwände vieler mariner Algen überwiegend aus stark quellbaren Matrixsubstanzen mit einem geringen Anteil an Gerüstsubstanzen. Eine mechanische Stabilisierung der Zellen durch die Zellwand hat für diese Organismen nur eine untergeordnete Bedeutung. Mit dem Übergang zum Landleben nimmt die Bedeutung einer stabilisierenden Funktion durch die Zellwand zu und dementsprechend auch der Anteil an Gerüstsubstanz in den Zellwänden der Höheren Pflanzen. Die vorherrschende Gerüstsubstanz in den Zellwänden aller Höheren Pflanzen und der meisten Niederen Pflanzen ist die Cellulose. Dabei handelt es sich um ein lineares Molekül aus β -D-Glucose Monomeren, von denen sich in den Zellwänden mehrere Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen zu Elementarfibrillen zusammenlagern. Die Cellulosefibrillen sind in eine gelartige Matrix eingebettet, die überwiegend aus Pektinen (Polygalacturonsäure, Rhamnogalacturonane), Hemicellulosen (Xyloglucanen) und Glykoproteinen besteht (Frey-Wyssling und Mühletaler, 1965). Die Zellwände innerhalb einer Pflanze bilden zusammen mit den Interzellularen ein Kontinuum, das als Apoplast dem Symplasten gegenübergestellt wird (Münch, 1930). Als Symplast wird entsprechend die Gesamtheit aller, durch Plasmodesmen verbundenen, lebenden Zellen einer Pflanze verstanden.

Für elektrisch geladene Teilchen kann der Apoplast der Pflanze in den Donnan-Free-Space (DFS) und den Water-Free-Space (WFS) unterteilt werden. Der Donnan-Free-Space resultiert aus der Eigenschaft der Pektine und Hemicellulosen, positiv geladene Teilchen wie Kationen reversibel, d.h. austauschbar an negativen Festladungen (Carboxyl- und Hydroxylgruppen) zu binden. Dadurch steht Kationen in der Zellwand ein scheinbar größerer Diffusionsraum (Apparent-Free-Space) zur Verfügung als ungeladenen Teilchen oder Wasser. Der für Wasser und Ionen gleichermaßen zugängliche Diffusionsraum in der Zellwand wird als Water-Free-Space bezeichnet. Donnan-Free-Space und Water-Free-Space bilden zusammen den Apparent-Free-Space.

Die Aufnahme von gelösten Nährstoffen wie K^+ erfolgt über die Wurzeln. Dabei stehen die Zellen der Abschlußgewebe in direktem Kontakt mit der Außenlösung. Dementsprechend können diese Zellen Nährstoffe auch direkt aus dieser Lösung aufnehmen. Für alle anderen Zellen, zum Beispiel in der Wurzelrinde, müssen aber die Nährstoffe zunächst zu den Zellen transportiert werden. Nach dem von Steudle (1989) vorgeschlagenen 'Composite model' stehen für den Transport von Wasser und Ionen in der Pflanze potentiell drei verschiedene Wege zur Verfügung. Der **apoplastische** Transport bezieht sich auf diffusive Stoffbewegungen außerhalb des Plasmalemmas, worunter der Transport in den Zellwänden und

Interzellularen verstanden wird. Außerdem gibt es den **symplastischen** Transport, der intrazellulär durch das Cytoplasma und dann von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmen erfolgt; dabei müssen die Ionen zunächst unter physiologischer Kontrolle über die Plasmamembran, von zumindest einer Zelle transportiert werden. Insbesondere Wasser kann zusätzlich auf **transzellulärem** Weg transportiert werden. Dabei muß es die Plasmamembran pro Zelle zweimal überqueren, während der Transport zur benachbarten Zelle über den Apoplasten erfolgt. Der transzelluläre Weg spielt für den Transport von gelösten Ionen in der Regel nur eine untergeordnete Rolle (Steudle und Peterson, 1998).

1.1 Wurzelgewebe mit inkrustierten Zellwänden

Der apoplastische Transport von Ionen kann in Wurzeln durch die Inkrustierungen der Zellwände mit hydrophoben Substanzen wie Suberin und Lignin unterbrochen bzw. stark eingeschränkt werden (Läuchli, 1976; Clarkson, 1988). Bei Suberin handelt es sich um ein Polymer, das zu unterschiedlichen Anteilen aus aliphatischen (hoher Anteil von ω -Hydroxy-Carbonsäuren) und aromatischen (phenolischen) Fettsäuren besteht (Kollattukudy, 1980). Lignin ist ebenfalls ein hochmolekulares Polymer, das im wesentlichen aus den drei Monomeren p-Hydroxy-Cumaryl-, p-Hydroxy-Coniferyl- und p-Hydroxy-Sinapylalkohol besteht (Mohr und Schopfer, 1992). Sowohl Lignin als auch Suberin können gleichzeitig in derselben Zellwand vorkommen. Sie werden mit geeigneten Reagenzien histochemisch nachgewiesen. Das in dieser Hinsicht bekannteste Gewebe ist die innerste Zelllage der Wurzelrinde, die Endodermis. Die radialen Zellwände der Endodermis zeichnen sich durch die Präsenz von besonderen Strukturen aus, die nach ihrem Entdecker Caspary-Streifen benannt wurden (Caspary 1858, 1866 zitiert in Schreiber et al., 1999). Dabei handelt es sich um suberinisierte und lignifizierte Bereiche der Zellwände, die sich durch eine enge Assoziation von Plasmalemma und Zellwand auszeichnen (Bonnet, 1968; Gunning und Steer, 1975). Die Verbindung zwischen Plasmalemma und Zellwand ist so stabil, daß sie selbst im plasmolysierten Zustand der Zelle bandartig an allen Radialwänden erhalten bleibt, weshalb dieser Fall als Bandplasmolyse bezeichnet wird (Behrisch, 1926; Mager, 1933). Die Endodermis kann in drei verschiedenen Differenzierungszuständen vorliegen (Kroemer, 1903). Die **primäre** Endodermis ist allein durch das Vorkommen von Caspary-Streifen in den Radialwänden gekennzeichnet, d.h. die tangentialen Zellwände haben die gleichen Merkmale wie die übrigen Rindenzellen. Im **sekundären** Zustand wird in alle Wände der Endodermis zusätzlich eine Suberinlamelle eingelagert. Dabei wird die neue Suberinlamelle in unmittelbarem Anschluß an die Caspary-Streifen gebildet und im Bereich des Caspary-Streifens wird ein neues, sekundäres Plasmalemma angelegt (Robards et al., 1973; Stelzer und Läuchli, 1977). Das ursprünglich mit dem Caspary-Streifen verbundene Stück der Plasmamembran wird gleichzeitig mit der Anlagerung des suberinisierten Zellwandmaterials aufgelöst. Die

einzelnen Endodermiszellen sind anschließend vollständig von einer Suberinlamelle umgeben und dadurch vom direkten Kontakt mit dem Apoplast isoliert. Im **tertiären** Zustand schließlich können die inneren aber auch die äußeren Tangentialwände und die Radialwände durch weitere Auflagerungen von Zellwandmaterial partiell verdickt werden, woraus das typische Aussehen (U-Form) tertiärer Endodermiszellen resultiert. Einzelne Zellen in der sekundären und tertiären Endodermis verbleiben als sogenannte Durchlaßzellen sehr lange im primären Zustand. Meistens befinden sich die Durchlaßzellen über den Protoxylem-elementen des Leitbündels, was zu der Schlußfolgerung geführt hat, daß sie maßgeblich am Stofftransport in das Leitgewebe des Zentralzylinders beteiligt sind (Schwendener, 1882; Haberlandt, 1918). Aufgrund der speziellen Modifikationen ihrer Zellwände wurde die primäre Endodermis früh als hauptsächliches Hindernis für den apoplastischen Transport von Wasser und Ionen angesehen (Schwendener, 1882; van Fleet, 1961). Elektronendichte Substanzen wie z.B. Silber-,Uranyl- und Lanthanionen können in der Elektronenmikroskopie zur Markierung von Kompartimenten oder zur Lokalisation von Elementen anhand ihrer Fällungsprodukte verwendet werden (Läuchli, 1975, Stelzer et al., 1975, Stelzer und Läuchli, 1978). Robards und Robb (1974) konnten mit Hilfe von La^{3+} als Apoplastenmarker im elektronenmikroskopischen Bild zeigen, daß angebotenes La^{3+} in Keimlingswurzeln der Gerste nur bis zum Caspary-Streifen der Endodermis vordringt. Auch an den weiter fortgeschrittenen Differenzierungsstadien der Endodermis (sekundärer und tertiärer Zustand) konnten diese Befunde bestätigt werden (Robards und Robb, 1974; Läuchli, 1976). Es ist heute allgemein anerkannt, daß die Endodermis den apoplastischen Transport von Ionen unterbindet (Läuchli, 1976; Clarkson, 1996). Bisherige Modelle für die Ionenaufnahme durch die Wurzel gehen deshalb davon aus, daß der Apoplast der Wurzelrinde für Ionen bis zur Endodermis frei zugänglich ist. Die Zusammensetzung der apoplastischen Flüssigkeit in der Wurzelrinde entspräche demnach derjenigen der Bodenlösung. Für die aktive, physiologisch kontrollierte Ionenaufnahme aus der umgebenden Lösung stünde dementsprechend die Gesamtheit aller Plasmamembranen der Wurzelrinde zur Verfügung. Spätestens an der Endodermis müßten Ionen und andere gelöste Substanzen von den Zellen aufgenommen und im Symplasten zu den Leitgeweben des Zentralzylinders transportiert werden.

In der Wurzelrinde vieler Pflanzenarten wird in den Zellwänden der Hypodermis, also der Zellschicht unterhalb der Rhizodermis, während der Differenzierung wie in der Endodermis eine Suberinlamelle eingelagert. Eine Hypodermis, in deren Zellwänden eine Suberinlamelle zu finden ist, wird als Exodermis bezeichnet und ist regelmäßig bei allen Monokotylen zu finden (Guttenberg, 1940, 1943). In den zusammenfassenden Darstellungen über die Exodermis unterscheidet Guttenberg (1940, 1943) zwischen Kurzzellexodermen und einheitlichen Exodermen. Die Kurzzellexodermen bestehen aus einem Mosaik von einerseits

suberinisierten und axial gestreckten Zellen und andererseits aus isodiametrischen Zellen, bei denen erst zu einem viel späteren Zeitpunkt der Differenzierung eine Suberinlamelle eingelagert wird. Die Kurzzellen fungieren nach Guttenberg (1940, 1943) als Durchlaßzellen und ermöglichen deshalb noch einen regen Stofftransport über die Exodermis. Die einheitlichen Exodermen bestehen aus gleichartigen, axial gestreckten Zellen. Die Suberinisierung der einzelnen Zellen (bzw. der Zellwände) erfolgt nicht einheitlich in einem bestimmten Abstand hinter der Wurzelspitze, sondern ist über eine für verschiedene Arten unterschiedlich lange Übergangszone verteilt. Die einheitliche Exodermis ist typisch für die meisten Monokotylen. Ausnahmen zu dieser Regel stellen z.B. Monokotyle dar, die ein *Velamen radicum* ausbilden (z.B. viele Orchideen, Araceen), da bei Ihnen eine Kurzzellexodermis zu finden ist. Guttenberg (1943) weist ausdrücklich darauf hin, daß ein Caspary-Streifen in der Exodermis niemals zu beobachten sei.

Im Gegensatz dazu fanden Peterson und Emanuel (1983) an Zwiebelwurzeln erstmals auch in der Exodermis Indizien für die Existenz eines Caspary-Streifens, in dem sie bei Experimenten mit hypertonschen Medien Bandplasmolyse beobachteten. Mit Hilfe fluoreszierender Substanzen, wie z.B. Berberinsulfat (Strugger, 1949), konnten in Kombination mit Anilinblau sowohl die Caspary-Streifen der Endo- als auch der Exodermis in Wurzelquerschnitten fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Brundrett et al., 1988). Eine Untersuchung an über 180 Pflanzenarten zeigte, daß bei den meisten der untersuchten Spezies (89%) die Wurzeln eine suberinisierte Exodermis mit Caspary-Streifen hatten (Perumalla et al., 1990). Peterson (1989) schlug vor die Definition des Begriffs Exodermis nach Guttenberg (1940, 1943) zu erweitern. Danach wird eine Hypodermis, die eine Suberinlamelle **und** einen Caspary-Streifen in den Zellwänden besitzt als Exodermis bezeichnet. Im Rahmen der Untersuchung von Perumalla et al. (1990) wurden auch Gerstenwurzeln auf die Präsenz einer Exodermis hin untersucht und schließlich den Spezies ohne Exodermis zugeordnet. Im Gegensatz dazu ergaben sich aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem Apoplastenmarker Evans Blue Hinweise auf das Vorhandensein einer Exodermis in Gerstenwurzeln (Mühlefeld, 1993), die mit der Berberinsulfat/Anilinblau Färbung bestätigt werden konnten (Gierth et al., 1999). Die analogen Inkrusten in den Zellwänden der Endo- und Exodermis haben die Vermutung nahe gelegt, daß die Caspary-Streifen der Exodermis wie die der Endodermis die freie Beweglichkeit von Ionen im Apoplasten einschränken. Dadurch wäre die Aufnahme von Ionen hauptsächlich auf die peripheren Wurzelgewebe, i.e.S. auf die Rhizodermis und ihre Wurzelhaare, beschränkt. Um diese Frage aufzuklären wurden bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Dabei kamen einige Autoren zu dem Schluß, daß die Ionenaufnahme durch die Wurzel überwiegend in den äußeren beiden Wurzelgeweben, nämlich an der Rhizodermis und den äußeren zentripetalen Wänden der Exodermis erfolgt (Vakhmistrov, 1967, Bange, 1973). Nach mikroautoradiographischen Untersuchungen zur

Rb⁺(K⁺)-Aufnahme von Gerstenwurzeln gingen van Iren und van der Sluijs (1980) sogar soweit zu folgern, daß den Rindenzellen während der Differenzierung die Fähigkeit zur Ionenaufnahme weitgehend verloren ginge. An Protoplasten von Maiswurzeln konnte hingegen gezeigt werden, daß diese K⁺ (Rb⁺) durchaus aufnehmen können (Kochian und Lucas, 1983).

Zur Bestimmung der Permeabilität der Hypodermiszellwände wurden an isolierten Hypodermis-Hüllen mehrere Untersuchungen durchgeführt (Clarkson et al. 1978; Robards et al., 1979; Clarkson et al., 1987; Shone und Clarkson, 1988). Diese zeigten, daß die Permeabilität der isolierten Zellwände von Maiswurzeln, die in feuchter Luft angezogen wurden, wesentlich niedriger war als in Wurzeln, die permanent in die Nährlösung eingetaucht waren (Clarkson et al., 1987). Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch an abgeschnittenen Maiswurzeln für die hydraulische Leitfähigkeit gefunden (Zimmermann und Steudle, 1998). Während an Hypodermis-Hüllen von Maiswurzeln für die Zellwände niedrige Permeabilitäten ermittelt wurden, deuten die Permeabilitäten von Zwiebelwurzeln an, daß die Zellwände relativ leicht für gelöste Stoffe zu passieren sind (Clarkson et al., 1978). Sie stimmen insofern nicht mit gleichzeitig durchgeführten histologischen Untersuchungen an abgeschnittenen Wurzeln überein, die ergeben haben, daß die Exodermiszellwände für den in beiden Fällen untersuchten Farbstoff Uvitex CFX undurchlässig sind (Peterson et al., 1978). Mit Hilfe organischer Fluoreszenzfarbstoffe als Apoplastenmarker konnte für Mais und andere Pflanzenarten gezeigt werden, daß die Marker bei intakter Exodermis nicht in die Wurzelrinde eindringen (Peterson und Perumalla, 1984). Ergänzend zu den Untersuchungen mit großen Farbstoffmolekülen konnte gezeigt werden, daß der scheinbar freie Diffusionsraum (AFS) für SO₄²⁻ Ionen durch eine intakte Exodermis stark verkleinert wird (Peterson, 1987). Daraus wurde der Schluß abgeleitet, die Exodermis limitiere den Zugang der SO₄²⁻ Ionen zum Apoplasten des Wurzelrindenparenchyms. Die Aufnahme von SO₄²⁻ durch die Wurzeln wurde aber auch schon früher mit Hilfe mikro-autoradiographischer Techniken eingehend untersucht (Weigl und Lüttge, 1962; Lüttge und Weigl, 1962; Ziegler et al., 1963; Krichbaum et al., 1967). Aus den Ergebnissen an abgeschnittenen Segmenten junger Maiswurzeln wurde abgeleitet, daß der Apoplast der Wurzelrinde für SO₄²⁻ bis zur Endodermis frei zugänglich ist. Die Präsenz einer Exodermis wurde in diesen Untersuchungen nicht erwähnt.

1.2 Der Apoplast als Untersuchungsobjekt

Für die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Funktion der Exodermis im Hinblick auf den radialen Transport gelöster Ionen im Apoplasten wurden entweder nur Wurzelsegmente oder sogar nur isolierte Zellwände verwendet. Zudem wurden lediglich indirekte Messungen durchgeführt, entweder durch Ionen-Auswaschungen oder durch den Einsatz hochmole-

kularer Tracer. Die Verwendung indirekter Methoden für Untersuchungen in den dünnen Zellwänden ist auch ein Hinweis auf die schlechte Zugänglichkeit des Wurzelapoplasten für direkte Meßmethoden. Dennoch wird gegenwärtig mit unterschiedlichen Methoden der Versuch unternommen die Bedeutung des Apoplasten als Speicher-, Transport- und Reaktionsraum für die Pflanze aufzuklären. Um das Milieu im Apoplasten von Wurzeln zu charakterisieren, werden z.B. ionenselektive Elektroden dazu verwendet den pH-Wert in den Wänden der äußeren Wurzelrindenzellen und an der Wurzeloberfläche entlang der Wurzelachse zu bestimmen (Felle 1998; Peters und Felle, 1999). Der pH-Wert ist im Bereich der Wurzelspitze und der Streckungszone von Maiswurzeln demnach niedriger als in allen anderen Wurzelabschnitten. Mit Hilfe dieser Technik wurde außerdem gezeigt, daß beim Angebot toxischen Aluminiums an die Wurzelzone 1-2 mm hinter der Wurzelspitze die typische Alkalisierung des pH-Werts im Apoplasten abgeschwächt wurde (Kollmeier et al., 2000). Damit konnten frühere Ergebnisse, wonach diese Wurzelzone ausschlaggebend für die toxische Wirkung von Al^{3+} ist, bestätigt werden (Sivaguru und Horst, 1998). Mit Hilfe von Zell- und Wurzeldruckmeßsonden wurden Untersuchungen zum radialen Wassertransport und zum radialen Transport von Abscisinsäure (ABA) durch die Wurzeln durchgeführt (Zimmermann und Steudle, 1998; Zimmermann et al. 2000; Freundl et al, 2000). Alle drei Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, daß eine Exodermis sowohl den Transport von Wasser, als auch den Transport von ABA einschränkt. Die Parameter des Wassertransports im Xylem wurden mit Hilfe von Druckmeßsonden, die im Xylem plaziert wurden beschrieben (Wegner et al. 1999; Wegner und Zimmermann, 1998), während die Kern-Spin-Tomographie (NMR) dazu benutzt wurde die Wasserbewegung in den Leitgeweben des Sprosses an intakten Pflanzen zu beobachten (Kuchenbrod et al., 1998). Mit Hilfe von 'patch clamp' Untersuchungen wurden an Xylemparenchymzellen neue Anionen-Transportkanäle für Nitrat und Chlorid beschrieben und deren Bedeutung für die Beladung der Xylemelemente mit Nährstoffen untersucht (Köhler und Raschke, 2000). Die Bedeutung des Wurzelapoplasten als Speicher für Eisen wurde mit quantitativ chemischen Methoden und der Protonen-Induzierten Emission von Röntgenstrahlen (PIXE) an Schnitten gefriersubstituierter Wurzeln untersucht (Strasser et al., 1999; Schneider et al. 2000). Daraus geht hervor, daß der Apoplast der Wurzelrinde keine bzw. nur eine geringe Bedeutung als Speicher für Eisen hat. Mit Hilfe der LAMMA-Technik (Laser-Microprobe-Mass-Analyzer) wurde die Zugänglichkeit des Apoplasten mykorrhizierter Fichtenwurzeln für zweiwertige Kationen untersucht (Kuhn et al., 2000), mit dem Ergebnis, daß in diesen Wurzeln der Apoplast bis zur Endodermis frei zugänglich ist.

Zur Klärung der Frage nach der Zugänglichkeit des Apoplasten von Gerstenwurzeln für K^+ (Rb^+) sollten direkte Messungen der Elementkonzentrationen in den Zellwänden durch-

geführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit standen dazu die energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDXA), die Sekundärionen Massenspektroskopie (SIMS) und die Elektronen Energieverlust Spektroskopie (EELS) für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung. Für die Lokalisation von mobilen, anorganischen Ionen in Zellwänden müssen hinsichtlich der Probenpräparation besondere Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst muß die Fixierung der Proben garantieren, daß die *in situ* Verteilung der Ionen nicht beeinflusst wird. Die am besten geeignete Technik den 'Ist-Zustand' der Proben augenblicklich zu konservieren ist die Gefrierimmobilisierung (Zierold und Steinbrecht, 1987; Echlin, 1992). Wegen der störenden Einflüsse der Eiskristalle besteht eine Optimierung des Einfrierens biologischer Proben darin, das Wasser in einem glasartigen Zustand erstarren zu lassen, d.h. die Probe zu vitrifizieren. Das Einfrieren von biologischem Material unter hohem Druck schafft die Voraussetzungen um Proben bis zu einer Dicke von 500 µm zu vitrifizieren (Moor, 1987). Alle anderen bekannten Einfriertechniken sind in dieser Hinsicht weniger gut geeignet und es kommt bereits in geringen Probentiefen (ca. 10 µm in flüssigem Propan) zur Bildung und zum Wachstum von Eiskristallen (Kaeser et al., 1989). Eiskristalle bilden sich in pflanzlichen Präparaten überwiegend in den großen wassergefüllten Vakuolen. Neben dem Effekt der sekundären Verlagerung von Ionen, erschweren sie außerdem die nachfolgenden Schritte der Probenpräparation, d.h. ganz besonders das Anfertigen von Gefrierschnitten. Die Herstellung von Gefrierschnitten ist für die Untersuchung von Elementkonzentrationen in den dünnen Zellwänden notwendig, weil die räumliche Auflösung der EDX-Analyse an dicken Proben dafür nicht ausreicht (Echlin, 1992). Von pflanzlichem Gewebe wurden bisher Kryoschnitte von Proben, die unter hohem Druck eingefroren wurden, dazu hergestellt, um die Ultrastruktur der Zellen zu untersuchen (Michel et al. 1991). Um die Verteilung diffusibler Ionen in Zellwänden zu untersuchen, wurden zumeist Gefrierschnitte von Geweben angefertigt, die in flüssigem Propan oder Freon-22 eingefroren wurden (Campbell et al., 1981; Satter et al., 1982; Cameron et al., 1984). Bei diesen Einfrieremethoden ist es im Gegensatz zum Hochdruckeinfrieren möglich, intakte Wurzeln bzw. sogar intakte Pflanzen einzufrieren und damit die Wahrscheinlichkeit zu verringern, die Verteilung der Ionen innerhalb der Probe vor dem Einfrieren zu verändern.

Wegen des recht hohen endogenen K^+ -Gehaltes pflanzlicher Gewebe können Experimente zur Aufnahme und zum Transport dieses Ions nur mit geeigneten Tracern durchgeführt werden. In Kurzzeitversuchen hat sich in der Pflanzenphysiologie seit langem das chemische Analogon für K^+ nämlich Rb^+ bewährt (Epstein, 1972; van Iren und van der Sluijs, 1980; Hooymans, 1982; Schachtman und Schroeder, 1994; Hirsch et al. 1998). Die Radien der hydratisierten Ionen von Kalium und Rubidium unterscheiden sich nur geringfügig (K^+ : 0,331 nm; Rb^+ : 0,329 nm, Nightingale, 1959). Deshalb dürften sie sich in bezug auf die Diffusion in einer freien Lösung bzw. im Apoplasten ebenfalls nur wenig unterscheiden und

Rb^+ von daher für die Untersuchung der Beweglichkeit von K^+ im Apoplasten gut geeignet sein.

Die direkten Messungen mit Hilfe analytisch-elektronenmikroskopischer Techniken sollten insbesondere dazu beitragen herauszufinden, ob die Exodermis und/oder die äußeren Wurzelgewebe die freie Diffusion von Kationen wie Kalium im Apoplasten der Wurzelrinde einschränken. Eine Exodermis bzw. Rhizodermis, die den radialen apoplastischen Ionen-transport limitiert, hätte große Auswirkungen auf die Gesamtfläche der Plasmamembranen, die für die Ionenaufnahme aus der Außenlösung zur Verfügung stünde. Im Gegensatz zu den bisherigen Vorstellungen wäre die Ionenaufnahme in diesem Fall überwiegend auf die äußeren beiden Zellschichten beschränkt. Die Zusammensetzung der apoplastischen Flüssigkeit in der Wurzelrinde zwischen Exo- und Endodermis wäre mehr oder weniger unbeeinflusst von der Außenlösung und unterläge der physiologischen Kontrolle durch die beiden peripheren Wurzelzellschichten und die Zellen der Wurzelrinde. Unter solchen Voraussetzungen könnte man in diesem Apoplasten Eigenschaften eines eigenständigen Reaktionsraumes, d.h. eines Kompartimentes im eigentlichen Sinne, erwarten.

2 Material und Methoden

2.1 Kulturbedingungen und Pflanzenmaterial

2.1.1 Pflanzenanzucht

Für sämtliche Versuche wurde Gerste (*Hordeum vulgare* L.) der Sorte "Alexis" (Saatzucht Josef Breun, 91074 Herzogenaurach) verwendet. Diese Sorte wurde innerhalb des DFG Schwerpunktprogrammes "Der Apoplast der höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum" einheitlich für Untersuchungen an Gerste benutzt.

Gerstensamen wurden über Nacht in belüfteter CaSO_4 Lösung ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) vorgequollen. Anschließend wurden die gekeimten Samen auf ein Netz übertragen, das auf CaSO_4 Lösung schwamm und dort für weitere 6 Tage belassen (davon die ersten 3 Tage abgedunkelt). Danach wurden die Pflanzen auf belüftete Nährlösung umgesetzt (Tab. 1). Dabei wurden jeweils 5 einzelne Pflanzen in einem 3 Liter Nährlösung enthaltenden Kulturgefäß aus schwarzem Plastik zusammengefaßt (Abb. 2.1). Die Nährlösung wurde alle 3 Tage gewechselt. Die Nährlösung enthält kein Silizium (Tab. 1), obwohl dieses für viele Gramineenarten als Nährelement gilt (Marschner, 1995). Zur Belüftung der Nährlösung wurden Glaseinsätze verwendet. Da davon auszugehen war, daß bereits über diese Glaseinsätze ausreichend Si in die Nährlösung gelangt, wurde auf einen Zusatz von Si zur Nährlösung verzichtet.

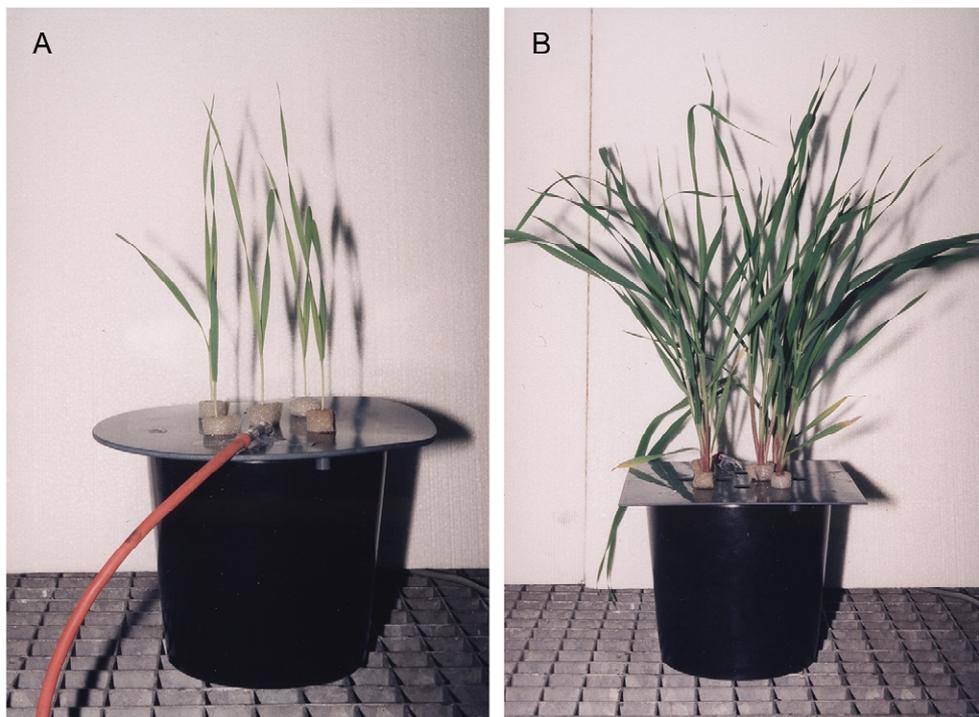


Abb. 2.1: Gerstenpflanzen nach einer Woche (A) und nach drei Wochen Kulturdauer (B).

Vierzehn Tage nach der Keimung bildeten die Gerstenpflanzen zusätzlich zu den 7-9 Keimlingswurzeln neue Adventivwurzeln der 2. Generation (Nodalwurzeln). Zu diesem Zeitpunkt wurde der Rest der Karyopse, deren Stärkevorrat bereits aufgebraucht war, von Hand entfernt. Die Ernte der Nodalwurzeln erfolgte in der Regel nach einer Kulturdauer von 21 Tagen (inklusive des Vorquellens); die Ernte der Keimlingswurzeln erfolgte zu einem früheren Zeitpunkt, meistens 7 bis 9 Tage nach der Keimung.

Die Anzucht der Pflanzen wurde in einer begehbaren Klimakammer mit einem 16/8 h Licht/Dunkel Wechsel durchgeführt. Die Lufttemperatur betrug während der Lichtphase 20 °C und während der Dunkelphase 16 °C. Als Lichtquelle dienten Quecksilberdampflampen (HQI-T, 400 W/D daylight, Osram), die auf Höhe der Pflanzen eine mittlere Lichtintensität von 50 kLux erzeugten.

Tab. 1: Zusammensetzung der Nährlösung (DFG Standardnährlösung für Monokotyle).

Hauptnährelemente	[mol · m ⁻³]	Spurenelemente	[10 ⁻³ mol · m ⁻³]
NH ₄ NO ₃	0,1	H ₃ BO ₄	1,0
K ₂ SO ₄	0,7	MnSO ₄	0,5
KCl	0,1	ZnSO ₄	0,1
Ca(NO ₃) ₂	0,4	CuSO ₄	0,2
MgSO ₄	0,5	(NH) ₄ Mo ₇ O ₂₄	0,01
KH ₂ PO ₄	0,1		
Fe-EDTA	0,02		

2.1.2 Bestimmung von Trockengewichten und Wurzellängen

Einzelne Pflanzen wurden nach definierten Zeitintervallen während der Pflanzenkultur geerntet und die Wurzeln vom Sproß mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Die Karyopsen wurden ebenfalls mit einer Rasierklinge abgetrennt.

Die Länge der einzelnen Wurzeln wurde mit einem Zentimetermaß vermessen. Anschließend wurden die Wurzeln, Sprosse und Karyopsen nach Einzelpflanzen getrennt im Trockenschrank für 24h bei 105°C entwässert. Aus der Differenz von Frisch- und Trockengewicht wurde der Wassergehalt berechnet.

Das Sproß zu Wurzel Verhältnis wurde aus den Trockengewichten berechnet.

2.1.3 Bestimmung der Osmolarität von Wurzelpreßsäften

Gerstenwurzeln wurden mit Filterpapier oberflächlich abgetrocknet und ca. 300 mg frisches Wurzelmaterial in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen. Die Eppendorfgefäße mit den Wurzeln wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 10 min im Wasserbad bei 80°C aufgetaut. In die Spitze des Gefäßes wurde nun mit einer glühenden

Präpariernadel ein ca. 1 mm großes Loch geschmolzen. Die Eppendorfgefäße mit Wurzelmaterial wurden auf ein zweites Eppendorfgefäß gesteckt und beide zusammen bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 10 min zentrifugiert.

Von der abzentrifugierten Flüssigkeit wurde die Osmolarität mit einem Halbmikro-Osmometer (Knauer, Berlin) bestimmt. Dazu wurde der Preßsaft 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und davon 150 µl in eine Meßküvette des Osmometers überführt. Die Bestimmung der Osmolarität erfolgte durch die Gefrierpunktserniedrigung der Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration der gelösten Teilchen. Die Eichung erfolgte mit Hilfe einer NaCl Lösung bekannter Konzentration (400 mosmol NaCl • kg⁻¹ H₂O; 12,687 g NaCl • kg⁻¹ H₂O)

Die Osmolarität des Preßsaftes von Gerstenwurzeln wurde mit diesem Verfahren zu $209 \pm 25 \text{ osmol} \cdot \text{m}^{-3}$ bestimmt.

2.2 Histochemische Untersuchungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Axiolab Fotomikroskop durchgeführt. Bilder der Präparate wurden auf Kodak Ektachrome EPY 64 Filmen aufgenommen.

2.2.1 Berberinsulfat/Anilinblau Färbung

Die Untersuchung von Keimlings- und Nodalwurzeln auf die Präsenz einer Exodermis wurde mit der Färbemethodik nach Brundrett et al. (1988) durchgeführt. Diese Färbung ruft unter kurzwelligem Licht eine gewebetypische grün-gelbliche Fluoreszenz in den radialen Zellwänden der Endodermis und der ausdifferenzierten Exodermis hervor und soll deshalb die Präsenz von Caspary-Streifen anzeigen. Die nach Brundrett et al. (1988) für die Fluoreszenz ausschlaggebenden Substanzen sind Lignin, Suberin und/oder Callose.

Mit Hilfe einer Rasierklinge angefertigte Querschnitte durch frische Wurzeln wurden zunächst für 1 h in einer 0,1% Berberinsulfatlösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) inkubiert. Anschließend wurden die in einer Tüpfelschale aufbewahrten Schnitte mit Leitungswasser gespült und in einem zweiten Schritt für 30 min in einer 0,5% Anilinblaulösung gefärbt. Danach wurden die Schnitte nochmals mit Leitungswasser gespült und in einen Tropfen Glycerinlösung (50% Glycerin, 0,1% FeCl₃) auf einen Glasobjektträger überführt und unter Auflicht der Wellenlängen 450-490nm mikroskopiert.

2.2.2 Phloroglucin/HCl Färbung

Handgefertigte Querschnitte von frischen Gerstenwurzeln wurden für 5 min in Phloroglucin Lösung (Phloroglucin in Ethanol) gegeben. Anschließend wurden sie in einen Tropfen HCl (½ konz.) überführt, in Glycerin aufgenommen und im Hellfeld lichtmikroskopisch untersucht. Die Phloroglucin/HCl Färbung zeigt im Hellfeld Lichtmikroskop Gewebe mit lignifizierten Zellwänden durch eine rote Färbung an. Der Ligninnachweis beruht auf der Reaktion von Phloroglucin mit den Aldehyd-Gruppen des Lignins (Gahan, 1984).

2.2.3 Sudan III Färbung

Handgefertigte Querschnitte von frischen Gerstenwurzeln wurden in einen Tropfen Sudan III Lösung (Sudan III in Ethanol) überführt und zusammen mit der Lösung vorsichtig erwärmt. Anschließend wurden die Schnitte in Glycerin aufgenommen und mikroskopiert. Mit Sudan III lassen sich alle lipophilen Substanzen insbesondere aber Suberin und Cutin anfärben und ergeben dann eine rote Färbung im Hellfeld Lichtmikroskop (Gahan, 1984).

2.3 Untersuchungen zur Zugänglichkeit des Apoplasten von Gerstenwurzeln

Der Frage nach der Zugänglichkeit des Wurzelapoplasten wurde vor allem anhand von direkten Messungen in den Zellwänden mit Methoden der analytischen Elektronenmikroskopie (EDXA, EELS) und der bildgebenden Massenspektroskopie (SIMS) nachgegangen. Daneben wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt um den Weg des Apoplastenmarkers Farbstoff Evans Blue im Wurzelgebe nachzuvollziehen. Außerdem wurde mit Hilfe von quantitativ chemischen Messungen untersucht in welcher Zeit angebotener Tracer (Rb^+) wieder aus dem Apoplasten intakter Wurzeln ausgewaschen werden kann. Dazu wurden dieselben experimentellen Bedingungen verwendet, wie für die direkten Messungen in den Zellwänden. Die Inkubationszeit wurden dabei bewußt kurz gewählt, damit der radiale Transport der Ionen in die Wurzel hauptsächlich über den Apoplasten stattfand. Gleichzeitig wurde eine hohe Konzentration des Tracers angeboten ($60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ RbCl}$), um einen steilen Konzentrationsgradienten herzustellen.

Die verschiedenen Versuchsansätze und Techniken sind in Abb. 2.2 zusammengestellt.

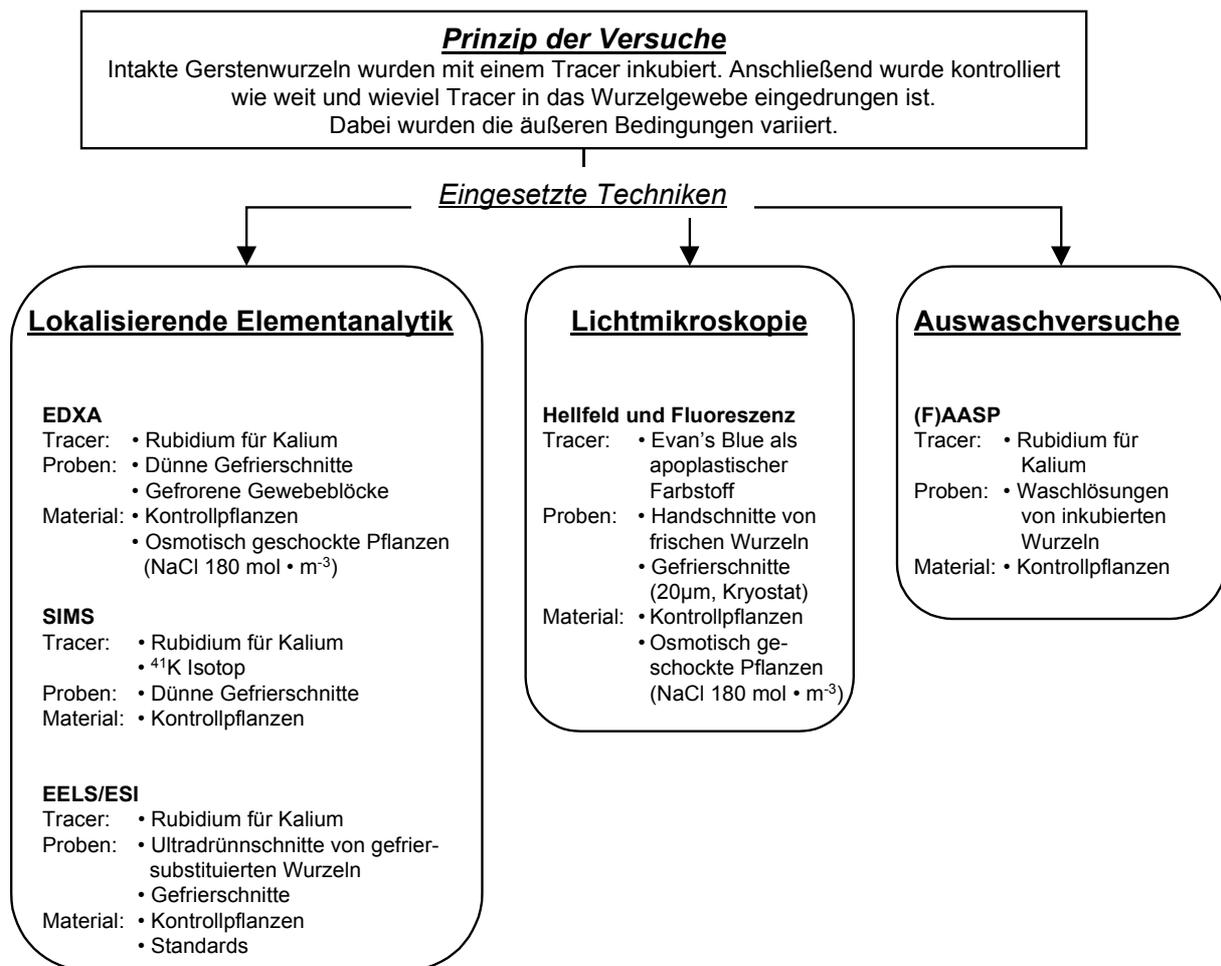


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsansätze.

2.3.1 Evans Blue als Apoplastenmarker

Evans Blue ist ein hochmolekularer Farbstoff (s. Anhang) der nicht in lebende Zellen aufgenommen wird und deshalb zur Markierung des Apoplasten eingesetzt wird (Taylor und West, 1980). Im Lichtmikroskop zeigt er im Hellfeld Bild eine dunkelblaue Farbe, durch Anregung mit kurzwelligem Licht von 450-490nm fluoresziert Evans Blue rot.

Die Wurzeln intakter Pflanzen wurden für 1 h in eine 0,5% Evans Blue Lösung getaucht (Kontrollen) oder in eine Lösung, die Evans Blue und zusätzlich $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl enthielt (osmotisch geschockte Wurzeln). Anschließend wurden von einzelnen Wurzeln per Hand Querschnitte angefertigt, die in Glycerin oder Wasser aufgenommen und dann lichtmikroskopisch untersucht wurden.

Außerdem wurden Wurzeln in Tissue Tek (Sakura Fine Tek, Niederlande) eingebettet und auf dem Probentisch eines Kryostat Mikrotoms (Modell 2700 Frigocut, Reichert) eingefroren. Bei -15°C wurden $20\mu\text{m}$ dicke Querschnitte mit Hilfe eines Metallmessers angefertigt und auf Glasobjektträger überführt. Die Schnitte wurden durch Erwärmen der Unterseite des Objektträgers getrocknet und anschließend mikroskopiert.

2.3.2 Auswaschversuche

Bei diesen Versuchen wurden die Rb^+ -Konzentrationen der Waschlösungen, die nach vorausgegangener zweiminütiger Inkubation aus den Wurzeln ausgewaschen werden konnten, in Abhängigkeit von der Zeit mit der AAS (Kap. 2.3.3.2.3) bestimmt. Mit Hilfe der resultierenden Kinetiken können die zum Auswaschen notwendigen Halbwertszeiten errechnet werden. Diese dienen dazu herauszufinden, ob die gewählte Inkubationszeit lang genug war, um den Apoplasten der Wurzelrinde zu ent- bzw. zu beladen.

Ganze Wurzeln

Es wurden von 5 Pflanzen die Nodalwurzeln bzw. von 10 Pflanzen die Keimlingswurzeln unterhalb der Karyopse vom Sproß abgeschnitten und mit einem Baumwollfaden zusammengebunden. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur für 2 min in eine RbCl Lösung ($\text{RbCl } 60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$, $\text{CaSO}_4 \text{ } 0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) getaucht. Zum Auswaschen wurden die Wurzeln mit einer Pinzette in 40 ml CaSO_4 Lösung ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) überführt. Dort wurden sie unter Schwenken des Becherglases für die Dauer der Auswaschzeit belassen und danach in das nächste Becherglas überführt. Zwischen zwei Waschschrritten wurde die oberflächlich anhaftende Lösung mit Filterpapier entfernt.

Die Auswaschzeiten pro Waschschrtritt betragen 10, 20, 30, 60 Sekunden und 2, 4, 8, 15, 30, 60 min, was sich insgesamt zu einer Auswaschzeit von 121 min summierte.

Nach dem letzten Waschschrtritt wurden die Wurzeln für 60 min in 10 ml HNO_3 (0,5 %) bei 90°C extrahiert. Die mit der AAS ermittelten Rb^+ -Konzentrationen wurden auf die dazugehörige Frischgewichtseinwaage bezogen.

Einzelne Wurzelabschnitte

Basale und apikale Segmente einzelner Gerstenwurzeln, die noch mit der intakten Pflanze verbunden waren, wurden in einer speziellen Halterung so positioniert, daß sie über eine Schlauchpumpe mit Lösung gespült werden konnten. Die Lösung wurde in einem Probengefäß unterhalb der Wurzel aufgefangen und konnte von dort über Silikonschläuche erneut über die Wurzeln geleitet werden. Auf diese Weise wurden definierte Abschnitte von Keimlings- und Nodalwurzeln zunächst mit einer RbCl Lösung ($60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) für 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Wurzelsegmente mit 10 ml einer CaSO_4 Lösung ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) gespült. Für die kürzeren Waschzeiten wurde die CaSO_4 Lösung aus einer 10 ml Pipette langsam über die Segmente ausgelassen und in dem unter der Probe befindlichen Probengefäß aufgefangen. Bei den längeren Spülzeiten (ab 2 min) wurde die Lösung über die Schlauchpumpe aus dem Probengefäß abgesaugt und in einem Kreislauf kontinuierlich über den Wurzelabschnitt geleitet. Die Versuche wurden in einem begehbaren Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Spülzeiten sind identisch mit denen für ganze Wurzeln.

Nach dem Auswaschen wurde das Wurzelsegment in 5 ml HNO_3 (0,5 %) für 60 min bei 90°C extrahiert.

Die Bestimmung der Rb^+ Konzentrationen in den Waschlösungen und Extrakten erfolgte mit der AAS (Kap. 2.3.3.2.3).

Aus den Rb^+ Konzentrationen in den Waschlösungen nach den definierten Zeitintervallen wurden die Halbwertszeiten für das Auswaschen des angebotenen Rb^+ berechnet. Dazu wurden die Auswaschzeiten gegen die aufsummierten Rb^+ Konzentrationen der Waschlösungen doppelt reziprok aufgetragen und die Halbwertszeit gemäß der Michaelis-Menten Kinetik als x-Achsen Schnittpunkt berechnet (vergl. Abb. 3.8).

2.3.3 Lokalisation der Elemente Kalium, Rubidium und Chlor in Zellwänden

Experimentelle Ansätze

Um die Zugänglichkeit des Apoplasten von Gerstenwurzeln für anorganische Ionen zu testen, wurde den Wurzeln von intakten Pflanzen für 2 bzw. 5 min eine Tracer Lösung angeboten. Bei Wurzeln, die mit der EDX-Analyse untersucht werden sollten enthielt diese Lösung als Tracer für Kalium das chemisch ähnliche Rubidium.

Wurzeln, die mit der SIMS untersucht werden sollten (vergl. 2.3.3.2.2), wurde neben Rb^+ auch seltene Isotope von Kalium (^{41}K), Calcium (^{44}Ca) und Magnesium (^{26}Mg) angeboten. Das Angebot erfolgte entweder gleichzeitig mit Rb^+ oder ohne Zusatz von Rb^+ (Tab. 2). Dabei sollte unter anderem überprüft werden, ob die Verteilung des angebotenen Rb^+ mit der Verteilung des angebotenen seltenen $^{41}\text{K}^+$ Isotops vergleichbar ist.

Es wurden Wurzelanschnitte mit Exodermis ($\geq 4\text{ cm h.Wsp.}$) und Wurzelanschnitte ohne Exodermis (ca. 1 mm h.Wsp.) vergleichend untersucht. Die Präparation der Proben wird sowohl für die EDXA als auch für die SIMS in Kap. 2.3.3.1.1 und 2.3.3.1.3 eingehend erläutert.

Tab. 2: Zusammensetzung der Isotopenlösungen ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$).

	$^{85/87}\text{RbCl}$	^{41}KCl	$^{44}\text{CaNO}_3$	$^{26}\text{MgCl}$
Lösung 1	30	30	0,4	0,5
Lösung 2	0	1,5	0,4	0,5

Zusätzlich zu den Untersuchungen an Kontrollpflanzen wurden die Wurzeln von Pflanzen untersucht, deren Nährlösung vor der Rb^+ -Inkubation mit NaCl aufgesalzen wurde bzw. deren Wurzeln durch NaCl-Zusatz osmotisch geschockt wurden. Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Zellturgor einen Einfluß auf die Permeabilität der Zellwände für Rb^+ hat.

Um "aufgesalzene" (d.h. an NaCl adaptierte) Pflanzen zu erhalten, wurde die NaCl Konzentration in der Nährlösung 20 Tage alter Gerstenpflanzen über einen Zeitraum von 6 Stunden mit einer Schlauchpumpe von 0 auf $180\text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ kontinuierlich angehoben (Erhöhung der NaCl Konzentration um $30\text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$).

Den Wurzeln einzelner, intakter Pflanzen wurde 4, 6 und 19 Stunden nach Beginn der Aufsalzung für 5 min eine RbCl Lösung (+ CaSO_4 $0,2\text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) angeboten, die der Konzentration von NaCl in der Nährlösung zu diesem Zeitpunkt entsprach.

Für die Plasmolyseversuche wurden die Wurzeln intakter Pflanzen mit einer hypertonischen RbCl Lösung ($\text{RbCl } 180 + \text{CaSO}_4$ $0,2\text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) osmotisch geschockt. Dazu wurden die Wurzeln der Pflanzen in vorgekühlter Lösung ($1,4^\circ\text{C}$) inkubiert. Durch die niedrige Temperatur der Lösung sollte die Aufnahme und der Transport von Rb^+ durch den Symplasten unterdrückt werden. Nach definierten Zeitintervallen (8-20 min) wurden einzelne Wurzeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die EDX-Analyse im Kryo-REM vorbereitet (Kap. 2.3.3.1.1).

2.3.3.1 Probenpräparation

2.3.3.1.1 Gefrierimmobilisation

Für die Präparation von im Block gefrorenen Proben wurden Kupfer-Halter verwendet, die auf den Kühltisch des REMs geschraubt werden konnten. Zum Einfrieren von Wurzeln, die im Kryomikrotom weiterverarbeitet werden sollten, wurden Aluminiumhalter verwendet. Diese kommerziell erhältlichen Halter mußten hierfür durchbohrt werden; die Durchmesser der

Bohrungen wurden dem Wurzeltyp entsprechend ausgewählt (0,5 mm für Keimlingswurzeln; 0,8 mm für Nodalwurzeln).

Einzelne Wurzeln von intakten Gerstenpflanzen wurden durch die zentrale Bohrung der Probenhalter gesteckt. Der Halter wurde anschließend behutsam eine definierte Strecke entlang der Wurzelachse verschoben. Nun wurde ein Tropfen der Tracer-Lösung an die Wurzeloberfläche auf den Halter gegeben (Abb. 2.3). Nach 2 bzw. 5 min wurde die Lösung mit Filterpapier abgesaugt (nur für die Kryomikrotomie) und der Halter, zusammen mit der noch an der intakten Pflanze befindlichen Wurzel, in das flüssige Propan getaucht. Anschließend wurde der Halter in flüssigem Stickstoff überführt und die Wurzel über der Halteroberfläche mit Hilfe von vorgekühlten Pinzetten abgebrochen. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung im Kryomikrotom in flüssigem Stickstoff gelagert.

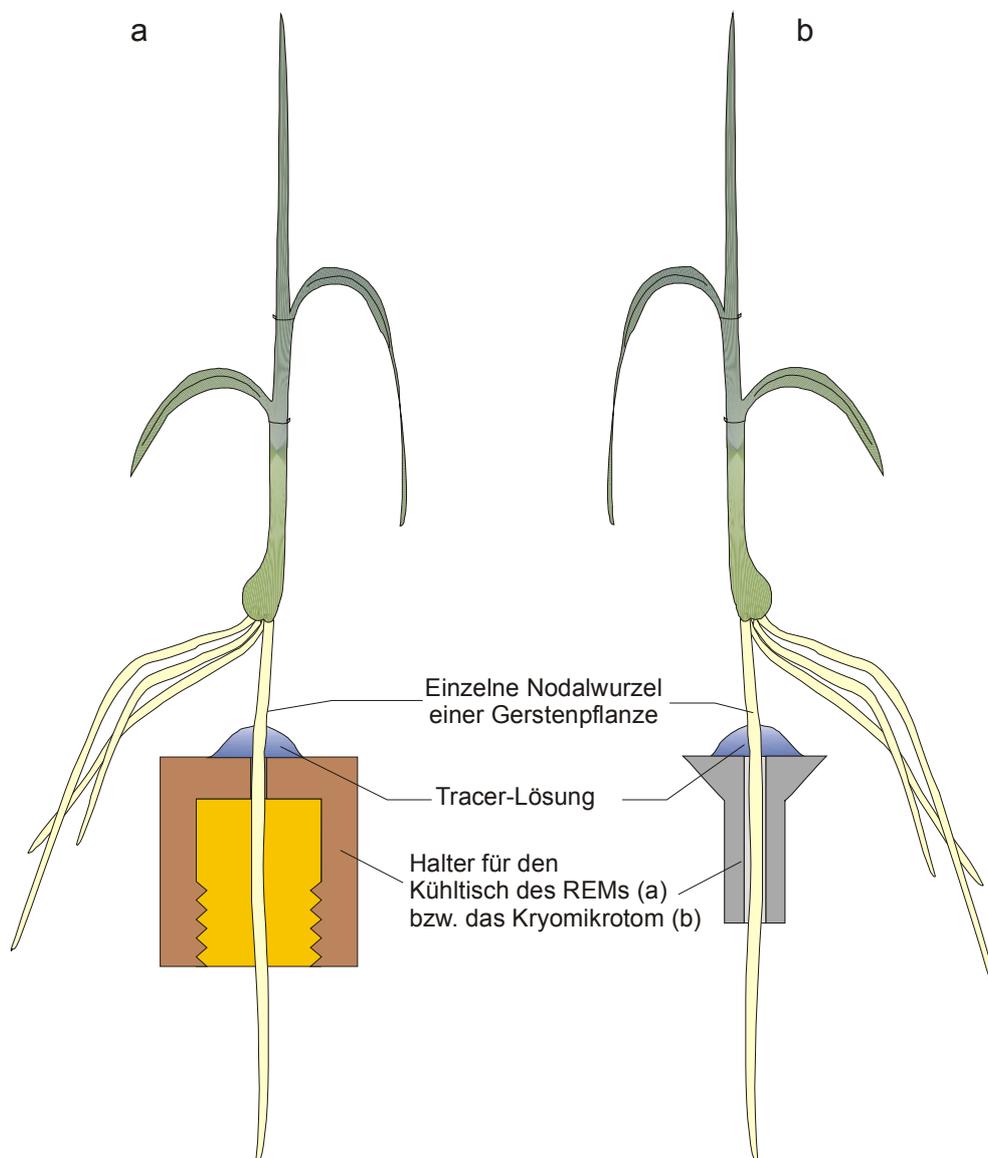


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der praktischen Versuchsdurchführung zum Inkubieren der Wurzeln mit Tracer-Lösung.

a: Präparation mit Kupferhalter passend für das REM.

b: Präparation mit Aluminiumhalter passend für das Kryomikrotom.

Die abgebrochenen Wurzelsegmente von der Wurzelbasis kurz oberhalb des Probenhalters wurden aufgetaut, mit Berberinsulfat/Anilinblau angefärbt (Kap. 2.2.1) und auf Fluoreszenz in der Exodermis überprüft.

Um zu testen, ob die angebotenen Tracer bei beschädigter Exodermis in der angebotenen Zeit in die Wurzelrinde eindringen können, wurden Nodalwurzeln entlang der Wurzelachse mit einer Rasierklinge mechanisch verletzt. Anschließend wurden die Wurzeln entsprechend den Angaben oben für 2 min mit der Tracer-Lösung behandelt und eingefroren. Diese Proben wurden mit der SIMS untersucht.

Verflüssigen von Propan

In einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Messingzylinder wird gasförmiges Propan eingeleitet. Das gasförmige Propan kondensiert an der, mit flüssigem Stickstoff gekühlten Wand des Messingzylinders aus, der sich nach ca. 3-5 min mit flüssigem Propan füllt (Volumen ca. 5 ml). Die Temperatur des auf diese Weise hergestellten flüssigen Propans liegt nur knapp über dessen Schmelzpunkt bei -180°C . Da der Siedepunkt von Propan bei -42°C liegt, bildet sich an der Oberfläche eines warmen Objekts, das in das Propan eingetaucht wird, nicht so leicht eine Gasphase aus. Dieser sogenannte Leidenfrostsche Effekt wird dadurch gegenüber flüssigem Stickstoff, dessen Schmelz (-210°C) und Siedepunkt (-196°C) nur 14°C auseinander liegen, stark vermindert bzw. vollständig unterdrückt.

2.3.3.1.2 Gefriersubstitution

Für die Gefriersubstitution wurden in flüssigem Propan eingefrorene Proben verwendet.

Das Substitutionsmedium bestand nach Kaeser (1989) aus einer Mischung von Aceton und Dimethoxypropan (1:1). Die Proben wurden in Eppendorfgläser (1,5 ml) mit vorgekühltem Substitutionsmedium (-80°C) überführt. Das Medium wurde nach 2, 4 und 19 Tagen erneuert. Die Substitution erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 21 Tagen in einer Gefriertruhe bei -80°C , wobei die Proben kontinuierlich auf einem Rotor bewegt wurden. Nach 21 Tagen wurde die Temperatur über einen Zeitraum von 48 h auf -30°C erhöht und das Substitutionsmedium anschließend schrittweise gegen Einbettungsmedium (Lowicryl HM 23, Polysciences, Eppelheim) oder L.R. Gold (London Resins) ausgetauscht. Der Austausch erfolgte über die Stufen 50% (Einbettungsmedium/Aceton 1:1, 4-6 h) und 90% (Einbettungsmedium/Aceton 9:1, über nacht) zu 100% (24 h) Einbettungsmedium.

Die Polymerisation des Harzes wurde durch Zusatz von Katalysatoren (Crosslinker und Initiator für Lowicryl HM 23, Benzil (0,1 %) für L.R. Gold) zum Einbettungsmedium unter UV-Licht Einfluß bei -80°C (Lowicryl) bzw. -30°C (L.R. Gold) eingeleitet. Die Proben wurden anschließend zum endgültigen Aushärten für zwei Wochen in den verschlossenen Eppendorfgläsern im Tageslicht aufbewahrt.

2.3.3.1.3 Gefrierschneiden

Das Erarbeiten eines praktikablen Protokolls für die Anfertigung dünner Gefrierschnitte von Gerstenwurzeln war ein wichtiger Teil der angewandten Methodik. Deshalb sei hier detailliert auf das Vorgehen bei der Anfertigung der Kryoschnitte eingegangen.

Für das Herstellen von Gefrierschnitten wurde das Mikrotom Ultracut E mit der Kryokammer FC 4 der Firma Reichert-Jung (Österreich) benutzt. Die Kryokammer wird mit flüssigem Stickstoff gekühlt und erlaubt die unabhängige Regelung der Temperatur des Probenkopfes, des Messerblocks und der Stickstoffatmosphäre in der Kammer. Während des Betriebs der Kammer wird deren Innenraum permanent mit kaltem Stickstoffgas horizontal durchstößt, wodurch Eiskontaminationen durch auskristallisierende Luftfeuchtigkeit weitgehend vermieden werden können. Allerdings ist die Kammer nach oben geöffnet, so daß bei längerem Betrieb und hoher relativer Luftfeuchtigkeit (Sommer) Eiskristalle von oben in die Kammer hineinfallen können. Es ist deshalb zweckmäßig, die Verweildauer der fertigen Schnitte in dieser Atmosphäre so kurz wie möglich zu halten und die Kammer in den Arbeitspausen abzudecken.

Die Halter mit den tiefgefrorenen Wurzelsegmenten (Kap. 2.3.3.1.1) wurden in der Probenkammer aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und in den vorgekühlten Probenkopf des Gefriermikrotoms eingespannt. Anhaftendes Eis wurde zuvor mit einem Pinsel entfernt. Zunächst wurde die Bruchfläche der Wurzel mit einem Glasmesser geglättet, indem etwa 300 – 400 µm von der Probe in 2 µm Schritten abgenommen wurden (Abb. 2.4 a-c). Anschließend wurde die Wurzel mit einem Metallmesser von zwei Seiten getrimmt, so daß etwa ein Viertel der gesamten Querschnittsfläche der Wurzel für die Anfertigung der Gefrierschnitte übrig blieb (Abb. 2.4 d). - Dies war notwendig, weil sich dünne Kryoschnitte von der Größe eines kompletten Wurzelquerschnitts nur sehr schwer herstellen ließen und außerdem schlecht zu handhaben waren. - Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryo-Diamantmesser (45°, Drukker, Niederlande) hergestellt (Abb. 2.4 e-g). Die Messer- und Proben temperatur betrug dabei -50 °C, die Temperatur der Stickstoffatmosphäre in der Kammer -110 °C. Die Schnittdicke wurde auf 300 nm eingestellt. Die Schnitte wurden bereits während des Schneidens mit einer an einen Holzstab geklebten Wimper „geführt“. Damit wurde vermieden, daß sich der Schnitt aufrollte und dadurch für die weitere Verwendung unbrauchbar wurde. Einzelne Schnitte (Abb. 2.4 f) oder Schnittbänder (Abb. 2.4 g) von 3-5 Schnitten wurden dann mittels der Wimper auf polierte, vorgekühlte Kupfer-Objektträger überführt (Abb. 2.4 h). Insgesamt wurden so auf jedem Objektträger ca. 10 –15 Schnitte abgelegt. Die Fixierung der Schnitte auf der Oberfläche erfolgte durch Andrücken. Dazu wurde ein auf -110°C vorgekühltes 150 Maschen Kupfer EM-Netz auf die Schnitte gelegt und mit der polierten Oberfläche eines ca. -110°C kalten Metallstabes (Zubehör für das Mikrotom) angedrückt (Abb. 2.4 i).

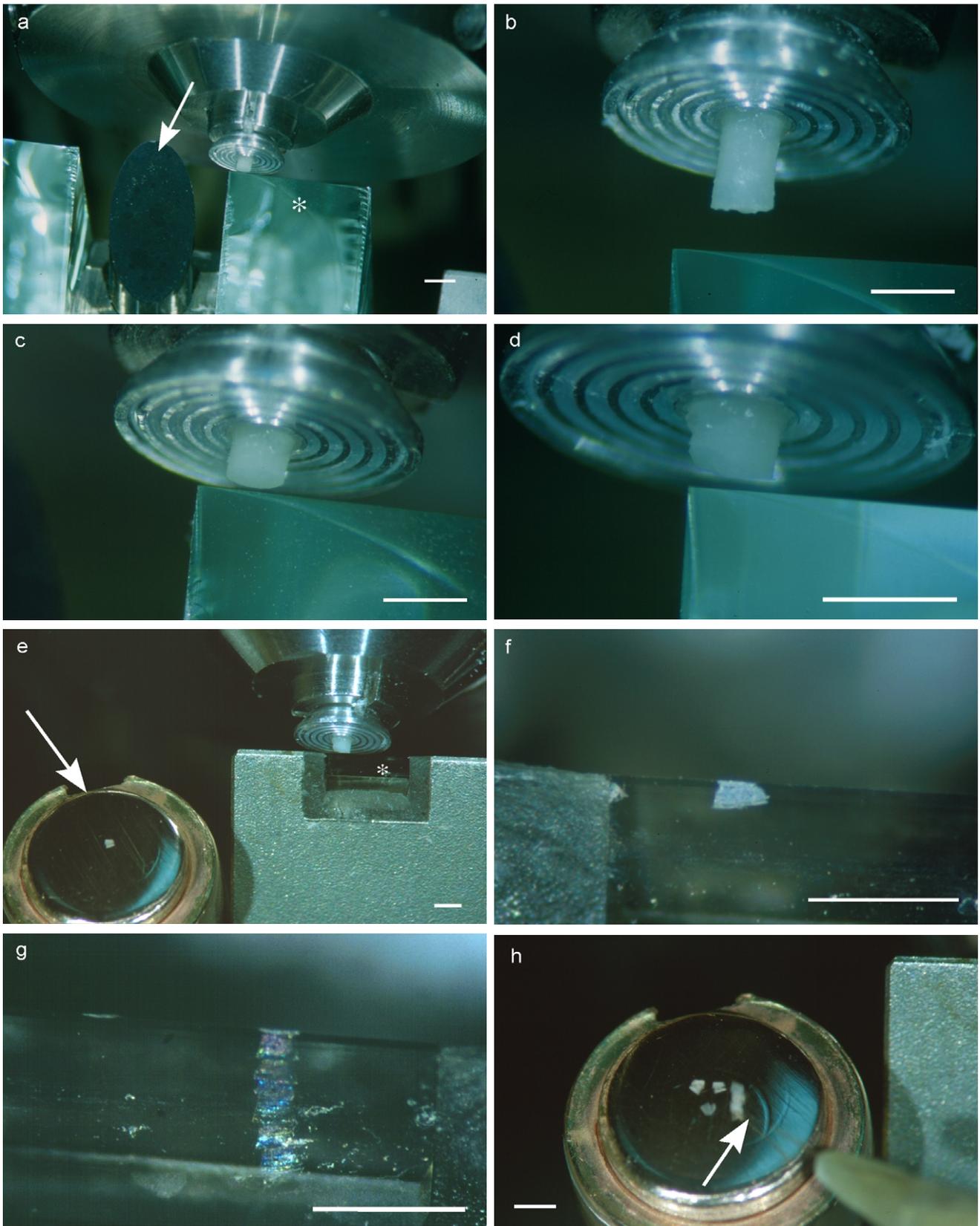


Abb. 2.4: Anfertigung von 300nm Gefrierschnitten im Kryomikrotom. Ausführliche Legende siehe Seite 21.

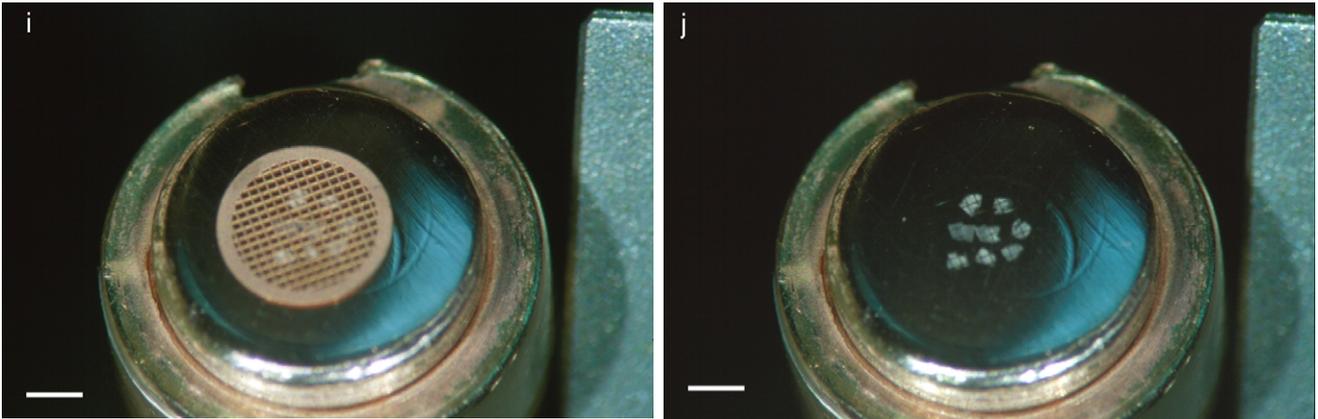


Abb. 2.4: *Anfertigung von 300nm Gefrierschnitten im Kryomikrotom
Balken = 1 mm*

- a: Übersicht über die Anordnung von Probenhalter mit Wurzel, Glasmesser (*) und Metallmesser (Pfeil) in der Probenkammer.*
- b: Die abgebrochene Wurzel hat zunächst eine raue Oberfläche.*
- c: Dieselbe Wurzel wie in b nachdem die Bruchfläche mit dem Glasmesser geglättet wurde.*
- d: Für die Anfertigung der Kryoschnitte wird die Schnittfläche durch Trimmen mit dem Metallmesser (Pfeil in a) auf $\frac{1}{4}$ des Wurzelquerschnittes reduziert.*
- e: Das Glasmesser wird gegen ein Diamantmesser (*) ausgetauscht und ein Kupfer-Probenhalter (Pfeil) neben dem Messer in der Kühlkammer positioniert.*
- f: Ein einzelner Kryoschnitt einer Kontrollwurzel an der Messerkante des Diamantmessers.*
- g: Ein Schnittband von Kryoschnitten eines Dextran Standards (infiltriertes Wurzelsegment). Die Schnitte der Standards erscheinen transparenter als die Schnitte von unbehandelten Wurzeln (f).*
- h: Der Transfer der Schnitte von der Messerkante auf den Kupfer-Objektträger erfolgt mit einer an einen Holzstab geklebten Wimper (Pfeil).*
- i: Auf die Schnitte wird ein 150 'mesh' EM-Netz aus Kupfer gelegt und mit einem kalten Metallstab angedrückt.*
- j: Das Bild zeigt die Kryoschnitte nach dem Entfernen des Netzes. Auf den Schnitten sind noch die Abdrücke der Stege zu erkennen (dunkle Linien).*

Anschließend wurde das Netz entfernt und der Halter mit den angedrückten Schnitten bis zur Untersuchung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Abb. 2.4 j).

Schnitte, die mit der SIMS untersucht werden sollten (Kap. 2.3.3.2.2), wurden ohne die Zuhilfenahme eines Netzes mit dem vorgekühlten Metallstab auf die vergoldete Oberfläche von Aluminiumhaltern gedrückt.

Während des Schneidevorgangs wurde ein Ionisator (Haug AG, Biel Schweiz) ca. 3 cm entfernt von der Messerkante positioniert. Der Ionisator sollte elektrostatische Aufladungen der Schnitte durch die Ionisierung der Stickstoffgasatmosphäre nahe der Messerkante neutralisieren. Derartige Aufladungen führen dazu, daß die Schnitte sich nicht von der Messerkante trennen und somit nicht auf die Objektträger überführt werden können. Während des Übertragens der Schnitte auf den Objektträger wurde der Ionisator ausgeschaltet, da bei laufendem Gerät die Schnitte häufig verwirbelt wurden.

2.3.3.2 Analytische Techniken

2.3.3.2.1 Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse (EDXA)

Die Elementlokalisierung mit der EDXA im Raster-Elektronenmikroskop (REM) beruht auf der Detektion von Röntgenquanten, welche als Resultat der Wechselwirkung zwischen einfallendem Elektronenstrahl und Elementen in der Probe freigesetzt werden.

Mit der EDXA wurden sowohl hydratisiert gefrorene als auch gefriergetrocknete Kryoschnitte untersucht. Hinzu kamen gefrorene Gewebeblöcke von Gerstenwurzeln sowie Semidünnschnitte gefriersubstituierter Wurzeln.

Der Halter mit den fixierten **Kryoschnitten** wurde mit einem speziell konstruierten Greifer (Abb.2.5) unter Stickstoffgasatmosphäre (Vermeidung von Eiskontaminationen aus der Luftfeuchtigkeit) auf den vorgekühlten Probentisch des REM' geschraubt. Die Schnitte wurden anschließend im gefroren-hydratisierten Zustand in die Säule des REM' eingeschleust und dort durch Erhöhen der Proben temperatur auf ca. -110°C vorsichtig gefriergetrocknet.

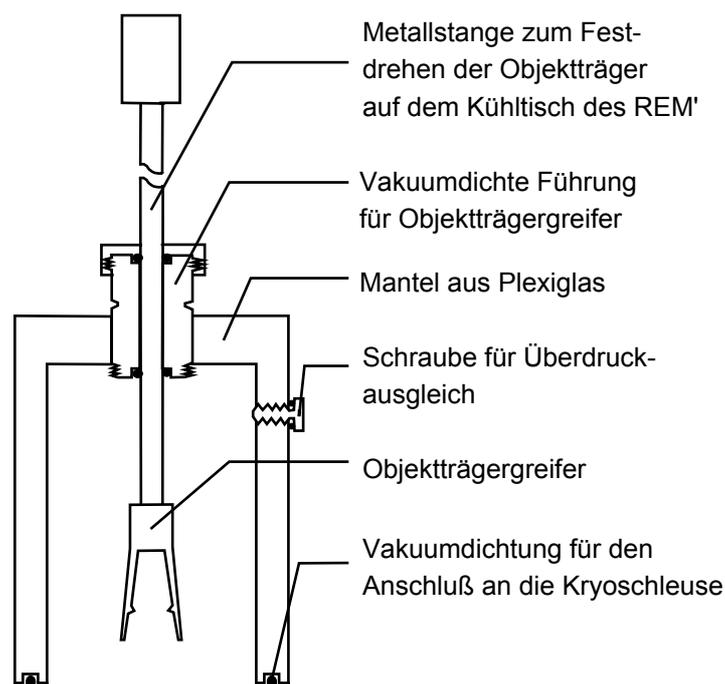


Abb.2.5: Greifer zum kontaminationsfreien Transfer von tiefgekühlten Objektträgern in die Säule des REM.

Für die Messungen an **gefrorenen Gewebebrüchen** wurden die Kupferhalter in der Schleuse des REM' auf den vorgekühlten Probentisch geschraubt. Unter Vakuumbedingungen wurde das Wurzelsegment mit einem stickstoffgekühlten Messer quer gebrochen und ohne Verzögerung in die Probenkammer des REM' eingeschleust. Im gefroren-hydratisierten Zustand waren die Zellstrukturen schwer zu erkennen. Eine Verbesserung wurde durch eine

schonende d.h. langsame Sublimation von Eis aus der Probenoberfläche unter optischer Kontrolle erreicht. Dazu wurde die Probe unter Hochvakuumbedingungen ($2,6 \cdot 10^{-3}$ Pa) kurzzeitig auf eine Temperatur von -110°C erwärmt ("Ätzen").

Kryoschnitte und Gewebebrüche wurden im REM über Kühlschleifen aus einem Vorratsdewargefäß permanent mit flüssigem Stickstoff gekühlt (Probentemperatur ca. -180°C).

Von den **gefriersubstituierten Wurzeln** wurden mit einem Mikrotom (Pyramitom 11800, LKB Produkter) $1\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, auf konventionellen Proben Tellern für das REM aufgeklebt und bei Raumtemperatur analysiert.

EDX-Spektren aus Zellwänden Rb^+ behandelter Gerstenwurzeln sowie die dazugehörigen Kontrollen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV für 45 s (Totzeit korrigiert) aufgenommen. Bei 15000 facher Vergrößerung hatte die Meßfläche dabei eine Größe von $0,3 - 0,4\ \mu\text{m}^2$. Die Röntgenquanten wurden mit einem Si/Li Halbleiterdetektor mit Berylliumfenster (KEVEX) detektiert und mittels eines Vielkanalanalysators (NORAN, TN 5402) registriert. Die Auswertung der Spektren erfolgte über die Berechnung des Peak zu Background Verhältnisses (p/b ratio).

$$\frac{p}{b} = \frac{\text{Net}}{(\text{Gross} - \text{Net})}$$

Net : Zahl der Röntgenimpulse innerhalb der integrierten Peakfläche eines spezifischen Energiefensters (= **peak**)

Gross : alle Röntgenimpulse eines spezifischen Energiefensters (= **peak plus background**)

Es wurden folgende Energiefenster verwendet:

Rubidium	1,550 – 1,880 keV	$\text{K}_{\beta} = 1,694\ \text{keV}$
Kalium	3,150 – 3,480 keV	$\text{K}_{\alpha} = 3,313\ \text{keV}$
Natrium	0,910 – 1,190 keV	$\text{K}_{\alpha} = 1,041\ \text{keV}$
Chlor	2,450 – 2,780 keV	$\text{K}_{\alpha} = 2,622\ \text{keV}$

Herstellung von Standards

Für die Quantifizierung der EDX Messungen mußten Standards hergestellt werden, die in ihrer Beschaffenheit den Zellwänden möglichst ähnlich sind. Dazu wurden durch mehrere Einfrier- und Auftauzyklen abgetötete Wurzelsegmente in einem Exsikkator mit wässriger 20%iger Dextran Lösung infiltriert (Dextran 500; SERVA, Heidelberg). Diese Lösungen enthielten zusätzlich bekannte Konzentrationen an Salzen (Tab. 3). Anschließend wurden diese Segmente in flüssigem Propan eingefroren und ebenso am Kryomikrotom weiterverarbeitet und im REM analysiert wie die Proben. Die EDX Messungen wurden in den mit Dextran

infiltrierten Metaxylemelementen durchgeführt. Aus den resultierenden Kalibriergeraden (Abb. 2.6) wurden die Elementkonzentrationen in den Zellwänden bestimmt.

Tab. 3: Zusammensetzung der Standardlösungen [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$] für die EDXA.

	Standard 0	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4
KNO_3	0	25	50	100	150
RbCl	0	150	100	50	25

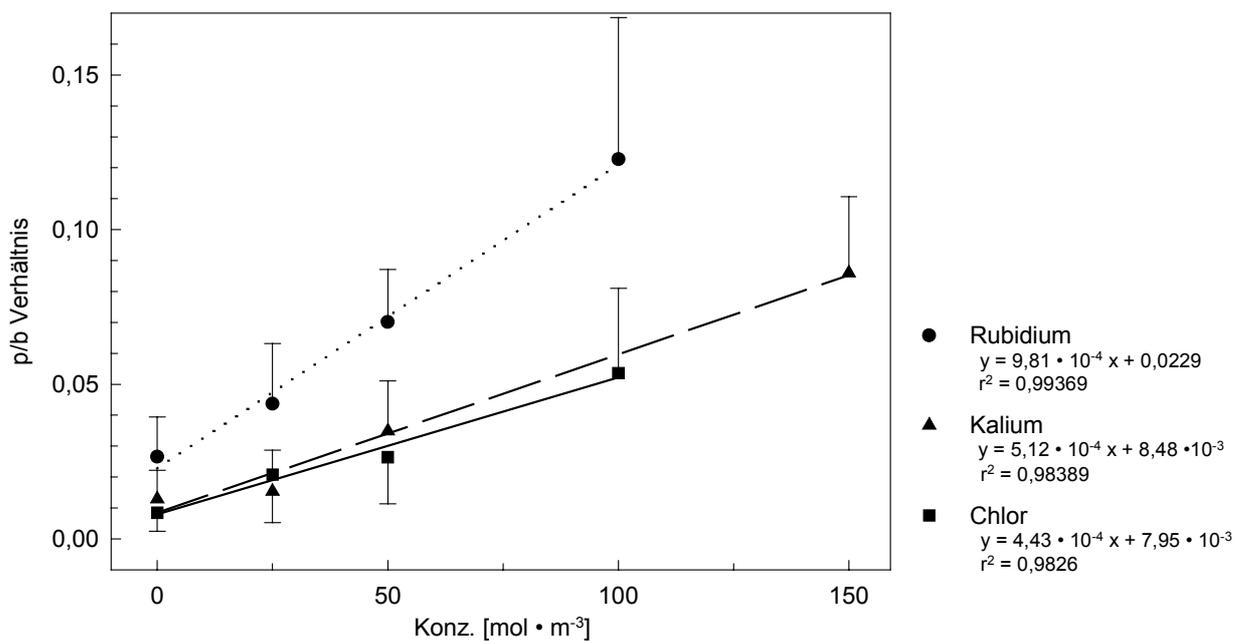


Abb. 2.6: Kalibriergeraden (EDXA) für Kalium, Rubidium und Chlor (Kryoschnitte). Vertikale Balken = Standardabweichung, $n = 21-48$ (Tab. 10 im Anhang).

2.3.3.2.2 Sekundärionen Massenspektroskopie (SIMS)

Mit der SIMS wurden gefriergetrocknete Kryoschnitte untersucht. Zum Gefrier-trocknen wurden die auf dem vergoldeten Halter fixierten Schnitte im gefroren-hydratisierten Zustand in die Probenkammer des REM' eingeschleust. Der gekühlte Proben-tisch taute über Nacht langsam auf, wodurch die Schnitte sehr schonend getrocknet wurden. Die Proben wurden bis zur Messung im Exsikkator über Trockenmittel aufbewahrt.

Die SIMS beruht auf der Emission von Sekundärionen aus einer Probe, die im Hochvakuum ($1,3 \cdot 10^{-4}$ bis $1,3 \cdot 10^{-5}$ Pa) mit einem Primärionenstrahl z.B. Ga^{3+} angeregt wurde. Die Sekundärionen werden mit einem Massenspektrometer detektiert, mit dem Vorteil, daß nicht nur zwischen den Sekundärionen verschiedener Elemente unterschieden werden kann, sondern auch zwischen den Sekundärionen verschiedener Isotope eines Elements.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die bildgebende SIMS (SIMS Imaging) angewandt. Das Ergebnis der Messung ist die genaue Kartierung eines Elements bzw. seines Isotops innerhalb der untersuchten, d.h. der abgerasterten Fläche eines Wurzelquerschnitts (=Verteilungsbild).

Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines VG-Systems Scientific SIMSLAB 410 (Vacuum Generators, England), das mit einem Quadrupol Massenspektrometer ausgerüstet ist. Als Primärionenquelle diente eine Gallium Kanone (25 LMIG, Ionoptika, England) bei 20 kV Beschleunigungsspannung und einem Emissionsstrom von 3,6 μA . Die Verteilungsbilder wurden mit Hilfe der Eclipse 2.0 Software aufgenommen. Alle SIMS Messungen wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Schröder im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

Die Isotopenverteilung wurde in Falschfarben dargestellt, wobei die verwendete Farbpalette (Fire Two, NIH) den Bildpunkten mit hoher Sekundärionenausbeute helle Farben und Bildpunkten mit niedriger Sekundärionenausbeute dunkle Farben zuwies. Die notwendige Meßdauer betrug 3-5 min für ein Verteilungsbild von Isotopen mit hoher Konzentration ($^{39}\text{K}^+$, $^{85}\text{Rb}^+$). Die Meßzeiten konnten bis zu 60 min betragen, wenn z.B. Isotope mit niedrigen Konzentrationen untersucht wurden ($^{40}\text{Ca}^{2+}$, $^{24}\text{Mg}^{2+}$). Die Meßdauer war zusätzlich von der gewählten Bildauflösung abhängig, d.h. sie war größer bei hoher bzw. niedriger bei geringer lateraler Auflösung.

Die Auswertung der Isotopenbilder von $^{41}\text{K}^+$, ^{44}Ca und ^{26}Mg geschah durch verrechnen der Verteilungen von zwei Isotopen desselben Elementes. Dies war notwendig, um den natürlichen Anteil des seltenen Isotops in der Probe (z.B. ~7% des natürlichen Kalium' ist $^{41}\text{K}^+$, vergl. Tab. 11, Anhang) von dem durch die Tracerlösung hinzugekommenen zu unterscheiden. Dabei muß sowohl der im natürlichen Isotopengemisch vorhandene Anteil des seltenen Isotops berücksichtigt werden, als auch der Anteil des in der Tracer-Lösung vorhandenen, häufigen Isotops (Fain und Schröder, 1987). Ein Netto-Verteilungsbild für das seltene Isotop ergibt sich, wenn von der Intensität eines jeden Bildpunkts des Brutto-Bildes, die errechnete, auf die natürliche Häufigkeit des Isotops zurückzuführende, Intensität abgezogen wird.

Die Auswertung der Intensitäten in den einzelnen Bildpunkten geschah mit dem Programm NIH Image (Version Beta 3b) für PC. Dabei wurden in einem Verteilungsbild Bereiche ausgewählt (z.B. Zellwand, Interzellulare) und die mittleren Intensitäten der Bildpunkte in diesen Bereichen ermittelt (Abb. 3.23 C/D). Für Rubidium wurden diese Intensitäten zur mittleren Intensität in der Inkubationslösung (bekannter Konzentration) in Beziehung gesetzt und dadurch die Konzentration abgeschätzt. Hierfür wurden ausschließlich Messungen in der Inkubationslösung verwendet, die zusammen mit den Meßflächen auf einem Bild dargestellt waren.

2.3.3.2.3 Atom Absorptions-Spektrometrie (AAS)

Die AAS beruht darauf, daß in Lösung befindliche Ionen bzw. Elemente durch thermische Anregung atomisiert werden und in diesem Zustand Licht charakteristischer Wellenlängen absorbieren. Das Licht charakteristischer Wellenlängen wird mittels einer Hohlkathodenlampe erzeugt und durch die in einer Acetylen-Flamme atomisierten Probe gestrahlt. In Abhängigkeit von der Elementkonzentration in der Probe wird das Licht unterschiedlich stark absorbiert.

Mit der AAS wurden die Rb^+ Konzentrationen in den Waschlösungen von den Versuchen aus Kap. 2.3.2 bestimmt. Die Messungen erfolgten an einem Atom-Absorptionsspektrometer (PU 9100x, Philips) mit der Flammen- (Kap. 2.3.2 Ganze Wurzeln) und der Graphitrohr-technik (Kap. 2.3.2 Einzelne Wurzelabschnitte).

Zur Quantifizierung wurden Standards benutzt, die wie die Waschlösungen CaSO_4 ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) enthielten. Um Interferenzen mit anderen Elementen zu vermindern enthielten sowohl die Standards als auch die Proben für die Messung mit dem Graphitrohr zusätzlich 0,1 % LaCl_3 als Matrixmodifier, (Welz, 1985). Für die Bestimmung der Rb^+ -Konzentration wurde die Emissions- bzw. Absorptionslinie von Rubidium bei 780,0 nm genutzt. Die Bestimmung mit der Flamme erfolgte mit Hilfe eines Luft/Acetylen Gemisches (Luft: $\sim 4,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, Acetylen $\sim 1,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Bestimmung mit dem Graphitrohr erfolgte durch manuelles Einspritzen von 20 μl der Probenlösung in das Graphitrohr. Von Jeder Lösung wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt und aus diesen der Mittelwert berechnet.

Tab. 4: *Trocknungs-, Veraschungs- und Atomisierungsprogramm, das für die Bestimmung von Rb^+ mit der Graphitrohr verwendet wurde.*

Phase	Temp [°C]	Zeit [s]	Anstieg [°C · s ⁻¹]	Vorgang
1	110	10	5	Trocknen
2	480	50	20	Veraschen
3	1400	3	0	Messen
4	1800	5	0	Ausheizen

Tab. 5: Benutzte Rb^+ -Konzentrationen der Standards für die AAS und eine exemplarische Kalibrierung.

Graphitrohr		Flamme	
Konz. [$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$]	Absorption	Konz. [$10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$]	Absorption
0	0,033	0	0,005
0,5	0,127	10	0,032
2	0,372	50	0,141
3	0,484	100	0,265
5	0,761	150	0,389
		200	0,530
r^2	0,9955		0,9996

2.3.3.2.4 Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (EELS) und Electron-Spectroscopic-Imaging (ESI)

Mit der EELS können Elemente in dünnen Gewebeschnitten im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Der Nachweis beruht auf dem charakteristischen Energieverlust eines eingestrahnten Elektrons durch die Interaktion mit den Elementen in der Probe. Damit ein Elektron jedoch nicht mit mehreren Atomen in einer Probe nacheinander in Wechselwirkung tritt, sollte die Probe ein extrem dünner Schnitt sein (30-70 nm). Wegen der geringen Dicke und aufgrund der Tatsache, daß der Elektronenstrahl auf sehr kleine Areale fokussiert werden kann, wird eine hohe räumliche Auflösung dieser Meßtechnik erzielt. Eine Messung liefert als Ergebnis zunächst ein Elektronen-Energie-Verlust-Spektrum im bestrahlten Areal (EELS). Für den spezifischen Elementnachweis muß das Spektrum noch um den unspezifischen Hintergrund korrigiert werden. Als Hintergrund gilt dabei der Energieverlust von Werten kleiner als der für Rb^+ spezifische Energieverlust. Von einem Spektrum wird deshalb ein konstanter Wert abgezogen, der aus dem Bereich des Energieverlustes von $\Delta E = 1770-1820 \text{ eV}$ als Mittelwert berechnet wird.

Um ein Elementverteilungsbild (ESI) zu erhalten, ist es nötig zwei Bilder miteinander zu verrechnen. Von dem Rb^+ Verteilungsbild des charakteristischen Energieverlusts bei $\Delta E = 1820 \text{ eV}$ wird das Verteilungsbild bei einem unspezifischen Energieverlust ($\Delta E = 1700 \text{ eV}$) abgezogen. Das Ergebnis ist ein Netto-Verteilungsbild von Rb^+ in der abgebildeten Fläche.

Von gefriersubstituierten Wurzeln, die mit Rb^+ inkubiert worden waren, wurden am Mikrotom (Reichert, OM-U2) ultradünne Schnitte (50 nm) hergestellt. Der Trog des Diamantmessers wurde zum Abschwimmen der Schnitte bei einer Serie mit destilliertem Wasser und bei einer

weiteren Serie von demselben Präparat mit einer $120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl bzw. einer $240 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ KCl Lösung gefüllt.

Außerdem wurden mit dieser Technik gefriergetrocknete Kryoschnitte von Standards, das waren 50 nm dicke Schnitte durch Dextran infiltrierte Wurzelsegmente (Kap. 2.3.3.2.1), untersucht. Es wurden Standards verwendet, weil sich von diesen die besten und dünnsten Kryoschnitte anfertigen ließen.

Die Aufnahme der Rb^+ Spektren erfolgte in einem Zeiss EM 902 bei einer Beschleunigungsspannung von 81,77 bis 81,87 kV, wobei die charakteristische Energie der L_3 Schale des Rb^+ bei $\Delta E = 1820 \text{ eV}$ zum Nachweis benutzt wurde.

2.4 Statistik

Die **Standardabweichung** (s) ist ein Maß dafür, wie stark die einzelnen Meßwerte paralleler Meßreihen, vom arithmetischen Mittelwert aller Meßwerte abweichen. Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

n : Anzahl der Meßwerte
 \bar{x} : arithmetischer Mittelwert
 x_i : i - ter Meßwert

Mit Hilfe der **Regressionsanalyse** ist es möglich, eine Ausgleichskurve durch eine Punktwolke zu berechnen. Dabei wird die Kurve so berechnet, daß die Abweichung der einzelnen Meßwerte zum rechnerischen Wert auf der Kurve minimal ist. Bei einer linearen Regression wird die Kurve nach der Formel $y = ax + b$ einer Geraden angepaßt, wobei a die Steigung der Geraden und b der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse ist. Als Maß dafür wie stark die Meßwerte insgesamt um die Gerade streuen, bzw. wie eng die Abhängigkeit zwischen den x- und y-Werten ist, wird der Korrelationskoeffizient (r^2) berechnet. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei sich der Wert des Korrelationskoeffizienten 1 nähert, je enger die Abhängigkeit zwischen x- und y-Werten ist.

Eine Aussage darüber, ob die Mittelwerte zweier normalverteilter Stichproben verschieden oder gleich sind (d.h. die Stichproben sind zwei verschiedenen oder ein und derselben Grundgesamtheit entnommen), läßt sich durch die Anwendung von statistischen Testverfahren wie dem **t-Test** treffen. Dazu wird die Prüfgröße t, bei unabhängigen Stichproben, aus dem Verhältnis der Differenz der Mittelwerte zum mittleren Fehler der durchschnittlichen Differenz berechnet (Harms, 1988).

Ist $t \geq t_{f,\alpha}$ für $f = n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgrade zum Signifikanzniveau α , so sind die Mittelwerte beider Stichproben verschieden; die Hypothese H_1 wird angenommen, die Nullhypothese H_0 (die Mittelwerte beider Stichproben sind gleich) wird verworfen.

$$t = \frac{|\bar{d}|}{s_{\bar{d}}} = \frac{\text{Differenz der Mittelwerte}}{\text{mittlerer Fehler der durchschnittlichen Differenz}}$$

Für alle statistischen Berechnungen wurden die entsprechenden Funktionen von Microsoft Excel 97 verwendet:

	Funktion in MS Excel 97
Standardabweichung	STABW
Lineare Regression	RGP
t-Test für unabhängige Stichproben	TTEST

3 Ergebnisse

3.1 Pflanzenwachstum

Die Verläufe der Sproß- und Wurzel Trockengewichte während der Kulturdauer sind in Abb. 3.1 dargestellt. Sie zeigen eine gleichmäßige Zunahme der Trockenmasse sowohl für die Wurzeln als auch für die Sprosse. Nach 10 Tagen ergibt das Sproß zu Wurzel Verhältnis einen in etwa gleichbleibenden Wert zwischen 2,4 und 2,8 (Tab. 6).

Die Gesamtlängen der Hauptachsen aller Wurzeln einer Pflanze steigen ebenso wie die Trockenmassen gleichmäßig mit fortschreitender Kulturdauer an und erreichen nach 17 Tagen Kulturdauer bereits eine Länge von ~2,6 m pro Pflanze (Tab. 6). Die Bildung von Nodalwurzeln beginnt etwa 14 Tage nach der Keimung. Nach 17 Tagen haben sie bereits einen Anteil an der gesamten Wurzellänge von 11 % erreicht bzw. einen Anteil an der gesamten Wurzelmasse von 13,5 %. Die Wassergehalte von Sprossen ($89,4 \pm 0,6$ %) und Wurzeln ($94,2 \pm 0,5$ %) unterscheiden sich nur geringfügig und verändern sich ab dem siebten Tag nach der Keimung abgesehen von geringen Schwankungen während der Kultur nicht mehr (Tab. 6). Der prozentuale Anteil der Karyopse an der Gesamttrockenmasse einer Pflanze sinkt von anfangs annähernd 100% auf 10% nach 14 Tagen ab (Tab. 6). Zu diesem Zeitpunkt wird die leere Karyopse von der Pflanze entfernt.

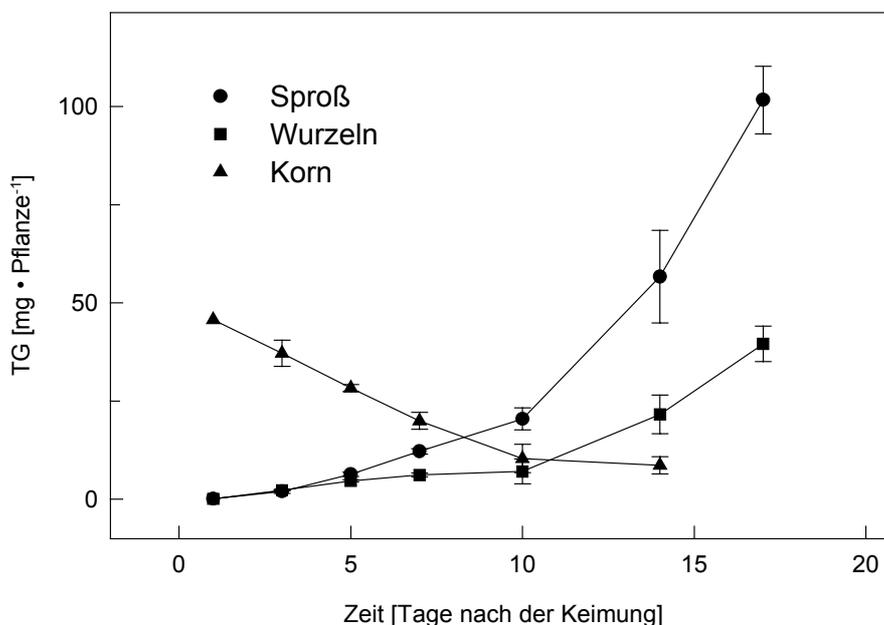


Abb. 3.1: Sproß, Wurzel und Korn Trockengewichte [$\text{mg} \cdot \text{Pflanze}^{-1}$] in Abhängigkeit von der Zeit nach der Keimung. Vertikale Balken = Standardabweichung ($n = 5$).

Tab. 6: Wassergehalte, Trockenmassen, Sproß zu Wurzel Verhältnis (S/W) und Gesamtlängen aller Wurzeln zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Keimung. n.b.: nicht bestimmt.

Tage	Wassergehalte [%]		Trockenmasse [mg • Pflanze ⁻¹]					Gesamtlängen aller Wurzeln [mm • Pflanze ⁻¹]			
	Sproß	Wurzel	Wurzeln gesamt	Nodal- wurzeln	%	S/W	Korn %	Gesamt	Nodal	%	
1	92,2		0,1				99,7				
3	93,0	93,2	2,3			0,8	89,6	149,8 ± 35,9			
5	91,1	93,6	4,7			1,4	71,8	270,7 ± 50,8			
7	89,0	94,1	6,2			2,0	52,1	307,5 ± 52,6			
10	89,3	94,2	8,5			2,4	26,4	606,6 ± 95,1			
14	89,7	94,0	21,6	n.b.	n.b.	2,6	10,0	1342,4 ± 232,9	101,3 ± 37,8	7,5	
17	89,8	94,6	39,6	5,3	13,5	2,6		2650,0 ± 158,6	300,0 ± 76,9	11,3	
21	90,8	94,5	58,0	9,1	15,6	2,8		3525,4 ± 343,2	430,8 ± 147,9	12,2	
MW ₇₋₂₁	89,7	94,3									

3.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Histochemie von Gerstenwurzeln

3.2.1 Caspary-Steifen in Endo- und Exodermis

Die Kombination der Färbungen mit Berberinsulfat und Anilinblau bewirkt im lichtmikroskopischen Bild quergeschnittener Gerstenwurzeln eine helle, grünliche Fluoreszenz in den Radialwänden der Exodermis, der Endodermis und in den Zellwänden der Xylemelemente (Abb. 3.2 A-C). In den Zellwänden der Rindenzellen erkennt man nur eine äußerst schwache Fluoreszenz.

Die Radialwände der Exodermis fluoreszieren jedoch nicht in allen untersuchten Wurzelsegmenten. Waren die Wurzeln z.B. während des Wachstums permanent in die Nährlösung eingetaucht, so findet man ca. 6-8 cm hinter der Wurzelspitze noch keine fluoreszierende Exodermis (Abb. 3.2 B). In vergleichbaren Wurzelabschnitten, welche in der relativ feuchten Atmosphäre zwischen der Nährlösungsoberfläche und dem Deckel des Kulturgefäßes gewachsen waren, ist dagegen eine voll ausdifferenzierte Exodermis zu sehen (Abb. 3.2 A).

Neben diesen beiden Zuständen der Exodermis lassen sich auch Übergänge beobachten. Dabei fluoreszieren nur einige der radialen Exodermiszellwände und bilden keinen geschlossenen Ring in der Wurzelperipherie (Abb. 3.2 C).

Der Vergleich mit ungefärbten Querschnitten (Autofluoreszenz) zeigt, daß hier nahezu alle Zellwände einer Gerstenwurzel fluoreszieren (Abb. 3.2 D). Dabei sind besonders hohe Intensitäten im Bereich der Rhizodermis, der Exodermis und des Zentralzylinders zu beobachten (Abb. 3.2 D). Außerdem ist der Farbton der Autofluoreszenz verglichen mit der Fluoreszenz

nach der Färbung mit Berberinsulfat und Anilinblau zu größeren Wellenlängen, d.h. in Richtung gelb verschoben.

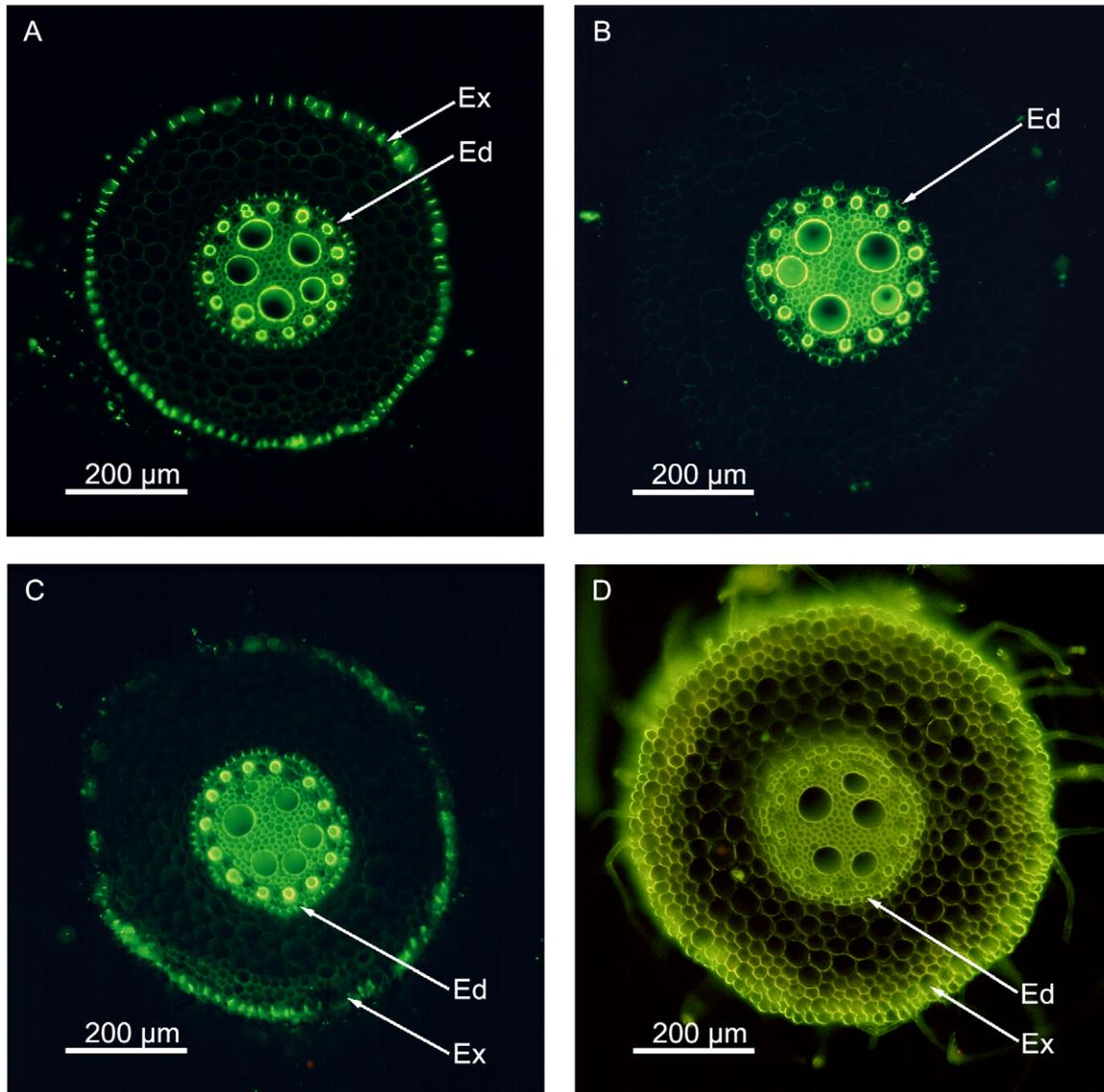


Abb. 3.2: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen (Auflichtfluoreszenz) von Gerstenwurzelquerschnitten (Nodalwurzeln, ca. 6-8 cm h.Wsp.). Anregungswellenlängen von 450-490 nm. Die Schnitte in A bis C wurden vor dem Mikroskopieren mit Berberinsulfat/Anilinblau gefärbt (Kap. 2.2.1).

- A: Querschnitt durch einen Wurzelabschnitt aus der 'feuchten Kammer' zwischen Nährlösungsoberfläche und Deckel des Kulturgefäßes mit ausdifferenzierter Exodermis.
 B: Querschnitt durch einen Wurzelabschnitt aus der Nährlösung ohne Exodermis.
 C: Querschnitt durch einen basalen Wurzelabschnitt mit teilweise ausdifferenzierter Exodermis.
 D: Querschnitt durch einen basalen Wurzelabschnitt, der nicht mit Berberinsulfat/Anilinblau vorbehandelt wurde (Autofluoreszenz).
 Ed: Endodermis Ex: Exodermis

Die Detailaufnahmen in Abb. 3.3 A und B zeigen eine grünliche Fluoreszenz in den Radialwänden von Endo- und Exodermis. In der Endodermis sind an den Orten der hellen Fluoreszenz die Caspary-Streifen (CS) lokalisiert (Abb. 3.3 B). Aufgrund der gleichen Färbung in den radialen Zellwänden der Exodermis (Abb. 3.3 A) werden hier Strukturen vermutet, die den Caspary-Streifen ähnlich sind.

An die Exodermis anschließend sind die Zellen der Rinde (R) mit verdickten Zellwänden zu erkennen (Abb. 3.3 A). Die fluoreszierenden Zellwandabschnitte der Exodermis erscheinen hierzu vergleichsweise dünn. Von der Endodermis in radialer Richtung nach innen folgen die Zellen des Zentralzylinders von denen die Metaxylemelemente besonders hell fluoreszieren (Mx Abb. 3.3 B). Die Autofluoreszenz in den äußeren Zellschichten der Gerstenwurzel zeigt, daß sämtliche Zellwände von Rhizo- und Exodermis hell fluoreszieren (Abb. 3.3 C). Eine deutlich geringere Fluoreszenz findet man in den Zellwänden der äußeren Rindenzellschichten.

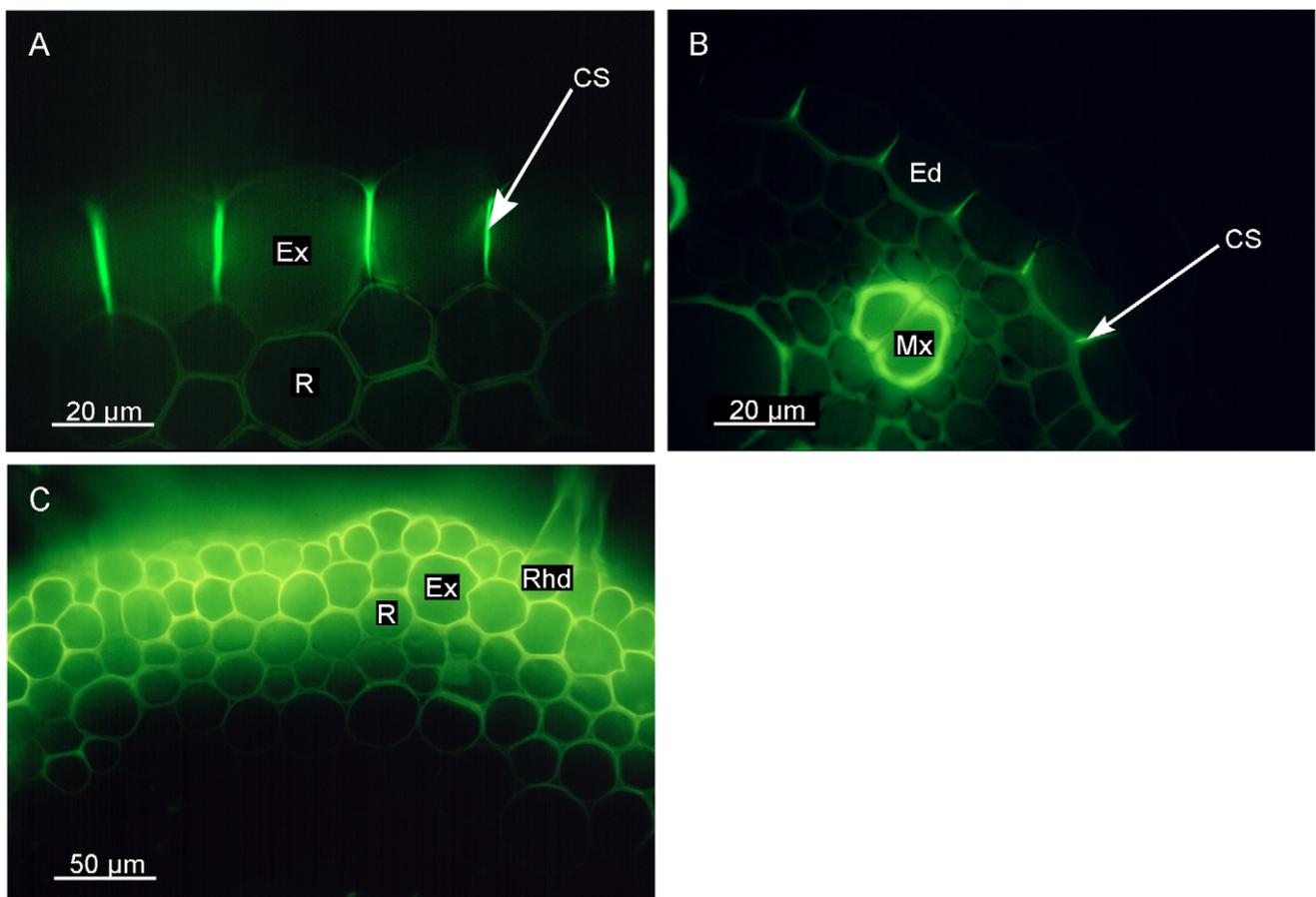


Abb. 3.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Auflichtfluoreszenz) von Gerstenwurzelquerschnitten. Anregungswellenlängen von 450-490 nm. Die Schnitte in A und B wurden mit Berberinsulfat/Anilinblau gefärbt (Kap. 2.2.1).

A: Äußeren Abschlußgewebe einer Nodalwurzel (ca. 6-8 cm h.Wsp.). Die radialen Wände der Exodermis fluoreszieren grün und zeigen die Präsenz von Caspary-Streifen an.

B: Innere Abschlußgewebe der Rinde einer Nodalwurzel und Ausschnitt aus dem Zentralzylinder (ca. 6-8 cm h.Wsp.). In den radialen Zellwänden der Endodermis fluoreszieren die Bereiche der Caspary-Streifen grün.

C: Autofluoreszenz im äußeren Rindenbereich einer Nodalwurzel >10 cm h.Wsp..

CS: Caspary-Streifen Ed: Endodermis Ex: Exodermis R: Rinde
Rhd: Rhizodermis Mx: Metaxylem.

3.2.2 Nachweis von Suberin und Lignin in Endo- und Exodermis

Durch Sudan III werden lipophile Substanzen wie z.B. Suberin und Cutin rot angefärbt. Danach kann Suberin sowohl in den Radial- als auch in den Tangentialwänden der Exodermis nachgewiesen werden (Abb. 3.4 A). Die Endodermis weist ebenfalls in allen Wänden eine Suberinlamelle auf (Abb. 3.4 B). Weiterhin ist in den Zellwänden der späten Metaxylemgefäßen im Bereich der Mittellamelle eine leichte Rotfärbung zu erkennen. In den Zellwänden der Rinde und der Rhizodermis ist kein Suberinnachweis zu beobachten.

Durch die Färbung mit Phloroglucin und anschließender Salzsäurebehandlung erscheinen verholzte Zellwände im lichtmikroskopischen Bild dunkelrot. Aus Abb. 3.5 A geht hervor, daß in basalen Abschnitten von Keimlingswurzeln nur die Zellen des Zentralzylinders und der Endodermis verholzt sind. Im Gegensatz dazu kommt es bei fortgeschrittener Differenzierung der Wurzel auch zur Verholzung der Exodermis- und der darunterliegenden Rindenzellwände (Abb. 3.5 B). Dabei sind die Zellwände der Exodermis im Vergleich mit den verholzten Rindenzellwänden weniger stark verdickt, weisen jedoch eine intensivere Rotfärbung auf. Die Endodermis befindet sich im tertiären Zustand und ist mit Ausnahme der deutlich sichtbaren Durchlaßzellen ebenfalls leicht verholzt.

Die intensivste Rotfärbung zeigen in den basalen Wurzelabschnitten die Metaxylemgefäße des Zentralzylinders (Mx in Abb. 3.5 B).

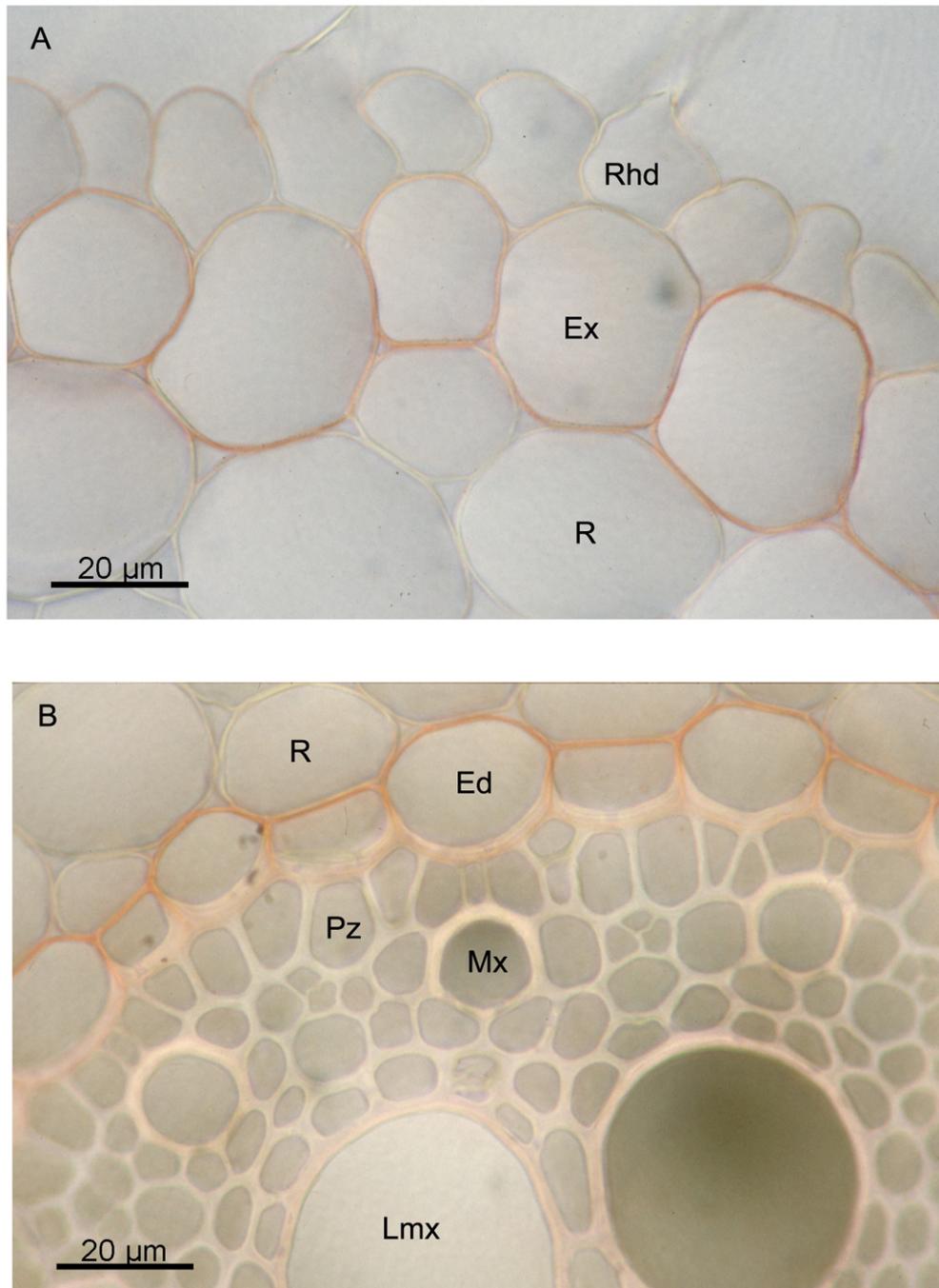


Abb. 3.4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch Gerstenwurzeln mit histochemischer Lokalisation des Suberins durch Sudan III Färbung.

A: Ausschnittsvergrößerung mit den äußeren Geweben der Wurzelrinde ca. 4-5 cm h. Wsp.. Suberin läßt sich in allen Zellwänden der Exodermis nachweisen.

B: Ausschnittsvergrößerung der inneren Wurzelrinde mit Zentralzylinder. In den Wänden der Endodermis und weniger deutlich in den Xylemelementen des Zentralzylinders kann Suberin anhand der Rotfärbung nachgewiesen werden.

Ed: Endodermis Ex: Exodermis R: Rinde
 Rhd: Rhizodermis Mx: Metaxylem Pz: Perizykel
 Lmx: Spätes Metaxylem.

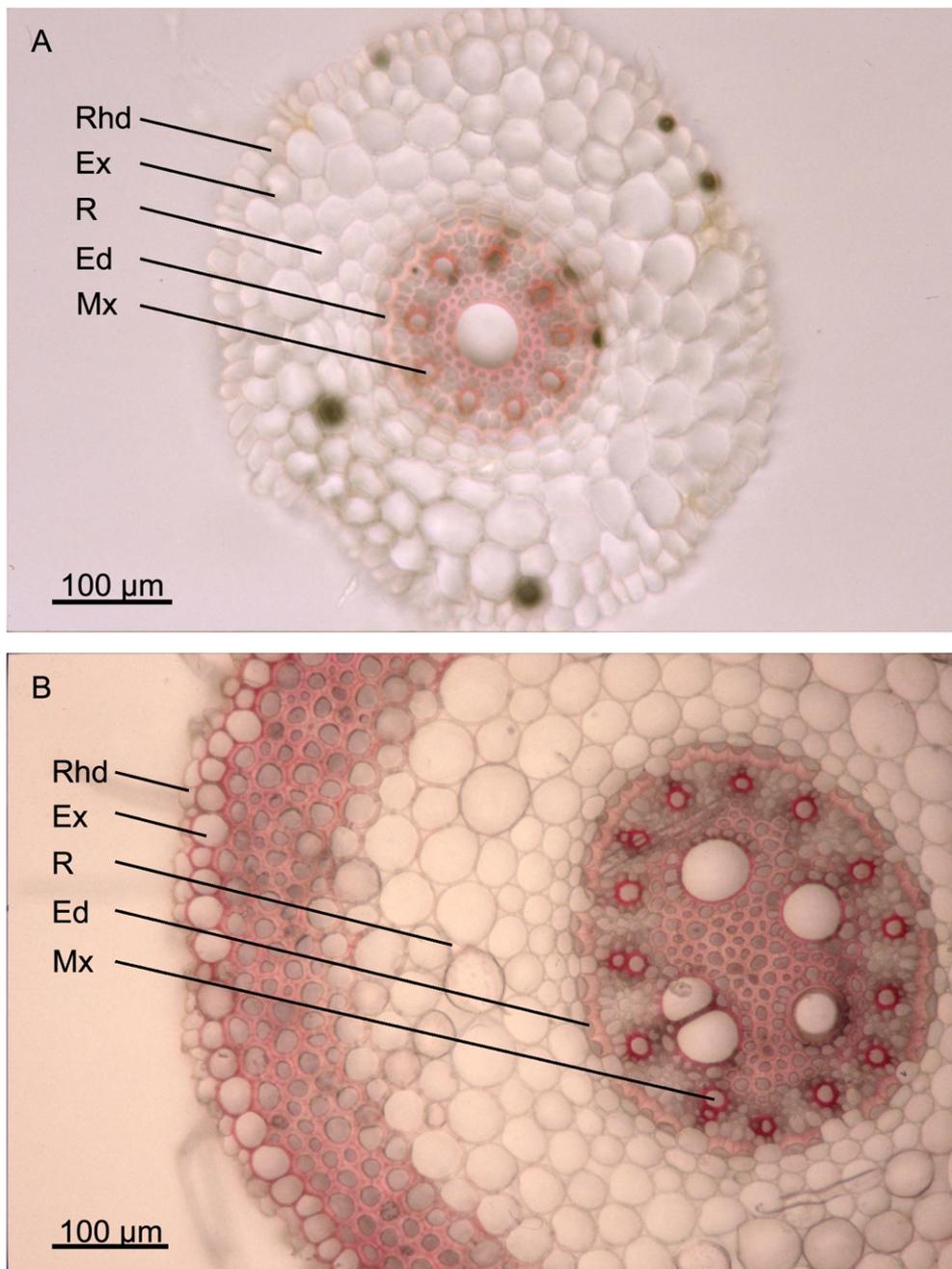


Abb. 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch Gerstenwurzeln mit histochemischer Lokalisation des des Lignins durch Phloroglucin/HCl Färbung.

A: Quergeschnittene Keimlingswurzel (nur 1 Zentrales Gefäß) mit den leicht verholzten Zellwänden (rosa) der tertiären Endodermis und der Xylemelemente des Zentralzylinders. Die Wände der großlumigen Metaxylemgefäße zeigen die stärksten Lignineinlagerungen (rot).

B: Quergeschnittene Nodalwurzel (mit mehreren späten Metaxylemgefäßen) mit intensiv rot gefärbten Metaxylemgefäßen, die auf eine starke Verholzung hindeuten. Die dickwandigen Zellen im zentralen Bereich des Zentralzylinders sowie die Zellwände der tertiären Endodermis und des äußeren Rindengewebes zeigen nur eine schwache Rotfärbung, ein Hinweis darauf, daß die Wände dieser Zellen deutlich weniger Lignin als die Gefäße enthalten.

Ed: Endodermis Ex: Exodermis R: Rinde
 Rhd: Rhizodermis Mx: Metaxylem.

3.3 Die Zugänglichkeit des Apoplasten für Evans Blue

Werden intakte Nodalwurzeln von Gerstenpflanzen für 1 h mit Evans Blue inkubiert, so konzentriert sich der rot fluoreszierende Farbstoff im Bereich der Wurzelspitze hauptsächlich an der Wurzeloberfläche (Abb. 3.6 A). In der Rinde ist ein Gradient abnehmender Fluoreszenzintensität von der Wurzeloberfläche zur inneren Rinde feststellbar. Im zentralen Teil des Wurzelquerschnitts ca. 150 μm unterhalb der Oberfläche ist keine Fluoreszenz mehr zu erkennen. Wurde die Wurzel vor der Evans Blue Inkubation osmotisch mit NaCl geschockt, findet man den Farbstoff auf dem gesamten Querschnitt verteilt (Abb. 3.6 B). Dabei fällt auf, daß die Rhizodermis weniger fluoresziert, als die übrigen Gewebe. Evans Blue markiert den Apoplasten und dringt deshalb bei plasmolysierten Zellen auch in den periplasmatischen Raum zwischen Zellwand und Plasmalemma ein. Da die äußeren Zellen sehr plasmareich sind erscheint dieser Zellverband weniger stark gefärbt als die übrigen, stärker vakuolisierten Zellen.

Bei den korrespondierenden Hellfeldbildern zu den handgefertigten Wurzelquerschnitten zeigen die Kontrollen eine Blaufärbung ausschließlich in der Mucilage, d.h an der Wurzeloberfläche (Mu in Abb. 3.6 C). Die Schnitte durch osmotisch geschockte Wurzeln zeigen im Hellfeldbild eine Blaufärbung sowohl der Mucilage als auch der Rhizodermis, wobei in der Rhizodermis die Zellkerne deutlich hervortreten (Abb. 3.6 D). In den Fluoreszenzbildern der Handschnitte (Abb. 3.6 A, B) kann Evans Blue im allgemeinen tiefer in der Wurzelrinde nachgewiesen werden als in den korrespondierenden Hellfeld Bildern (Abb. 3.6 C, D). Man kann daraus schließen, daß der Nachweis von Evans Blue in "fluoreszierendem Licht" deutlich empfindlicher als im Hellfeld ist.

Bei Verwendung von ca. 20 μm dicken Gefrierschnitten ist das Ergebnis deutlicher und zeigt außerdem geringe Abweichungen zu den Ergebnissen der Handschnitte. In den Querschnitten von Kontrollen ist die rote Fluoreszenz hauptsächlich in der an der Wurzeloberfläche anhaftenden Mucilage konzentriert und mit deutlich geringerer Intensität auch in der Rhizodermis (Abb. 3.6 E). In den sonst in Abb. 3.6 A markierten Bereichen findet man keine rote Fluoreszenz (Abb. 3.6 E).

Das Fluoreszenzbild eines Gefrierschnittes von einer osmotisch geschockten Wurzel zeigt, daß Evans Blue lediglich ein bis zwei Zellschichten tief in die Rinde eingedrungen ist (Abb. 3.6 F). Auffällig ist in Abb. 3.6 F auch, daß vorwiegend die Zellwände mit dem Farbstoff markiert sind und nicht wie in Abb. 3.6 B gezeigt, sich Evans Blue über die ganze Zelle verteilt.

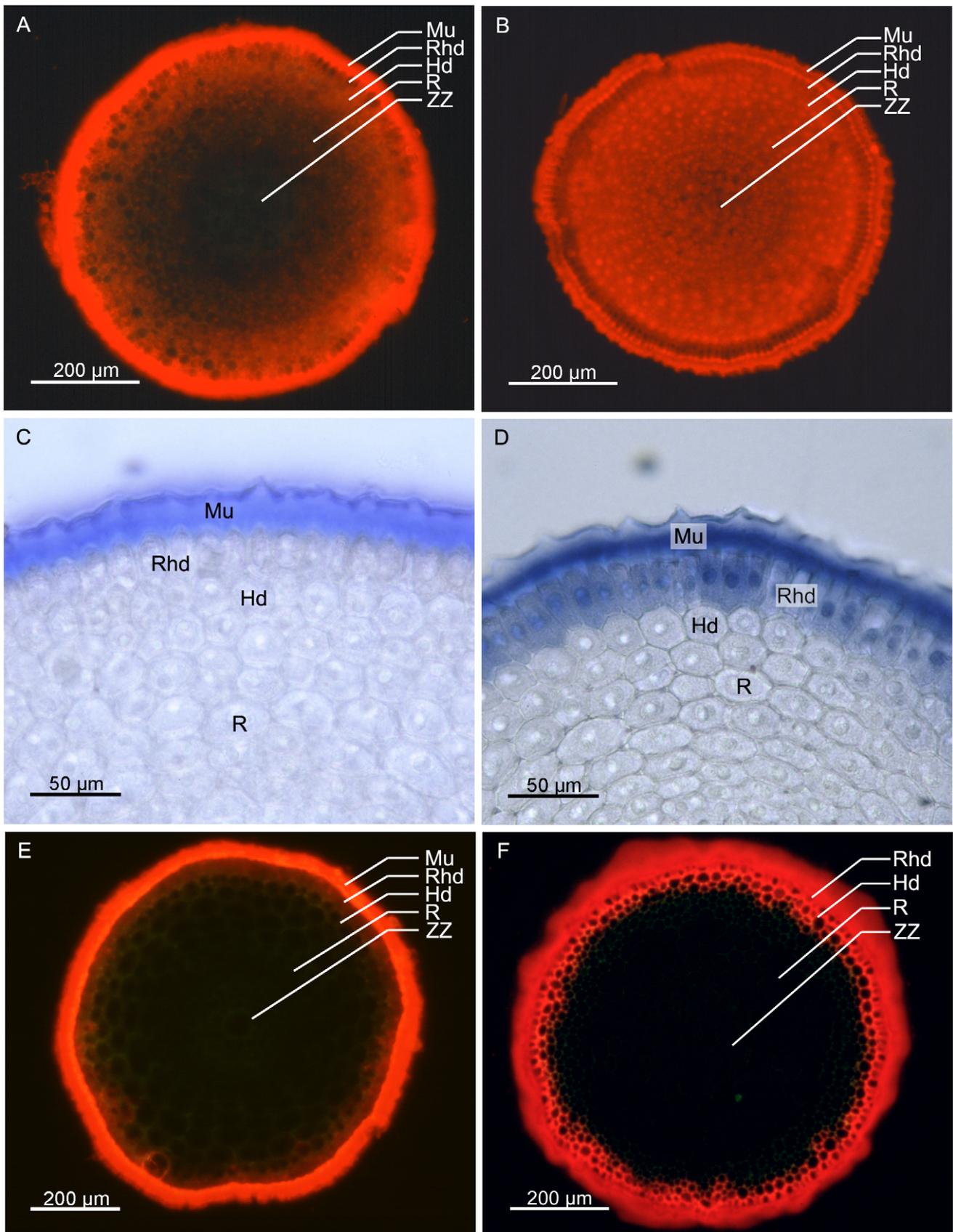


Abb. 3.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch die **Wurzelspitze** (ca. 1 mm h.Wsp.). Die Gerstenwurzeln wurden vor dem Schneiden mit Evans Blue inkubiert (Kap. 2.3.1). Bei A-D handelt es sich um Handschnitte durch lebende Wurzeln, bei E-F handelt es sich um Kryostatschnitte durch gefrorene Wurzeln.

A, C, E: Kontrollen

B, D, F: Inkubation mit $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ NaCl}$ zusammen mit Evans Blue (Kap. 2.3.1).

Mu: Mucilage Rhd: Rhizodermis Hd: Hypodermis R: Rinde

ZZ: Zentralzylinder

In Hand- und Gefrierschnitten von basalen Wurzelsegmenten ist nach 1 Stunde Inkubation mit Evans Blue bevorzugt in der Rhizodermis und in den äußeren Tangentialwänden der Exodermis eine rote Markierung festzustellen (Abb. 3.7 A, B). Zusätzlich lassen die handgefertigten Querschnitte eine rote Fluoreszenz in den späten Metaxylem Gefäßen des Zentralzylinders erkennen (Abb. 3.7 A). Diese fehlt bei Kryostatschnitten, wobei hier wiederum einzelne rote 'Flecken' in der Rinde zu finden sind (Abb. 3.7 B). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Zellfragmente, die beim Schneiden entstanden sind und über die Probenfläche mit dem Messer verteilt wurden.

Dieser Befund ändert sich für die basalen Wurzelabschnitte auch nicht bei osmotisch

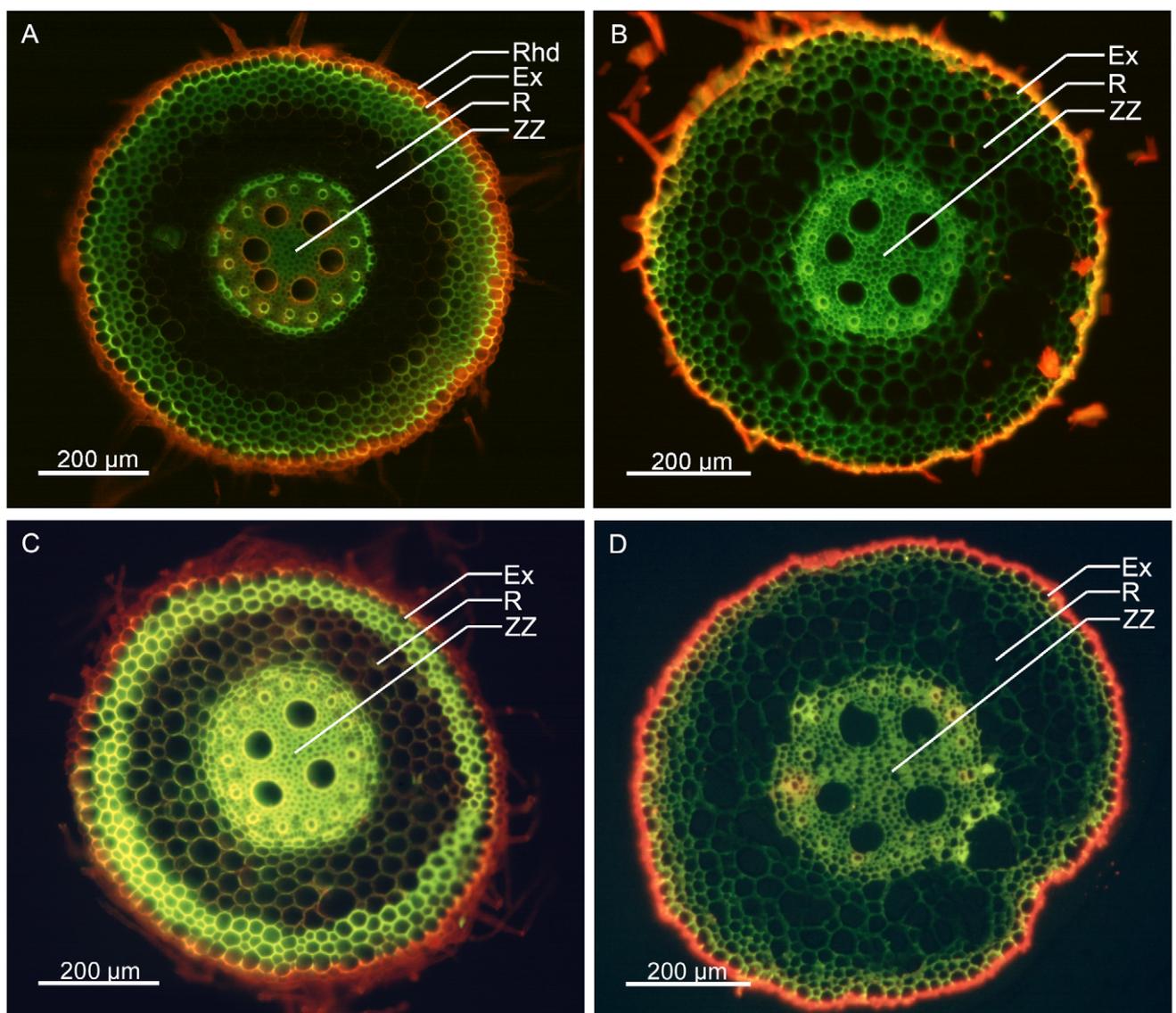


Abb. 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch die **Basis von Nodalwurzeln**. Die Wurzeln wurden vor dem Schneiden für 1 h mit Evans Blue inkubiert (Kap. 2.3.1). Bei A u. C handelt es sich um handgefertigte Querschnitte, bei B u. D handelt es sich um Kryostatschnitte.

A, B: Kontrollen

C, D: Inkubation mit $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ NaCl}$ zusammen mit Evans Blue (Kap. 2.3.1).

Ex: Exodermis Rhd: Rhizodermis R: Rinde

ZZ: Zentralzylinder

geschockten Wurzeln (Abb. 3.7 C, D). Hier findet man wie bei den Kontrollen den rot fluoreszierenden Farbstoff sowohl im Handschnitt als auch im Gefrierschnitt an der Wurzeloberfläche lokalisiert. Evans Blue ist danach höchstens bis in die radialen Zellwände der Exodermis vorgedrungen (Abb. 3.7 C, D).

3.4 Bestimmung der Halbwertszeiten für das Auswaschen von Rb^+ nach zweiminütiger Inkubation

Die Rb^+ Konzentrationen, die aus den mit $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ $RbCl$ inkubierten Wurzeln ausgewaschen wurden, ergaben bei Auftragung gegen die Zeit eine zu Beginn stark abfallende Kurve, die sich dann asymptotisch einer sehr niedrigen Konzentration nahe der Nachweisbarkeit nähert (Abb. 3.8 A). Trägt man die Konzentrationen kumulativ gegen die Zeit auf ergibt sich dadurch eine hyperbolische Sättigungskurve (Abb. 3.8 B), aus der durch Umwandlung in ein Lineweaver-Burk-Diagramm die Halbwertszeit für die Rb^+ Auswaschung aus den Wurzeln berechnet werden kann (Abb. 3.8 C).

Die mittleren Halbwertszeiten ($t/2$) bei den für 2 min inkubierten Wurzeln liegen zwischen 24 s für Keimlingswurzeln und 44 s für Nodalwurzeln (Tab. 7). Aus Tab. 7 und Abb. 3.8 geht weiterhin hervor, daß es zwischen Nodal- und Keimlingswurzeln grundsätzlich einen Unterschied in den Halbwertszeiten gibt. Die Halbwertszeit für die Nodalwurzeln ist sowohl bei der Bestimmung an intakten Wurzeln, als auch an einzelnen Wurzelsegmenten größer als für die Keimlingswurzeln (Tab. 7, Abb. 3.8C). Während die mittleren Halbwertszeiten für die Keimlingswurzeln bei den Messungen an ganzen Wurzeln und Wurzelsegmenten gleich sind, ergibt sich für die Nodalwurzeln hingegen ein Unterschied zwischen Messungen an ganzen Wurzeln und Wurzelsegmenten (Tab. 7).

Tab. 7: Halbwertszeiten ($t/2$) für die Auswaschung von Rb^+ aus ganzen Wurzeln bzw. Wurzelsegmenten von Gerstenpflanzen nach 2 min Inkubation mit $RbCl$ ($60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$). Mittelwerte und Standardabweichungen aus n Versuchen. Unterschiedliche Symbole zeigen signifikant verschiedene Werte an (t -Test, $\alpha = 0,05$).

	ganze Wurzeln		Wurzelsegmente	
	$t/2$ [s]	n	$t/2$ [s]	n
Nodalwurzel	$30^{\#} \pm 6$	6	$44^{\$} \pm 15$	3
Keimlingswurzel	$24^* \pm 5$	10	$25^* \pm 8$	4

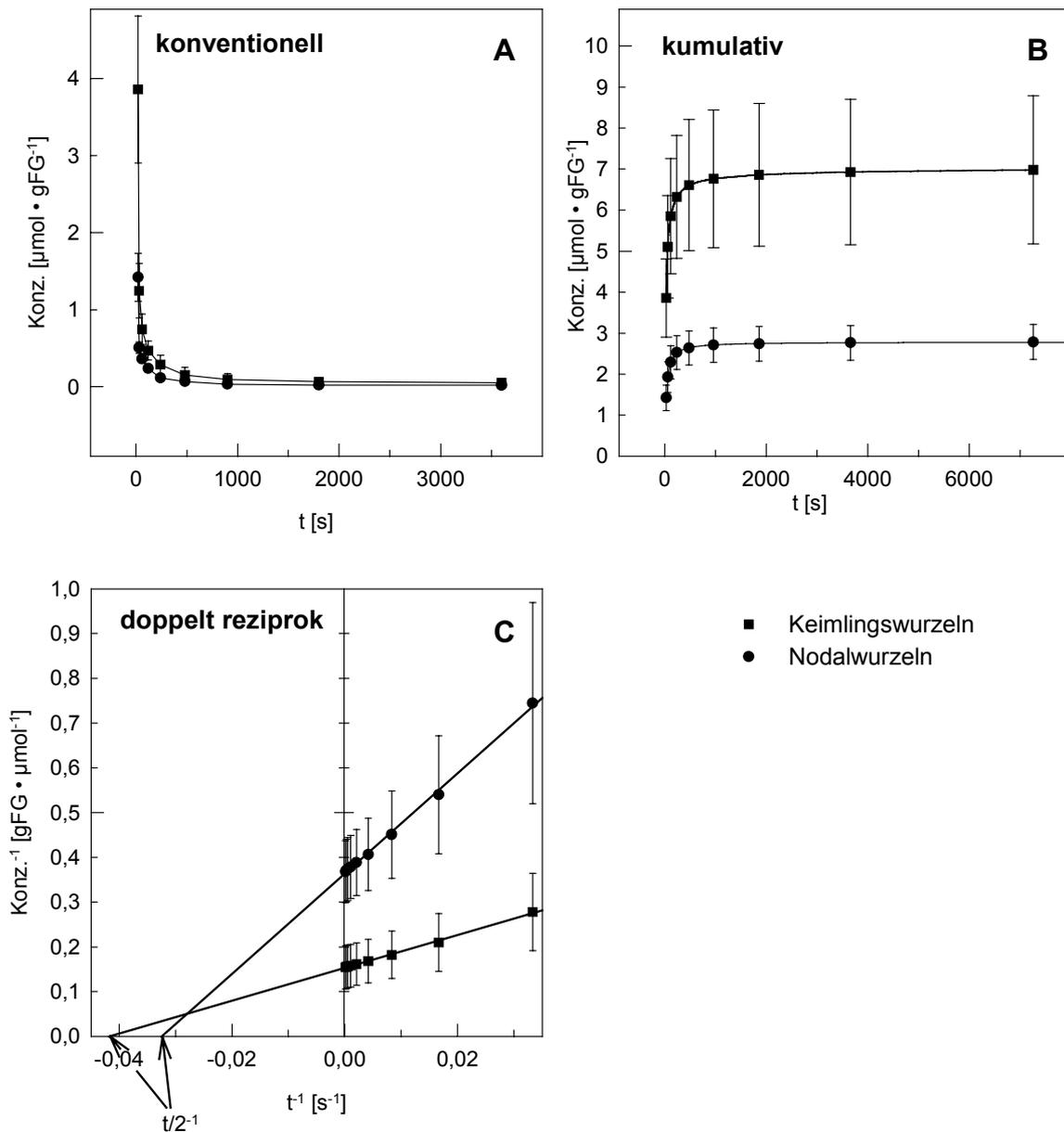


Abb. 3.8: Konventionelle (A), kumulative (B) und doppelt reziproke (C) Darstellung der Meßwerte aus den Auswaschversuchen von ganzen Wurzeln.

3.5 Die Zugänglichkeit des Apoplasten für anorganische Ionen

3.5.1 Erscheinungsbild der Kryoschnitte im REM

Kryoschnitte von Gerstenwurzeln, die in das Kryo-Raster-Elektronenmikroskop eingeschleust werden, können sowohl im gefroren-hydratisierten als auch im gefriergetrockneten Zustand untersucht werden. Im gefroren-hydratisierten Zustand befindet sich das in den Zellen vorhandene Wasser im kristallinen Zustand. Dementsprechend beherrschen diese kristallinen Strukturen auch das Erscheinungsbild der Schnitte im REM (Abb. 3.9 A, C, E). Ein genaues Unterscheiden zwischen apoplastischen und symplastischen Bereichen der Zellen d.h. zwischen Wand und Cytoplasma, aber auch eine klare Zuordnung einzelner Zellen zu den dazugehörigen Geweben erweist sich im hydratisiert-gefrorenen Zustand der Schnitte oft als äußerst schwierig. Durch kurzzeitiges Anheben der Temperatur des Probenstückes sublimiert das Eis langsam aus der Probe, wobei dieser Vorgang mit dem REM direkt beobachtet werden kann. Als Resultat ergeben sich teilweise (Abb. 3.9 D) oder komplett (Abb. 3.9 B, F) gefriergetrocknete Schnitte. In diesem Zustand ist eine Unterscheidung von einzelnen Zellwänden, Zellen und Geweben wesentlich erleichtert. Die Übersichtsaufnahmen in Abb. 3.9 (A, B) zeigen zwei Kryo-Schnitte sowohl im gefroren-hydratisierten Zustand (A) als auch im gefriergetrockneten Zustand (B). Die Form der Schnitte entspricht dem Viertel eines gesamten Wurzelquerschnitts und kommt durch das Trimmen der Wurzel von zwei Seiten bei der Probenvorbereitung zustande (vergl. Kap. 2.3.3.1.3). Dabei sind die Schnitte in Schnittrichtung gestaucht, weshalb sie die Form eines Viertel Ovals und nicht eines viertel Kreissektors (als idealisierte Form eines Wurzelquerschnitts) besitzen. Im gefriergetrockneten Zustand (Abb. 3.9 B) sind die kleinen, dickwandigen Zellen des Zentralzylinders, die großlumigen Zellen der Wurzelrinde und die Zellen der Rhizodermis zu erkennen. Durch den direkten Vergleich der Bilder von beiden Zuständen ist es möglich auch im gefroren-hydratisierten Zustand einzelne Zellen und deren Wände zu identifizieren. Dabei ist zu erkennen, daß der Inhalt einiger Zellen bei der Präparation der Schnitte komplett oder teilweise herausgefallen ist (Pfeil in Abb. 3.9 A). Besonders auffallend in Abb. 3.9 A und B sind die dunklen quadratischen Muster auf den Schnitten. Dabei handelt es sich um den Abdruck des EM Träger Netzes, das auf die Schnitte gedrückt wurde, um sie auf dem Halter zu fixieren (vergl. Kap. 2.3.3.1.3). Die Schnitte sind im Bereich des Abdruckes sehr glatt. An diesen Stellen sind im gefroren-hydratisierten so gut wie keine Zellstrukturen zu erkennen. Im gefriergetrockneten Zustand sind hingegen im Zentralzylinder zum Teil Zellwände erkennbar.

Auf den Detailaufnahmen aus der Region der Wurzeloberfläche lassen sich die Zellen der Rhizodermis, der Exodermis und der äußeren Rinde wiedererkennen (Abb. 3.9 C, D). Im hydratisierten Zustand sind in den Zellen zahlreiche Eiskristalle mit einer einheitlichen, hier vertikalen Orientierung auszumachen (Abb. 3.9 C). Diese Ausrichtung der Kristalle ist eine Folge des Schneidens, wobei das Eis "schuppenartig", d.h. parallel zur Messerkante, abbricht. Der gezeigte Schnitt war beim Vorbeiführen der Wurzel an der Messerkante im Mikrotom demnach um ca. 90° entgegen dem Uhrzeigersinn gedreht. Auf der Oberfläche des

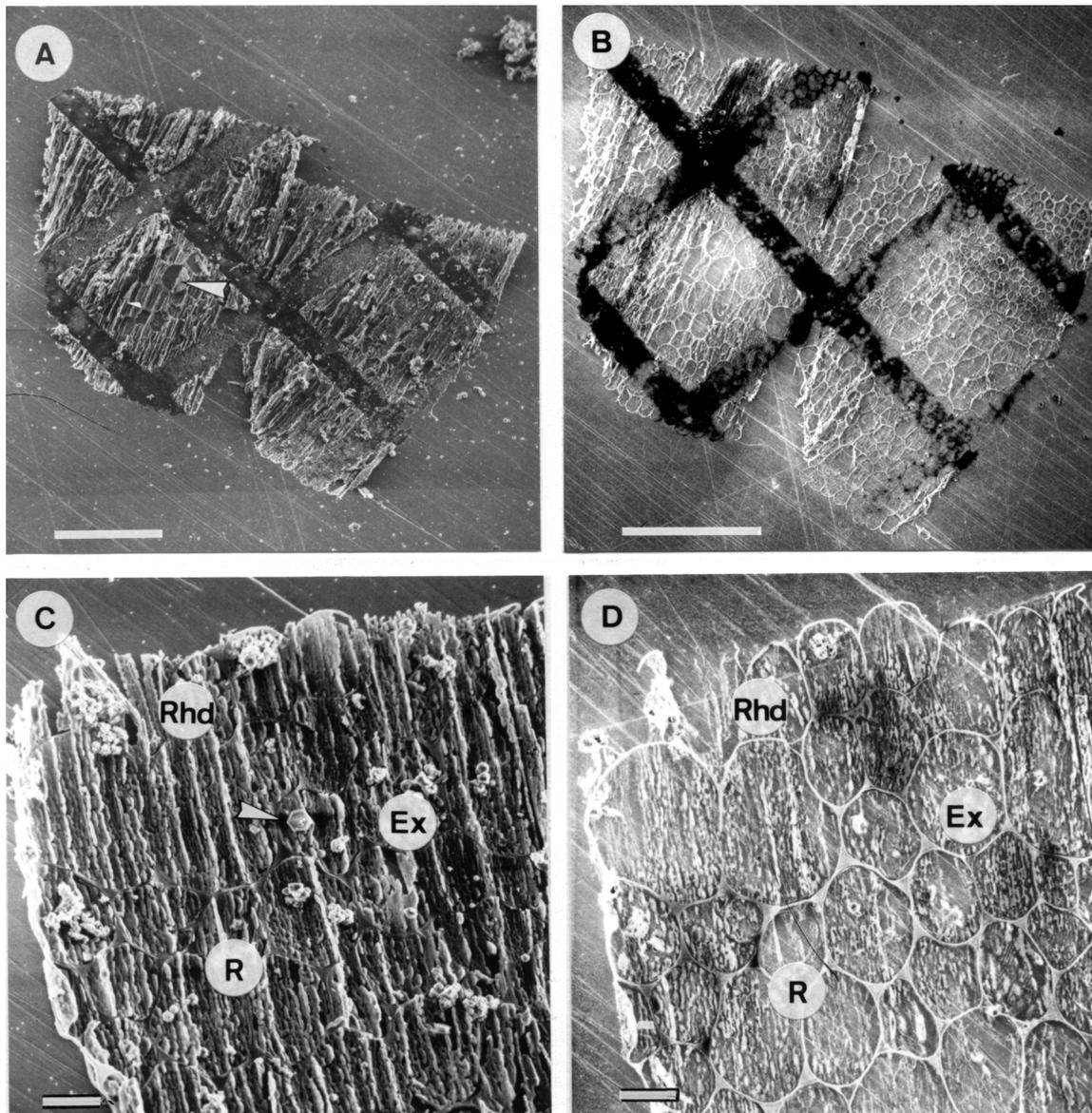


Abb. 3.9: Sekundärelektronenbilder von 300 nm dicken Kryoschnitten der Wurzelbasis (ca. 10 cm h.Wsp.) im hydratisierten (A und C) und im partiell gefriergetrockneten Zustand (B und D). Beschleunigungsspannung: 5 kV. Balken: 100 μ m (A, B) bzw. 10 μ m (C, D).
 A u. B: SE-Bilder von zwei Kryoschnitten durch eine Nodalwurzel. Die Pfeilspitze deutet auf eine leere Zelle, deren Inhalt während der Präparation herausgefallen ist.
 C u. D: Detailaufnahmen aus dem Bereich der äußeren Abschlussgewebe einer Nodalwurzel. Die Pfeilspitze markiert ein hexagonales Eiskristall.
 Ex: Exodermis Rhd: Rhizodermis R: Rinde

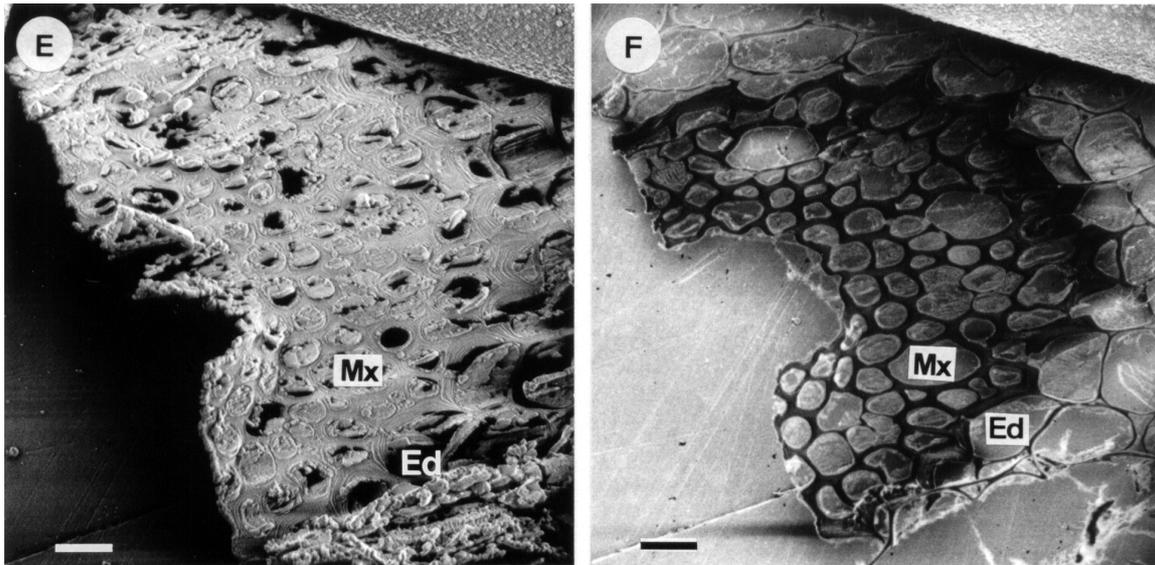


Abb. 3.9: Sekundärelektronenbilder von 300 nm dicken Kryoschnitten der Wurzelbasis (ca. 10 cm h.Wsp.) im hydratisierten (E) und im partiell gefriergetrockneten Zustand (F). Beschleunigungsspannung: 2,5 kV (E) und 5 kV (F). Balken: 10 μ m.
E u. F: Detailaufnahmen aus dem Bereich des Zentralzylinders einer Keimlingswurzel.
Mx: Metaxylem Ed: Endodermis

Schnittes liegen z.T. kleine kugelförmige oder hexagonale Eiskristalle (Pfeil in Abb. 3.9 C), bei denen es sich vermutlich um Kontaminationen, entweder aus dem Mikrotomraum oder aus dem flüssigen Stickstoff des Probenvorratsgefäßes, handelt. In Abb. 3.9 C u. D ist derselbe Kryo-Schnitt im gefroren-hydratisierten (C) und im halb gefriergetrockneten Zustand (D) dargestellt. Die Zellwände treten im halb gefriergetrockneten Zustand wiederum deutlicher hervor. Interzellularen sind innerhalb des kompakt erscheinenden Rindengewebes unterhalb der Exodermis nicht zu erkennen. Nach dem Gefrier Trocknen kann man anhand der weißen intrazellulären Strukturen die Grenzen der ehemaligen Eiskristalle wiederfinden. Eine Zuordnung dieser Strukturen zu bekannten Zellkompartimenten wie der Vakuole, dem Cytoplasma oder dem Zellkern ist dagegen nicht möglich.

Die Abb. 3.9 E und F zeigen eine Detailaufnahme aus dem Bereich des Zentralzylinders. Bereits im gefroren-hydratisierten Zustand erkennt man die verdickten inneren Tangentialwände der tertiären Endodermis (Abb. 3.9 E). Die verdickten Zellwände der Endodermis erscheinen geschichtet, wobei im gefriergetrockneten Zustand diese Schichtung der inneren Tangentialwand weniger gut zu erkennen ist (Abb. 3.9 F). Dagegen sind die Metaxylemgefäße im gefriergetrockneten Zustand besser als im hydratisierten Zustand auffindig zu machen (Abb. 3.9 F).

Kryoschnitte von Wurzelspitzen wie sie in Abb. 3.10 gezeigt sind, weisen grundsätzlich eine glattere Oberfläche auf als Schnitte von der Wurzelbasis. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß Kryoschnitte von der Wurzelspitze bereits beim Schneiden im Mikrotom einen wesentlich transparenteren Eindruck machten und sich einfacher anfertigen ließen als Schnitte von ausdifferenzierten Wurzelabschnitten. Die glattere Oberfläche

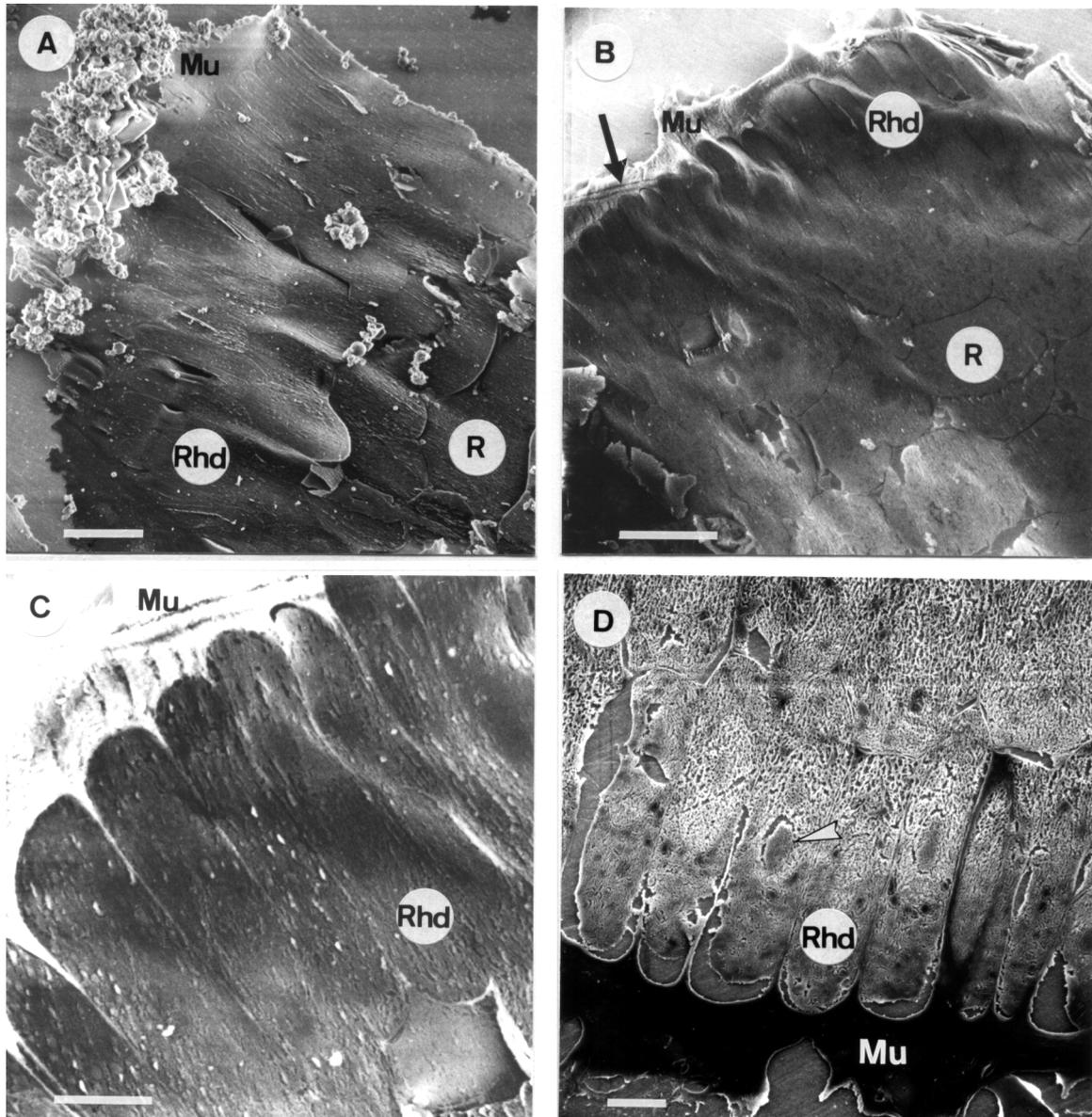


Abb. 3.10: Sekundärelektronenbilder von 300 nm dicken Kryoschnitten, die von Wurzelspitzen präpariert wurden. Gefroren-hydratisierter Zustand (A) und gefriergetrockneter Zustand (B-D). Beschleunigungsspannung: 3,1 kV (A, C) und 5 kV (b, D). Balken: 20 μ m (A, B) bzw. 5 μ m (C, D)

A: Die äußeren Zellschichten des Querschnitts einer Wurzelspitze im gefroren-hydratisierten Zustand.

B: Die äußeren Zellschichten des Querschnitts einer Wurzelspitze im gefriergetrockneten Zustand. Der Pfeil deutet auf Messermarken.

C: Ausschnittvergrößerung der Abb. 3.10 B mit der Rhizodermis.

D: Rhizodermis einer Gerstenwurzelspitze im gefriergetrockneten Zustand. Die Zellen waren beim Andrücken auf den Halter in direktem Kontakt mit dem EM Träger Netz; vergl. dazu auch die kontrastreichen Streifen auf Abb. 3.9 B.

Mu: Mucilage Rhd: Rhizodermis R: Rinde
Die Pfeilspitzen deuten auf Zellkerne.

bedingt aber auch ein sehr einheitliches Erscheinungsbild im gefroren-hydratisierten Zustand, weshalb das Wiedererkennen von Strukturen bzw. die Zuordnung der Strukturen zu bestimmten Zelltypen oder Geweben in den Schnitten von der Wurzelspitze noch schwieriger ist als in den Schnitten von der Wurzelbasis.

Die Abb. 3.10 A und B zeigen einen Ausschnitt der äußeren Gewebe von Querschnitten der Wurzelspitze im gefroren hydratisierten und gefriergetrockneten Zustand. Weil das Bildpaar keine identischen Schnitte zeigt, ist hier ein direkter Vergleich beider Zustände am selben Schnitt nicht möglich.

Die Zellen der Rhizodermis sind nur bei genauer Betrachtung der Bilder auszumachen und erscheinen in radialer Richtung gestreckt. An der Wurzeloberfläche ist die Mucilage zu erkennen, welche sich als homogene Matrix außerhalb der Rhizodermis befindet. Im gefroren-hydratisierten Zustand erkennt man, daß der Schnitt in der Rinde an den Wänden einzelner Zellen gebrochen ist. Möglicherweise ist das die Folge des festen Andrückens des Schnittes auf den Halter. Im gefriergetrockneten Zustand sind die Zellwände in der Rinde als dünne, dunkle Strukturen erkennbar (Abb. 3.10 B). Außerdem ist der Zellinhalt zumeist noch vorhanden. Es ist an einigen Stellen auch möglich dunklere von helleren Zellstrukturen zu unterscheiden, wobei die dunkleren Strukturen z.B. Zellkernen zugeordnet werden dürfen.

Eine Detailansicht der Rhizodermis des Schnittes aus Abb. 3.10 B zeigt Abb. 3.10 C. Auf dieser Ansicht sind jedoch intrazelluläre Strukturen nur schwer erkennbar. Das für die Rhizodermis charakteristische, langgestreckte Erscheinungsbild erleichtert das Auffinden dieses Gewebes auf dem Objektträger. In der Mucilage erkennt man zwei dunkle Streifen, die von der linken Seite zum oberen Bildrand verlaufen. Dabei handelt es sich um Messermarken, die beim Schneiden entstanden sind. Die Messermarken findet man auch im Übersichtsbild wieder (Pfeil in Abb. 3.10 B) und man kann an ihnen erkennen, von welcher Position auf dem Übersichtsbild die Ausschnittsvergrößerung stammt. Abb. 3.10 D zeigt mehrere Rhizodermiszellen eines anderen Schnittes im gefriergetrockneten Zustand. Diese Zellen waren beim Andrücken auf den Halter unter einem Steg des EM Trägernetzes lokalisiert. In dieser Ansicht treten die Zellwände recht deutlich hervor und in den Zellen sind die Zellkerne zu erkennen. Die Zellkerne sind umgeben von netzartig aussehendem Cytoplasma, das zum Teil während des Trocknes geschrumpft ist und sich deshalb von der Wand abgelöst hat. An der Wurzeloberfläche anhaftend findet man auch hier die äußere Schleimhülle (Mu in Abb. 3.10). Aus diesen Abbildungen von der Rhizodermis geht hervor, daß die Dicke der Wände deutlich weniger als 1 μm beträgt.

Die am leichtesten zu präparierenden Kryoschnitte mit den glattesten Oberflächen waren von den Standards zu erhalten. Zunächst wurden dafür schockgefrorene Dextrantropfen, die definierte Ionenkonzentrationen enthielten, geschnitten. Das Sekundärelektronenbild eines Schnittes von einem Standardtropfen zeigt, daß die Schnitte vollständig und nahezu ohne

Brüche oder andere mechanische Beschädigungen in das Kryo-REM transferiert werden konnten (Abb. 3.11 A). Die wellenförmigen Oberflächenstrukturen sind vermutlich auf Stauchungen während des Schneidevorgangs zurückzuführen. Es ist wahrscheinlich, daß mit den Stauchungen auch die Schnittdicke variiert und dadurch auch die für den Elektronenstrahl anregbare Masse an Standard bei konstantem Einfallswinkel und konstanter Größe der Meßfläche. Außerdem war zu beobachten, daß die Schnitte durch Dextrantropfen während der Gefriertrocknung stark schrumpften. Beide Effekte zusammen führten dazu, daß solche Standards mit den eigentlichen Proben nicht mehr vergleichbar waren. Deshalb wurden Standards hergestellt, bei denen ein stabilisierendes Gerüst in Form der Zellwände von abgetötetem Wurzelgewebe mit Dextranlösung infiltriert wurde (vergl. Kap. 2.3.3.2.1). Die Abb. 3.11 B zeigt einen Kryo-Schnitt durch einen solchen Standard. Man erkennt deutlich die Zellen des Zentralzylinders. Die im Vergleich zu Schnitten von unbehandelten Wurzeln sehr glatte Oberfläche des Inhaltes aller Zellen ist ein guter Hinweis darauf, daß die Wurzel ausreichend mit der Standardlösung infiltriert wurde. Wellenförmige Oberflächenstrukturen, wie sie bei den Schnitten von Dextrantropfen beobachtet wurden (Abb. 3.11 A) sind bei den Gewebestandards nicht zu erkennen.

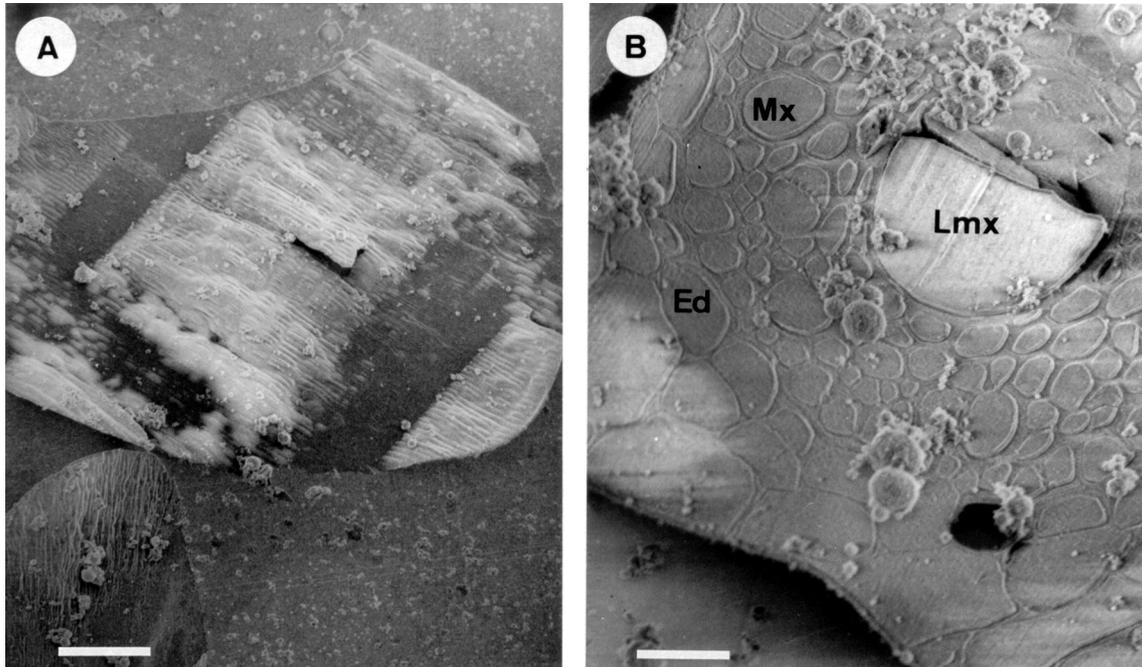


Abb. 3.11: SE-Bilder von Kryoschnitten durch Standards wie sie für die EDX-Analysen hergestellt wurden. Beschleunigungsspannung: 5 kV. Balken: 40 μ m (A) und 10 μ m (B).
 A: Dextrantropfen: Gefrierschnitt (ca. 300nm) im gefroren-hydratisierten Zustand.
 B: Gewebestandard: Gefrierschnitt (ca. 300 nm) im gefroren-hydratisierten Zustand. Das Bild zeigt einen Ausschnitt aus dem Zentralzylinder (vergl. Kap. 2.3.3.2.1).
 Ed: Endodermis R: Rinde Mx: Metaxylem
 Lmx: Spätes Metaxylem

3.5.2 Direkte Messungen von Ionen in Zellwänden

3.5.2.1 Vergleich von EDX-Analysen von im Block gefrorenen Proben und Kryoschnitten

An basalen Abschnitten von Wurzeln der zweiten Generation, die für 2 min mit RbCl inkubiert wurden, konnten vergleichend EDX Analysen an Kryoschnitten und im Block gefrorene Proben durchgeführt werden. Dabei wurden dieselben Wurzelblöcke untersucht, von denen auch die Kryoschnitte abgenommen wurden.

Die Abb. 3.12 zeigt zwei Sekundärelektronen-Bilder von der Oberfläche eines tiefgefrorenen Wurzelsegments im REM. Im voll hydratisierten Zustand kleinere Strukturen wie z.B. die Zellwände von Rindenparenchymzellen nur schwer zu erkennen (Abb. 3.12 A). Für eine Verbesserung der Strukturerkennung wurden die Proben durch Absublimieren von Eis oberflächlich "geätzt" (vergl. 2.3.3.2.1). Danach sind der Zentralzylinder, die Endodermis im tertiären Zustand, die Rinde und die Rhizodermis wesentlich deutlicher zu erkennen (Abb. 3.12 B).

Die ermittelten p/b Verhältnisse für Rubidium, Chlor und Kalium aus den Zellwänden sind in Abb. 3.13 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Rb^+ Konzentrationen (p/b Verhältnisse)

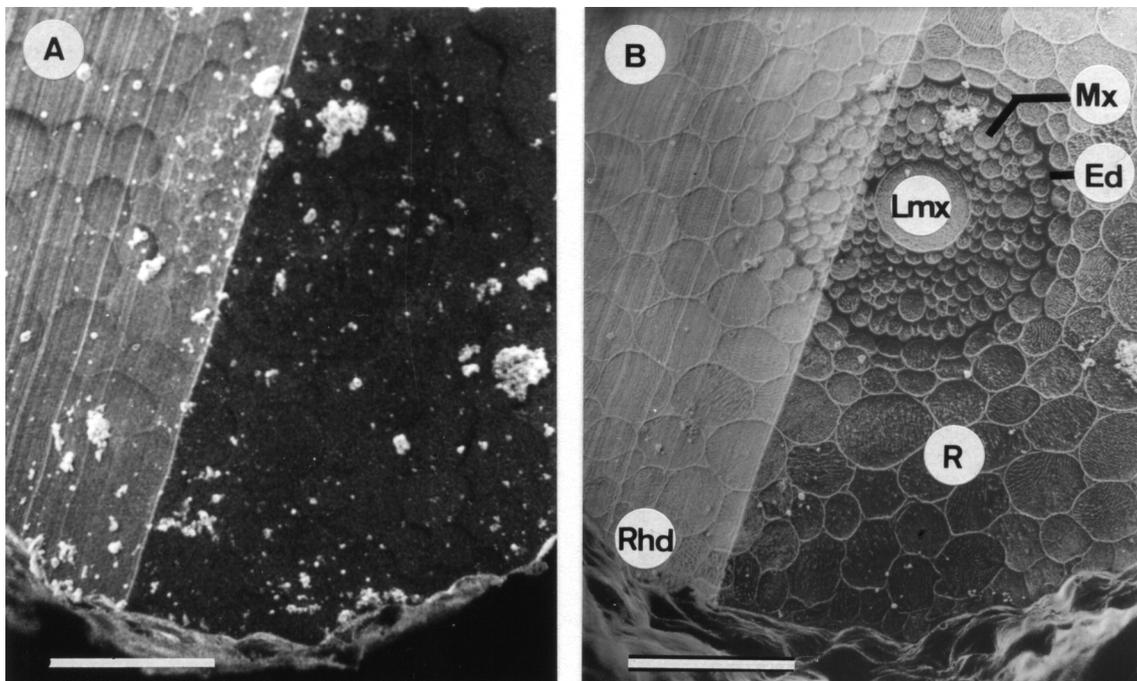


Abb. 3.12: SE-Bilder von der Oberfläche eines Probenstumpfes (Keimlingswurzel) im gefroren-hydratisierten (A) und im geätzten (B) Zustand. Der Probenstumpf läßt eine Zweiteilung erkennen. Von der linken unteren Seite läuft eine Kante, die durch das Trimmen der Probe entstanden ist, zur rechten oberen Bildkante hin. In diesem Fall wurde die Wurzel also nur von einer Seite getrimmt. Beschleunigungsspannung: 10kV. Balken: 100 μm .

Ed: Endodermis Lmx: Spätes Metaxylem Mx: Metaxylem
R: Rinde Rhd: Rhizodermis

sowohl in den im Block gefrorenen Proben als auch in den Kryoschnitten an der Wurzeloberfläche am höchsten sind und dann zur Wurzelrinde hin steil abnehmen. Mit der steilen Abnahme der Rb^+ Konzentrationen geht eine gleichzeitige Abnahme der Cl^- Konzentrationen einher.

Im Gegensatz dazu steigen die K^+ Konzentrationen von einem minimalen Wert an der Wurzeloberfläche über die gesamte Wurzelrinde an, wo sie ein Maximum erreichen. Zum Zentralzylinder hin fallen sie hingegen wieder ab. Auch für die Kaliumkonzentrationen zeigen die Messungen an Kryoschnitten und den im Block gefrorenen Proben prinzipiell einen übereinstimmenden Verlauf. Allerdings erreichen die K^+ Konzentrationen im Verhältnis zu den Werten von Rb^+ und Cl^- in den Blöcken wesentlich höhere Werte als in den Kryoschnitten. Dieser Unterschied wird bei Betrachtung des Verhältnisses der p/b Werte von im Block gefrorenen Proben zu Kryoschnitten deutlich (Tab. 8). An den Meßpositionen mit einem eindeutigen Nachweis für Rb^+ und Cl^- (① und ②) ergibt sich ein mehr oder weniger konstanter Faktor von ~ 5 zwischen dem p/b Verhältnis in Schnitten zu dem p/b Verhältnis im Block gefrorenen Proben. Für K^+ beträgt der Faktor zwischen Schnitten und im Block gefrorenen Proben in etwa 10.

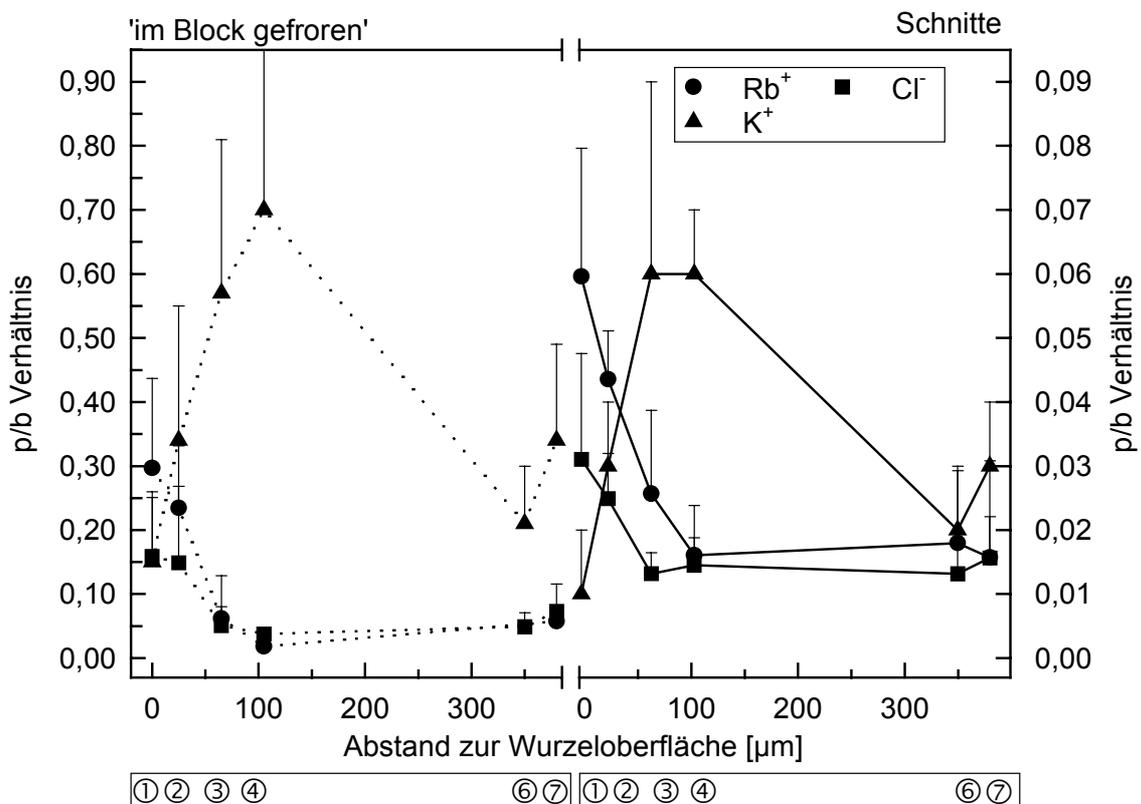


Abb. 3.13: p/b Verhältnisse in den Zellwänden von Gerstenwurzeln für Rb^+ , Cl^- und K^+ in Abhängigkeit vom Abstand zur Wurzeloberfläche. Die Wurzeln wurden vor dem Einfrieren für 120 s mit RbCl ($60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) inkubiert. Vertikale Balken = Standardabweichung. $n = 5$ (25 Einzelmessungen). Die Nummern entsprechen den in Abb. 3.14 dargestellten Meßpositionen.

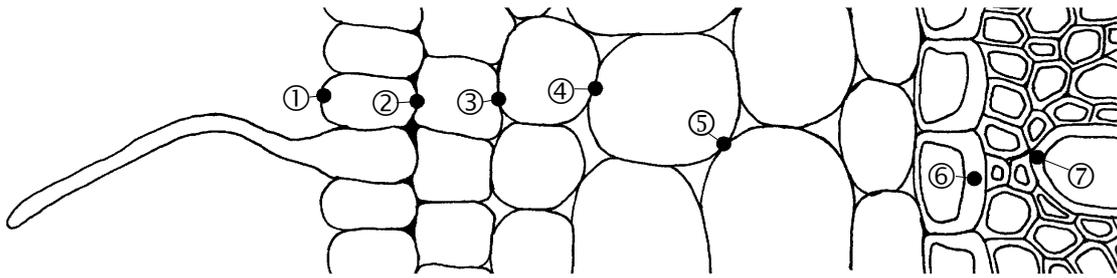


Abb. 3.14: Meßpositionen für die EDX-Analysen in den Wänden quer geschnittener Wurzelzellen.

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| ① Rhizodermis äußere Tangentialwand | ⑤ zweite Rindenzellwand |
| ② Rhizodermis innere Tangentialwand | ⑥ Endodermis innere Tangentialwand |
| ③ Exodermis innere Tangentialwand | ⑦ Metaxylem |
| ④ erste Rindenzellwand | |

Tab. 8: Faktoren zwischen den p/b Verhältnissen für Rb^+ , Cl^- und K^+ in Kryoschnitten und im Block gefrorenen Proben. Die Nummern entsprechen den in Abb. 3.14 dargestellten Meßpositionen.

	Rubidium	Chlor	Kalium
① rhd atw	5,0	5,1	10,3
② hd atw	5,4	6,0	12,4
③ hd itw	2,4	3,9	9,0
④ r 1	1,1	2,6	12,5
⑥ ted itw		3,7	9,5
⑦ mx	3,7	4,7	12,1

3.5.2.2 EDXA an gefrorenen Wurzelsegmenten mit und ohne Exodermis

Die Nodalwurzeln von intakten Pflanzen wurden für 120s mit $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ RbCl}$ inkubiert und auf Haltern für die Untersuchung eingefroren. Die Segmente oberhalb der abgebrochenen Wurzeln wurden außerdem lichtmikroskopisch auf eine fluoreszierende Exodermis untersucht (vergl. Kap. 2.2.1) und anschließend in die zwei Gruppen 'mit Exodermis' und 'ohne Exodermis' eingeteilt. In Abb. 3.15 sind die p/b Verhältnisse für Rb^+ in den Wänden dieser Wurzelzellen dargestellt. Aus Abb. 3.15 geht hervor, daß die Rb^+ Konzentrationen in den äußeren beiden Meßpunkten beider Gruppen, wie bei dem Versuch im vorhergehenden Kapitel (Abb. 3.13), am höchsten sind. In der inneren Tangentialwand der Hypodermis (=Exodermis) ist allerdings in den Wurzeln mit Exodermis nur noch ein p/b Verhältnis unterhalb des Wertes für einen sicheren Nachweis in gefrorenen Gewebeblöcken ($< 0,1$) zu finden, während in den Wurzeln ohne Exodermis noch ein deutliches Rb^+ Signal messbar ist. Das gilt ebenso für die Tangentialwände der auf die Hypo(Exo-)dermis folgenden

Rindenzellschicht (r1). In den weiter innen gelegenen Zellwänden der Rinde ist auch in den Wurzeln ohne Exodermis kein Rb^+ mehr nachweisbar.

Im Vergleich dazu ergibt sich in allen Zellwänden von Wurzeln, die vor der Inkubation mit Rb^+ abgetötet wurden, für Rb^+ ein p/b Verhältnis deutlich oberhalb der Nachweisgrenze (Abb. 3.15). Dabei sinken die p/b Verhältnisse zwar auch von den äußeren zu den inneren Zellwänden hin ab, bleiben aber dennoch stets größer als 0,1.

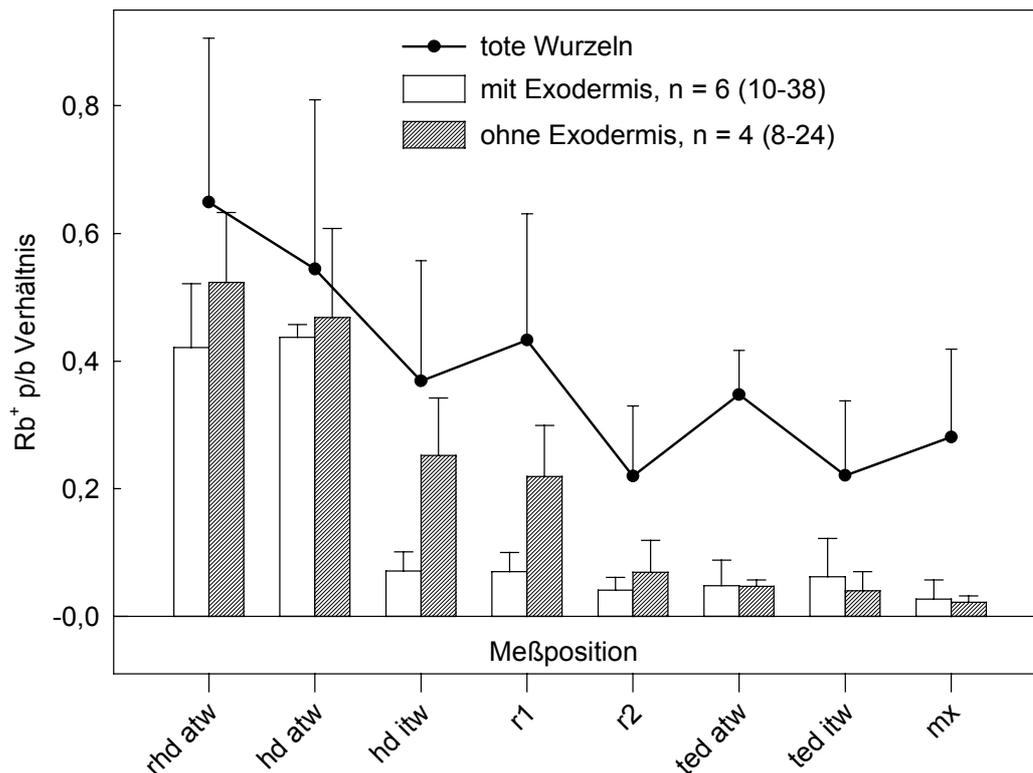


Abb. 3.15: p/b Verhältnisse für Rb^+ in den Zellwänden von Nodalwurzeln. Vergleich zwischen Wurzeln mit und ohne Exodermis und abgetöteten Wurzeln. Vertikale Balken = Standardabweichung.

3.5.2.3 Lokalisation von Rb^+ in Gefrierschnitten von inkubierten Wurzeln mit der EDX-Analyse

Die Messungen mit der EDX Analyse an Gefrierschnitten von Gerstenwurzeln ergaben für die Kontrollen (unbehandelte Wurzeln) stets p/b Verhältnisse für Rb^+ , die niedriger als diejenigen Standards lagen, die kein Rb^+ enthielten ('blanks' in Abb. 3.16).

Wurde den Wurzeln vor dem Einfrieren für 2 bzw. 5 min Rb^+ ($60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ RbCl}$) angeboten, so waren in den Wänden nahe der Wurzeloberfläche die höchsten Rb^+ Konzentrationen zu finden (Abb. 3.16). Die Rb^+ Konzentration in den Wänden der Rindenzellen aus dem Bereich der Wurzelbasis nimmt dann aber, einem steilen Gradienten folgend, schnell in radialer Richtung ab, so daß bereits in den inneren Tangentialwänden der Exodermis kein Rb^+ mehr nachweisbar ist (Abb. 3.16 A). Dieses Ergebnis erhält man sowohl für eine 2 als auch für

eine 5 minütige Dauer des Rb^+ -Angebots vor dem Einfrieren (Abb. 3.16 A). Ähnlich fällt auch das Ergebnis bei Inkubation der Wurzelspitze mit RbCl Lösung aus. Nach 2 minütiger Inkubation findet man Rb^+ ausschließlich in den äußeren Tangentialwänden der Rhizodermis, d.h. unmittelbar an der Wurzeloberfläche (Abb. 3.16 B). Nach 5 minütiger Inkubation mit Rb^+ ist allerdings in den Wänden nahe der Rindenzellen ein p/b Verhältnis für Rb^+ zu finden, welches größer ist als dasjenige des 'blank' (Abb. 3.16 B offene Symbole). Auffällig dabei ist, daß das p/b Verhältnis für Rb^+ sowohl in den Wänden nahe der Wurzeloberfläche, als auch in den Wänden der inneren Rinde viel höher ausfällt als in den vergleichbaren Wänden nach

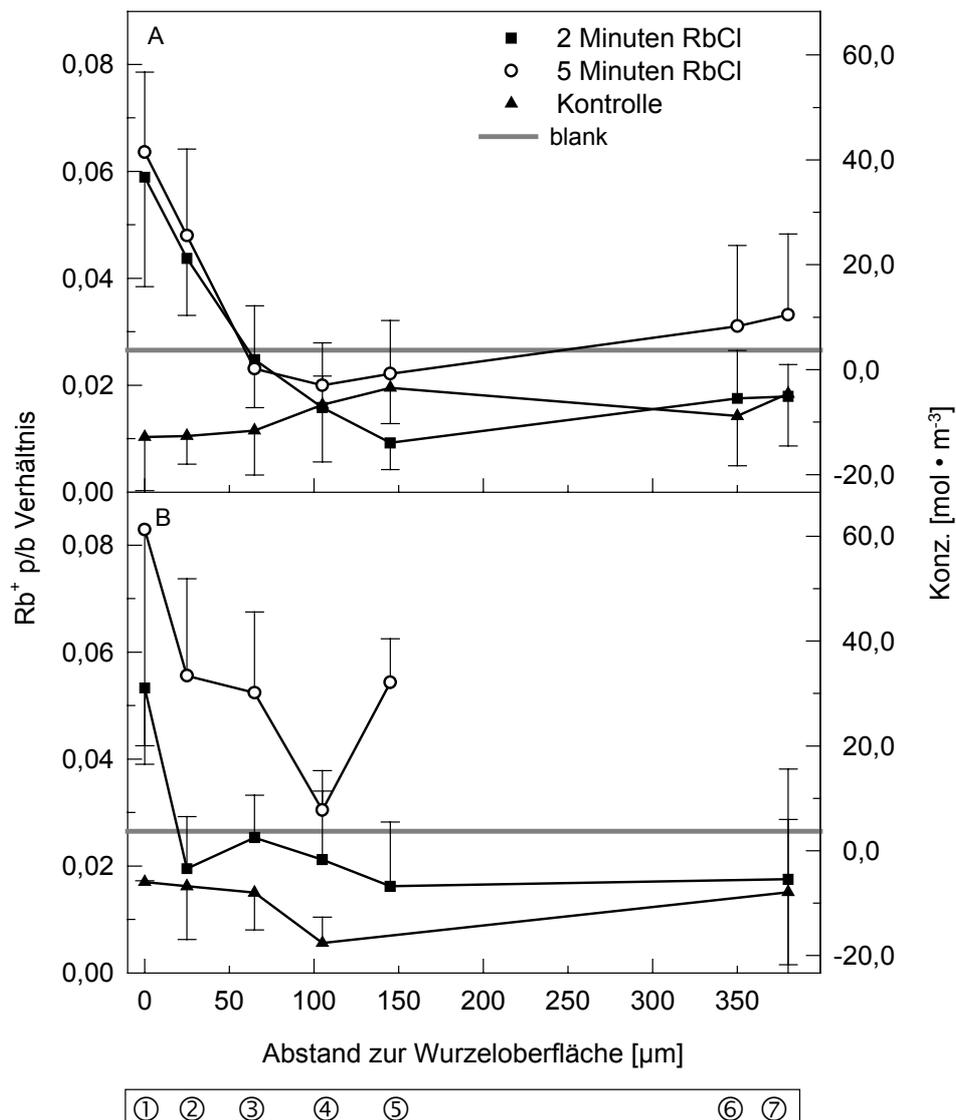


Abb. 3.16: Rb^+ p/b Verhältnisse und errechnete Konzentrationen (rechte y-Achse) in den Wänden quer geschnittener Wurzelzellen, die für 2 bzw. 5 min mit $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl behandelt wurden. Die Messungen wurden an gefriergetrockneten Kryoschnitten durchgeführt.

A: Wurzelbasis

B: Wurzelspitze

'blank': Mittelwert des p/b Verhältnisses für Rb^+ in Standards, die kein Rb^+ enthielten.

Vertikale Balken: Standardabweichung. $n = 2-10$ (10-50).

Die Nummern unter der x-Achse korrespondieren mit der schematischen Darstellung der Meßpositionen in Abb. 3.14.

2 minütiger Inkubation bzw. höher als in den Wänden der Rindenzellen aus dem Wurzelbasisbereich; das mittlere p/b Verhältnis an der Wurzeloberfläche liegt hier bei etwa 0,06 im Gegensatz zu 0,08 bei den für 5 min inkubierten Wurzelspitzen (Abb. 3.16).

Aus den EDX-Spektren wurden außer den Rb^+ - auch gleichzeitig die K^+ -Konzentrationen in den gemessenen Zellwänden bestimmt (Abb. 3.17). In allen gemessenen Zellwänden ist das p/b Verhältnis für K^+ größer, als im 'blank'. Daher ist davon auszugehen, daß in nahezu allen Zellwänden K^+ nachgewiesen wurde.

Für die basalen Wurzelabschnitte zeigt sich entlang des Wurzelradius ein recht einheitlicher Verlauf der K^+ -Konzentrationen. Von niedrigen Konzentrationen in den Wänden der Rhizo-

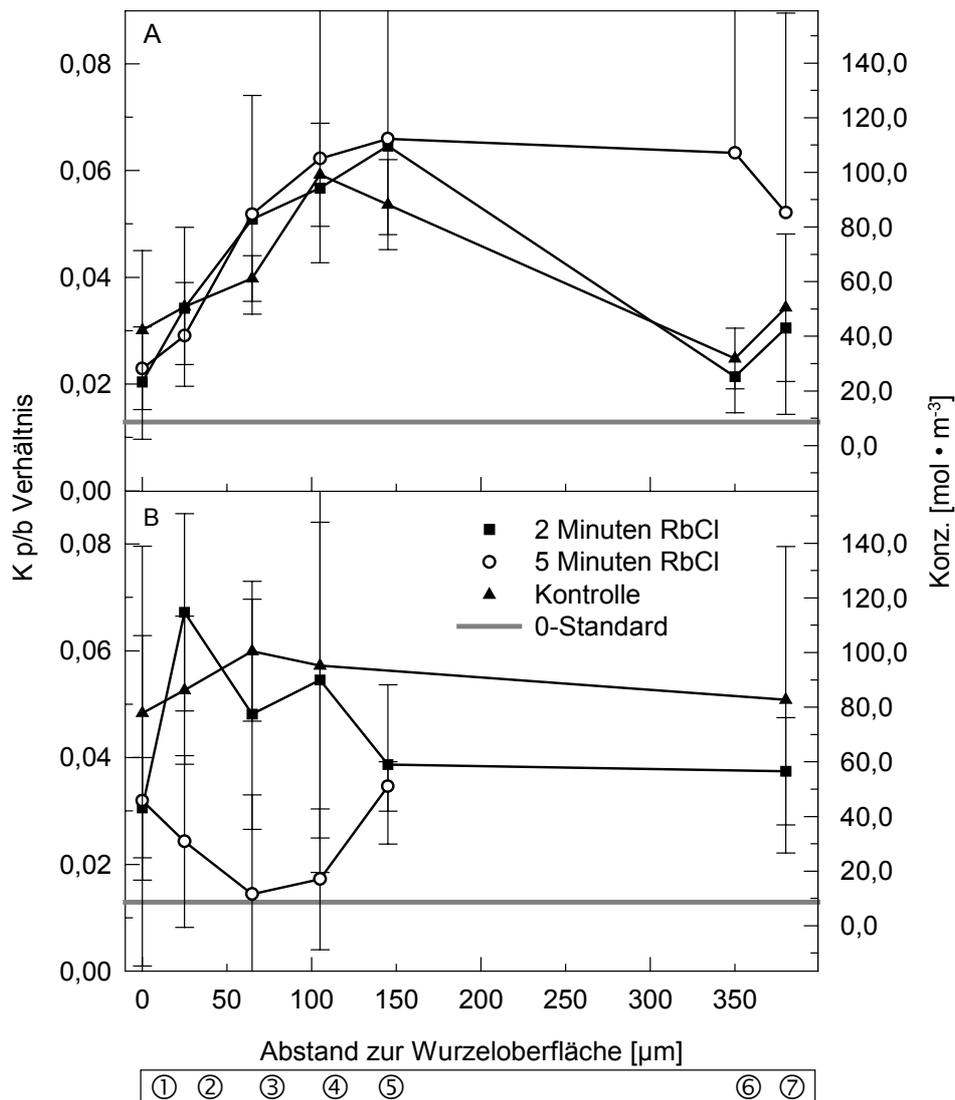


Abb. 3.17: K^+ p/b Verhältnisse und errechnete Konzentrationen (rechte y-Achse) in den Zellwänden von Gerstenwurzeln, die für 2 bzw. 5 min mit $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl behandelt wurden. Die Messungen wurden an gefriergetrockneten Kryoschnitten durchgeführt.

A: Wurzelbasis

B: Wurzelspitze

'blank': Mittelwert des p/b Verhältnisses für Rb^+ in Standards, die kein Rb^+ enthielten.

Vertikale Balken = Standardabweichung. $n = 2-10$ (10-50).

Die Nummern unter der x-Achse korrespondieren mit der schematischen Darstellung der Meßpositionen in Abb. 3.14

dermis steigen die Werte in den Wänden der inneren Rinde zu höheren Konzentrationen hin an (Abb. 3.17 A). In den Wänden der Gefäße bzw. den inneren Tangentialwänden der Endodermis sind die Konzentrationen, mit Ausnahme der für 5 min inkubierten Wurzeln, wieder so niedrig, wie an der Wurzeloberfläche (Abb. 3.17 A). In den Wurzelspitzen zeigen die K^+ -Konzentrationen einen nicht so einheitlichen Verlauf. In den Wänden der Kontrollen und der für 2 min inkubierten Wurzelspitzen findet man grundsätzlich hohe K^+ -Konzentrationen mit Ausnahme der äußeren Tangentialwand der Rhizodermis, wo sie nach 2 min Inkubation mit RbCl deutlich niedriger sind (Abb. 3.17 B). Abweichend davon werden in den Wänden der Wurzelzellen, die für 5 min mit RbCl inkubiert wurden, insgesamt niedrigere K^+ -Konzentrationen gefunden, wobei die äußeren Tangentialwände der Rhizodermis und die Wände der inneren Rinde relativ am höchsten sind (Abb. 3.17 B).

Alle bestimmten K^+ -Konzentrationen zeichnen sich, unabhängig von der Versuchsvariante, durch eine große Standardabweichung aus.

3.5.2.4 Langsamer Anstieg der Salzkonzentration im Nährmedium

In diesem Versuch wurden die Auswirkungen eines langsamen Anstiegs der Salzkonzentration in der Nährlösung auf die Ionenkonzentrationen im Apoplasten der Wurzelrinde getestet. Dazu wurden die Wurzeln intakter Gerstenpflanzen innerhalb von 4 h auf $120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ mit NaCl aufgesalzen, was für 5 min vor dem Einfrieren der Wurzel gegen RbCl derselben Konzentration ausgetauscht wurde. Die EDX- Analysen an den Zellwänden des äußeren Rindenbereichs zeigen, daß das kurzfristig angebotene Rb^+ nur bis in die äußeren Tangentialwände der Exodermis vorgedrungen ist, d.h. dort nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.18 A, t1). Wurden die Pflanzen jedoch auf $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl aufgesalzen, konnte Rb^+ auch in den inneren Zellwänden der Hypodermis nachgewiesen werden (Abb. 3.18 A, t2). Verbleiben die Pflanzen dann für weitere 17 Stunden in der auf $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl aufgesalzenen Nährlösung, so ist ein positiver Rb^+ Nachweis wiederum nur in den äußeren Tangentialwänden der Rhizo- und Exodermis möglich (Abb. 3.18 A, t3).

Der Verlauf der Chlor Konzentrationen in den Zellwänden ist für die Ansätze t1 und t2 mit dem Verlauf der Rb^+ Konzentrationen in den Zellwänden nahezu identisch (Abb. 3.18 B). Für den Ansatz t3, dessen Pflanzen für 17 Stunden in der aufgesalzenen Nährlösung kultiviert wurden, weichen die Verläufe voneinander ab. Chlor ist hier auch in den inneren tangentialen Zellwänden der Exodermis und der 1. inneren Rindenzellschicht nachweisbar (Abb. 3.18 B, t3).

In den Vakuolen der gemessenen Gewebe ist Rb^+ nur in der Rhizodermis zu finden; die übrigen p/b Verhältnisse für Rb^+ der Ansätze t2 und t3 sind identisch, während der Wert in den Rhizodermisvakuolen der Wurzeln aus Ansatz t1 niedriger ist (Abb. 3.18 C).

Chlor ist in allen Vakuolen der Rhizodermis, Exodermis und ersten Rindenzellschicht aus Ansatz t3 in nahezu gleicher Höhe nachweisbar. Beim Ansatz t2 kann Cl^- nur in den Vakuolen der Rhizodermis deutlich nachgewiesen werden, während für den Ansatz t1 die p/b Verhältnisse für Cl^- in allen gemessenen Vakuolen nahe der Nachweisgrenze liegen (Abb. 3.18 D).

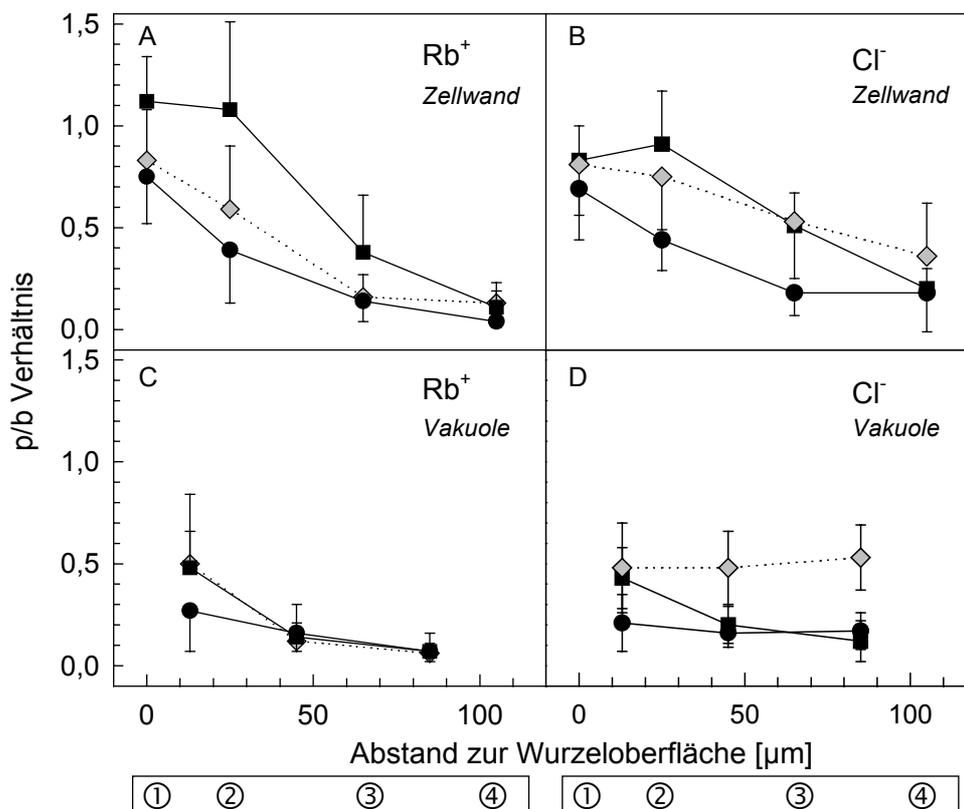


Abb. 3.18: p/b Verhältnisse für Rb^+ und Cl^- aus EDX-Analysen an den im Block gefrorenen Gerstenwurzelsegmenten in Abhängigkeit vom Abstand zur Wurzeloberfläche. Vor der 5 minütigen RbCl Inkubation wurde die Nährlösung der Pflanzen auf 120 bzw. $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl aufgesalzen.

Vertikale Balken: Standardabweichungen ($n = 3-15$).

Die eingekreisten Zahlen unter der x-Achse korrespondieren mit den Meßpositionen in Abb. 3.14.

- t1: ca. 1 Stunde nach Aufsalzen auf $120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl
- t2: ca. 1 Stunde nach Aufsalzen auf $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl
- ◇ t3: 17 Stunden nach Aufsalzen auf $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl

3.5.2.5 Plötzlicher Anstieg der Salzkonzentration im Nährmedium

Als Fortführung der Besatzungsversuche wurden intakte Wurzeln vor dem Einfrieren, ohne Adaptationsphase, einer plasmolytisch wirksamen Salzkonzentration ausgesetzt ($180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ RbCl} + 0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ CaSO}_4$, 8 – 20 min, Kap. 2.3.3). In Abb. 3.19 sind die Ergebnisse aus diesen Versuchen dargestellt. Es war bei diesem Ansatz möglich die genaue Entfernung jeder einzelnen Meßposition zur Wurzeloberfläche zu ermitteln, weshalb in diesem Fall einzelne Meßwerte aufgetragen werden konnten.

Für die Auswertung wurden die untersuchten Wurzelabschnitte zu den zwei Gruppen "Abstand zur Wurzelspitze $>10 \text{ cm}$ " bzw. "Abstand zur Wurzelspitze $<10 \text{ cm}$ " zusammengefaßt (Abb. 3.19). Bei der Auftragung des Abstandes der Meßpunkte zur Wurzeloberfläche gegen das p/b Verhältnis für Rb^+ , ergibt sich pro Gruppe eine Punktwolke, durch die eine ausgeglichene Kurve gelegt wurde. Dabei zeigt sich für die Wurzelabschnitte $>10 \text{ cm}$ hinter der Wurzelspitze (h.Wsp.) der bekannte Verlauf mit einem steil abfallenden p/b Verhältnis für Rb^+ innerhalb der ersten $40 \mu\text{m}$ Abstand von der Wurzeloberfläche auf einen Wert, der

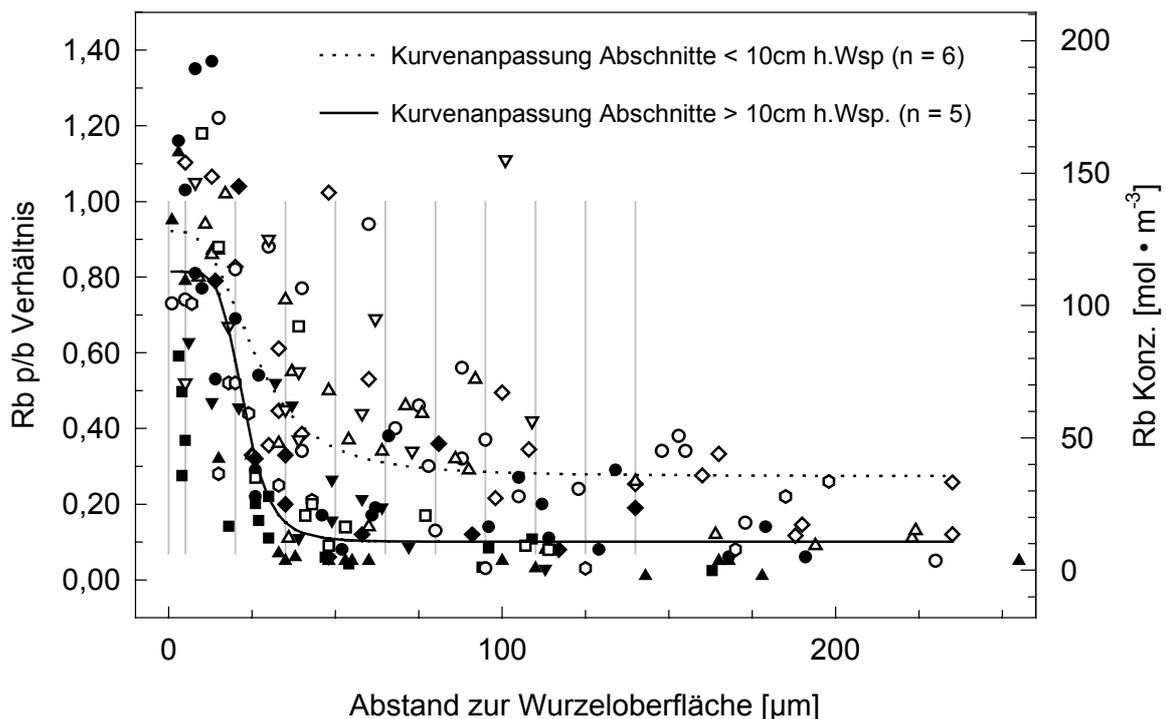


Abb. 3.19: Aus EDX-Analysen an im Block gefrorenen Gerstenwurzeln ermittelte p/b Quotienten und Rb^+ -Konzentrationen in Zellwänden (im Apoplasten). Vor dem Einfrieren wurden die Wurzeln für 8-20 min mit einer $1,5^\circ\text{C}$ kalten RbCl Lösung ($180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ RbCl} + 0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ CaSO}_4$) inkubiert. Die Konzentrationen (rechte Ordinate) wurde mit Hilfe von Messungen an Standards berechnet. Die vertikalen Linien zeigen die Intervalle, für die Permeabilitäten in Abb. 3.21 einzeln berechnet wurden. Die Kurvenanpassung erfolgte mit der 'Automatic Curve Fit' Funktion von SigmaPlot (2.0). Die Formeln für die Kurven lauten:

$$<10 \text{ cm h.Wsp.: } y = 0,9212 - 0,274 / (1 + (x/25,8454)^{3,1164}) + 0,274$$

$$>10 \text{ cm h.Wsp.: } y = 0,8144 - 0,1006 / (1 + (x/22,5824)^{5,8595}) + 0,1006$$

offene Symbole: $<10 \text{ cm}$ hinter der Wurzelspitze

gefüllte Symbole: $>10 \text{ cm}$ hinter der Wurzelspitze

unter diesen Bedingungen nicht mehr als Elementnachweis betrachtet werden kann ($p/b \leq 0,1$ Abb. 3.19). Anders ist der Verlauf für die Abschnitte <10 cm hinter der Wurzelspitze: das p/b Verhältnis sinkt hier zwar auch rasch mit zunehmendem Abstand von der Wurzeloberfläche ab, bleibt dann aber deutlich oberhalb von 0,1, was einem Rb^+ Nachweis in den Zellwänden der inneren Rinde entspricht (Abb. 3.19). Die rechte Ordinate gibt die p/b Verhältnisse in Konzentrationen umgerechnet wieder. Daraus geht hervor, daß die Rb^+ Konzentration in den Rindenzellwänden bei $\sim 35 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ liegt. Die Konzentration, welche dem p/b Verhältnis $\leq 0,1$ entspricht, d.h. wo kein eindeutiger Rb^+ Nachweis mehr möglich ist, errechnet sich zu ca. $11 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$. Diesen Wert muß man im ungünstigen Fall als potentiell vorhanden aber in den Zellwänden der Rinde als nicht nachweisbar annehmen.

In Abb. 3.20 sind exemplarisch die Querbrüche von Nodalwurzeln dargestellt, die für die Untersuchungen an salzadaptierten und osmotisch geschockten Wurzeln verwendet wurden. Die Kontrolle in Abb. 3.20 A zeigt intrazellulär die für geätzte Querbrüche typischen Eiskristallgrenzen. Die Zellen der Rinde erscheinen überwiegend abgerundet, d.h. sie sind turgeszent. Die Interzellularen sehen vielfach optisch leer aus, ein Hinweis darauf, daß sie *in situ* mit Luft gefüllt waren.

Wird die Nährlösung, in der eine Wurzel wächst, innerhalb von 6 h auf $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl aufgesalzen (Abb. 3.20 B), so sind zwar auch hier in den Rindenzellen die typischen Muster der Eiskristallgrenzen zu beobachten, in den Zellen der Rhizo- und Hypodermis sind allerdings auch Strukturen zu erkennen, die auf Plasmolyse hindeuten. So z.B. haben sich die Protoplasten von der Zellwand abgelöst und erscheinen als abgerundete Strukturen in den Zellen (Pfeilspitzen in Abb. 3.20 B/C). Besonders häufig ist diese Beobachtung in der Exodermis zu machen.

In Wurzeln, die mit einer $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl Lösung osmotisch geschockt wurden zeigen viele Rindenzellen Zeichen von Plasmolyse d.h. sie sind sehr stark deformiert (Abb. 3.20 D). Dies ist besonders häufig bei Wurzelsegmenten, die weniger als 10 cm von der Wurzelspitze entfernt sind. Andererseits kommen bei Wurzelabschnitten, die mehr als 10 cm von der Wurzelspitze entfernt sind nur sehr vereinzelt Zellen mit Anzeichen von Plasmolyse vor (Abb. 3.20 C), d.h. sie sind diesbezüglich kaum von einer Kontrolle zu unterscheiden (vergl. Abb. 3.20 A). Zwischen beiden Erscheinungsformen sind zwar auch Übergänge zu finden, grundsätzlich unterstützen diese Beobachtungen jedoch die Einteilung der untersuchten geschockten Wurzeln in die beiden Gruppen "*Abstand zur Wurzelspitze* >10 cm bzw. <10 cm".

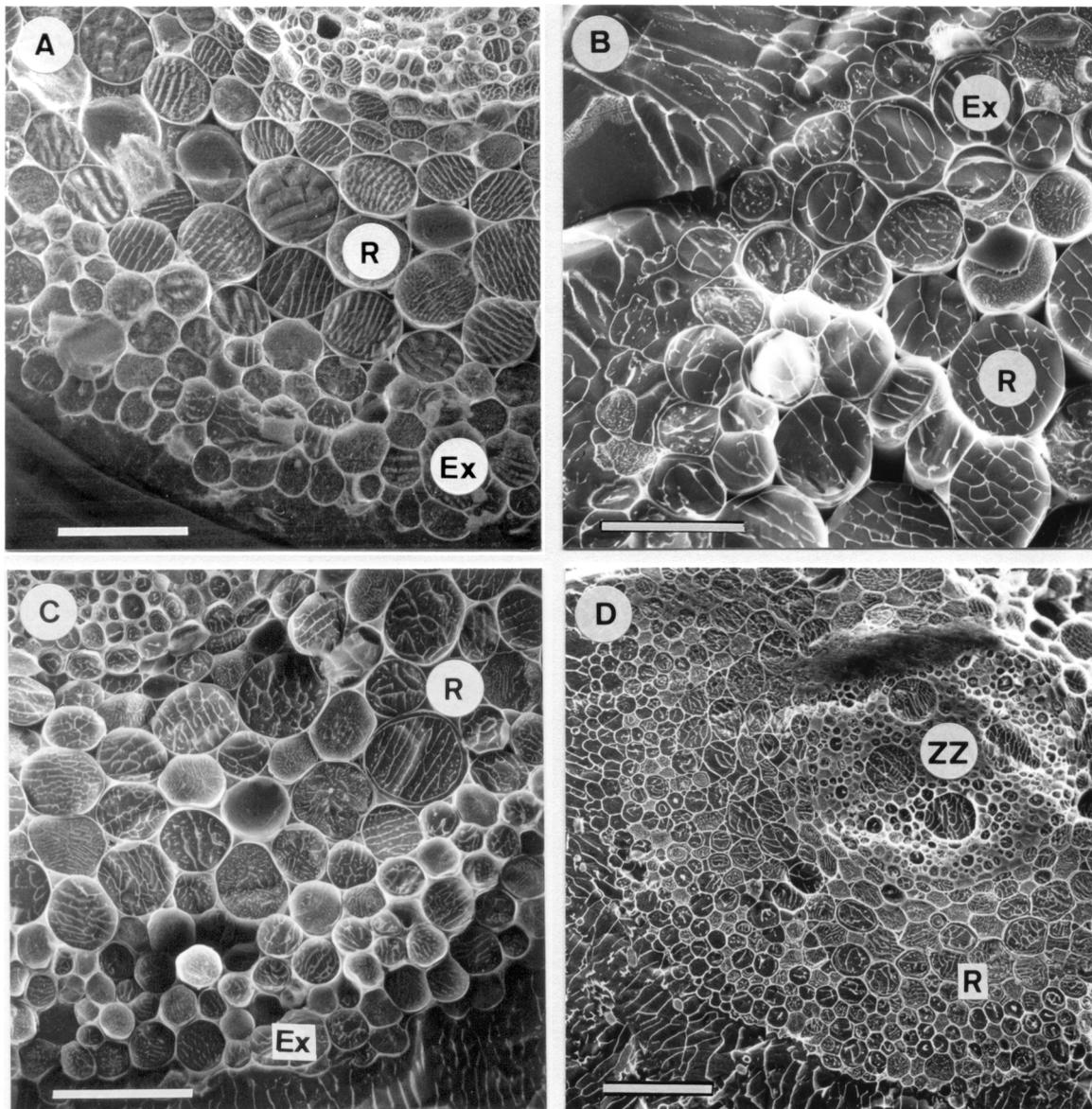


Abb. 3.20: Die SE-Bilder zeigen die Oberflächen von gefroren quergebrosenen Gerstenwurzeln aus den Besatzungs- und Plasmolyseversuchen (vergl. Kap. 2.3). Balken: 50 μm (A-C) bzw. 100 μm (D)

A: Aufsicht auf den Querbruch einer unbehandelten Nodalwurzel (Kontrolle, ca. 10 cm h.Wsp.).

B: Äußere Zellschichten einer Nodalwurzel nach langsamer Aufsatzung auf $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl zum Zeitpunkt t2 (ca. 8 cm h.Wsp.).

C: Aufsicht auf den Querbruch durch eine Nodalwurzel nach osmotischem Schock mit $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl bei $1,4^\circ\text{C}$ (ca. 10 cm h.Wsp.).

D: Aufsicht auf den Querbruch durch eine Nodalwurzel nach osmotischem Schock mit $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl bei $1,4^\circ\text{C}$ (ca. 6 cm h.Wsp.).

Ex: Exodermis R: Rinde ZZ: Zentralzylinder

3.5.2.6 Berechnung der Permeabilität von Exodermiszellwänden

Aus den ermittelten Rb^+ Konzentrationen in den Zellwänden bzw. in den Interzellularen der Rinde kann die Permeabilität (P) verschiedener Zellwände z.B. für Rb^+ Ionen berechnet werden.

Der Fluß (J) bezeichnet die Stoffmenge (dn), die sich in der Zeit dt durch die hypothetische Querschnittsfläche F bewegt. F wurde zur Berechnung gleich 1 m^2 gesetzt. Für die Stoffmenge und die Zeit wurden die ermittelten bzw. vorgegebenen Werte eingesetzt. Außerdem muß für die Berechnung der Permeabilität noch die Konzentrationsdifferenz ($\Delta c = c_1 - c_2$) für Rb^+ zwischen den beiden Kompartimenten (außerhalb und innerhalb der Exodermis) eingesetzt werden. Hier wurde als Außenkonzentration die errechnete Rb^+ Konzentration in der Zellwand in einem Abstand von $20 \mu\text{m}$ zur Wurzeloberfläche eingesetzt.

$$P_{\text{Rb}^+} = \frac{J}{(c_1 - c_2)} \quad J = \frac{dn}{dt \cdot F}$$

P_{Rb^+} : Permeabilität der Zellwand für Rb^+ Ionen

Aus den Ergebnissen der EDX Analysen an osmotisch geschockten Gerstenwurzeln ergab sich für die Wurzelabschnitte $>10 \text{ cm h.Wsp.}$ eine Permeabilität der Zellwände für Rb^+ von $1,45 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ und für die Wurzelabschnitte $<10 \text{ cm h.Wsp.}$ eine Permeabilität der Zellwände für Rb^+ von $5,17 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Für die Wurzelabschnitte $>10 \text{ cm h.Wsp.}$ wurde dabei die Konzentration, die maximal in den Zellwänden vorhanden sein kann, ohne daß dabei Rb^+ nachweisbar ist (=Nachweisgrenze) vorliegt, zu Grunde gelegt. Die hier eingesetzte Rb^+ Nachweisgrenze beträgt etwa $11 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$.

Aus den Rb^+ Messungen in den Zellwänden von langsam aufgesalzene Wurzeln (Abb. 3.18) konnten ebenfalls die Permeabilitäten der Exodermiszellwände berechnet werden. Bei diesem Versuchsansatz betrug die Inkubationszeit nur 5 min. Einen Unterschied in den ermittelten Rb^+ p/b Verhältnissen zwischen den Varianten t1, t2 und t3 ist bis in die innere Tangentialwand der Exodermis (Meßpunkt ③ in Abb. 3.18), nicht aber in den inneren Rindenzellwänden zu finden. Für die Berechnung der Permeabilitäten wurden aus diesem Grund die mit Hilfe der Regressionskurve errechneten Konzentrationen in einem Abstand von $20 \mu\text{m}$ zur Wurzeloberfläche und in Meßpunkt ③ benutzt. Zum Zeitpunkt t1 ergab sich eine Permeabilität von $8,7 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, zum Zeitpunkt t2 von $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ und zum Zeitpunkt t3 von $7,4 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Berechnet man die Permeabilitäten der Zellwände für definierte Intervalle des Abstands zur Wurzeloberfläche, wird daraus der Zellwandabschnitt mit der niedrigsten Permeabilität für Rb^+ bestimmbar (Abb. 3.21). Aus Abb. 3.21 geht hervor, daß die niedrigste Permeabilität für Rb^+ im Zellwandabschnitt $20\text{-}35 \mu\text{m}$ Abstand zur Wurzeloberfläche vorliegt. Das gilt sowohl

für die Wurzelabschnitte >10 cm h.Wsp. als auch <10 cm h.Wsp., wobei dieser Befund bei den Wurzelabschnitten >10 cm h.Wsp. besonders deutlich ist (Abb. 3.21).

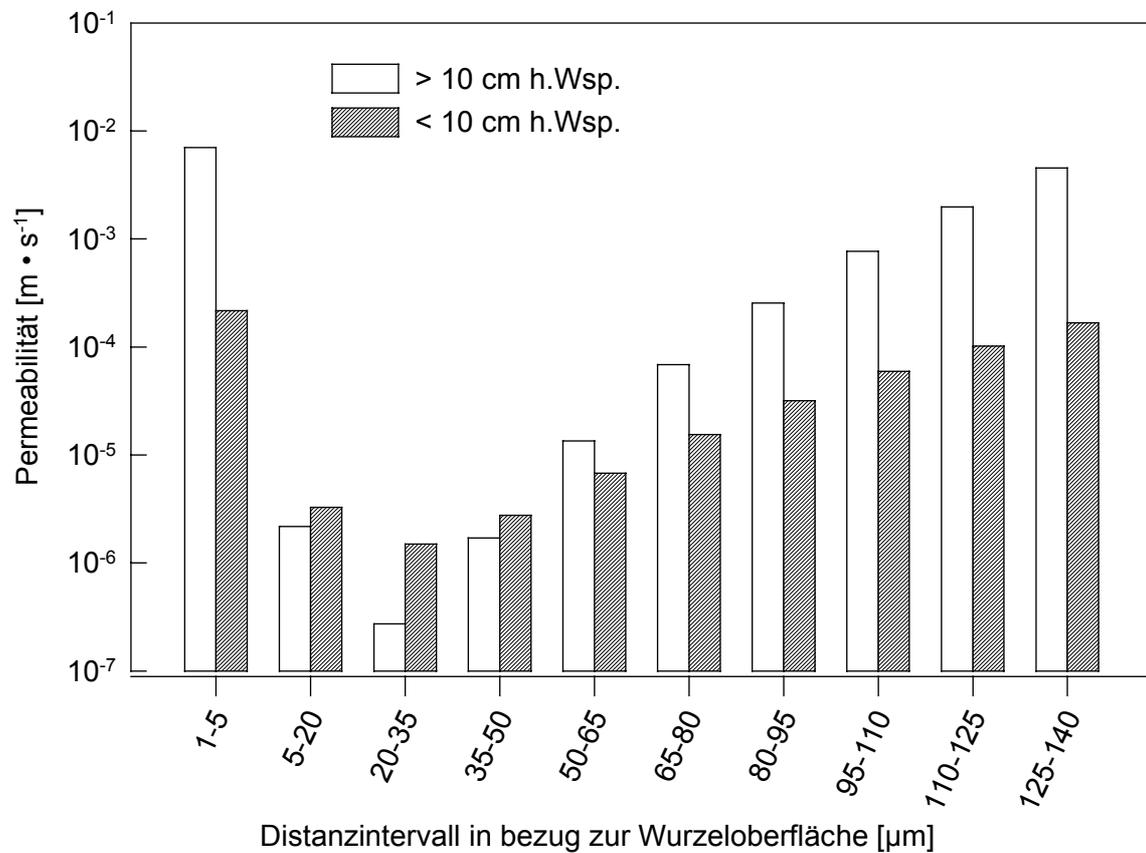


Abb. 3.21: Permeabilitäten für Rb^+ innerhalb definierter Zellwandstrecken in Abhängigkeit vom Abstand zur Wurzeloberfläche. Die Permeabilitäten wurden aus den Ergebnissen der EDX Analysen an osmotisch geschockten Wurzeln (Abb. 3.19) berechnet.

3.5.2.7 Tracerlokalisierung mit SIMS in Gefrierschnitten

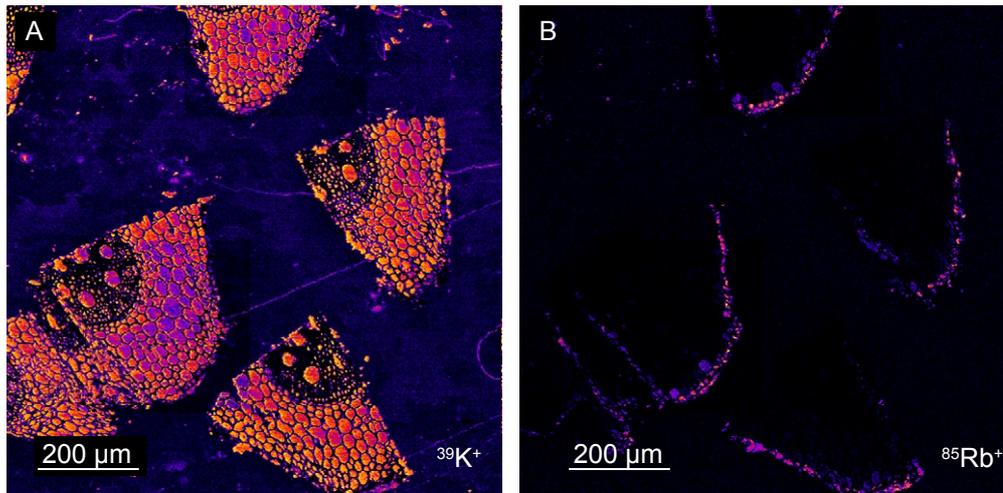


Abb. 3.22: Verteilungen der Isotope $^{39}\text{K}^+$ (A) und $^{85}\text{Rb}^+$ (B) in mehreren Gefrierschnitten von Gerstenwurzeln. Die Gefrierschnitte bestehen wegen der Probenpräparation jeweils nur aus ca. $\frac{1}{4}$ Sektoren eines kompletten Querschnitts.

- A: $^{39}\text{K}^+$ Verteilung
 B: $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung

Mit Hilfe der SIMS an gefriergetrockneten Kryoschnitten kann die Verteilung eines vorab den Wurzeln angebotenen Nährelements anhand seines Tracers (z.B. Rb^+ für K^+) und/oder anhand eines Isotops in einem Wurzelquerschnitt bildlich dargestellt werden (Abb. 3.22). Durch die Präparation der Kryoschnitte von zweiseitig getrimmten Wurzelstümpfen ergab sich als Meßfläche jeweils nur $\frac{1}{4}$ eines gesamten Wurzelquerschnitts (Abb. 3.22).

Die $^{39}\text{K}^+$ Verteilung ermöglicht eine gute strukturelle Zuordnung der Tracer innerhalb der Schnitte, da Kalium in pflanzlichen Zellen in relativ hohen Konzentrationen vorkommt (Abb. 3.22 A und Abb. 3.23 A u. E). Bereits auf den Übersichtsbildern (Abb. 3.22) ist zu erkennen, daß die intrazellulären K^+ -Konzentrationen wesentlich höher sind, als in den Zellwänden i.e.S. im Apoplasten. Dadurch erklärt sich auch, weshalb die Zellwände dunkel erscheinen. Dies ermöglicht bei stärkerer Vergrößerung ein relativ sicheres Erkennen der Zellen und deren Zuordnung zu diversen Geweben wie z.B. der Rhizodermis (Rhd), Exodermis (Ex), Rinde (R), Endodermis (Ed) und dem Zentralzylinder (ZZ) (Abb. 3.23 A). In Abb. 3.23 A erkennt man außerdem (Pfeil), daß nur wenige Zellen der Rhizodermis $^{39}\text{K}^+$ angereichert haben. Im komplementären $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilungsbild desselben Schnittes, sind die kaliumfreien Rhizodermiszellen stark mit $^{85}\text{Rb}^+$ markiert, während die kaliumreichen Rhizodermiszellen intrazellulär nicht mit $^{85}\text{Rb}^+$ markiert sind (Pfeil in Abb. 3.23 A u. B). Insgesamt beschränkt sich die $^{85}\text{Rb}^+$ Markierung überwiegend auf die Zellen bzw. Zellwände in der Nähe der Wurzeloberfläche. Dies wird besonders deutlich im Übersichtsbild der $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung, wo man die Schnitte nur anhand der $^{85}\text{Rb}^+$ Markierung ihrer Rhizodermiszellen erkennt (Abb. 3.22 B).

Weiterhin findet man $^{85}\text{Rb}^+$ in einigen frühen und späten Metaxylem Gefäßen (Abb. 3.23 B u. F).

Die $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung in den äußeren Zellschichten ist in Abb. 3.23 C und D bei stärkerer Vergrößerung dargestellt. Bei linearer Darstellung der Pixelintensität erkennt man, daß die $^{85}\text{Rb}^+$ Markierung der Zellwände bereits in den radialen Exodermiszellwänden abrupt endet (Pfeile in Abb. 3.23 C u. D). Bei einer logarithmischen Darstellung der Pixelintensitäten wird dies stärker verdeutlicht (Pfeil Abb. 3.23 D). Durch die logarithmische Darstellung der Intensitäten werden aber auch geringe Helligkeiten gegenüber hohen Helligkeiten optisch verstärkt, weshalb in den Wänden der inneren Rinde und hier besonders in den Interzellularen, $^{85}\text{Rb}^+$ deutlicher zum Vorschein kommt. Die dort vorliegende Konzentration scheint allerdings in sehr niedrig zu sein (Pfeilspitzen in Abb. 3.23 D).

Zur Bestimmung der relativen $^{85}\text{Rb}^+$ Intensitäten in den Interzellularen wurde das NIH-Image Programm verwendet (vergl. Kap. 2.3.3.2.2). Die farbcodierten Bilder wurden zunächst in Graustufen Bilder umgewandelt (Abb. 3.23 E u. F). Anschließend wurden in den $^{85}\text{Rb}^+$ Bildern die Flächen mit erhöhten Helligkeitswerten automatisch ausgewählt (Abb. 3.23 F). Die mittleren Helligkeiten in den ausgewählten Flächen konnten über das NIH-Image Programm ausgegeben werden. Durch Anzeigen der Flächenmarkierungen im $^{39}\text{K}^+$ Bild desselben Schnittes konnte kontrolliert werden, an welcher Stelle auf dem Wurzelquerschnitt sich die Meßflächen im $^{85}\text{Rb}^+$ Bild befanden (Abb. 3.23 E).

Die ermittelten $^{85}\text{Rb}^+$ Konzentrationen (vergl. Kap. 2.3.3.2.2) in den Interzellularen zeigen, daß im Mittel $1,9 \pm 1,1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ vorliegen (Tab. 9). Das entspricht einem $3,5 \pm 1,6\%$ igen Anteil der Pixelintensität in Beziehung zur Außenlösung, die 100 % gesetzt wurde. Analog dazu findet man in den mit $^{85}\text{Rb}^+$ markierten Metaxylemgefäßen (Mx in Abb. 3.23 B) einen relativen $^{87}\text{Rb}^+$ -Anteil von $29,0 \pm 12,0 \%$, was näherungsweise ein $^{85}\text{Rb}^+$ Konzentrationen von $17,4 \pm 7,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ entspricht (Tab. 9).

Aus den errechneten Konzentrationen in den Interzellularen der Gerstenwurzeln ließen sich wie für die Messungen mit der EDX Analyse die Permeabilitäten der Zellwände für Rb^+ berechnen (Tab. 9). Dabei ergab sich eine mittlere Permeabilität von $3,06 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

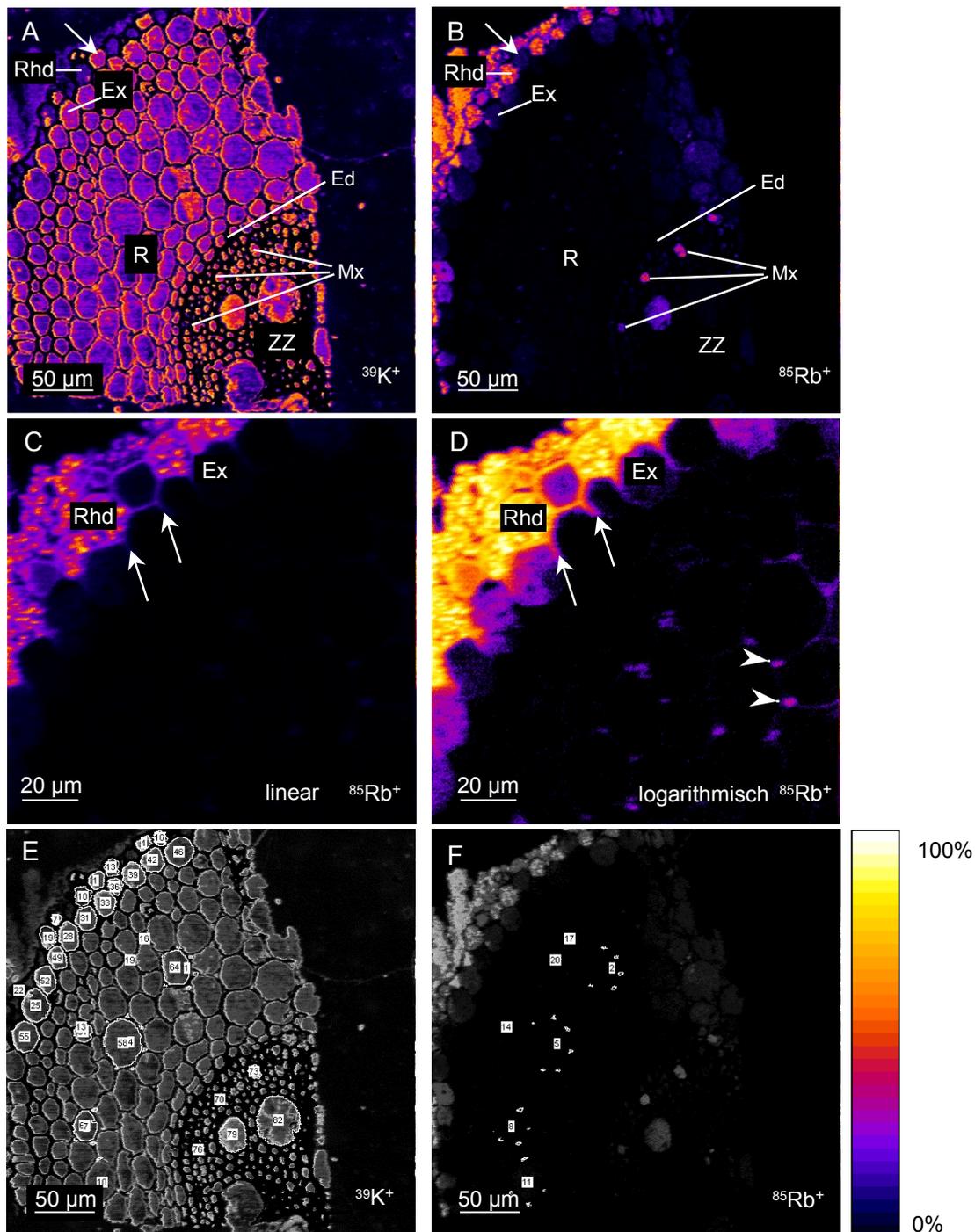


Abb. 3.23: Verteilung der Isotope $^{39}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ in Querschnitten von Gerstenwurzeln als Ergebnis der bildgebenden SIMS. Die intakten Wurzeln wurden vor dem Einfrieren für 2 min mit $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ RbCl}$ inkubiert.

A: $^{39}\text{K}^+$ Verteilung

B: $^{85}\text{Rb}^+$ in demselben Schnitt wie A

C: Der äußere Wurzelbereich bei stärkerer Vergrößerung zeigt die lineare Darstellung der Pixelintensitäten einer $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung in den Wänden der Rhizo- und Exodermis (Pfeile).

D: Logarithmische Darstellung der Pixelintensitäten aus C. Die Pfeilspitzen deuten auf $^{85}\text{Rb}^+$ Markierungen in den Interzellularen der Wurzelrinde.

E/F: Beispiel für die Auswertung von Isotopen Verteilungsbildern mit dem NIH-Image Programm. Nach Umwandlung der Farbcodierung in Graustufen wurden die mittleren Helligkeiten (lineare Darstellung der Pixelintensitäten) von ausgewählten Flächen (markierte und nummerierte Flächen in beiden Bildern) ermittelt.

Rhd: Rhizodermis Ex: Exodermis R: Rinde Ed: Endodermis
ZZ: Zentralzylinder

Tab. 9: *Relative Intensitäten von $^{85}\text{Rb}^+$ in den Interzellularen von Gerstenwurzeln bezogen auf die Intensität in der Außenlösung bekannter Konzentration. Mit Hilfe der bekannten Konzentration in der Außenlösung wurden die relativen Intensitäten gemessener Teilchen aus den Wänden in Konzentrationen umgerechnet. Die Wurzeln wurden vor dem Einfrieren für 120 s mit folgenden RbCl Lösungen inkubiert (Nr. 1-3: $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl für 2 min; Nr. 4: $30 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl).*

Probennr.	(n)	Interzellularen			Metaxylem Gefäße		
		%	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$	Permeabilität [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]	(n)	%	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
1	(7)	$4,7 \pm 1,0$	$2,8 \pm 0,6$	$4,09 \cdot 10^{-7} \pm 9,4 \cdot 10^{-8}$	(3)	$29,0 \pm 12,0$	$17,4 \pm 7,2$
2	(5)	$5,0 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,6$	$4,39 \cdot 10^{-7} \pm 9,4 \cdot 10^{-8}$			
3	(7)	$1,8 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,5$	$1,55 \cdot 10^{-7} \pm 7,8 \cdot 10^{-8}$			
4	(6)	$2,6 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,1$	$2,20 \cdot 10^{-7} \pm 3,4 \cdot 10^{-8}$			
Mittelwert	(4)	$3,5 \pm 1,6$	$1,9 \pm 1,1$	$3,06 \cdot 10^{-7} \pm 1,4 \cdot 10^{-8}$			

Werden $^{41}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ mit der Inkubationslösung gleichzeitig angeboten, ist es möglich die Verteilung beider Isotope in derselben Probe zu untersuchen (Abb. 3.24 A-D). Die Verteilungen von $^{39}\text{K}^+$ und $^{41}\text{K}^+$ zeigen Unterschiede zwischen beiden Isotopen (Abb. 3.24 A, B). Das $^{39}\text{K}^+$ Bild zeigt die überwiegend intrazelluläre Lokalisation des natürlich vorkommenden Kaliums. In dieser Probe erkennt man zusätzlich eine zur inneren Rinde hin ansteigenden $^{39}\text{K}^+$ Konzentrationsgradienten (Abb. 3.24 A). Das "Brutto" $^{41}\text{K}^+$ Bild (Abb. 3.24 B) zeigt ebenfalls intrazelluläres Vorkommen des Isotops, außerdem erkennt man sehr hohe $^{41}\text{K}^+$ Konzentrationen aus der Inkubationslösung an der Wurzeloberfläche, die auf das angebotene Medium zurückgeführt werden können. Die für die langfristig eingesetzte Nährlösung verwendeten Kaliumsalze enthalten Kalium in einer natürlichen Isotopenmischung bestehend aus $^{39}\text{K}^+$, $^{40}\text{K}^+$ und $^{41}\text{K}^+$, wobei $^{41}\text{K}^+$ einen relativen Anteil von 6,7% besitzt. Deshalb enthält pflanzliches Gewebe immer $^{41}\text{K}^+$, das aus der Nährlösung bzw. noch aus der Kaliumreserve der Karyopse stammt und in Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen als $^{41}\text{K}^+$ Background bezeichnet wird. Wird dieser $^{41}\text{K}^+$ Background vom „Brutto Bild“ abgezogen, ergibt sich die „Netto Verteilung“ des zusätzlich angebotenen $^{41}\text{K}^+$ -Tracers (Abb. 3.24 C; vergl. Kap. 2.3.3.2.2). Die "Netto Verteilung" des $^{41}\text{K}^+$ -Tracers zeigt große Mengen des Isotops an der Wurzeloberfläche, in den Zellen der inneren Rinde und in einigen Bereichen des Zentralzylinders lokalisiert (Abb. 3.24 C). Die Zellen der inneren Rinde weisen verständlicherweise nach der Subtraktion des $^{41}\text{K}^+$ - Backgrounds (Abb. 3.24 C) eine höhere Pixelintensität auf als im Bruttobild (Abb. 3.24 B).

Weil Rubidium natürlicherweise in Pflanzen nicht vorkommt ist die Kartierung des angebotenen $^{85}\text{Rb}^+$ (Abb. 3.24 D) gegenüber der berechneten Darstellung der $^{41}\text{K}^+$ Verteilung (Abb. 3.24 C) wesentlich genauer. Sie spiegelt exakt die experimentell angestrebte Situation wieder, anhand eines steilen Konzentrationsgradienten von der Wurzeloberfläche zum Wurzelinneren den apoplastischen Weg des Tracers zu verfolgen. Die $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung läßt

hingegen keinen Tracer in der inneren Rinde erkennen, sondern fast ausschließlich in der anhaftenden Inkubationslösung an der Wurzeloberfläche (Abb. 3.24 D). Die Geometrie des anhaftenden Mediums ist identisch mit derjenigen, welche beim $^{41}\text{K}^+$ Tracer an der Wurzeloberfläche beobachtet wurde (Abb. 3.24 B u. C).

Die Verteilung von $^{39}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ im Querschnitt durch eine Wurzelspitze zeigen die Abb. 3.24 E u. F. Die $^{39}\text{K}^+$ Verteilung in der Wurzelspitze ist nahezu homogen. Die Zellwände sind undeutlich und sehr schwer erkennbar (Abb. 3.24 E). Eine zelluläre Auflösung ist kaum möglich. Das $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilungsbild in der Wurzelspitze zeigt, wie an der Wurzelbasis, daß die höchsten Intensitäten des Tracers an der Wurzeloberfläche vorkommen (Abb. 3.24 F).

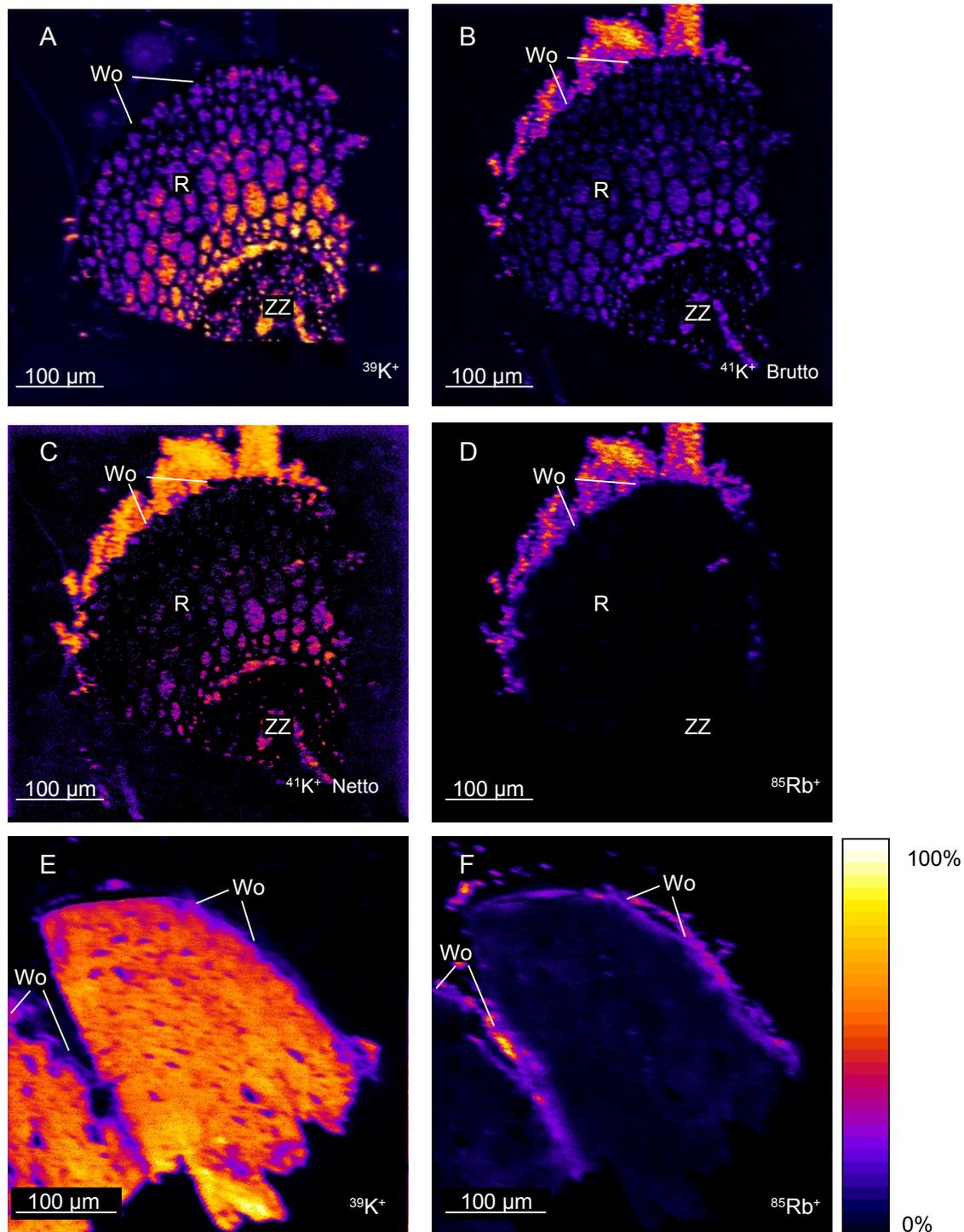


Abb. 3.24: Verteilungsbilder der Isotope $^{39}\text{K}^+$, $^{41}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ in Querschnitten von Gerstenwurzeln. Die Wurzeln wurden vor dem Einfrieren für 2 min mit $^{85/87}\text{RbCl}$ und ^{41}KCl ($30 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) inkubiert (Lösung 1, Tab. 2 S.16).

A-D Querschnitt von der Wurzelbasis (10 cm h.Wsp.)

E-F Ein Querschnitt von der Wurzelspitze (0,5-1,0 mm h.Wsp.)

A: $^{39}\text{K}^+$ Verteilung (= 'Kontrolle') entsprechend einer unbehandelten Wurzel (= natürlich vorkommendes, endogenes Kalium)

B: $^{41}\text{K}^+$ Brutto-Verteilung im selben Schnitt wie A

C: $^{41}\text{K}^+$ Netto-Verteilung; durch Verrechnung von B minus A (s. Text) entstandenes Verteilungsbild.

D: $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung im selben Schnitt wie A

E: $^{39}\text{K}^+$ Verteilung in einer quer geschnittenen Wurzelspitze

F: $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung in demselben Schnitt wie E

R: Rinde ZZ: Zentralzylinder Wo: Wurzeloberfläche

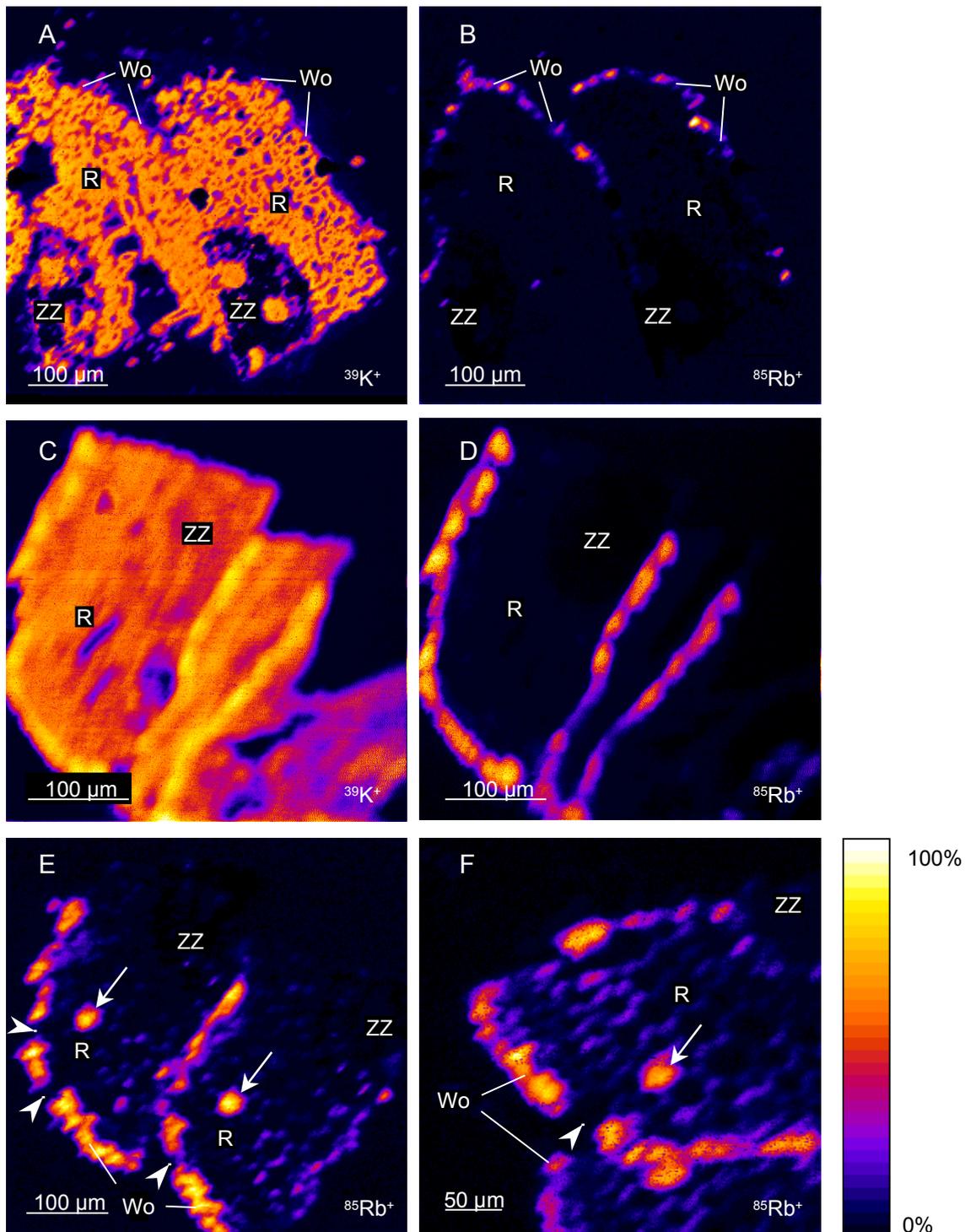


Abb. 3.25: Verteilungsbilder von $^{39}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ in Querschnitten aus dem Wurzelbasisbereich (A/B u. E/F) und von der Wurzelspitze (C/D). Die Wurzeln intakter Pflanzen wurden vor dem Einfrieren für 5 min (A/D) bzw. 2 min (E/F) mit einer 60 mM RbCl Lösung inkubiert. Die Wurzeln in E und F wurden vor der Inkubation mechanisch entlang der Oberfläche verletzt. ZZ: Zentralzylinder R: Rinde Wo: Wurzeloberfläche Die Pfeile deuten auf besonders starke $^{85}\text{Rb}^+$ Markierungen in der Rinde und die Pfeilspitzen auf "Lücken" in der $^{85}\text{Rb}^+$ Markierung an der Wurzeloberfläche.

Die Verteilung der Isotope $^{39}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ nach 5 minütiger Inkubation mit RbCl zeigt Abb. 3.25 A-D. Die Bilder sind von geringerer Qualität als die Bilder von Schnitten nach 2 minütiger Inkubation mit RbCl. Zellwände können zwar nicht identifiziert werden, aber eine großflächigere Zuordnung z.B. der Bereiche Zentralzylinder (ZZ) und Rinde (R) ist ebenso möglich, wie die Identifizierung der Wurzeloberfläche (Wo). Das zu Abb. 3.25 A korrespondierende $^{85}\text{Rb}^+$ Bild (Abb. 3.25 B) zeigt den angebotenen Tracer nach einer Inkubationsdauer von 5 min ausschließlich an der Wurzeloberfläche.

In der Wurzelspitze sind die Isotope $^{39}\text{K}^+$ und $^{85}\text{Rb}^+$ ähnlich wie in der Wurzelbasis verteilt d.h. $^{39}\text{K}^+$ findet man überall auf dem Querschnitt in relativ hohen Konzentrationen (Abb. 3.25 C), während $^{85}\text{Rb}^+$ nur in der Peripherie des Wurzelquerschnitts zu erkennen ist (Abb. 3.25 D). Trotz der geringeren Bildqualitäten bestätigen diese Experimente mit den längeren Inkubationszeiten (5 min) die der kürzeren, d.h. die mit nur 5 min Inkubation.

Um zu überprüfen, ob der angebotene Tracer innerhalb von 2 min prinzipiell durch den Apoplasten der Rinde bis zum Zentralzylinder vordringt und dort auch mit der SIMS nachweisbar ist, wurden die Wurzeln vor der Inkubation mit RbCl mit einer Rasierklinge entlang der Wurzelachse mechanisch verletzt. In den Schnitten dieser Wurzeln kann man $^{85}\text{Rb}^+$ sowohl in der Rinde als auch im Bereich des Zentralzylinders wiederfinden (Abb. 3.25 E/F). Die stärksten Markierungen sind aber auch hier an der Wurzeloberfläche zu finden. In der inneren Rinde ist außerdem auf allen drei Schnitten in Abb. 3.25 E/F eine räumlich eng begrenzte, besonders helle $^{85}\text{Rb}^+$ Markierung zu erkennen (Pfeil). In radialer Richtung von dieser Markierung aus gesehen sind die ansonsten recht gleichförmigen $^{85}\text{Rb}^+$ Markierungen an der Wurzeloberfläche unterbrochen (Pfeilspitzen in Abb. 3.25 E/F).

3.5.2.8 ESI/EELS und EDXA an Schnitten von gefriersubstituierten Wurzeln

Für die Elementanalytik mit der ESI/EELS Technik müssen vom gefriersubstituierten Wurzelmaterial zunächst ultradünne Schnitte (≤ 50 nm) angefertigt werden. Um derart dünne Schnitte verarbeiten zu können ist es notwendig sie im Trog des Messers auf einer Flüssigkeit aufschwimmen zu lassen, von der sie dann mit dem EM-Netz abgenommen werden können.

In Schnitten, die auf destilliertem Wasser aufgeschwommen sind, ist weder in RbCl behandelten Wurzeln noch in Kontrollen Rb^+ nachweisbar (Abb. 3.26). Um zu testen, ob Rb^+ prinzipiell mit der EELS nachweisbar ist, wurde statt destilliertem Wasser eine RbCl Lösung ($120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) zum Abschwimmen der Schnitte verwendet. In den Zellwänden von RbCl behandelten Wurzeln ist auch dann kein Rb^+ nachzuweisen, wenn die Schnitte auf einer konzentrierten KCl Lösung aufgeschwommen waren. In diesen Schnitten konnte Rb^+ in den Wänden von Wurzelzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.26 A/B). Dabei ist sowohl in den

Exodermiszellwänden von RbCl inkubierten Wurzeln, als auch in den Exodermiszellwänden von unbehandelten Wurzeln (Kontrollen) Rb^+ zu finden (Abb. 3.26 A/B).

Der Rb^+ -Nachweis in Schnitten, die auf RbCl Lösung aufgeschwommen sind beschränkt sich auf die Zellwände. In den zugehörigen Vakuolen ist selbst dann kein Rb^+ zu finden, wenn der Schnitt auf einer hoch konzentrierten RbCl Lösung aufgenommen wurde (Abb. 3.26 C). In Vakuolen von Schnitten, die auf destilliertem Wasser aufgeschwommenen sind, ist ebenfalls kein Rb^+ nachzuweisen (Abb. 3.26 D).

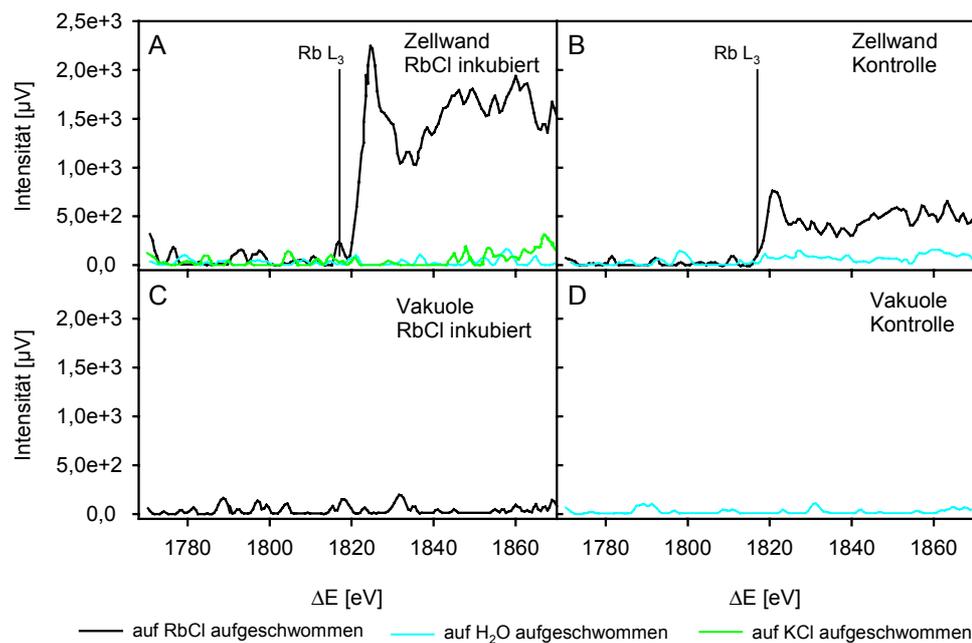


Abb. 3.26: EEL Spektren aufgenommen in den Zellwänden und Vakuolen der Exodermis von gefriersubstituierten Gerstenwurzeln. Die Wurzeln waren vor dem Einfrieren für 2 Minuten einer RbCl Lösung ($120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) ausgesetzt (A, C) oder sie waren unbehandelt (Kontrollen, B, D).

A, B: 5 Spektren aus Zellwänden.
C, D: 2 Spektren aus Vakuolen.

Im Gegensatz zu den Schnitten von gefriersubstituierten Wurzeln, wird in gefriergetrockneten Kryoschnitten von Standards sowohl in den Wänden als auch im Zelllumen Rb^+ nachgewiesen (Abb. 3.27). Auf dem Netto Rb^+ -Verteilungsbild tritt allerdings nur das Zelllumen deutlich hervor (Abb. 3.27 B). Aus den beiden Spektren geht hervor, daß Rb^+ auch in der Wand vorkommt. Aus der Wand erhält man bei gleicher Gesamtpulsrate während der Messung eine geringere Rb^+ -Intensität als aus dem Zelllumen. Die Intensität bei den EEL Spektren ist allerdings kein direktes Maß für die Konzentration eines Elementes in der Probe. Dennoch stimmt die Beobachtung, daß im Zelllumen ein höheres Rb^+ Signal als aus der Zellwand meßbar ist mit EDX Messungen an den Standards überein (Daten nicht dargestellt).

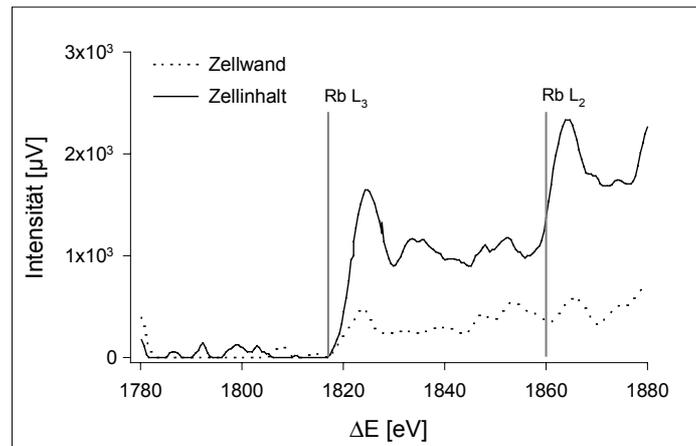
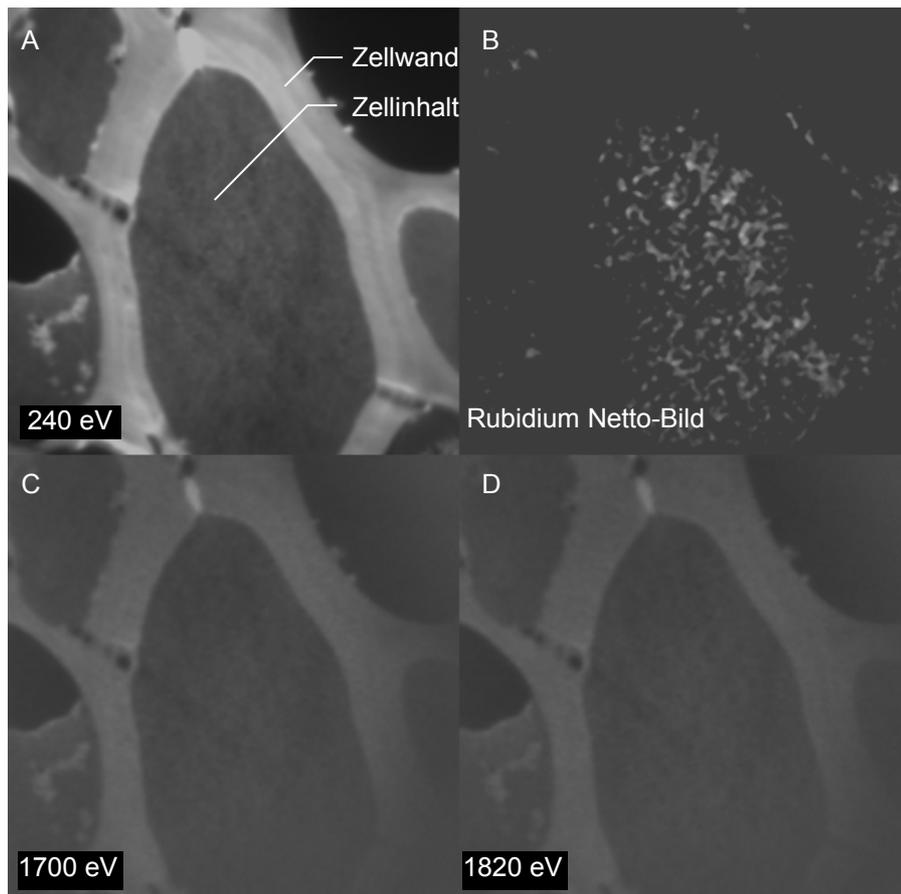


Abb. 3.27: ES Bilder (A-D) und EEL Spektren (E) eines Kryoschnittes, der von einem Standard (vergl. Kap. 2.3.3.2.1) hergestellt wurde.

A: Die ES Abbildung bei 240 eV zeigt die generelle Struktur einer Zelle aus dem Zentralzylinder.

B: Netto-Verteilung von Rb^+ in der abgebildeten Meßfläche. Die Netto-Verteilung ergibt sich aus der Subtraktion des Bildes bei 1700 eV (C, Background) vom Bild bei 1820 eV (D, Rb, L_3).

C: Background der Rb^+ Verteilung.

D: Brutto-Bild der Rb^+ -Verteilung.

E: zu den Bildern in A-D korrespondierende EEL Spektren aus dem Zellinhalt (durchgezogene Linie) und der Zellwand (gestrichelte Linie).

Schnitte von gefriersubstituierten Wurzeln wurden außerdem mit der EDX Analyse untersucht. Dazu wurden abgetötete Wurzelsegmente mit einer NaCl Lösung infiltriert um Standards zu erhalten und danach gefriersubstituiert. Anschließend wurden Wurzellängsschnitte angefertigt und im REM untersucht. Das Sekundärelektronenbild eines solchen Schnittes zeigt eine Konzentrierung von weiß erscheinenden, granulären Partikeln an den inneren Tangentialwänden der meisten Rindenzellen (Abb. 3.28 A). Die Partikel weisen nach den Ergebnissen von EDX Messungen eine hohe Konzentration an Na^+ und Cl^- auf (Abb. 3.28 B). Es liegt daher die Vermutung nahe, daß es sich bei den weißen Partikeln um Kochsalzkristalle handelt.

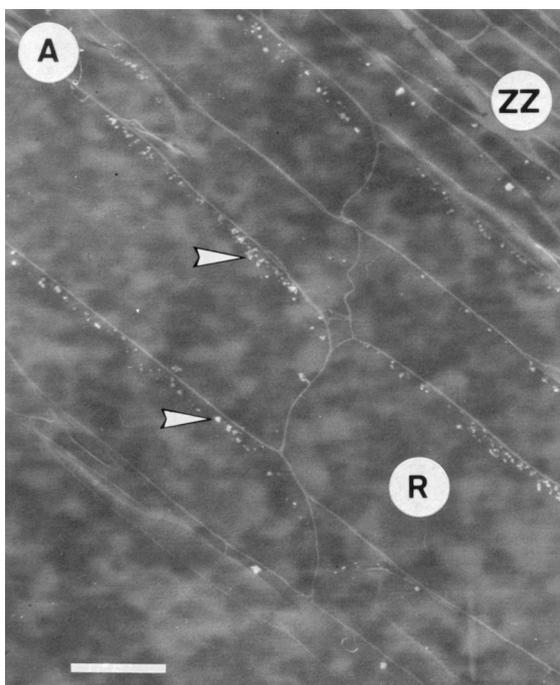
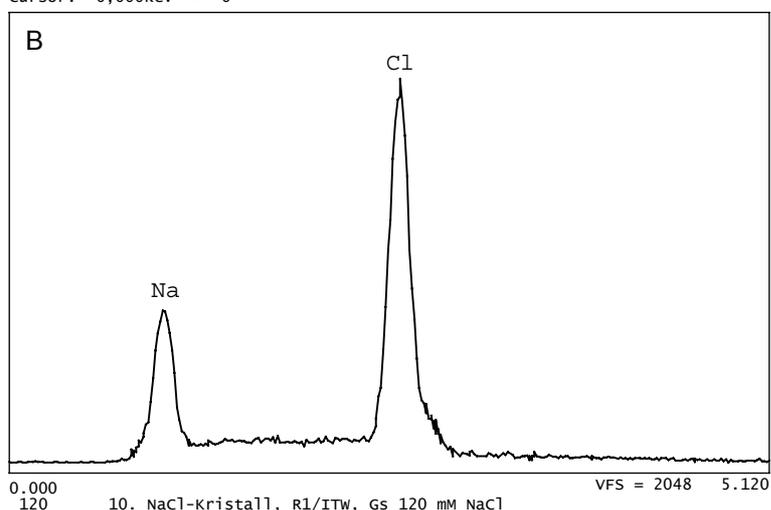


Abb. 3.28: SE-Bild von einer gefriersubstituierten, längs geschnittenen Gerstenwurzel (A) und repräsentatives EDX-Spektrum (B) eines "weißen Partikels" (Pfeilspitzen in A) aus der Rinde. Die Wurzel wurde vor dem Einfrieren abgetötet und zur Herstellung eines Standards mit einer NaCl Lösung ($120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) infiltriert.
R: Rinde ZZ: Zentralzylinder
Die Pfeilspitzen deuten auf weiße Kristalle. Balken: $20 \mu\text{m}$.

Botanisches Institut TiHo Hannover
cursor: 0,000keV = 0

WED 26-NOV-68 17:10



4 Diskussion

4.1 Pflanzenwachstum

Die Daten des Pflanzenwachstums (Abb. 3.1, Tab. 6) zeigen, daß die Pflanzen sich während der Kultur kontinuierlich entwickelt haben. Sowohl die Trockenmasse der Wurzeln als auch die Trockenmasse des Sprosses steigt an, wobei der Sproß zunächst schneller an Trockenmasse zunimmt als die Wurzeln (Abb. 3.1). Ein in etwa konstantes Sproß zu Wurzel (S/W) Verhältnis wird deshalb erst nach ca. 14 Tagen erreicht (Tab. 6). Das S/W Verhältnis ist für viele Pflanzen artspezifisch, jedoch innerhalb einer Spezies von vielen externen Faktoren abhängig. So führt Trockenstreß oder Nährstoffmangel zu einer Erniedrigung des S/W Verhältnisses, was unter anderem bedeutet, daß das Wurzelwachstum gegenüber dem Sproßwachstum gefördert wird. (Marschner, 1995). An drei Wochen alten Maispflanzen fanden z.B. Stasovski und Peterson (1991) eine Verringerung des S/W Verhältnisses von 2,6 in Kontrollen auf 1,6 in Pflanzen unter Trockenstreß. Demnach zeigt das S/W Verhältnis der verwendeten Gerstenpflanzen von 2,6 (Tab. 6) eine gute Nährstoff- und Wasserversorgung der Versuchspflanzen an. Der Verlauf der Wurzeltrockenmasse stimmt mit publizierten Daten zum Wurzelwachstum von Gerstenpflanzen auf Hydrokultur überein (z.B. Walker et al., 1998).

4.2 Kryoschnitte

Die SE-Bilder der Kryoschnitte, die mit den beschriebenen Verfahren zum Einfrieren und Schneiden der Proben zu erhalten waren, zeigen alle für EDX-Messungen im Apoplasten wichtigen Details (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Die Schnitte von der Wurzelspitze lassen sogar eine Identifizierung von Strukturen wie den Zellkernen zu (Abb. 3.10).

Allerdings gibt die Oberflächenstruktur der Kryoschnitte auch deutliche Hinweise auf die Bildung von Eiskristallen. Insbesondere in den basalen Wurzelabschnitten mit ausdifferenzierten Zellen, die Interzellularen, große wassergefüllte Vakuolen und relativ dicke Wände besitzen, ist die Bildung vieler kleiner Eiskristalle zu beobachten (Abb. 3.9). Die Kristalle sind jedoch in Relation zur Größe einer Zelle klein, so daß z.B. eine großräumige Umverteilung von im Wasser gelösten Substanzen über Zell- oder sogar Gewebegrenzen hinweg unwahrscheinlich ist. Zglinicki (1991) folgert aus theoretischen Überlegungen und praktischen Erfahrungen, daß die Verlagerung von Ionen entlang von Eiskristallen so gering sind, daß selbst die Unterscheidung von intrazellulären Kompartimenten noch möglich ist. Daß es sich bei den beobachteten Strukturen tatsächlich um Eiskristalle handelt, wird beim Vergleich der Schnitte von der Wurzelbasis mit Schnitten von der Wurzelspitze (Abb. 3.10) bzw. den infiltrierten Standards deutlich (Abb. 3.11). Weder in den proteinreichen, von großen Zentralvakuolen freien Zellen der Wurzelspitze noch in den mit einer 20%igen Dextranmatrix infil-

trierten Zellen der Standards sind derart große Eiskristalle wie in den Vakuolen zu beobachten. Durch den hohen Anteil organischer Moleküle als 'Gefrierschutzmittel' in wässriger Lösung und durch die stärkere Bindung des Wassers an die organische Matrix wird die Bildung größerer Eiskristalle verhindert (Echlin, 1992).

Um Proben von ausdifferenziertem pflanzlichen Gewebe zu erhalten, in denen es zu keiner Eiskristallbildung kommt, d.h. die vitrifiziert vorliegen, gibt es bisher nur ein Verfahren, bei dem die Proben unter Einwirkung von hohem Druck eingefroren werden (Moor, 1987). Die Vitrifizierung der Proben ist Voraussetzung, damit im Kryomikrotom Schnitte bei Temperaturen von <193 K angefertigt werden können. Bei höheren Temperaturen als 193 K kann es selbst in vitrifizierten biologischen Proben zur Bildung und zum Wachstum von Eiskristallen kommen, weshalb sie während des Schneidens nicht über diese Temperatur erwärmt werden sollten (Echlin, 1992).

Zum Hochdruckeinfrieren ist eine massive Vorbehandlung der Proben notwendig (Michel, 1991, Michel et al., 1991). Zum einen erlaubt das Einfriergerät nur eine maximale Probenlänge von 2 mm und Probenhöhe von 0,5 mm, so daß die Wurzeln in jedem Fall vor dem Einfrieren in Segmente zerschnitten werden müssen. Außerdem macht es der hohe Druck, der auf die Proben vor dem eigentlichen Einfrieren einwirkt notwendig, alle gasgefüllten Interzellularen durch Unterdruckinfiltration mit Hexadecen zu füllen. Beide Behandlungsschritte können dazu führen, daß die Ionenzusammensetzung in der Zellwand bereits vor dem Einfrieren in unkontrollierbarer Weise verändert wird, wodurch dieses Einfrierverfahren für die Analyse von löslichen, mobilen Ionen ungeeignet ist (Zglinicki, 1991).

Dennoch wurden Wurzeln mit der Hochdruckeinfrieremethode eingefroren, um das Schneiden von optimal gefrorenen Proben auszuprobieren (Ergebnisse nicht dargestellt). Es zeigte sich, daß Schnitte von hochdruckeingefrorenen Wurzelsegmenten nicht einfacher und/oder zuverlässiger angefertigt werden konnten, als solche von Wurzeln, die mit Propan eingefroren worden waren. Hinzu kam bei den hochdruckeingefrorenen Wurzeln, daß die Wurzelsegmente in der Kryokammer des Mikrotoms aus den zum Einfrieren verwendeten Aluminiumhalbschalen herausgebrochen werden mußten. Erschwert wurde dies zusätzlich dadurch, daß nicht in jeder Aluminiumhalbschale ein Wurzelsegment zu finden war. Schließlich mußten die Wurzelsegmente noch mit einem Kryokleber auf dem Mikrotomhalter festgeklebt werden. Dazu wurde eine Mischung aus Ethanol und 2-Propanol (2:3) verwendet, die bei 140 K zähflüssig und bei 115 K fest ist (Richter, 1994). Die gefrorene Probe konnte so bei 140 K in einem Tropfen dieser Mischung plaziert werden und nach Abkühlen des Probenkopfes auf 115 K Schnitte angefertigt werden.

Untersuchungen an erfolgreich hergestellten Kryoschnitten von hochdruckeingefrorenen pflanzlichen Proben, zeigen eine bessere Erhaltung der Ultrastrukturen (Michel, 1991; Frey et al. 1997), als die Kryoschnitte, die in der vorliegenden Arbeit angefertigt wurden. Michel

(1991) und Frey et al. (1997) konnten allerdings meist nur Schnitte von einzelnen Zellen bis maximal sehr kleinräumigen Gewebeausschnitten erzielen, während für die vorliegende Untersuchung nahezu komplette Querschnitte von Wurzeln benötigt wurden (Abb. 3.9, Abb. 3.10).

Kryoschnitte, die von pflanzlichen Proben angefertigt wurden, um daran die Elementverteilung mit EDXA oder SIMS zu untersuchen, wurden meist durch manuelles Eintauchen in flüssiges Propan oder Freon-22 eingefroren (z.B. Campbell et al., 1981; Cameron et al., 1984, Lazof et al., 1994). Auf Bildern von meristematischen Zellen aus Wurzelspitzen von Zwiebeln sind im STEM ähnliche ultrastrukturelle Details in den Zellen zu erkennen (Cameron et al., 1984), wie in der vorliegenden Untersuchung. In Übereinstimmung mit den gefriergetrockneten Kryoschnitten von basalen Gerstenwurzelabschnitten sind hingegen in Schnitten von ausdifferenzierten Maiswurzeln (Lazof et al., 1994) bzw. von Blattgelenken von *Samanea* (Campbell et al., 1981) überwiegend nur die Zellwände zu erkennen.

Für die Erhaltung der Ultrastrukturen in Kryoschnitten ist demnach das Hochdruckeinfrieren vermutlich das am besten geeignete Verfahren. In bezug auf die Analyse von löslichen Ionen im Apoplasten hat das Einfrieren von intakten Wurzeln in flüssigem Propan demgegenüber mehrere Vorteile:

- Die Wurzeln sind während der Versuchsdauer bis zum Zeitpunkt des Einfrierens in Propan intakt – die präparationsbedingte Verlagerung von löslichen Ionen in der Zellwand wird auf ein Minimum reduziert.
- Die Qualität der Kryoschnitte ist ausreichend, um die hier interessierenden Strukturen, nämlich die Zellwände zu erkennen und EDX-Messungen daran durchzuführen. Eine deutlich meßbare Verlagerung von Ionen innerhalb der Zellwand durch Eiskristallbildung oder -wachstum ist wegen des geringen Volumens der zur Verfügung stehenden Räume ($\leq 0,05 \mu\text{m}^3$)¹ kleiner als das räumliche Auflösungsvermögen der eingesetzten Analytik ($0,2 \mu\text{m}^3$)².
- Es können Kryoschnitte von der Größe $\frac{1}{4}$ Wurzelquerschnitts angefertigt werden. Auf einem Schnitt sind damit alle zu messenden Zellwände vorhanden.

4.3 Das Auflösungsvermögen von EDX-Analysen an Kryoschnitten

Der wichtigste Grund für die Verwendung von Kryoschnitten als Untersuchungsmaterial war die räumliche Auflösung der EDX-Analyse. Die Dicke der meisten Zellwände in der Gerstenwurzelrinde beträgt $\sim 0,5$ - $1,0 \mu\text{m}$. Es ist technisch problemlos möglich den Durchmesser des Elektronenstrahls im REM auf diese Größe zu fokussieren. Allerdings ist für die räumliche

¹ $0,5 \cdot 0,5 \cdot 0,2$ (Dicke der Zellwand² • Schnittdicke)

² $1 \cdot 1 \cdot 0,2$ (geschätzte Fläche des Anregungsvolumens • Schnittdicke)

Auflösung der EDXA nicht nur der Strahldurchmesser auf der Probenoberfläche entscheidend, sondern vor allem wie weit der Strahl in die Probe eindringt und dementsprechend aus welcher Tiefe noch Röntgenimpulse aus der Probe freigesetzt werden. Der Strahl der einfallenden Elektronen dringt dabei nicht parallel in eine dicke Probe ein, sondern verbreitert sich unterhalb der Probenoberfläche, was zu einem tropfenförmigen Anregungsvolumen innerhalb der Probe führt (beam broadening) (Abb. 4.1). Die Eindringtiefe des Elektronenstrahls und die Ausdehnung des angeregten Volumens sind vor allem von der Dichte der Probe und der Beschleunigungsspannung abhängig (Abb. 4.1). Dabei gilt je größer die Beschleunigungsspannung und je geringer Dichte der Probe, desto größer die Eindringtiefe und desto geringer die räumliche Auflösung. Die räumliche Auflösung ist deshalb z.B. in voll hydratisierten Gewebeblöcken besser als in gefriergetrockneten.

In dünnen bis zu 1 μm dicken Schnitten kommt es zu keiner Aufweitung des einfallenden Elektronenstrahls in der Probe (Abb. 4.1). Die räumliche Auflösung der EDXA wird demnach entscheidend verbessert, wenn statt dicker, im Block gefrorener Proben dünne Schnitte für die Analysen verwendet werden.

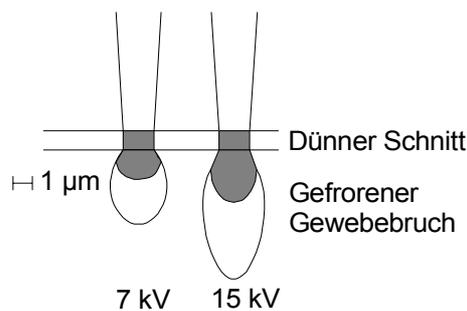


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der relativen Größe des Anregungsvolumens in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung in Schnitten und Gewebeblöcken (verändert nach Echlin, 1992).

Die EDX Messungen an Kryoschnitten und den dazugehörigen gefrorenen Probenstümpfen (Abb. 3.12) ermöglichen den Vergleich zwischen Kryoschnitten und gefrorenen Gewebeblöcken (Abb. 3.13). In Wurzeln, denen vor dem Einfrieren für 2 min $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl angeboten wurde, zeigen die Konzentrationen der Elemente Rb^+ , Cl^- und K^+ im Block gefrorener Proben und Kryoschnitten prinzipiell einen ähnlichen Verlauf (Abb. 3.13). Rb^+ und Cl^- sind nur in den äußersten beiden Zellwänden sicher nachzuweisen, während für K^+ ein Anstieg des p/b Verhältnisses innerhalb der Wurzelrinde zu beobachten ist, mit den Minimalwerten an der Wurzeloberfläche und im Zentralzylinder.

Die p/b Verhältnisse für Rb^+ und Cl^- sind in den Kryoschnitten in den äußeren beiden Zellwänden in etwa um den Faktor 5 kleiner als in den im Block gefrorenen Proben (Tab. 8). Die Ausbeute an elementspezifischen Röntgenquanten ist proportional zur angeregten Masse. Demnach errechnet sich die ungefähre Tiefe aus der noch Röntgenquanten aus der Probe freigesetzt wurden zu $1,5 \mu\text{m}$ ($0,3 \mu\text{m}$ Schnittdicke $\cdot 5$). Echlin (1992) gibt für K^+ und Cl^- in

einer Protein-Wasser Matrix eine Tiefenauflösung von 2 μm bei 15 kV Beschleunigungsspannung an. Die größere Eindringtiefe bei Echlin (1992) mag ein Effekt der von der Zellwand verschiedenen Protein-Wasser Matrix sein oder auch des unterschiedlichen Grades der Gefrierdrying der Proben. Die untersuchten Wurzelblöcke waren nur oberflächlich leicht 'angeätzt' nicht aber gefriergetrocknet.

Der direkte Vergleich zwischen Messungen an im Block gefrorenen und Kryoschnitten zeigt andererseits auch Probleme bei der Interpretation der Meßergebnisse auf. So ergibt sich als Nachweisgrenze für die meisten Elemente an im Block gefrorenen Proben in der Regel ein p/b Verhältnis von etwa 0,1. Die Nachweisgrenze sollte abhängig von der Meßmethode und den gewählten Meßbedingungen und unabhängig von der untersuchten Probe sein. Dementsprechend könnte keines der gemessenen p/b Verhältnisse in den Kryoschnitten als Elementnachweis interpretiert werden, da alle p/b Verhältnisse kleiner als 0,1 sind. Wird umgekehrt das Rb^+ p/b Verhältnis von Standards, die kein Rb^+ enthielten, von 0,026 (Abb. 2.6) als Nachweisgrenze definiert, so müßte in allen untersuchten Zellwänden der gefrorenen Gewebeblöcke von einem Rb^+ -Nachweis ausgegangen werden. Diese Überlegungen zeigen, daß die "Nachweisgrenze", d.h. der noch nachweisbare relative Massenanteil eines Elementes im angeregten Probenvolumen in gefrorenen Gewebeblöcken und in Kryoschnitten von verschiedenen Faktoren beeinflußt sein muß. Ein Unterschied dürfte darin bestehen, daß die unspezifische "Bremsstrahlung" (background) in gefrorenen Gewebeblöcken durch die Wechselwirkung der Elektronen mit der stark wasserhaltigen Matrix entsteht, während sie bei den Messungen an Schnitten überwiegend durch die Wechselwirkung mit dem metallischen Untergrund des Kupfer-Probenhalters zustande kommt. Außerdem wird in gefrorenen Gewebeblöcken ein Teil der charakteristischen Röntgenstrahlung innerhalb der Probe absorbiert (Echlin, 1992), wodurch das Verhältnis von charakteristischer Röntgenstrahlung zu "Bremsstrahlung" (p/b-Verhältnis) vermindert wird. In Schnitten kommt es zu keiner Absorption von Strahlung in der Probe; es kann im Gegenteil sogar zu einer mehrfachen Anregung der Probe und damit zur Verbesserung des p/b Verhältnisses durch die von der Metalloberfläche des Probenhalters zurückgestreuten Elektronen kommen. Beide Effekte zusammen könnten eine Erklärung für die unterschiedlichen p/b Verhältnisse bei den Nachweisgrenzen zwischen gefrorenen Gewebeblöcken und Kryoschnitten sein. Dadurch wird auch deutlich, daß eine Quantifizierung der EDX Analysen nur im direkten Vergleich mit analog gefertigten Standards möglich ist, die in möglichst allen ihren Materialeigenschaften der jeweiligen Probe ähnelt.

Mit Hilfe der dextraninfiltrierten Wurzelsegmente wurde demnach versucht diesen Vorstellungen gerecht zu werden (Kap. 2.3.3.2.1). Die errechneten Rb^+ -Konzentrationen in den Zellwänden der Rhizodermis zeigen dementsprechend auch, daß eine Quantifizierung realistische Ergebnisse liefert (Abb. 3.16). Wird an der Oberfläche eine Rb^+ -Konzentration

von $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ angeboten, so findet man in den Rhizodermiszellwänden eine Rb^+ -Konzentration von etwa $40 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$. Die niedrigere Konzentration in den Zellwänden kann durch eine "Verdünnung" der Inkubationslösung durch das Zellwandmaterial erklärt werden. Daß die Standards in bezug auf ihre Eigenschaften dennoch nicht identisch mit den Zellwänden sind zeigt die Tatsache, daß in Zellwänden von Kontrollen negative Konzentrationen errechnet wurden (Abb. 3.16). Die aus den EDX-Analysen errechneten Konzentrationen sollten deshalb als erste Näherung betrachtet werden. Fest steht, daß kleinere p/b-Verhältnisse als das mittlere p/b-Verhältnis aus einem Standard, der kein Rb^+ , K^+ oder Cl^- enthalten hat, in keinem Fall als Nachweis für die Präsenz eines dieser Elemente gewertet werden können.

Berechnet man für die p/b Verhältnisse von K^+ den Faktor zwischen Kryoschnitten und gefrorenen Gewebebrüchen, so findet man abweichend von Rb^+ und Cl^- einen Wert von ungefähr 10 (Tab. 8). Dieser Unterschied in den Faktoren läßt sich dadurch erklären, daß aufgrund des Anregungsvolumens in gefrorenen Gewebeblöcken ein hoher Anteil des K^+ p/b Verhältnisses vermutlich aus dem an die Zellwand angrenzenden Cytoplasma stammt. Im Umkehrschluß läßt sich daraus ableiten, daß das gemessene Rb^+ und Cl^- in den gefrorenen Gewebeblöcken nahezu ausschließlich in der Zellwand lokalisiert sein muß, denn das Anregungsvolumen ist sowohl für K^+ als auch für Rb^+ und Cl^- annähernd dasselbe. Wären also nennenswerte Konzentrationen von Rb^+ oder Cl^- im Cytoplasma vorhanden gewesen, so hätte der Faktor zwischen den p/b Verhältnissen in Kryoschnitten und im Block gefrorener Proben für alle Elemente gleich sein müssen.

Andererseits ist davon auszugehen, daß auch bei den Messungen an Kryoschnitten ein Teil des K^+ Signals aus dem Cytoplasma stammt. Der Anteil des Cytoplasmas am gesamten Signal ist jedoch bei Verwendung von Kryoschnitten nur etwa halb so hoch wie in gefrorenen Gewebeblöcken. Daß das Signal aus dem Cytoplasma nicht vollständig unterdrückt wird, mag wiederum damit zusammenhängen, daß die Schnitte auf einer Metalloberfläche liegen. Die Elektronen, die den Schnitt durchstrahlt haben, werden an der Metalloberfläche des Probenhalters gestreut und regen die Probe anschließend erneut an. In welcher Richtung die Elektronen gestreut werden ist jedoch zufallsabhängig, weshalb eine Anregung von angrenzendem Cytoplasma möglich ist. Gegenüber gefrorenen Gewebeblöcken erzielt die Verwendung von Kryoschnitten für die EDXA dennoch eine deutliche Verbesserung der räumlichen Auflösung insbesondere wegen der geringen Tiefe.

4.4 Die Anwendung von EELS/ESI an gefriersubstituierten Wurzeln

Mit Hilfe der EELS/ESI ist es möglich die Verteilung von Elementen auf ultrastrukturellem Niveau zu untersuchen, wobei eine sehr hohe räumliche Auflösung bis zu 10 nm (in speziellen Fällen bis zu 1 nm) erreicht werden kann (Echlin, 1992). Das Meßverfahren kann aber nur an Ultradünnschnitten durchgeführt werden, da es sonst zu einer Mehrfachstreuung der

Elektronen in der Probe und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen kann. Mit dem erarbeiteten Protokoll für die Herstellung von Kryoschnitten konnten von unbehandelten Wurzeln allerdings nur 300 nm dicke Schnitte hergestellt werden; von dextransfiltrierten Wurzelsegmenten (Standards, Kap. 2.3.3.2.1), waren jedoch 100 nm dünne Schnitte zu erhalten, deren Dicke nach der Gefriertrocknung mit Hilfe des Energieverlusts eingestrahelter Elektronen zu ungefähr 80 nm errechnet wurde. An den Schnitten von Standards, die Rb^+ enthielten, konnten EELS und ESI Messungen durchgeführt werden, die zeigten, daß in trocken abgenommenen Schnitten Rb^+ nachweisbar ist (Abb. 3.27). Um von unbehandelten Wurzeln Schnitte geeigneter Dicke zu erhalten wurden schockgefrorene Wurzeln gefriersubstituiert und anschließend ultradünne Schnitte hergestellt. In diesen Präparaten war jedoch kein Rb^+ nachweisbar, wenn die Schnitte auf destilliertem Wasser abgeschwommen waren (blaue Linien in Abb. 3.26). Im Gegensatz dazu wurde Rb^+ in den Zellwänden von Wurzeln nachgewiesen, deren Schnitte auf einer RbCl -Lösung abgeschwommen waren, unabhängig davon, ob die Wurzeln vor dem Einfrieren mit RbCl behandelt wurden oder nicht (schwarze Linie in Abb. 3.26). Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die diffusiblen Ionen aus den Schnitten in das destillierte Wasser des Trogs ausgewaschen wurden. Umgekehrt binden Rb^+ Ionen aus der Lösung im Trog des Diamantmessers vermutlich bevorzugt an die negativen Bindungsstellen der Zellwandpektine der Zellwänden, weshalb sie dort gut nachweisbar sind. Auch ein Überangebot an K^+ in der Lösung des Troges kann das Auswaschen von Rb^+ aus den Schnitten scheinbar nicht verhindern, denn in Schnitten von RbCl behandelten Wurzeln, die auf einer KCl Lösung ($240 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) aufgeschwommen waren war ebenfalls kein Rb^+ nachzuweisen (grüne Linie in Abb. 3.26 A). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß die anorganischen Ionen bereits durch die Gefriersubstitution aus den Proben ausgewaschen wurden. EDX-Messungen an Längsschnitten von gefriersubstituierten Gerstenwurzeln, die vor dem Einfrieren mit einer NaCl Lösung infiltriert wurden, zeigen jedoch, daß in den Zellen noch Natrium und Chlor nachweisbar ist (Abb. 3.28B). Aus den Messungen geht ebenfalls hervor, daß das NaCl in den Zellen nicht homogen wie in der Infiltrationslösung verteilt ist, sondern in Form von NaCl Kristallen an den inneren Tangentialwänden der Rindenzellen ausgefallen ist (Abb. 3.28). Das bedeutet, daß während der Gefriersubstitution die löslichen Ionen zwar verlagert und an der nächsten mechanischen Grenze (Zellwand) ausgefällt wurden, aber nicht ganz aus dem Gewebe ausgewaschen wurden. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Orlovich und Ashford (1995), die in gefriersubstituierten Tropfen von Salzlösungen keine Verlagerung oder Konzentrierung der Ionen feststellen konnten. In jedem Fall verdeutlichen die Ergebnisse, daß sowohl die Gefriersubstitution, als auch die anschließende Präparation der Schnitte einen Einfluß auf die Verteilung von leicht löslichen, mobilen anorganischen Ionen haben. Um die EELS/ESI Technik sinnvoll zu nutzen sollten Tracer verwendet werden, die nicht oder nur

sehr schwer innerhalb der Probe verlagert bzw. ausgewaschen werden. In diesem Zusammenhang hat sich die Verwendung von La^{3+} bestens bewährt, z.B. um den apoplastischen Transportweg wasserlöslicher Substanzen in Wurzeln zu verfolgen (Peterson et al., 1986; Lehmann et al., 2000). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Verteilung des elektronendichten La^{3+} -Tracers in Wurzelquerschnitten deuten ebenfalls darauf hin, daß die Exodermis von Nodalwurzeln eine Diffusionsbarriere ist (Lehmann et al., 2000).

4.5 Die Caspary-Streifen in der Exodermis

Die Definition der Exodermis, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird, geht auf eine Ergänzung der Definition nach Guttenberg (1940) durch Peterson (1989) zurück. Nach Peterson (1989) gilt als Exodermis ein hypodermales Gewebe, welches, zusätzlich zur Präsenz einer Suberinlamelle (Definition nach Guttenberg, 1940), Inkrusten in den radialen Zellwänden aufweist, die denen des Caspary-Streifens der Endodermis zumindest ähneln. Diese lassen sich mit einer Kombinationsfärbung aus Berberinsulfat und Anilinblau im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen (Brundrett et al., 1988).

Die Untersuchungen der Gerstenwurzeln auf die Präsenz einer Exodermis zeigten, daß diese regelmäßig in den Adventivwurzeln der zweiten Generation ausdifferenziert wird (Abb. 3.2, Abb. 3.3). Die Differenzierung zur Exodermis ist dabei vom Abstand zur Wurzelspitze abhängig. In den Nodalwurzeln der Gerstenpflanzen konnte mindestens 3–4 cm hinter der Wurzelspitze eine Exodermis nachgewiesen werden. Einen Einfluß auf die Differenzierung der Exodermis scheint auch das umgebende Medium zu haben. So wurde für die Gerstenwurzeln beobachtet, daß in Wurzelsegmenten, die in der feuchten Atmosphäre zwischen der Nährlösungsoberfläche und dem Deckel des Kulturgefäßes gewachsen waren, die Exodermis am frühesten, d.h. bereits sehr nah hinter der Wurzelspitze ausgebildet wurde (Abb. 3.2 A). In vergleichbaren Wurzelabschnitten, die in die Nährlösung eintauchten, war die Exodermis häufig nur unvollständig vorhanden (Abb. 3.2 B/C). Ähnliche Effekte wurden auch für Maiswurzeln beschrieben (Enstone und Peterson, 1998; Zimmermann und Steudle, 1998). Bei Pflanzen deren Wurzeln in feuchter Luft (Nebelkultur) angezogen wurden, war eine Exodermis wesentlich häufiger ausgebildet als in Wurzeln, die in die Nährlösung eintauchten. In Übereinstimmung damit wurde in den Zellwänden der Endodermis und der Rhizo- und Hypodermis von jungen Maiswurzeln aus Nebelkultur eine gegenüber Hydrokulturwurzeln signifikant erhöhte Konzentration an Suberin und Lignin beobachtet (Zimmermann et al., 2000). Damit einher ging eine reduzierte hydraulische Leitfähigkeit der Maiswurzeln aus Nebelkultur. So läßt sich auch erklären, weshalb in einer Untersuchung von 180 Pflanzenarten auf die Präsenz einer Exodermis die Gerste als eine Pflanze ohne Exodermis eingestuft wurde (Perumalla et al., 1990). Dies mag daran gelegen haben, daß die dabei untersuchten Pflanzen höchsten 2 Wochen alt waren und deshalb nur Keimlingswurzeln zur

Verfügung standen, bei denen auch in der vorliegenden Arbeit keine Exodermis nachgewiesen werden konnte.

Nach Brundrett et al. (1988) soll die Färbung mit Berberinsulfat/Anilinblau die pflanzlichen Makromoleküle Suberin, Lignin und Callose in den Zellwänden sichtbar machen. Deshalb wurde mit Sudan III und Phloroglucin untersucht, welche Gewebe eines Gerstenwurzelquerschnitts suberinisiert bzw. lignifiziert sind. Die Ergebnisse zeigen, daß in Nodalwurzeln die Zellwände von Endo- und Exodermis für Suberin und Lignin einen positiven Nachweis ergeben (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Allerdings beschränkt sich die Färbung nicht allein auf die radialen Zellwände der Endo- und Exodermis, in denen die Fluoreszenz nach der Färbung mit Berberinsulfat und Anilinblau auftritt (Abb. 3.3), sondern sie ist in allen Zellwänden dieser Gewebe zu finden (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Die Fluoreszenz in den Radialwänden von Endo- und Exodermis kann deshalb nicht ausschließlich auf die Präsenz, d.h. auf die Inkrustierung mit Suberin und Lignin zurückgeführt werden.

Die Zusammensetzung und der relative Anteil von Suberin und Lignin in den Zellwänden der Endodermis und den beiden äußersten Zellschichten (Rhizo- und Hypodermis) verschiedener Pflanzenarten wurde in mehreren Arbeiten untersucht (Schreiber et al., 1999; Zeier et al., 1999; Zimmermann et al., 2000). Die Ergebnisse sind zum Teil recht uneinheitlich. Während für die monokotylen Arten *Monstera deliciosa* (Liebm.) und *Clivia miniata* (Reg.) ein hoher Ligningehalt in Relation zum Suberin in den Casparystreifen ermittelt wurde (Schreiber et al., 1999), finden Zeier et al. (1999) in Mais nur sehr geringe Ligninkonzentrationen und Zimmermann et al. (2000) konnten in Caspary-Streifen von Mais überhaupt kein Lignin nachweisen. Die Bestimmung des Lignins erfolgte in allen Untersuchungen nach derselben Methode. Insgesamt nimmt bei Mais mit fortschreitender Differenzierung der Gewebe der Gehalt an Lignin und Suberin von Endodermis und Rhizo- und Hypodermis zu (Zeier et al., 1999). Die Zusammensetzung des aliphatischen Suberinanteils ist in den Zellwänden der Endodermis und der Rhizo- und Hypodermis unterschiedlich. In der Endodermis besteht das Suberin überwiegend aus Fettsäuren mit C₁₆ und C₁₈ Körpern, während in Rhizo- und Hypodermis langkettigere (C₂₄ und C₂₆) dominieren (Zeier et al., 1999).

Im ultrastrukturellen Bild zeichnen sich die Caspary-Streifen der primären Endodermis durch eine glatte Zellwandoberfläche und eine stets enge Verbindung zwischen Plasmalemma und Zellwand aus, die selbst unter plasmolytischen Bedingungen bestehen bleibt (Bonnet, 1968; Robards et al., 1973; Gunning und Steer, 1975). Von allen anderen Endodermiszellwänden löst sich das Plasmalemma ab, weshalb dieser Zustand als Bandplasmolyse bezeichnet wird (Mager, 1933). Die enge Verbindung zwischen Plasmalemma und Zellwand wird vermutlich durch Proteine hergestellt, die sowohl in der Plasmamembran als auch in der Zellwand fest verankert sind. So geben Schreiber et al. (1999) für isolierte Caspary-Streifen der Endodermis vergleichsweise hohe Proteingehalte von ~13% des gesamten Zellwandisolates an.

In der Exodermis sind unter Plasmolyse-Bedingungen ebenfalls Strukturen nachgewiesen worden, die auf Bandplasmolyse hindeuten (Peterson und Emanuel, 1983; Enstone und Peterson, 1997). Bei Betrachtung der Ultrastruktur haben sich jedoch Unterschiede zur Endodermis gezeigt. Bei Plasmolyse liegt die Plasmamembran der Exodermiszellen nicht dicht an der Zellwand an, sondern ist über fädige Strukturen mit der radialen Zellwand verbunden, so daß zwischen Wand und Plasmamembran ein schmaler Spalt bleibt (Holzamer, 1998; Lehmann et al., 2000). Ob es sich bei diesen Strukturen ebenfalls um Proteine handelt, ist nicht bekannt. Denkbar ist, daß die Fluoreszenz in den radialen Zellwänden von Endo- und Exodermis durch die gleichzeitige Präsenz von Suberin, Lignin und spezifischen Proteinen zustande kommt. Dementsprechend müßte davon ausgegangen werden, daß auch in der Exodermis Proteine für die Plasmalemma – Zellwandverbindung vorhanden sind.

4.6 Die Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde für Evans Blue

Eine erste Annäherung an die Frage nach der Zugänglichkeit des Wurzelapoplasten für anorganische Ionen ist mit Hilfe von Farbstoffen möglich, die auf Ihrem Weg in die Wurzeln lichtmikroskopisch beobachtet werden können. Um den symplastischen Transportweg auszuschließen, ist dazu allerdings ein Farbstoff notwendig der nicht in die Zellen aufgenommen wird. Als ein derartiger Farbstoff hat sich Evans Blue erwiesen. Evans Blue dringt erst in pflanzliche Zellen ein, wenn diese abgestorben oder geschädigt sind (Grunwaldt et al. 1978; Taylor und West, 1980) und ist damit gut als Apoplasten-Marker geeignet.

Bei der Präparation von Wurzelquerschnitten, die mit Evans Blue inkubiert wurden muß darauf geachtet werden, daß nicht bereits durch das Anfertigen der Schnitte der Farbstoff verlagert wird. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit handgefertigte Schnitte mit Querschnitten verglichen, die von gefrorenen Wurzelsegmenten am Kryostat hergestellt wurden (Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Durch die Gefrierimmobilisation wird der Farbstoff dort fixiert, wo er sich bis zum Zeitpunkt des Einfrierens gerade befand. Bei handgefertigten Schnitten besteht hingegen die Möglichkeit einer Umverteilung des Farbstoffs, nachdem die Schnitte bereits präpariert sind. Hinzu kommt, daß Querschnitte, die am Kryostaten angefertigt wurden von gleichmäßigerer und kontrollierterer Dicke sind als Handschnitte. Beide Faktoren zusammen führen dazu, daß die Lokalisation von Evans Blue in Kryostatschnitten zuverlässiger sein dürfte als in Handschnitten. Die Ergebnisse zeigen, daß für die Wurzelspitzen Unterschiede in der Verteilung von Evans Blue zwischen den handgefertigten Querschnitten und den Kryostatschnitten bestehen. Während Evans Blue in den Handschnitten von Kontrollwurzeln recht weit in die Wurzelrinde eingedrungen zu sein scheint (Abb. 3.6 A), ist es in den Kryostatschnitten ausschließlich an der Wurzeloberfläche lokalisiert (Abb. 3.6 E). Dieses Ergebnis unterstützt Befunde an Wurzelspitzen von Arten mit Exodermis (*Zea mays*, *Allium cepa*, *Helianthus annuus*) und ohne Exodermis (*Vicia faba*, *Pisum sativum*), in denen der Farbstoff

Berberinsulfat ebenfalls nur an der Wurzeloberfläche lokalisiert werden konnte (Enstone und Peterson, 1992b). Der Vergleich von Hand- und Kryostatschnitten von osmotisch geschockten Wurzeln zeigt, daß in Handschnitten Evans Blue über den gesamten Querschnitt verteilt ist (Abb. 3.6 B), während es in Kryostatschnitten lediglich 2-3 Zellschichten tief in die Rinde vorgedrungen ist (Abb. 3.6 F). Der Vergleich mit den Hellfeldbildern (Abb. 3.6 C/D) zeigt, daß die blaue Markierung sowohl für die Kontrollen als auch für die osmotisch geschockten Wurzeln nicht so weit in der Rinde zu erkennen ist, wie die rote Markierung in den Fluoreszenzbildern (Abb. 3.6 B/F). Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Evans Blue ist danach wesentlich empfindlicher als der Nachweis im Hellfeld. In den Rhizodermiszellen der osmotisch geschockten Wurzelspitzen erkennt man deutlich eine Blaufärbung des Zellinhalts (Abb. 3.6 D). An Wurzelspitzen von Mais wurde dieser Befund als Hinweis auf eine Schädigung der Rhizodermiszellen gedeutet (Grunwaldt et al., 1978). Dementsprechend zeigen die Ergebnisse, daß Evans Blue in den Apoplast der Wurzelrinde von Wurzelspitzen nur dann eindringt, wenn die Rhizodermiszellen durch Plasmolyse beeinträchtigt wurden.

In den Schnitten von der Wurzelbasis stimmt die Verteilung von Evans Blue in Hand- und Kryostatschnitten überwiegend überein (Abb. 3.7). Evans Blue ist in Kontrollen und osmotisch geschockten Wurzeln an der Wurzeloberfläche zu finden. In den Handschnitten erkennt man zusätzlich in den späten Metaxylemgefäßen eine Markierung mit Evans Blue (Abb. 3.7 A), bei der es sich vermutlich um eine präparationsbedingte Kontamination handelt. Evans Blue ist hierbei wahrscheinlich beim Anschneiden der Wurzeln in die Metaxylemgefäße eingedrungen. Die Ergebnisse zeigen, daß im Bereich einer ausdifferenzierten Exodermis die Wurzelrinde für Evans Blue nicht zugänglich ist. Für die Farbstoffe Berberinsulfat bzw. Sulphorhodamin G kamen sowohl Enstone und Peterson (1992b) als auch Canny und Huang (1994) bei Untersuchungen an Wurzeln mit Exodermis (*Zea mays*, *Allium cepa*, *Helianthus annuus*) zu demselben Ergebnis. In ausdifferenzierten Wurzelabschnitten von Arten, die keine Exodermis bilden (*Vicia faba*, *Pisum sativum*) dringen apoplastische Farbstoffen dagegen bis an die Endodermis vor (Enstone und Peterson, 1992b; Bayliss et al., 1996). Um sicherzustellen, daß der Farbstoff nicht nachträglich innerhalb der Schnitte verlagert wird, wurden entweder gefriersubstituierte Proben verwendet (Canny und Huang, 1994) oder der Farbstoff vor dem Anfertigen der Schnitte ausgefällt (Enstone und Peterson, 1992a).

Farbstoffe wurden auch früher schon benutzt, um allgemeine Aussagen über Stoffbewegungen innerhalb der Pflanze zu machen (Mager, 1933; Bauer, 1953). Die recht eindeutigen Hinweise, daß die Wurzelrinde in Abschnitten mit ausdifferenzierter Exodermis aber auch in den Wurzelspitzen nur sehr eingeschränkt zugänglich ist, können nicht unmittelbar auf die Mobilität der viel kleineren, geladenen anorganischen Ionen übertragen werden. Organische Farbstoffmoleküle sind häufig wesentlich größer als Ionen, haben ein höheres Molekular-

gewicht und sind meist ungeladen. Zudem unterscheiden sich bereits in Wasser die Diffusionskoeffizienten zwischen Farbstoffmolekülen (z.B. Sulphorhodamin G $D_{\text{aq}} = 3,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) und den meisten Nährionen ($D_{\text{aq}} \approx 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) um den Faktor 10.

4.7 Die Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde für K^+ (Rb^+)

4.7.1 Die Exodermis und Rhizodermis als Diffusionsbarriere

Voruntersuchungen zur Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde wurden zunächst an gefrorenen Gewebeblöcken durchgeführt, da mit dieser Probenart schneller Ergebnisse zu erzielen sind, als mit Kryoschnitten. Es wurden vergleichend Wurzeln mit und ohne Exodermis sowie abgetötete Wurzeln untersucht. Vor dem Einfrieren wurden die Wurzeln für 2 min mit einer $60 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl Lösung inkubiert. Die Messungen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen Wurzeln mit und ohne Exodermis (Abb. 3.15). Bei Wurzeln mit Exodermis ist Rb^+ nur in den äußeren Tangentialwänden der Rhizo- und Exodermis nachzuweisen, während es in Wurzeln ohne Exodermis bis in die erste Rindenzellwand zu finden ist. Dieses Ergebnis ist ein guter Hinweis darauf, daß neben der Mobilität von Evans Blue auch die Mobilität von anorganischen Ionen wie Rb^+ in der Zellwand einer ausdifferenzierten Exodermis eingeschränkt ist.

Interessant ist auch, daß das p/b Verhältnis von Rb^+ in den Zellwänden von abgetöteten Wurzeln, die mit RbCl behandelt wurden, insbesondere in den Zellwänden der Rinde und des Zentralzylinders höher ist, als in den Zellwänden der Wurzeln ohne Exodermis (Abb. 3.15). Dies legt den Schluß nahe, daß nicht nur die chemischen Eigenschaften der Zellwände einen Einfluß auf die Mobilität der Ionen haben, sondern auch der Zustand der zugehörigen Zellen. In den abgetöteten Geweben sind z.B. die Zellwände nicht mehr turgeszent gespannt, wodurch der Scheinbar Freie Raum (AFS) in der Zellwand möglicherweise vergrößert wird. Rechnet man zum AFS auch das hinzugekommene Volumen der abgetöteten Zellen, so wird der Diffusionsraum dadurch jedoch in wesentlich stärkerem Maße vergrößert, als es alleine durch die Änderung des Spannungszustandes in den Zellwänden der Fall wäre.

Weiterführende Untersuchungen zur Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde wurden wegen der besseren räumlichen Auflösung der EDX-Analyse an Kryoschnitten durchgeführt. Ergänzend zu den Messungen an den gefrorenen Gewebeblöcken wurden für diese Versuche zwei verschiedene Inkubationszeiten (2 und 5 min) verwendet. Es zeigte sich wie bei den gefrorenen Gewebeblöcken, daß das angebotene Rb^+ in Schnitten der Wurzelbasis (mit Exodermis) nur in den äußeren beiden Zellwänden nachweisbar ist (Abb. 3.16 A). Erhärtet wird dieser Befund durch die Ergebnisse der SIMS-Untersuchungen an gefriergetrockneten

Kryoschnitten. Selbst mit der um den Faktor 10 niedrigeren Nachweisgrenze der SIMS (Newbury et al., 1986) ist die Exodermis als Barriere für das Eindringen des K^+ Tracers, nämlich Rb^+ in die Wurzelrinde auszumachen (Abb. 3.23 B-D, Abb. 3.25 B). Besonders eindrucksvoll geht dies aus Abb. 3.23 C/D hervor. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Markierung mit $^{85}Rb^+$ im Bereich der radialen Wänden der Exodermis unvermittelt endet (Pfeile in Abb. 3.23 C/D). Aus der logarithmischen Darstellung der Pixelintensitäten für $^{85}Rb^+$ geht andererseits auch hervor, daß in den Interzellularen der inneren Rinde z.T. auch $^{85}Rb^+$ nachgewiesen werden kann (Pfeilspitzen in Abb. 3.23 D). Die dekadisch logarithmische Darstellung der Pixelintensitäten gleicht jedoch hohe und niedrige Konzentrationen optisch aneinander an, d.h. die tatsächliche $^{85}Rb^+$ Konzentration in den Interzellularen mehr als 10mal niedriger als an der Wurzeloberfläche. Bei der linearen Darstellung der $^{85}Rb^+$ Intensitäten ist nämlich in denselben Interzellularen kein $^{85}Rb^+$ zu erkennen (Abb. 3.23 D). Die Interpretation der Isotopenverteilung ist recht schwierig, was besonders auf die Anwendung von seltenen Isotopen eines Elements als Tracer und die Quantifizierung der Bilder zutrifft (siehe unten und Kap. 4.7.2).

Unsicherheit bei der Interpretation, die Exodermis stelle ein Hindernis für die Diffusion von Rb^+ dar, besteht hinsichtlich der relativ kurzen Inkubationszeiten. Es wäre möglich, daß das Rb^+ allein aus Gründen der Diffusion nicht weiter als bis zur Exodermis in die Wurzelrinde eindringen konnte. Die Strecke, die Rb^+ per Diffusion in der angebotenen Zeit theoretisch zurücklegen könnte, ist nach dem zweiten Fick'schen Diffusionsgesetz berechenbar [$s = (t \cdot D)^{1/2}$, dabei ist s die Strecke, t die Inkubationszeit und D der Diffusionskoeffizient]. Aikman et al. (1980) geben für Rb^+ in Wasser einen Diffusionskoeffizienten von $D_{aq} = 2,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und für Rb^+ in pflanzlichem Gewebe von $D_{tiss} = 0,19 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ an. Bei freier Diffusion in Wasser hätte Rb^+ danach innerhalb von 2 min eine Strecke von bis zu 500 μm zurücklegen können (Abb. 4.2). Diese Strecke ist größer als der mittlere Radius einer Nodalwurzel der Gerste. Selbst bei einem 10fach geringeren Diffusionskoeffizienten für Rb , wie Aikman et al. (1980) ihn für Gewebe von Zuckerrüben gefunden haben, ergibt sich noch eine Eindringtiefe von 160 μm (Abb. 4.2), was in etwa der Strecke bis zur 4. oder sogar 5. Zellschicht entspricht (~Meßpunkt ⑤ in Abb. 3.14). Daraus geht hervor, daß bereits die Inkubation für 2 min ausreichend lang ist, um den Tracer in die Wurzelrinde eindringen zu lassen.

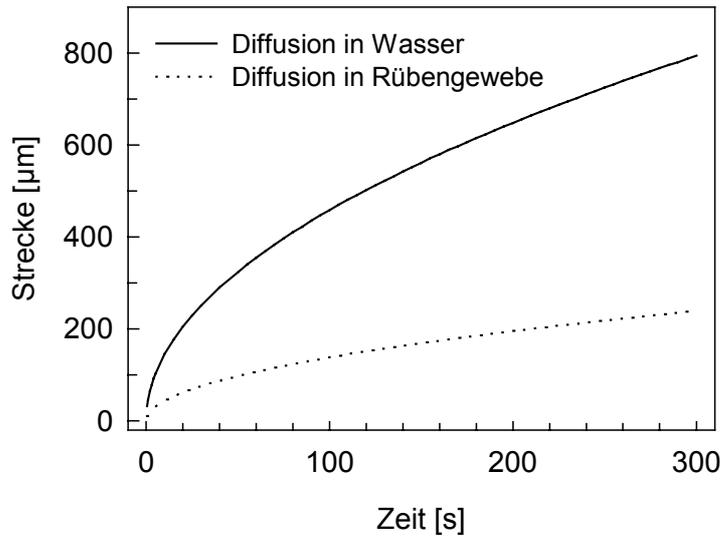


Abb. 4.2: Diffusionsstrecken für Rb^+ in Abhängigkeit von der Zeit. Berechnet nach Angaben bei Aikman et al. (1980)

Als weiteres, unterstützendes Argument dafür, daß die Angebotszeit ausreichend war, dienen die ermittelten Halbwertszeiten für das Auswaschen von Rb^+ aus den inkubierten Wurzeln (Tab. 7). Alle Halbwertszeiten liegen bei ca. 30 s, was bedeutet, daß selbst die doppelte Halbwertszeit noch deutlich kleiner ist, als die Inkubationszeit von 120 s. Daraus läßt sich ableiten, daß das angebotene Rb^+ nicht soweit in die Wurzeln eingedrungen ist, wie es innerhalb von 120 s möglich gewesen wäre. Anderenfalls hätte die ermittelten Halbwertszeiten für das Auswaschen deutlich größer (≈ 60 s) sein müssen, wenn man davon ausgeht, daß die Inkubationszeit und Auswaschzeit in etwa gleich sind. Unberücksichtigt bei dieser Überlegung bleibt die Tatsache, daß in den Apoplasten eingedrungenes Rb^+ an den negativen Festladungen reversibel gebunden wird. Um das am Austauscher gebundene Rb^+ trotzdem auszuwaschen, war in der Waschlösung $0,2 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ Ca}^{2+}$ enthalten, das Rb^+ vom Austauscher verdrängen kann. Die Folge eines verzögerten Auswaschens von Rb^+ durch Austauschabsorption wäre ohnehin eine Überschätzung der ermittelten Auswaschzeiten, d.h. diese wären ohne diesen Effekt eher noch kürzer. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß das Vordringen des Rb^+ in die Wurzelrinde wahrscheinlich nicht durch die Inkubationszeit limitiert wurde.

Der Vergleich der Auswaschzeiten zwischen Keimlings- und Knotenwurzeln zeigt, daß für die Knotenwurzeln die längeren Halbwertszeiten ermittelt wurden (Tab. 7). Dies ist insofern überraschend, als für das Vordringen von Rb^+ in den Keimlingswurzeln ohne Exodermis ein größeres Apoplastenvolumen zur Verfügung stehen sollte, als in den Nodalwurzeln mit Exodermis. Dementsprechend wären für die Keimlingswurzeln die längeren Halbwertszeiten zu erwarten. Für intakte Zwiebelwurzeln mit Exodermis ergab sich z.B. eine kürzere

Auswaschzeit von Sulfationen als für halbierte Zwiebelwurzeln, in denen der gesamte Apoplast frei zugänglich war (Peterson, 1987). Keimlings- und Nodalwurzeln von Gerste sind in dieser Hinsicht nicht direkt vergleichbar, da sie unterschiedliche Durchmesser haben. Möglicherweise bewirkt der gegenüber Keimlingswurzeln (~1200 μm) größere Umfang von Knotenwurzeln (~2200 μm), daß das zugängliche Apoplastenvolumen von Knotenwurzeln trotz Exodermis größer ist als das zugängliche Volumen von Keimlingswurzeln (ohne Exodermis).

Die Tatsache, daß Rb^+ innerhalb von 2 min per Diffusion den gesamten Apoplasten der Wurzelrinde erreichen könnte, läßt noch keine Aussage darüber zu, ob die Rb^+ -Konzentrationen in den Zellwänden für einen Nachweis ausreichend hoch wären. Auf den SIMS Bildern von Wurzeln, deren Rhizo- und Exodermis mechanisch verletzt wurde, ist nach 2 minütiger Inkubation mit $^{85/87}\text{RbCl}$ in allen Zellwänden bis zur Endodermis $^{85}\text{Rb}^+$ nachweisbar (Abb. 3.25 E, F). Dieser Befund zeigt, daß die Inkubationszeiten ausreichend lang waren, damit in den Zellwänden der Wurzelrinde nachweisbare Rb^+ -Konzentrationen erreicht werden. Es ist somit davon auszugehen, daß im Fall von freier Diffusion das angebotene Rb^+ innerhalb der Inkubationszeit in die Wurzelrinde eingedrungen und dort zumindest mit der SIMS nachweisbar gewesen wäre.

Die direkten Messungen zur Lokalisation Rb^+ im Apoplasten von Gerstenwurzeln, sowohl mit der EDXA als auch mit der SIMS lassen demnach den Schluß zu, daß die Exodermis die Mobilität von Rb^+ stark einschränkt. Eine ähnliche Aussage ist aufgrund der Ergebnisse auch für die Rhizodermis in Wurzelspitzen möglich. Es konnte mit der EDXA zumindest für die zweiminütige Inkubation mit RbCl gezeigt werden, daß Rb^+ nur in der äußersten Zellschicht bzw. in der Mucilage nachweisbar ist (Abb. 3.16 B). Ebenso war mit der SIMS sowohl nach zwei als auch nach fünf Minuten Inkubation $^{85}\text{Rb}^+$ nur an der Oberfläche von Wurzelspitzen zu finden (Abb. 3.24 F, Abb. 3.25 D). Abweichend davon zeigen die EDX Messungen an Wurzelspitzen, die für fünf Minuten mit RbCl inkubiert wurden, einen Rb^+ Nachweis in allen Zellwänden der Wurzelrinde (Abb. 3.16 B).

Bei vergleichender Betrachtung der Rb^+ Messungen (Abb. 3.16) und der K^+ Messungen (Abb. 3.17), ist festzustellen, daß die K^+ -Konzentrationen in den Zellwänden der Wurzelspitzen nach fünf Minuten Inkubation ebenfalls von allen anderen K^+ -Messungen abweichen. Während in nahezu allen Zellwänden der Kontrollen und der zwei Minuten inkubierten Wurzelspitzen hohe K^+ -Konzentrationen zwischen 60 und 80 $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ nachgewiesen wurden, liegen die Meßwerte für die fünf Minuten inkubierten Wurzelspitzen in den Zellwänden der Rhizodermis, Hypodermis und der ersten Rindenzellschicht nahe der Nachweisgrenze (Abb. 3.17 B). Da davon auszugehen ist, daß das Meßvolumen trotz der Verwendung von Kryoschnitten, nicht ausschließlich auf die Zellwand beschränkt ist (Kap. 4.3), können die K^+ -Messungen Auskunft über den Zustand der an die Zellwände angrenzenden

Protoplasten geben. Die cytoplasmatischen Kalium-Konzentrationen betragen in lebenden Pflanzenzellen in etwa $100\text{-}200 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ (Leigh und Wyn Jones, 1984). Niedrige Kaliumkonzentrationen, wie in den Zellwänden der für fünf Minuten inkubierten Wurzelspitzen, könnten deshalb ein Hinweis darauf sein, daß deren Zellen bereits vor Versuchsbeginn geschädigt waren. Das Vordringen des Rb^+ -Tracers in die Rinde wäre somit eine Folge des physiologisch gestörten Zustandes der Wurzelspitzen dieses Versuchsansatzes. Die Ergebnisse an den Wurzelspitzen der 5 min inkubierten Wurzelspitzen befinden sich daher in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen an plasmolysierten Wurzelspitzen, in denen Evans Blue in den Apoplasten der Wurzelrinde vordringen konnte (Abb. 3.6 F). Die SIMS und EDX-Analysen an Wurzelspitzen haben übereinstimmend gezeigt, daß die vitalen, turgeszenten Zellen der Rhizodermis die Mobilität von Rb^+ im Apoplasten ebenso einschränken wie die Zellwände der Exodermis in der Wurzelbasis.

In den Zellwänden der Wurzelbasis ist mit der EDX-Analyse eine von der Wurzeloberfläche zum Zentralzylinder hin ansteigende K^+ -Konzentration festzustellen (Abb. 3.17 A). Auch für die Rindenzellwände von Zwiebelwurzeln wurden mit der EDX-Analyse sehr hohe K^+ -Konzentrationen ermittelt (Cameron et al., 1984) und Untersuchungen an Maiswurzeln mit der SIMS zeigen ebenfalls im Bereich der Zellwände hohe $^{39}\text{K}^+$ -Konzentrationen (Kaldorf et al., 1999). Es wäre also möglich, daß in den Zellwänden der Wurzelrinde allgemein hohe K^+ -Konzentrationen zu finden sind. Andererseits kann für die intrazellulären K^+ -Konzentrationen auf einigen $^{39}\text{K}^+$ Verteilungsbildern der SIMS Messungen exakt dieselbe Beobachtung von außen nach innen ansteigender Konzentrationen gemacht werden, während die Zellwände kaliumfrei erscheinen (Abb. 3.24 A). Dies legt die Vermutung nahe, daß die hohen K^+ -Konzentrationen in der Zellwand hauptsächlich auf Einflüsse des Cytoplasmas zurückgehen (siehe auch Kap. 4.3). In den Zellwänden der Rhizodermis sind besonders niedrige Kaliumkonzentrationen zu finden (Meßpunkte ① und ② in Abb. 3.17 A). Diese Beobachtung deckt sich mit den $^{39}\text{K}^+$ Verteilungsbildern der SIMS-Untersuchungen von Schnitten der Wurzelbasis (z.B. Abb. 3.23), auf denen zu erkennen ist, daß nur einige Rhizodermiszellen noch Kalium enthalten. Insgesamt bestätigen beide Ergebnisse die Interpretation, daß die mit der EDX-Analyse in den Zellwänden gemessenen Kaliumkonzentrationen vom relativ hohen intrazellulären Kaliumlevel beeinflusst wurde und somit auch einen hinsichtlich der K^+ Versorgung guten Vitalitätszustand des Protoplasten widerspiegeln (Leigh und Wyn Jones, 1984). Demnach sind viele Rhizodermiszellen in basalen Wurzelabschnitten bereits abgestorben.

Aus den $^{39}\text{K}^+$ Verteilungsbildern von der Wurzelspitze wird jedoch auch das geringe Auflösungsvermögen der SIMS offenbar. Bei Betrachtung der $^{39}\text{K}^+$ Verteilungen in den Wurzelspitzen wird deutlich, daß eine sichere Unterscheidung zwischen Zellwand und Protoplast nicht mehr möglich ist (Abb. 3.24 E, Abb. 3.25 C). Lazof et al. (1994) konnten die Zellwände

von Gefrierschnitten des Meristems von Maiswurzeln ebenfalls mit der SIMS nicht optisch auflösen. In ausdifferenzierten Wurzelabschnitten konnten sie die Zellwände hingegen identifizieren und schlossen daraus auf ein Auflösungsvermögen der SIMS von 1-2 μm . Bei optimalen Proben und Meßbedingungen sind die Zellwände und Protoplasten auch in den Querschnitten von ausdifferenzierten Gerstenwurzeln gut unterscheidbar und somit Aussagen über den Apoplasten möglich (z.B. Abb. 3.23 A-D). Unter ungünstigen Meßvoraussetzungen (z.B. Aufladungen durch zu hohe Probenbelastung) ist jedoch selbst in Querschnitten von der Wurzelbasis eine sichere Identifizierung der Zellwände äußerst schwierig (Abb. 3.25 A). Für die generelle Aussage, nämlich daß das angebotene $^{85}\text{Rb}^+$ nahezu ausschließlich an der Wurzeloberfläche zu finden ist, wird durch die Qualität der SIMS Bilder hinreichend bestätigt (Abb. 3.24 E/F, Abb. 3.25 A-D)

Mit Hilfe der Isotopen-Verteilungsbilder der SIMS sollten nicht nur die Ergebnisse der EDX Analysen überprüft werden, sondern es sollte zusätzlich herausgefunden werden, ob sich die Verteilungen von $^{85}\text{Rb}^+$ und dem gleichzeitig angebotenen seltenen $^{41}\text{K}^+$ -Isotop entsprechen. Damit wurde auch eine Antwort auf die Frage gesucht, ob Rb^+ ein geeigneter Tracer für K^+ ist. Die Auswertung der $^{41}\text{K}^+$ Verteilung hat sich als problematisch erwiesen, weil die Bruttoverteilung des $^{41}\text{K}^+$ Isotops, also das unmittelbare Meßergebnis, noch rechnerisch weiter verarbeitet werden mußte (Kap. 2.3.3.2.2). Dabei wurden die Verteilungen der beiden Isotope $^{39}\text{K}^+$ und $^{41}\text{K}^+$ am selben Wurzelquerschnitt aufgenommen und anschließend miteinander verrechnet (Abb. 3.24 A, B), um ein $^{41}\text{K}^+$ Netto-Verteilungsbild zu erhalten. Das resultierende Bild (Abb. 3.24 C) ist das Ergebnis der Subtraktion des errechneten $^{41}\text{K}^+$ Anteils aus Abb. 3.24 A von der gemessenen $^{41}\text{K}^+$ -Verteilung aus Abb. 3.24 B (Fain und Schröder, 1987). Beim Vergleich der $^{41}\text{K}^+$ -Netto Verteilung (Abb. 3.24 C) mit der $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilung (Abb. 3.24 D) zeigt sich, daß zwar sowohl $^{41}\text{K}^+$ als auch $^{85}\text{Rb}^+$ mit den höchsten Intensitäten an der Wurzeloberfläche zu finden sind, jedoch $^{41}\text{K}^+$ zusätzlich auch in den Zellen der Rinde festgestellt werden kann. Bei konsequenter Auslegung der $^{41}\text{K}^+$ -Netto Verteilung könnte man folgern, daß Rb^+ als Tracer für K^+ nicht geeignet ist, weil sich die Verteilungen beider Isotope voneinander unterscheiden. Allerdings ergeben sich aus Abb. 3.24 C auch einige Argumente dafür, daß bei der Berechnung der $^{41}\text{K}^+$ -Netto Verteilung nicht alles endogene $^{41}\text{K}^+$ (d.h. $^{41}\text{K}^+$, das nicht aus der angebotenen Tracer-Lösung stammt) vom Brutto Bild abgezogen wurde. Zum einen ist das $^{41}\text{K}^+$ in Abb. 3.24 C in der Rinde vorwiegend intrazellulär (und nicht in der Zellwand) zu finden und zum anderen läßt es denselben Konzentrationsgradienten von außen zum Zentralzylinder hin erkennen, wie die $^{39}\text{K}^+$ Verteilung in Abb. 3.24 A. Das angebotene $^{41}\text{K}^+$ hätte z.B. überwiegend in der Zellwand lokalisiert sein müssen, wenn es von der Wurzeloberfläche über den Apoplasten in die Wurzelrinde eingedrungen wäre. Eine Aufnahme von feststellbaren $^{41}\text{K}^+$ Konzentrationen in den Symplasten

spielt eine untergeordnete Rolle und kann vielleicht wegen der kurzen Inkubationszeit von 2 min sogar vollkommen ausgeschlossen werden.

Unverständlich ist außerdem die Tatsache, daß die Pixelintensität der $^{41}\text{K}^+$ Nettoverteilung in Abb. 3.24 C größer ist (hellere Farben), als im Bruttobild (Abb. 3.24 B), obwohl von Abb. 3.24 B rein rechnerisch Pixelintensitäten abgezogen wurden. Die eigentlichen Ursachen dafür sind vermutlich eher technischen Art. So ist es für eine exakte Berechnung der $^{41}\text{K}^+$ -Netto-Verteilung zwingende Voraussetzung, daß jedes einzelne Pixel der beiden zu verrechnenden Bilder exakt denselben Positionen auf der Probe entsprechen. Deshalb müssen die Meßbedingungen während der Aufnahme beider Verteilungsbilder identisch sein. Diese Voraussetzungen treffen aber bei den sehr kleinen Proben und den verhältnismäßig geringen Strahlströmen der Primärionenquelle äußerst selten zu. Die Verwendung seltener Isotope pflanzlicher Nährstoffe wie $^{41}\text{K}^+$ hat sich deshalb im Zusammenhang mit den durchgeführten Untersuchungen als weniger aussagekräftig erwiesen als die Verwendung des seltenen, dem Kalium chemisch verwandten Rubidium als Tracer.

4.7.2 Die Permeabilität der Exodermiswände für Rb^+

Die Osmolarität des Preßsaftes von Gerstenwurzeln wurde zu $209 \pm 25 \text{ osmol} \cdot \text{m}^{-3}$ bestimmt (Kap. 2.1.3). Eine Konzentration von $120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ($240 \text{ osmol} \cdot \text{m}^{-3}$) NaCl oder RbCl ist demnach leicht hypertonisch, d.h. die Zellen befinden aber im Bereich der Grenzplasmolyse, während die Wurzelzellen bei unvermittelter Zugabe einer $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ($360 \text{ osmol} \cdot \text{m}^{-3}$) NaCl oder RbCl Lösung wahrscheinlich plasmolysiert sind. An Wurzeln, deren Nährlösung kurz vor der Behandlung mit RbCl ($180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) auf eine NaCl Konzentration von $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl aufgesalzen worden war und die demnach plasmolysiert waren, konnte Rb^+ noch in der inneren Tangentialwand der Exodermis nachgewiesen werden (t2 in Abb. 3.18 A). Im Gegensatz dazu war es in Wurzeln, die bereits an die hohe NaCl Konzentration adaptiert waren und in Wurzeln, die nur mit $120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ RbCl behandelt wurden, nur in den äußeren Wänden von Rhizo- und Exodermis zu finden (t1 und t3 in Abb. 3.18 A). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, daß der Spannungszustand der Zellwände vermutlich einen Einfluß auf ihre Permeabilität für Rb^+ hat. Pflanzen, die osmotischem Streß durch hohe NaCl Konzentrationen ausgesetzt sind, reagieren häufig mit einer Anpassung des osmotischen Wertes in den Vakuolen durch vermehrte Aufnahme von Na^+ und Cl^- (Greenway und Munns, 1980; Marschner, 1995). In diesem Sinne zeigen die Cl^- Konzentrationen in den Vakuolen, daß es sich bei den Wurzeln, die bereits lange (16 Stunden) einer hohen NaCl Konzentration ($180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) ausgesetzt waren, um osmotisch adaptierte Wurzeln handelte (Abb. 3.18 D). Diese sind in den Vakuolen der Rhizodermis, Exodermis und der ersten Rindenzellschicht dieses Ansatzes deutlich höher (t3 Abb. 3.18 D) als nach einer Stunde Adaptation bzw. nach Aufsalzen auf eine NaCl Konzentration von $120 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$

(t1 und t2 in Abb. 3.18 D). Die Rhizodermiszellen scheinen bereits nach einer Stunde an eine Konzentration von $180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ NaCl adaptiert zu sein, da in ihren Vakuolen nach dieser Zeit bereits dasselbe p/b Verhältnis für Cl^- gemessen wird wie nach 16 Stunden Adaptation (t2 in Abb. 3.18 D). In den Vakuolen von Exodermis und Rinde ist das p/b Verhältnis für Cl^- hingegen nach einer Stunde Adaptation wesentlich niedriger als in den Rhizodermisvakuolen (t2 in Abb. 3.18 D).

Die Versuche zum Einfluß des Spannungszustands der Zellwände auf die Permeabilität wurden fortgeführt, indem Wurzeln ohne vorherige Adaptation mit einer RbCl-Lösung ($180 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) osmotisch geschockt wurden. Außerdem wurde die Inkubationsdauer auf 15-20 Minuten verlängert, damit die hohen RbCl Konzentrationen auf die Zellen tatsächlich plasmolytisch wirken konnten. Die aus den Einzelmessungen errechnete Kurvenfunktion zeigt, daß in der Rinde von Abschnitten, die mehr als 10 cm von der Wurzelspitze entfernt sind, kein Rb^+ nachzuweisen ist (p/b Verhältnis $\leq 0,1$; durchgezogene Linie in Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu ist in der Rinde von Abschnitten, die weniger als 10 cm von der Wurzelspitze entfernt sind Rb^+ deutlich nachzuweisen (gestrichelte Linie in Abb. 3.19). Übereinstimmend mit den Meßergebnissen zeigen die Zellen der Wurzelabschnitte <10 h.Wsp. im elektronenmikroskopischen Bild starke Anzeichen von Plasmolyse (deformierte Zellen, von der Zellwand abgelöste Protoplasten, Abb. 3.20 D), während diese Beobachtung an Wurzelabschnitten >10 cm h.Wsp. nicht bzw. nur in geringerem Ausmaß zu machen ist (Abb. 3.20 C). Neben der Inkrustierung der radialen Exodermiszellwand hat nach diesen Ergebnissen auch die Zellwandspannung einen Einfluß auf die Permeabilität der Zellwände. Das heißt, je turgeszenter die Zelle ist bzw. je stärker die Wand gespannt ist, desto größer ist der Diffusionswiderstand der Wand für Ionen. Diese Interpretation wird durch das Vordringen von Evans Blue in die Wurzelrinde von osmotisch geschockten Wurzelspitzen ebenfalls unterstützt (Abb. 3.6 F, Kap. 4.5).

Die Permeabilität der Zellwände ist in den plasmolysierten Abschnitten (< 10 cm h.Wsp.) mit $5,17 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ in etwa um den Faktor 3,6 größer als im Abschnitt > 10 cm h.Wsp. mit $1,45 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kap. 3.5.2.6). Der Grund für die erhöhte Permeabilität der Exodermiszellwände im plasmolysierten Zustand ist möglicherweise aber auch in der unterschiedlichen Ultrastruktur der Caspary-Streifen zu suchen. In der Exodermis wird zwar auch Bandplasmolyse beobachtet (Peterson und Emanuel, 1983), im ultrastrukturellen Bild zeigt sich jedoch ein schmaler Spalt zwischen Plasmalemma und Zellwand (Lehmann et al., 2000), den es am Caspary-Streifen der Endodermis anscheinend nicht gibt. Die Ionen könnten im spannungsfreien Zustand der Plasmolyse durch diesen schmalen Spalt in die Rinde diffundieren. An der Endodermis bleibt der apoplastische Weg auch im Zustand der Plasmolyse blockiert. Dementsprechend wird auch nach der relativ langen Inkubationszeit von bis zu 20 min im Zentralzylinder kein Rb^+ nachgewiesen. Der Bereich der niedrigsten Permeabilität ist für

beide Wurzelabschnitte dem Zellwandintervall 20-35 μm Abstand zur Wurzeloberfläche zuzuordnen und kennzeichnet damit genau den Bereich der radialen Exodermiswände (Abb. 3.21). Die Exodermis ist damit eindeutig als das Gewebe identifizierbar, das die Beweglichkeit der Ionen im Apoplasten am stärksten einschränkt.

Die radiale Beweglichkeit von Wasser wird nach Untersuchungen von Zimmermann und Steudle (1998) durch die Präsenz einer Exodermis in ähnlichem Ausmaß eingeschränkt. An ganzen Maiswurzeln wurde die hydraulische Leitfähigkeit durch das Vorhandensein einer Exodermis ebenfalls um den Faktor von 3,6 reduziert (Zimmermann und Steudle, 1998). Insofern scheint hier die Berechnung der Permeabilität der Exodermiswände in der richtigen Größenordnung zu liegen.

Mit der Permeabilität wird die Eigenschaft der Zellwand beschrieben, Ionen passieren zu lassen oder zurückzuhalten, d.h. es werden Stoffbewegungen beschrieben. Mit der EDX-Analyse werden jedoch nur lokale Konzentrationen an Elementen (d.h. der relative Massenanteil des Elements am Meßvolumen) bestimmt und nicht deren Beweglichkeit. Die Konzentration, d.h. das p/b Verhältnis für ein bestimmtes Element ist von der umgebenden Matrix abhängig. Da die Wandmatrix von Zellen verschiedener Gewebe durchaus große Unterschiede aufweisen kann (z.B. durch Lignin- oder Suberineinlagerung), ist es denkbar, daß sich, bezogen auf die ganze Zellwand größere Konzentrationsunterschiede ergeben, während die Konzentrationsunterschiede der Ionen in der Lösung des AFS durchaus geringer sein können. Die Konzentration einer Lösung wird also „durch die unterschiedlichen Zellwandmatrizes verschieden stark verdünnt“. Das wiederum bedeutet, daß die absoluten Zahlenwerte der Permeabilitäten, die auf solchen Konzentrationsbestimmungen beruhen, vorsichtig interpretiert werden müssen. Zum Beispiel, ist die Vorhersage von Konzentrationen in den Zellwänden der inneren Rinde nach definierten Zeitintervallen deshalb schwierig. Der Vergleich von Permeabilitäten untereinander, die an ähnlichem Probenmaterial ermittelt wurden, ist hingegen zulässig. In dieser Hinsicht ist davon auszugehen, daß die Permeabilität in den Wänden plasmolysierter Zellen tatsächlich um den Faktor 3,6 erhöht ist.

Die Permeabilitäten der Zellwände wurde auch aus den $^{85}\text{Rb}^+$ Verteilungen berechnet, die mit der SIMS gemessen wurden (Tab. 9). Dafür ist zunächst eine Quantifizierung der Pixelintensitäten notwendig. Dabei wurden die mit dem NIH-Image Programm ermittelten Pixelintensitäten der Meßflächen zur mittleren Pixelintensität der Außenlösung bekannter Konzentration in Beziehung gesetzt. Die Außenlösung befand sich dabei auf demselben Bild. Die Größenordnung der aufgrund dieser Konzentrationen bestimmten mittleren Permeabilität von $3,1 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ stimmt mit den aus den EDX-Messungen ermittelten Permeabilitäten überein. Allerdings ist die Quantifizierung der Verteilungsbilder recht ungenau. In einem Verteilungsbild können nur 256 verschiedene Farben dargestellt werden. Dabei wird

der hellste Pixelwert (256 = weiß) der größten Impulsanzahl in einem Bild zugordnet und der niedrigste Pixelwert (0 = schwarz) der Impulsanzahl 0 zugeordnet, unabhängig davon, ob die höchste Impulsanzahl 100 oder 10000 Impulse betragen hat. Der Bereich zwischen minimaler und maximaler Impulsanzahl wird in 256 Klassen aufgeteilt und jedem Pixel anschließend die seinem Meßwert entsprechende Klasse (=Farbe) zugewiesen (Kuhn et al., 1997; Kaldorf et al., 1999). Es handelt sich also um eine relative Darstellung der Isotopenverteilung in einer Meßfläche, weshalb aus einem Pixelwert des resultierenden Bildes rückwirkend nicht auf die gemessene Impulsanzahl dieses Pixels geschlossen werden kann. Eine Auswertung der Bilder ist deshalb ausschließlich durch den Vergleich mit Flächen bekannter Konzentration auf demselben Bild möglich. Trotzdem gehen Informationen verloren, die für eine exakte Berechnung der Konzentrationen nötig wären. Zusätzlich, zu den für die Quantifizierung der EDX-Messungen geschilderten Matrixeffekten, wird die Quantifizierung der SIMS Bilder noch durch unterschiedliche Sekundärionenausbeuten und Topografieeffekte erschwert (Linton und Goldsmith, 1992). Die Konzentrationsangaben und Permeabilitäten in Tab. 9 sind deshalb lediglich als erste Näherung zu bewerten.

4.7.3 Funktion und Auswirkungen einer Diffusionsbarriere in den äußeren Abschlußgeweben der Gerstenwurzel

Alle erzielten Ergebnisse zeigen, daß die Exodermis in ausdifferenzierten Wurzelabschnitten und die Rhizodermis in Wurzelspitzen die Beweglichkeit von K^+ (Rb^+) und Evans Blue im Apoplasten der Wurzelrinde einschränken. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen zur Zugänglichkeit von Sulfationen zum Apoplasten von Zwiebelwurzeln (Peterson, 1987) und zur Auswirkung einer Exodermis auf den radialen Wassertransport und Abscisinsäuretransport (Zimmermann und Steudle 1998; Zimmermann et al. 2000; Freundl et al., 2000). Eine vollkommene Isolierung des Apoplasten der Wurzelrinde von der Außenlösung ist allerdings nicht möglich. Die Kontinuität der Endo- und Exodermis wird zumindest zeitweise an Stellen unterbrochen, an denen sich Seitenwurzeln bilden (Peterson et al., 1981; Häussling et al., 1988). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß anorganische Ionen und apoplastische Farbstoffe in den Wurzelrindenapoplasten eindringen, wenn einzelne Zellen der Rhizo- bzw. Exodermis verletzt oder beschädigt wurden (Abb. 3.6 F, Abb. 3.25 E/F). In letzterem Fall findet die Aufnahme in den Symplasten spätestens an der Endodermis statt, die den Übertritt der Ionen vom Rindenapoplasten in den Zentralzylinder verhindert. Den äußeren Abschlußgeweben wird deshalb eine unterstützende Wirkung zur Funktion der Endodermis zugeordnet, welche hilft die Nährstoffaufnahme in die Pflanze, d.h. das Ionen-Milieu im Wurzelapoplasten besser zu kontrollieren bzw. zu regulieren.

Die stark eingeschränkte Mobilität von Rb^+ in den Zellwänden der peripheren Wurzelgewebe hat zur Folge, daß die Zellen der Wurzelrinde keinen unmittelbaren Kontakt mit der Bodenlösung haben und deshalb auch an der Aufnahme von Rb^+ bzw. den Nährstoffen im allgemeinen nur in vernachlässigbarem Ausmaß beteiligt sind. Versuche zur Kaliumauswaschung aus Gerstenwurzeln (Vakhmistrov, 1967) und theoretische Überlegungen zur Diffusion von Rb^+ im Apoplasten von jungen Gerstenwurzeln (Bange, 1973) unterstützen diese Schlußfolgerung. Kochian und Lucas (1983) interpretierten ihre Versuchsergebnisse zur Rb^+ Aufnahme von Maiswurzeln zwar ähnlich; gleichzeitig schlossen sie aber, aufgrund der Tatsache, daß sie radioaktiv markiertes, cytotoxisch wirkendes [^{206}Hg]PCMBS¹ bereits nach 5 Minuten in den Rindenzellwänden gefriersubstituierter Wurzeln wiederfanden, das Vorhandensein einer apoplastischen Barriere in der Exodermis aus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß bei der Gefriersubstitution massive Umverteilungen innerhalb der Proben auftreten können (Kap. 4.4). Diese Tatsache und die Verwendung eines stark cytotoxisch wirkenden Markers empfiehlt eine behutsame Interpretation der Ergebnisse mit [^{206}Hg]PCMBS. Grunwaldt et al. (1979) fanden bei niedrigen Phosphat-außenkonzentrationen für Maiswurzeln, deren Rhizodermis durch osmotischen Schock geschädigt wurde, eine Verminderung der Phosphataufnahme um 50% während die Verminderung bei höheren Konzentrationen ($1\text{-}10 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$) wesentlich geringer war. Sie schlossen daraus, daß die Aufnahme von Phosphat in Maiswurzeln überwiegend durch die Rhizodermis geschieht, der Apoplast der Wurzelrinde aber grundsätzlich frei zugänglich sei. In Übereinstimmung mit der reduzierten Zugänglichkeit des Apoplasten stehen auch Ergebnisse aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen zum Chlorid Transport in Gerstenwurzeln (Stelzer et al., 1975). Danach scheint der Transport durch die Wurzelrinde überwiegend symplastisch durch die Plasmodesmen zu erfolgen.

Zur Aufnahme von Kationen in die Pflanze sind H^+ -ATPasen notwendig, die einen elektrochemischen Gradienten über die Membran aufrecht erhalten und sie dadurch energetisieren. Die Verteilung von Plasmamembran ATPasen wurde sowohl an ausdifferenzierten Gerstenwurzeln (Samuels et al., 1992) als auch an Maiswurzelspitzen untersucht (Jahn et al., 1998). Für beide Pflanzenarten zeigte sich in der Rhizo- und Hypodermis ein vermehrtes Vorkommen der ATPasen. Aus ihren Untersuchungen an Wurzelspitzen von Mais schließen Jahn et al. (1998), daß die Hauptaufnahmeorte für Kationen in der Rhizodermis lokalisiert sein müssen. Samuels et al. (1992), die auch in ausdifferenzierten Wurzelabschnitten von Gerste eine bevorzugte Lokalisation der H^+ -ATPase in der Rhizodermis fanden, kommen zum selben Ergebnis.

¹ *p*-(Chlormercuri)-Benzolsulfonsäure

Für *Arabidopsis thaliana* wurde AKT1 (*Arabidopsis* Kalium Transporter) als Kaliumkanal in den Wurzeln indentifiziert (Sentenac et al., 1992). Wird der Promoter des AKT1 Gens mit dem GUS-Reporter Gen fusioniert so findet man eine bevorzugte Expression des Konstrukts in der Rhizodermis, der Rinde und Endodermis, wobei die stärkste Markierung in den Wurzelhaaren der Rhizodermis zu finden ist (Lagarde et al., 1996). In der Wurzelspitze ist das Vorkommen der GUS Markierung auf die Rhizodermis und die Zellen der Wurzelhaube beschränkt. Der hochaffine Kaliumtransporter HKT1 aus Weizen ist in Weizenwurzeln nach den Ergebnissen mit der in situ Hybridisierung gleichmäßig in allen Rindenzellen und der Rhizodermis verteilt (Schachtman und Schroeder, 1994). Für die Untersuchungen wurden allerdings Keimlingswurzeln von Weizen benutzt; eine ausdifferenzierte Exodermis war hier ähnlich wie im Fall der Gerste nicht zu erwarten. Die Verteilung der Kalium-Transporter in verschiedenen Wurzelgeweben könnte allerdings zwischen Keimlingswurzeln und später gebildeten Nodalwurzeln unterschiedlich sein. Bei Gerstenpflanzen, die unter Kaliummangel angezogen wurden, sank z.B. die mittlere cytoplasmatische Kaliumkonzentration in den Keimlingswurzeln ab, während sie in den Nodalwurzeln im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert blieb (Walker et al., 1998). Von Walker et al. (1998) wird deshalb ein genereller Unterschied zwischen Keimlings- und Nodalwurzeln in bezug auf die Fähigkeit Kalium bei niedrigen Außenkonzentrationen aufzunehmen diskutiert.

Zusammenfassend deuten die aus der Literatur bekannten Ergebnisse zur Lokalisierung der Kaliumtransporter und der Plasmalemma ATPasen auf eine große Bedeutung der äußeren Wurzelgewebe für die Aufnahme von Kationen im allgemeinen und von Kalium im speziellen hin. Sie stehen damit in guter Übereinstimmung zur Lokalisation der radialen Exodermis bzw. der Rhizodermiswände als Diffusionsbarriere für anorganische Ionen im Apoplasten. In zukünftigen Untersuchungen sollte gezielt das Vorkommen und die physiologischen Eigenschaften von Kaliumtransportern in den verschiedenen Geweben, vor allem aber auch in den verschiedenen Wurzeltypen untersucht werden.

Die primäre Funktion der Exodermis wurde bisher ausschließlich in bezug auf den Ioneneinstrom in den Apoplasten diskutiert. Es ist aber auch durchaus möglich, daß eine Exodermis primär dazu angelegt wird, den passiven Verlust der Wurzeln vor allem von Wasser zu vermindern, wenn nicht sogar vollständig zu verhindern. Die Ergebnisse, daß sich eine Exodermis mit Caspary-Streifen vermehrt bzw. ausschließlich dann bildet, wenn die Wurzeln nur von einer feuchten Atmosphäre umgeben sind (Enstone und Peterson, 1998; Zimmermann und Steudle, 1998), dies aber unterlassen, wenn sie in die Nährlösung eintauchen, scheinen diese Vermutung zu bestätigen. Auch die Tatsache, daß in den Wurzeln der Wüstenpflanze *Agave deserti* die hydraulische Leitfähigkeit durch das frühe Ausdiffer-

enzieren einer Exodermis unter Trockenstreß stark reduziert wird, deutet in diese Richtung (North und Nobel, 1991). Daß die Exodermis nicht nur den passiven Einstrom, sondern auch den Verlust von Substanzen aus der Wurzelrinde reguliert, dürfte auch für andere Transportprozesse wichtig sein. So findet z.B. der basipetale Transport von Auxin in Wurzeln überwiegend in den äußeren Rindenzellen, vermutlich unter Beteiligung des Apoplasten statt (Hasenstein und Evans, 1988; Estelle, 1998). Ein passiver Verlust von Auxin durch 'leaching' in die Bodenlösung dürfte die vorgesehene Wirkung dieses Hormons nachhaltig beeinflussen.

Eine andere Wirkung der Exodermis zusätzlich zur Aufrechterhaltung einer Wasser- und Ionenhomöostase im Apoplasten der Wurzelrinde könnte, in einer Schutzfunktion gegen Pathogenbefall bestehen. Suberinisierte Zellwände, wie sie auch in der Exodermis zu finden sind (Abb. 3.4 A), erniedrigen in der Regel die Infektionsgefahr durch Mikroorganismen (Kolattukudy, 1984). Durch ihre exponierte Lage nahe der Wurzeloberfläche ist die Exodermis für eine solche Prävention geradezu prädestiniert.

Die Konzentrationen der Nährstoffe in der Bodenlösung sind unter natürlichen Bedingungen in der Regel so niedrig, daß die Nährstoffaufnahme durch die Transporter in den Rhizo- bzw. Exodermiszellen vollkommen ausreichen würde, um alle verfügbaren Ionen aufzunehmen (Bange, 1973). Eine mögliche "Schutzfunktion" der Exodermis gegen das passive Eindringen von Ionen kommt deshalb erst dann zum Tragen, wenn die Mineralstoffkonzentrationen in der Bodenlösung potentiell schädliche Größenordnungen erreichen. Dies ist z.B. bei der Austrocknung des Bodens und einem damit verbundenen Anstieg der Salzkonzentration in der Bodenlösung der Fall. Für salzempfindliche Arten wie z.B. Reis wird ein sogenannter 'bypass-flow' für die Aufnahme von Na^+ unter salinen Bedingungen angenommen (Yeo et al., 1987; Garcia et al., 1997), der durch die Zugabe von Silicium zum Nährmedium stark verringert werden kann (Yeo et al., 1999). Ob sich beim Reis durch die Siliciumzugabe eine Exodermis früher oder überhaupt erst ausbildet, ist nicht bekannt. Die Gerste hingegen ist eine relativ salzresistente Pflanzenart, wobei einige Sorten (z.B. 'California Mariout') sogar mit Meerwasser kultiviert werden können (Epstein und Norlyn, 1977; Huang und van Steveninck, 1989). Möglicherweise ist die Präsenz einer Exodermis einer der Gründe dafür, daß sie als typischer "salt-excluder" das Eindringen von Salz insbesondere von Na^+ in die Wurzelrinde in weitgehend verhindert.

Der Interpretationsspielraum im Hinblick auf die physiologischen Funktionen der Exodermis ist sehr groß und zeigt, daß die Zuordnung einer bestimmten Aufgabe zu diesem Gewebe derzeit nicht möglich ist. Interessante biologische Aspekte, wie z.B. Zusammenhänge zwischen der Präsenz einer Exodermis und den vielleicht damit verbundenen Resistenzen gegenüber Salz aber auch gegen Mikroorganismen erfordern noch zahlreiche Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Viele Pflanzenarten entwickeln während der Differenzierung der Wurzel eine Exodermis. Als Exodermis wird eine Hypodermis verstanden, deren radiale Wände den Caspary-Streifen der Endodermis ähnliche Differenzierungen aufweisen. Es wird deshalb für die Exodermis eine ähnliche Funktion wie für die Endodermis vermutet, nämlich den radialen Transport von anorganischen Ionen im Apoplasten einzuschränken. Dies hätte zur Folge, daß für die Ionenaufnahme in die Wurzeln vornehmlich nur die Oberflächen der äußeren Zellschichten zur Verfügung stünden. Die Caspary-Streifen von Endo- und Exodermis lassen sich nach Färbung mit Berberinsulfat und Anilinblau im Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Für Gerstenwurzeln konnte gezeigt werden, daß in bezug auf die Präsenz einer Exodermis zwischen den Keimlingswurzeln und den später gebildeten Nodalwurzeln unterschieden werden muß. Während in den Nodalwurzeln im Abstand von 3-4 cm hinter der Wurzelspitze eine Exodermis regelmäßig nachzuweisen war, konnte in den Keimlingswurzeln eine Exodermis nicht bzw. nur unvollständig nachgewiesen werden.

Die Zugänglichkeit des Apoplasten der Wurzelrinde von Nodalwurzeln wurde zunächst mit Hilfe des apoplastischen Farbstoffs Evans Blue untersucht. Hierbei wurde intakten Nodalwurzeln Evan's Blue angeboten. Der Farbstoff war in Abschnitten mit ausdifferenzierter Exodermis fluoreszenzmikroskopisch nur in den Zellwänden der Rhizodermis und den äußeren Tangentialwänden der Exodermis nachzuweisen und drang nicht in die Zellwände der Wurzelrinde ein. Für die Wurzelspitzen zeigte sich ein ähnlicher Befund, wobei der Farbstoff hier hauptsächlich in der äußeren Schleimschicht und den Zellwänden der Rhizodermis nachweisbar war. Wurden die Rhizodermiszellen durch Plasmolyse geschädigt, drang der Farbstoff auch in die Wurzelrinde ein.

Organische Farbstoffmoleküle sind in bezug auf ihre Größe, Ladung und Diffusionseigenschaften nur schlecht mit anorganischen Ionen wie K^+ vergleichbar. Deshalb wurden direkte Messungen zur Lokalisation und Quantifizierung von Elementen in den Zellwänden mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgen Mikroanalyse (EDXA) im Raster-Elektronenmikroskop und der Sekundärionen Massenspektroskopie (SIMS) durchgeführt. Hierfür muß die Probenpräparation garantieren, daß die Verteilung von löslichen, mobilen Ionen in der Probe nicht durch die Präparation verändert wird. Die Messungen mußten deshalb an Dünnschnitten von schockgefrorenen Gerstenwurzeln durchgeführt werden. Zunächst wurde darum die Methode der Kryomikrotomie für die Anfertigung von Gefrierschnitten von Gerstenwurzeln optimiert und die Schnitte anschließend im Raster-Elektronenmikroskop im gefroren-hydratisierten bzw. gefriergetrockneten Zustand (SIMS) analysiert.

Wurde intakten Wurzeln vor dem Einfrieren Rb^+ als Tracer für K^+ angeboten, so war das angebotene Rb^+ in basalen Wurzelabschnitten (mit Exodermis) bis in die äußeren Zellwände

der Exodermis nachweisbar, nicht jedoch in den Zellwänden der Rinde. Dasselbe Ergebnis zeigten die Untersuchungen mit der SIMS: auf Rb^+ -Verteilungsbildern endet die Markierung des Apoplasten mit Rb^+ abrupt in den Radialwänden der Exodermis. In Übereinstimmung mit den Farbstoffmarkierungen konnte angebotenes Rb^+ in Schnitten von der Wurzelspitze nur in den äußeren Tangentialwänden der Rhizodermis und in der Mucilage nachgewiesen werden. Lediglich nach mechanischer Verletzung der Exodermis oder nachdem die Wurzel hohen plasmolytisch wirksamen Mineralstoffkonzentrationen ausgesetzt wurde, war Rb^+ auch in den Zellwänden der Rinde nachweisbar.

Anhand der Konzentrationen des angebotenen Tracers in den Zellwänden wurde die Permeabilität einzelner Zellwandabschnitte für Rb^+ berechnet. Dabei konnten die Radialwände der Exodermis, als die Zellwandabschnitte mit der niedrigsten Permeabilität, ermittelt werden.

Die Ergebnisse werden dahingehend gedeutet, daß die äußeren Wurzelgewebe den passiven Einstrom sowohl von Ionen als auch von anderen gelösten Substanzen in den Wurzelapoplasten stark einschränken. Während in der Wurzelspitze die turgeszenten Zellen der Rhizodermis die äußere apoplastische Barriere bilden, wird diese Funktion in basalen Wurzelabschnitten von der Exodermis übernommen. Die Ergebnisse zeigen andererseits auch, daß die Exodermis bzw. Rhizodermis in Bereichen mit abgestorbenen und/oder geschädigten Zellen relativ leicht überwunden werden kann. An diesen Stellen wird der apoplastische Ionentransport alleine durch die Endodermis kontrolliert. In bezug auf den radialen Ionentransport wird die Rolle von Rhizodermis und Exodermis einerseits als Ergänzung zur Funktion der Endodermis interpretiert, die freie Bewegung von Ionen im Apoplasten zu kontrollieren. Andererseits ermöglicht die Barrierefunktion von Rhizo- und Exodermis gleichzeitig die Aufrechterhaltung und Regulation eines von der Außenlösung verschiedenen Wasser- und Ionengleichgewichts innerhalb des Apoplasten der Wurzelrinde.

6 Literatur

- Aikman, D.P., Harmer, R., Rust, T.S.O. (1980) Electrical resistance and ion movement through excised discs of sugar beet root tissue. *Physiol. Plant.* **48**: 395-402.
- Bange, G.G.J. (1973) Diffusion and absorption of ions in plant tissue III. The role of the cortex cells in ion absorption. *Acta Bot. Neerl.* **22**: 529-542.
- Bauer, L. (1953) Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. *Planta* **42**:367-451.
- Bayliss, C., van der Weele, C., Canny, M.J. (1996) Determinations of dye diffusivities in the cell-wall apoplast of roots by a rapid method. *New Phytol.* **134**:1-4.
- Behrisch, R. (1926) Zur Kenntnis der Endodermiszelle. *Ber. Deu. Bot. Ges.* **44**:162-164.
- Bonnet, H.T. (1968) The root endodermis: fine structure and function. *J. Cell Biol.* **37**:199-205.
- Brundrett, M.C., Enstone, D.E., Peterson, C.A. (1988) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberine, lignin and callose in plant tissue. *Protoplasma* **146**:133-142.
- Cameron, I.L., Hunter, K.E., Smith, N.K.R. (1984) The subcellular concentration of ions and elements in thin cryosections of onion root meristem cells. *J. Cell Sci.* **72**:295-306.
- Campbell, N.A., Satter, R.L., Garber, R.C. (1981) Apoplastic transport of ions in the motor organ of *Samanea*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**:2981-2984.
- Canny, M.J., Huang, C.X. (1994) Rates of diffusion into roots of maize. *New Phytol.* **126**:11-19.
- Casparry, R. (1858) Die Hydrillen. *Jahrb. wiss. Bot.* **1**:377-509. Zitiert in Schreiber et al., 1999.
- Casparry, R. (1866) Bemerkungen über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahrb. wiss. Bot.* **4**:101-123. Zitiert in Schreiber et al., 1999.
- Clarkson, D.T. (1988) Movements of ions across roots. In: *Solute transport in plant cells and tissues*. Baker, D.A., Hall, J.L. (eds.). Longman Scientific & Technical. Longman House. Burn Mill, Harlow. 251-304.
- Clarkson, D.T. (1996) Root structure and sites of ion uptake. In: *Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds.) Plant roots – The hidden half*. 2nd Edition. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong. 483-510.
- Clarkson, D.T., Robards, A.W., Stephens, E.J., Stark, M. (1987) Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots: development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant Cell and Environ.* **10**:83-93.

- Clarkson, D.T., Robards, A.W., Sanderson, J., Peterson, C.A. (1978) Permeability on epidermal-hypodermal sleeves isolated from roots of *Allium cepa* (onion). *Can. J. Bot.* **56**:1526-1532.
- Echlin, P. (1992) Low-temperature microscopy and analysis. Plenum Press. New York, London.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A. (1992a) A rapid technique to probe the permeability of the root apoplast. *Can. J. Bot.* **70**:1493-1501.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A. (1992b) The apoplastic permeability of root apices. *Can. J. Bot.* **70**:1502-1512.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A. (1997) Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. *Can. J. Bot.* **75**:1188-1199.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A. (1998) Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Cell Environ.* **21**:837-844.
- Epstein, E. (1972) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. J. Wiley and Sons Inc.. New York, London, Sydney, Toronto.
- Epstein, E., Norlyn, J.D. (1977) Seawater-based crop production: a feasibility study. *Science* **197**:249-251.
- Estelle, M. (1998) Polar auxin transport: New support for an old model. *Plant Cell* **10**:1775-1778.
- Fain, G.L., Schröder, W.H. (1987) Calcium in dark-adapted toad rods: evidence for pooling and cyclic-guanosine-3'-5'-monophosphate-dependent release. *J. Physiol.* **389**:361-384.
- Felle, H.H. (1998) The apoplastic pH of *Zea mays* roots. *J. Exp. Bot.* **49**:987-995.
- Freundl, E., Steudle, E., Hartung, W. (2000) Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* **210**:222-231.
- Frey, B., Brunner, I., Walther, P., Scheidegger, C., Zierold, K. (1997) Element localization in ultrathin cryosections of high pressure frozen ectomycorrhizal spruce roots. *Plant Cell Environ.* **20**:929-937.
- Frey-Wyssling, A., Mühletaler, K. (1965) Ultrastructural plant cytology. Elsevier. Amsterdam.
- Gahan, P.G. (1984) Plant histochemistry and cytochemistry. Academic Press. London.
- Garcia, A., Rizzo, C.A., Du-Din, J., Bartos, S.L., Senadhira, D., Flowers, T.J., Yeo, A.R. (1997) Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium:potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant Cell Environ.* **20**:1167-1174.

- Gierth, M., Stelzer, R., Lehmann, H. (1999) An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic Rb^+ (K^+) transport in barley roots. *Plant and Soil* **207**:209-218.
- Greenway, H., Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Grunwaldt, G., Ehwald, R., Göring, H. (1978) Suitability of the osmotic shock procedure for the analysis of membrane transport in root tips of *Zea mays* L.. *J. Exp. Bot.* **29**:97-106.
- Grunwaldt, G., Ehwald, R., Pietsch, W., Göhring, H. (1979) A special role of the rhizodermis in nutrient uptake by plant roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **174**:831-837.
- Gunning, B.E.S., Steer, M.W. (1975) *Ultrastructure and the biology of plant cells*. Edward Arnold (Publishers) Ltd.. London.
- Guttenberg, H. von (1940) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Bd. VIII. Verlag Gebrüder von Borntraeger. Berlin. 89-101.
- Guttenberg, H. von (1943) Die physiologischen Scheiden. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Bd. V. Verlag Gebrüder von Borntraeger. Berlin. 2-23.
- Haberlandt, G. (1918) *Physiologische Pflanzenanatomie*. 5. Auflage. Verlag W. Engelmann. Leipzig.
- Häussling, M., Jorns, C.A., Lehmbecker, G., Hecht-Buchholz, C., Marschner, H. (1988) Ion and water uptake in relation to root development in norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *J. Plant Physiol.* **133**:486-491.
- Harms, V. (1988) *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*. 5. Aufl.. Harms Verlag. Kiel.
- Hasenstein, K.H., Evans, M.L. (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol* **86**:890-894.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., Sussman, M.R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**:918-921.
- Holzamer, S. (1998) Untersuchungen zur Lokalisation der Diffusionsbarrieren im Apoplasten der Sommergerste. Examensarbeit am Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Hooymans, J.J.M. (1982) Adsorption of Rb^+ ions onto isolated membrane fragments of barley root cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **105**:193-200.
- Huang, C.X., van Steveninck, R.F.M. (1989) Maintenance of low Cl^- concentrations in mesophyll cells of leaf blades of barley seedlings exposed to salt stress. *Plant Physiol.* **90**:1440-1443.
- Jahn, T., Baluska, F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkmann, D. (1998) Plasma membrane H^+ -ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma

- and assymetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiol. Plant.* **104**:311-316.
- Kaesler, W. (1989) Freeze substitution of plant tissue with a new medium containing dimethoxypropane. *J. Microsc.* **154**:273-278.
- Kaesler, W., Koyro, H.-W., Moor, H. (1989) Cryofixation of plant tissues without pretreatment. *J. Microsc.* **154**: 279-288.
- Kaldorf, M., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Hildebrandt, U., Bothe, H. (1999) Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.* **154**:718-728.
- Kochian, L.V., Lucas, W.J. (1983) Potassium transport in corn roots. II The significance of the root periphery. *Plant Physiol.* **73**:208-215.
- Köhler, B., Raschke, K. (2000) The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiol.* **122**:243-254.
- Kolattukudy, P.E. (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* **208**:990-1000.
- Kolattukudy, P.E. (1984) Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* **62**:2918-2933.
- Kollmeier, M., Felle, H., Horst, H.J. (2000) Genotypical differences in aluminium resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol.* **122**:945-956.
- Krichbaum, R., Lüttge, U., Weigl, J. (1967) Mikroautoradiographische Untersuchung der Auswaschung des "anscheinend freien Raumes" von Maiswurzeln. *Ber. Deu. Bot. Ges.* **80**:167-176.
- Kroemer, K. (1903) Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibliotheca Botanica* **59**:1-148.
- Kuchenbrod, E., Kahler, E., Thürmer, F., Deichmann, R., Zimmermann, U., Haase, A. (1998) Functional magnetic resonance imaging in intact plants – quantitative observation of flow in plant vessels. *Magnetic Resonance imaging* **16**:331-338.
- Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Bauch, J (1997) On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Holzforschung* **51**:487-496.
- Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Bauch, J. (2000) The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* **210**:488-496.
- Läuchli, A. (1975) Precipitation technique for diffusible substances. *J. Microscopie Biol. Cell* **22**:239-246.

- Läuchli, A. (1976) Apoplasmic transport in tissues. In: Encyclopedia of Plant Physiology. New series Vol. 2 Part B. Transport in Plants II. Part B: Tissues and organs. Lüttge, U., Pitman, M.G. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. 3-34.
- Läuchli, A., Pflüger, R. (1978) Potassium transport through plant cell membranes and metabolic role of potassium in plants. In: Potassium research, review and trends. Proc. 11th Congr. Int. Potash Inst. Bern, Switzerland. 111-163.
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., Grignon, C. (1996) Tissue-specific expression of *Arabidopsis* *AKT1* gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J.* **9**:195-203.
- Lazof, D.B., Goldsmith, K.G., Rufty, T.W., Suggs, C., Linton, R.W. (1994) The preparation of cryosections from plant tissue: an alternative method appropriate for secondary ion mass spectrometry studies of nutrient tracers and trace metals. *J. Microsc.* **176**:99-109.
- Lehmann, H., Stelzer, R., Holzamer, S., Kunz, U., Gierth, M. (2000) Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* (im Druck).
- Leigh, R.A., Wyn Jones, R.G. (1984) A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* **97**:1-13.
- Linton, R.W., Goldsmith, J.G. (1992) The role of secondary ion mass spectrometry (SIMS) in biological microanalysis: technique comparisons and prospects. *Biol. Cell* **74**:147-160.
- Lüttge, U., Weigl, J. (1962) Mikroautoradiographische Untersuchungen der Aufnahme und des Transportes von ³⁵SO₄²⁻ und ⁴⁵Ca²⁺ in Keimwurzeln von *Zea mays* und *Pisum sativum*. *Planta* **58**:113-126.
- Mager, H. (1933) Die Endodermis als Grenze für Stoffwanderungen. *Planta* **19**:534-546.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Michel, M. (1991) Kryo-Ultramikrotomie hochdruckgefrorener pflanzlicher und mikrobieller Proben: ein Vergleich mit konventionellen Kryo-Präparationsverfahren. Dissertation an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich. Diss. ETH Nr. 9548.
- Michel, M., Hillmann, T., Müller, M. (1991) Cryosectioning of plant material frozen at high pressure. *J. Microsc.* **163**:3-18.
- Mohr, H., Schopfer, P. (1992) Pflanzenphysiologie. 4. Aufl. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

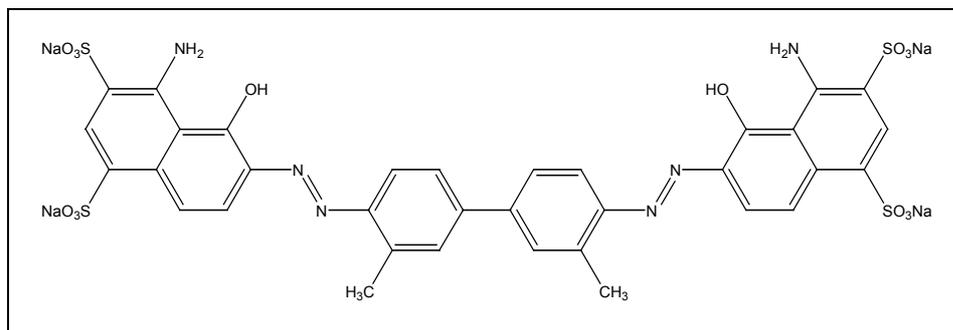
- Moor, H. (1987) Theory and practice of high pressure freezing. In: Cryotechniques in biological electron microscopy. Steinbrecht, R.A.; Zierold, K. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp. 175-191.
- Mühlefeld, M. (1993) Untersuchungen zur Lokalisation anorganischer Ionen im Apoplasten von Gerstenwurzeln (*Hordeum vulgare* L. cv. Aramir). Diplomarbeit am Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Münch, E. (1930) Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Verlag G. Fischer. Jena.
- Newbury, D.E., Joy, D.C., Echlin, P., Fiori, C.E., Goldstein, J.I. (1986) Advanced scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Plenum Press. New York.
- Nightingale, E.R. (1959) Phenomological theory of ion solvation. J. Physic. Chem. **63**:1381-1387.
- North, G.B., Nobel, P.S. (1991) Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave deserti* (Agavaceae). Am. J. Bot. **78**:906-915.
- Orlovich, D.A., Ashford, A.E. (1995) X-ray microanalysis of ion distribution in frozen salt/dextran droplets after freeze-substitution an embedding in anhydrous conditions. J. Microsc. **180**:117-126.
- Perumalla, C.J., Peterson, C.A., Enstone, D.E. (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I Roots with a uniseriate hypodermis or epidermis. Bot. J. Linn. Soc. **103**:93-112.
- Peters, W.S., Felle, H.H. (1999) The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in maize roots. Plant Physiol. **121**:905-912.
- Peterson, C.A. (1987) The exodermal casparian band of onion roots blocks the apoplastic movement of sulphate ions. J. Exp. Bot. **38**:2068-2081.
- Peterson, C.A. (1989) Significance of the exodermis in root function. In: Structural and functional aspects of transport in roots. Third international symposium on structure and function of roots. Nitra, Czechoslovakia. Loughman, B.C., Gasparikova, O., Kolek, J. (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 35-40.
- Peterson, C.A., Emanuel, M.E. (1983) Casparian bands occur in onion root hypodermal cells: evidence from band plasmolysis. Ann. Bot. **51**:135-137.
- Peterson, C.A., Emanuel, M.E., Humphreys, G.B. (1981) Pathway of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation on corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). Can. J. Bot. **59**:618-625.
- Peterson, C.A., Perumalla, C.J. (1984) Development of the hypodermal casparian band in corn and onion roots. J. Exp. Bot. **35**:51-57.
- Peterson, C.A., Peterson, R.L., Robards, A.W. (1978) A correlated histochemical and ultrastructural study of the epidermis and hypodermis of onion roots. Protoplasma **96**:1-21.

- Peterson, T.A., Swanson, E.S., Hull, R.J. (1986) Use of lanthanum to trace apoplastic solute transport in intact plants. *J. Exp. Bot.* **37**:807-822.
- Richter, K. (1994) A cryogluce to mount vitreous biological specimens for cryoultramicrotomy at 110K. *J. Microsc.* **173**: 143-147.
- Robards, A.W., Clarkson, D.T., Sanderson, J. (1979) Structure and permeability of the epidermal/hypodermal layers of the sand sedge (*Carex arenaria*, L.). *Protoplasma* **101**:331-347.
- Robards, A.W., Jackson, S.M., Clarkson, D.T., Sanderson, J. (1973) The structure of barley roots in relation to the transport of ions into the stele. *Protoplasma* **77**:291-311.
- Robards, A.W., Robb, M.E. (1974) The entry of ions and molecules into roots: an investigation using electron-opaque tracers. *Planta* **120**:1-12.
- Samuels, L.A., Fernando, M., Glass, A.D.M. (1992) Immunofluorescent localization of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K⁺ nutrition. *Plant Physiol.* **99**:1509-1514.
- Satter, R.L., Garber, R.C., Khairallah, L., Cheng, Y.-S. (1982) Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. *J. Cell Biol.* **95**:893-902.
- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**:655-658.
- Schneider, T., Povh, B., Strasser, O., Gierth, M., Przybylowicz, W., Mesjasz-Przybylowicz, J., Churms, C., Schüßler, A. (2000) Micro-PIXE Evaluation of Fe distribution in barley roots. *Intern. J. Pixe.* im Druck.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., Zeier, J. (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* **50**:1267-1280.
- Schwendener, S. (1882) Die Schutzscheiden und ihre Verstärkungen. *Abhandlungen der Königlichen Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.* 1-73.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.-M. et al. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transporter system. *Science* **256**: 663-665.
- Shone, M.G.T., Clarkson, D.T. (1988) Rectification of radial water flow in the hypodermis of nodal roots of *Zea mays*. *Plant and Soil* **111**:223-229.
- Sivaguru, M., Horst, W.J. (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of *Zea mays* L.. *Plant Physiol.* **116**:155-163.
- Stasovski, E., Peterson, C.A. (1991) The effects of drought and subsequent rehydration on the structure and vitality of *Zea mays* seedling roots. *Can. J. Bot.* **69**:1170-1178.

- Stelzer, R., Läuchli, A. (1977) Salz- und Überflutungstoleranz von *Puccinellia peisonis* II. Strukturelle Differenzierung der Wurzel in Beziehung zur Funktion. Z. Pflanzenphysiol. **84**:95-108.
- Stelzer, R., Läuchli, A. (1978) Salt- and flooding tolerance of *Puccinellia peisonis* III. Distribution and localization of ions in the plant. Z. Pflanzenphysiol. **88**:437-448.
- Stelzer, R., Läuchli, A., Kramer, D. (1975) Interzelluläre Transportwege des Chlorids in Wurzeln intakter Gerstenpflanzen. Cytobiologie **10**:449-457.
- Steudle, E. (1989) Water flow in plants and its coupling to other processes: an overview. Methods in Enzymology **174**: 183-225.
- Steudle, E., Peterson, C.A. (1998) How does water get through roots? J. Exp. Bot. **49**:775-788.
- Strasser, O., Köhl, K., Römheld, V. (1999) Overestimation of apoplastic Fe in roots of soil grown plants. Plant and Soil **210**:179-189.
- Strucker, S. (1949) Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Springer-Verlag. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Taylor, J.A., West, D.W. (1980) The use of the Evan's Blue stain to test the survival of plant cells after exposure to high salt and high osmotic pressure. J. Exp. Bot. **31**:571-576.
- Vakhmistrov, D.B. (1967) On the function of the apparent free space in plant roots. A study of the absorbing power of epidermal and cortical cells in barley roots. Sov. Plant Physiol. **14**:103-107.
- van Fleet, D.S. (1961) Histochemistry and function of the endodermis. Bot. Rev. **27**: 165-200.
- van Iren, F., Boers-van der Sluijs, P (1980) Symplasmic and apoplasmic radial ion transport in plant roots. Planta **148**:130-137.
- Walker, D.J., Black, C.R., Miller, A.J. (1998) The role of cytosolic potassium and pH in the growth of barley roots. Plant Physiol. **118**:957-964.
- Weast, R.C. (1989) Handbook of Chemistry and Physics. 70th edition. Chemical Rubber Co.. Cleveland.
- Wegner, L.H., Sattelmacher, B., Läuchli, A., Zimmermann, U. (1999) Trans-root potential, xylem pressure, and root cortical membrane potential of "low salt" maize plants as influenced by nitrate and ammonium. Plant Cell Environ. **22**:1549-1558.
- Wegner, L.H., Zimmermann, U. (1998) Simultaneous recording of xylem pressure and trans-root potential in roots of intact glycophytes using a novel xylem pressure probe technique. Plant Cell Environ. **21**:849-865.
- Weigl, J., Lüttge, U. (1962) Mikroautoradiographische Untersuchungen über die Aufnahme von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ durch die Wurzeln von *Zea mays* L.. Die Funktion der primären Endodermis. Planta **59**: 15-28.

- Welz, B. (1985) Atomic absorption spectrometry. 2nd edition, VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim.
- Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N., Flowers, T.J (1999) Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant Cell Environ.* **22**:559-565.
- Yeo, A.R., Yeo, M.E., Flowers, T.J. (1987) The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* **38**:1141-1153.
- Zeier, J., Ruel, K., Ryser, U., Schreiber, L. (1999) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* **209**:1-12.
- Zglinicki, T. von (1991) Reliability of intracellular water and ion distributions as measured by X-ray microanalysis – a review. *Scanning Microsc. Suppl.* **5**:S85-S93.
- Ziegler, H., Weigl, J., Lüttge, U. (1963) Mikroautoradiographischer Nachweis der Wanderung von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ durch die Tertiärendodermis der *Iris*-Wurzel. *Protoplasma* **56**: 362-370.
- Zierold, K., Steinbrecht, R.A. (1987) Cryofixation of diffusible elements in cells and tissues for electron probe microanalysis. In: *Cryotechniques in biological electron microscopy*. Steinbrecht, R.A., Zierold, K. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo. 272-279.
- Zimmermann, M.H., Hartmann, K., Schreiber, L., Steudle, E. (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* **210**:302-311.
- Zimmermann, M.H., Steudle, E. (1998) Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* **206**:7-19.

7 Anhang



Evans Blue ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$) Mol. Gew. 960,83

bezogen über Sigma Aldrich GmbH, 82039 Deisenhofen.

Tab. 10: Meßwerte (p/b ratios) der Kalibriergeraden für die EDXA an Kryoschnitten. Werte, die mit einem "*" markiert sind, sind nicht mit in die Regressionsgerade mit eingeflossen.

	Rubidium			Kalium			Chlor		
	Mittelwerte	+/-	n	Mittelwerte	+/-	n	Mittelwerte	+/-	n
0	0,0265	0,013	28	0,0129	0,009	48	0,0085	0,006	21
25	0,0437	0,019	31	0,0154	0,010	6	0,0208	0,008	25
50	0,0702	0,017	30	0,0349	0,016	26	0,0264	0,015	30
100	0,1228	0,046	28	*0,0353	0,011	21	0,0536	0,027	28
150	*0,1151	0,022	12	0,0860	0,025	30	*0,0522	0,024	12
r^2									

Tab. 11: Natürliches Vorkommen der häufigsten Isotope (%) von Kalium, Calcium und Magnesium (nach Weast, 1989).

Isotop	Kalium			Calcium			Magnesium		
	39	40*	41	40	42	44	24	25	26
Häufigkeit	93,3	0,01	6,7	96,9	0,6	2,1	79,0	10,0	11,0

Radioaktive Isotope sind mit einem "*" markiert.

Danke ...

Herrn Prof. Dr. H. Lehmann danke ich für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit und seine Bereitschaft jederzeit Fragen offen zu diskutieren.

Herrn Dr. R. Stelzer danke ich für die beste Betreuung, die man sich im Rahmen einer solchen Arbeit vorstellen kann. Ohne seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, seinen Ideenreichtum und sein Engagement wäre diese Arbeit kaum zustande gekommen.

Herrn Dr. W. Kaeser danke ich für die Einführung in die Gefriermikrotomie sowie die Überlassung seines Kryo-Diamantmessers, wodurch das Anfertigen der Gefrierschnitte wesentlich erleichtert wurde.

Herrn Dr. W. H. Schröder vom Forschungszentrum Jülich danke ich für die große Hilfe bei der Durchführung der SIMS Untersuchungen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für ein angenehmes Arbeitsklima und tatkräftige Hilfe.

Meiner Familie danke ich für Geduld, Unterstützung, Aufmunterung, Zuversicht.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Forschungsmittel der DFG im Rahmen des Schwerpunktprogramms 717: "Der Apoplast der Höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum" gefördert.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Markus Gierth
Geburtsdatum	26.11.68
Geburtsort	Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, ein Sohn (Hannes Simko, geb. 20.5.98)

Ausbildung:

1975 - 79	Grundschule Mengendamm, Hannover
1979 - 81	Orientierungsstufe Röntgenstraße, Hannover
1981 - 88	Leibnizschule Hannover
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1988 - 89	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
Okt. 1989 bis Dez. 1995	Biologiestudium an der Universität Hannover
	Vordiplom Sept. 1991
	Hauptfach: Botanik
	Nebenfächer: Zoologie, Pflanzenphysiologie, Bodenkunde
	Abschluß: Diplombiologe

Praktische Tätigkeit

Jan. 1996 bis Jan. 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover
-------------------------	---