

**Charakterisierung zonaler Unterschiede in der
Aluminium-Sensitivität der Primärwurzelspitze von
Zea mays (L.)**

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von
Malte Kollmeier
geboren am 11.11.1970, in Duisburg

2001

Referent: Prof. Dr. W. J. Horst
Korreferent: Prof. Dr. H. Lehmann
Tag der Promotion: 13.07.2001

Abstract

Weltweit ist Aluminium-(Al)-Toxizität auf sauren Böden einer der bedeutendsten den Ertrag von Nutzpflanzen limitierenden Faktoren. Der primäre Angriffsort von Al ist in der Wurzel lokalisiert, jedoch sind die genauen Mechanismen der Schädigung noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Primärwurzelspitze von Mais (*Zea mays* L.) hinsichtlich zonaler Unterschiede in der Al-Sensitivität charakterisiert. Kurzzeiteffekte (1-3 h) wurden an 3-4 Tage alten Keimlingen zweier unterschiedlich Al-resistenter Maisgenotypen untersucht. Agaroseblocksysteme ermöglichten die spezifische Behandlung von 1-mm Segmenten intakter, vertikal wachsender Wurzeln mit Al oder anderen Substanzen. Alle Parameter wurden mit einer longitudinalen Auflösung von 1-mm in den apikalen 5 bzw. 10 mm analysiert.

Die Parameter Al-induzierte Hemmung des Wurzellängenwachstums, Callosebildung und Al-Akkumulation zeigten, dass spezifische Al-Behandlung einer Zone im Abstand von 1-2 mm von der Wurzelspitze zu Effekten führte, die denen bei Behandlung über den gesamten Apex (3 cm) entsprachen, während die benachbarte 0-1 mm Zone deutlich weniger empfindlich reagierte. Behandlung der Elongationszone (EZ: 2-5 mm) löste innerhalb 1 h keine Al-Effekte aus.

Mittels pH-selektiver Mikroelektroden konnte demonstriert werden, dass Al sowohl bei Behandlung über den gesamten Apex als auch spezifisch an die 1-2 mm Zone zu deutlichen Veränderungen des für die Maiswurzel typischen pH-Profiles entlang der Rhizoplane führte. Primär kam es dabei zu einer pH-Wert-Absenkung in der Alkalisierungszone im Bereich der apikalen 3 mm. Diese Effekte traten innerhalb von 15 min auf und waren beim Al-sensitiven Genotyp stärker ausgeprägt.

Aluminium-Behandlung der 1-2 mm Zone, die selber kaum zur Wurzelstreckung beiträgt, führte zur schnellen Hemmung der Wurzelstreckung in der EZ. Untersuchungen zum Einfluss von Al auf die Indol-3-Essigsäure-(IES)-Homöostase in der Wurzelspitze weisen auf eine Beteiligung des durch Al gehemmten basipetalen IES-Transportes an der Weiterleitung des Al-Signals hin.

Um die Ursache für die genotypischen Unterschiede in der Al-Resistenz zu erklären, wurde die Abgabe der Anionen organischer Säuren aus der Wurzelspitze untersucht. Das die Resistenz vermittelnde Anion ist Citrat. Es wurde, in Korrelation mit der genotypischen Al-Resistenz, aus den apikalen 3-4 mm ausgeschieden, wobei die Exsudationsrate bis 100 μ M Al positiv mit der Al-Konzentration im Medium korreliert war. Aluminium führte zu einer deutlichen Abnahme der Citratgehalte des Al-sensitiven Genotyps bei Zunahme der spezifischen Aconitase-Aktivität. Beim Al-resistenten Genotyp waren die spezifischen Aktivitäten der Malat-Dehydrogenase und PEP-Carboxylase signifikant, die der Citrat-Synthase tendenziell erhöht, während die Citratgehalte nicht beeinflusst waren.

Mittels der Patch-clamp Technik wurde der molekulare Mechanismus der Exsudation untersucht. Ein Al-aktivierter Anionenkanal war ausschließlich in der Plasmamembran aus der Rinde der 1-2 mm Zone isolierter Protoplasten detektierbar. Die Aktivierung erfolgte nach einer Verzögerungsphase von ca. 10 min. Der Kanal verfügt über eine große Chlorid-Leitfähigkeit von 144 pS und ist für Citrat und Malat permeabel. Er trat signifikant häufiger beim Al-resistenten Genotyp auf.

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen ist zu folgern, dass die 1-2 mm Zone der Primärwurzelspitze von *Zea mays* (L.) von herausragender Bedeutung für Al-Toxizität sowie -Resistenz ist. Kurzfristige Al-Behandlung führt in dieser Zone zu physiologischen Veränderungen, die die weitere Zellentwicklung in genotypisch unterschiedlicher Weise beeinflussen. Ferner wird das Al-Signal aus dieser Zone an die Elongationszone geleitet und führt dort zur schnellen Hemmung des Streckungswachstums.

Schlagworte: Aluminiumtoxizität, organische Säuren, Stressresistenz

Abstract

Aluminium (Al) toxicity in acid soils is one of the most important crop yield-limiting factors world-wide. The primary target of Al is located in the root, however, the underlying mechanisms remain equivocal. In this study the spatial sensitivity of the primary root-tip of *Zea mays* (L.) towards Al was characterised. Short-term effects (1-3 h) on 3 to 4-day-old seedlings of two maize cultivars differing in Al sensitivity were examined. Agarose gels allowed the localised treatment of Al or other substances to specific 1-mm root segments of intact, vertically growing roots. Parameters were analysed with a longitudinal resolution of 1-mm in the apical 5 or 10 mm.

The study of Al-induced inhibition of root elongation, callose formation, and Al-accumulation revealed that specific treatment of a root zone at a distance of 1-2 mm from the root tip for 1 h led to effects similar to those derived upon treatment of the entire root apex (3 cm). The adjacent 0-1 mm zone proved considerably less sensitive while treatment of the elongation zone (EZ: 2-5 mm) did not yield considerable Al effects.

Aluminium treatment to the 1-2 mm root zone as well as the entire apex led to significant changes in the typical pH-profile along the maize root rhizoplane as determined by means of pH-selective micro-electrodes. The outstanding effect was a pH decrease in the alkalisation zone (apical 3 mm). These effects occurred within 15 min and were more pronounced in the Al-sensitive cultivar.

Aluminium treatment to the 1-2 mm zone – not considerably contributing to root elongation – evoked a rapid inhibition of elongation growth in the EZ. Experiments on the influence of Al on the indole-3-acetic acid (IAA) homeostasis in the root tip suggest a role of inhibited basipetal IAA-transport in the transduction of the Al-signal from the 1-2 mm zone to the EZ.

To study the mechanisms conferring differential genotypical Al-resistance, the exudation of organic acid anions from the root tip was studied. Citrate is the anion mediating resistance. In accordance with the genotypical Al-resistance it was exuded from the apical 3-4 mm. The exudation rate was positively correlated with the Al-concentration in the incubation medium up to 100 μM Al. Aluminium treatment led to a significant decrease in tissue citrate contents and elevated specific activity of aconitase in the Al-sensitive cultivar. In contrast, no effect on citrate contents was demonstrated in the Al-resistant cultivar while a significant increase in specific activity was observed for malate dehydrogenase and PEP carboxylase. The specific activity of citrate synthase was increased in tendency in the Al-resistant cultivar.

The underlying molecular mechanism of Al-induced exudation of organic anions was studied by means of the patch-clamp technique. An Al-activated anion channel was detected only in the plasma membrane of protoplasts isolated from cortical cells of the 1-2 mm zone. Activation occurred after a lag phase of approximately 10 min. The channel is characterised by a large chloride conductance of 144 pS and is permeable to citrate and malate. It was detected in both cultivars, though more often in the Al-resistant cultivar.

In conclusion, the 1-2 mm zone of the primary root of *Zea mays* is of outstanding importance for Al-toxicity and –resistance. Short-term treatment with Al in this zone leads to physiological responses determining the further cell development in genotypically different manner. Furthermore, the Al-signal is transduced from this root zone to the elongation zone, leading to rapid inhibition of cell elongation.

Keywords: Aluminium toxicity, organic acids, stress resistance

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	9
2.1	Pflanzenmaterial, Anzucht und Versuchsbedingungen	9
2.2	Histochemische Untersuchungen.....	10
2.2.1	Calcofluor Weiß Färbung.....	10
2.2.2	Anilinblaufärbung.....	10
2.2.3	Hämatoxylinfärbung.....	11
2.3	Bestimmung des Wurzellängenwachstums.....	11
2.4	Calloseanalytik.....	11
2.5	Bestimmung monomeren Aluminiums in Nähr- und Inkubationslösungen	12
2.6	Elementanalytik.....	13
2.7	Lokalisation von Al mittels Sekundärionen Massenspektrometrie (SIMS).....	13
2.8	Messung der pH-Oberflächenprofile mittels pH-selektiver Mikroelektroden...	14
2.9	Anteil einzelner Wurzelzonen an der Wurzelstreckung	16
2.10	Effekt extern applizierter IES auf die Al-induzierte Hemmung des WLW	16
2.11	Exogene Applikation von [³ H]-IES und deren Lokalisation in 1-mm Wurzelsegmenten	17
2.12	Bestimmung der Exsudationsrate der Anionen organischer Säuren	18
2.12.1	Exsudation aus dem gesamten Wurzelsystem.....	18
2.12.2	Exsudation aus der Wurzelspitze	19
2.12.3	Exsudation aus abgeschnittenen 1-mm Segmenten	20
2.13	Bestimmung der Gewebegehalte organischer Anionen	20
2.14	Bestimmung der Aktivitäten von Enzymen des Carbonsäuremetabolismus ..	21
2.15	Einfluss von Al auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran von Maiswurzelpoplasten.....	23
2.15.1	Protoplastenisolation	23
2.15.2	Patch-clamp Technik.....	24
2.15.2.1	Messprinzip der Patch-clamp Technik.....	24
2.15.2.2	Patch-clamp Aufzeichnungen.....	25
2.15.2.3	Patch-clamp Lösungen.....	26
2.15.2.4	Bestimmung der relativen Permeabilitäten.....	26
2.16	Statistik	27

3 Ergebnisse	28
3.1 Einfluss von Al auf das Wurzellängenwachstum	28
3.1.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze	28
3.1.2 Einfluss spezifischer Al-Behandlung auf den Anteil einzelner Wurzelsegmente an der Wurzelstreckung	30
3.1.3 Lichtmikroskopische Charakterisierung der Primärwurzelspitze	32
3.2 Einfluss von Al auf die Callosebildung in der Wurzelspitze	34
3.2.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze	34
3.2.2 Behandlung spezifischer 1-mm Segmente	35
3.2.3 Lokalisation von Callose in Wurzelquerschnitten mittels Anilinblau ...	37
3.3 Einfluss von Al auf die Mineralstoffgehalte in der Wurzelspitze	38
3.3.1 Akkumulation von Al in der Wurzelspitze	38
3.3.1.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze	38
3.3.1.2 Behandlung spezifischer 1-mm Segmente	40
3.3.1.3 Al-Lokalisation mittels Hämatoxylin	41
3.3.1.4 Al-Lokalisation in Kryoschnitten mittels der SIMS	42
3.3.2 Gehalte von K, Ca, Mg und P in der Wurzelspitze	45
3.4 Einfluss von Al auf das pH-Profil entlang der Rhizoplane	48
3.4.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze	48
3.4.2 Behandlung spezifischer 1-mm Segmente	50
3.5 Einfluss von Al auf die IES-Homöostase in der Wurzelspitze	52
3.5.1 Einfluss von IES auf die Al-induzierte Hemmung des WLW	52
3.5.2 Einfluss von Al auf Aufnahme und Transport von [³ H]-IES	54
3.6 Die Exsudation der Anionen organischer Säuren als Mechanismus der Al- Resistenz	56
3.6.1 Lokalisation der Hauptexsudationszone	57
3.6.1.1 Exsudation aus dem Gesamtwurzelsystem	57
3.6.1.2 Exsudation aus den apikalen 10 mm	59
3.6.1.3 Exsudation aus den apikalen 5 mm	61
3.6.1.4 Exsudation aus inkubierten Wurzelspitzen	62
3.6.2 Einfluss von Anionenkanal-Inhibitoren auf die Exsudation	65
3.6.3 Aluminium-Spezifität der Exsudationsinduktion	66
3.6.4 Kontinuität der Exsudation nach Entfernen von Al	67
3.6.5 Einfluss von Al auf die Gewebegehalte organischer Anionen	68

3.6.6	Einfluss von Al auf Enzyme des Carbonsäuremetabolismus.....	73
3.6.6.1	Verteilung der Enzymaktivitäten entlang des Wurzelapex.....	73
3.6.6.2	Einfluss von Al auf die spezifischen Enzymaktivitäten	74
3.7	Einfluss von Al auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran von Wurzelrindenprotoplasten	78
3.7.1	Charakterisierung eines Al-aktivierten Anionenkanals	78
3.7.1.1	Aluminium-induzierte Einwärtsströme	78
3.7.1.2	Chlorid-Abhängigkeit der Einwärtsströme	82
3.7.1.3	Einfluss von Anionenkanalinhibitoren.....	83
3.7.1.4	Permeabilität des Anionenkanals für Malat und Citrat.....	84
3.7.2	Einfluss von Al auf K ⁺ -Kanäle.....	86
4	Diskussion.....	88
4.1	Hemmung des Wurzellängenwachstums als Maß der Al-Sensitivität.....	88
4.2	Callosebildung als Maß der Al-Sensitivität	93
4.3	Aluminiumlokalisierung im Gewebe.....	95
4.4	Einfluss von Al auf das pH-Profil entlang der Wurzeloberfläche	101
4.5	Einfluss von Al auf die IES-Homöostase in der Wurzelspitze	105
4.6	Die Exsudation der Anionen organischer Säuren als Mechanismus der Al- Resistenz	110
4.6.1	Charakterisierung und Lokalisation der Exsudation	111
4.6.2	Einfluss von Al auf den Carbonsäuremetabolismus	114
4.6.3	Wird Resistenz ausschließlich über die Exsudation vermittelt?.....	120
4.7	Ein Al-aktivierter Anionenkanal	121
4.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	129
5	Zusammenfassung	130
6	Literaturverzeichnis	135

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACO	Aconitase
Ag	Silber
Al	Aluminium
Al ³⁺	Al(H ₂ O) ₆ ³⁺
Al _{MONO}	monomeres Aluminium
<i>aqua deion.</i>	deionisiertes Wasser (18.3 MΩ, E-pure, Barnstead, Dubuque, Irland)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Geschlossenzustand eines Ionenkanals
Ca	Calcium
Cl	Chlor
CS	Citrat-Synthase
d	Tag
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure
E _K / E _{Cl}	Umkehrpotential für K ⁺ bzw. Cl ⁻
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX-MA	Energiedispersive Röntgenstrahl Mikroanalyse
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)-N,N'Tetraacetat
EZ	Elongationszone
F	Faraday Konstante
g	Erdbeschleunigung
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
I	Stromstärke in Ampere
ICDH	NADP-Isocitratdehydrogenase
ICP	Induzierbar gekoppeltes Plasma
IES	Indol-3-Essigsäure
[³ H]-IES	Tritium-markierte IES
K	Kalium
La	Lanthan
M	molar (mol l ⁻¹)
MDH	NAD-Malatdehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
min	Minute
MZ	Meristematische Zone (0-1 mm von der Spitze)

n	Anzahl der unabhängigen Wiederholungen
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
n.d.	nicht bestimmbar
NPA	N-1-Naphthylphthalam-Säure
n.s.	nicht signifikant
o	Offenzustand eines Ionenkanals
OES	Optische Emissions-Spektrometrie
P	Phosphor
p	Signifikanzniveau
PÄ	Pachyman Äquivalente
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
pH	pondus hydrogenii
PVC	Polyvinylchlorid
P_x/P_{Cl}	relative Permeabilität von Anion X gegenüber Cl^-
R	Gaskonstante
s	Sekunde
S	Siemens
SD	Standardabweichung
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie
t	Zeit
T	absolute Temperatur
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
THF	Tetrahydrofuran
TIBA	2,3,5-Triiodobenzoe-Säure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Spannung in Volt
U_F	Spannung des Folgepulses
U_H	Haltespannung
U_{REV}	Nullstromspannung
V	Volt
WLW	Wurzellängenwachstum
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

Im Jahre 1798 erschien die Streitschrift „An essay on the principle of population“ des britischen Geistlichen und Soziologen Thomas Robert Malthus. In dieser legte er dar, dass die landwirtschaftliche Produktion auf Dauer nicht mit dem Wachstum der Erdbevölkerung mithalten könne (MALTHUS, 1798). Zwei Jahrhunderte später erscheint diese Kalkulation vor dem Hintergrund einer rapide wachsenden Erdbevölkerung aktueller denn je (FEDOROFF und COHEN, 1999; BORLAUG, 2000) und nur eine nachhaltige Nutzung bestehender sowie die Urbarmachung neuer landwirtschaftlicher Nutzflächen scheint die Ernährung der Erdbevölkerung mittelfristig sichern zu können.

Ein maßgeblicher Aspekt ist in diesem Zusammenhang die Aluminiumtoxizität. Aluminiumionen stellen weltweit auf sauren Böden einen der bedeutendsten die Verbreitung von Arten und Ökotypen sowie den Ertrag von Nutzpflanzen limitierenden Faktoren dar (KINZEL, 1983; HAUG, 1984; FOY, 1988). Das ökonomische Ausmaß der toxischen Wirkung von Aluminium (Al) auf Pflanzen zeigt sich darin, dass weltweit etwa 30-40 % der derzeit landwirtschaftlich genutzten Fläche unter niedrigem Boden-pH und, damit häufig einhergehend, hoher Aluminiumsättigung leiden (HAUG, 1984; KOCHIAN, 1995; VON UEXKÜLL und MUTERT, 1995; FEDOROFF und COHEN, 1999). Rechnet man die potentiell in Zukunft nutzbaren Böden hinzu, so wird dieser Anteil auf bis zu 70 % geschätzt (HAUG, 1984; RENGEL, 1996).

Aluminium ist mit etwa 7,6 % Anteil nach Sauerstoff und Silizium das dritthäufigste Element und das häufigste Metall der Erdkruste. Aufgrund seiner hohen Reaktivität liegt es in der Regel in Silikaten, beispielsweise in Form von Feldspäten und Glimmer, seltener auch in Oxiden, gebunden vor. Über deren Verwitterungsprodukte, die Tonminerale, reichert es sich im Boden an (SCHEFFER und SCHACHTSCHABEL, 1982; HAUG, 1984). In saurem Milieu hydrolysieren die Al-Verbindungen und der Anteil der besonders phytotoxischen monomeren Al-Spezies Al^{3+} ($Al(H_2O)_6^{3+}$) steigt dramatisch an (KINRAIDE, 1991; KOCHIAN, 1995). Aus diesem Grund sind besonders die sauren Böden (pH < 5,5) der humiden und semiariden Tropen von der Al-Problematik betroffen, also die Böden, die in Zukunft den größten Bevölkerungsanteil ernähren müssen (VON UEXKÜLL und MUTERT, 1995; FEDOROFF und COHEN, 1999). Diese, im Vergleich zu den postglacial entstandenen, sehr alten Böden sind stark ausgewaschen und entbast und zeichnen sich neben einer hohen Protonen- und Al-Abundanz durch geringe Pflanzenverfügbarkeit von Calcium, Magnesium und

Phosphor aus (MARSCHNER, 1991). Anthropogene Einflüsse wie saurer Niederschlag, Einsatz von Ammoniumdüngern sowie verstärkter Anbau von Leguminosen führen zudem zu einer weiteren Versauerung (MARSCHNER, 1991; FEDOROFF und COHEN, 1999; SIVAGURU *et al.*, 2000b). Eine Anhebung des pH-Wertes durch Kalkung ist aufgrund der sozioökonomischen Hintergründe in den meisten betroffenen Regionen nicht möglich oder sinnvoll (FOY, 1988; SIVAGURU *et al.*, 2000b). Einen Ausweg aus dieser Situation bietet die genetische Adaptation an Aluminiumüberschuss. Unterschiedliche Pflanzenarten sowie Genotypen einer Art unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihrer Al-Sensitivität. Produktion und Anbau Al-resistenter Arten bzw. Genotypen ist daher der effektivste Weg, auch auf stark Al-gesättigten Böden angemessene Erträge zu erwirtschaften.

Bereits 1909 beschrieb FLURI die toxische Wirkung von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma und im Jahre 1918 führten HARTWELL und PEMBER die Reduktion des Wurzellängenwachstums von Gerste und Roggen auf sauren Böden auf die toxische Wirkung von Al zurück. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen der phytotoxischen Wirkung von Al trotz einer florierenden Forschungskultur in diesem Sektor immer noch weitgehend ungeklärt (TAYLOR, 1991; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996; MATSUMOTO, 2000). Es besteht jedoch Einigkeit darüber, dass die Wurzel der primäre Angriffsort von Al ist (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996). So wird das Streckungswachstum der Wurzel innerhalb 1 h Al-Behandlung gehemmt (LLUGANY *et al.*, 1995; BLANCAFLOR *et al.*, 1998; SIVAGURU und HORST, 1998). Einflüsse auf oberirdische Pflanzenorgane ergeben sich dann sekundär, u.a. durch eine unzureichende Erschließung des Wurzelraumes und Mineralstoffmangel sowie Störungen der Phytohormon-Homöostase (MARSCHNER, 1991).

BENNET *et al.* (1985) schlossen aus ihren Untersuchungen zur Ultrastruktur der Zelle, dass der Wurzelhaube eine dominierende Rolle in der Al-Perzeption zukommt. RYAN *et al.* (1993) demonstrierten, dass die ersten 3 mm der Primärwurzelspitze von Mais am empfindlichsten auf Al reagieren. Ein Abtrennen der Wurzelhaube hatte jedoch keinen Einfluss auf die Al-Wirkung, was auf eine basal der Wurzelhaube gelegene Al-perzipierende Region hinweist. SIVAGURU und HORST (1998) konnten schließlich durch spezifische Al-Behandlung einzelner 1-mm Zonen der Primärwurzelspitze von Mais zeigen, dass eine Zone im Abstand von 1-2 mm von der Spitze die stärkste Al-Empfindlichkeit aufweist. Diese Wurzelzone stellt eine Übergangszone zwischen Zellteilung und Zellstreckung (ISHIKAWA und EVANS, 1995; BALUŠKA *et al.*, 1996) dar

und zeichnet sich durch besonders hohe Sensitivität gegenüber externen Stimuli wie Gravistimulation und Auxin (MEUWLY und PILET, 1991; ISHIKAWA und EVANS, 1993) sowie mechanischen Reizen (ISHIKAWA und EVANS, 1990a&1993) aus. In der Literatur wird sie unter unterschiedlichen Begriffen wie „distale Elongationszone“ (DEZ; ISHIKAWA und EVANS, 1995), „postmeristematische Zone isodiametrischen Wachstums“ (PIG; BALUŠKA *et al.*, 1996) sowie „distale Transitionszone“ (DTZ; SIVAGURU und HORST, 1998) geführt. Unter Umgehung einer interpretierenden Namensgebung wird im Zuge dieser Arbeit die neutrale Bezeichnung 1-2 mm Zone verwendet werden.

Da die 1-2 mm Zone nur unbedeutend zum Gesamtstreckungswachstum beiträgt (PILET *et al.*, 1983; RYAN *et al.*, 1993; BLANCAFLOR *et al.*, 1998), ist zu erwarten, dass ein Mechanismus der Signaltransduktion das in dieser Zone perzipierte Al-Signal zur Elongationszone leitet. Aufgrund ihrer fundamentalen Rolle für Entwicklung und Streckungswachstum der Wurzel (HASENSTEIN und EVANS, 1988; KERK und FELDMAN, 1994; RUEGGER *et al.*, 1997) erscheint eine Beteiligung von Auxinen an diesem Prozess möglich. Der von HASENSTEIN und EVANS (1988) demonstrierte hemmende Einfluss von Al auf den basipetalen Transport Tritium-markierter Indol-3-Essigsäure in Richtung Elongationszone deutet auf eine infolge Al-Behandlung auftretende Störung der Auxinhomöostase in der Wurzelspitze hin.

Während die Bedeutung der Wurzelspitze für Al-Toxizität mittlerweile weitgehend akzeptiert ist, bleibt die physiologische Basis der Al-induzierten Hemmung der Zellstreckung ungeklärt. Besonders hinsichtlich der Frage, inwiefern Al-Toxizität primär ein symplastisches oder apoplastisches Phänomen ist, herrscht Uneinigkeit (HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996; MATSUMOTO, 2000). Aluminium interagiert mit einem breiten Spektrum cytosolischer Komponenten, was auf seine hohe Affinität gegenüber natürlichen, im Symplasten vorkommenden Liganden wie Phosphat, Nukleotiden, RNA, DNA, Enzymen, Calmodulin, Tubulin, Carbonsäuren, Heteropolysacchariden, Lipopolysacchariden, Flavonoiden, Anthozyanen, etc. (HAUG, 1984; MARTIN, 1988; DELHAIZE und RYAN, 1995; RENGEL, 1996; MA, 2000) zurückzuführen ist. Allerdings ist zu beachten, dass monomeres Al^{3+} bei dem *in vivo* im Cytosol herrschenden leicht alkalischen pH-Wert nur in extrem geringen Konzentrationen vorkommen kann (KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996). Unter Berücksichtigung seiner hohen Affinität beispielsweise gegenüber Adenosintriphosphat (10^7 mal höher als Mg^{2+}) könnten jedoch bereits diese geringen

Mengen ausreichen, um ernste Schädigungen im Zellstoffwechsel zu induzieren. Zudem wird auch polynuklearen Hydroxy-Aluminium Komplexen mit hoher positiver Ladung wie dem bei basischen pH-Werten vorkommenden Al_{13} (Triskai-dekaaluminium; $AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}^{7+}$) eine stark toxische Wirkung zugesprochen (KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996).

Bevor Al den Symplasten erreicht, muss es jedoch die Zellwand und die Plasmamembran passieren. Extern appliziertes Al bindet schnell an negative Bindungsstellen des Apoplasten (BLAMEY *et al.*, 1990; DELHAIZE *et al.*, 1993a), vornehmlich die Carboxylgruppen der Pektinmatrix (SCHMOHL und HORST, 2000; SCHMOHL *et al.*, 2000). Hierbei kommt es zu einer Verdrängung von Ca, was zu strukturellen Veränderungen der Zellwand führt (HORST, 1995; KOCHIAN, 1995). Bereits diese physikalischen Prozesse könnten möglicherweise zu verringerter Zellwandelastizität und damit vermindertem Streckungswachstum führen. Auch die Plasmamembran wird in ihrer Struktur und Funktionalität durch Al beeinflusst (HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000). So hemmt Al ein- und auswärtsgerichtete K^+ -Kanäle (GASSMANN und SCHRÖDER, 1994; RYAN *et al.*, 1997b; PIÑEROS und KOCHIAN, 2001; ZHANG *et al.*, 2001) sowie Ca^{2+} -Kanäle in Weizen (PIÑEROS und TESTER, 1993&1995; HUANG *et al.*, 1996). Auch Al-induzierte Lipidperoxidation konnte gezeigt werden (CAKMAK und HORST, 1991; MATSUMOTO, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 2001). Unter Berücksichtigung des für Pflanzenzellen postulierten Zellwand-Plasmamembran-Cytoskelett Kontinuums (WYATT und CARPITA, 1993; MILLER *et al.*, 1997a&b; FOWLER und QUATRANO, 1997) wäre die Wirkung von Al auf den Apoplasten völlig ausreichend, um einen Großteil der mit Al-Toxizität in Zusammenhang gebrachten Primärprozesse zu erklären (HORST *et al.*, 1999).

Die Induktion der 1,3- β -Glucan-(Callose)-Synthese ist eine in Pflanzen weit verbreitete Reaktion auf mechanische, biophysikalische, chemische sowie biologische Stressfaktoren und indiziert Läsionen der Plasmamembran (KAUSS, 1987; ZHANG *et al.*, 1994; KAUSS, 1996). In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass Callosebildung in der Wurzelspitze ein sensibler physiologischer Marker für Al-Sensitivität ist (WISSEMEIER *et al.*, 1987; ZHANG *et al.*, 1994; HORST *et al.*, 1997). Die Induktion erfolgt innerhalb von 15 bis 30 min Behandlungsdauer (ZHANG *et al.*, 1994; STAß und HORST, 1995) und erlaubt daher eine Beurteilung des Schädigungsgrades von Geweben innerhalb kurzfristiger Al-Behandlung (SIVAGURU und HORST, 1998).

Die Klärung der Frage nach dem symplastischen bzw. apoplastischen Wirkungsort von Al wird nicht zuletzt aufgrund des hohen analytischen Anspruchs der Lokalisation von Al im Gewebe nach kurzfristiger Al-Behandlung erschwert (RENGEL, 1996). Die longitudinale sowie radiale Verteilung von Al im Gewebe wurde in einer Reihe von Studien mit unterschiedlich sensitiven Methoden wie Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS; ZHANG und TAYLOR, 1989&1990; DELHAIZE *et al.*, 1993a; HORST *et al.*, 1997; SIVAGURU *et al.*, 1998), Energiedispersive Röntgenstrahl Mikroanalyse (EDX-MA; HUETT und MENARY, 1980; DELHAIZE *et al.*, 1993a; MARIENFELD und STELZER, 1993), Laser Mikrosonden Massenanalyse (LAMMA; MARIENFELD *et al.*, 2000), Partikelinduzierte Röntgenstrahlemission (PIXE; SCHOFIELD *et al.*, 1998), Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS; LAZOF *et al.*, 1994a&b, 1996) sowie mit colorimetrischen und fluorometrischen Techniken wie der Hämatoxylin- und Morinfärbemethode (POLLE *et al.*, 1978; TICE *et al.*, 1992; RINÓN und GONZALES, 1992) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die stärkste Akkumulation von Al in der Wurzelspitze im Bereich der am stärksten Al-sensitiven Zone erfolgt (RINÓN und GONZALES, 1992; DELHAIZE *et al.*, 1993a; SIVAGURU und HORST, 1998; HORST *et al.*, 1999) und positiv mit Al-Sensitivität korreliert ist (RINÓN und GONZALES, 1992; DELHAIZE *et al.*, 1993a; LLUGANY *et al.*, 1994; HORST *et al.*, 1997). HUETT und MENARY (1980), DELHAIZE *et al.* (1993a), MARIENFELD und STELZER, 1993) sowie RENGEL und REID (1997) zeigten, dass der bei weitem größte Anteil des akkumulierten Aluminiums im Apoplasten lokalisiert ist. Die radiale Mobilität von Al ist dabei gering und beschränkt sich auf die äußeren corticalen Zellschichten (MARIENFELD und STELZER, 1993; MARIENFELD *et al.*, 2000). Demgegenüber konnten LAZOF *et al.* (1994a) für Sojabohne mittels SIMS eine gute radiale Mobilität zeigen, wobei jedoch der Hauptteil des Aluminiums in der Wurzelperipherie lokalisiert war. Aus dieser Arbeitsgruppe kommt auch der bisher deutlichste Hinweis für ein Eindringen von Al in den Symplasten innerhalb kurzfristiger (30 min) Al-Behandlung (LAZOF *et al.*, 1994a).

Die positive Beziehung zwischen Al-Sensitivität und Al-Akkumulation deutet auf einen Mechanismus der Al-Resistenz hin, der geringere Al-Akkumulation zur Folge hat (RENGEL, 1996). Es lassen sich prinzipiell zwei Strategien der Al-Resistenz unterscheiden (TAYLOR, 1991): Externe Resistenz und interne Toleranz. Pflanzen der ersten Kategorie (Exkluder) verfügen über Mechanismen, die dem Ausschluss von Al aus dem Gewebe dienen (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; HORST, 1995; MA, 2000). Pflanzen der zweiten Kategorie (Inkluder) nehmen Al zum Teil in erheblichen

Mengen auf, verfügen jedoch über interne Mechanismen der Al-Detoxifikation wie dessen Komplexierung im Cytosol, Akkumulation in der Vakuole, Verlagerung in weniger Al-empfindliche Pflanzenorgane oder das Vorhandensein Al-resistenter Proteine (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995). So können typische Inkluder wie Tee (*Camellia sinensis*) und Hortensie (*Hydrangea macrophylla*) erhebliche Mengen an Al in ihren Blättern bzw. Sepalen speichern. Die meisten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, wie auch Mais, gehören jedoch der ersten Kategorie an (MARSCHNER, 1991).

Als ein möglicher Mechanismus der Al-Exklusion wird die phytogene Erhöhung des Rhizosphären-pH-Wertes diskutiert (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; DEGENHARDT *et al.*, 1998). Eine Alkalisierung der Rhizosphäre würde zu einer Abnahme der Konzentration des besonders toxischen Al^{3+} führen (MARTELL und MOTOKAIKIS, 1989; KINRAIDE, 1991). Ein transients Anstieg des Nährlösungs-pH konnte in einer Reihe von Experimenten mit Al-Resistenz korreliert werden (FOY, 1988; DEGENHARDT *et al.*, 1998 und Referenzen darin). Ein kausaler Zusammenhang ist jedoch aus diesen Studien nicht zu entnehmen, da dort (a) die angebotene Stickstoffform sowie (b) die gesamte Wurzel und nicht nur die für Al-Toxizität sowie -Resistenz zuständige Zone Einfluss auf den pH-Wert nehmen. Mittels ionenselektiver Mikroelektroden konnten MIYASAKA *et al.* (1989) zeigen, dass der Oberflächen-pH-Wert der Wurzelspitze eines Al-resistenten Weizengenotyps nach Al-Behandlung um 0,15 pH-Einheiten über dem eines Al-sensitiven lag. Allerdings war dies eher ein Indiz der Schädigung des sensitiven Genotyps als der Grund für die höhere Resistenz des Al-resistenten Genotyps. Nur DEGENHARDT *et al.* (1998) konnten seither, ebenfalls mittels pH-selektiver Mikroelektroden, die Resistenz einer *Arabidopsis*-Mutante auf die lokale Erhöhung des pH-Wertes an der Oberfläche der Wurzelspitze zurückführen.

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise auf einen auf der Exsudation organischer Liganden mit hoher Al-Bindungskapazität basierenden Mechanismus der Al-Resistenz (MA, 2000). Die Anionen einiger organischer Säuren können Al zu nicht phytotoxischen Verbindungen komplexieren und damit die Konzentration monomeren Aluminiums in Rhizosphäre bzw. Apoplast vermindern (HUE *et al.*, 1986; OWNBY und POPHAM, 1989; JONES, 1998). Eine Al-induzierte Exsudation organischer Anionen konnte positiv mit Al-Resistenz korreliert werden (siehe DELHAIZE und RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995; JONES, 1998; MA, 2000 als Reviews). Die ausgeschiedenen Anionen variieren zwischen den Pflanzenarten. So wird Malat von Weizen (DELHAIZE *et al.*,

1993b; RYAN *et al.*, 1995a&b; PELLET *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2000b), Citrat von Bohne (MIYASAKA *et al.*, 1989), Mais (PELLET *et al.*, 1995; JORGE und ARRUDA, 1997) und Roggen (LI *et al.*, 2000b) sowie Oxalat von Buchweizen (MA *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 1998a&b) als Reaktion auf Al-Behandlung ausgeschieden. Dabei ist die Exsudation von Malat bei Weizen auf die ersten 3 mm der Wurzelspitze, also den Bereich der höchsten Al-Sensitivität, beschränkt (DELHAIZE *et al.*, 1993b; RYAN *et al.*, 1995a&b). Trotz der Fülle an Untersuchungen zur Exsudation ist bisher wenig über den kurzfristigen Einfluss von Al auf den Metabolismus der an diesem Mechanismus der Al-Resistenz beteiligten Carbonsäuren bekannt (MA, 2000; LI *et al.*, 2000b).

Unter den schwach alkalischen Bedingungen im Cytosol liegen die organischen Säuren zum größten Teil deprotoniert vor. Aufgrund des negativen Membranpotentials und des starken Konzentrationsgradienten der Anionen über die Plasmamembran könnten Anionenkanäle am molekularen Mechanismus der Exsudation beteiligt sein. In der höheren Pflanze sind eine Anzahl unterschiedlicher Anionenkanäle beschrieben worden, die an einer Reihe physiologischer Prozesse wie der Regulation der Stomata, Aufrechterhaltung des Membranpotentials, Nährstofftransport sowie Turgoradjustierung beteiligt sind (TYERMAN, 1992; SCHROEDER, 1995). Mittlerweile konnten RYAN *et al.* (1997b) sowie PIÑEROS und KOCHIAN (2001) die Aktivierung von Anionenkanälen in der Plasmamembran von Wurzelspitzenprotoplasten aus Weizen und Mais durch Al demonstrieren. Eine genauere Lokalisation dieser Kanäle ging jedoch bisher nicht über die Wurzelspitze (5 mm) hinaus. ZHANG *et al.* (2001) konnten an dem Al-aktivierten Anionenkanal in Weizen zeigen, dass Aktivierungsfrequenz und Stromdichte bei einer Al-resistenten höher als bei einer Al-sensitiven Linie waren und demonstrierten zudem eine gute Malatpermeabilität. Für Al-aktivierte Anionenkanäle in Mais fehlen bisher sowohl ein Genotypenvergleich als auch eine biophysikalische Charakterisierung der Permeabilität für organische Anionen.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Primärwurzelspitze von Mais hinsichtlich zonaler Unterschiede in der Al-Sensitivität. Die Rolle der besonders Al-sensitiven 1-2 mm Zone bezüglich Aluminium-Toxizität und -Resistenz stand dabei im Mittelpunkt der Untersuchungen. Drei bis vier Tage alte Keimpflanzen zweier unterschiedlich Al-resistenter Maisgenotypen wurden miteinander verglichen. Durch die Verwendung von Agaroseblocksystemen konnten alle Experimente mit vertikal wachsenden Wurzeln intakter Pflanzen durchgeführt werden, wobei die spezifische

Al-Behandlung einzelner 1-mm Zonen möglich war, während die übrige Wurzel ohne Al-Behandlung blieb. Der Charakterisierung der Al-Sensitivität dienten die Parameter Al-induzierte Hemmung des Wurzellängenwachstums, Al-induzierte Callosebildung sowie Al-Akkumulation. Desweiteren wurde der Einfluss von Al auf das pH-Profil entlang der Rhizoplane der Wurzelspitze mittels pH-selektiver Mikroelektroden untersucht sowie Experimente zum möglichen Einfluss von Al auf die Auxinhomeostase durchgeführt. Den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Exsudation organischer Anionen als Mechanismus der Al-Resistenz und dessen Lokalisation in der Wurzelspitze. Mittels der Patch-clamp Technik wurde ferner der molekulare Mechanismus der Exsudation untersucht und ein Al-aktivierter Anionenkanal charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial, Anzucht und Versuchsbedingungen

Alle Versuche wurden mit Mais (*Zea mays* L.) der Genotypen ATP-Y (Al-resistent; Dr. C. Thé, Institut de la Recherche Agronomique du Cameroon, Yaounde, Kamerun) und Lixis (Al-sensitiv; Force Limagrain, Montpellier, Frankreich) durchgeführt. Die Klassifikation hinsichtlich der Al-Sensitivität erfolgte durch LLUGANY *et al.* (1994) und HORST *et al.* (1997) in Nährlösungsexperimenten sowie COLLET (2001) in Feldversuchen. Die Körner wurden nach Größe und Form selektiert (Mitte der Spindel), um vergleichbare Voraussetzungen für den Keimungsprozess zu erreichen (BOCKSTALLER und GIRARDIN, 1994), für 8 h in Leitungswasser vorgequollen und danach in Filterpapierrollen für 3 d angekeimt. Dabei wurde das Filterpapier mit Leitungswasser bzw. Nährlösung feucht gehalten und mittels einer Plastikabdeckung des Ankeimgefäßes ein für den Keimungsprozess optimales Mikroklima geschaffen. Das Ankeimen sowie die Experimente erfolgten unter kontrollierten Umgebungsbedingungen in Klimakammern. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 16/8 h bei einer Temperatur von 30/26 °C, 70 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer Einstrahlungsintensität von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Alle Experimente wurden an intakten Pflanzen durchgeführt. Die Keimlinge wurden wiederum auf Erscheinungsbild und einheitliche Primärwurzellänge (10-15 cm) selektiert. Die Keimlinge wurden vor den Experimenten schrittweise über 24 h an einen pH-Wert von 4,3-4,5 adaptiert, indem der pH-Wert der Ankeimlösung abgesenkt wurde.

Alle Behandlungen erfolgten in Agarosegelen (0,6 % (w/v); Niedrige Geliertemperatur Agarose, Fluka, Deisenhofen), die Nährlösung enthielten. Zu Referenzzwecken wurden Experimente in Nährlösungskultur durchgeführt. Die Zusammensetzung der Nährlösung betrug: 250 μM CaSO_4 ; 400 μM KNO_3 ; 100 μM MgSO_4 ; 20 μM FeDDHA ; 1 μM MnSO_4 ; 0,2 μM ZnSO_4 ; 0,2 μM CuSO_4 ; 10 μM KH_2PO_4 ; 8 μM H_3BO_3 ; 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; 200 μM NH_4NO_3 (pH 4,3 mit 0,1 M HCl). Aluminium wurde aus einer AlCl_3 Stammlösung (1000 ppm in 0,1 mM HCl; Merck, Darmstadt) zu den betreffenden Lösungen pipettiert. Um eine Konzentration von 90 μM monomeren Aluminiums (Al_{MONO}) einzustellen, wurden 300 μM AlCl_3 kurz vor dem Erstarren zum Gel gegeben (siehe SIVAGURU und HORST, 1998). Alle Versuchsansätze wurden ebenfalls mit Kontrollbehandlungen ohne Al parallel durchgeführt. Die lokale Applikation von Al und anderen Substanzen erfolgte mittels des von SIVAGURU und HORST (1998) be-

schriebenen und nach den Anforderungen der jeweiligen Fragestellung modifizierten Agaroseblocksystems. Um Kurzzeit-Effekte von Al zu studieren, lag die jeweilige Behandlungsdauer zwischen 1 und 2 h.

Eventuelle Abweichungen von den hier beschriebenen experimentellen Bedingungen sind den jeweiligen Abbildungslegenden zu entnehmen.

2.2 Histochemische Untersuchungen

Längs- und Querschnitte aus den Segmenten 0-1, 1-2 sowie 3-5 mm (von der Spitze gesehen) der Primärwurzelspitze wurden mittels einer Rasierklinge von Hand erstellt. Die histochemischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Axioskop Fotomikroskop (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Präparate wurden auf Kodak Ektachrome 64 EPY Filme aufgenommen.

2.2.1 Calcofluor Weiß Färbung

Fluoreszenz-Aufheller oder Calcofluor Weiß verstärkt die Autofluoreszenz der Zellwandpolysaccharide. Hierdurch lässt sich mittels Auflichtfluoreszenzmikroskopie die Gewebemorphologie von Quer- und Längsschnitten verbessert darstellen. Handgefertigte Gewebeschnitte wurden für 10 min in einer Lösung aus 0,1 % (w/v) Fluorescent Brightener (Sigma, Deisenhofen) in Sorbitol ($550 \text{ mosmol kg}^{-1}$) inkubiert und unter UV-Anregung ($\lambda = 395 - 440 \text{ nm}$; Sperrfilter bei $\lambda = 470 \text{ nm}$) mikroskopiert (LARKIN, 1976).

2.2.2 Anilinblaufärbung

Handgefertigte Querschnitte wurden für 10 min in einer Färbelösung aus 5 mg Anilinblau (Fluka, Deisenhofen) in 100 ml Leitungswasser (mit Na_2CO_3 auf pH 8,5) inkubiert und dann unter UV-Anregung ($\lambda = 395 - 440 \text{ nm}$) mikroskopiert (GERLACH, 1984). Die Methode beruht auf der Komplexierung von Callose mit dem im Anilinblau enthaltenen Fluorochrom Sirofluor (EVANS *et al.*, 1984). Diese Komplexe fluoreszieren unter UV-Anregung gelb-grün. Aufgrund der geringen, grünlichen Eigenfluoreszenz der Zellwände in den untersuchten Wurzelzonen, traten Interferenzen mit der Callosefluoreszenz nicht auf.

2.2.3 Hämatoxylinfärbung

Die Hämatoxylinfärbung erfolgte in Anlehnung an POLLE *et al.* (1978). Die Färbelösung enthielt 0,2 % (w/v) Hämatoxylin (Fluka, Deisenhofen) und 0,02 % (w/v) KIO₃ in deionisiertem Wasser (*aqua deion.*; 18.3 MΩ, E-pure, Barnstead, Dubuque, Irland). Nach 1 h Behandlung im Agarosegel mit 0 oder 90 μM Al_{MONO} wurden die Wurzeln für 20 min in *aqua deion.* gespült. Wurzelspitzen (3 cm) wurden für 10 min in Färbelösung inkubiert und dann erneut für 15 min gespült. Aluminiumhaltige Gewebepartien erscheinen rötlich-violett angefärbt.

2.3 Bestimmung des Wurzellängenwachstums

Das Wachstum der Wurzeln wurde im Agarosegel mittels eines Binokulars (Stemi SV8, Zeiss, Oberkochen) bei 24-facher Vergrößerung gemessen. Die Genauigkeit betrug dabei 50 μm. Bei der Behandlung von Pflanzen in Nährlösung für 24 h wurde die Primärwurzellänge vor und nach der Al-Behandlung mittels Millimeterpapier mit einer Genauigkeit von 1 mm ermittelt.

Die aluminiuminduzierte Hemmung des Wurzellängenwachstums (WLW) als Indikator für die Empfindlichkeit gegenüber Al wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Al-induzierte Hemmung des WLW} = 100 - \left(\frac{\text{WLW}_{+ \text{Al}}}{\text{WLW}_{- \text{Al}}} * 100 \right)$$

WLW_{-Al}: Zuwachs in der Kontrolle (0 μM Al)

WLW_{+Al}: Zuwachs in der Aluminiumbehandlung

2.4 Calloseanalytik

Die Callosebestimmung erfolgte quantitativ mittels des von KÖHLE *et al.* (1985) und KAUSS (1989) beschriebenen fluorometrischen Verfahrens.

Nach der Behandlung wurden die Primärwurzeln in *aqua deion.* gespült, um Gelreste abzuwaschen. Der apikale Zentimeter wurde in 1-mm Segmente geschnitten. Jeweils die entsprechenden Segmente von zwei Wurzeln wurden in ein Reaktionsgefäß mit 96 % Ethanol überführt, um die Bildung von Wundcallose zu unterbinden, und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben in jeweils 1 ml 1 M NaOH überführt und wiederum eingefroren. Nach dem erneuten Auftauen wurden die Proben für 40 s mittels Ultraschall homogenisiert (Bandelin Ultraschall-Desintegrator Sonopuls HD 70 mit Titansonotrode MS 72, Bandelin Electronics, Berlin).

Die Callose wurde durch Erhitzen der homogenisierten Proben für 15 min im Wasserbad bei 80 °C extrahiert. Größere Gewebereste wurden durch anschließende Zentrifugation (MC 12V, Sorvall, Bad Homburg) für 10 min bei 10000 g sedimentiert. Für die Bestimmung der Callosefluoreszenz wurden 160 µl des Überstandes mit 1 ml einer Lösung aus 500 ml Glycin/NaOH-Puffer (1 M; pH 9,5), 166 ml HCl (1 M) und 334 ml Anilinblau (0,1 % (w/v)) vermischt und für 20 min bei 50 °C inkubiert. Um die durch andere Zellwandpolysaccharide auftretende Autofluoreszenz bestimmen zu können, wurden im gleichen Messgang 160 µl des Überstandes mit einer Lösung aus 500 ml Glycin/NaOH-Puffer (1 M, pH 9,5), 166 ml HCl (1 M) und 334 ml *aqua deion.* vermischt und ebenfalls für 20 min bei 50 °C inkubiert.

Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur (30 min) erfolgte die Messung der Proben am Fluoreszenzspektralfotometer (F2000, Hitachi, Tokyo, Japan; Anregung $\lambda = 393$ nm; Emission $\lambda = 484$ nm; Spannung = 700 V; Spaltbreite = 5 nm). Die Berechnung des Callosegehaltes erfolgte durch Subtraktion der Autofluoreszenz von der Callosefluoreszenz. Der im Ergebnisteil dargestellte Al-induzierte Callosegehalt ergibt sich als Differenz aus der in der Al-Behandlung und der in der Kontrollbehandlung gemessenen Callose.

Als Eichsubstanz diente das 1,3- β -Glucan Pachyman (Calbiochem, Deisenhofen; Polymerisationsgrad 250-690). Daher führen die Callosewerte die Einheit PÄ (Pachyman-Äquivalent). Die Eichreihe wurde im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 25 µg PÄ ml⁻¹ angesetzt.

2.5 Bestimmung monomeren Aluminiums in Nähr- und Inkubationslösungen

Monomeres Aluminium (Al_{MONO}) in Nähr- und Inkubationslösungen wurde mittels der Aluminonmethode nach KERVEN *et al.* (1989) bestimmt. 750 µl der Probenlösung wurden mit 50 µl Ascorbinsäure (0,5 % (w/v) in *aqua deion.*) versetzt. Nach 1 min Einwirkzeit wurden 250 µl Aluminon/Acetatpuffer hinzupipettiert und nach weiteren 30 s die Extinktion bei $\lambda = 530$ nm am Spektralphotometer UVIKON 943 (Kontron Instruments, München) gemessen. Zur Herstellung des Aluminon/Acetatpuffers wurden 24 g NaOH in 200 ml *aqua deion.* gelöst und 120 ml Eisessig zugesetzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 175 mg Aluminon (Aurintricarbonsäure-Ammoniumsalz; Sigma, Deisenhofen) zugegeben und die Lösung auf 500 ml mit *aqua deion.* aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 4,2 eingestellt.

2.6 Elementanalytik

Nach der Behandlung wurden die Primärwurzeln unter *aqua deion.* gespült, um eventuell anhaftende Al-haltige Gelreste zu entfernen. Der apikale Zentimeter wurde in einzelne 1-mm Segmente geschnitten. Die entsprechenden Segmente von 2-4 Wurzeln wurden in Eppendorf-Gefäße mit 500 μ l *aqua deion.* überführt und bei -20 °C eingefroren. Für die Analyse wurden die Proben in 10 ml Teflongefäße überführt. In einem Heizblock wurde das Wasser bei 120 °C verdampft. Die Proben wurden in 1 ml konzentrierter (65 %) ultrareiner HNO₃ aufgenommen und dann bei 190 °C nassverascht. Der Rückstand wurde in 500 bzw. 1000 μ l hochreiner HNO₃ (1:3 in *aqua deion.*) aufgenommen. Die Al-Messung erfolgte am Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer (QZ 939, Unicam, Analytical Technology, Cambridge, UK; λ = 309,3 nm). Die Eichreihe wurde für den Bereich von 0 bis 300 ppb erstellt. Die Messung von K, Ca und Mg erfolgte mittels induzierbar gekoppeltem Plasma in Verbindung mit optischer Emissions Spektrometrie (ICP-OES; Spectro FlameEOP, Spectro Analytical Instruments, Kleve).

2.7 Lokalisation von Al mittels Sekundärionen Massenspektrometrie (SIMS)

Die SIMS beruht auf der Emission von Sekundärionen aus einer Probe, die im Hochvakuum mit einem Primärionenstrahl angeregt wird. Die Sekundärionen werden mittels eines Massenspektrometers detektiert, wobei die Differenzierung der Sekundärionen unterschiedlicher Isotope eines Elements möglich ist. Aus der hier verwendeten bildgebenden SIMS resultiert ein zweidimensionales Lokalisationsbild des jeweils detektierten Isotops über die Präparatfläche.

Wurzeln intakter Keimlinge wurden für 1 h in Agarosegel mit Nährlösung und 0 bzw. 90 μ M Al_{mono} behandelt. Die Wurzelspitzen wurden in eigens dafür modifizierte Mikrotomhalter eingesetzt, in flüssigem Propan schockgefroren (siehe GIERTH *et al.*, 2000) und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Bevorzugung von flüssigem Propan gegenüber Stickstoff vermindert den sogenannten Leidenfrostischen Effekt, d.h. die Ausbildung einer Gasphase an der Oberfläche warmer Objekte, die in die kalte Flüssigkeit getaucht werden, da Schmelz- und Siedepunkt von Propan mit -180 °C bzw. -42 °C weiter auseinander liegen als von Stickstoff (-210 °C und -196 °C). Am Mikrotom Ultracut E mit der Kryokammer FC 4 (Reichert-Jung, Österreich) wurden mit einem Kryo-Diamantmesser (45°, Drukker, Niederlande) Dünnschnitte (300 nm) aus den Wurzelzonen 0-1, 1-2 und 3-4 mm erstellt. Die eigentliche Schnittregion

wurde erreicht, indem die Wurzel mittels eines Glasmessers in 2 µm Schritten bis in die gewünschte Region vorgeschritten und dann zweiphasig getrimmt wurde, sodass die eigentlichen Dünnschnitte Viertelsegmente des Gesamtwurzelquerschnittes darstellen. Die Proben wurden auf mit Gold besputterte Kupferhalter gepresst und gefriergetrocknet (GIERTH *et al.*, 2000). Die räumlichen und technischen Möglichkeiten zur Anfertigung der Kryoschnitte wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Lehmann, Drs. R. Stelzer und M. Gierth (Institut für Tierökologie und Zellbiologie, TiHO Hannover) zur Verfügung gestellt. Die SIMS-Messungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Dr. W. Schröder am Forschungszentrum Jülich an einer Cameca ims 4f (Cameca, Connecticut, USA). Der Strahlstrom betrug 10^{-9} A. Als Primärion diente O_2^+ . Die Primärbeschleunigung betrug 12,5 keV, die Sekundärbeschleunigung 4,5 keV. Die Isotopenverteilung erfolgte in Falschfarben (Farbpalette Fire 2, Scion Image-PC, Version Beta 4.0.2, Scion Corporation, USA), wobei helle Farben Messpunkten mit hoher, dunkle Farben Messpunkten mit niedriger Sekundärionenausbeute entsprechen. Die Messdauer war abhängig von der lateralen Bildauflösung (= Anzahl der Messpunkte im Ausschnitt) sowie der erwarteten Konzentration der Isotope. Die in dieser Arbeit dargestellten Aufnahmen entstanden in 22 min Messzeit.

2.8 Messung der pH-Oberflächenprofile mittels pH-selektiver Mikroelektroden

Für die Arbeit mit den pH-selektiven Mikroelektroden wurde ein veränderter elektro-physiologischer Arbeitsplatz (PETERS und FELLE, 1999) verwendet. Dieser war um 90° gedreht, so dass der positive Gravitropismus der Wurzeln nicht gestört wurde und so die Experimente beeinflusste. Der Keimling und die Wurzel blieben intakt. Bei den hier verwendeten Flüssigmembran-Elektroden bildet der in die Pipettenspitze eingebrachte Sensor als Ionenträger zwischen Pipettenelektrolyt und Messlösung ein Membranpotential, das gegen eine Referenzelektrode gemessen und kalibriert werden kann (lineares Verhalten zwischen pH 4 und 8 bei 59 mV pro pH-Einheit; siehe FELLE und BERTL, 1986; FELLE, 1993). Das Vorgehen bei der Herstellung der ionenselektiven Mikroelektroden wurde bei FELLE und BERTL (1986) und FELLE (1994&1998) beschrieben. Die Mikropipetten wurden auf einem Patch-clamp Puller (List Instruments, Darmstadt) aus Borosilikatglasröhrchen mit solidem Filament (Hilgenberg, Malsfeld) gezogen. Der Spitzendurchmesser betrug 3-4 µm. Die Spitzen waren stumpf und wurden hitzepoliert. Zudem wurden die Pipetten in einem Ofen bei

ca. 180 °C silanisiert (0,15 % Dimethyl-Dichlorosilan in Benzen). Vor der Füllung wurde der apikale Teil (4 cm) der Mikropipette um 30° gebogen, um eine Annäherung an die vertikal positionierte Wurzel zu erlauben.

Um dem ionensensitiven Sensor in der Spitze genug Festigkeit zu verleihen und die Mikroelektrode häufiger verwenden zu können, wurde der Cocktail (Fluka: 95297) in einer Mischung aus 40 mg Polyvinylchlorid (PVC) pro ml Tetrahydrofuran (THF) im Verhältnis 30:70 gelöst. Nach dem Abdampfen des THF wurde das feste Gel mit unverdünntem Sensor-Cocktail überschichtet. Die Elektrolytfüllung war eine Lösung aus 0,5 M KCl und 1 mM 2-([N-Morpholino])-Ethansulfonsäure (MES) mit einem pH-Wert von 6,0. Die Mikropipetten wurden über eine Ag/AgCl Halbzelle an einen Hoch-Impedanz Verstärker (FD 223, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) angeschlossen. Signale wurden mittels eines Schreibers (L2200, Linseis, Selb) aufgezeichnet. Die Experimente wurden unter konstanter Perfusion (1 ml min⁻¹) in einer speziell angefertigten Plexiglasküvette bei Raumtemperatur (22-23 °C) durchgeführt. Die Messlösung bestand aus je 200 µM CaCl₂ und KCl, sowie 1 mM MES (pH 4,5). Die pH-Profile entlang des Wurzelapex wurden in einem Abstand zur Oberfläche von 20 µm und in Intervallen von 200 µm entlang der ersten 5 mm von der Spitze aus durchgeführt. Kontrollmessungen erfolgten 15 min nach dem Befestigen der Wurzeln im Mess-System. Nur Wurzeln, die das für Mais typische pH-Profil (PETERS und FELLE, 1999; eigene Vorversuche) aufwiesen, wurden für weitere Experimente ausgewählt. Entweder der gesamte Apex oder spezifische 1-mm Segmente wurden für 1 h behandelt. Die Behandlung des gesamten Apex erfolgte mittels oben genannter Perfusionslösung ± 90 µM AlCl₃ (entsprechend 68 µM Al_{MONO}). Die spezifische Behandlung erfolgte mittels eines Agaroseblockhalters, der die Platzierung eines 1-mm Agaroseblöckchens (1,2 % (w/v) mit Perfusionslösung ± 90 µM Al_{MONO}; pH 4,5) an spezifische Segmente (0-1, 1-2 sowie 2,5-3,5 mm von der Wurzelspitze) der intakten Maiswurzel ermöglichte, während die übrige Wurzel von Perfusionslösung ohne Al umspült wurde.

Die räumlichen und technischen Möglichkeiten für die elektrophysiologischen Arbeiten wurden von Prof. Dr. H. H. Felle (Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

2.9 Anteil einzelner Wurzelzonen an der Wurzelstreckung

Der für die Messungen der Oberflächen pH-Profile genutzte elektrophysiologische Messplatz erlaubte neben der Messung der pH-Profile auch die Bestimmung der Streckungsrate spezifischer 1-mm Segmente. Vor dem Einsetzen der Keimlinge in die Messküvette wurde die Wurzelspitze in 1-mm Intervallen mit Tinte (Bruynzeel Permanent Fine, Bruynzeel, Niederlande) markiert. Die Abstände zwischen den Markierungen sowie die Breite der Markierungen wurden vor und nach der Behandlung (0 oder 90 μM Al_{MONO} über die gesamte Wurzel oder mittels Agaroseblöckchen an spezifische 1-mm Segmente) gemessen. Auf diese Weise konnte der Anteil einzelner Zonen an der Gesamtstreckungsrate ermittelt werden. Die verwendete Tinte löste sich während der Dauer der Experimente nicht ab und beeinflusste weder das Wurzelwachstum noch die pH-Messungen. Die Präzision der Messungen betrug 25 μm bei 64-facher Vergrößerung. Aufgrund der vertikalen Anordnung der Keimlinge trat kein Gravitropismuseffekt auf. Zwischen den Messungen wurde die Messküvette abgedunkelt.

2.10 Effekt extern applizierter IES auf die Al-induzierte Hemmung des WLW

Das Versuchssystem für die Untersuchung des Effektes extern applizierter Indol-3-Essigsäure (IES; Sigma, Deisenhofen) auf die Al-induzierte Hemmung des WLW war eine modifizierte Variante des PVC-Block Systems (SIVAGURU und HORST, 1998). Hierzu wurden die PVC-Platten auf denen die Keimlinge befestigt waren senkrecht auf einem fahrbaren Gestell vor dem Binokular (20-fache Vergrößerung; Stemi SV8, Zeiss, Oberkochen) platziert, so dass sie für die Messung erschütterungsfrei vor diesem bewegt werden konnten. Ein Gravitropismuseffekt konnte hierdurch weiter ausgeschlossen werden, da das Verbringen der PVC-Platten in die Horizontale für die Messungen umgangen wurde. Nährlösung mit 0 bzw. 90 μM Al_{MONO} oder 10 μM der IES-Transport-Inhibitoren 2,3,5-Triiodobenzoe-Säure (TIBA; Sigma) oder N-1-Naphthylphthalam-Säure (NPA, Naptalam Pestanal[®]; Riedel-de Haën, Seelze) wurde mittels Agaroseblöckchen der 1-2 mm Wurzelzone angeboten, während Agaroseblöckchen (1,2 % (w/v) Agarose; pH 4,3) mit Nährlösung und 0,1 μM IES entweder der 0-1 mm Zone oder einem Teil der Elongationszone (2,5-3,5 mm) angeboten wurde. Die Behandlungsdauer betrug 1 h. Die verwendete IES-Konzentration hatte sich in Vorversuchen, bei denen die gesamte Wurzelspitze (3 cm) im Agarosegel (mit Nährlösung sowie unterschiedlichen IES-Konzentrationen

zwischen 0,01 und 50 μM ; pH 4,3) für 2 h behandelt wurde, stimulierend auf das WLW ausgewirkt (**Abb. 1**).

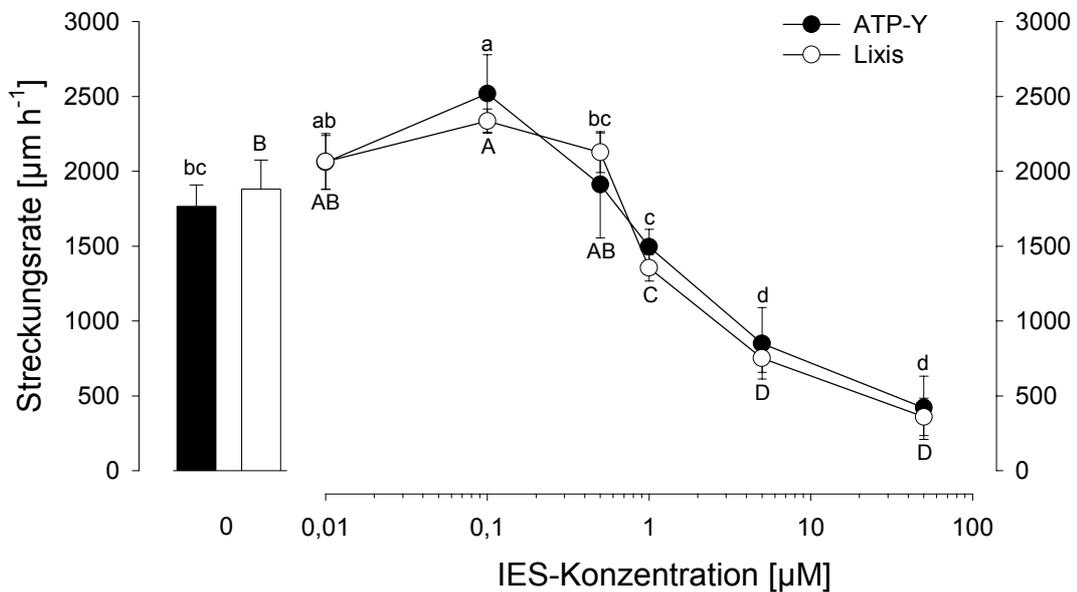


Abb. 1: Einfluss von IES auf das Streckungswachstum der Primärwurzel. Indol-3-Essigsäure wurde für 2 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) über den gesamten Wurzelapex (3 cm) appliziert. Dabei wurden 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 oder 50 μM IES angeboten. Werte sind Mittelwerte von 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Behandlungsunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). Kleine Buchstaben: ATP-Y (Al-resistent); Großbuchstaben: Lixis (Al-sensitiv).

2.11 Exogene Applikation von [³H]-IES und deren Lokalisation in 1-mm Wurzelsegmenten

Es wurden 90 μM Al_{MONO} oder 10 μM der IES-Transport Inhibitoren TIBA oder NPA an der 1-2 mm Zone der Primärwurzelspitze intakter Keimlinge im PVC-Block System appliziert. Tritium-markierte IES ($[^3\text{H}]\text{-IES}$; 777 GBq mmol^{-1} , Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde der Zone im Abstand von 0-1 mm von der Spitze (MZ) in Agaroseblöckchen (64 μl ; 1,2 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) für 30 min angeboten. Hierfür wurden 0,02 μM der markierten IES mit unmarkierter IES gemischt, um eine Endkonzentration von 0,1 μM zu erreichen. Nach der Behandlung wurden die Wurzeln vorsichtig aus dem Versuchssystem entfernt und für 3 s mit *aqua deion.* von der Basis zur Spitze gespült. Danach wurden 1-mm Segmente geschnitten und in Szintillationsgefäßen mit 4 ml *aqua deion.* über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen und Erreichen von Raumtemperatur wurden 8 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus, Lumac LSC B.V., Groningen, Niederlande) zu den Proben gegeben und gut vermischt. Die Radioaktivität wurde mittels eines Flüssigszintillationszählers (RackBeta 1217, LKB Wallac OY, Turku, Finnland) in Zusammenarbeit mit R. Sachse

(Zentrum für Strahlenschutz und Radioökologie, Universität Hannover) bei 10 min Integrationszeit je Probe gemessen.

2.12 Bestimmung der Exsudationsrate der Anionen organischer Säuren

Alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente zum Einfluss von Al auf die Exsudation organischer Anionen, deren Gehalte im Gewebe und die Enzymaktivitäten der an ihrem Metabolismus beteiligten Enzyme wurden nach Möglichkeit stets zwischen 13 und 15 Uhr gestartet, um vergleichbare physiologische Stadien innerhalb der diurnalen Rhythmik des Carbonsäuremetabolismus vergleichen zu können (siehe SCHEIBLE *et al.*, 2000).

2.12.1 Exsudation aus dem gesamten Wurzelsystem

Drei Tage alte Maiskeimlinge wurden nach Morphologie und Primärwurzellänge selektiert. Jeweils 10 Keimlinge wurden gemeinsam in Messgefäße mit 500 ml belüfteter Inkubationslösung (200 μM CaCl_2 , 0 oder 100 μM AlCl_3 (89 μM Al_{MONO}); pH 4,3) eingesetzt, sodass das gesamte Wurzelsystem mit Ausnahme der basalen 2 cm in die Inkubationsflüssigkeit tauchte. Zuvor wurde die Gesamtanzahl der eingetauchten Wurzeln bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 2 h. Nach Entfernen der Pflanzen wurde die Inkubationslösung sukzessive durch 100 und 5 μm Gaze gefiltert und mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} durch eine Säule (Econo-Pac, BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA) befüllt mit 3 g Kationenaustauschergranulat (AG50W-X8, Partikelgröße 75-150 μm , BioRad) gefolgt von einer Säule (Econo-Pac, BioRad) befüllt mit 2 g Anionenaustauschergranulat (AG 1-X8, Partikelgröße 75-150 μm , BioRad) geleitet. Das Eluieren der im Anionenaustauscher gebundenen Anionen erfolgte mittels 18 ml Ameisensäure (8 M), die mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} durch den Anionenaustauscher geleitet wurden. Die Ameisensäure wurde in einem Vakuumzentrifugalverdampfer (RCT 10-22T, Jouan, Saint-Herblain, Frankreich) abgedampft und das entstandene Pellet in 1 ml Perchlorsäure (10 mM) gelöst. Vor der Messung wurden die Proben durch 0,45 μm Filtrationseinsätze (Durapore[®] Membran, Millipore, Eching) geleitet. Die Analyse der organischen Anionen erfolgte mittels isokratischer HPLC (Kroma System 2000, Kontron Instruments, München). Der Trennung der organischen Anionen diente eine Aminex HPX-87H Säule (BioRad), vor die eine H^+ -Microguard Vorsäule (BioRad) geschaltet war. Als Fließmittel wurde Perchlorsäure

(10 mM) bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ und einer Temperatur von $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Oven 480, Kontron Instruments) verwendet. Als Detektor diente ein UV Detector 320 (Kontron Instruments) bei $\lambda = 214 \text{ nm}$. Die Probennahme ($20 \text{ }\mu\text{l}$) erfolgte mittels eines Autosamplers 360 (Kontron Instruments). Der Standardisierung diente ein Mischstandard organischer Anionen in 10 mM Perchlorsäure.

2.12.2 Exsudation aus der Wurzelspitze

Ein System wurde entwickelt, das es ermöglicht, den Wurzelapex intakter Maiskeimlinge spezifisch mit Al zu behandeln und gleichzeitig die Exsudationsrate nur aus diesem Bereich zu bestimmen. Hierzu wurden jeweils 10 Keimlinge gebündelt, sodass die Primärwurzelspitzen in einer Ebene zu liegen kamen. Die Spitzen ($0,5$ oder 1 cm) wurden für 2 h in 4 ml einer Lösung aus $200 \text{ }\mu\text{M}$ CaCl_2 und $0, 10, 25, 50, 75, 100$ oder $200 \text{ }\mu\text{M}$ AlCl_3 ($\text{pH } 4,3$; entsprechend $0, 8, 21, 45, 64, 89, 169 \text{ }\mu\text{M}$ Al_{MONO}) inkubiert. Der basale Teil der Wurzel wurde mit feuchtem Filterpapier und Aluminiumfolie umwickelt und während der Versuche mit CaCl_2 -Lösung ($200 \text{ }\mu\text{M}$) feucht gehalten, um Austrocknung zu verhindern. Um dem Streckungswachstum der Wurzeln Rechnung zu tragen, wurden zu Beginn der Behandlung nur die apikalen $0,4$ bzw. $0,9 \text{ cm}$ in die Inkubationslösung eingetaucht. Die Inkubationslösung befand sich in Bakerbond SPE Filtrationssäulen (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA), die mit 1 g Anionentauschergranulat (AG 1-X8, BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA) gefüllt waren. Das Tauschermaterial wurde durch eine Fritte ($40 \text{ }\mu\text{m}$ Masche) abgedeckt. Nach dem Entfernen der Wurzeln wurde das Inkubationsmedium mit einer Flussrate von ca. 1 ml min^{-1} durch den Anionentauscher geleitet. Die gebundenen Anionen wurden anschließend durch 2 Spülschritte mit je 5 ml Ameisensäure (8 M) ebenfalls mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} eluiert. Die weitere Probenvorbereitung sowie die Messung erfolgten wie in Abschnitt 2.12.1 beschrieben.

Um den Effekt von Anionenkanal-Inhibitoren auf die Exsudation zu untersuchen, wurden der Inkubationslösung $100 \text{ }\mu\text{M}$ der Anionenkanalinhibitoren Nifluminsäure (2-(3-[Trifluoromethyl]anilino)Nicotinsäure, Sigma, Deisenhofen) oder DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonsäure, Sigma) zugegeben. Für diese Experimente wurde eine Al-Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{M}$ ($45 \text{ }\mu\text{M}$ Al_{MONO}) verwendet. Die Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Konzentration monomeren Aluminiums in der Lösung.

2.12.3 Exsudation aus abgeschnittenen 1-mm Segmenten

Jeweils die entsprechenden 1-mm Wurzelsegmente des ersten Zentimeters der Primärwurzelspitze von 52 Wurzeln wurden als eine Wiederholung in mit 5 ml Inkubationslösung (200 μM CaCl_2 ; pH 4,3) befüllte Reaktionsgefäße überführt und für 10 min geschüttelt, um an den Schnittstellen austretende organische Säuren bzw. deren Anionen zu entfernen. Die Waschlösung wurde durch identische Lösung \pm 50 μM AlCl_3 (pH 4,3) ersetzt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 27 °C auf einem Taumelrollenmischer (TRM 50, IDL). Nach 3 h wurde die Inkubationslösung abpipettiert und über eine mit Anionentauscher (1 g, AG 1-X8; BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA) befüllte Bakerbond SPE Säule (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) gegeben. Die gebundenen Anionen wurden anschließend durch 2 Spülschritte mit je 5 ml Ameisensäure (8 M) ebenfalls mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} eluiert. Die weitere Probenvorbereitung sowie die Messung erfolgten wie in Abschnitt 2.12.1 beschrieben.

2.13 Bestimmung der Gewebegehalte organischer Anionen

Nach erfolgter Al-Behandlung (2 h im Agarosegel, 0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μM Al_{MONO} ; pH 4,3) wurde der apikale Zentimeter der Primärwurzel in 1-mm Segmente geschnitten. Jeweils die entsprechenden Segmente von 17-20 Wurzeln wurden als eine Wiederholung in ein Reaktionsgefäß verbracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden sie über Nacht bei -20 °C gelagert. Während des Auftauens wurden die Proben mittels eines Homogenisators (RW 20, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen) in 0,5 ml *aqua deion.* homogenisiert. Zum Spülen des Aufsatzes wurden weitere 0,5 ml hinzugegeben. Zur weiteren Gewebedesintegration wurden die Proben wiederum eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben für 2 h bei Raumtemperatur (21 °C) im Dunkeln auf einem Taumelrollenmischer (TRM 50, IDL) inkubiert. Danach wurden sie für 10 min bei 14000 g zentrifugiert (Biofuge primoR, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde nacheinander durch 0,45 und 0,22 μm Filtriereinsätze (Durapore[®] Membran, Millipore, Eching) gegeben. Die Messung erfolgte wie in Abschnitt 2.12.1 beschrieben.

2.14 Bestimmung der Aktivitäten von Enzymen des Carbonsäuremetabolismus

Nach 2 h Inkubation im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) mit 0 oder 90 μM Al_{MONO} wurden jeweils die entsprechenden 1-mm Wurzelsegmente von 15 Wurzelspitzen zu einer Probe zusammengefasst und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um eine gute Homogenisation des Gewebes zu erreichen, wurden die Proben auf Eis in einem ersten Schritt mittels eines Desintegrators (RW 20, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen) in 1 ml eines 100 mM HEPES/KOH Puffers (pH 7,5) und dann für 40 s mittels einer Sonotrode (Bandelin Sonopuls HD 70 mit Titansonotrode MS 72) ultraschallhomogenisiert. Die Proben wurden anschließend bei 14000 g zentrifugiert (Biofuge primoR, Heraeus, Hanau) und 100 μl Aliquote bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Bestimmung sämtlicher Enzymaktivitäten erfolgte innerhalb der folgenden 10 Tage und die Proben wurden jeweils direkt vor der Messung aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht.

Gesamtproteingehalt

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte fluoreszenzphotometrisch nach der von BÖHLEN *et al.* (1973) beschriebenen Methode mit Fluorescamin (Sigma, Deisenhofen; 30 mg in 100 ml Aceton). 150 μl Probe wurden in 600 μl $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ Puffer (pH 8,0) aufgenommen und mit 250 μl Fluorescaminlösung versetzt. Diese Lösung wurde für 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$) inkubiert, bevor die Messung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 393\text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 475\text{ nm}$ erfolgte (F2000, Hitachi, Tokyo, Japan). Die Eichung erfolgte mittels BSA (Fraktion V, Sigma) im Bereich von 0 bis 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Die im Folgenden beschriebenen Enzymassays wurden an einem UVIKON 943 Spektralphotometer (Kontron Instruments, München) bei einer Raumtemperatur um $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Citrat-Synthase

Die Aktivitätsbestimmung der Citrat-Synthase (CS; EC 4.1.3.7) erfolgte modifiziert nach SRERE (1969) und JOHNSON *et al.* (1994). Die Reaktionslösung enthielt 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0), 5 mM MgCl_2 , 1 mM 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB), 0,3 mM Acetyl-CoA sowie 0,5 mM Oxalacetat. Spektralphotometrisch wurde

die Reduktion von DTNB zu 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure als Extinktionszunahme bei $\lambda = 412 \text{ nm}$ für 3 min gemessen. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{412} für 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure beträgt $13,20 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ (KLEBER *et al.*, 1997).

Aconitase

Die Bestimmung der Aconitase-Aktivität (ACO; EC 4.2.1.3) erfolgte in modifizierter Form nach FANSLER und LOWENSTEIN (1969). Bei dieser Methode wird der Abbau von *cis*-Aconitat spektralphotometrisch bei $\lambda = 240 \text{ nm}$ gemessen. Die Messzeit betrug 3 min. Die Konzentrationen in der Testlösung betragen 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl sowie 0,1 mM *cis*-Aconitat (pH 7,4). Der Extinktionskoeffizient ϵ_{240} für *cis*-Aconitat wurde experimentell als $3,88 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ermittelt.

NADP-Isocitratdehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase (ICDH; EC 1.1.1.42) erfolgte in modifizierter Form nach BERNT und BERGMAYER (1974). Die Konzentrationen in der Testlösung betragen 80 mM Triethanolaminhydrochlorid, 42 mM NaCl, 3,7 mM DL-Isocitrat, 3,9 mM Mn^{2+} sowie 0,32 mM NADP (pH 7,5). Die Reduktion von NADP wurde spektralphotometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ über 3 min verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{340} für NADP beträgt $6,20 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ (KLEBER *et al.*, 1997)

NAD-Malatdehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der NAD-abhängigen Malatdehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) erfolgte modifiziert nach MACNICOL und JACOBSEN (1992). Die Reaktionslösung enthielt 50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 0,5 mM EDTA, 0,2 mM NADH sowie 1 mM Oxalacetat. Die Oxidation von NADH zu NAD wurde spektralphotometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ über 2 min verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{340} für NADH beträgt $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ (KLEBER *et al.*, 1997).

PEP-Carboxylase

Die Bestimmung der Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) erfolgte modifiziert nach HATCH und OLIVER (1978) sowie MACNICOL und JACOBSEN (1992). Die Reaktionslösung enthielt 100 mM Bicine (pH 8,5), 2 mM PEP, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaHCO_3 , 0,2 mM NADH, 1 mM Glucose-6-Phosphat, 4 mM

Dithiothreitol sowie 2 Units MDH (Sigma). Die Oxidation von NADH wurde spektralphotometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ über 3 min erfasst. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{340} für NADH beträgt $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ (KLEBER *et al.*, 1997).

2.15 Einfluss von Al auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran von Maiswurzelprotoplasten

Um die zellulären und molekularen Grundlagen der Al-induzierten Exsudation organischer Anionen näher zu untersuchen, wurde die Patch-clamp Technik (HAMILL *et al.*, 1981) auf Maiswurzelprotoplasten angewendet. Anzucht und Adaptation der Maiskeimlinge erfolgten wie zuvor beschrieben. Vor der Protoplastenisolation wurden die Wurzelapices (3 cm) der intakten Pflanzen für 1 h in Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung sowie 0 oder $90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3) inkubiert. In einem weiteren Versuchsansatz entfiel die Vorbehandlung.

2.15.1 Protoplastenisolation

Protoplasten wurden enzymatisch aus Rindenzellen zweier unterschiedlicher Wurzelzonen isoliert: Der 1-2 mm Zone und einem Teil der Elongationszone (3-5 mm; EZ). Nach der Vorbehandlung wurden die Wurzelspitzen in *aqua deion.* gespült. Jeweils die entsprechenden Segmente aus 40 Wurzelspitzen wurden geschnitten und für den Verdau gesammelt. Die Isolationsroutine basierte auf der von BREGANTE *et al.* (1997) beschriebenen Methode, die für die zu untersuchenden Wurzelzonen modifiziert wurde. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst für 50 min bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 65 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Inkubationslösung setzte sich zusammen aus 1 mM CaCl_2 , 0,5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 0,5 % (w/v) BSA, 0,8 % (w/v) Cellulase (Onozuka RS, Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan), 0,1 % (w/v) Pectolyase (Sigma), 8 mM MES, KOH auf pH 5,5. Die Osmolarität wurde mit Sorbitol auf $550 \text{ mosmol kg}^{-1}$ eingestellt. Zwei ml derselben Lösung ohne Pectolyase und einem pH-Wert von 5,8 wurden hinzugegeben und erneut für 20 min inkubiert. Um die Protoplasten von unverdauten Geweberesten zu trennen, wurde die Suspension durch $75 \mu\text{m}$ Gaze gefiltert und bei 60 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protoplastenpellet in 5 ml Waschlösung (1 mM CaCl_2 , 5 mM MES/Tris, pH 5,5; Sorbitol auf $570 \text{ mosmol kg}^{-1}$) resuspendiert. Nach zwei weiteren identischen Waschschrinen wurden die Protoplasten in dieser Lösung auf Eis

aufbewahrt. Die Patch-clamp Experimente konnten während der folgenden 4-5 h durchgeführt werden. Aus Rindenzellen isolierte Protoplasten konnten von aus Stelenzellen isolierten aufgrund ihrer Größe getrennt werden (BREGANTE *et al.*, 1997). Aufgrund höherer Resistenz der Rhizodermis-Zellwand gegenüber Cellulase und Pectolyase (KOCHIAN und LUCAS, 1983) wurden Rhizodermisprotoplasten während der relativ kurzen Isolationsdauer nur wenig angegriffen. In der Patchküvette fielen diese Protoplasten zudem aufgrund ihrer elliptischen Gestalt auf und konnten so von den Messungen ausgeschlossen werden.

2.15.2 Patch-clamp Technik

2.15.2.1 Messprinzip der Patch-clamp Technik

Das Öffnen und Schließen eines Ionenkanals resultiert in extrem kleinen und in der Regel kurzanhaltenden Stromfluktuationen. Die Patch-clamp Technik (HAMILL *et al.*, 1981; SAKMANN und NEHER, 1995) ermöglicht es, die Aktivität einzelner in Biomembranen lokalisierter Ionenkanäle aufzulösen, indem mit zunehmender Weiterentwicklung sowohl die zeitliche Auflösung als auch das Signal:Rausch Verhältnis verbessert und somit Ströme im Picoampere Bereich und einer Impulsdauer von < 1 ms messbar gemacht wurden. Dabei sind die intra- und extrazellulären Bedingungen in erheblichem Maße regulier- und standardisierbar.

Auf die Membran wird eine Glaspipette (Öffnungsdurchmesser ca. $1 \mu\text{m}$) aufgesetzt und durch leichten Unterdruck eine optimale Abdichtung zwischen Glas und Membran erzeugt. Hierbei ist die Sauberkeit der Membran von entscheidender Bedeutung. Bildet sich ein Abdichtwiderstand von $1 \text{ G}\Omega$ und größer aus, so wird die Pipettenlösung elektrisch gegen die Badlösung isoliert. Der Protoplast wird damit zu einem veränderlichen Widerstand in einem Stromkreis.

Je geringer nun die Hintergrundströme sind, desto besser lässt sich der aus der Öffnung von Ionenkanälen resultierende Strom auflösen. Man spricht von der sogenannten „cell-attached“ Konfiguration. Durchbricht man nun mittels eines wohl dosierten Saugimpulses das in die Pipette eingesogene Membranstück, so erhält man einen offenen Zugang zwischen Pipettenmedium und Cytosol. In dieser Konfiguration („whole-cell“ oder Ganzzell-Konfiguration) ersetzt das Pipettenmedium das Cytosol. Die gemessenen Ströme sind die Summe aller über die Membran des betreffenden Protoplasten fließenden Ströme.

2.15.2.2 Patch-clamp Aufzeichnungen

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran wurden mittels der Ganzzell Konfiguration der Patch-clamp Technik (HAMILL *et al.*, 1981) studiert. Als Mess- und Referenzelektrode wurden Ag-AgCl Elektroden verwendet. Die Membranströme wurden mittels eines EPC-7 Patch-clamp-Verstärkers (List Electronic, Darmstadt) verstärkt. Das Ausgangssignal wurde mittels eines 8-Pol Bessel Filters bei 2 kHz tiefpassgefiltert. Die Daten wurden mit 5 kHz gesampelt, digitalisiert (ITC 16, Instrutech Corp., Elmont, New York, USA), auf Festplatte gespeichert und auf einer MacIntosh Quadra 650 mit Wavemetrics Software (List Electronic) analysiert. Membranpotentiale wurden nach NEHER (1992) offline korrigiert für „liquid junction“ Potentiale. Glasmikropipetten wurden aus Borsilikat Hartglaskapillaren (Kimax-51, Kimble products, Vineland, New York, USA) hergestellt, mit Silikon beschichtet (Sylgard^R 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corp., Michigan, USA) und hitzepoliert. Die Pipetten hatten einen Widerstand von ca. 2 M Ω .

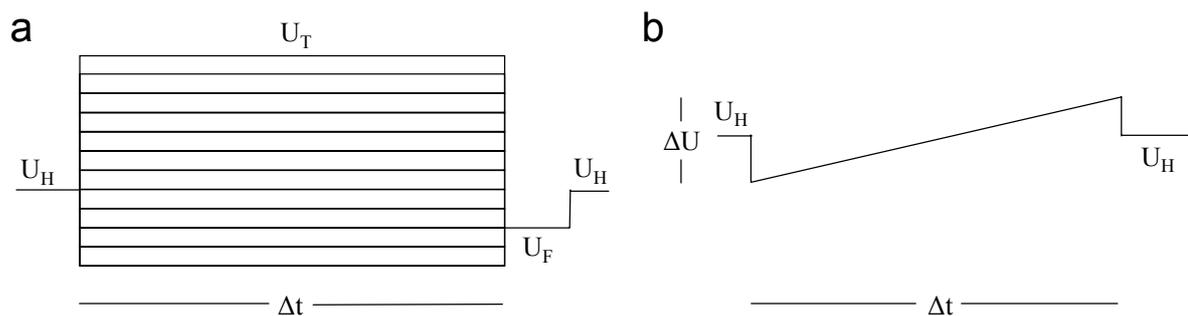


Abb. 2: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Spannungsprotokolltypen. (a) In Einfachspannungspulsprotokollen wurden, ausgehend von einer Haltespannung (U_H), über ein bestimmtes Zeitintervall (Δt) verschiedene Testspannungen (U_T) angelegt. Es erfolgte ein Sprung zu einer Spannung U_F , was die Messung von Strömen bei einer konstanten treibenden Kraft ermöglichte. Anschließend wurde erneut die Haltespannung angelegt. (b) In Rampenprotokollen wurde nach einem Sprung von der Haltespannung zu einer negativen Spannung die Spannung kontinuierlich mit der Geschwindigkeit $\Delta U/\Delta t$ geändert. Danach erfolgte die Rückkehr zur Haltespannung.

Nach der Offsetkorrektur für Diffusionspotentialdifferenzen wurden unterschiedliche Spannungsprotokolle ausgehend von einer Haltespannung appliziert, bei der keine oder nur geringe Ionenkanalaktivität herrschte (**Abb. 2**). Im Standard-Einfachspannungspulsprotokoll wurden von einem Haltepotential von -52 mV nacheinander 2 s Pulse an die Membran appliziert, die in 20 mV Schritten von -132 bis +88 mV reichten. Bevor zum Haltepotential zurückgekehrt wurde, wurde noch ein Folgepuls auf -92 mV appliziert. Kontinuierliche Spannungsrampen von 200 ms oder 2 s Dauer

wurden ebenfalls angewandt. Die Einstellungen sind in den betreffenden Legenden angegeben.

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die für Messungen an der Plasmamembran übliche Vorzeichenkonvention berücksichtigt, nach der ein negativer Strom einem Ausstrom von Anionen oder einem Einstrom von Kationen (= einwärtsgerichteter Strom) entspricht.

2.15.2.3 Patch-clamp Lösungen

Die Pipettenlösung ersetzt bei der Ganzzellstrommessung das Cytosol. Die Standardpipettenlösung für die Untersuchung der Anionenkanäle bestand aus 100 mM TEACl, 2 mM MgCl₂, 2 mM MgATP, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2). Die Standardbadlösung enthielt 20 mM TEACl, 1 mM CaCl₂, 5 mM MES/Tris (pH 4,3). Tetraethylammonium (TEA) wurde verwendet, um mögliche K⁺-Ströme zu eliminieren (BLATT und GRADMANN, 1997) und somit die Anionenströme besser auflösen zu können. Für Al-haltige Lösungen wurden 50 µM AlCl₃ (entsprechend 33 µM Al_{MONO}) zugegeben. Für die Untersuchungen der Kaliumkanäle bestand die Pipettenlösung aus 150 mM K-Gluconat, 2 mM MgCl₂, 5 mM MgATP, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2). Die Badlösung bestand aus 50 mM K-Gluconat, 1 mM CaCl₂ und 5 mM MES/Tris (pH 4,3). Alle Lösungen wurden mit Sorbitol auf eine Osmolalität von 600 mosmol kg⁻¹ (Pipette: 620 mosmol kg⁻¹) eingestellt und mit einem Wasserdampf-Osmometer (5100C, Wescor, Logan, Utah, USA) überprüft. Als Elektrolyt der Referenzelektrode diente 3 M KCl. Kontamination der Badlösung durch Auslaufen wurde durch einen Agarstopfen (3 M KCl, 2 % (w/v) Agar) verhindert. Badlösungen wurden auf Eis gekühlt und kontinuierlich mit einer Rate von 0,1 ml min⁻¹ perfundiert. Die Temperatur in der Patch-Küvette betrug ca. 20-24 °C.

2.15.2.4 Bestimmung der relativen Permeabilitäten

Die relativen Permeabilitäten von Malat und Citrat gegenüber Chlorid wurden unter biionischen Bedingungen aus den Umkehrspannungen mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung (GOLDMAN, 1943; HODGKIN und KATZ, 1949) modifiziert nach FATT und GINSBORG (1958) berechnet:

$$U_{\text{Rev}} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{n^2 P_{\text{B}^{n-}} [\text{B}^{n-}]_{\text{innen}}}{P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_{\text{außen}}}$$

Dabei ist R die Gaskonstante ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T die absolute Temperatur in Kelvin und F die Faraday Konstante ($96480 \text{ A s mol}^{-1}$). n stellt die Ladung des Anions B^{n-} auf der cytosolischen Seite dar. In diesen Experimenten wurde das TEACl in der Pipette von 100 auf 60 mM reduziert, während es in der Badlösung auf 60 mM erhöht war. Die 60 mM TEACl in der Pipette wurden dann gegen 60 mM TEA₂-Malat bzw. 60 mM TEA₃-Citrat ersetzt und die Umkehrpotentiale mittels Einfachspannungspuls- und Rampenprotokollen ermittelt.

Die räumlichen und technischen Möglichkeiten zur Durchführung der Patch-clamp Experimente wurden von Prof. Dr. R. Hedrich (Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

2.16 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente sind, soweit nicht gesondert hervorgehoben, repräsentativ für 2-4 unabhängige Einzelexperimente. Für alle ermittelten Parameter wurden Mittelwert und Standardabweichung (SD) mittels der Funktionen MITTELWERT und STABW in Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) berechnet. Die weiteren statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SAS V 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Wiederholungen ist in den jeweiligen Legenden angegeben. Varianzanalysen wurden zum Signifikanzniveau $\alpha = 5 \%$ durchgeführt (PROC GLM). Mittelwertvergleiche wurden mittels des Tukey-t-Tests vorgenommen. Unterschiedliche Buchstaben bzw. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Für lineare Regressionen (PROC REG) zeigen Sternchen die Signifikanzniveaus: 0,05 (*), 0,01 (**), sowie 0,001 (***).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Al auf das Wurzellängenwachstum

3.1.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze

Vier Tage alte Maiskeimlinge wurden in Nährlösung $\pm 25 \mu\text{M AlCl}_3$ kultiviert, der pH-Wert mittels pH-stat-Einrichtung konstant bei $4,3 \pm 0,1$ gehalten. Die Streckungsrate lag in der Kontrollbehandlung mit $5,7 \pm 1,3 \text{ cm d}^{-1}$ für den Al-resistenten Genotyp ATP-Y sowie $6,3 \pm 1,0 \text{ cm d}^{-1}$ für den Al-sensitiven Genotyp Lixis auf einheitlichem Niveau (**Abb. 3a**). Behandlung mit $25 \mu\text{M Al}$ für 24 h führte zu einer Abnahme der Streckungsrate auf $3,5 \pm 0,8 \text{ cm d}^{-1}$ (ATP-Y) bzw. $1,9 \pm 0,3 \text{ cm d}^{-1}$ (Lixis). Für Genotyp Lixis war diese Abnahme signifikant. In der Al-induzierten Hemmung des Wurzellängenwachstums (WLW) unterschieden sich beide Genotypen mit $39,1 \pm 14,3 \%$ (ATP-Y) und $70,8 \pm 4,6 \%$ (Lixis) signifikant (**Abb. 3b**).

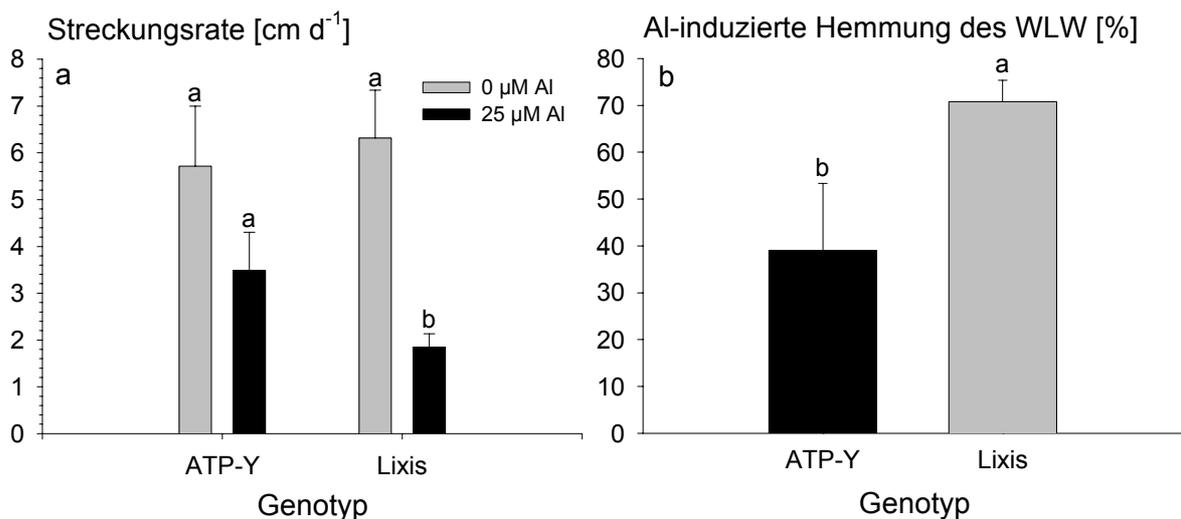


Abb. 3: Einfluss von Al auf das Wurzellängenwachstum in Nährlösung. Das komplette Wurzelsystem intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurde für 24 h in Nährlösung mit 0 oder $25 \mu\text{M AlCl}_3$ (pH 4,3) behandelt. (a) Streckungsrate der Primärwurzel für beide Behandlungen; (b) Al-induzierte Hemmung des WLW. Werte sind Mittelwerte aus 11 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test).

Bei Behandlung der apikalen 3 cm der Primärwurzel intakter drei Tage alter Maiskeimlinge für 5 h im Agarosegel war die Streckungsrate beider Genotypen in der Al-Behandlung über den gesamten Behandlungszeitraum signifikant gegenüber den Kontrollen verringert (**Abb. 4**). Dabei entsprachen die Absolutwerte in der Kontrollbehandlung mit etwa $2,2 \text{ mm h}^{-1}$ den Streckungsraten in Nährlösung (um $2,5 \text{ mm h}^{-1}$).

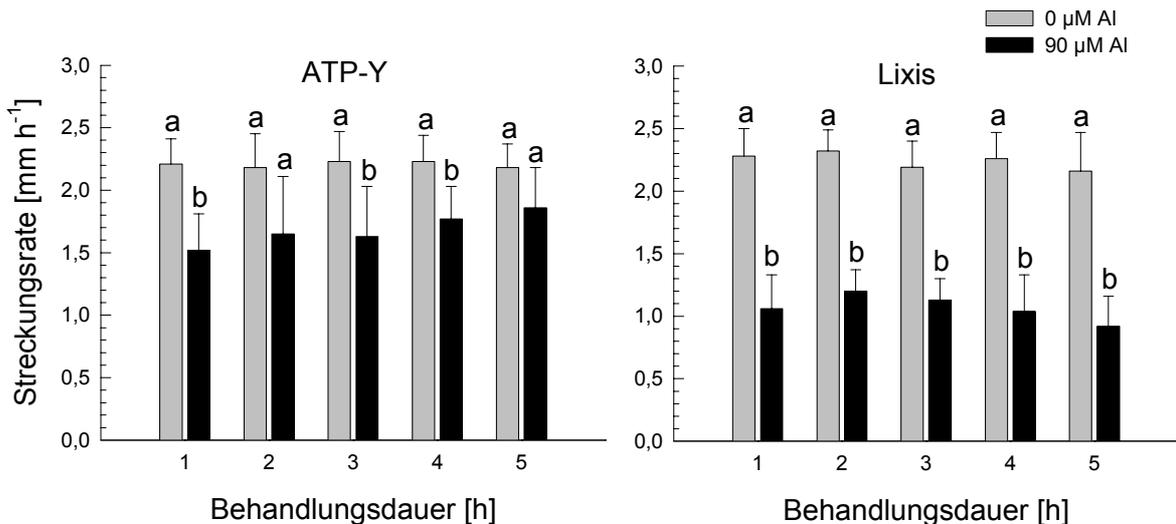


Abb. 4: Einfluss von Al auf die Streckungsrate der Primärwurzel im Agarosegel. Primärwurzelapices (3 cm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 5 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) behandelt. Werte sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test).

Für die Al-induzierte Hemmung des WLW zeigten sich bereits nach 1 h sowie für den gesamten Behandlungsverlauf signifikante genotypische Unterschiede (**Abb. 5**). Die Hemmung lag für Genotyp ATP-Y zwischen 21 und 35 %, für Genotyp Lixis zwischen 48 und 58 %.

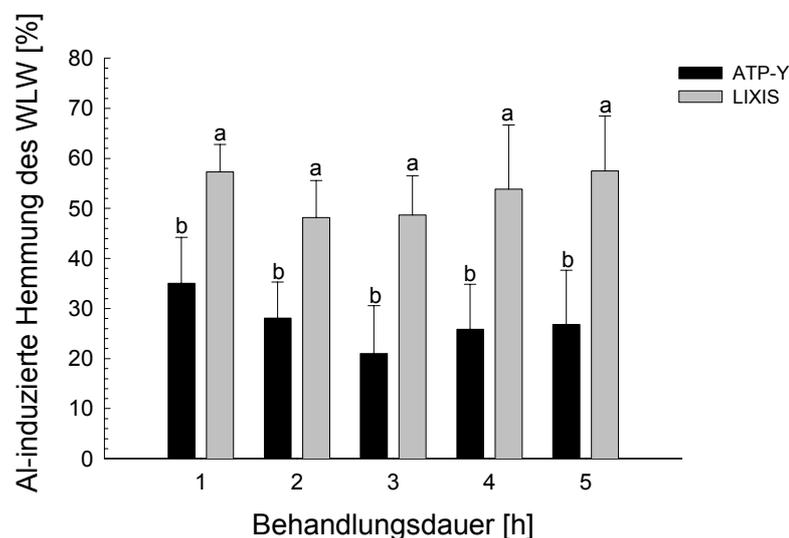


Abb. 5: Aluminium-induzierte Hemmung des Wurzellängenwachstums. Primärwurzelapices (3 cm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 5 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) behandelt. Werte sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test).

Zone führte nur tendenziell zu einer Abnahme der partiellen Streckungsraten, während Al-Behandlung der 2,5-3,5 mm Zone keinen Einfluss hatte.

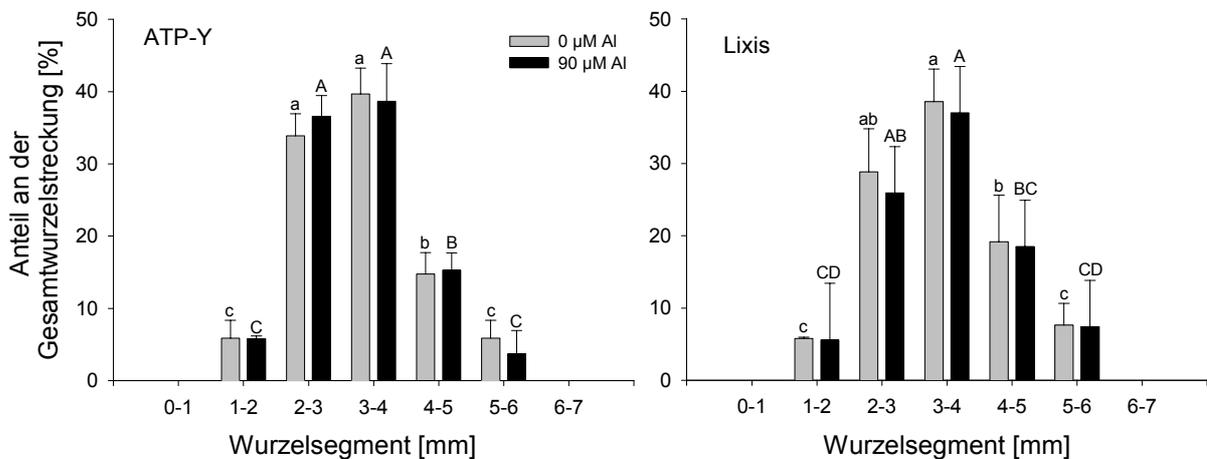


Abb. 7: Prozentualer Anteil spezifischer 1-mm Segmente an der Gesamtwurzelstreckung in Abhängigkeit von der Al-Behandlung. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Die Behandlung erfolgte für 1 h in einer Lösung aus je 200 μM CaCl_2 und KCl, 1 mM MES \pm 90 μM AlCl_3 (pH 4,5) über den gesamten Primärwurzelapex. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Segmentunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für die Kontroll-, Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen.

Bei Betrachtung der Gesamtstreckungsrate zeigt sich, dass spezifische Al-Behandlung der 1-2 mm Zone bei beiden Genotypen zu einer signifikanten Verminderung führte, die der bei Behandlung des gesamten Apex entsprach (**Abb. 8**).

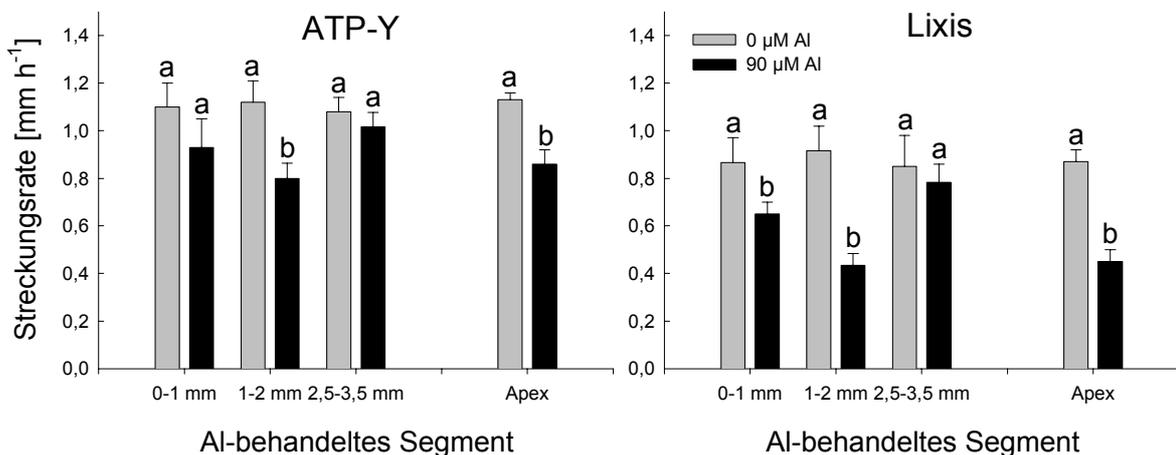


Abb. 8: Einfluss partieller Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente des Wurzelapex auf die Gesamtstreckungsrate der Primärwurzel. Die Al-Behandlung erfolgte spezifisch an 1-mm Segmente (90 μM Al_{MONO} in Agaroseblöckchen (1,2 % (w/v)) mit Nährlösung; pH 4,3) bzw. über den gesamten Apex intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Behandlungseffekte ($p < 0,05$; Tukey Test).

Aus den jeweiligen Kontrollen (graue Balken) wird zudem deutlich, dass die Applikation des Agaroseblöckchens mit Kontrolllösung ohne Al unabhängig von der Behandlungszone keinen Einfluss auf die Streckungsrate hatte (**Abb. 8**).

Tab. 1: Einfluss der Behandlungszone auf die Al-induzierte Hemmung des Wurzellängenwachstums. Die Al-Behandlung erfolgte spezifisch an 1-mm Segmente (90 μM Al_{MONO} in Agaroseblöckchen (1,2 % (w/v)) mit Nährlösung; pH 4,3) bzw. über den gesamten Apex. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Großbuchstaben symbolisieren signifikante genotypische Effekte, während kleine Buchstaben Effekte des Behandlungsortes innerhalb des jeweiligen Genotyps anzeigen ($p < 0,05$; Tukey Test).

Behandlungszone	ATP-Y	Lixis
	<i>Al-induzierte Hemmung des WLW [%]</i>	
Ges. Apex	23,45 \pm 6,30 ^{a,B}	48,04 \pm 1,69 ^{a,A}
0-1 mm	17,52 \pm 11,35 ^{a,A}	25,05 \pm 3,83 ^{b,A}
1-2 mm	29,38 \pm 1,83 ^{a,B}	49,89 \pm 7,66 ^{a,A}
2,5-3,5 mm	13,24 \pm 4,36 ^{a,A}	9,37 \pm 11,51 ^{b,A}

Auch die genotypischen Unterschiede in der Hemmung des WLW waren deutlich (**Tab. 1**). Behandlung der 0-1 mm Zone führte nur bei Lixis zu einer signifikanten Hemmung des WLW, deren Ausmaß jedoch unter dem der 1-2 mm Behandlung lag. Aluminium-Behandlung der 2,5-3,5 mm Zone hatte keinen Einfluss auf die Gesamtwurzelstreckung.

3.1.3 Lichtmikroskopische Charakterisierung der Primärwurzelspitze

Zur anatomischen Charakterisierung der in Abschnitt 3.1.2 eingeführten Wurzelzonen wurden Längs- und Querschnitte aus einem Teil der Hauptelongationszone (**Abb. 9a&b**), der 1-2 mm Zone (**Abb. 9c&d**) sowie der 0-1 mm Zone (Meristematische Zone; MZ; **Abb. 9e&f**) in Calcofluor Weiß inkubiert und mittels Auflichtfluoreszenzmikroskopie dargestellt.

Die Wurzelhaube nimmt die apikalen 300-450 μm der MZ ein (**Abb. 9e**). Bereits im basaleren Teil der MZ sowie der 1-2 mm Zone und der EZ ist in Querschnitten die Zugehörigkeit der Zellen zu Rhizodermis, Rinde, Endodermis sowie Zentralzylinder deutlich zu erkennen (**Abb. 9b, d, f**). Die Rinde besteht aus 8 bis 10 Zelllagen. Zwischen den Rindenzellen liegen relativ große Interzellularen. Im Zentralzylinder sind die Metaxylemgefäße deutlich zu erkennen. In den Längsschnitten zeigt sich das

zunehmende längsgerichtete Streckungswachstum der Zellen im Übergang der späten 1-2 mm Zone zur frühen EZ (**Abb. 9c**). Dabei betrug die Zelllänge der äußeren Rindenzellen im Abstand von 2 mm von der Wurzelspitze zwischen 10 und 15 μm . Eine Suberinisierung der Endodermis war in allen 3 Zonen mittels Sudan IV-Färbung nicht feststellbar (nicht gezeigt).

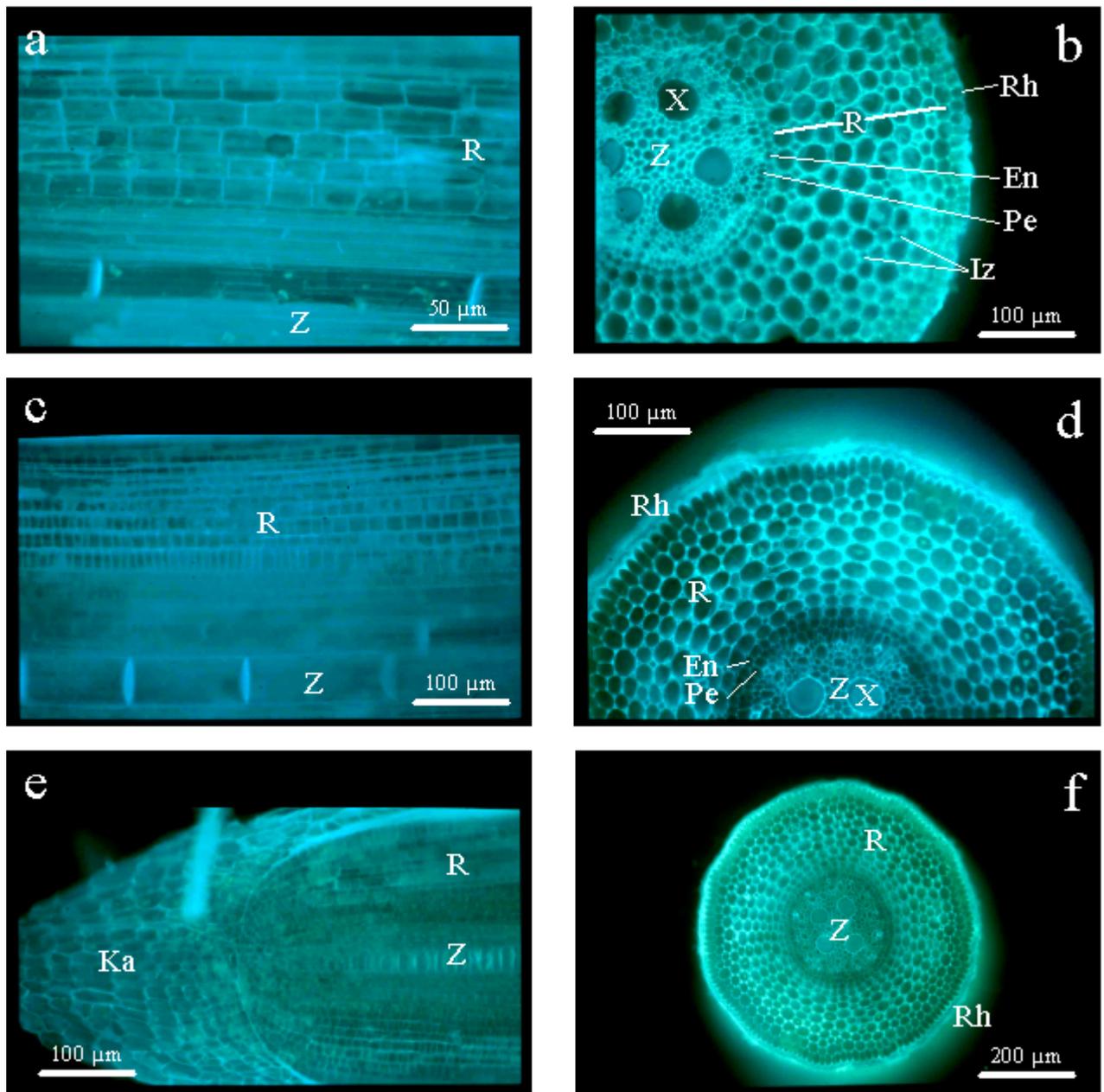


Abb. 9: Auflichtfluoreszenzaufnahmen von Längs- und Querschnitten aus drei Zonen der Primärwurzelspitze. (a&b) 3-4 mm (Elongationszone; EZ), (c&d) 1-2 mm Zone, (e&f) 0-1 mm (Meristematische Zone; MZ). Die Wurzeln wurden für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mittels Calcofluor Weiß. Anregungswellenlängen von $\lambda = 395\text{-}440\text{ nm}$. En = Endodermis; Iz = Interzellularen; Ka = Kalyptra; Pe = Perizykel; R = Rinde; Rh = Rhizodermis; X = Xylem; Z = Zentralzylinder.

3.2 Einfluss von Al auf die Callosebildung in der Wurzelspitze

3.2.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze

Nach 24 h Behandlung mit 0 oder 25 μM AlCl_3 in Nährlösungskultur wurde Callose in den apikalen 2 cm der Primärwurzelspitze analysiert. Dieser Bereich wurde in 5-mm Segmente aufgeteilt (**Abb. 10**).

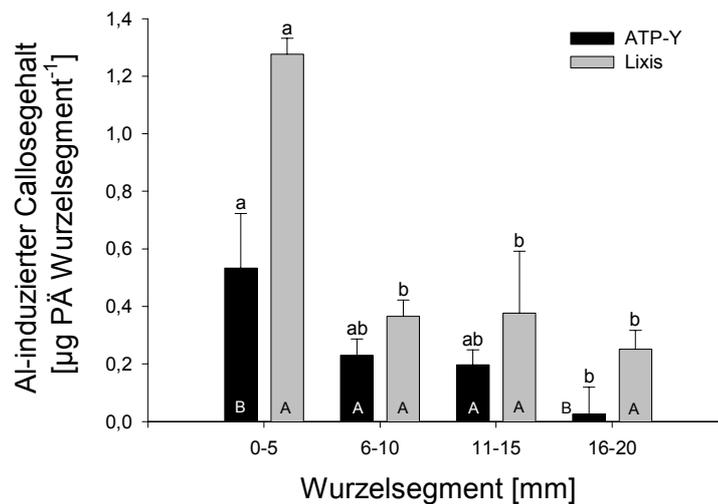


Abb. 10: Einfluss einer Al-Behandlung in Nährlösung auf die Al-induzierte Callosebildung in unterschiedlichen 5-mm Segmenten der Primärwurzelspitze. Die Behandlung erfolgte für 24 h in Nährlösung \pm 25 μM AlCl_3 (pH 4,3) über das gesamte Wurzelsystem intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). Dabei stellen kleine Buchstaben den Segmentvergleich für jeden Genotyp getrennt, Großbuchstaben den Sortenvergleich für die jeweiligen Segmente dar.

Bei beiden Genotypen wurde in den apikalen 5 mm ebenso viel Callose gebildet wie in den folgenden 15 mm zusammen. Mit $0,53 \pm 0,19 \mu\text{g PÄ Wurzelsegment}^{-1}$ wurde im 0-5 mm Segment des Al-resistenten Genotyps ATP-Y signifikant weniger Callose gebildet als im Al-sensitiven Genotyp Lixis mit $1,3 \pm 0,1 \mu\text{g PÄ Wurzelsegment}^{-1}$.

Nach Behandlung der Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge im Agarosegel für 1 h mit Al war die Callosebildung in allen apikalen 1-mm Segmenten beider Genotypen gegenüber der Kontrollbehandlung ohne Al signifikant erhöht (**Abb. 11a**). Bei beiden Genotypen wurde der Hauptteil der Al-induzierten Callose deutlich in den apikalen 3 mm gebildet (**Abb. 11b**). Dabei war die Callosebildung in der 1-2 mm Zone gegenüber den benachbarten Segmenten signifikant erhöht. Besonders in den apikalen 3 mm lag die Al-induzierte Callosebildung des Al-sensitiven Genotyps Lixis signifikant über der des Al-resistenten Genotyps ATP-Y.

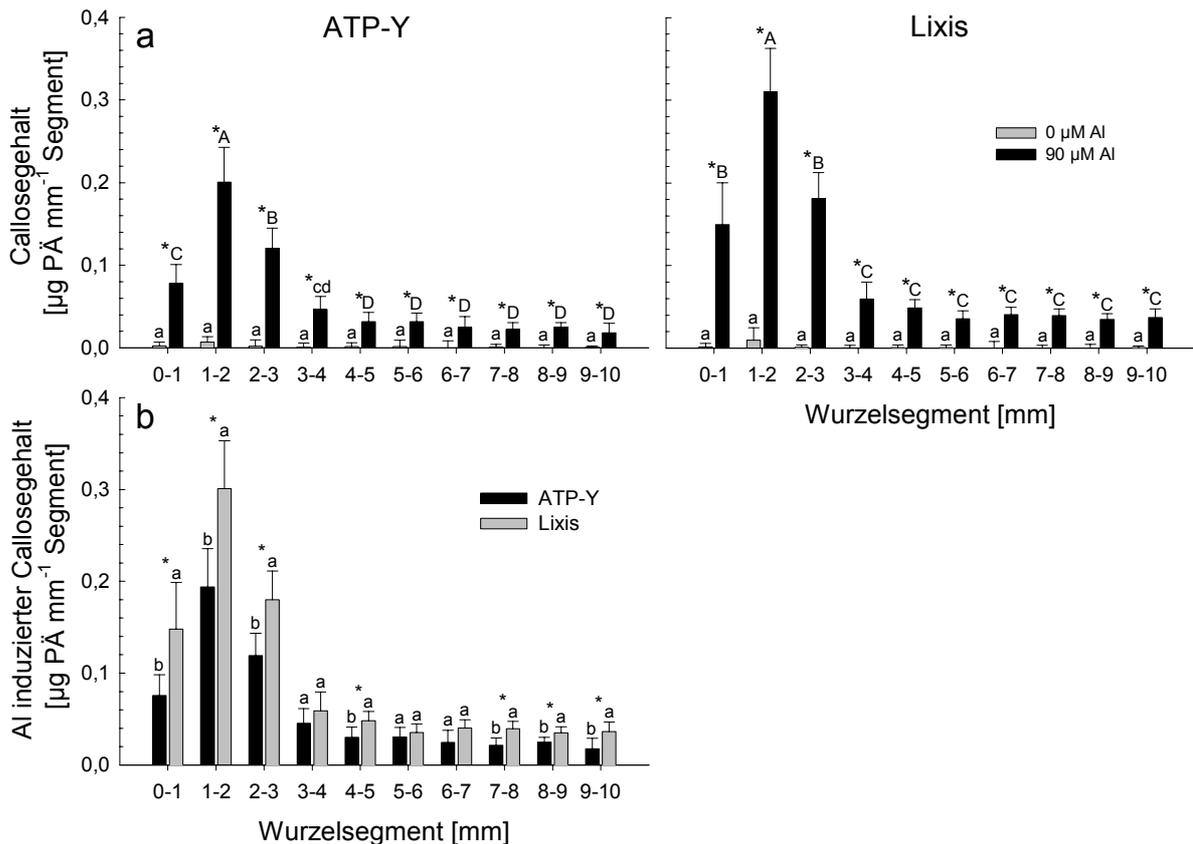


Abb. 11: Verteilung der Callosebildung entlang der Primärwurzelspitze. Wurzelapices (3 cm) intakter Keimlinge der Genotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) behandelt. (a) Einfluss der Al-Behandlung auf die Callosebildung. (b) Genotypenvergleich der Al-induzierten Callosebildung. Werte sind Mittelwerte von 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei in (a) kleine Buchstaben für die Kontroll-, Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen. Sternchen zeigen signifikante Al-Effekte. In (b) symbolisieren unterschiedliche Buchstaben sowie Sternchen signifikante genotypische Unterschiede.

3.2.2 Behandlung spezifischer 1-mm Segmente

Bei Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente wurde die in **Abb. 11** bezüglich der Al-induzierten Callosebildung gezeigte Dominanz der 1-2 mm Zone bestätigt. Innerhalb 1 h führte die spezifische Al-Behandlung der ersten beiden 1-mm Segmente zu einem Verteilungsmuster, dass dem bei Behandlung des gesamten Apex entsprach (**Abb. 12**). Eine deutliche Erhöhung der Callosegehalte gegenüber der Kontrollbehandlung (nicht gezeigt) war in basaleren Segmenten nur bei spezifischer Behandlung der 1-2 mm Zone festzustellen. Bei spezifischer Al-Behandlung der Segmente 2-3, 3-4 sowie 4-5 waren die Al-induzierten Callosegehalte bei beiden Genotypen tendenziell, jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrollbehandlung (nicht gezeigt), erhöht. Bei spezifischer Al-Behandlung der 1-2 mm Zone traten in selbiger signifikante genotypische Unterschiede bezüglich des

Al-induzierten Callosegehaltes auf (**Abb. 12**). Insgesamt lagen die Callosegehalte unter denen bei Behandlung des gesamten Apex (vergleiche **Abb. 11**), was auf die geringere Kontaktzeit der Wurzeloberfläche mit dem Al-haltigen Gel zurückzuführen sein kann.

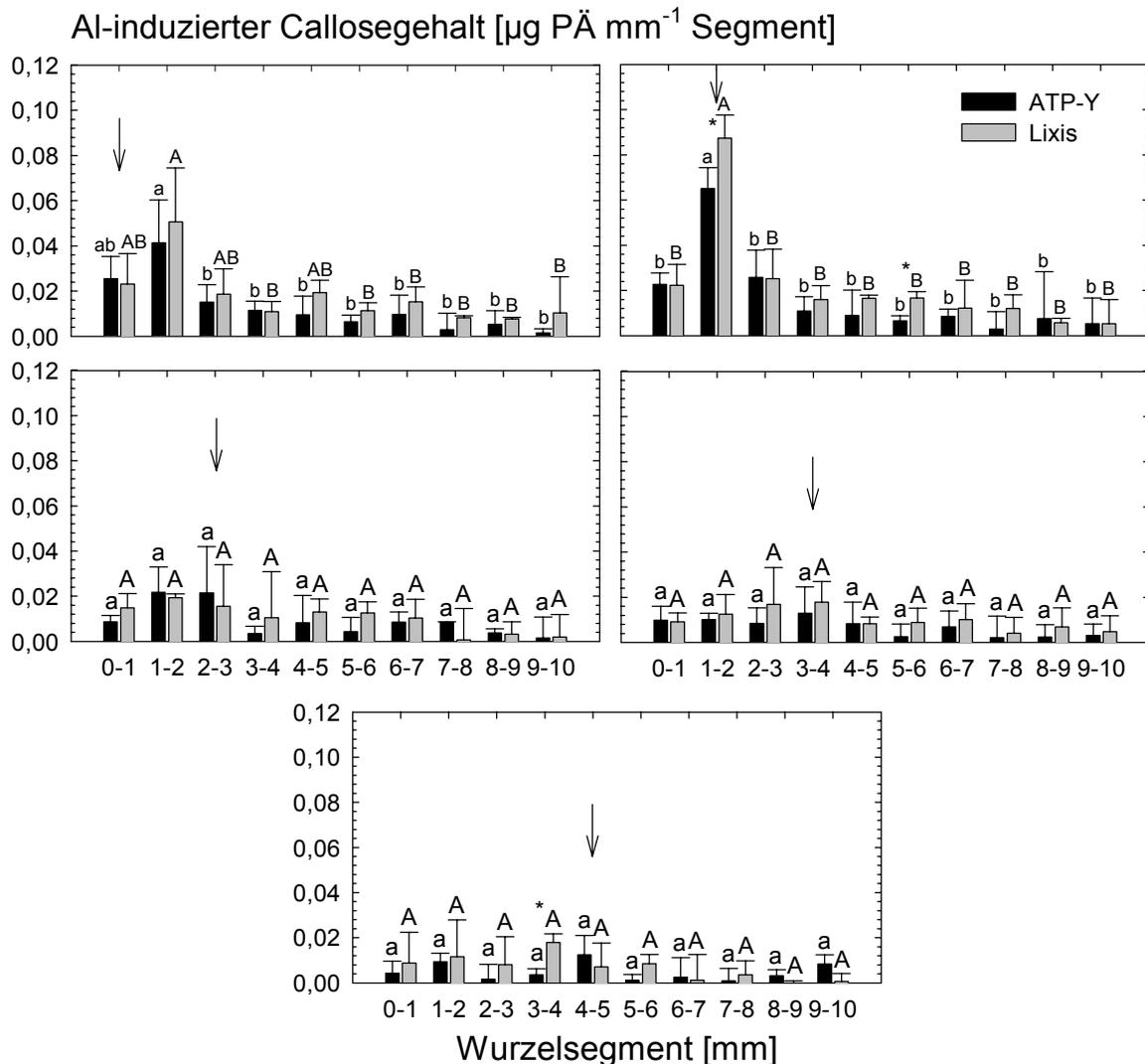


Abb. 12: Einfluss partieller Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente auf die Al-induzierte Callosebildung im Primärwurzelaepex. Die Behandlung erfolgte mittels Agarosegelblöckchen (0,6 % (w/v) mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3) für 1 h. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Pfeile geben das spezifisch mit Al behandelte Wurzelsegment an. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede innerhalb der Genotypen ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für ATP-Y (Al-resistent), Großbuchstaben für Lixis (Al-sensitiv) stehen. Sternchen zeigen signifikante genotypische Unterschiede.

3.2.3 Lokalisation von Callose in Wurzelquerschnitten mittels Anilinblau

Zur radialen Lokalisation der Al-induzierten Callose wurden nach Al-Behandlung über den gesamten Apex (2 h) Querschnitte aus der Elongationszone, der 0-1 mm Zone sowie der 1-2 mm Zone angefertigt und in Anilinlösung inkubiert. Die gelblich-grüne Callosefluoreszenz setzt sich deutlich gegenüber der Zellwandfluoreszenz ab (**Abb. 13**).

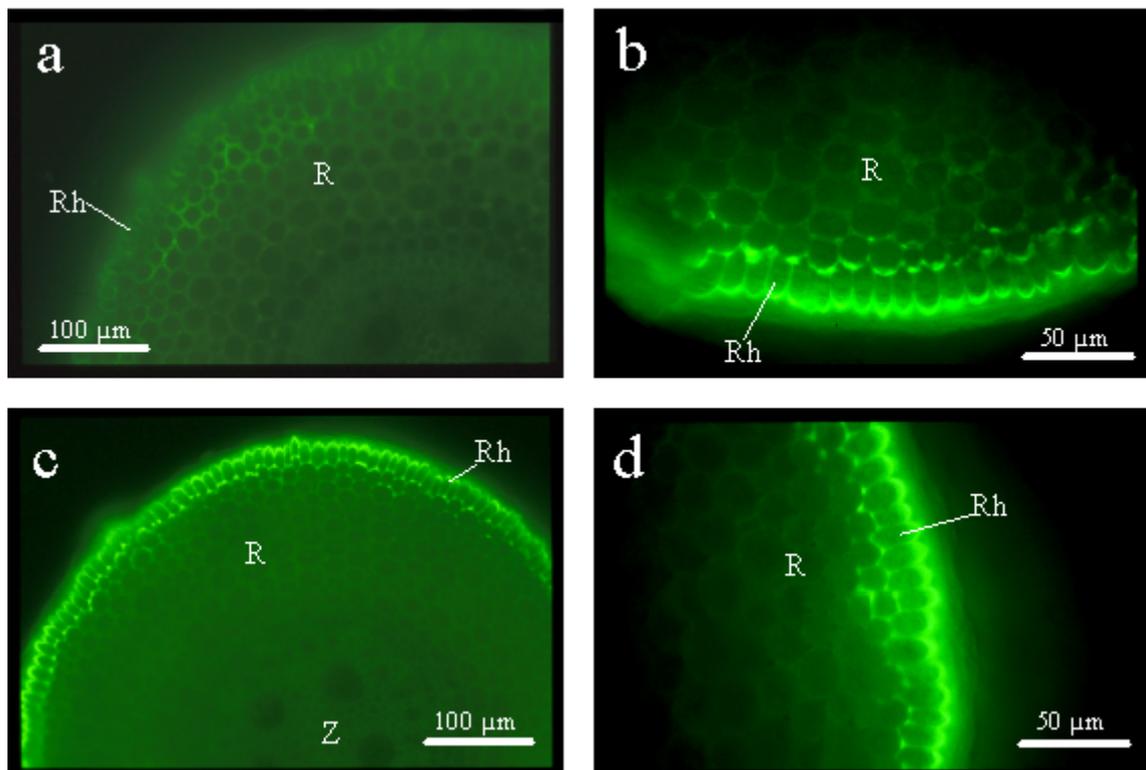


Abb. 13: Lokalisation der Al-induzierten Callosebildung in der Wurzelspitze. Nach 2 h Al-Behandlung im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + 90 μM Al_{MONO} ; pH 4,3) wurden Handschnitte aus der (a) EZ (um 4 mm), (b) der MZ (um 0,8 mm) sowie (c&d) der 1-2 mm Zone (um 1,5 mm) des Al-sensitiven Genotyps Lixis gefertigt. Die Präparate wurden für 10 min in Anilinlösung inkubiert und mittels Auflichtfluoreszenzmikroskopie bei Anregungswellenlängen von $\lambda = 395\text{-}440$ nm dargestellt. Rh = Rhizodermis; R = Rinde; Z = Zentralzylinder.

In der EZ war nach dieser Behandlungsdauer keine bzw. nur geringe Callosefluoreszenz nachzuweisen (**Abb. 13a**), während diese in der MZ (**Abb. 13b**) und der 1-2 mm Zone (**Abb. 13c&d**) deutlich erkennbar ist. Dabei war die Callosebildung in beiden Zonen auf die Zellwände der Rhizodermis und der äußeren 1-2 Rindenzellschichten beschränkt. In Kontrollpräparaten war eine erhöhte Fluoreszenz nicht nachzuweisen (nicht gezeigt).

3.3 Einfluss von Al auf die Mineralstoffgehalte in der Wurzelspitze

3.3.1 Akkumulation von Al in der Wurzelspitze

3.3.1.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze

Nach Behandlung der Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge im Agarosegel für 1 h wurde der Al-Gehalt in 1-mm Segmenten des ersten Zentimeters der Wurzelspitze bestimmt.

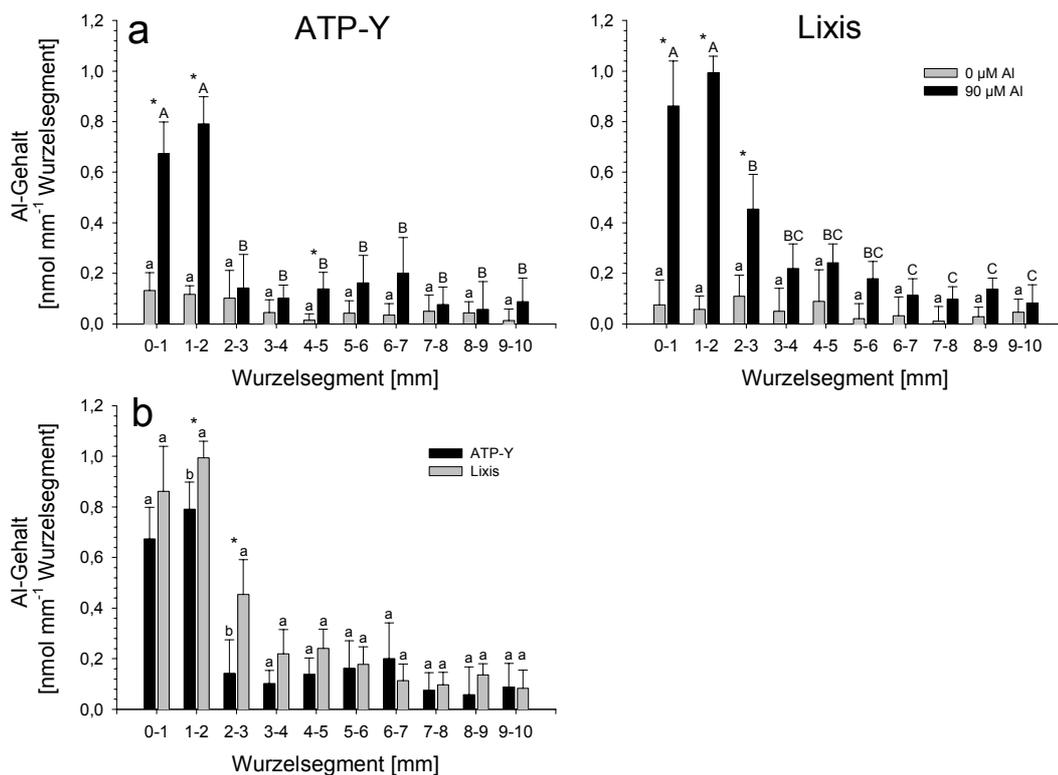


Abb. 14: Verteilung der Al-Akkumulation entlang der Primärwurzelspitze. Wurzelapices (3 cm) intakter Keimlinge der Genotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) behandelt. (a) Einfluss der Al-Behandlung auf die Al-Akkumulation. (b) Genotypenvergleich der Al-Akkumulation in der Al-Behandlung. Werte sind Mittelwerte von 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei in (a) kleine Buchstaben für die Kontroll-, Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen. Sternchen zeigen signifikante Al-Effekte. In (b) symbolisieren unterschiedliche Buchstaben sowie Sternchen signifikante genotypische Unterschiede.

In der Kontrollbehandlung wurden Al-Gehalte unter 0,1 nmol mm⁻¹ Wurzelsegment detektiert (**Abb. 14a**). Durch Al-Behandlung kam es im Al-resistenten Genotyp ATP-Y in den ersten beiden Millimetern zu einer gegenüber der Kontrollbehandlung signifikanten Akkumulation von Al auf Werte bis 0,8 nmol mm⁻¹ Wurzelsegment. Der Al-sensitive Genotyp Lixis akkumulierte Al signifikant in den ersten 3 Millimetern, wobei

die ersten beiden Segmente sich mit Werten bis 1 nmol mm^{-1} Wurzelsegment signifikant gegenüber dem 2-3 mm Segment abhoben. Innerhalb 1 h Al-Behandlung waren die Al-Gehalte der übrigen Segmente gegenüber der Kontrolle nur tendenziell erhöht. Im Vergleich unterschiedlicher Versuche war auffällig, dass die Al-Akkumulation besonders in der 0-1 mm Zone von ATP-Y stärkeren Schwankungen unterworfen war als bei Lixis.

Tendenziell lagen die Al-Gehalte des Al-sensitiven Genotyps Lixis in den ersten 5 Segmenten über denen des Al-sensitiven Genotyps ATP-Y, darunter signifikant im 1-2 sowie 2-3 mm Segment (**Abb. 14b**). Im Bereich 5-10 mm traten keine Unterschiede bezüglich der Al-Akkumulation auf.

3.3.1.2 Behandlung spezifischer 1-mm Segmente

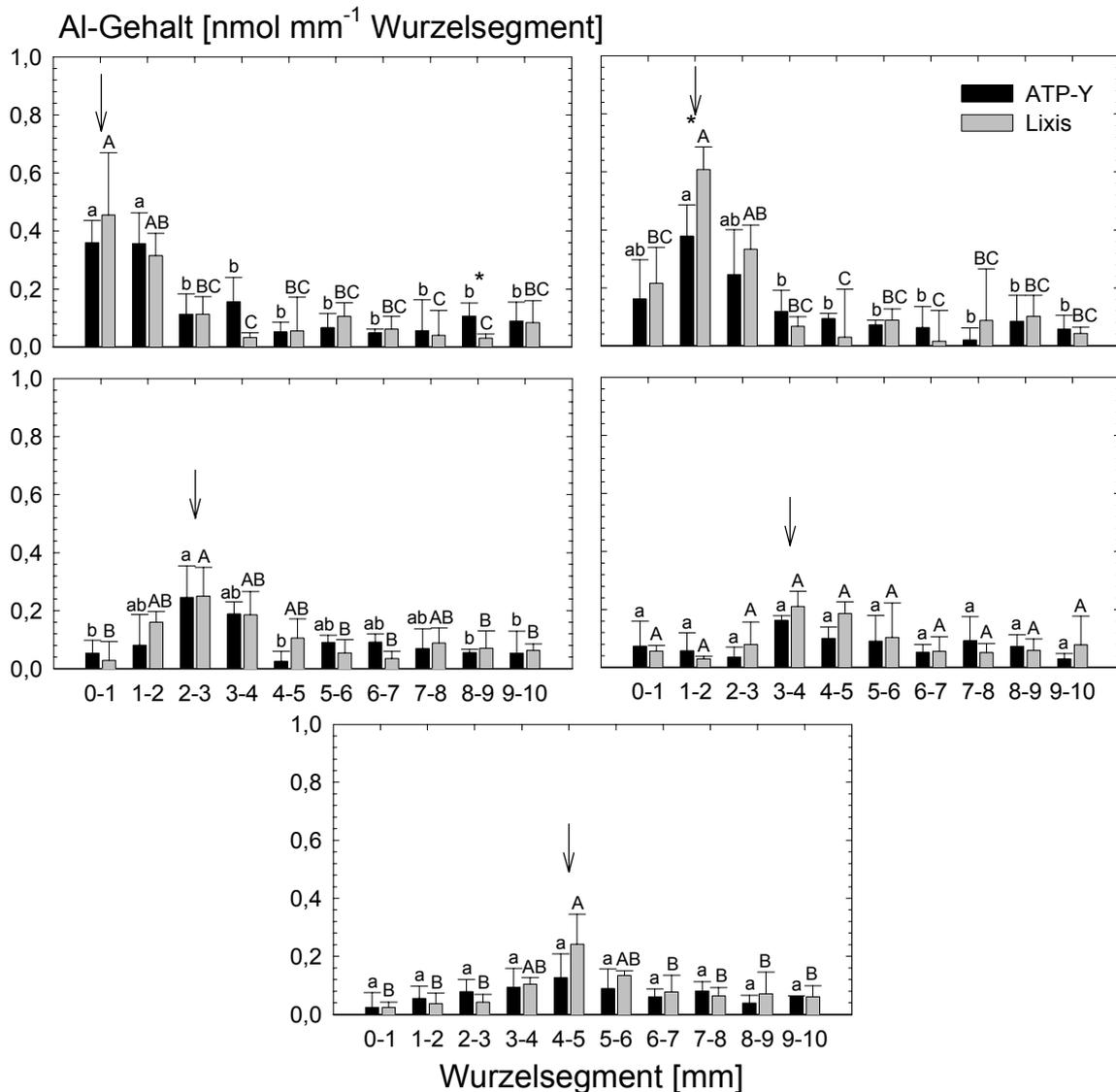


Abb. 15: Einfluss partieller Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente auf die Al-Akkumulation im Primärwurzelapex. Die Behandlung erfolgte mittels Agarosegelblöckchen (0,6 % (w/v) mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3) für 1 h. Pfeile geben das spezifisch mit Al behandelte Wurzelsegment an. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede innerhalb der Genotypen ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für ATP-Y (Al-resistent), Großbuchstaben für Lixis (Al-sensitiv) stehen. Sternchen zeigen signifikante genotypische Unterschiede.

Zu einer signifikanten Akkumulation von Al im jeweils behandelten Segment kam es nur bei spezifischer Behandlung der apikalen 3 mm, wobei die spezifische Al-Behandlung der 1-2 mm Zone zu einem Akkumulationsprofil führte, das dem in den Abschnitten 3.2 für die Calloseinduktion und 3.3.1.1 für die Al-Akkumulation bei Behandlung des gesamten Apex entsprach (**Abb. 15**). Behandlung der basaleren Segmente führte nur andeutungsweise zu gegenüber den übrigen Segmenten

erhöhten Al-Gehalten. Nur bei Behandlung der 1-2 mm Zone traten - auf diese beschränkt - signifikante genotypische Unterschiede in der Akkumulation auf.

3.3.1.3 Al-Lokalisation mittels Hämatoxylin

Wurzelspitzen wurden nach Behandlung im Agarosegel (1 h) in Anlehnung an POLLE *et al.* (1978) in Hämatoxylinlösung inkubiert. Deutlich zeigt sich die rötlich-violette Färbung im Bereich der apikalen 2-3 mm nach Al-Behandlung (**Abb. 16a&b**), während die Kontrollen völlig ungefärbt sind (**Abb. 16c**). Genotypische Unterschiede in der Färbeintensität sind nicht feststellbar. Allerdings reicht die Färbung des Al-sensitiven Genotyps Lixis tendenziell weiter in die Elongationszone hinein.

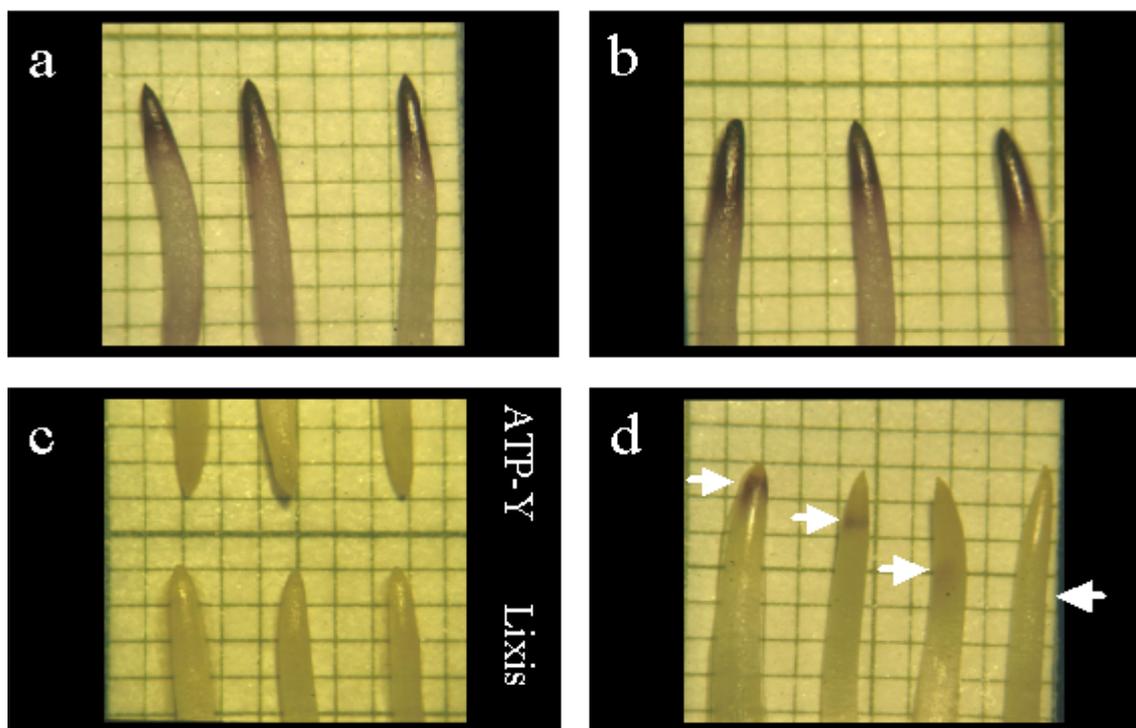


Abb. 16: Lokalisation von Aluminium entlang der Wurzelspitze mittels Hämatoxylin. Die Behandlung der Wurzelspitzen (3 cm) intakter Keimlinge erfolgte für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3). (a) Al-behandelte Wurzelspitzen des Al-resistenten Genotyps ATP-Y, (b) Al-behandelte Wurzelspitzen des Al-sensitiven Genotyps Lixis, (c) Kontrollen ohne Al-Angebot. Für (d) erfolgte die Al-Behandlung mittels des Agaroseblocksystems an spezifische 1-mm Segmente (0-1; 1-2; 2,5-3,5 sowie 4-5 mm; siehe Pfeile).

Erfolgte die Al-Behandlung im Agaroseblocksystem an spezifische apikale Zonen, so zeigten an der EZ behandelte Wurzelspitzen nur eine leichte (2,5-3,5 mm) bis gar keine Färbung (4-5 mm), während bei Behandlung der 0-1 bzw. 1-2 mm Zone eine deutliche Färbung in diesen Zonen erkennbar ist (**Abb. 16d**). Dies bestätigt die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zur Al-Akkumulation in 1-mm Segmenten.

3.3.1.4 Al-Lokalisation in Kryoschnitten mittels der SIMS

Die Verteilung von ^{27}Al in gefriergetrockneten Kryoschnitten (300 nm) aus den Segmenten 0-1, 1-2 sowie 3-4 mm wurde nach 1 h Al-Behandlung im Agarosegel mittels der Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) untersucht. Da die Wurzeln vor der Anfertigung der Dünnschnitte von zwei Seiten phasisch getrimmt wurden, entsprach die eigentliche Messprobe einem Viertelsegment der Wurzel. Allerdings ließ sich in den untersuchten Wurzelzonen auch durch diese Maßnahme die Stauchung der Präparate bei der Anfertigung nicht unterbinden (Vergleiche hierzu GIERTH, 2000).

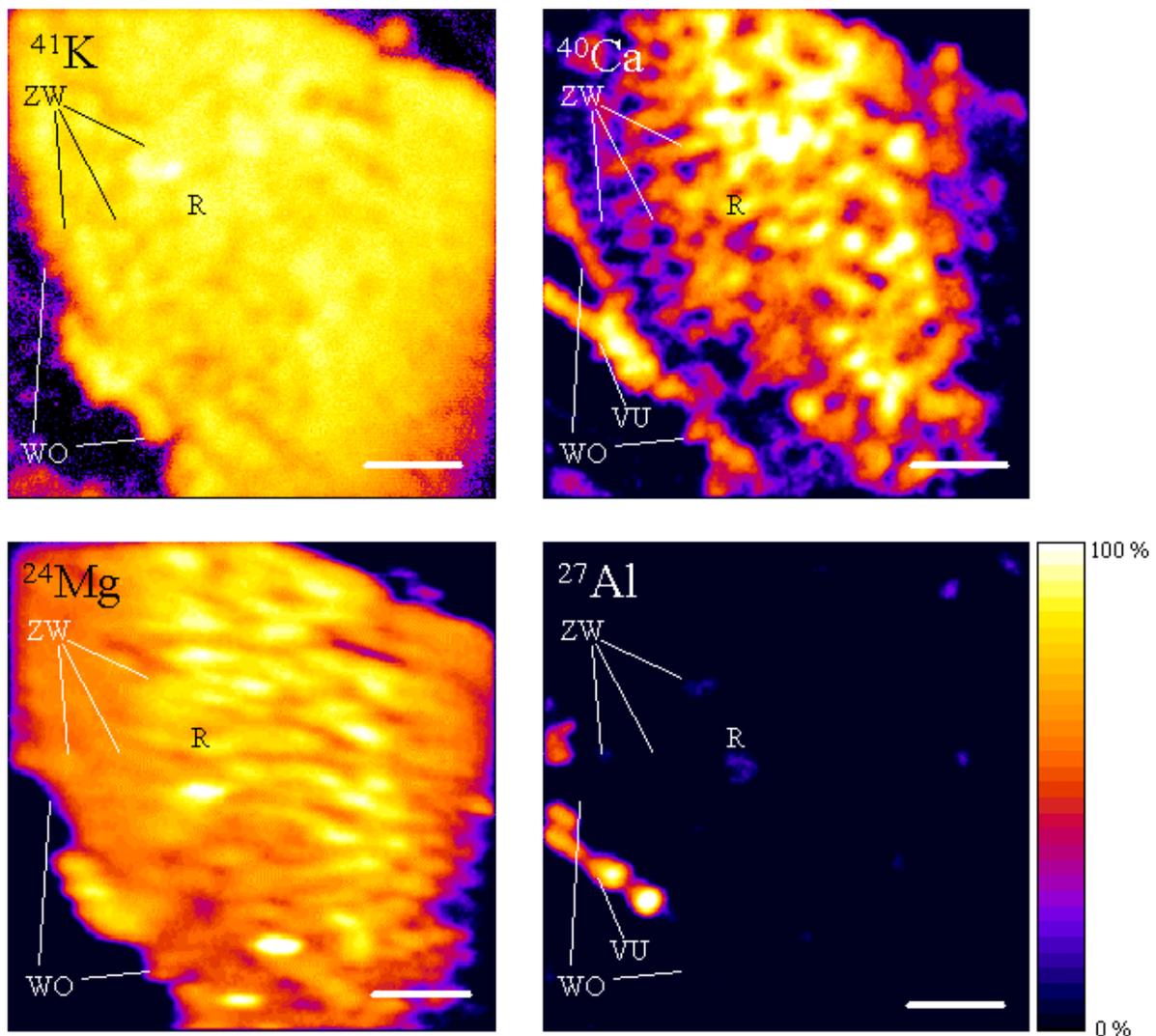


Abb. 17: Verteilung der Isotope ^{41}K , ^{40}Ca , ^{24}Mg und ^{27}Al in Kryoschnitten aus der 1-2 mm Zone des Al-sensitiven Genotyps Lixis nach Kontroll-Behandlung als Ergebnis der bildgebenden SIMS. Die Wurzelspitze (3 cm) intakter Keimlinge wurde für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung ohne Al; pH 4,3) behandelt. Balken = 50 μm . R = Rinde; VU = Verunreinigung; WO = Wurzeloberfläche; ZW = Zellwand.

Da Kalium in der Pflanzenzelle in hohen Konzentrationen vorkommt, während Ca vermehrt im Bereich der Zellwand lokalisiert ist, lässt sich die Gewebeanatomie der

Schnitte näherungsweise anhand der Verteilung dieser Isotope nachvollziehen (**Abb. 17**). In der Kontrollbehandlung konnte Al im Gewebe abgesehen von einzelnen nicht probenspezifischen, präparativ bedingten Verunreinigungen nicht detektiert werden.

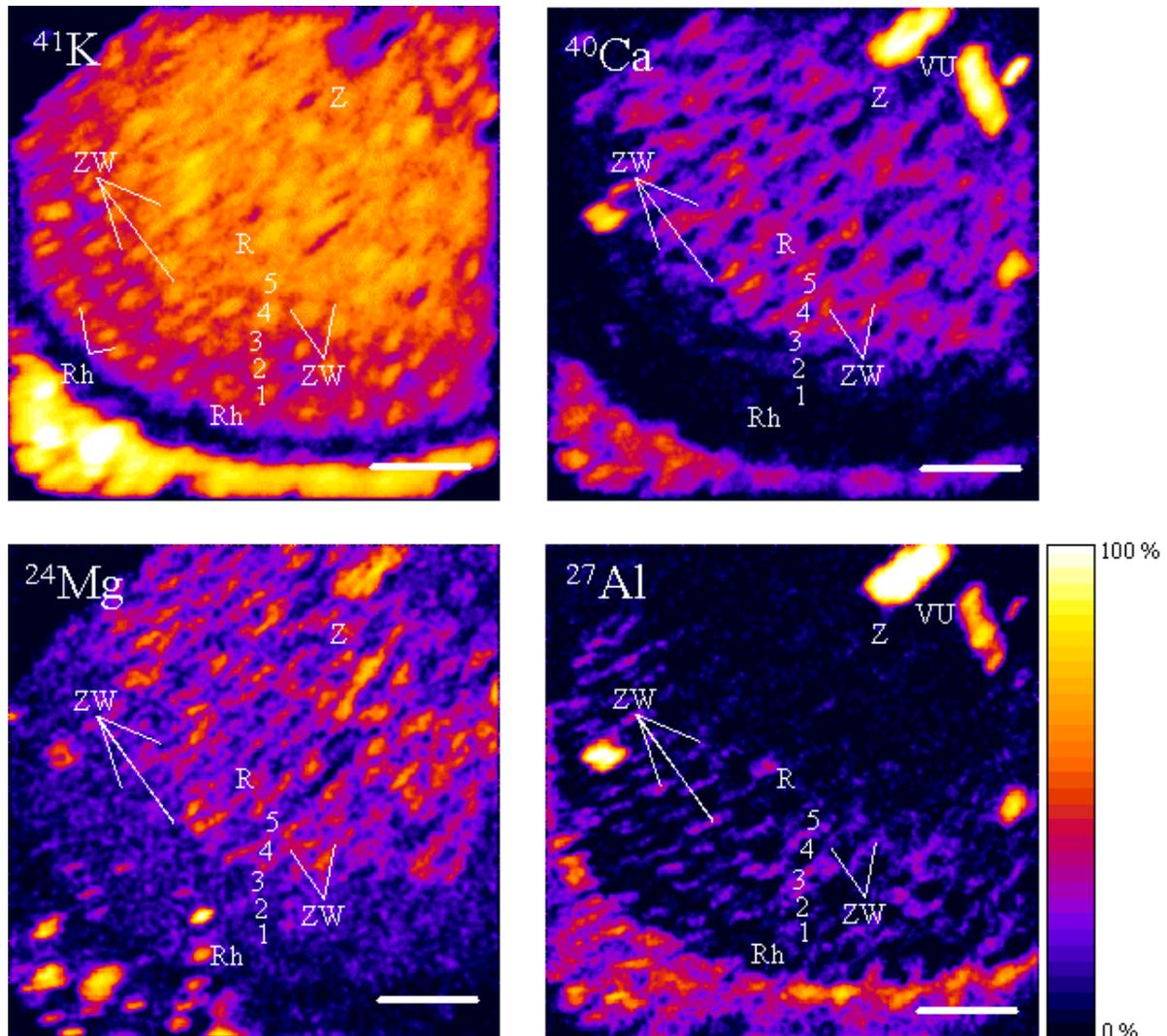


Abb. 18: Verteilung der Isotope ^{41}K , ^{40}Ca , ^{24}Mg und ^{27}Al in Kryoschnitten aus der 1-2 mm Zone des Al-sensitiven Genotyps Lixis nach Al-Behandlung als Ergebnis der bildgebenden SIMS. Die Wurzelspitze (3 cm) intakter Keimlinge wurde für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + $90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3) behandelt. Balken = $50 \mu\text{m}$. R = Rinde; Rh = Rhizodermis; Vu = Verunreinigung; WO = Wurzeloberfläche; Z = Zentralzylinder; ZW = Zellwand. Zahlen von 1-5 stehen für Rindenschichten.

Nach erfolgter Al-Behandlung trat Al in der 1-2 mm Zone im Zellwandbereich auf (**Abb. 18**). Die radiale Mobilität reichte bei beiden Genotypen bis in die Zellwände der 5. Rindenschicht, wobei die stärksten Signale an der Außenwand der Rhizodermis detektiert wurden und die Signalstärke zur Stele hin deutlich abnahm (**Abb. 18** sowie **Abb. 19c&d**).

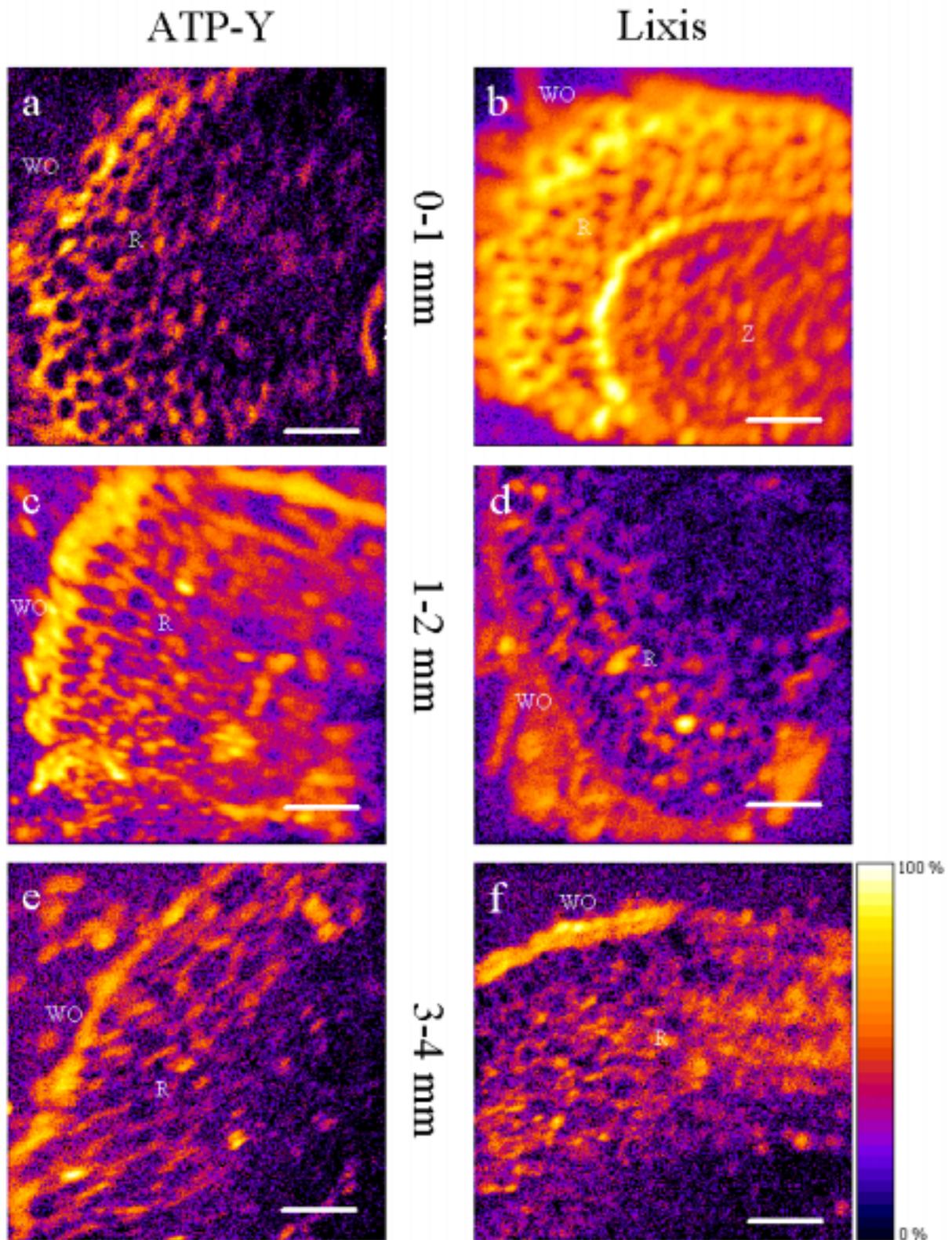


Abb. 19: Vergleich der Verteilung von ^{27}Al in Kryoschnitten aus den Zonen 0-1 mm (a&b), 1-2 mm (c&d) und 3-4 mm (e&f) der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent; a, c, e) und Lixis (Al-sensitiv; b, d, f). Die Wurzelspitze (3 cm) intakter Keimlinge wurde für 1 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + 90 μM Al_{MONO} , pH 4,3) behandelt. Balken = 50 μm . R = Rinde; WO = Wurzeloberfläche; Z = Zentralzylinder.

Genotypische Unterschiede in der Al-Akkumulation bzw. dessen radialer Verteilung konnten mittels dieser Methode in keiner der Zonen gezeigt werden (**Abb. 19**).

Hinsichtlich des Zonenvergleiches zeigte sich, dass die radiale Mobilität von Al in der 0-1 mm Zone deutlich besser als in den basaleren Zonen war (**Abb. 19a&b**). Hier erreichte Al innerhalb von 1 h sogar die Endodermis und die Signalstärke war in den äußeren 5 Rindenschichten homogener als in der 1-2 mm Zone. In der Elongationszone entsprach die Al-Verteilung der der 1-2 mm Zone, wenngleich die Verteilung diffuser erschien (**Abb. 19e&f**).

Berücksichtigt man die innerhalb der 22 min Messungen erreichten „Counts“ für die Zonen (**Abb. 20**), so zeigt sich (beide Genotypen wurden aufgrund nicht detektierbarer Unterschiede gepoolt), dass in der 0-1 mm Zone die stärksten Al-Signale detektiert wurden. Zur Elongationszone hin nahm die Signalstärke weiter ab.

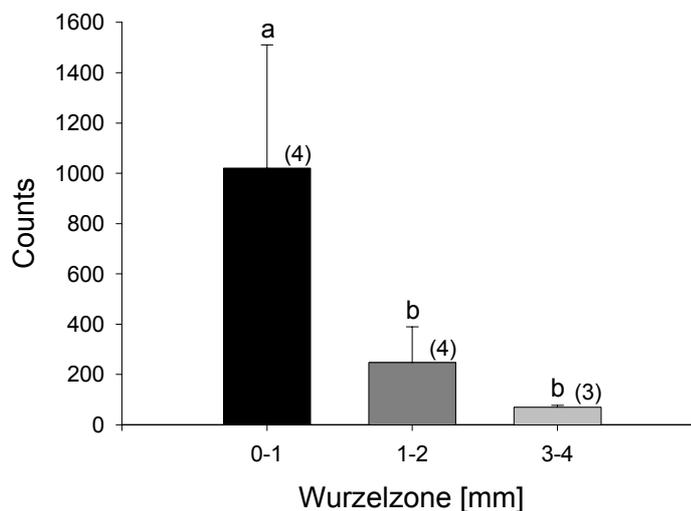


Abb. 20: Vergleich der in den SIMS-Messungen für ^{27}Al über 22 min erreichten „Counts“ der drei untersuchten Wurzelzonen. Messungen wurden für beide Genotypen gepoolt, da keine genotypischen Unterschiede quantifizierbar waren. Die Werte stellen Mittelwerte aus den in Klammern angegebenen unabhängigen Wiederholungen \pm SD dar. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test).

3.3.2 Gehalte von K, Ca, Mg und P in der Wurzelspitze

Der Einfluss einer 2 h Al-Behandlung der Primärwurzelspitzen intakter Keimlinge im Agarosegel auf die Gehalte von K, Ca, Mg sowie P wurde in 1-mm Segmenten untersucht.

In den Kontrollbehandlungen zeigte sich für beide Genotypen ein typisches Verteilungsmuster für K (**Abb. 21a**). Mit Gehalten zwischen 10 und 16 nmol K lagen dabei die Gehalte im 0-1 mm Segment signifikant unter denen der übrigen Segmente, die

gleichmäßig um 30 nmol K lagen. Summiert auf den Wurzelapex (1 cm) ergaben sich $285,0 \pm 19,1$ (ATP-Y) bzw. $295,0 \pm 23,1$ nmol K (Lixis).

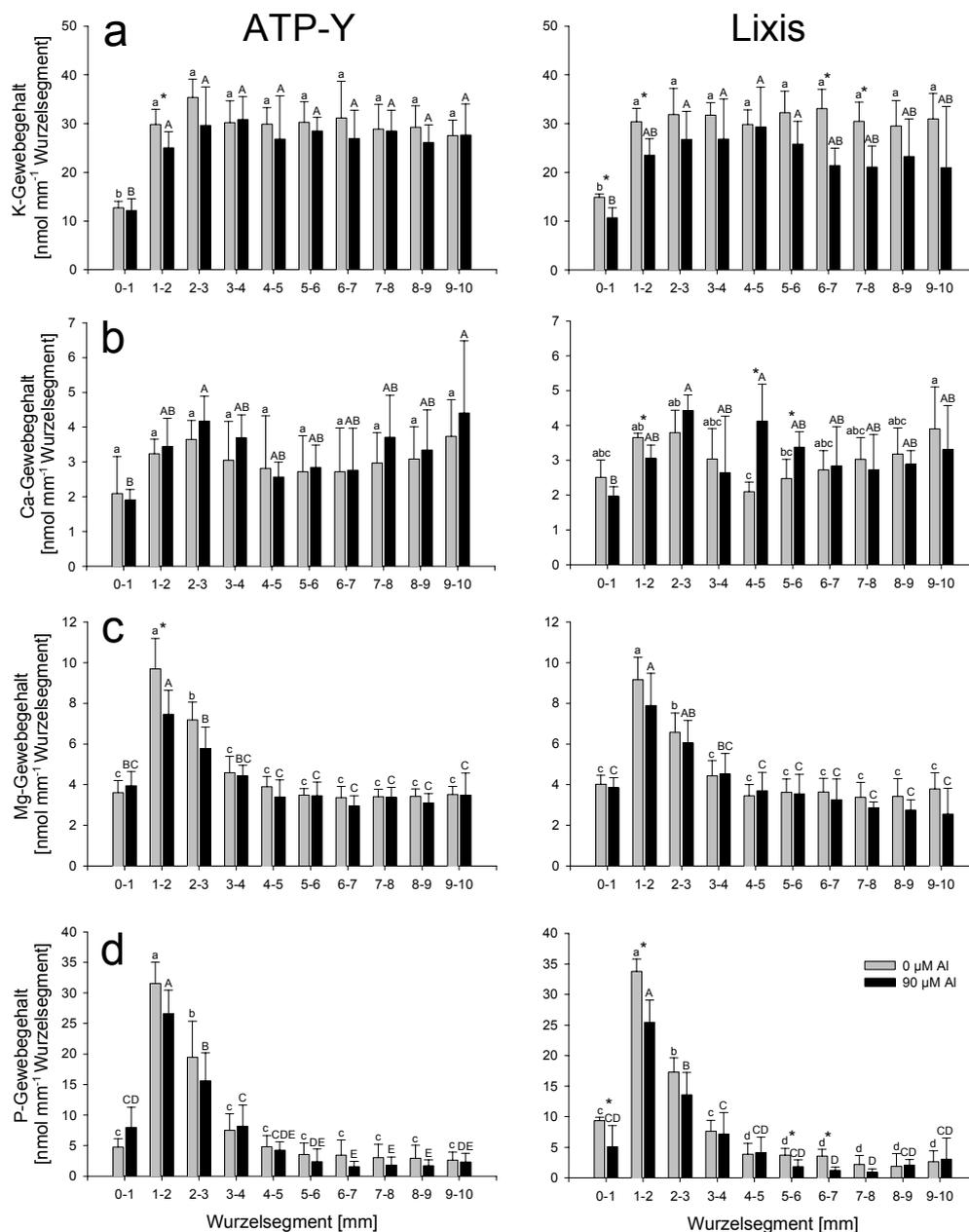


Abb. 21: Einfluss von Al auf die Gehalte von Kalium (a), Calcium (b), Magnesium (c) sowie Phosphor (d) in 1-mm Segmenten des Primärwurzelapex. Wurzelapices (3 cm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 1 h in Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3) behandelt. Werte sind Mittelwerte von 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für die Kontroll-, Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen. Sternchen zeigen signifikante Al-Effekte.

In der Al-Behandlung lagen die Werte in allen Segmenten unter denen der Kontrollbehandlung, wobei dieser Effekt bei beiden Genotypen in der 1-2 mm Zone signifikant war. Insgesamt war dieser Effekt bei Lixis über den gesamten Apex stärker

ausgeprägt. Summiert auf den 1-cm Wurzelapex lag der K-Gehalt in der Al-Behandlung mit $262,0 \pm 35,8$ (ATP-Y) tendenziell bzw. $229,8 \pm 48,9$ nmol K (Lixis) signifikant unter dem der Kontrollbehandlung.

Die Ca-Gehalte waren im 0-1 mm Segment am geringsten ($2-2,5$ nmol Ca), stiegen zum 2-3 mm Segment, auf Werte um 4 nmol Ca um dann wiederum leicht abzufallen (**Abb. 21b**). Zu den basaleren Segmenten hin kam es wieder zu einem tendenziellen Anstieg. Ein konsistenter Al-Effekt über den Apex (1 cm) war innerhalb 2 h Behandlung nicht festzustellen, allerdings ließ sich bei Lixis im Bereich 0-2 mm ein Absinken der Ca-Gehalte zeigen, der im 1-2 mm Segment signifikant war. Der im dargestellten Experiment für Lixis in den Segmenten 4-5 und 5-6 mm gezeigte signifikante Behandlungseffekt in Form einer Steigerung der Ca-Gehalte war nicht reproduzierbar. Die Werte für den Apex (1 cm) lagen in der Kontrolle bei $30,1 \pm 3,9$ (ATP-Y) bzw. $30,4 \pm 2,9$ nmol Ca (Lixis). In der Al-Behandlung lagen die Werte mit $32,8 \pm 5,4$ (ATP-Y) bzw. $31,3 \pm 4,7$ nmol Ca auf gleichem Niveau.

Die Mg-Gewebegehalte (**Abb. 21c**) lagen im 0-1 mm Segment bei 4 nmol Mg, hatten ihr signifikantes Maximum mit Werten zwischen 9 und 10 nmol Mg im 1-2 mm Segment, um dann zum 3-4 mm auf Werte um 4 nmol Mg abzusinken, die im weiteren Verlauf konstant blieben. In der Al-Behandlung war der Mg-Gehalt (signifikant bei ATP-Y) in den Segmenten 1-2 und 2-3 mm leicht abgesenkt. Diese Tendenz zeigte sich auch bei der Berechnung der Gehalte des Wurzelapex (1 cm). Hier lagen die Mg-Gehalte in der Kontrolle bei $46,1 \pm 3,0$ (ATP-Y) bzw. $45,5 \pm 5,9$ nmol Mg (Lixis) und sanken in der Al-Behandlung tendenziell auf $41,4 \pm 5,9$ (ATP-Y) bzw. $40,9 \pm 7,5$ nmol Mg (Lixis).

Das Verteilungsmuster für den P-Gehalt (**Abb. 21d**) entsprach dem für Mg. Die Werte lagen unter 10 nmol P im 0-1 mm Segment sowie in den Segmenten ab dem 3-4 mm Segment. Signifikante Maxima lagen im 1-2 mm Segment für beide Genotypen zwischen 30 und 35 nmol P. In der Al-Behandlung lagen die P-Gehalte besonders im Bereich 1-3 mm (ATP-Y, tendenziell) bzw. 0-3 mm (Lixis, davon 0-2 mm signifikant) unter denen der Kontrolle. Dieser Effekt spiegelte sich bei der Berechnung der Werte für den Wurzelapex (1 cm) wieder. Summiert lag der P-Gehalt von Lixis in der Al-Behandlung mit $64,4 \pm 13,9$ nmol P signifikant unter dem der Kontrollbehandlung ($85,8 \pm 7,1$ nmol P) während dieser Effekt bei ATP-Y weitaus geringer ausgeprägt war ($83,6 \pm 14,1$ nmol P in der Kontrolle bzw. $72,4 \pm 17,9$ nmol P in der Al-Behandlung).

3.4 Einfluss von Al auf das pH-Profil entlang der Rhizoplane

3.4.1 Behandlung der gesamten Wurzelspitze

Das pH-Profil entlang der apikalen 5 mm der Rhizoplane wurde mittels pH-selektiver Mikroelektroden in 20 μm Abstand von der Wurzeloberfläche gemessen. Ein modifizierter elektrophysiologischer Arbeitsplatz erlaubte die Arbeit an vertikal wachsenden Wurzeln intakter Keimlinge. Die Wurzeln beider Genotypen zeigten in der Kontrollbehandlung (0 μM Al, pH 4,5) ein typisches, stabiles pH-Profil entlang der ersten 5 mm der Wurzelspitze (**Abb. 22**).

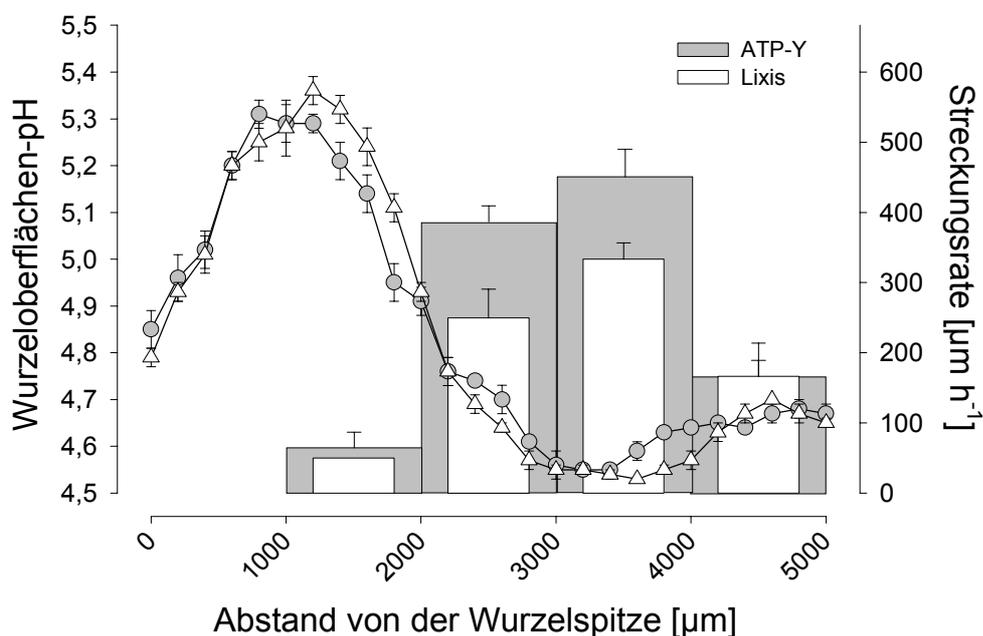


Abb. 22: Beziehung zwischen dem pH-Oberflächenprofil der Maiswurzelspitze und der Streckungsrate der jeweiligen Wurzelsegmente. Die Perfusionslösung enthielt je 200 μM KCl und CaCl_2 sowie 1 mM MES (pH 4,5). Die Messung der pH-Werte erfolgte von der Spitze ausgehend alle 200 μm in 20 μm Abstand von der Wurzeloberfläche. Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Symbole = pH-Wert; Balken = Streckungsrate.

Von pH 4,8 an der Spitze kam es zu einem steilen Anstieg auf pH 5,2 bis 5,4 im Abstand von 0,6 bis 1,6 mm von der Spitze. Der pH-Wert sank im Anschluss daran wiederum stark ab und erreichte bei 2 mm erneut 4,8. Der pH-Wert sank weiter ab und hatte im Bereich zwischen 3 und 4 mm die geringsten Werte (4,5-4,6), blieb jedoch stets über dem der Perfusionslösung. Im Anschluss daran kam es erneut zu einem leichten Anstieg auf Werte bis zu pH 4,7. Bringt man dieses pH-Profil mit der Streckungsrate spezifischer 1-mm Segmente in Zusammenhang (**Abb. 22**), so wird deutlich, dass die Bereiche mit dem stärksten Streckungswachstum (2-3 und 3-4 mm) die niedrigsten pH-Werte an der Wurzeloberfläche aufweisen.

Wurden Wurzelspitzen mit Al-haltiger Lösung perfundiert, so kam es bereits nach 15 min bei beiden Genotypen zu einer deutlichen Abflachung des pH-Profiles sowohl in der Alkalisierungszone (0 – 3 mm) als auch im Bereich zwischen 3,5-5 mm (**Abb. 23**). Dabei lagen die Maximalwerte im Alkalisierungsbereich um pH 4,9. Während mit weiterer Behandlungsdauer diese Abflachung beim Al-resistenten Genotyp ATP-Y nicht stärker wurde, sank der pH-Wert beim Al-sensitiven Genotyp Lixis sowohl im Bereich bis 2 mm als auch im Bereich 4-5 mm noch weiter.

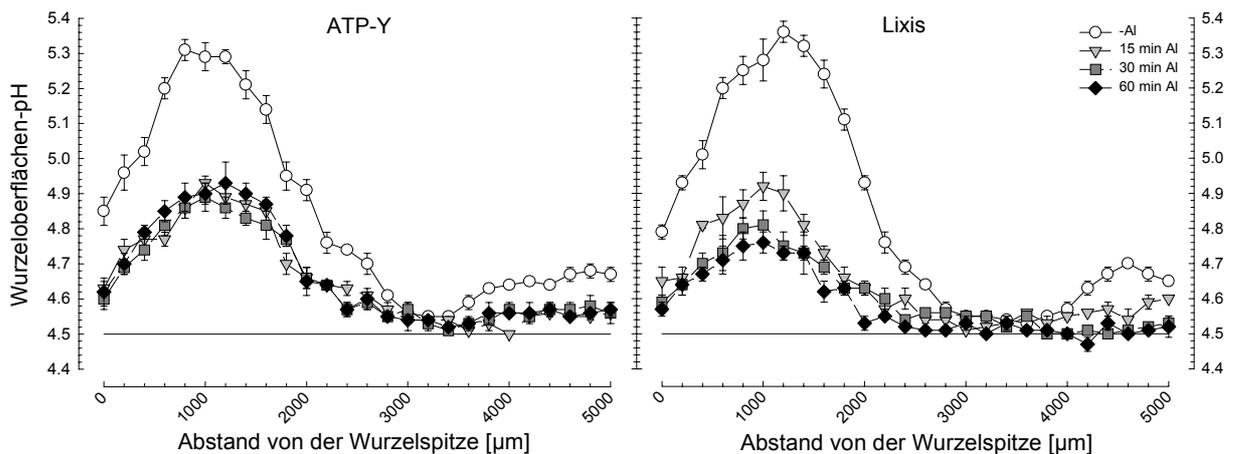


Abb. 23: Einfluss von Al-Behandlung über den gesamten Wurzelapex auf das Oberflächen-pH-Profil der Primärwurzelspitze. Die Perfusionslösung enthielt je 200 μM KCl und CaCl_2 , 1 mM MES sowie $\pm 90 \mu\text{M}$ AlCl_3 (pH 4,5). Die Messung der pH-Werte erfolgte von der Spitze ausgehend alle 200 μm in 20 μm Abstand von der Wurzeloberfläche. Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. ATP-Y = Al-resistent; Lixis = Al-sensitiv.

Die theoretische freie Al^{3+} -Aktivität (im thermodynamischen Gleichgewicht) an der Wurzeloberfläche nach 60 min Al-Behandlung über den gesamten Apex wurde mittels GEOCHEM-PC (PARKER *et al.*, 1995) aus den in **Abb. 23** gezeigten Mittelwerten berechnet (**Abb. 24**). In der Perfusionslösung betrug die freie Al^{3+} -Aktivität 47,5 μM . Im Bereich bis 1,8 mm (Lixis) bzw. 2 mm (ATP-Y) von der Wurzelspitze war die freie Al^{3+} -Aktivität an der Wurzeloberfläche beider Genotypen gegenüber der in der Perfusionslösung deutlich vermindert. Die Minimalwerte lagen im Bereich um 1 mm mit 30 μM (ATP-Y) bzw. 38 μM (Lixis). Im Bereich von 2-5 mm unterschied sich die freie Al^{3+} -Aktivität an der Wurzeloberfläche beider Genotypen nicht von der in der Perfusionslösung.

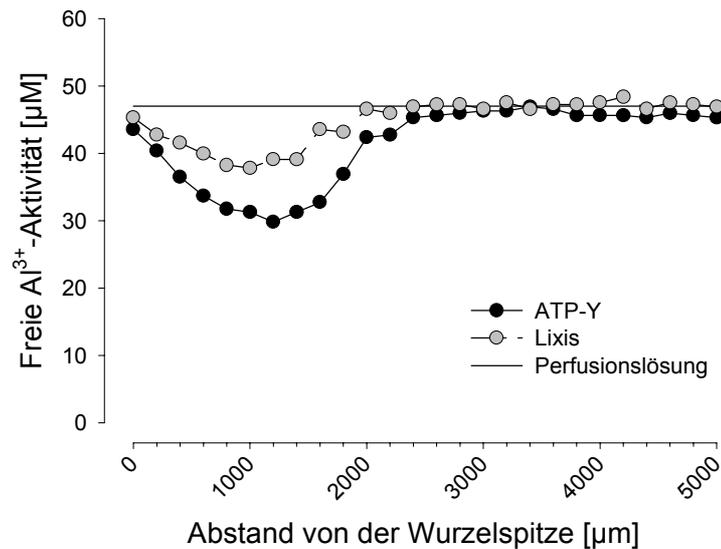


Abb. 24: Freie Al³⁺-Aktivität an der Wurzeloberfläche der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) nach 1 h Al-Behandlung. Die Werte wurden mittels GEOCHEM-PC anhand der in **Abb. 23** gezeigten Mittelwerte für die Al-Behandlung nach 60 min berechnet.

3.4.2 Behandlung spezifischer 1-mm Segmente

Mittels eines in die Messküvette einsetzbaren Agaroseblockhalters konnten spezifische 1-mm Segmente mit Al behandelt werden, während der Rest der Wurzel mit Perfusionslösung ohne Al umspült wurde. Nach 1 h wurde der Agaroseblock von der Wurzel entfernt, ohne dass deren Position im System verändert werden musste, und das pH-Profil gemessen.

Wurde das Segment 0-1 mm mit Al behandelt, so kam es bei beiden Genotypen zu einer leichten pH-Absenkung um 0,1-0,2 Einheiten im Bereich 0-2 mm (**Abb. 25**). Behandlung der 1-2 mm Zone führte zu einem Effekt, der dem bei Behandlung des gesamten Apex entsprach. Deutliche genotypische Unterschiede traten im Bereich zwischen 1,2 bis 3,2 mm auf. Hier war der pH-Wert des Al-sensitiven Genotyps Lixis deutlich niedriger als der des Al-resistenten Genotyps ATP-Y. Der pH-Wert im Bereich 3,5-5 mm war bei beiden Genotypen erniedrigt. Wurde die 2,5-3,5 mm Zone behandelt, so wurden die pH-Profile beider Genotypen nicht beeinflusst.

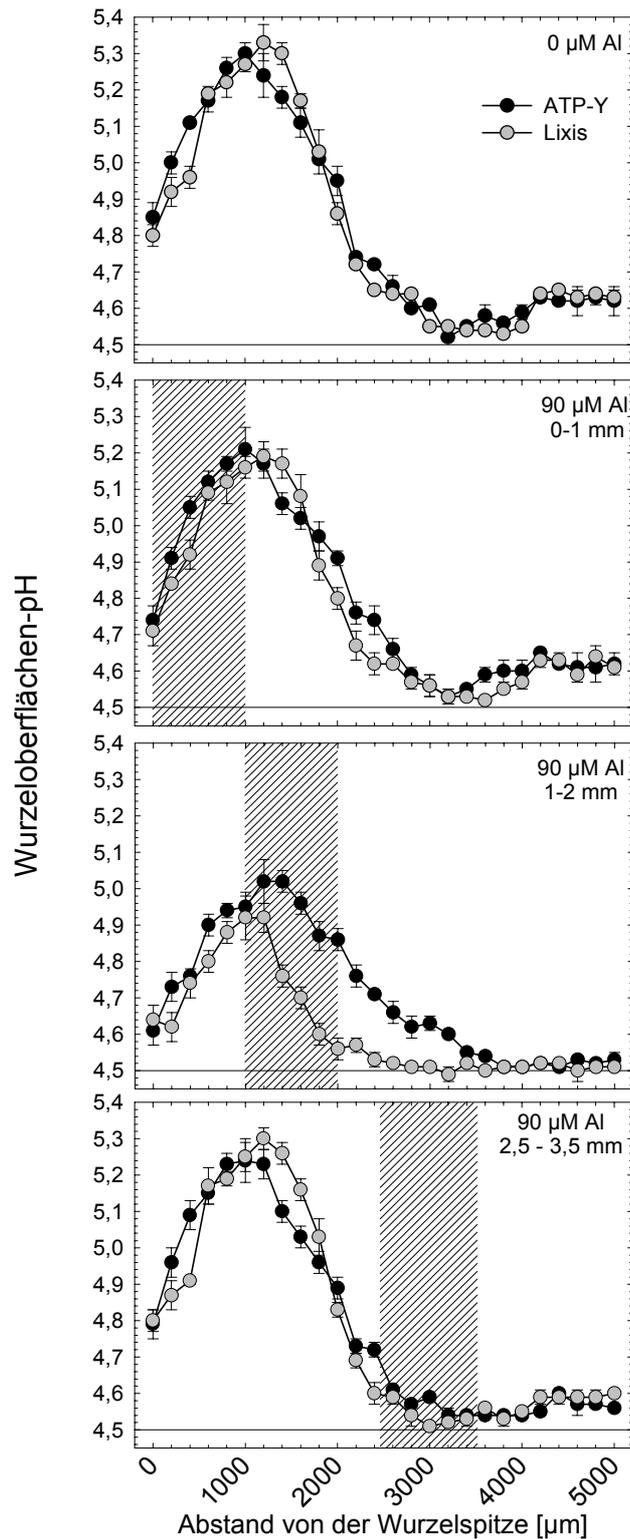


Abb. 25: Einfluss partieller Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente auf das Oberflächen-pH-Profil entlang der Primärwurzelspitze. Der pH-Wert der Perfusionslösung (je 200 μM KCl und CaCl_2 , 1 mM MES) lag bei 4,5. Die Al-Behandlung erfolgte über Agaroseblöckchen (1,2 % (w/v) mit Perfusionslösung und 90 μM Al_{MONO} ; pH 4,5) spezifisch an die Segmente 0-1, 1-2 oder 2,5-3,5 mm intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv). Die Messung der pH-Werte erfolgte in 20 μm Abstand von der Wurzeloberfläche. Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Die schraffierten Flächen zeigen die Zone der spezifischen Al-Behandlung.

3.5 Einfluss von AI auf die IES-Homöostase in der Wurzelspitze

3.5.1 Einfluss von IES auf die AI-induzierte Hemmung des WLW

Indol-3-Essigsäure (IES) wurde mittels Agaroseblöckchen an zwei unterschiedlichen Wurzelzonen appliziert: 0-1 mm (MZ) sowie 2,5-3,5 mm (Teil der EZ). Gleichzeitig wurde die 1-2 mm Zone mit Agaroseblöckchen mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$ oder $10 \mu\text{M TIBA}$, eines Inhibitors des basipetalen Auxintransportes, behandelt. Die Streckungsrate innerhalb 1 h Behandlung wurde bestimmt.

In der Kontrollbehandlung ($0 \mu\text{M Al}$) waren die Streckungsraten beider Genotypen durch IES, unabhängig von der Zone der IES-Applikation, deutlich gesteigert (**Abb. 26**). Wurde die 1-2 mm Zone mit AI behandelt, so nahm die Streckungsrate beider Genotypen in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 3.1.2 gezeigten Ergebnissen ab. Dieser Effekt fiel beim AI-sensitiven Genotyp Lixis signifikant stärker aus. Wurde die 1-2 mm Zone mit TIBA behandelt, so wurde das WLW beider Genotypen gleich stark um 40 bis 50 % gehemmt (**Tab. 2**). Indol-3-Essigsäure-Behandlung der MZ bei gleichzeitiger AI-Behandlung der 1-2 mm Zone führte nur bei ATP-Y zu einer signifikanten Verminderung des AI-Effektes auf das Streckungswachstum der Wurzel.

Tab. 2: Einfluss exogen an unterschiedliche Wurzelzonen applizierter IES auf die AI-induzierte Hemmung des Wurzellängenwachstums (WLW). Indol-3-Essigsäure ($0,1 \mu\text{M}$) wurde für 1 h mittels Agaroseblöckchen (1,2% (w/v) mit Nährlösung, pH 4,3) an die MZ oder EZ intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (AI-resistent) und Lixis (AI-sensitiv) angeboten. Die 1-2 mm Zone wurde mittels Agaroseblöckchen (0,6 % (w/v) mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$ oder $10 \mu\text{M TIBA}$; pH 4,3) behandelt. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben stehen für den IES-Effekt für jeden Genotyp sowie Behandlungstyp getrennt, Sternchen symbolisieren signifikante genotypische Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlung ($p < 0,05$; Tukey Test).

		ATP-Y		Lixis	
		-IES	+IES	-IES	+IES
		<i>Hemmung des WLW (%)</i>			
IES- Applikationszone	MZ	1-2 mm - Behandlung			
		90 $\mu\text{M Al}$	41,8 \pm 6,5 ^{a*}	34,2 \pm 3,7 ^{b*}	55,1 \pm 5,3 ^{a*}
	10 $\mu\text{M TIBA}$	45,9 \pm 11,5 ^a	46,1 \pm 6,8 ^a	47,3 \pm 9,6 ^a	55,4 \pm 5,8 ^a
	EZ	90 $\mu\text{M Al}$	42,3 \pm 3,7 ^{a*}	31,6 \pm 2,3 ^{b*}	52,8 \pm 5,3 ^{a*}
10 $\mu\text{M TIBA}$		48,3 \pm 11,1 ^a	25,9 \pm 4,6 ^b	45,0 \pm 10,0 ^a	21,1 \pm 7,4 ^b

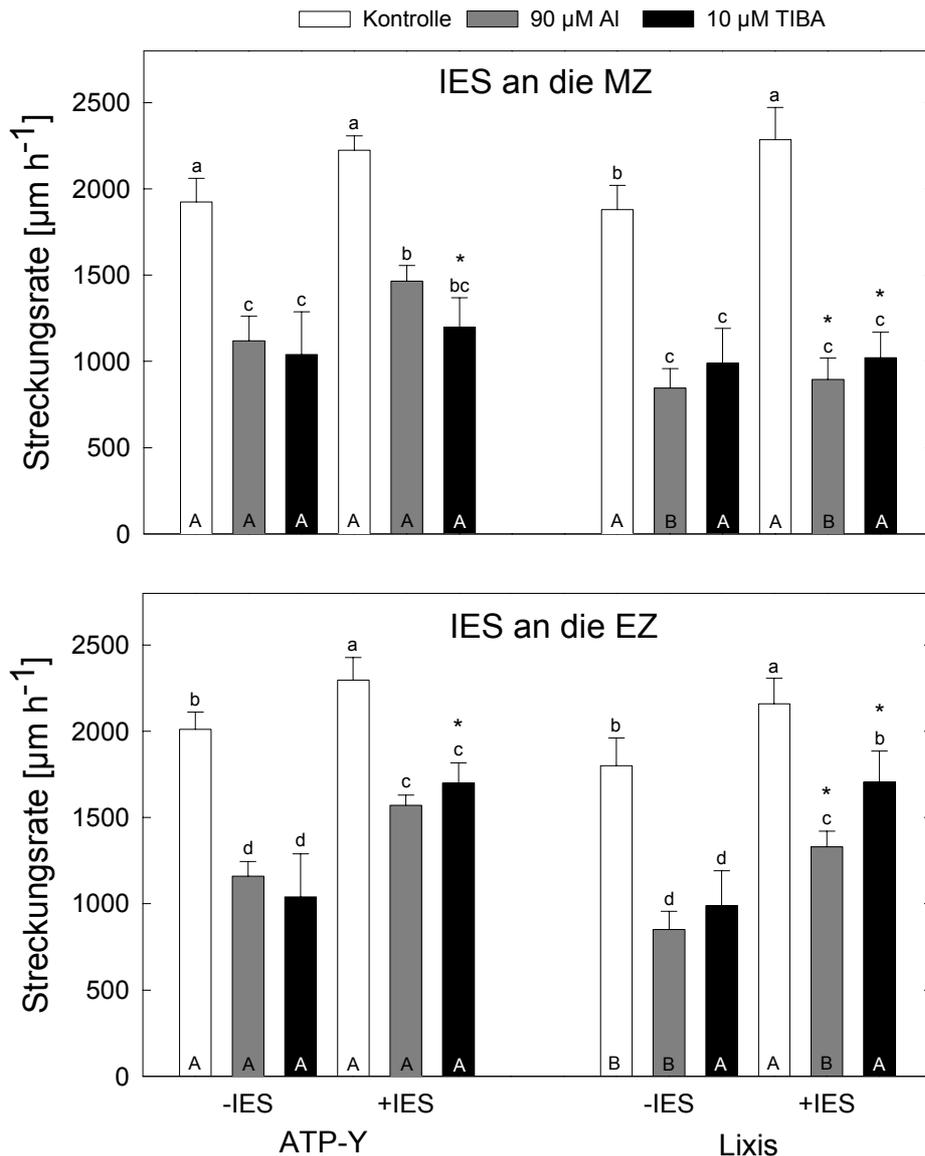


Abb. 26: Einfluss exogen applizierter IES an unterschiedliche Wurzelzonen auf die Streckungsrate. Indol-3-Essigsäure ($0,1 \mu\text{M}$) wurde für 1 h mittels Agaroseblöckchen ($1,2 \%$ (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) an die MZ oder EZ intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) angeboten. Die 1-2 mm Zone wurde mittels Agaroseblöckchen ($0,6 \%$ (w/v) mit Nährlösung $\pm 90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$ oder $10 \mu\text{M TIBA}$; pH 4,3) behandelt. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). Kleine Buchstaben über den Fehlerbalken zeigen Behandlungseffekte getrennt für die Genotypen und den Behandlungsort, während Großbuchstaben in den Balken genotypische Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlung anzeigen. Sternchen über den Balken symbolisieren einen signifikanten Einfluss der Behandlungszone für IES.

Wenn IES jedoch an der EZ appliziert wurde, war die Streckungsrate gegenüber der einfachen Al-Behandlung in beiden Genotypen signifikant erhöht (**Abb. 26**) sowie die Al-induzierte Hemmung des WLW signifikant vermindert (**Tab. 2**). Analog hierzu wurde auch die TIBA-induzierte Hemmung des WLW nur durch IES-Applikation an die EZ, nicht jedoch die MZ, vermindert.

3.5.2 Einfluss von AI auf Aufnahme und Transport von [³H]-IES

Um die Frage zu klären, ob AI ähnlich einem der bekannten IES-Transportinhibitoren TIBA oder NPA in der Wurzelspitze den basipetalen IES Transport hemmt, wurde der 0-1 mm Zone Tritium-markierte IES (³H]-IES) angeboten, während an der 1-2 mm Zone ein Agaroseblöckchen mit Nährlösung und AI oder TIBA bzw. NPA appliziert wurde. Nach 30 min Behandlung wurden die radioaktiven Zerfälle in den ersten 10 mm der Primärwurzelspitze in 1-mm Segmenten gemessen.

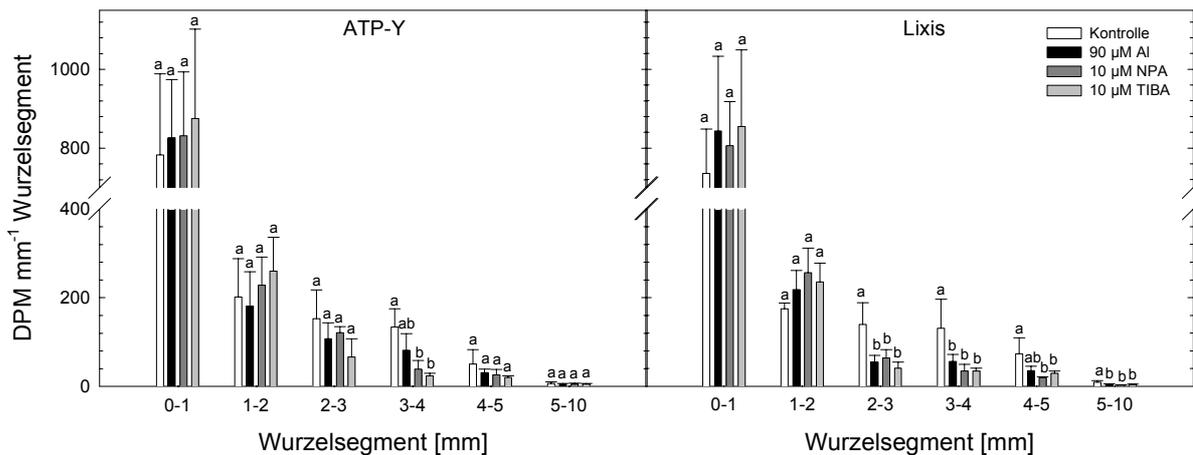


Abb. 27: Einfluss von AI auf Aufnahme und basipetalen Transport von [³H]-IES im Primärwurzelapex. Die 1-2 mm Zone intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (AI-resistent) und Lixis (AI-sensitiv) wurde im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) mit Zusatz von 90 µM AI_{MONO}, 10 µM TIBA oder 10 µM NPA behandelt. Kontrollpflanzen wurden in demselben Gel ohne Zusätze behandelt. [³H]-IES (0,1 µM in 1,2 % (w/v) Agarosegel mit Nährlösung; pH 4,3) wurde für 30 min an der MZ (0-1 mm) angeboten. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Wiederholungen ± SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Behandlungseffekte für jedes Segment getrennt (p < 0,05; Tukey Test).

Innerhalb von 30 min kam es zu einer deutlichen Aufnahme von [³H]-IES über die 0-1 mm Zone (**Abb. 27&28**). Die größten Anteile wurden in den behandelten Segmenten wiedergefunden. Basalwärts nahm die detektierbare Strahlung ab. Der basipetale [³H]-IES Transport ging dabei nicht über die ersten 10 mm der Wurzelspitze hinaus. In den Kontrollbehandlungen unterschieden sich die Genotypen bezüglich der absoluten wie auch der relativen Werte nicht voneinander. Die Applikation von TIBA oder NPA an die 1-2 mm Zone führte zu einem signifikant verminderten Transport von [³H]-IES in die Elongationszone beim AI-sensitiven Genotyp Lixis. Beim AI-resistenten Genotyp ATP-Y bestand ebenfalls die Tendenz hierzu, war jedoch weniger stark ausgeprägt.

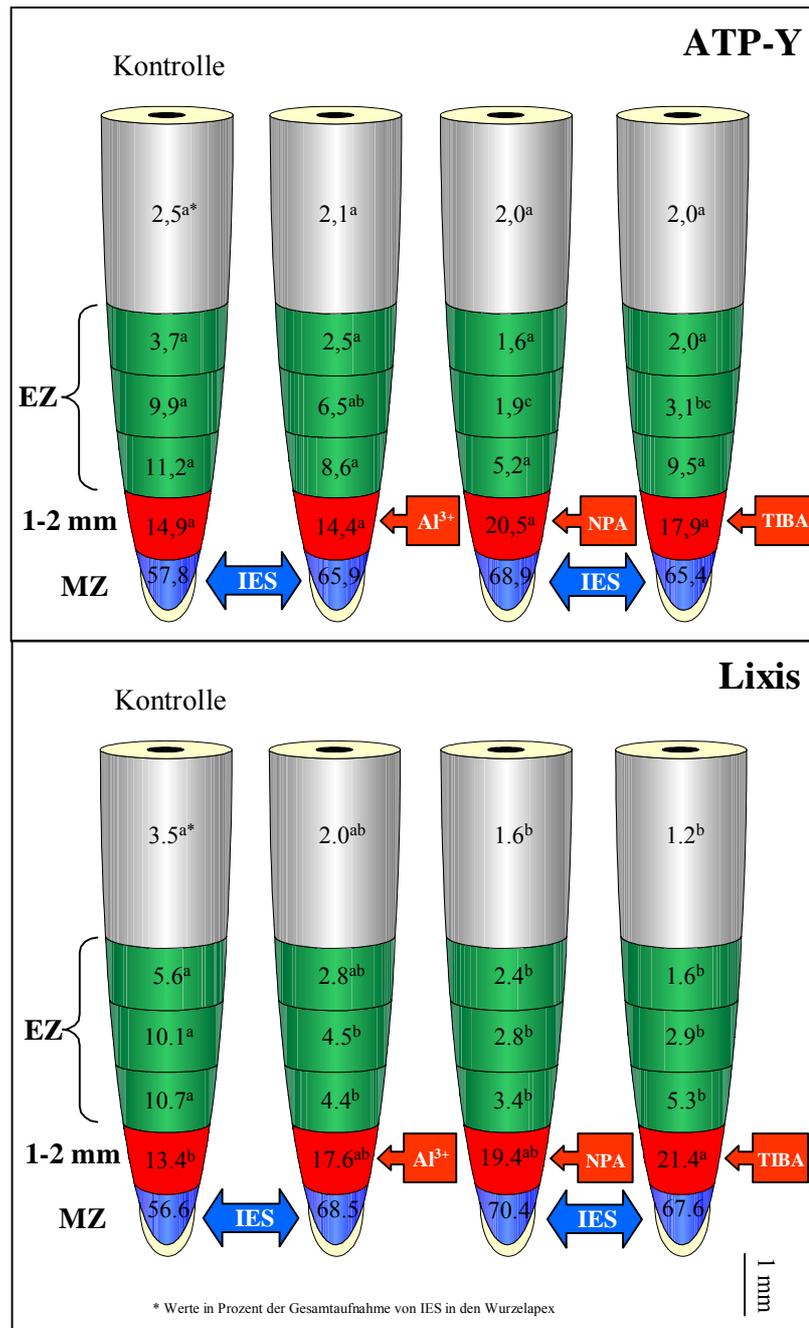


Abb. 28: Einfluss von Al auf Aufnahme und basipetalen Transport von [³H]-IES im Primärwurzelapex. Die in **Abb. 27** dargestellten Daten wurden in relative Anteile der einzelnen Segmente an der Gesamtaufnahme von [³H]-IES umgerechnet. Die 1-2 mm Zone intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurde im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) mit Zusatz von 90 μM Al_{MONO}, 10 μM TIBA oder 10 μM NPA behandelt. Kontrollpflanzen wurden mit demselben Gel ohne Zusätze behandelt. [³H]-IES (0,1 μM in 1,2 % (w/v) Agarosegel mit Nährlösung, pH 4,3) wurde für 30 min an der MZ (0-1 mm) angeboten. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Wiederholungen ± SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede (p < 0,05; Tukey Test).

Bei beiden Genotypen kam es zugleich tendenziell zur Akkumulation von IES in den ersten beiden apikalen Millimetern der Wurzelspitze. Wurde die 1-2 mm Zone mit Al behandelt, so traten besonders im Al-sensitiven Genotyp Lixis vergleichbare Effekte

auf: Verminderte relative und absolute Gehalte an [^3H]-IES im Bereich 2-5 mm, während es in der Spitze (0-1 mm bei ATP-Y bzw. 0-2 mm bei Lixis) zu einer tendenziellen Akkumulation kam. Letztere war bei beiden Genotypen nicht so stark ausgeprägt wie bei der Behandlung mit NPA oder TIBA.

3.6 Die Exsudation der Anionen organischer Säuren als Mechanismus der Al-Resistenz

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Exsudationsexperimenten wurden im Exsudat neben Citrat und Malat große Mengen an Succinat und *trans*-Aconitat sowie geringe Mengen an Oxalat, *cis*-Aconitat, 2-oxo-Glutarat und Fumarat detektiert. Um die unterschiedliche Kapazität dieser von der Maiswurzel ausgeschiedenen Anionen organischer Säuren zur Detoxifizierung von Al zu untersuchen, wurden Primärwurzelspitzen für 2 h im Agarosegel mit Nährlösung (pH 4,3) unter Zusatz des jeweiligen Anions \pm Al im molaren Verhältnis von 1:1 behandelt.

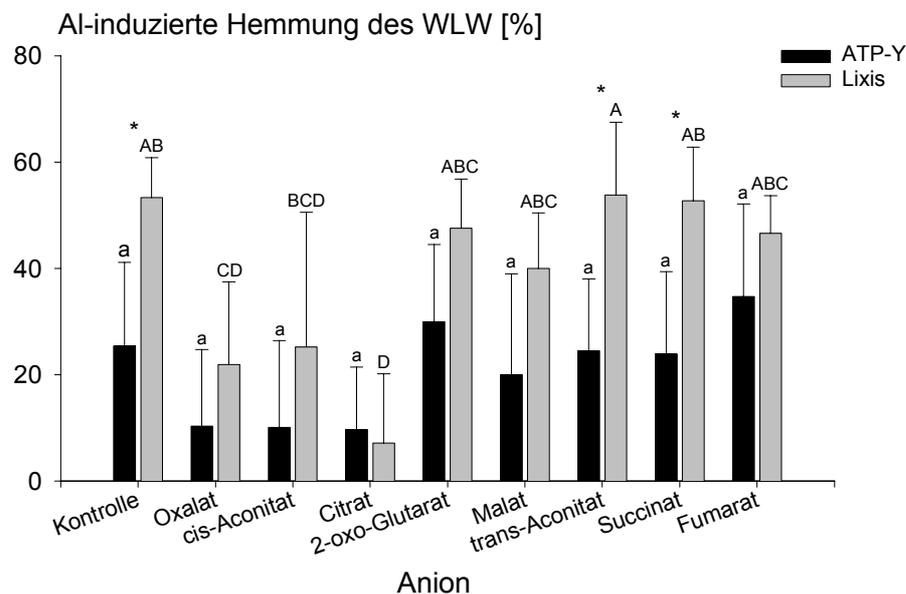


Abb. 29: Einfluss unterschiedlicher organischer Anionen auf die Al-induzierte Hemmung des WLW. Die organischen Anionen wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu einer Al-Konzentration von 90 μM für 2 h im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung pH 4,3) über den gesamten Apex (3 cm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) angeboten. Für die Berechnung der Al-induzierten Hemmung des WLW wurde für jedes Anion eine eigene Kontrolle durchgeführt. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen für die Genotypen ATP-Y (kleine Buchstaben) und Lixis (Großbuchstaben) getrennt ($p < 0,05$; Tukey Test). Sternchen zeigen signifikante genotypische Unterschiede.

Wurde keines der Anionen hinzugegeben (Kontrolle), so wurden die zuvor in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen genotypischen Unterschiede in der Al-induzierten Hemmung des WLW bestätigt (**Abb. 29**). Anwesenheit von 2-oxo-Glutarat, Fumarat, *trans*-Aconitat sowie Succinat hatte keine Auswirkung auf die Al-induzierte Hemmung des WLW bei beiden Genotypen. Nach Zugabe von Malat und *cis*-Aconitat zeigte sich tendenziell eine Abnahme der Hemmung für den Al-sensitiven Genotyp Lixis bzw. beide Genotypen. Zugabe von Oxalat und Citrat führte zu einer gegenüber den übrigen Behandlungen signifikant verminderten Al-induzierten Hemmung des WLW bei Genotyp Lixis. Dieser Effekt war tendenziell auch beim Al-resistenten Genotyp ATP-Y festzustellen. Bei der Citratbehandlung verschwanden die genotypischen Unterschiede völlig.

Für Oxalat war die Wiederfindungsrate aus Standards nach dem Eindampfungsprozess stets großen Fluktuationen unterworfen und Behandlungseffekte nicht feststellbar. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird auf die gesonderte Darstellung der Exsudationsraten für Oxalat, Succinat, *trans*-Aconitat, *cis*-Aconitat, Fumarat sowie 2-oxo-Glutarat verzichtet, da sie entweder keinen Einfluss auf die Al-Verfügbarkeit haben, in zu geringen Mengen ausgeschieden werden oder, im Falle von Oxalat, mit der verwendeten Analytik nicht zufriedenstellend bestimmt werden konnten. Neben der Citrat- und Malatexsudationsrate wird allerdings die Gesamtexsudationsrate als Indikator für die Exsudationskapazität der Wurzeln dargestellt. Dabei wurde der Succinatanteil abgezogen, da dieser über die übrigen Anionen dominierte und zudem nicht konsistent behandlungsabhängig war.

3.6.1 Lokalisation der Hauptexsudationszone

3.6.1.1 Exsudation aus dem Gesamtwurzelsystem

Das gesamte Wurzelsystem 4 Tage alter Maiskeimlinge wurde nach 1 d Vorkultur in Nährlösung (pH 4,3) für 2 h in 500 ml Inkubationslösung (200 μM CaCl_2 , \pm 100 μM AlCl_3 , pH 4,3) inkubiert und die Gesamtexsudationsrate sowie die Exsudationsraten von Citrat und Malat bestimmt. Die Exsudationsraten wurden auf die Basis Wurzel(spitze) berechnet.

Von einem Niveau von $1,81 \pm 0,65 \text{ nmol Wurzel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der Kontrollbehandlung stieg die Gesamtexsudationsrate des Al-resistenten Genotyps ATP-Y durch Al signifikant auf $4,71 \pm 1,89 \text{ nmol Wurzel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an (**Abb. 30a**). Im Al-sensitiven Genotyp Lixis trat kein deutlicher Anstieg auf ($1,65 \pm 0,54 \text{ nmol Wurzel}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Kontrolle; $2,26 \pm 1,02 \text{ nmol}$

Wurzel⁻¹ h⁻¹, Al-Behandlung). Obgleich der Mittelwert für ATP-Y in der Al-Behandlung beim Zweifachen dessen für Lixis lag, war der Unterschied aufgrund der großen Streuung nicht signifikant.

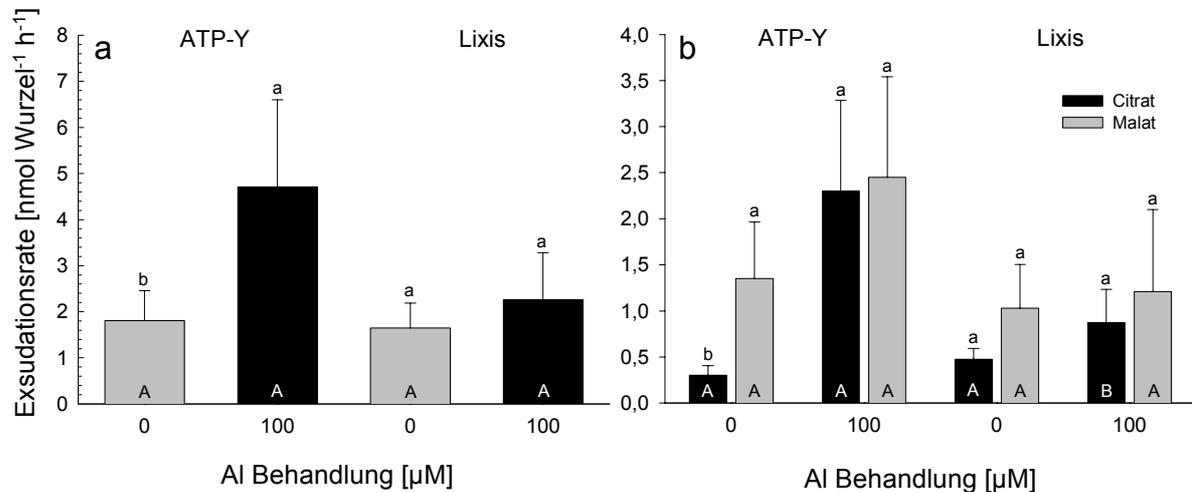


Abb. 30: Einfluss von Al auf die Exsudation organischer Anionen aus dem gesamten Wurzelsystem. (a) Gesamtexsudationsrate; (b) Exsudationsraten für Citrat und Malat. Die Behandlung erfolgte über das gesamte Wurzelsystem intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) in 500 ml einer Lösung aus 200 µM CaCl₂ ± 100 µM Al (pH 4,3) für 2 h. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Wiederholungen ± SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede (p < 0,05; Tukey Test). Kleine Buchstaben über den Balken zeigen Behandlungseffekte für jeden Genotyp getrennt, während Großbuchstaben in den Balken den Genotypenvergleich zwischen den Behandlungen darstellen.

Für die Citratexsudationsrate kam es für ATP-Y in der Al-Behandlung zu einer signifikanten Zunahme von $0,30 \pm 0,10$ auf $2,30 \pm 0,98$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹, während eine solche bei Lixis nur tendenziell auftrat ($0,47 \pm 0,12$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹, Kontrolle; $0,87 \pm 0,36$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹, Al-Behandlung; **Abb. 30b**). Der Genotypenunterschied war hier signifikant. Die Exsudationsrate von Malat lag mit $1,35 \pm 0,61$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹ (ATP-Y) bzw. $1,03 \pm 0,47$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹ (Lixis) in der Kontrolle bei beiden Genotypen über der von Citrat. Eine Al-induzierte Steigerung trat nur tendenziell bei ATP-Y ($2,45 \pm 1,09$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹) nicht jedoch bei Lixis ($1,21 \pm 0,89$ nmol Wurzel⁻¹ h⁻¹) auf. Während die absoluten Exsudationsraten für Citrat zwischen unterschiedlichen Experimenten relativ geringen Schwankungen unterlagen, zeigte sich, dass speziell die Malatexsudation deutlichen Schwankungen unterworfen war, die nicht auf einen Al-Einfluss zurückzuführen waren.

3.6.1.2 Exsudation aus den apikalen 10 mm

Um den Bereich der Wurzel, der den Hauptteil an der Exsudation trägt, einzugrenzen, wurden die apikalen 10 mm der Wurzelspitze für 2 h in einer Lösung aus 200 μM CaCl_2 (pH 4,3) mit Aluminium inkubiert und Exsudat ausschließlich aus dieser Zone gesammelt. Um die Abhängigkeit zwischen Exsudationsrate und Al-Konzentration zu untersuchen, wurden unterschiedliche Al-Konzentrationen zwischen 0 und 100 μM appliziert.

Die Gesamt- (**Abb. 31a**) wie auch die Citrat-Exsudationsrate (**Abb. 31c**) beider Genotypen waren bereits bei einem Al-Angebot von 10 μM gegenüber der Kontrollbehandlung erhöht und stiegen nach den in **Abb. 31b&d** angegebenen linearen Funktionen bis zur Behandlung mit 100 μM Al an. Von der 50 μM Al-Behandlung an aufwärts lag die Exsudationsrate des Al-sensitiven Genotyps Lixis deutlich unter der des Al-resistenten Genotyps ATP-Y. Die Exsudationsraten sowie die Ausprägung des Al-Effektes entsprachen qualitativ sowie quantitativ denen bei Sammlung des Exsudates über das gesamte Wurzelsystem (siehe **Abb. 30**).

Für die Malat-Exsudationsrate (**Abb. 31e**) bot sich ein leicht verändertes Bild. Ein Al-abhängiger Anstieg der Exsudationsrate war nur für den Al-resistenten Genotyp ATP-Y festzustellen, wenngleich bei gleichzeitiger Zunahme der Varianz. Für den Al-sensitiven Genotyp Lixis bestand keine Korrelation zwischen Al-Konzentration und Exsudationsrate (**Abb. 31f**). Wie bereits in Abschnitt 3.6.1.1 beschrieben, waren die absoluten Daten zur Malatexsudation auch in diesen Experimenten aufgrund großer Variabilität nicht konsistent.

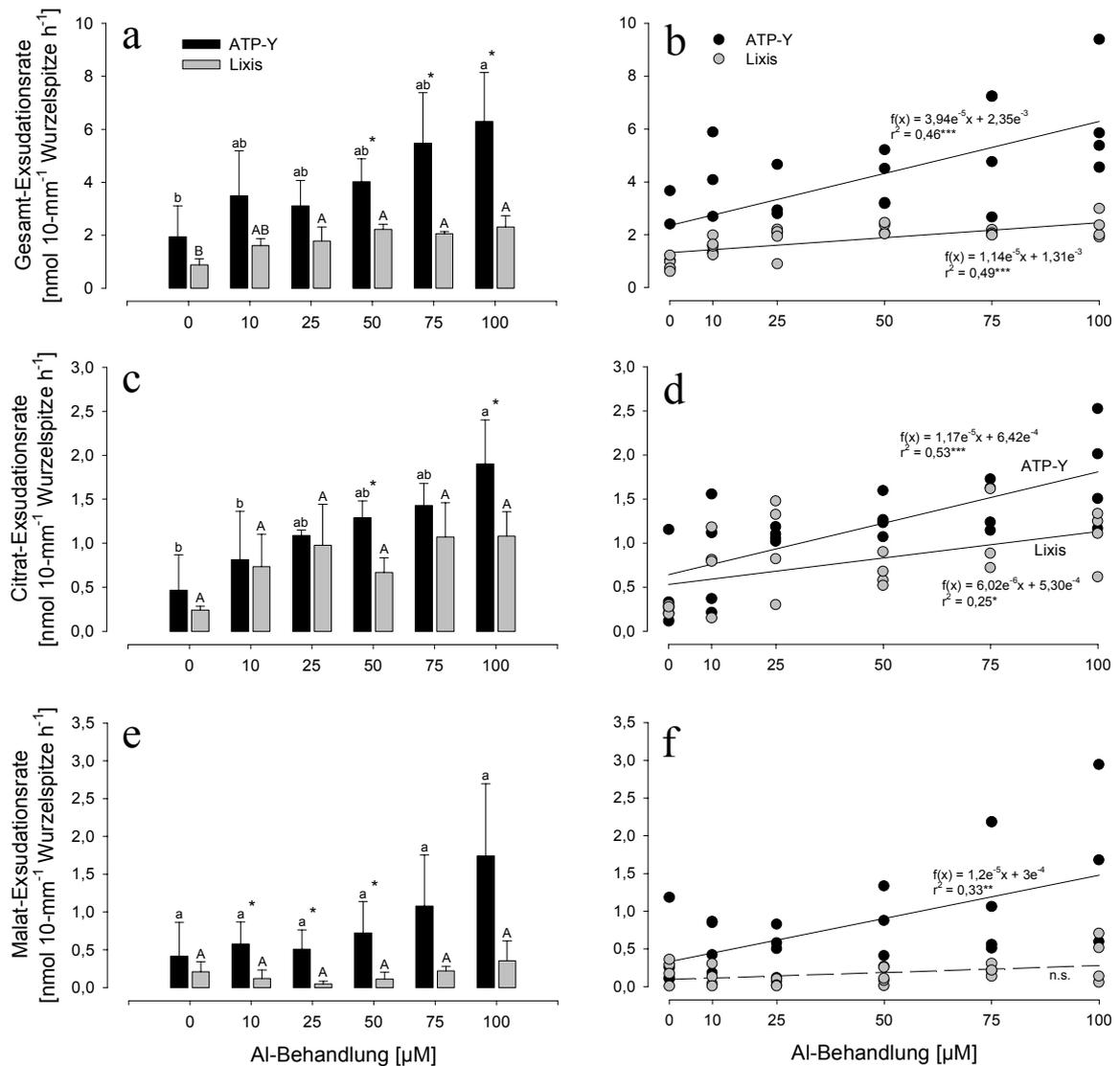


Abb. 31: Abhängigkeit der Exsudationsrate aus den apikalen 10 mm der Primärwurzel von der Al-Konzentration in der Inkubationslösung. Die apikalen 10 mm der Primärwurzel intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 2 h in einer Inkubationslösung (200 µM CaCl₂ + 0, 10, 25, 50, 75 oder 100 µM AlCl₃, pH 4,3) inkubiert. (a, b) Gesamtexsudationsrate, (c, d) Citrat-, (e, f) Malatexsudationsrate. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen ± SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für ATP-Y, Großbuchstaben für Lixis stehen. Sternchen zeigen signifikante genotypische Unterschiede. Linke Seite: Behandlungs- und Genotypenvergleich. Rechte Seite: Lineare Beziehungen zwischen Al-Konzentration und Exsudationsrate (Signifikanzniveaus: * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001).

3.6.1.3 Exsudation aus den apikalen 5 mm

Bei Sammlung des Exsudates aus den apikalen 5 mm der Primärwurzel wurden die bei Sammlung von Exsudat aus dem Gesamtwurzelsystem (**Abb. 30**) sowie aus den apikalen 10 mm der Primärwurzel (**Abb. 31**) gewonnenen Ergebnisse qualitativ sowie quantitativ bestätigt (**Abb. 32**).

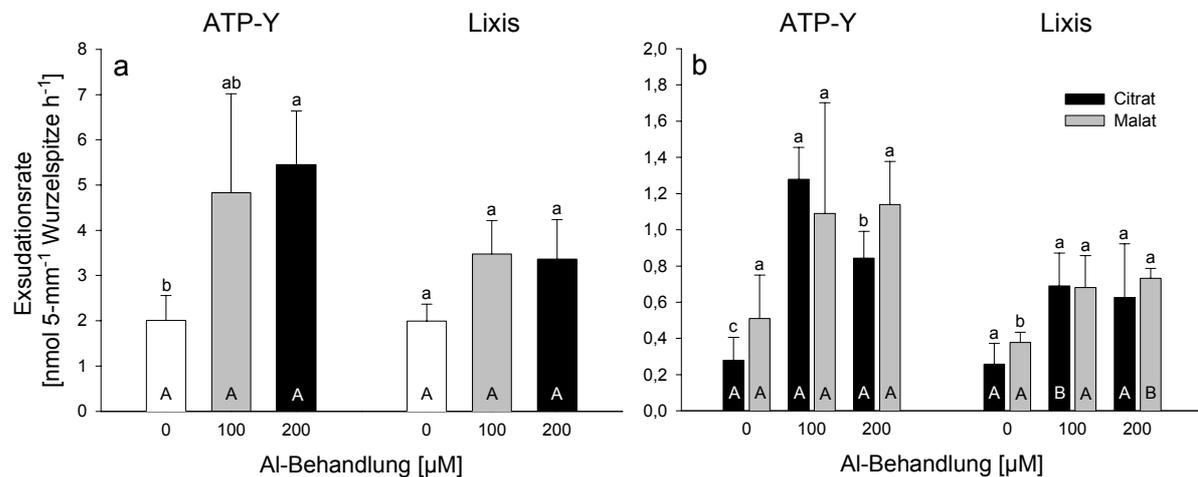


Abb. 32: Einfluss von Al auf die Exsudation organischer Anionen aus den apikalen 5 mm der Primärwurzel. (a) Gesamtexsudationsrate; (b) Exsudationsraten für Citrat und Malat. Die apikalen 5 mm der Primärwurzel intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 2 h in einer Inkubationslösung (200 µM CaCl₂ + 0, 100 oder 200 µM AlCl₃; pH 4,3) inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD von 3 unabhängigen Wiederholungen. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). Kleine Buchstaben über den Balken zeigen Behandlungseffekte für jeden Genotyp getrennt, während Großbuchstaben in den Balken den Genotypenvergleich innerhalb der jeweiligen Behandlung darstellen.

Durch Al wurde sowohl die Gesamt- (**Abb. 32a**) als auch die Citrat- und Malatexsudationsrate (**Abb. 32b**) speziell des Al-resistenten Genotyps gesteigert. Während bei der Behandlung mit 100 µM Al die Genotypenunterschiede für die Gesamt- und Malatexsudationsrate tendenziell hervortraten, unterschieden sich die Genotypen in ihrer Citratexsudation signifikant. Inkubation in 200 µM Al führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Exsudationsraten. Beim Al-resistenten Genotyp ATP-Y nahm die Exsudationsrate von Citrat zwischen der 100 und 200 µM Behandlung sogar signifikant ab. Unter Hinzunahme der nur für Genotyp ATP-Y erhobenen Daten bei einer Behandlung mit 50 µM Al ergaben sich signifikante Korrelationen (Polynom 2. Ordnung) zwischen Al-Angebot und Exsudationsrate für die Gesamt- und Citratexsudationsrate des Genotyps ATP-Y sowie die Malatexsudationsrate des Genotyps Lixis (**Abb. 33**).

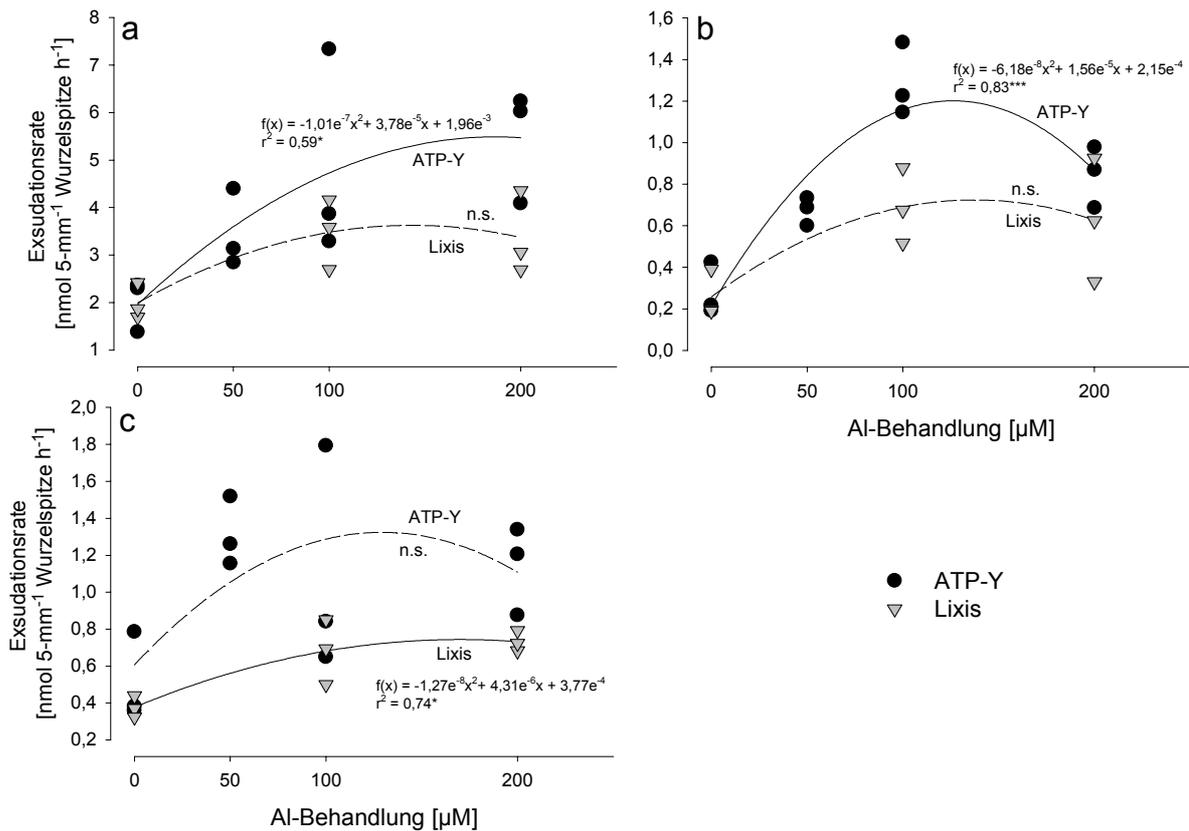


Abb. 33: Beziehung zwischen der Al-Konzentration im Inkubationsmedium und der Exsudation organischer Anionen aus den apikalen 5 mm der Primärwurzel. Die apikalen 5 mm der Primärwurzel intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 2 h in Inkubationslösung (200 μM CaCl₂ + 0, 50, 100 oder 200 μM AlCl₃; pH 4,3) inkubiert. (a) Gesamtexsudationsrate, (b) Exsudationsrate von Citrat und (c) Exsudationsrate von Malat. (Signifikanzniveaus: * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001).

3.6.1.4 Exsudation aus inkubierten Wurzelspitzen

Zur weiteren Eingrenzung der Hauptexsudationszone wurde die Exsudation organischer Anionen aus abgeschnitten 1-mm Wurzelsegmenten bestimmt.

In der Kontrollbehandlung wurden aus den einzelnen Wurzelsegmenten des Al-resistenten Genotyps ATP-Y zwischen 0,50 und 1,40 nmol Anionen h⁻¹ (Mittelwert: 1,03 ± 0,23) ausgeschieden (**Abb. 34a**). Dabei lag die Exsudation im 0-1 mm Segment unter dem Niveau der übrigen Segmente.

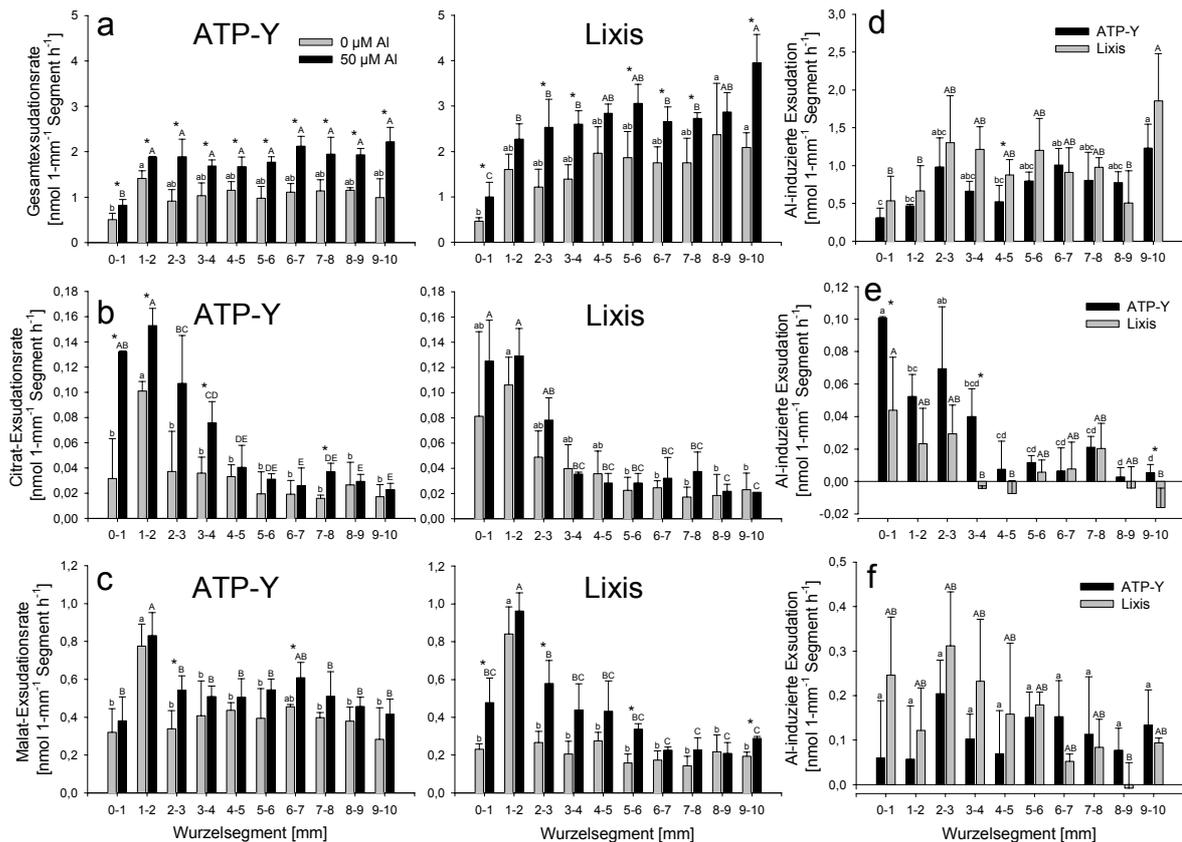


Abb. 34: Einfluss von Al auf die Exsudationsrate organischer Anionen aus abgeschnittenen 1-mm Wurzelsegmenten. Dargestellt sind die Gesamtexsudationsrate (a), sowie die Exsudationsraten von Citrat (b) und Malat (c) in Abhängigkeit von der Al-Behandlung für die Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) sowie Lixis (Al-sensitiv). Ferner ist der Al-induzierte Anteil an der Exsudation für die Summe aller organischen Anionen (d) sowie Citrat (e) und Malat (f) abgebildet. Jeweils 52 entsprechende 1-mm Segmente wurden als eine Wiederholung für 3 h in einer Lösung aus $200 \mu\text{M CaCl}_2 \pm 50 \mu\text{M AlCl}_3$ (pH 4,3) inkubiert. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). In (a), (b) und (c) stehen kleine Buchstaben für die Kontroll-, Großbuchstaben für die Al-Behandlung, Sternchen zeigen signifikante Behandlungsunterschiede. In (d), (e) und (f) stehen kleine Buchstaben für den Zonenvergleich für ATP-Y, Großbuchstaben für Lixis. Sternchen symbolisieren signifikante genotypische Unterschiede.

In der Summe wurden aus der 10-mm Wurzelspitze $10,37 \text{ nmol Anionen h}^{-1}$ exsudiert. Durch Al-Behandlung kam es für alle Segmente zu einer signifikanten Erhöhung der Exsudationsrate auf zwischen $0,80$ und $2,20 \text{ nmol Anionen h}^{-1}$ (Mittelwert: $1,79 \pm 0,38$). Insgesamt wurden aus der 10-mm Wurzelspitze $17,94 \text{ nmol Anionen h}^{-1}$ exsudiert. Für den Al-sensitiven Genotyp Lixis bestanden dieselben Tendenzen. Allerdings lagen die Gesamtexsudationsraten mit zwischen $0,50$ und $2,40$ (Kontrolle; Mittelwert: $1,64 \pm 0,53$; Summe über 10 mm: $16,45$) sowie 1 bis $4 \text{ nmol Anionen } 1\text{-mm}^{-1} \text{ Segment h}^{-1}$ (Al-Behandlung; Mittelwert: $2,65 \pm 0,73$; Summe über 10 mm: $26,51$) über denen von ATP-Y. Damit lagen die Gesamtexsudationsraten aus inkubierten Wurzelspitzen deutlich über denen aus intakten Wurzelapices, während

der Al-induzierte Anstieg der Exsudationsrate im Vergleich geringer ausfiel. Konstante genotypische Unterschiede in der Al-induzierten Exsudationsrate traten nicht auf (**Abb. 34d**). Die Werte lagen zwischen 0,3 und 1,2 nmol Anionen 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (ATP-Y; Mittelwert: $0,76 \pm 0,27$; Summe über 10 mm: 7,6) sowie 0,5 und 1,9 nmol Anionen 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (Lixis; Mittelwert: $1,00 \pm 0,40$; Summe über 10 mm: 10,0). und damit bei ATP-Y etwas, bei Lixis deutlich über der Gesamt-exsudationsrate der Al-Behandlung in den Experimenten an intakten Pflanzen (siehe Abschnitte 3.6.1.1, 3.6.1.2 und 3.6.1.3).

In der Kontrollbehandlung wurden aus den einzelnen Wurzelsegmenten von ATP-Y zwischen 0,016 und 0,101 nmol Citrat h^{-1} (Mittelwert: $0,03 \pm 0,03$) ausgeschieden (**Abb. 34b**). Dabei lag die Abgabe aus dem 1-2 mm Segment signifikant über der der übrigen Segmente. In der Summe wurden aus der 10-mm Wurzelspitze 0,3 nmol Citrat h^{-1} exsudiert. Durch Al-Behandlung kam es in den Segmenten 0-1, 1-2, 3-4 sowie 7-8 mm zu einer signifikanten Erhöhung der Exsudationsrate. Diese lag in der Al-Behandlung zwischen 0,03 und 0,15 nmol Citrat h^{-1} (Mittelwert: $0,06 \pm 0,05$). Auch hier dominierte das 1-2 mm Segment. Zusammen wurden aus der 10-mm Wurzelspitze 0,6 nmol Citrat h^{-1} exsudiert. Für Lixis lagen die Exsudationsraten zwischen 0,02 und 0,11 (Kontrolle; Mittelwert: $0,04 \pm 0,03$; Summe über 10 mm: 0,42) sowie 0,02 bis 0,13 nmol 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (Al-Behandlung; Mittelwert: $0,05 \pm 0,04$; Summe über 10 mm: 0,53). Die Al-induzierte Citrat-Exsudation erfolgte in der Hauptsache über die apikalen 3 (Lixis) bzw. 4 (ATP-Y) Segmenten (**Abb. 34e**). Die Werte lagen zwischen 0 und 0,10 (ATP-Y; Mittelwert: $0,03 \pm 0,03$; Summe über 10 mm: 0,32) sowie 0,016 und 0,044 nmol Citrat 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (Lixis; Mittelwert: $0,01 \pm 0,02$; Summe über 10 mm: 0,1). Damit lag die Exsudationsrate von Lixis unter der von ATP-Y, was auf genotypische Unterschiede in der Exsudation im Bereich 0-4 mm zurückzuführen ist. Während diese genotypischen Unterschiede in der Citratexsudationsrate den an intakten Pflanzen ermittelten Resultaten entsprach, fiel die Al-induzierte Steigerung deutlich geringer aus als bei den Versuchen an intakten Pflanzen.

In der Kontrollbehandlung wurden aus den einzelnen Wurzelsegmenten von ATP-Y zwischen 0,28 und 0,77 nmol Malat h^{-1} (Mittelwert: $0,42 \pm 0,13$) ausgeschieden (**Abb. 34c**). Dabei war die Exsudation im 1-2 mm Segment signifikant gegenüber den übrigen Segmenten erhöht. Insgesamt wurden aus der 10-mm Wurzelspitze 4,18 nmol Malat h^{-1} exsudiert. Durch Al-Behandlung kam es über den gesamten

Apex zur Steigerung der Exsudationsrate. Diese lag in der Al-Behandlung zwischen 0,38 und 0,83 nmol Malat 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (Mittelwert: $0,53 \pm 0,12$). Auch hier dominierte das 1-2 mm Segment. Insgesamt wurden aus der 10-mm Wurzelspitze 5,31 nmol Malat h^{-1} exsudiert. Für Lixis lagen die Exsudationsraten zwischen 0,14 und 0,84 (Kontrolle; Mittelwert: $0,27 \pm 0,20$; Summe über 10 mm: 2,71) sowie 0,21 bis 0,96 nmol Malat 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (Al-Behandlung; Mittelwert: $0,42 \pm 0,23$; Summe über 10 mm: 4,18). Damit lagen die Exsudationsraten für Malat in beiden Genotypen und Behandlungen deutlich über den an intakten Pflanzen ermittelten Werten. Während es bei Genotyp ATP-Y durch Al zu einer Steigerung der Malat-Exsudationsrate über den gesamten Apex kam, war diese bei Lixis in der Hauptsache auf den Bereich 0-6 mm beschränkt (**Abb. 34f**). Die Werte lagen zwischen 0,05 und 0,20 (ATP-Y; Mittelwert: $0,11 \pm 0,05$; Summe über 10 mm: 1,11) sowie 0 und 0,31 nmol Malat 1-mm^{-1} Segment h^{-1} (Lixis; Mittelwert: $0,15 \pm 0,01$; Summe über 10 mm: 1,47). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den an intakten Pflanzen gefundenen Resultaten.

3.6.2 Einfluss von Anionenkanal-Inhibitoren auf die Exsudation

Da die organischen Säuren unter den schwach alkalischen Bedingungen des Cytosols deprotoniert in anionischer Form vorliegen, stellt die Abgabe über einen in der Plasmamembran lokalisierten Anionenkanal eine Möglichkeit der Exsudation in den Apoplasten bzw. die Rhizosphäre dar. Um zu untersuchen, inwiefern ein solcher Mechanismus ursächlich für die Exsudation ist, wurden der Inkubationslösung die Anionenkanalinhibitoren DIDS oder Nifluminsäure hinzugegeben.

Die Exsudationsraten von Citrat sowie Malat aus 5-mm Wurzelapices waren durch Al in Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten Ergebnissen (Abschnitt 3.6.1) gegenüber der Kontrollbehandlung signifikant gesteigert (**Tab. 3**). Wurde der Al-haltigen Inkubationslösung DIDS bzw. Nifluminsäure zugegeben, so führte dies zu einer signifikanten Abnahme beider Exsudationsraten auf (Malat) bzw. unter (Citrat) das Kontrollniveau.

Tab. 3: Einfluss von Anionenkanalinhibitoren auf die Al-induzierten Exsudationsraten von Citrat und Malat aus 5-mm Wurzelapices. Die Werte sind relativ auf die Kontrollbehandlung (100 %) bezogen. Die apikalen 5 mm der Primärwurzel des Al-resistenten Genotyps ATP-Y wurden für 2 h in Inkubationslösung (200 μM $\text{CaCl}_2 \pm 50 \mu\text{M}$ AlCl_3 ; pH 4,3) inkubiert. Die Anionenkanalinhibitoren DIDS oder Nifluminsäure wurden in einer Konzentration von 100 μM hinzugegeben. Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Behandlungsunterschiede (getrennt für Citrat und Malat; $p < 0,05$; Tukey Test).

	Citrat	Malat
	<i>Relative Exsudationsrate [%]</i>	
Kontrolle	100 ^b	100 ^b
Al	174,22 \pm 14,27 ^a	199,40 \pm 23,19 ^a
Al + DIDS	65,16 \pm 7,23 ^c	76,82 \pm 13,13 ^b
Al + Nifluminsäure	68,68 \pm 10,02 ^c	101,39 \pm 24,63 ^b

3.6.3 Aluminium-Spezifität der Exsudationsinduktion

Um die Spezifität der Exsudationsinduktion gegenüber Al zu untersuchen, wurde Al in der Inkubationslösung durch Lanthan ersetzt.

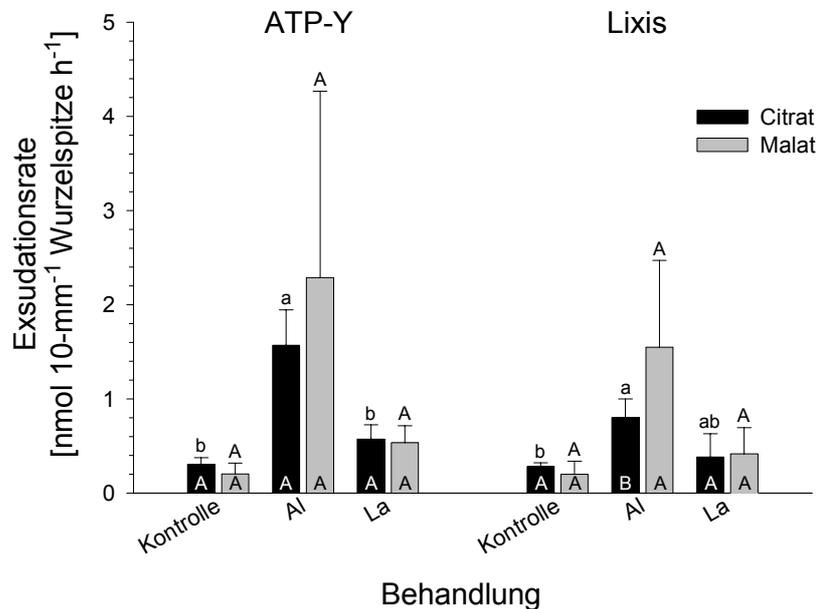


Abb. 35: Aluminiumspezifität der Exsudationsinduktion. Wurzelspitzen (10 mm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) wurden für 2 h in einer Lösung aus 200 μM CaCl_2 (pH 4,3) inkubiert. Es wurden 0 (Kontrolle), 100 μM AlCl_3 (Al) oder 100 μM LaCl_3 (La) hinzugegeben (pH 4,3). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). Kleine Buchstaben über den Fehlerbalken zeigen Behandlungseffekte auf die Citrat-, Großbuchstaben für Malatexsudationsrate für beide Genotypen getrennt. Großbuchstaben in den Balken stehen für den Genotypenvergleich für die jeweilige Behandlung für beide Anionen getrennt.

Während der Al-Effekt mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen übereinstimmte (siehe Abschnitt 3.6.1), waren die Exsudationsraten von Citrat und Malat in der Lanthan-Behandlung gegenüber der Kontrollbehandlung nicht (Lixis) bzw. nur leicht (ATP-Y) erhöht (**Abb. 35**).

3.6.4 Kontinuität der Exsudation nach Entfernen von Al

Um die Bedeutung der Präsenz von Al für die Aufrechterhaltung der Exsudation zu untersuchen, wurde Al nach erfolgter Induktion der Exsudation aus der Inkubationslösung entfernt und die Exsudation in Al-freiem Medium in den folgenden 2 h bestimmt.

In der Kontrollvariante änderte sich die Exsudationsrate von Citrat und Malat nach 4 h nicht gegenüber den nach 2 h erhaltenen Werten (**Abb. 36**). Wurde Al nach 2 h entfernt, so war eine signifikante Abnahme der Exsudationsrate von Citrat innerhalb der nächsten 2 h bei Inkubation in Al-freier Lösung nicht feststellbar.

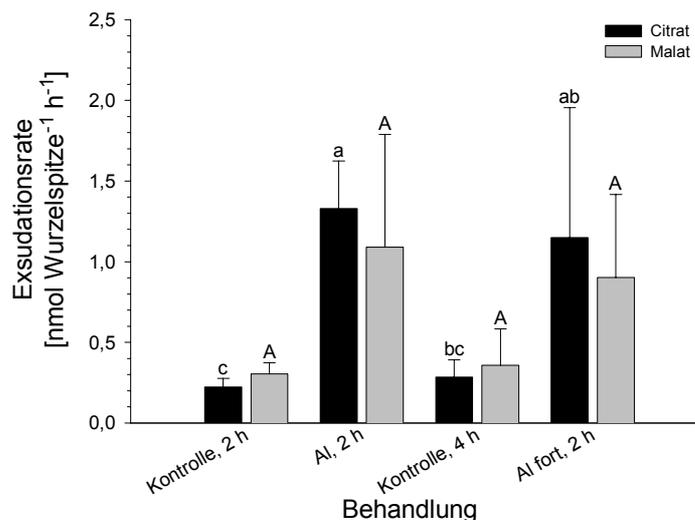


Abb. 36: Einfluss des Entfernen von Al aus dem Inkubationsmedium nach der Induktion der Exsudation. Die Wurzelspitze (10 mm) intakter Maiskeimlinge des Al-resistenten Genotyps ATP-Y wurde für 2 h in einer Lösung aus 200 μM $\text{CaCl}_2 \pm 100 \mu\text{M}$ AlCl_3 (pH 4,3) inkubiert (Kontrolle bzw. Al, 2 h). Anschließend wurden die Wurzeln aus der Inkubationslösung entfernt, in *aqua deion.* gespült und für weitere 2 h in Al-freier Inkubationslösung inkubiert (Kontrolle, 4 h bzw. Al fort, 2 h). Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Behandlungsunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test). Kleine Buchstaben = Citrat; Großbuchstaben = Malat.

3.6.5 Einfluss von Al auf die Gewebegehalte organischer Anionen

Um den Einfluss von Al auf die Gewebegehalte organischer Anionen zu untersuchen, wurden diese in 1-mm Segmenten des Primärwurzelaepex nach Behandlung der Primärwurzelspitzen intakter Keimlinge im Agarosegel für 2 h analysiert.

Die Citratgehalte lagen im Bereich zwischen 0,3 und 0,8 nmol Citrat mm⁻¹ Wurzelsegment (**Abb. 37a**). Für den Al-resistenten Genotyp ATP-Y zeigte sich in der Kontrollbehandlung ein typisches Muster der Citrat-Verteilung mit dem höchsten Gehalt im 1-2 mm Segment. Zum 0-1 mm Segment sowie zu den basaleren Segmenten hin nahmen die Gehalte ab und blieben ab dem 4. Segment konstant bzw. stiegen wieder leicht an. Durch Al-Behandlung wurden die Citrat-Gehalte im Apex nicht konsistent beeinflusst. Beim Al-sensitiven Genotyp Lixis war das Verteilungsmuster in der Kontrollbehandlung ähnlich, wenngleich nicht so stark ausgeprägt. In der Al-Behandlung kam es bei diesem Genotyp zu einer deutlichen Abnahme der Citratgehalte über den gesamten Apex.

Die *cis*-Aconitat-Gehalte lagen für ATP-Y in der Kontrollbehandlung im Bereich zwischen 0,01 und 0,10 nmol *cis*-Aconitat mm⁻¹ Wurzelsegment (**Abb. 37b**). Andeutungsweise lagen die Werte von Lixis dabei höher als von ATP-Y mit Werten bis 0,22 nmol *cis*-Aconitat mm⁻¹ Wurzelsegment. Bei beiden Genotypen stieg der Gehalt vom 0-1 mm Segment aus basalwärts an. Andeutungsweise kam es bei verhältnismäßig hoher Varianz zu einem Anstieg der Gehalte in der Al-Behandlung.

Die 2-oxo-Glutarat-Gehalte lagen mit Werten zwischen 0,2 und 0,9 nmol 2-oxo-Glutarat mm⁻¹ Wurzelsegment auf dem Niveau der Citrat-Gehalte (**Abb. 37c**). Das dort für ATP-Y beschriebene Verteilungsmuster trat hier bei beiden Genotypen und in beiden Behandlungen auf. Deutliche Behandlungseffekte gab es nicht.

Succinat stellte bei weitem den größten Anteil an der analysierten Fraktion organischer Anionen (**Abb. 37d**). Die Werte lagen zwischen 50 und 700 nmol Succinat mm⁻¹ Wurzelsegment. Es trat bei beiden Genotypen das bereits für Citrat beschriebene Verteilungsmuster auf. Andeutungsweise war der Succinat-Gehalt in der Al-Behandlung in beiden Genotypen im Bereich 0-4 mm (ATP-Y) bzw. 0-2 mm (Lixis) erhöht, wodurch eine Abgrenzung des 1-2 mm Segments gegenüber den übrigen Segmenten deutlicher wurde.

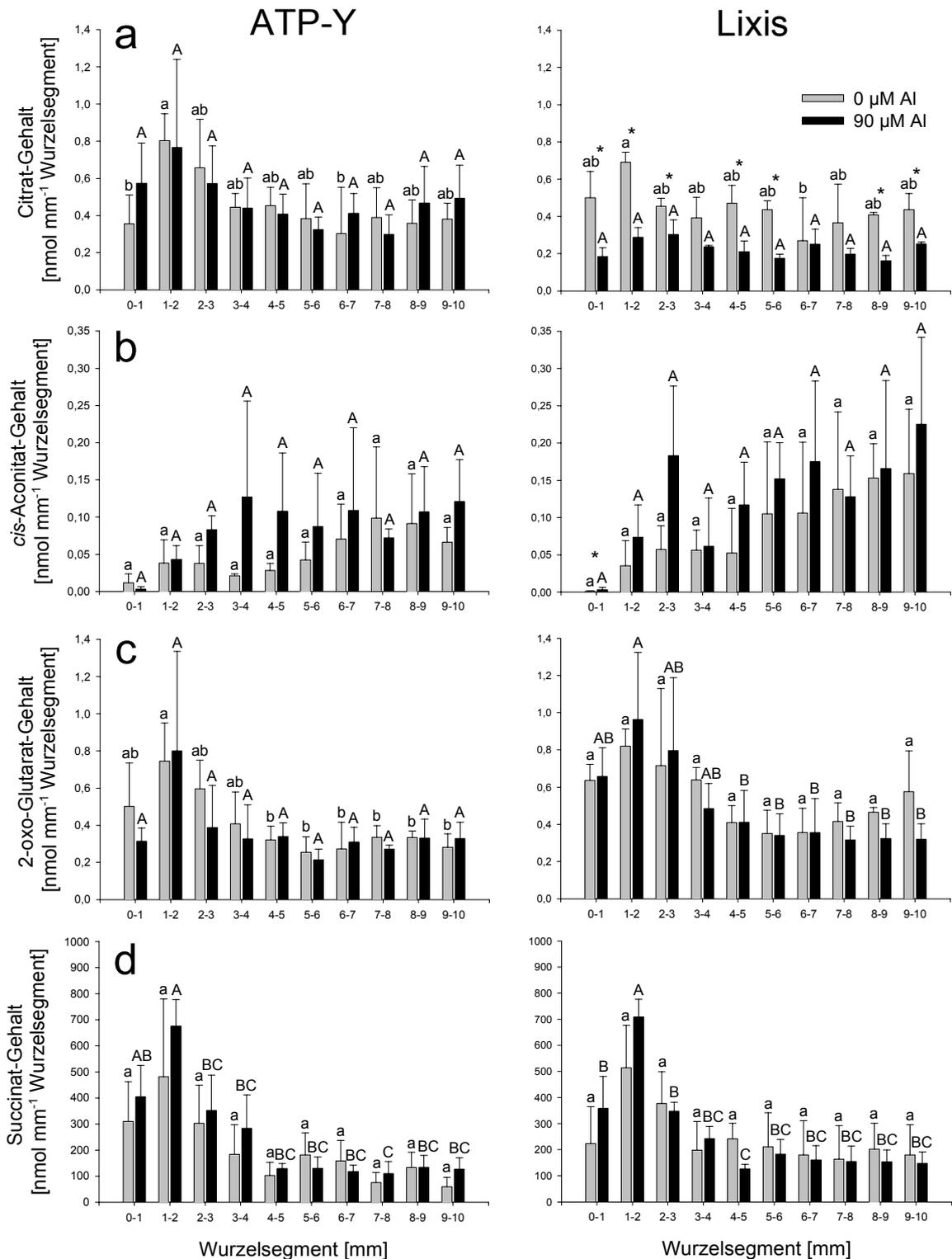


Abb. 37: Einfluss von Al auf die Gewebegehalte von Citrat (a), *cis*-Aconitat (b), 2-oxo-Glutarat (c) sowie Succinat (d) in den apikalen 10 mm der Primärwurzel. Die Behandlung erfolgte im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 $\mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$; pH 4,3) für 2 h über den gesamten Apex (3 cm) intakter Keimlinge der Genotypen ATP-Y (Al-resistent) sowie Lixis (Al-sensitiv). Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für die Kontroll- (0 $\mu\text{M Al}$), Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen. Sternchen über den Balken zeigen signifikante Behandlungsunterschiede.

Die Fumarat-Gehalte lagen zwischen 0,01 und 0,26 nmol Fumarat mm⁻¹ Wurzelsegment (**Abb. 38a**). Bei beiden Genotypen enthielt das 0-1 mm Segment die höchsten Gehalte. Diese nahmen über die folgenden 3-4 Segmente deutlich ab, um dann wieder leicht anzusteigen. Dabei lagen die Werte der Kontrollen bei Lixis im Bereich zwischen 4-10 mm über denen von ATP-Y. Ein konsistenter Al-Effekt war nicht feststellbar.

Die Malat-Gehalte lagen zwischen 0,6 und 5,0 nmol Malat mm⁻¹ Wurzelsegment (**Abb. 38b**). Das Verteilungsmuster zeigte eine grundsätzlich andere Charakteristik als für Citrat, 2-oxo-Glutarat und Succinat gezeigt. Beim Al-resistenten Genotyp ATP-Y stiegen die Gehalte in den beiden ersten Segmenten an, um dann im übrigen Bereich auf einheitlichem Niveau zu bleiben. Aluminium-Behandlung führte tendenziell zu einem leichten Anstieg der Malat-Gehalte über den gesamten Apex mit Ausnahme des 0-1 mm Segments. Beim Al-sensitiven Genotyp Lixis lagen die Malat-Gehalte der Kontrollbehandlung, mit Ausnahme des 0-1 mm Segments, unter denen von ATP-Y. Ein konsistenter Al-Effekt war nicht zu erkennen.

Im Gegensatz zu den bereits besprochenen Problemen bei der Analyse von Oxalat im Exsudat, ließ sich Oxalat im Gewebehomogenat gut bestimmen. Die Oxalat-Gehalte lagen zwischen 0,5 und 4,0 nmol Oxalat mm⁻¹ Wurzelsegment (**Abb. 38c**). Das zuvor für Citrat, 2-oxo-Glutarat und Succinat beschriebene Verteilungsmuster trat hier ebenfalls bei beiden Genotypen auf, wobei die Abgrenzung der ersten beiden Segmente gegenüber den übrigen Segmenten sowie der Anstieg in den basaleren Segmenten deutlicher waren. Ein Al-Effekt war nicht zu beobachten.

Nach Succinat stellte *trans*-Aconitat mengenmäßig das häufigste Anion dar. Die Gehalte lagen zwischen 1,5 und 27,0 nmol *trans*-Aconitat mm⁻¹ Wurzelsegment (**Abb. 38d**). Während sich das 0-1 mm Segment signifikant von den übrigen unterschied, lag der Gehalt ab dem 2. Segment auf konstantem Niveau (ATP-Y) oder stieg nach einer leichtem Abnahme bei 5 mm basalwärts wieder leicht an (Lixis). Dabei lagen die Werte für Lixis besonders in der Kontrollbehandlung über denen von ATP-Y. Ein Al-Effekt war nicht zu beobachten.

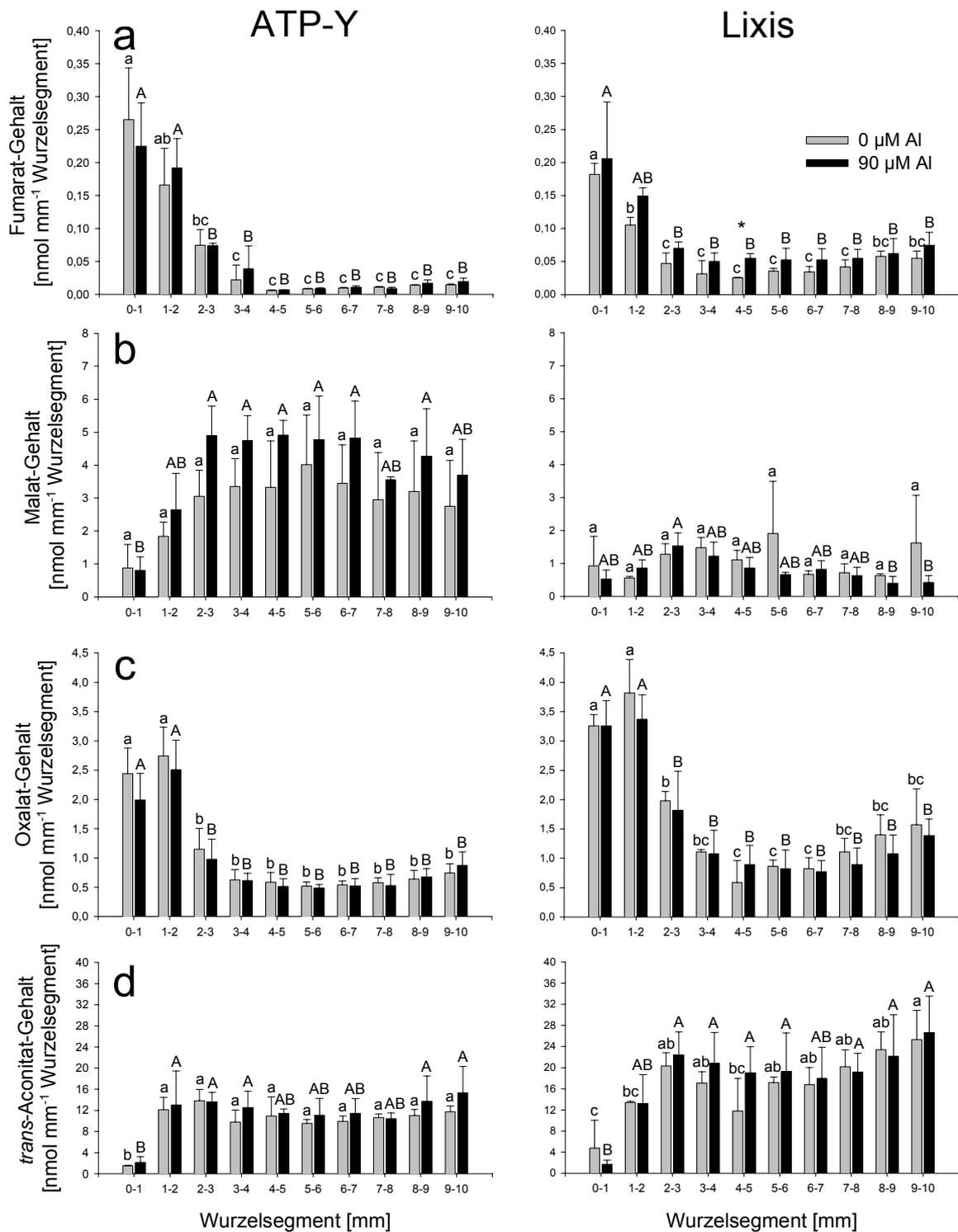


Abb. 38: Einfluss von Al auf die Gewebegehalte von Fumarat (a), Malat (b), Oxalat (c) sowie *trans*-Aconitat (d) in den apikalen 10 mm der Primärwurzel. Die Behandlung erfolgte im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) für 2 h über den gesamten Apex (3 cm) intakter Keimlinge der Genotypen ATP-Y (Al-resistent) sowie Lixis (Al-sensitiv). Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für die Kontroll- (0 μ M Al), Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen. Sternchen über den Balken zeigen signifikante Behandlungsunterschiede.

Zusammenfassend lassen sich die in dieser Arbeit bestimmten organischen Anionen bezüglich ihrer Abundanz in den apikalen 10 mm der Primärwurzel folgendermaßen aufreihen: Succinat >> *trans*-Aconitat > Malat > Oxalat > Citrat = 2-oxo-Glutarat > Fumarat = *cis*-Aconitat. Dabei waren Succinat, Oxalat, Citrat und 2-oxo-Glutarat verstärkt im 1-2 mm Segment zu finden, während Fumarat im 0-1 mm Segment am stärksten vertreten war. Malat und *cis/trans*-Aconitat traten verstärkt ab dem 2. bzw. 3. Segment auf. Deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen traten für die Malatgehalte auf. Diese lagen beim Al-sensitiven Genotyp Lixis in der Kontrollbehandlung über den gesamten 10-mm Apex deutlich unter denen des Al-resistenten Genotyps ATP-Y. Deutliche Behandlungseffekte traten bei Lixis in den Citrat-Gehalten über den gesamten 10-mm Apex auf, indem es hier zu einer Abnahme der Citrat-Gehalte in der Al-Behandlung kam.

3.6.6 Einfluss von Al auf Enzyme des Carbonsäuremetabolismus

Der Einfluss von Al auf die spezifischen Aktivitäten der Citrat-Synthase (CS), Aconitase (ACO), NADP-Isocitratdehydrogenase (ICDH), NAD-Malatdehydrogenase (MDH) sowie Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) wurde in 1-mm Wurzelsegmenten des Primärwurzelapex nach Behandlung der Wurzelspitzen intakter Keimlinge im Agarosegel untersucht. Neben den Werten für die 1-mm Segmente sind auch umgerechnete Werte für den 5-mm Wurzelapex dargestellt. Alle hier dargestellten Resultate entstammen einem Versuch.

3.6.6.1 Verteilung der Enzymaktivitäten entlang des Wurzelapex

Deutlich fällt auf, dass die Aktivitäten der CS, ICDH, MDH sowie PEPC ihr signifikantes Maximum in der 1-2 mm Zone hatten (**Abb. 39**). Das Verteilungsmuster stand in Übereinstimmung mit denen der Callosebildung (Abschnitt 3.2), der Al-Akkumulation (Abschnitt 3.3.1), der Verteilung von Mg und P (Abschnitt 3.3.2) sowie Citrat, 2-oxo-Glutarat, Succinat, Fumarat und Oxalat (Abschnitt 3.6.5).

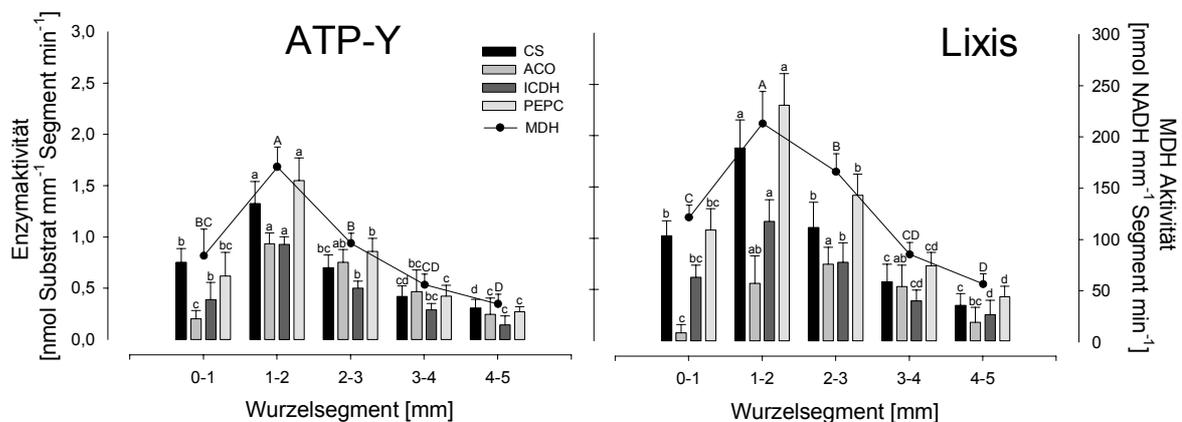


Abb. 39: Verteilung der Aktivitäten der CS, ACO, ICDH, MDH und PEPC entlang des Primärwurzelapex. Die Behandlung erfolgte über den gesamten Wurzelapex (3 cm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung ohne Al; pH 4,3) für 2 h. Werte sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede für jedes Enzym getrennt ($p < 0,05$; Tukey Test).

Während die Enzymaktivitäten der CS, ACO, ICDH sowie PEPC in der gleichen Größenordnung zwischen 0,1 und 2,5 nmol Substrat mm^{-1} Segment min^{-1} lagen, war die MDH-Aktivität um den Faktor 100 höher. Tendenziell lagen die Werte des Al-sensitiven über denen des Al-resistenten Genotyps.

3.6.6.2 Einfluss von AI auf die spezifischen Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität der CS wies deutliche Unterschiede zwischen den apikalen Wurzelsegmenten auf (**Abb. 40a**). Sie war in beiden Genotypen im 0-1 mm Segment am höchsten (42 bzw. 52 nmol Acetyl-CoA mg⁻¹ Protein min⁻¹ für ATP-Y bzw. Lixis) und nahm dann kontinuierlich basalwärts auf unter 10 nmol Acetyl-CoA mg⁻¹ Protein min⁻¹ ab. In der AI-Behandlung war die spezifische Aktivität beim AI-resistenten Genotyp ATP-Y tendenziell in allen Segmenten gegenüber der Kontrollbehandlung erhöht. Nach Umrechnung auf den 5-mm Wurzelapex lag die spezifische Aktivität in der Kontrollbehandlung für ATP-Y bei 23 nmol Acetyl-CoA mg⁻¹ Protein min⁻¹, für Lixis signifikant höher bei 27 nmol Acetyl-CoA mg⁻¹ Protein min⁻¹ (**Abb. 41a**). Andeutungsweise war die spezifische Aktivität in der AI-Behandlung erhöht (ATP-Y) oder erniedrigt (Lixis).

Die höchste spezifische Aktivität der ACO lag im Bereich 1-3 mm (ATP-Y, 24 nmol *cis*-Aconitat mg⁻¹ Protein min⁻¹) bzw. im 2-3 mm Segment (Lixis, 17 nmol *cis*-Aconitat mg⁻¹ Protein min⁻¹) vor (**Abb. 40b**). Sowohl apikal- als auch basalwärts nahm die spezifische Aktivität bis auf etwa 4 nmol *cis*-Aconitat mg⁻¹ Protein min⁻¹ ab. Während ein AI-Effekt bei ATP-Y nicht auftrat, stieg die spezifische Aktivität in den ersten 3 mm bei Lixis an; signifikant im 0-1 mm Segment (von 3,5 auf 17 nmol *cis*-Aconitat mg⁻¹ Protein min⁻¹). Bezogen auf den 5-mm Wurzelapex (**Abb. 41b**) lagen die Werte in der Kontrollbehandlung um 16 bzw. 11 nmol *cis*-Aconitat mg⁻¹ Protein min⁻¹ (ATP-Y bzw. Lixis). Während bei ATP-Y kein Behandlungseffekt auftrat, nahm die spezifische Aktivität bei Lixis tendenziell zu.

Die höchste spezifische Aktivität der ICDH lag in der Kontrollbehandlung in den ersten beiden Segmenten mit Raten von 22 nmol Isocitrat mg⁻¹ Protein min⁻¹ (ATP-Y) bzw. dem 0-1 mm Segment mit 30 nmol Isocitrat mg⁻¹ Protein min⁻¹ (Lixis) vor (**Abb. 40c**). Die spezifische Aktivität sank dann sukzessive basalwärts auf Werte um 5 nmol Isocitrat mg⁻¹ Protein min⁻¹. Während bei Lixis kein AI-Effekt auftrat, kam es bei ATP-Y über den gesamten Bereich zu einem tendenziellen Anstieg der spezifischen ICDH Aktivität. Bei Darstellung der Werte für den 5-mm Wurzelapex (**Abb. 41c**) bestätigte sich diese Tendenz. Dabei lagen die Werte zwischen 15 und 20 nmol Isocitrat mg⁻¹ Protein min⁻¹.

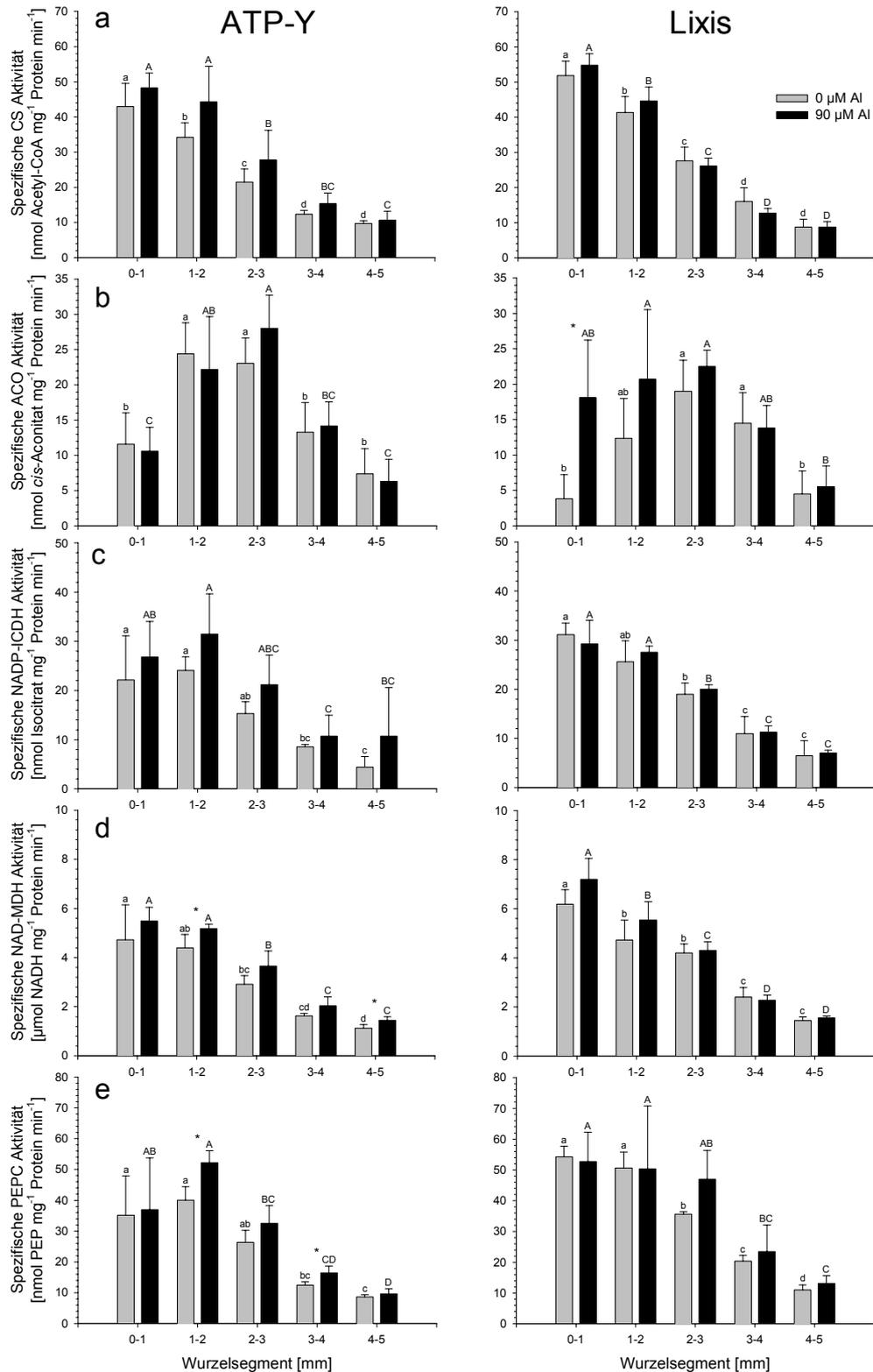


Abb. 40: Einfluss von Al auf die spezifischen Aktivitäten der CS (a), ACO (b), ICDH (c), MDH (d) sowie PEPC (e) in apikalen 1-mm Segmenten der Primärwurzel. Die Behandlung erfolgte über den gesamten Wurzelapex (3 cm) intakter Keimlinge der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung \pm 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) für 2 h. Werte sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Wiederholungen \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Zonenunterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben für die Kontroll- (0 μ M Al), Großbuchstaben für die Al-Behandlung stehen. Sternchen über den Balken zeigen signifikante Behandlungsunterschiede.

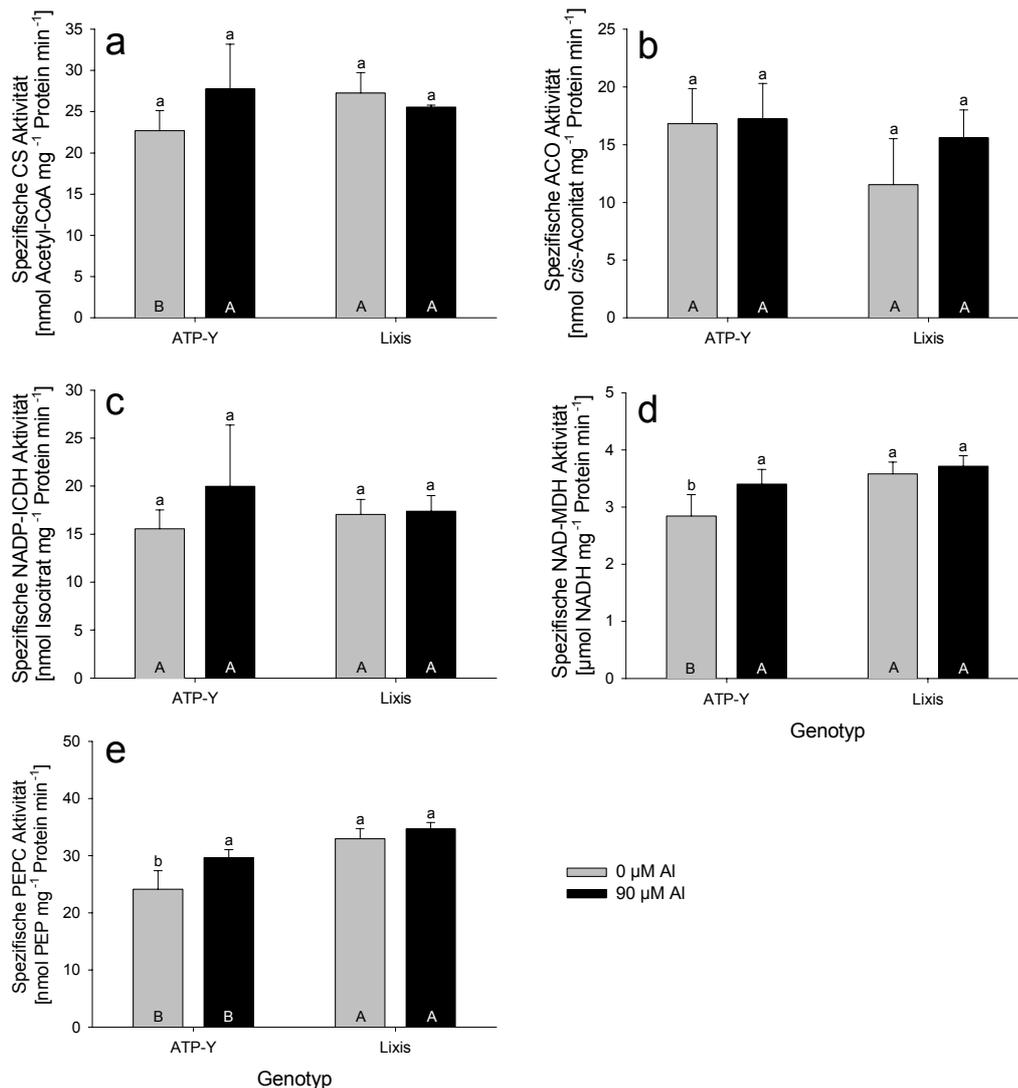


Abb. 41: Einfluss von Al auf die spezifischen Aktivitäten der CS (a), ACO (b), ICDH (c), MDH (d) sowie PEPC (e) im 5-mm Primärwurzelaepex. Werte sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Wiederholungen \pm SD und wurden aus den in **Abb. 40** gezeigten Daten errechnet. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Test), wobei kleine Buchstaben Behandlungseffekte für die Genotypen getrennt anzeigen, während Großbuchstaben in den Balken genotypische Unterschiede in der jeweiligen Behandlung angeben. ATP-Y = Al-resistent; Lixis = Al-sensitiv.

Die spezifische Aktivität der MDH war in den ersten beiden Segmenten (ATP-Y, 4-5 $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}$ Protein min^{-1}) bzw. dem ersten Segment (Lixis, 6 $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}$ Protein min^{-1}) am höchsten und sank dann sukzessive basalwärts auf Werte um 1 $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}$ Protein min^{-1} (**Abb. 40d**). Durch Al-Behandlung kam es zu einem tendenziellen Anstieg in allen Segmenten des Al-resistenten Genotyps ATP-Y, darunter signifikant in den Segmenten 1-2 und 4-5 mm. Dieser Eindruck bestätigte sich bei Umrechnung der spezifischen Aktivität auf den 5-mm Wurzelaepex (**Abb. 41d**). Hier lag die spezifische Aktivität in der Kontrollbehandlung von Lixis mit 3,5 μmol

NADH mg^{-1} Protein min^{-1} signifikant über der von ATP-Y ($3 \mu\text{mol NADH mg}^{-1}$ Protein min^{-1}). In der AI-Behandlung war die spezifische Aktivität von Genotyp ATP-Y signifikant gegenüber der in der Kontrollbehandlung gesteigert.

Bei beiden Genotypen war die spezifische Aktivität der PEPC in den ersten beiden Segmenten höher als in den übrigen Segmenten (**Abb. 40e**). Die Werte lagen zwischen 25 und 54 nmol PEP mg^{-1} Protein min^{-1} in den apikalen 3 und zwischen 10 und 20 nmol PEP mg^{-1} Protein min^{-1} in den folgenden 2 Segmenten. Bei Genotyp ATP-Y war die Aktivität im 1-2 und 3-4 mm Segment in der AI-Behandlung signifikant erhöht. Dieser Effekt trat nach Umrechnung der Werte auf den 5-mm Wurzelapex ebenfalls deutlich hervor (**Abb. 41e**). Die spezifische Aktivität lag dann zwischen 24 und 34 nmol PEP mg^{-1} Protein min^{-1} , wobei die Werte von Genotyp Lixis unabhängig von der Behandlung signifikant über denen von ATP-Y lagen.

3.7 Einfluss von Al auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran von Wurzelrindenprotoplasten

3.7.1 Charakterisierung eines Al-aktivierten Anionenkanals

Um die zellulären Mechanismen der Exsudation organischer Anionen aus dem Primärwurzelapex zu untersuchen, wurde die Ganzzell Konfiguration der Patch-clamp Technik auf Wurzelprotoplasten angewandt. Aus den beiden untersuchten Maisgenotypen wurden Protoplasten aus den Zonen im Abstand 1-2 mm sowie 3-5 mm (EZ) von der Wurzelspitze isoliert. Das eigens hierzu entwickelte Isolationsverfahren erzielte eine hohe Selektivität für die Gewinnung von Protoplasten aus Zellen der Wurzelrinde. Protoplasten mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $25,14 \pm 1,76 \mu\text{m}$ ($n = 148$) aus der 1-2 mm Zone sowie $52,74 \pm 5,46 \mu\text{m}$ ($n = 114$) aus der EZ wurden für die Patch-clamp Experimente selektiert.

3.7.1.1 Aluminium-induzierte Einwärtsströme

Um die Anionenkanäle vor einem möglichen Hintergrund von Kaliumströmen besser auflösen zu können, wurden Elektrolytlösungen mit Tetraethylammonium (TEA) und Chlorid verwendet. TEA eliminiert als Kaliumkanal-Inhibitor ein- und auswärts gerichtete Kaliumströme (BLATT und GRADMANN, 1997). Ausgehend von einem Haltepotential bei -52 mV wurden nacheinander 2 s dauernde Spannungspulse von -132 bis +88 mV in 20 mV Schritten appliziert (Standard Einfachspannungspulsprotokoll; **Abb. 2**). Unter Bedingungen von 20 mM TEACl im Bad und 100 mM TEACl in der Pipette wurden bei Abwesenheit von Al sowohl in der Vorbehandlung als auch in der Badlösung in Protoplasten aus beiden Wurzelzonen und für beide Genotypen nur sehr geringe Hintergrundströme detektiert (**Abb. 42a&b**). In Protoplasten aus der Elongationszone waren auch nach Vorbehandlung ($90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$ im Agarosegel, 1 h) der Wurzelspitzen vor der Protoplastenisolation keine Al-induzierten ein- oder auswärtsgerichteten Ströme detektierbar. Demgegenüber konnten in Protoplasten aus der 1-2 mm Zone nach 1 h Al-Vorbehandlung vor der Protoplastenisolation makroskopische Einwärtsströme gemessen werden (**Abb. 42c&d**). Als Antwort auf die Hyperpolarisation der Plasmamembran traten diese Ströme ohne Verzögerung auf. Auf den makroskopischen Strömen konnten in der Ganzzellkonfiguration Einzelkanalfuktuationen aufgelöst werden. Nach Depolarisation der Plasmamembran traten auch langsam aktivierende Auswärtsströme auf. Die zugehörigen

repräsentativen Strom/Spannungskennlinien aus dem „steady-state“ sind in **Abb. 42e** dargestellt. Die Umkehrpotentiale der Al-induzierten Einwärtsströme lagen bei beiden Genotypen beim Nernstpotential für Chlorid.

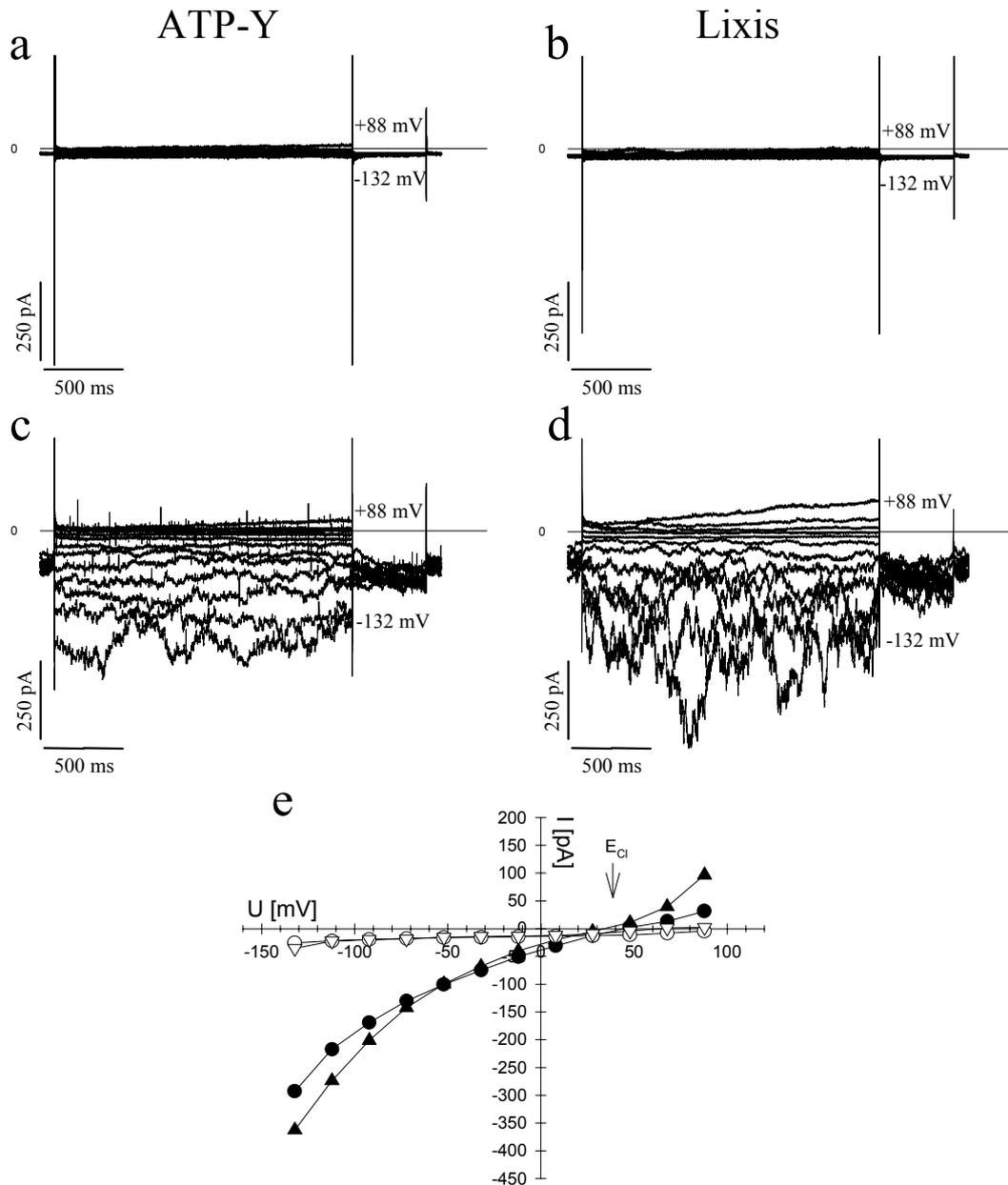


Abb. 42: Aluminium-induzierte Ganzzell-Einwärtsströme in der Plasmamembran von aus der 1-2 mm Zone isolierten corticalen Protoplasten. Von einem Haltepotential von -52 mV wurden in einem Einfachspannungspulsprotokoll 2 s Spannungspulse von -132 zu +88 mV in 20 mV Sprüngen angelegt. Vor der Protoplastenisolation wurden Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge für 1 h in Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung; pH 4,3) mit 0 μM Al_{MONO} (a, b) oder 90 μM Al_{MONO} (c, d) inkubiert. (a, c) ATP,Y; Al-resistent. (b, d) Lixis; Al-sensitiv. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM TEACl, 2 mM MgCl₂, 2 mM MgATP, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2), die Badlösung 20 mM TEACl, 1 mM CaCl₂, 50 μM AlCl₃, 5 mM MES/Tris (pH 4,3). (e) Repräsentative Strom/Spannungs-Kennlinien der Al-induzierten Einwärtsströme im „steady state“. Der Pfeil zeigt das Nernst-Potential für Cl⁻ an (39 mV). Kreise = ATP-Y; Dreiecke = Lixis. Weiße Symbole = Kontrollbehandlung; schwarze Symbole = Al-Behandlung.

Die makroskopischen Einwärtsströme traten nach Al Vorbehandlung in 8 von 10 Protoplasten aus der 1-2 mm Zone des Al-resistenten Genotyps ATP-Y sowie in 3 von 9 des Al-sensitiven Genotyps Lixis auf (**Abb. 43a**). Die durchschnittliche Stromamplitude lag bei -132 mV bei 282 ± 77 pA (ATP-Y, $n = 8$) bzw. 338 ± 71 pA (Lixis, $n = 3$). Das Entfernen von Al aus der Badlösung führte innerhalb von 10 min zu keiner Veränderung der Ströme, was in Übereinstimmung mit den Exsudationsexperimenten an intakten Pflanzen steht (siehe **Abb. 36**).

Kamen die Protoplasten ohne vorherige Al-Behandlung der intakten Wurzelspitzen mit Al in der Badlösung in Kontakt, so traten mit den zuvor beschriebenen Einwärtsströmen identische Ströme nach einer Verzögerungszeit von 7-10 min nur bei aus ATP-Y isolierten Protoplasten auf (3 von 9; 0 von 5 für Lixis; **Abb. 43b**).

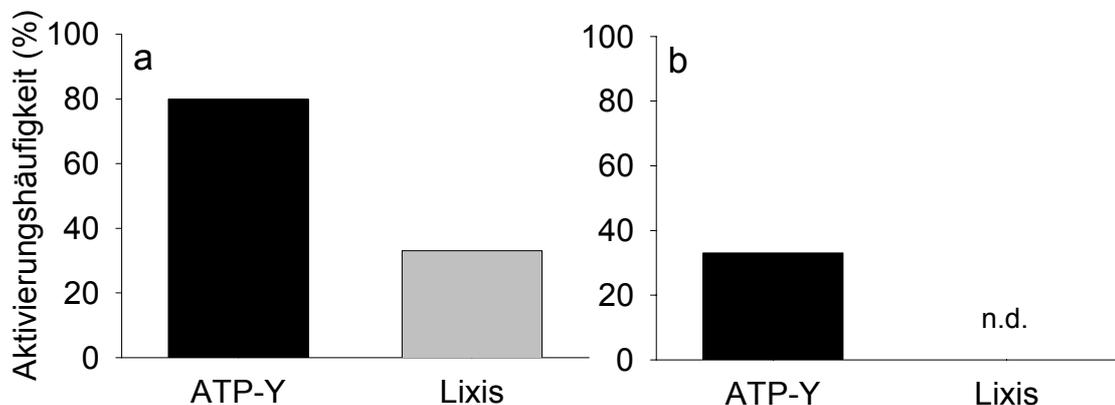


Abb. 43: Einfluss von Al auf die Aktivierungshäufigkeit des Anionenkanals. (a) Vergleich der prozentualen Aktivierungshäufigkeit der Maisgenotypen ATP-Y (Al-resistent) und Lixis (Al-sensitiv) nach Vorbehandlung intakter Wurzelspitzen mit Al vor der Protoplastenisolation bzw. (b) ohne den Vorbehandlungsschritt. n.d. = nicht detektierbar.

Während keine genotypischen Unterschiede in der Amplitude der maximalen Ströme bestanden, war der Unterschied in der Häufigkeit der Kanalaktivierung zwischen beiden Genotypen signifikant. Dabei wurde für die Berechnung des p-Wertes mittels Fisher's exaktem Test über die Form der Al-Behandlung (mit und ohne Vorbehandlung) gepoolt (Einseitiger $p = 0,036$; zweiseitiger $p = 0,058$). Dies war möglich, da das elektrophysiologische Verhalten der Protoplastenmembranen beider Genotypen nach erfolgter Kanalaktivierung identisch war.

Um zu überprüfen, ob die Verzögerung in der Kanalaktivierung bzw. deren geringere Häufigkeit bei der direkten Al-Behandlung auf die für eine *de novo* Synthese des Kanalproteins nötige Zeitdauer zurückzuführen ist, wurden Wurzeln für 45 min vor und während der Al-Behandlung (1 h) in $100 \mu\text{M}$ des Proteinbiosyntheseinhibitors Cyclo-

heximid (3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-Hydroxyethyl] Glutarimid) inkubiert. Durch diese Behandlung nahm die Anzahl vitaler Protoplasten dramatisch ab. Allerdings blieben die Aktivierungshäufigkeit (4 von 5 Protoplasten für ATP-Y; nicht gezeigt) als auch die Kanalamplitude unbeeinflusst, was zeigt, dass die für die Aktivierung notwendigen Voraussetzungen nicht von der Proteinbiosynthese abhängig sind. Die Spezifität der Kanalaktivierung für Al wurde getestet, indem Al bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen durch gleiche Konzentrationen an La ersetzt wurde. Weder durch Vorbehandlung noch durch direkte La-Applikation ließen sich Ströme aktivieren (n = 6; nicht gezeigt; siehe auch Abschnitt 3.6.3). Nach der Al-Aktivierung war La nicht in der Lage, hemmend zu wirken (n = 2; nicht gezeigt).

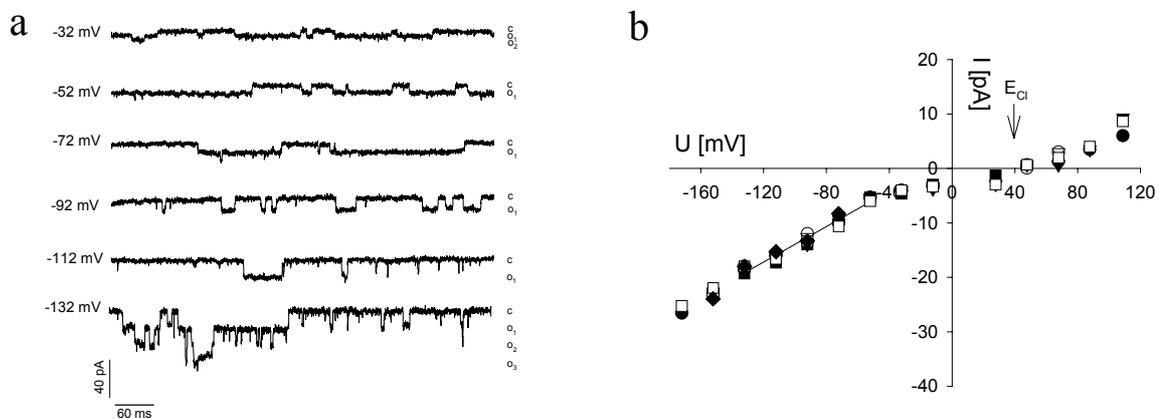


Abb. 44: Spannungsabhängige Einzelkanalströme über die Plasmamembran corticaler Protoplasten aus der 1-2 mm Zone in der Ganzzellkonfiguration. Die Aktivierung erfolgte durch 1 h Vorinkubation von Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + 90 μM Al_{MONO} ; pH 4,3) vor der Protoplastenisolation. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM TEACl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2), die Badlösung 20 mM TEACl, 1 mM CaCl_2 , 50 μM AlCl_3 , 5 mM MES/Tris (pH 4,3). (a) „Steady-state“ Kanalfluktuationen zwischen -132 und -32 mV. o_i zeigt die Offenzustände, während c den Geschlossenzustand anzeigt. (b) Die dazugehörigen Strom/Spannungskennlinien unter Standardbedingungen (n = 7). Eingezeichnet ist die lineare Beziehung der Einwärtsströme im Bereich zwischen -132 und -52 mV. Die spannungsabhängige Rektifizierung der Strom/Spannungskurve hat ihr Umkehrpotential nahe dem Nernst Potential für Chlorid (Pfeil; 39 mV).

Die Einzelkanalfluktuationen, die auf den makroskopischen Strömen detektierbar waren, wurden im steady-state in der Ganzzellkonfiguration analysiert. Repräsentative Originalspuren (-132 bis -32 mV) zeigen das Schaltverhalten der Einzelkanäle (**Abb. 44a**). Die jeweiligen Strom/Spannungskennlinien kehrten nahe beim Nernst Potential für Chlorid um (**Abb. 44b**). Die Einzelkanalleitfähigkeit lag bei 144 ± 10 pS (im linearen Bereich zwischen -132 und -52 mV; n = 7). Demgemäß sind etwa 15

Anionenkanäle in der Plasmamembran an der Generierung der beschriebenen Al-induzierten Ströme beteiligt.

3.7.1.2 Chlorid-Abhängigkeit der Einwärtsströme

Um abzuklären, ob die gemessenen Einwärtsströme tatsächlich von Anionen (in diesem Fall Chlorid) getragen sind, wurde das Verhältnis von interner zu externer Chloridkonzentration verändert, was zur Folge hat, dass das Umkehrpotential nach Nernst sich entlang der Abszisse verschiebt.

Von einem Haltepotential bei -52 mV wurde das Membranpotential nach -132 mV gepulst. Es folgte eine kontinuierliche Spannungsrampe bis +88 mV (2 s). Während die Amplitude der Einwärtsströme nur leicht beeinflusst wurde, erhöhte sich die Amplitude der Auswärtsströme mit zunehmender externer Chlorid-Konzentration (**Abb. 45a**).

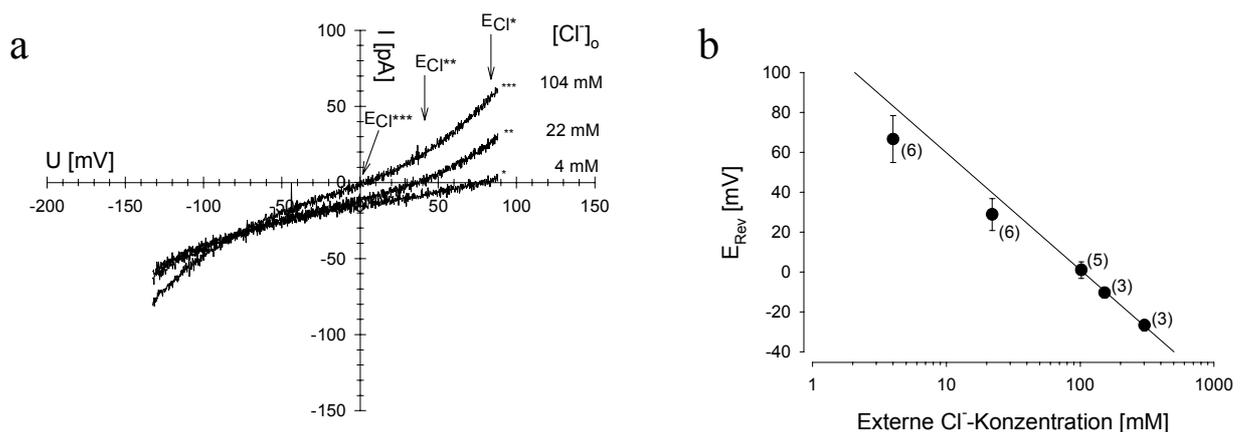


Abb. 45: Chloridabhängigkeit des Umkehrpotentials. Die Aktivierung der Ströme erfolgte durch 1 h Vorinkubation von Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge im Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + 90 μM Al_{MONO} ; pH 4,3) vor der Protoplastenisolation aus der 1-2 mm Zone. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM TEACl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2). Die Badlösung enthielt neben 1 mM CaCl_2 , 50 μM AlCl_3 , 5 mM MES/Tris (pH 4,3) 2, 20, 102, 150 oder 300 mM TEACl. (a) Ströme als Antwort auf kontinuierliche 2 s Spannungsrampen von -132 bis +88 mV. Die berechneten Nernst-Potentiale für die jeweiligen Verhältnisse zwischen cytosolischer und externer Chloridkonzentration sind mit Pfeilen dargestellt. (b) Nernst-Verhalten der Umkehrspannungen in Cl^- -haltigen Lösungen. Die Umkehrspannungen sind als Funktion der extrazellulären Cl^- Konzentration dargestellt und wurden mittels Einfachspannungspulsprotokollen oder 2000 bzw. 200 ms Spannungsrampen ermittelt. In Klammern die Wiederholungszahl für das jeweilige Cl^- Innen: Außen Verhältnis. Die Linie gibt das theoretische Nernst-Verhalten an. Die Nernst-Potentiale für Cl^- liegen bei einer Aussenkonzentration von 4, 22, 104, 152 oder 302 mM bei 82, 39, 0, -10 bzw. -27 mV.

Wurde die interne Cl^- -Konzentration von 104 auf 64 mM abgesenkt, so nahm die Leitfähigkeit des Kanals um 20 ± 5 % ab (n=3). Wurde die interne Cl^- -Konzentration

konstant bei 104 mM gehalten während die externe zwischen 4 und 302 mM verändert wurde, so kam es in Übereinstimmung mit dem Nernstpotential zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials von etwa 58 mV pro 10-facher Konzentrationsänderung (**Abb. 45b**), was die Bedeutung von Chlorid als Hauptladungsträger des Stromes widerspiegelt. Eine Abnahme der externen Cl⁻-Konzentration von 22 auf 4 mM resultierte in einer Verschiebung des Umkehrpotentials von 28 ± 7 mV ($n = 6$) auf 67 ± 11 ($n = 6$), während die Erhöhung auf 104 mM das Umkehrpotential nach 1 ± 3 mV ($n = 5$) verschob. Wurde die externe Cl⁻-Konzentration auf 152 bzw. 302 mM erhöht, so lag das Umkehrpotential bei -10 ± 2 mV ($n = 3$) bzw. -27 ± 2 mV.

3.7.1.3 Einfluss von Anionenkanalinhibitoren

Die Substanzen Nifluminsäure (2-(3-[Trifluoromethyl]anilino)Nicotinsäure) und DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonsäure) sind in der Lage, Anionenkanäle zu inhibieren. Diese pharmakologische Eigenschaft dient als weitere Überprüfung, inwiefern die gemessenen AI-induzierten Einwärtsströme durch Anionen getragen werden.

Hier bestätigten sich die bereits in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen an intakten Pflanzen gewonnenen Ergebnisse. Die makroskopischen Ströme wurden durch Nifluminsäure (100 μ M) innerhalb von 30 s zu 90 ± 5 % ($n = 12$) inhibiert (**Abb. 46a**). Die Einzelkanalleitfähigkeit war sofort blockiert ($n = 8$; **Abb. 46b**). Applikation von 100 μ M DIDS führte zu einer 60 ± 5 % ($n = 6$) Inhibierung der Ströme bei -132 mV (**Abb. 46a**). Die Einzelkanalleitfähigkeit nahm dementsprechend ebenfalls ab (**Abb. 46b**).

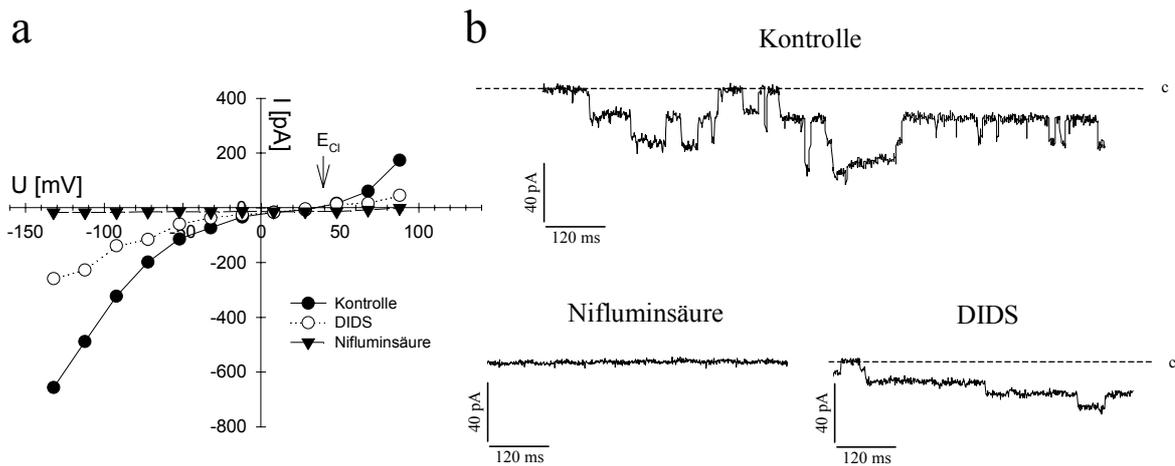


Abb. 46: Einfluss von Anionenkanal-Inhibitoren auf die Al-aktivierten makroskopischen Ströme sowie Einzelkanal-Amplituden. Von einem Haltepotential von -52 mV wurden in einem Einfachspannungspulsprotokoll 2 s Spannungspulse von -132 zu $+88$ mV in 20 mV Sprüngen angelegt. Vor der Protoplastenisolation aus der 1-2 mm Zone wurden Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge für 1 h in Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + $90 \mu\text{M Al}_{\text{MONO}}$, pH 4,3) inkubiert. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM TEACl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM MgATP, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2), die Badlösung 20 mM TEACl, 1 mM CaCl_2 , $50 \mu\text{M AlCl}_3$, 5 mM MES/Tris (pH 4,3). (a) „Steady-state“ Strom/Spannungskennlinien des Al-aktivierten Anionenkanals vor (Kontrolle) und nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DIDS oder Nifluminsäure. Der Pfeil zeigt das Nernst-Potential für Cl^- an (39 mV). (b) Repräsentative „steady-state“ Einzelkanalfluktuationen in der Ganzzellkonfiguration bei -132 mV in der Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Nifluminsäure oder DIDS an zwei unterschiedlichen Protoplasten.

3.7.1.4 Permeabilität des Anionenkanals für Malat und Citrat

Eine wichtige Voraussetzung für die Beteiligung des beschriebenen Anionenkanals an der Detoxifikation von Al ist seine Permeabilität für organische Anionen, die in der Lage sind, Al zu komplexieren. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur selektiven Permeabilität von Malat und Citrat gegenüber Chlorid durchgeführt. Hierzu wurde das cytosolische Chlorid (Pipettenlösung) durch Malat bzw. Citrat ersetzt. Da hohe Malat- und Citratkonzentrationen sich als letal für die Protoplasten erwiesen, wurde die Standardchloridkonzentration in diesen Experimenten von 104 auf 64 mM abgesenkt. Im Folgenden wurden dann 60 mM TEACl durch 60 mM TEA_2 -Malat bzw. 60 mM TEA_3 -Citrat ersetzt.

In Malat- und Citrat-haltigen Pipettenlösungen ähnelten Spannungsabhängigkeit sowie die Kinetik der Ein- und Auswärtsströme denen der Chlorid-haltigen (**Abb. 47a**). Die Amplitude der makroskopischen Ströme bei -132 mV war von 243 ± 24 pA für Chlorid ($n = 3$) auf 68 ± 15 pA für Malat ($n = 3$) und 52 ± 10 pA für Citrat ($n = 3$) reduziert. In Übereinstimmung mit den makroskopischen Strömen wurden die Einzelkanalleitfähigkeiten (so auflösbar) ebenfalls reduziert, wie anhand repräsentativer Spuren in **Abb. 47b** demonstriert wird. Aus den Strom/Spannungsbeziehungen

(Abb. 47c) ergaben sich im linearen Bereich zwischen -132 und -32 mV Einzelkanalleitfähigkeiten von 118 ± 4 pS für Chlorid ($n = 3$), 34 ± 4 pS für Malat ($n = 3$) sowie 21 pS für Citrat ($n = 2$).

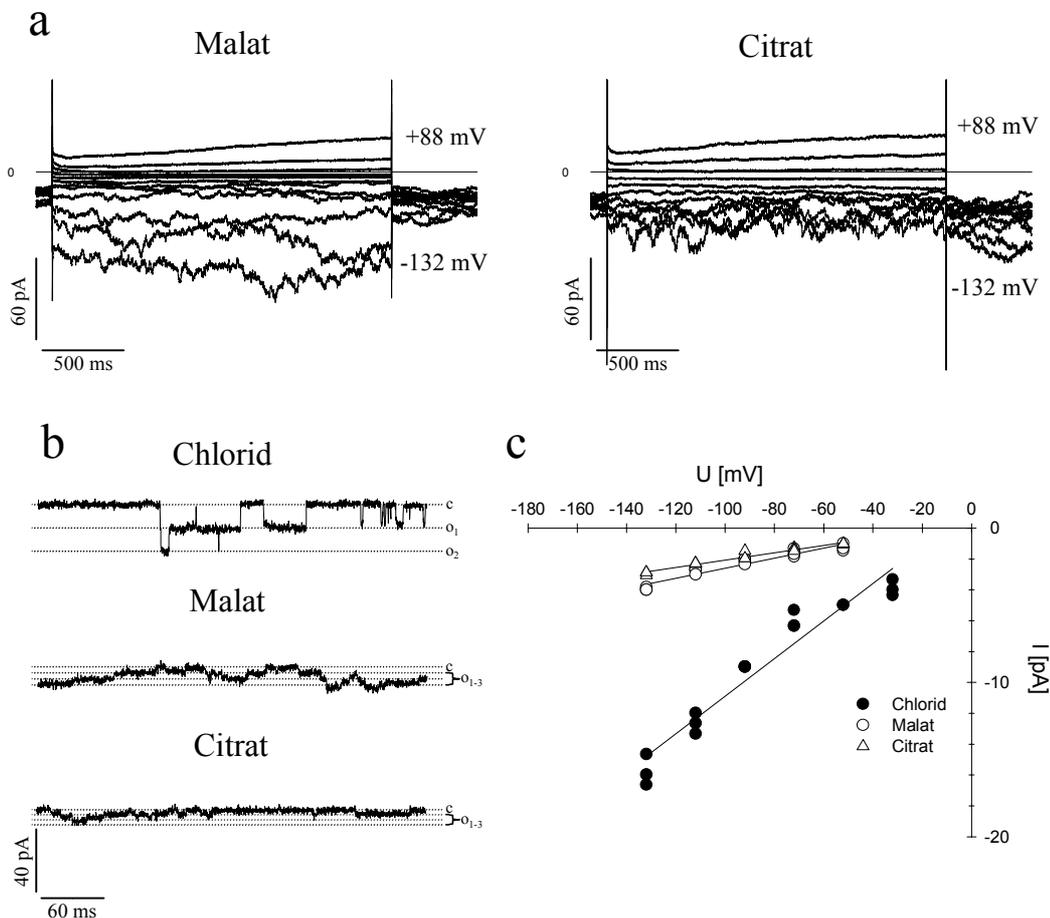


Abb. 47: Permeabilität des Al-aktivierten Anionenkanals für Malat und Citrat. Vor der Protoplastenisolation aus der 1-2 mm Zone wurden Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge des Al-resistenten Genotyps ATP-Y für 1 h in Agarosegel (0,6 % (w/v) mit Nährlösung + 90 μ M Al_{MONO}; pH 4,3) inkubiert. Die Pipettenlösung enthielt 2 mM MgCl₂, 2 mM MgATP, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2) unter Zusatz von 60 mM TEACl, 60 mM TEA₂-Malat oder 60 mM TEA₃-Citrat. Die Badlösung enthielt 60 mM TEACl, 1 mM CaCl₂, 5 mM MES/Tris (pH 4,3). (a) Anionenströme wurden gemessen als Antwort auf 2 s Spannungspulse von -132 zu +88 mV in 20 mV Sprüngen von einem Haltepotential von -52 mV. (b) „Steady-state“ Einzelkanal-Aktivitäten in der Ganzzellkonfiguration bei -132 mV. c = Geschlossenenzustand; o_i = Offenzustände des Kanals. (c) Strom/Spannungsbeziehung der Einzelkanalleitfähigkeiten bei unterschiedlichen Spannungen (-132 bis -32 mV) unter Bedingungen von 60 mM TEACl im Bad und 60 mM TEACl, 60 mM TEA₂-Malat oder 60 mM TEA₃-Citrat in der Pipettenlösung. Linien stellen lineare Beziehungen der Daten aus $n = 3$ (Chlorid und Malat) oder 2 (Citrat) dar.

Die relativen Permeabilitäten dieser organischen Anionen gegenüber Chlorid, berechnet aus den Umkehrpotentialen der makroskopischen Ströme nach FATT UND GINSBORG (1958), betragen $P_{\text{Malat}}/P_{\text{Chlorid}} = 0,25 \pm 0,03$ ($n = 3$) und $P_{\text{Citrat}}/P_{\text{Chlorid}} = 0,18 \pm 0,07$ ($n = 3$). Damit zeigt sich, dass der beschriebene Anionenkanal permeabel ist für Chlorid, Malat und Citrat.

3.7.2 Einfluss von Al auf K⁺-Kanäle

Die Plasmamembran corticaler Protoplasten aus der 1-2 mm Zone wurde hinsichtlich ihrer Ausstattung mit K⁺-Kanälen und deren Empfindlichkeit gegenüber Al untersucht. Die hierzu verwendeten Protoplasten wurden aus der 1-2 mm Zone nicht mit Al vorbehandelter Wurzeln des Al-resistenten Genotyps ATP-Y isoliert. Die Patch-Lösungen enthielten 150 mM K-Gluconat in der Pipette und 50 mM K-Gluconat im Bad.

Von einem Haltepotential bei -63 mV wurden 2 s Spannungspulse von -143 bis +177 mV an die Membran appliziert. Als Antwort auf diese hyperpolarisierenden und depolarisierenden Pulse wurden zeitabhängige aus- (**Abb. 48a&b**) und einwärtsrektifizierende K⁺-Ströme (**Abb. 48c&d**) aufgezeichnet. Während der Auswärtsgleichrichter bei Al-Konzentrationen von bis zu 300 µM (= 192 µM Al_{MONO}) unempfindlich reagierte (n = 3), wurde der Einwärtsgleichrichter innerhalb von 5 min zu 70 ± 12 % (bei -143 mV) gehemmt (n = 3).

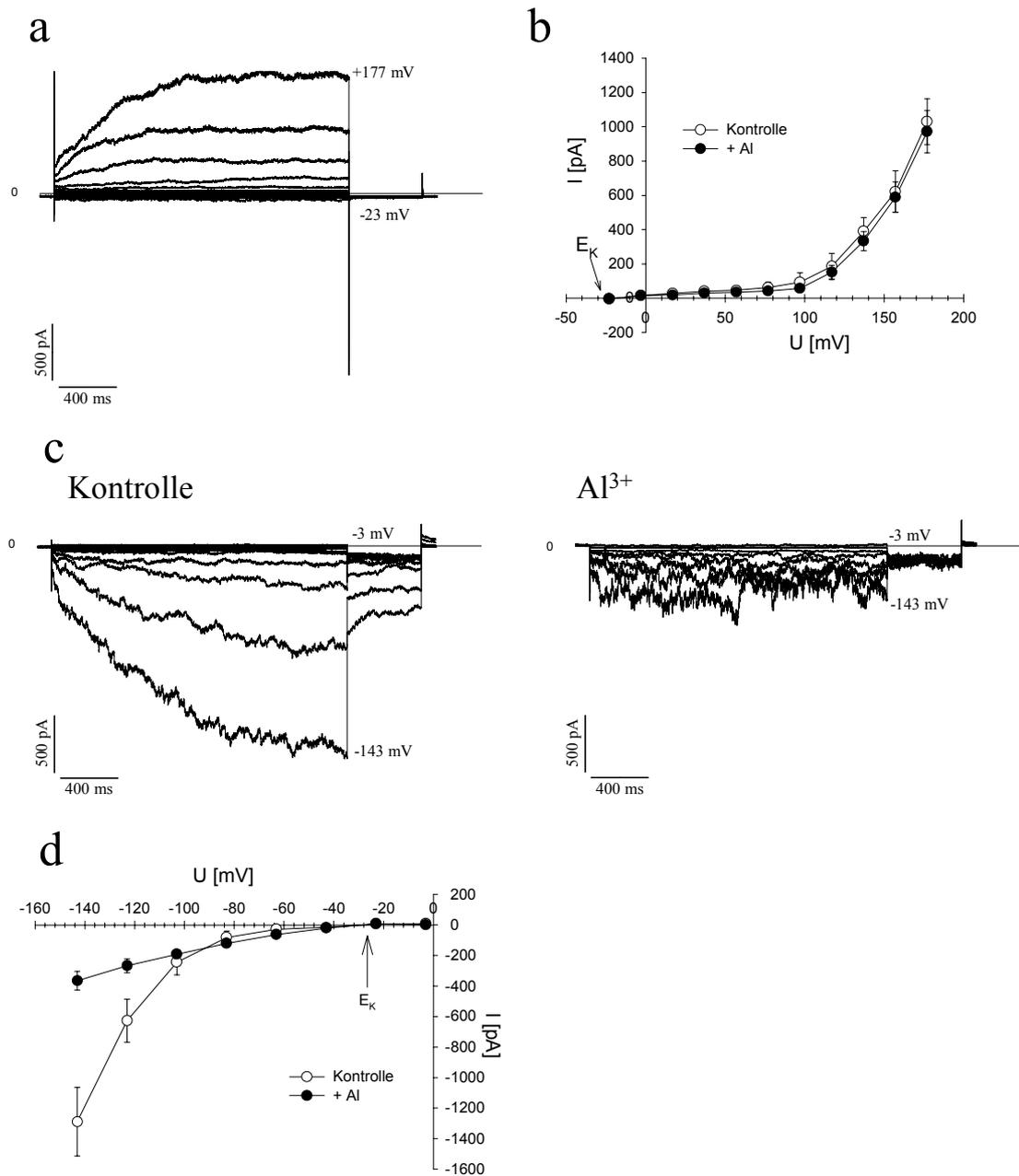


Abb. 48: Einfluss von Al auf K^+ -Kanäle in der Plasmamembran corticaler Protoplasten. Protoplasten wurden aus der 1-2 mm Zone nicht mit Al vorbehandelter Wurzeln des Al-resistenten Genotyps ATP-Y isoliert. Die Pipettenlösung enthielt 150 mM K-Gluconat, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM MgATP, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES/Tris (pH 7,2). Die Badlösung enthielt 50 mM K-Gluconat, 1 mM $CaCl_2$ sowie 5 mM MES/Tris (pH 4,3). Von einem Haltepotential von -63 mV wurden 2 s Spannungspulse zwischen -143 und +177 mV in 20 mV Schritten appliziert. (a) Langsam aktivierende K^+ -Ströme als Reaktion auf depolarisierende Spannungspulse. Die gezeigte Kurve ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente, deren Mittelwerte \pm SD in der in (b) gezeigte Strom/Spannungskennlinie gezeigt sind. (c) Repräsentative Aktivierung von einwärtsgerichteten K^+ -Kanälen als Antwort auf Membranhyperpolarisation ($n = 3$) und deren Inhibierung durch 300 μ M $AlCl_3$ (192 μ M Al_{MONO}). (d) Dazugehörige Strom/Spannungskennlinie aus Mittelwerten \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten. Das Nernst-Potential für K^+ (-27 mV) ist jeweils mittels eines Pfeils gekennzeichnet.

4 Diskussion

Die genauen Mechanismen der Schädigung pflanzlicher Gewebe durch Aluminium (Al) sind auch heute, mehr als 80 Jahre nachdem HARTWELL und PEMBER (1918) die phytotoxische Wirkung von Al auf sauren Böden beschrieben haben, nicht zufriedenstellend geklärt (HAUG, 1984; TAYLOR, 1991; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996; MATSUMOTO, 2000). Debattiert wird besonders die Bedeutung von Apoplast und Symplast sowohl bezüglich der Empfindlichkeit als auch der Resistenz gegenüber Al (HORST, 1995; KOCHIAN, 1995). Demgegenüber besteht Einigkeit darüber, dass der primäre Ort der Al-Wirkung in der Wurzel lokalisiert ist und sich dort auf die Spitze beschränkt (BENNET *et al.*, 1985; BENNET und BREEN, 1991; RYAN *et al.*, 1993; SIVAGURU und HORST, 1998).

Bezüglich ihrer Entwicklungszonen lässt sich die Wurzelspitze in vier Bereiche unterteilen: Auf die Wurzelhaube folgen die meristematische Zone, die Elongationszone und die Zone weiterer Differenzierung, die die Wurzelhaarzone einschließt (ISHIKAWA und EVANS, 1995). Allerdings stellen diese Zonen keine in sich homogenen Einheiten dar und die Übergänge erfolgen graduell. Ausgehend vom Konzept spezialisierter Zonen der Entwicklung (PILET und SENN, 1980; ISHIKAWA und EVANS, 1995; BALUŠKA *et al.*, 1996) wurde in der hier vorgestellten Arbeit die Primärwurzelspitze von *Zea mays* (L.) hinsichtlich zonaler Unterschiede in der Al-Sensitivität untersucht und die von SIVAGURU und HORST (1998) als besonders Al-sensitiv beschriebene Zone im Abstand von 1-2 mm von der Spitze hinsichtlich ihrer Bedeutung für Al-Toxizität und -Resistenz charakterisiert.

4.1 Hemmung des Wurzellängenwachstums als Maß der Al-Sensitivität

Die Wurzel ist das Pflanzenorgan, das entscheidend für Wasser- und Nährstoffaufnahme sowie die Verankerung im Substrat ist (PRITCHARD, 1994). Nach dem Auskeimen sind Kormophyten sedentär, also im Gegensatz zu tierischen Organismen nicht zu einer freien Ortsbewegung in der Lage. Der Pflanze wird die Eroberung ihrer Umwelt und Nutzung von Ressourcen durch das Wurzelwachstum ermöglicht (WINCH und PRITCHARD, 1999). Ungehemmtes Wurzelwachstum ist daher von existentieller Bedeutung für das Überleben der Pflanze in ihrer Umwelt und – phylogenetisch gesehen – für den Erhalt und die Verbreitung von Arten und Ökotypen.

Eines der ersten Symptome der Al-Toxizität ist die Hemmung des Wurzellängenwachstums (WLW; HAUG, 1984; TAYLOR, 1991; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995;

DELHAIZE und RYAN, 1995). Dieser Parameter ermöglicht, trotz der Fülle an mittlerweile mit Al-Toxizität in Zusammenhang gebrachten Faktoren (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000), immer noch die zuverlässigste Charakterisierung von Al-Resistenz in kurzfristigen Laborexperimenten. Genotypische Unterschiede in der Al-Resistenz wurden auf diese Weise in einer Reihe von Arbeiten unter anderem an Weizen (TICE *et al.*, 1992; RYAN *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 1995b), *Triticale* (MA *et al.*, 2000), Mais (LLUGANY *et al.*, 1994; JORGE und ARRUDA, 1997; HORST *et al.*, 1997) Sojabohne (HORST und KLOTZ, 1990; HANSON, 1991), Kartoffel (SCHMOHL *et al.*, 2000) sowie *Arabidopsis* (LARSEN *et al.*, 1998) gezeigt. Die Al-induzierte Hemmung des WLW tritt innerhalb kurzfristiger Behandlung von 1 h auf und eignet sich daher für die Untersuchung kurzzeitiger Al-Effekte (OWNBY und POPHAM, 1989; LLUGANY *et al.*, 1995; BLANCAFLOR *et al.*, 1998; SIVAGURU und HORST, 1998).

Die in dieser Arbeit miteinander verglichenen Maisgenotypen wurden zuvor in Nährlösungsexperimenten bezüglich ihrer Al-Empfindlichkeit getestet (LLUGANY *et al.*, 1994; HORST *et al.*, 1997). Das dieser Arbeit zugrundeliegende Versuchssystem basiert jedoch auf der Behandlung von Maiswurzeln bzw. spezifischer 1-mm Wurzelzonen im Agarosegel. Erst durch die Gelbehandlung wird die spezifische Behandlung möglich. Auch bei kurzfristiger Behandlung der gesamten Wurzelspitze (3 cm) bietet die Verwendung des Gels einen erheblichen Aufwandsvorteil gegenüber Nährlösungsexperimenten. Um einen Einfluss des Behandlungssystems auf die Reaktion der Wurzeln auf Al auszuschließen und die Eignung kurzfristiger Al-Behandlung für die Untersuchung der physiologischen Hintergründe für Al-Toxizität und -Resistenz zu ermitteln, wurde das Wurzellängenwachstum zu Referenzzwecken in Nährlösung (24 h; **Abb. 3**) untersucht. Dabei unterschieden sich die Ergebnisse zwischen beiden Versuchssystemen sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht (**Abb. 3,4&5**), was (a) die Klassifizierung der Genotypen ATP-Y als Al-resistent und Lixis als Al-sensitiv (LLUGANY *et al.*, 1994; HORST *et al.*, 1997) sowie (b) die Eignung des Agarosegelsystems zur Untersuchung der Al-Problematik (siehe auch CALBA *et al.*, 1996; SIVAGURU und HORST, 1998) bestätigt.

Die Untersuchungen zum Anteil spezifischer 1-mm Wurzelzonen an der Gesamtwurzelstreckung (**Abb. 6&7**) zeigen, dass die Hauptelongationszone der untersuchten Maisgenotypen im Bereich 2-5 mm von der Wurzelspitze lokalisiert ist. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von PILET und SENN (1980), PILET *et al.* (1983), COLLINGS *et al.* (1992), EVANS und ISHIKAWA (1997), BLANCAFLOR *et al.* (1998) sowie PETERS und FELLE (1999). Die 1-2 mm Zone trug nur sehr wenig zur Gesamt-

streckung der Wurzel bei, was ihre Einstufung als Übergangszone zwischen Zellteilung und Zellstreckung (ISHIKAWA und EVANS, 1993&1995; BALUŠKA *et al.*, 1996) bestätigt. Diese Zone ist gegenüber einer Reihe exogener Einflüsse wie Gravistimulation und Auxin (MEUWLY und PILET, 1991; ISHIKAWA und EVANS, 1993) sowie mechanischer Reize (ISHIKAWA und EVANS, 1990a&1993) empfindlich. Wurde nur die 1-2 mm Wurzelzone spezifisch mit Al behandelt, so entsprach die Al-induzierte Hemmung des WLW der bei Behandlung des gesamten Apex aufgetretenen (**Abb. 8**). Im Gegensatz dazu führte die spezifische Behandlung der 0-1 mm Zone nur zu einer geringen Hemmung, während die Behandlung eines Teils der Elongationszone (2,5-3,5 mm) keine Wachstumsdepression verursachte (vergleiche RYAN *et al.*, 1993). Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von SIVAGURU und HORST (1998) sowie SIVAGURU *et al.* (1999a), die zeigen konnten, dass die 1-2 mm Zone der Maisprimärwurzel am Al-empfindlichsten ist. Darüber hinaus wird die Bedeutung dieser Zone für die Ausprägung von Al-Resistenz deutlich, da signifikante Genotypenunterschiede im Wachstum bei alleiniger Behandlung der 1-2 mm Zone auftraten (**Tab. 1**).

Der genaue Mechanismus der Al-induzierten Hemmung des Streckungswachstums ist noch nicht geklärt (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000). Vermutlich ist sie jedoch das Resultat des Zusammenspiels mehrerer Faktoren. Erschwerend kommt hinzu, dass möglicherweise zwischen einer kurzfristig (innerhalb von < 30 min) induzierten und einer durch längere Al-Behandlung verursachten bzw. aufrechterhaltenen Wachstumshemmung unterschieden werden muss (siehe auch KOCHIAN, 1995).

Das Streckungswachstum der Wurzel äußert sich als Summe der individuellen Streckung aller apikalen Wurzelzellen (PRITCHARD, 1994; WINCH und PRITCHARD, 1999). Dabei durchlaufen die Zellen vier unterschiedliche Phasen. Die Zellstreckung ist in der meristematischen Zone gering. Es folgt ein postmitotischer Bereich isodiametrischen Wachstums, in dem Zellfunktion und Zugehörigkeit zu bestimmten Gewebetypen bereits deutlich werden. Es schließt sich eine Phase starker Zellstreckung an. Anschließend verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Streckung wieder (COSGROVE, 1997). RYAN *et al.* (1993) konnten beispielsweise zeigen, dass in Mais die Rindenzellen im Abstand von 2 mm von der Spitze relativ konstante Längen zwischen 10 und 15 μm aufwiesen (vergleiche **Abb. 9**) und sich dann in den folgenden 5 mm auf etwa 150 μm streckten.

Das Streckungswachstum der Zelle wird erst durch das komplexe Zusammenspiel einer Reihe von Prozessen ermöglicht. Hierzu gehören die Auflockerung der primä-

ren Zellwand, die Synthese und Sekretion neuen Zellwandmaterials, Vakuolisierung, Ionen- und Wasseraufnahme zum Aufbau des Turgordruckes, die Konformation des Cytoskelettes sowie die Synthese neuen Plasmamembran-Materials (PRITCHARD, 1994; COSGROVE, 1997; WINCH und PRITCHARD, 1999). Es gibt experimentelle Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Al auf jeden einzelnen dieser für das Streckungswachstum notwendigen Faktoren sowie die vermittelnden Signaltransduktionsprozesse (siehe TAYLOR, 1991; DELHAIZE und RYAN, 1995; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996; MATSUMOTO, 2000). So kommt es durch Al zu Veränderungen physikalischer Eigenschaften der Zellwand bzw. des Apoplasten wie Elastizität, Porosität und Wasserpermeabilität (BLAMEY *et al.*, 1993; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; BLAMEY und DOWLING, 1995; GUNSÉ *et al.*, 1997; MA *et al.*, 1999; MATSUMOTO, 2000). Struktur und Funktionalität der Plasmamembran werden beeinflusst (HORST, 1995; RENGEL, 1996; ZHANG *et al.*, 1997; ISHIKAWA und WAGATSUMA, 1998; MATSUMOTO, 2000), wobei besonders die Hemmung von K⁺- (GASSMANN und SCHROEDER, 1994; RYAN *et al.*, 1997b; PIÑEROS und KOCHIAN, 2001; ZHANG *et al.*, 2001) und Ca²⁺-Kanälen (DING *et al.*, 1993; PIÑEROS und TESTER, 1993&1995) sowie Änderungen des Membranpotentials (PAPERNIK und KOCHIAN, 1997; TAKABATAKE und SHIMMEN, 1997; SIVAGURU *et al.*, 1999a) hervorzuheben sind. Aluminium beeinflusst den Verlauf der Vakuolisierung und hemmt die Syntheseaktivität des Golgiapparates sowie sekretorische Prozesse in der Wurzelspitze (BENNET *et al.*, 1985; PUTHOTA *et al.*, 1991; MARIENFELD *et al.*, 1995; VITORELLO und HAUG, 1999). Auch Effekte auf das Cytoskelett konnten gezeigt werden (GRABSKI und SCHINDLER, 1995; BLANCAFLOR *et al.*, 1998; SIVAGURU *et al.*, 1999a&b). Desweiteren wurde ein Einfluss von Al auf die Ca²⁺- (RENGEL, 1992a&b; JONES *et al.*, 1998a&b; ZHANG und RENGEL, 1999) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat-abhängige Signaltransduktion (JONES und KOCHIAN, 1995) demonstriert. Aluminium führte ferner zu Störungen des Phytohormonhaushaltes in der Wurzelspitze (siehe MARSCHNER, 1991), wobei besonders die Hemmung des basipetalen Auxintransportes hervorzuheben ist (HASENSTEIN und EVANS, 1988). Schließlich konnte auch ein Al-Einfluss auf Respiration und Synthese von Adenosintriphosphat gezeigt werden (DELIMA und COPELAND, 1994; TONINELLO *et al.*, 2000), was möglicherweise dazu führen kann, dass die für die Zellstreckung notwendige Energie nicht in ausreichendem Maße bereitgestellt werden kann. Ein weiterer, zunehmend Beachtung findender Aspekt ist die Induktion oxidativen Stresses durch Al (CAKMAK und HORST, 1991; RICHARDS *et al.*, 1998; YOSHINO *et al.*, 1999; EZAKI *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 2001). Eine inhibierende Wirkung von

Zellwand-Peroxidasen (BROWNLEADER *et al.*, 2000) auf die Zellstreckung durch verstärkte Quervernetzung von Zellwandbestandteilen sowie eine Verminderung dieses Effektes durch Ascorbat (DEL CÓRDOBA-PEDREGOSA *et al.*, 1996) konnte gezeigt werden. LUKASZEWSKI und BLEVINS (1996) diskutierten einen gestörten Ascorbathaushalt als mögliche Ursache für die Al-induzierte Hemmung der Zellstreckung.

Die hohe Al-Empfindlichkeit der 1-2 mm Zone ist möglicherweise auf den in dieser erfolgenden Übergang vom Teilungs- zum Streckungswachstum zurückzuführen (ISHIKAWA und EVANS, 1995; BALUŠKA *et al.*, 1996). Die mit der Vorbereitung auf das schnelle Streckungswachstum einhergehenden Veränderungen des Zellstoffwechsels bieten angesichts der mannigfaltigen Al-Effekte eine ganze Reihe an Ansatzpunkten für dessen toxische Wirkung. Dabei ist zu beachten, dass hier zwei Mechanismen der Al-Wirkung zu unterscheiden sind. Zum Einen wird die Zellstreckung in dieser Zone direkt gehemmt und die Zellen treten in geschädigtem Zustand in die Hauptelongationszone ein. Zum Anderen stimuliert Al eine schnelle Signaltransduktion, die in der Elongationszone zu einer nicht direkt Al-induzierten Hemmung der Zellstreckung führt.

Die geringere Al-Sensitivität der 0-1 mm Zone kann in der in diesem Bereich ausgeschiedenen Mucilage begründet liegen, die eine hohe Al-Bindungskapazität aufweist (HORST *et al.*, 1982; ARCHAMBAULT *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2000a) und damit die Mobilität von Al stark einschränkt. Auch die Wurzelhaube führt dazu, dass der Anteil der direkt dem Al ausgesetzten Rhizodermiszelloberfläche hier geringer als in der 1-2 mm Zone ist (vergleiche **Abb. 9e**; sowie PILET und SENN, 1980). Der Grund für die geringe Empfindlichkeit der Elongationszone gegenüber Al ist noch nicht geklärt. RYAN *et al.* (1993) konnten ebenfalls an Mais demonstrieren, dass Al-Behandlung der Elongationszone zwar zu mechanischer Beschädigung der Rhizodermis und äußeren Rindenzellen, nicht jedoch zu einer Wachstumshemmung führte. Dieser Befund zeigt, dass die Al-induzierte Hemmung des WLW in der EZ nicht auf der Zerstörung äußerer Zellschichten beruht (RYAN *et al.*, 1993) und unterstützt die in dieser Arbeit gezeigte Fernwirkung von Al. SIVAGURU und HORST (1998) argumentierten, dass die in der EZ erfolgende stärkere Protonenabgabe (ZIESCHANG *et al.*, 1993; MONSHAUSEN *et al.*, 1996) aufgrund von Konkurrenz um die negativen Bindungsstellen im Apoplasten (GRAUER und HORST, 1992; KINRAIDE *et al.*, 1992; KINRAIDE, 1993) zu einer verminderten Al-Bindung führen könnte. SIVAGURU *et al.* (1999b) zeigten an Tabak Suspensionszellen, dass die Al-Sensitivität von Zellen in der stationären Phase

(entsprechend späte Elongationszone) geringer war als in der Phase exponentiellen Wachstums (entsprechend 1-2 mm Zone) und führten diesen Befund auf unterschiedliche Al-Beeinflussung des Cytoskelettes in beiden Zellkategorien zurück.

Zusammenfassend ist aus der Übertragung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Al-induzierten Hemmung des WLW auf die bestehende Literatur zu schließen, dass die Al-Wirkung auf zwei zeitversetzt auftretenden, möglicherweise voneinander unabhängigen Reaktionen beruht: (1) In einer schnellen Reaktion auf Al wird ein Signal von der Al-sensitiven Zone zur Elongationszone geleitet, das dort zur Hemmung der Zellstreckung führt (siehe auch BENNET und BREEN, 1991 sowie Abschnitt 4.5). (2) Bei längerer Behandlung führt Al dann auch in der Elongationszone zu direkten, die Zellstreckung modifizierenden Effekten.

4.2 Callosebildung als Maß der Al-Sensitivität

Eine verstärkte Synthese von 1,3- β -Glucanen (Callose) sowie deren Einlagerung in die Zellwand tritt als unspezifische Reaktion auf eine Reihe externer Stressfaktoren auf (KAUSS, 1987&1996; ZHANG *et al.*, 1994). Dennoch ist die Bildung von Callose in der Wurzel ein sensitiver physiologischer Marker für die Al-Sensitivität (WISSEMEIER *et al.*, 1987&1992; HORST *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1994; HORST, 1995). Eine positive Beziehung zwischen Al-induzierter Callosebildung und Al-Sensitivität konnte für Sojabohne (WISSEMEIER *et al.* 1987), Weizen (ZHANG *et al.* 1994) sowie Mais (LLUGANY *et al.*, 1994; HORST *et al.* 1997) gezeigt werden. Die Induktion der Callosebildung ist eine schnelle Reaktion auf Al-Stress. STAß und HORST (1995) konnten an Soja-Suspensionszellkulturen innerhalb von 15 min eine Al-induzierte Steigerung der Callosesynthese zeigen, während ZHANG *et al.* (1994) sowie WISSEMEIER und HORST (1995) an Wurzelspitzen von Weizen und Sojabohne innerhalb von 30 min eine signifikante Al-induzierte Callosebildung demonstrieren konnten. Somit eignet sich dieser Parameter für die Charakterisierung der Al-Sensitivität pflanzlicher Gewebe innerhalb kurzfristiger Behandlungszeiträume (SIVAGURU und HORST, 1998).

In Nährlösung überwog nach 24 h Al-Behandlung die Callosebildung in den apikalen 5 mm der Wurzel gegenüber den folgenden 15 mm deutlich (**Abb. 10**). Die Callosebildung fiel dabei im Al-sensitiven Genotyp signifikant stärker aus. Die im Agarosegel für 1 h durchgeführten Experimente bestätigten diese Ergebnisse und somit die

Eignung des Agarosegelsystems für die Untersuchung von Al-Effekten (**Abb. 11**; CALBA *et al.*, 1996). Aufgrund der höheren longitudinalen Auflösung der Calloseverteilung und der Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente konnten der Beitrag apikaler Wurzelzonen zur Al-induzierten Callosebildung und zonale Unterschiede in der Al-Sensitivität studiert werden.

Die deutlich höhere Al-Empfindlichkeit der 1-2 mm Zone spiegelte sich in der gegenüber den übrigen Segmenten verstärkten Bildung Al-induzierter Callose wieder (**Abb. 11**). Die geringere Callosebildung in der 0-1 mm Zone ist möglicherweise auf die durch Wurzelhaube (**Abb. 9e**) und Mucilageabsonderung (HORST *et al.*, 1982; ARCHAMBAULT *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2000a) geringere mit Al in Kontakt tretende Rhizodermisoberfläche bzw. die geringere Anzahl an Zellen (PILET und SENN, 1980) zurückzuführen. In den ersten 3 Segmenten bildete der Al-sensitive Genotyp signifikant mehr Callose als der Al-resistente. Die longitudinale Verteilung der Callosegehalte bei spezifischer Al-Behandlung der 1-2 mm Zone entsprach der bei Behandlung des gesamten Wurzelapex gezeigten (**Abb. 12**). Dabei lagen die Genotypen zwar dichter beieinander, waren aber dennoch in der 1-2 mm Zone signifikant voneinander zu unterscheiden. Die geringe Al-Sensitivität der EZ wurde sowohl bei Behandlung des gesamten Apex als auch bei spezifischer Al-Behandlung durch die deutlich geringere Callosebildung bestätigt (**Abb. 11,12&13**).

Es ist hervorzuheben, dass Al-Behandlung über den gesamten Apex sowie spezifische Behandlung der 1-2 mm Zone zu einer gesteigerten Callosebildung in der EZ führte (**Abb. 12**), während die spezifische Behandlung dieses Bereiches nur zu tendenziell erhöhter Callosebildung führte. Dieses Resultat deutet auf eine Transduktion des Al-Signals von der 1-2 mm Zone zur EZ hin.

Die Al-induzierte Callosebildung war auch nach mehrstündiger Al-Behandlung vornehmlich auf die Zellwände der äußeren Rindenschichten und der Rhizodermis beschränkt (**Abb. 13**; siehe auch: BENNET *et al.*, 1985; WISSEMEIER *et al.*, 1987; BUDÍKOVÁ und MISTRÍK, 1999). Da jedoch alle Pflanzenzellen potentiell in der Lage sind Callose zu bilden (KAUSS, 1989), könnte die Beschränkung der Callosebildung auf Rhizodermis sowie äußere Rinde ein Indiz für die geringe radiale Mobilität von Al sein (GODBOLD *et al.*, 1988; MARIENFELD und STELZER, 1993; HORST, 1995; RENGEL, 1996; MARIENFELD *et al.*, 2000). Der Apoplast wäre in diesem Fall eine Barriere für das Vordringen von Al in Richtung des Zentralzylinders. Die Tatsache, dass die radiale Mobilität von Al innerhalb von 1 h Behandlung jedoch in der 1-2 mm Zone bis in die 5. Rindenzellschicht, in der 0-1 mm Zone sogar bis zur inneren Rinde, reichte

(**Abb. 19**), deutet hingegen darauf hin, dass nicht die radiale Al-Mobilität limitierend für die Callosebildung war, sondern die Callosesynthese erst ab einer bestimmten lokalen Al-Konzentration induziert wird. Dies steht in Übereinstimmung mit der Abhängigkeit der Callosebildung von der Al-Konzentration im Inkubationsmedium (WISSEMEIER *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1994; STAß und HORST, 1995; WISSEMEIER *et al.*, 1998).

Die Regulation der Callose-Synthese erfolgt über cytosolisches Ca^{2+} (KAUSS, 1987; DELMER, 1987; ROBINSON, 1996). Dabei ist das die Synthese katalysierende Enzym möglicherweise identisch mit dem Cellulose synthetisierenden und das Umschalten von Cellulose- auf Callosesynthese erfolgt über eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (AMOR *et al.*, 1995; ROBINSON, 1996; DELMER, 1999). Obwohl die Resultate nicht einheitlich sind, konnte in einer Reihe von Studien ein Einfluss von Al auf die symplastische sowie apoplastische Ca-Homöostase gezeigt werden (RENGEL, 1992a&b; RYAN und KOCHIAN, 1993; HAUG *et al.*, 1994; RYAN *et al.*, 1994; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; REID *et al.*, 1995; LINDBERG und STRID, 1997; JONES *et al.*, 1998a&b, ZHANG und RENGEL, 1999). Bei Behandlung im Gel trat beim Al-sensitiven Genotyp innerhalb von 2 h eine Verminderung der Ca-Gehalte im Bereich 1-2 mm der Primärwurzelspitze auf (**Abb. 21**). Durch die Al-induzierte Verdrängung von den apoplastischen Bindungsstellen könnte Ca^{2+} , aufgrund der im Apoplasten ansteigenden freien Ca^{2+} -Konzentration (HORST, 1995), über Ca^{+} -Kanäle in das Cytosol gelangen und dort als „second messenger“ die Callose-Synthese aktivieren. Allerdings ist zu beachten, dass gezeigt werden konnte, dass Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran durch Al blockiert werden können (DING *et al.*, 1993; PIÑEROS und TESTER, 1993&1995; HUANG *et al.*, 1994&1996). In diesem Falle wären interne Ca^{2+} -Reservoirs wie das ER, die Vakuole und der Golgi-Apparat für eine Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels (RENGEL *et al.*, 1995; SANDERS *et al.*, 1999; MALHÓ, 1999) und die Aktivierung der Callose-Synthese verantwortlich und die Verdrängung von Ca^{2+} aus dem Apoplasten ein von der Callosesynthese getrennter Prozess.

4.3 Aluminiumlokalisierung im Gewebe

Für die Klärung der Frage nach dem primären Angriffsort von Al in der Wurzel ist dessen Lokalisation im Gewebe von herausragender Bedeutung und wurde bereits mit unterschiedlichen analytischen Methoden an einer Reihe von Pflanzenarten untersucht (Review: RENGEL, 1996). Dabei konnte eine positive Beziehung zwischen Al-

Sensitivität und Al-Akkumulation in der Wurzel u.a. für Weizen (RINCON und GONZALES, 1992; TICE *et al.*, 1992; DELHAIZE *et al.*, 1993a; SAMUELS *et al.*, 1997), Mais (LLUGANY *et al.*, 1994; MOON *et al.*, 1997), Sojabohne (LAZOF *et al.*, 1994b; SILVA *et al.*, 2000) sowie *Arabidopsis* (LARSEN *et al.*, 1998) gezeigt werden. Dieser Befund deutet auf einen den Ausschluss von Al aus dem Gewebe vermittelnden Resistenzmechanismus hin (RINCON und GONZALES, 1992; DELHAIZE *et al.*, 1993a; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996). In Übereinstimmung mit der primären Al-Wirkung auf die Wurzelspitze (RYAN *et al.*, 1993) konnten RINCON und GONZALES (1992), DELHAIZE *et al.* (1993a) sowie SAMUELS *et al.* (1997) an Weizen zeigen, dass die apikalen 2-3 mm den Hauptanteil der Al-Akkumulation aufwiesen. Diese Studien weisen darauf hin, dass, aufgrund des Maskierungseffektes bei der Analyse des Gesamtaluminiumgehaltes in größeren Wurzelsegmenten, eine feinere longitudinale Auflösung der Gehalte entlang der Wurzelspitze notwendig ist, um die Al-Akkumulation in einen kausalen Zusammenhang mit der Al-Sensitivität bringen zu können (DELHAIZE *et al.*, 1993a; RENGEL, 1996; SAMUELS *et al.*, 1997). SIVAGURU und HORST (1998) konnten für den auch in dieser Arbeit verwendeten Al-sensitiven Maisgenotyp Lixis zeigen, dass die Zone höchster Al-Akkumulation (1-2 mm von der Spitze) gleichzeitig die höchste Al-Sensitivität aufwies.

Die hohe Al-Empfindlichkeit der 1-2 mm Zone wurde in den eigenen Experimenten durch die hohe Al-Akkumulation in den apikalen 2-3 mm der Wurzel reflektiert (**Abb. 14**), wobei die Akkumulation in der MZ (0-1 mm) eher auf die starke Bindungskapazität der die Wurzelspitze umgebenden Mucilage für Al als auf echte Akkumulation im Gewebe zurückzuführen ist (HORST *et al.*, 1982; ARCHAMBAULT *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2000a). Genotypische Unterschiede traten ebenfalls in den ersten 3 mm, speziell in der 1-2 mm Zone, hervor. Diese Ergebnisse wurden durch Al-Behandlung spezifischer 1-mm Segmente bestätigt (**Abb. 15**). Hier trat eine signifikante Al-Akkumulation nur bei Behandlung der 0-1 sowie 1-2 mm Zone auf. Wurde die 1-2 mm Zone spezifisch mit Al behandelt, so lag die Al-Akkumulation in diesem Segment beim Al-sensitiven Genotyp Lixis signifikant über der des Al-resistenten Genotyps ATP-Y. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass ein nennenswerter longitudinaler Transport von Al innerhalb von 1 h Behandlung nicht auftrat.

Mittels der Hämatoxylinfärbung (POLLE *et al.*, 1978) konnte das longitudinale Verteilungsprofil für Al bestätigt werden (**Abb. 16**). Die Färbeintensität in der Elongationszone war deutlich geringer als in den apikalen 2 mm der Wurzelspitze (siehe auch RYAN *et al.*, 1993). Mit dieser Methode konnten POLLE *et al.* (1978), RINCON und

GONZALES (1992), DELHAIZE *et al.* (1993a) an Weizen sowie TANG *et al.* (2000) an Gerste deutliche Unterschiede in der Al-Akkumulation unterschiedlich Al-resistenter Genotypen nachweisen. In der hier vorgestellten Arbeit waren, wie auch von RYAN *et al.* (1993) gezeigt, in den ersten beiden Millimetern keine konsistenten genotypischen Unterschiede in der Färbung zu erkennen. Dies reflektiert die - im Vergleich zu Untersuchungen an Weizen festgestellten (RINÓN und GONZALES, 1992; DELHAIZE *et al.*, 1993a) - relativ geringen Unterschiede in der Al-Akkumulation der untersuchten Maisgenotypen innerhalb kurzzeitiger Al-Behandlung.

Extern appliziertes Al wird schnell in den Zellwänden von Wurzelzellen gebunden (ZHANG und TAYLOR, 1989; BLAMEY *et al.*, 1990; DELHAIZE *et al.*, 1993a, RENGEL, 1996). Die Hauptbindungsstellen sind hierbei die Carboxylgruppen der Pektinmatrix (GRAUER und HORST, 1992; SCHMOHL und HORST, 2000). Diese negativen Ladungen erzeugen einen elektrischen Potentialgradienten, der das Bindungsvermögen und die Verteilung von Ionen im Apoplasten bestimmt (KINRAIDE, 1993). HORST *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die longitudinalen Unterschiede in der Empfindlichkeit der Wurzelspitze gegenüber Al mit Ausnahme der 0-1 mm Zone positiv mit dem Pektin-gehalt dieser Wurzelzonen korreliert sind. Die Bedeutung des Pektingehaltes sowie des Methylierungsgrades der Polygalakturonsäuren, d.h. der Verfügbarkeit negativer Bindungsstellen, für die Al-Akkumulation wurde für die Maiswurzelspitze von HORST *et al.* (1999) sowie an Mais-Suspensionszellen von SCHMOHL und HORST (2000) so- wie SCHMOHL *et al.* (2000) demonstriert. Es ist anzunehmen, dass die Bindung von Al an die Pektinmatrix bzw. andere Konstituenten der Zellwand (CARPITA und GIBEAUT, 1993; CARPITA, 1996) zu einer Beeinflussung der physikalischen Eigenschaften der Zellwand wie Elastizität und Porosität sowie apoplastischer Enzymaktivitäten führt (BLAMEY *et al.*, 1993; PRITCHARD, 1994; HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; RENGEL, 1996; MATSUMOTO, 2000; SCHMOHL, 2001). Hierdurch wird möglicherweise mechanischer Stress induziert, der beispielsweise über mechanosensorische Ionenkanäle (Hedrich und Cosgrove, 1991; DING *et al.*, 1993) oder die Störung membranassoziierter Signaltransduktionsketten (MATSUMOTO, 2000) zu Veränderungen im Zellwand-Plasmamembran-Cytoskelett Kontinuum (WYATT und CARPITA, 1993; MILLER *et al.*, 1997a&b; FOWLER und QUATRANO, 1997; NICK, 1999; HORST *et al.*, 1999) führen und somit möglicherweise den Einfluss von in der Zellwand gebundenem Al auf das Cytoskelett erklären kann (GRABSKI und SCHINDLER, 1995; BLANCAFLOR *et al.*, 1998; HORST *et al.*, 1999; SIVAGURU *et al.*, 1999a). Ein Eindringen von Al in den Symplasten wäre dann nicht nötig, um innerhalb kürzester Zeiträume neben einer Schädigung

des Apoplasten gravierende Störungen intrazellulärer Prozesse (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000) und schließlich die Hemmung des WLW zu induzieren.

Die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) kombiniert ein hochauflösendes massenspektrometrisches mit einem bildgebenden Verfahren. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Quantifizierbarkeit der Ergebnisse (LAZOF *et al.*, 1994a). Während Kryopräparationen bei der Untersuchung diffusibler Substanzen große Vorteile bieten (LAZOF *et al.*, 1996), gehen doch räumliche Auflösung sowie strukturelle Details verloren. Wie bereits von GIERTH (2000) gezeigt, nimmt zudem die Qualität der Kryoschnitte mit zunehmender Annäherung an die Spitze drastisch ab. Da in dieser Arbeit ausschließlich Schnitte aus dem apikalen Bereich angefertigt wurden, war die Qualität der Bilder aufgrund von bei der Probenvorbereitung aufgetretenen Verzerrungen und Rissen im Zusammenspiel mit der lateralen Auflösungsgrenze der Messapparatur (siehe LAZOF *et al.*, 1994a; RENGEL, 1996) beschränkt.

Eine geringe radiale Mobilität von Al innerhalb der Wurzel in Richtung Zentralzylinder konnte gezeigt werden (GODBOLD *et al.*, 1988; MARIENFELD und STELZER, 1993; MARIENFELD *et al.*, 2000). Dies steht in Übereinstimmung mit der Beschränkung der Callosebildung auf die Rhizodermis und die äußeren 2 Rindenschichten innerhalb von 2 h Behandlung (**Abb. 13**). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten jedoch auf eine bessere radiale Mobilität in der 1-2 mm Zone bis zur 5. Rindenschicht (Abschnitt 3.3.1.4), ähnlich den von LAZOF *et al.* (1994a&1996) an Sojabohne gezeigten Ergebnissen, hin. Allerdings nahm die Signalstärke in Richtung Stele stark ab und der Hauptanteil an Al befand sich in der Zellwand der Rhizodermis und der ersten 2 Rindenschichten (siehe auch MARIENFELD *et al.*, 2000). Die Signalstärke lag in der EZ deutlich unter der in den apikalen 2 mm, wobei die radiale Mobilität der in der 1-2 mm Zone entsprach (**Abb. 19&20**). In der 0-1 mm Zone war die Gesamtsignalstärke am höchsten und auch die radiale Mobilität von Al reichte weiter in Richtung Stele, was (a) zeigt, dass trotz Mucilage ein beträchtlicher Anteil an Al den Apoplasten erreicht und (b) vermuten lässt, dass der Apoplast in der 1-2 mm Zone eine stärkere Barriere für Al darstellt als in der 0-1 mm Zone. Genotypische Unterschiede bezüglich der Verteilung von Al waren mittels der SIMS nicht detektierbar.

Bezüglich des in der Literatur viel diskutierten (siehe RENGEL, 1996) Verhältnisses zwischen apoplastischem und symplastischem Anteil an der Al-Akkumulation im Gewebe zeigen die SIMS Bilder (**Abb. 18&19**), dass bei Mais nach 1 h Behandlung der

Hauptanteil an Al im Bereich der Zellwände lokalisiert war, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen von MARIENFELD und STELZER (1993) an Hafer, DELHAIZE *et al.* (1993a) an Weizen, GODBOLD *et al.* (1995) an Fichte sowie RENGEL und REID (1997) an der Armleuchteralge *Chara corallina* steht. RENGEL und REID (1997) zeigten mittels des stabilen Isotops ^{26}Al , dass über 99 % des in *Chara* akkumulierten Al im Apoplasten vorlag. Diese Tatsache schließt nicht aus, dass geringe Mengen an Al in den Symplasten gelangt sein können, wie von LAZOF *et al.* (1994a&1996) an Sojabohne mittels SIMS, VÁZQUEZ *et al.* (1999) an Mais mittels EDX-MA oder SILVA *et al.* (2000) an Weizen mittels Lumogallionfärbung und confokaler Laserscanning-Mikroskopie gezeigt werden konnte. Allerdings erscheint eine Dominanz von symplastischem gegenüber apoplastischem Al, wie von TICE *et al.* (1992) postuliert, unwahrscheinlich. RENGEL (1996) erhebt zudem deutliche Kritik an den in Arbeiten zur Bestimmung symplastischen Aluminiums angewandten Methoden. So wurde beispielsweise bei der Probenvorbereitung Al aus den Zellwänden mittels Citrat (LAZOF *et al.*, 1994a&1996; VÁZQUEZ *et al.*, 1999) ausgewaschen, wodurch zum Einen die hohen Al-Konzentrationen im Apoplasten so weit vermindert wurden, dass symplastisches Al detektiert werden konnte, zum Anderen, neben möglichen Fixierungsartefakten, das Eindringen eines möglichen ladungsfreien Citrat-Aluminium Komplexes in das Cytosol vorstellbar erscheint (RENGEL, 1996). Auch eine nicht ausreichende Desorption von Al aus dem Apoplasten kann zu einer drastischen Überschätzung des Anteils symplastischen Aluminiums an der Gesamtakkumulation in den Arbeiten von ZHANG und TAYLOR (1989&1990) sowie TICE *et al.* (1992) geführt haben.

Der von VÁZQUEZ *et al.* (1999) für den Al-resistenten Maisgenotypen C525M vorgeschlagene Mechanismus der Al-Resistenz durch Akkumulation von Al in der Vakuole von Zellen der Wurzelspitze, wie für diverse Schwermetalle beschrieben (siehe ERNST, 1998), wird von den hier vorgestellten Ergebnissen nicht gestützt. Innerhalb einer kurzfristigen Behandlung von 1 h konnte eine Akkumulation von Al im Bereich ab 3 mm von der Spitze, also Regionen zunehmender Vakuolisierung (PATEL *et al.*, 1990 und Referenzen darin) nicht gezeigt werden (**Abb. 14**). Zwar schließt diese Tatsache die Beteiligung eines Akkumulationsmechanismus in der Al-Resistenz von Gramineen wie er für Al-Akkumulatoren wie Tee und Hortensie beschrieben ist (siehe TAYLOR, 1991; RENGEL, 1996) bei längerfristiger Behandlung nicht aus, erscheint jedoch aufgrund der Mehrheit experimenteller Befunde zu genotypischen Unterschieden in der Al-Akkumulation (siehe RENGEL, 1996) unwahrscheinlich.

Während eine positive Beziehung zwischen Al-Akkumulation und -Sensitivität entlang der Primärwurzelspitze gezeigt werden konnte, bleibt die Frage, über welche Mechanismen Al die Wurzelstreckung beeinflusst, Gegenstand der Diskussion (vergleiche Abschnitt 4.1).

Die Co-Lokalisation von Al mit Ca im Zellwandbereich (**Abb. 18**) steht in Übereinstimmung mit der von HORST *et al.* (1999), SCHMOHL und HORST (2000) und SCHMOHL *et al.* (2000) gezeigten positiven Beziehung zwischen Pektingehalt und Al-Akkumulation. Die Al-induzierte Abnahme der Ca-Gehalte im Al-sensitiven Genotyp in den apikalen 2 mm der Wurzelspitze (**Abb. 21**) weist auf die Verdrängung von Ca aus dem Apoplasten durch Al hin (Calciumverdrängungshypothese; RYAN und KOCHIAN, 1993; RYAN *et al.*, 1994; KINRAIDE *et al.*, 1994; BLAMEY und DOWLING, 1995; REID *et al.*, 1995; RYAN *et al.*, 1997a; GODBOLD und JENTSCHKE, 1998; SCHOFIELD *et al.*, 1998). Calcium ist eine wichtige strukturelle Komponente der Zellwand (CARPITA und GIBEAUT, 1993). Das zweiwertige Kation vernetzt die negativ geladenen Carboxylgruppen der Pektinmatrix („egg-box“ Modell; GRANT *et al.*, 1973) und hat damit entscheidenden Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Gelmatrix. Eine Verdrängung von Ca^{2+} durch apoplastisches Al^{3+} aus diesen Bindungsstellen (DELHAIZE *et al.*, 1993a; RYAN und KOCHIAN, 1993; REID *et al.*, 1995; HORST, 1995; RYAN *et al.*, 1997a; GODBOLD und JENTSCHKE, 1998; SCHMOHL *et al.*, 2000), könnte aufgrund der unterschiedlichen Wertigkeit zu einer Änderung der Gelstärke und somit der Konformation der Zellwandstruktur führen, was wiederum mit der Zellwandstreckung interferieren könnte.

Aufgrund der räumlichen Trennung zwischen den Orten der Al-Perzeption und der schnellen Wachstumshemmung erscheint jedoch ein direkter Al-Effekt auf mit der Zellstreckung einhergehende Prozesse innerhalb kurzfristiger Behandlung unwahrscheinlich. Die Induktion bzw. Inhibition einer für die Zellstreckung in der Elongationszone notwendigen Signaltransduktion durch Al böte eine Erklärungsmöglichkeit. So sind beispielsweise „secondary messenger“ wie Ca^{2+} (RENGEL, 1992a&b) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (JONES und KOCHIAN, 1995) oder polare Auxintransportströme (HASENSTEIN und EVANS, 1988; siehe Abschnitt 4.5) an der Regulation der Zellstreckung beteiligt und werden zudem durch Al beeinflusst.

4.4 Einfluss von Al auf das pH-Profil entlang der Wurzeloberfläche

Der pH-Wert des Apoplasten und seine Regulation unter Al-Einfluss sind in zweierlei Hinsicht von Relevanz für die Al-Problematik. Zum Einen wird die Bildung und Aufrechterhaltung einer pH-Barriere gegenüber dem die Wurzel umgebenden Medium als Mechanismus der Al-Resistenz diskutiert (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; DEGENHARDT *et al.*, 1998). Zum Anderen geht die für das Streckungswachstum der Wurzelzellen erforderliche Auflockerung der Zellwand mit einer Ansäuerung des Apoplasten einher („Acid growth“ Hypothese, siehe HAGER, 1971; RAYLE und CLELAND, 1992; KUTSCHERA, 1994), was eine Untersuchung des Al-Einflusses auf den Zellwand-pH in der Elongationszone interessant erscheinen lässt.

Der Anteil an freiem Al^{3+} in der Bodenlösung ist stark pH-abhängig (MARTIN, 1988; KINRAIDE, 1991). Daher wäre in saurem Milieu die phytogene Erhöhung des pH-Wertes in der Rhizosphäre bzw. im Apoplasten ein gutes Mittel, die Konzentration der phytotoxischen Al-Spezies zu vermindern (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; DEGENHARDT *et al.*, 1998). Allerdings ist es schwierig, den pH-Wert des Apoplasten direkt zu bestimmen (DEGENHARDT *et al.*, 1998; PETERS *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2000). Mangels adäquater Methoden wurde der Zellwand-pH-Wert daher häufig aus pH-Veränderungen im Inkubationsmedium extrapoliert (siehe PETERS *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2000). Diese Vorgehensweise wird den Anforderungen an eine zuverlässige Messung bei weitem nicht gerecht (MIYASAKA *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2000). FELLE *et al.* (2000) offerieren eine Methode, bei der Ionenkonzentrationen mittels in den Apoplasten eingebrachter ionenselektiver Mikroelektroden mit hoher Genauigkeit gemessen werden können. Dieses System eignet sich jedoch aufgrund der mechanischen Empfindlichkeit sowie der hohen Anforderungen an die manuellen Fähigkeiten des Experimentators derzeit nicht für die Anwendung auf Fragestellungen, die eine große Anzahl an Messungen erfordern. Als Kompromiss bietet sich die Verwendung ionenselektiver Mikroelektroden, wie von PETERS und FELLE (1999) vorgeschlagen, direkt an der Wurzeloberfläche an. In der hier vorgestellten Arbeit wurde der pH-Wert im Abstand von 20 μm von der Wurzeloberfläche gemessen. In diesem Bereich ist der Einfluss des pH-Wertes im Perfusionsmedium auf die Messungen und Ionenfluxe relativ gering, während der Einfluss des Zellwandmilieus zunimmt (FELLE, 1998). Auf diese Weise geben die Messungen einen guten Aufschluss über die Verhältnisse in der Zellwand.

Das pH-Profil entlang der Wurzeloberfläche (0-5 mm von der Spitze) bestätigte mit seiner Alkalisierungszone im Bereich der apikalen 3 mm und deren Maximum

zwischen 0,6 und 1,6 mm (**Abb. 22**) die von PILET *et al.* (1983), COLLINGS *et al.* (1992), FELLE (1998) sowie PETERS und FELLE (1999) publizierten Ergebnisse. Es ist bemerkenswert, dass das pH-Profil nur geringe Abhängigkeit vom pH-Wert im Inkubationsmedium zeigt. Während in dieser Arbeit bei pH 4,5 gearbeitet wurde, betrug der pH-Wert der Perfusionslösung 6,8 bei PILET *et al.* (1983) bzw. 7,9 bei FELLE (1998). PETERS und FELLE (1999) variierten den pH-Wert der Inkubationslösung zwischen 4,2 und 7,8. Die Tatsache, dass die Wurzeln dieses pH-Profil auch nach Adaptation an niedrige pH-Werte über 24 h aufrechterhielten, zeigt, dass es sich nicht um einen transienten, versuchsbedingten Effekt sondern um einen gerichteten physiologischen Prozess handelt (FELLE, 1998; PETERS und FELLE, 1999). Dabei ist zu beachten, dass die Maiswurzel in der Lage ist, in Abhängigkeit vom externen pH-Wert, bestimmte apikale Zonen je nach Bedarf anzusäuern oder zu alkalisieren. Die Aufrechterhaltung des pH-Profiles ist demnach als ein wichtiger physiologischer Adaptationsmechanismus zu beurteilen, der für die Wurzelfunktionen maßgeblich ist (FELLE, 1998; PETERS und FELLE, 1999).

MIYASAKA *et al.* (1989), RYAN *et al.* (1992) und COLLINGS *et al.* (1992) erklärten das pH-Profil entlang der Rhizoplane von Weizen und Mais anhand entsprechender endogener Ionenfluxe entlang der Wurzelspitze. MILLER und GOW (1989a) demonstrierten einen Zusammenhang zwischen der Zirkulation endogener Ionenfluxe und dem Wachstum und der Entwicklung der Wurzelspitze. Sie zeigten an 12 monokotylen und dikotylen Pflanzenarten einen einwärtsgerichteten Strom (Nettoinflux von Kationen bzw. Nettoefflux von Anionen) an der Wurzelspitze im Bereich der meristematischen und Elongationszone sowie einen auswärtsgerichteten Strom (Nettoefflux von Kationen bzw. Nettoinflux von Anionen) in basaleren, stärker ausdifferenzierten Wurzelzonen. Sie konnten an Mais zeigen, dass die in die Wurzelspitze eintretenden Ströme in ihrer Stärke positiv mit dem Wachstum korreliert waren (MILLER und GOW, 1989b). In ihrem Vergleich zweier unterschiedlich Al-resistenter Weizengenotypen konnten RYAN *et al.* (1992) allerdings keinen Kausalzusammenhang zwischen dem Einfluss von Al auf die endogenen Ströme und der Al-induzierten Hemmung des WLW im Al-sensitiven Genotyp feststellen. COLLINGS *et al.* (1992) diskutierten die Rolle dieser Ströme in der Transduktion des Gravistimulus in Mais von der Wurzelhaube zur Elongationszone. Indem sie K^+ , Na^+ , Ca^{2+} oder Cl^- aus der Inkubationslösung entfernten bzw. Lanthan oder Nifedipine als Calciumkanalinhibitoren hinzugaben, konnten sie in Übereinstimmung mit RYAN *et al.* (1992) Protonen als Hauptla-

Träger dieser Ströme identifizieren. Ca^{2+} -Influx und Cl^- -Efflux trugen ebenfalls in geringerem Maße zu diesen Strömen bei (IWABUCHI *et al.*, 1989; RYAN *et al.*, 1992).

Bei einem pH-Wert in der Rhizosphäre von 4,5 führt ein Anstieg um 0,1 bis 0,2 Einheiten zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität an freiem Al^{3+} (MARTELL und MOTEKAIKIS, 1989; KINRAIDE, 1991). Die Hypothese, dass die phytogene Erhöhung des Rhizosphären-pH-Wertes Al-Resistenz vermittelt (TAYLOR, 1991; KOCHIAN, 1995; DEGENHARDT *et al.*, 1998), konnte von MIYASAKA *et al.* (1989) an zwei unterschiedlich Al-resistenten Weizengenotypen jedoch nicht bestätigt werden. Auch mit dem in Abschnitt 3.4 vorgestellten pH-Profil entlang der Rhizoplane ist sie schwer in Übereinstimmung zu bringen. Während die Zone mit dem höchsten Oberflächen-pH-Wert (und somit der geringsten Konzentration an freiem Al^{3+}) am Al-empfindlichsten ist, zeigt die Elongationszone keine messbare Al-Empfindlichkeit, während die Konzentration an freiem Al^{3+} dort, aufgrund des niedrigen pH-Wertes, wesentlich höher ist (siehe auch **Abb. 24**). Ein Grund für die hohe Al-Empfindlichkeit im Bereich der Alkalisierungszone könnte eine geringere Konkurrenz zwischen Protonen und Al^{3+} um negative apoplastische Bindungsstellen und somit ein stärkerer Al-Einfluss sein (GRAUER und HORST, 1992; KINRAIDE, 1993).

Aluminium-Behandlung über den gesamten Apex bzw. die 1-2 mm Zone führte zu einer deutlichen Abnahme des pH-Wertes in der Alkalisierungszone innerhalb von 15 min Behandlung (**Abb. 23**). Dieser Effekt blieb während der folgenden 45 min Behandlung konstant (ATP-Y) bzw. verstärkte sich noch weiter (Lixis). Ein Anstieg des Rhizosphären-pH-Wertes, wie von DEGENHARDT *et al.* (1998) an einer Al-resistenten *Arabidopsis*-Mutante gezeigt, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Allerdings war die Abnahme des pH-Wertes beim Al-resistenten Genotyp deutlich geringer als beim Al-sensitiven. Diese Differenz resultierte zwar nach 1 h Behandlung in einer geringeren Al^{3+} -Aktivität in diesem Bereich des resistenten Genotyps ATP-Y (**Abb. 24**), ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht für die Unterschiede in der Al-Resistenz verantwortlich. Die genotypischen Unterschiede stellen eher die Konsequenz als die Ursache von Unterschieden in der Al-Resistenz dar. Diese Ansicht wird auch von MIYASAKA *et al.* (1989) geteilt, die Ionenfluxe und Oberflächen-pH-Werte an zwei unterschiedlich Al-resistenten Weizengenotypen untersucht haben.

Die Tatsache, dass spezifische Al-Behandlung der 1-2 mm Zone zu einer Abnahme des pH-Wertes in der Elongationszone führte, während direkte Behandlung derselben kaum einen Einfluss auf den pH-Wert hatte (**Abb. 25**), deutet auf eine

Weiterleitung des Al-Signals aus der besonders Al-empfindlichen Zone an die Elongationszone hin (siehe Abschnitt 4.5).

Für die starke pH-Wert-Erhöhung in der Alkalisierungszone in der Kontrollbehandlung können die folgenden Ursachen maßgeblich sein: (a) Eine verstärkte Anionenaufnahme, z.B. in Form eines Protonen/Anionen Symportsystems, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen von COLLINGS *et al.* (1992), RYAN *et al.* (1992), FELLE (1994&1998) sowie PETERS und FELLE (1999) steht. (b) Verstärkte Respiration und damit Abgabe von HCO_3^- (RYAN *et al.*, 1992), was in Übereinstimmung mit der hohen Stoffwechselaktivität in diesem Wurzelbereich steht. Im sauren apoplastischen Mileu würde HCO_3^- protoniert werden und somit zu einer lokalen Abnahme der Konzentration an freien Protonen führen. (c) Verstärkte Abgabe der Anionen organischer Säuren, die freie Protonen im Apoplasten ebenfalls binden und damit den pH-Wert an der Wurzeloberfläche erhöhen könnten (JONES, 1998; COCKER *et al.*, 1998). Allerdings müssten dies Anionen mit geringer Kapazität zur Komplexbildung und damit Detoxifizierung von Al sein, da die Alkalisierungszone in Übereinstimmung mit der am stärksten Al-empfindlichen Zone steht (SIVAGURU und HORST, 1998; SIVAGURU *et al.*, 1999a) und das Kontroll-pH-Profil beider Genotypen trotz unterschiedlicher Al-Resistenz übereinstimmte.

Die Kapazität des Al-resistenten Genotyps zur besseren Aufrechterhaltung der Alkalisierung kann durch zwei Faktoren erklärt werden: (a) Die physiologischen Mechanismen für die Erzeugung und Aufrechterhaltung der Alkalisierung sind im Al-resistenten Genotyp weniger stark durch Al gestört (MIYASAKA *et al.*, 1989; RYAN *et al.*, 1992). Nach FELLE (1998) und PETERS und FELLE (1999) ist die Regulation des apoplastischen pH-Wertes neben der H^+ -ATPase Aktivität von Kationenkanälen in der Plasmamembran abhängig. Die von GASSMANN und SCHROEDER (1994), DING *et al.* (1993), HUANG *et al.* (1994&1996) sowie PIÑEROS und TESTER (1995) demonstrierte hemmende Wirkung von Al auf K^+ - sowie Ca^{2+} -Kanäle könnte damit die Abflachung des Alkalisierungsbereiches teilweise erklären. (b) Der Genotypenunterschied ist auf den oben erwähnten Prozess der Exsudation organischer Anionen aus der sensitiven Zone zurückzuführen, der dann beim Al-resistenten Genotyp stärker ausgeprägt wäre. Dies wird durch den Befund gestützt, dass die Al-induzierte Gesamtexsudationsrate organischer Anionen des Al-resistenten Genotyps ATP-Y höher als die des Al-sensitiven Lixis war (Abschnitt 3.6). Anionen mit geringer Affinität gegenüber Al^{3+} wie Succinat und *trans*-Aconitat könnten im Apoplasten

protoniert werden und so zu einer lokalen Absenkung der Protonenkonzentration führen.

Die Regulation des Zellwand-pH-Wertes ist von großer Bedeutung für das Streckungswachstum von Pflanzenzellen (HAGER, 1971; RAYLE und CLELAND, 1992; ZIESCHANG *et al.*, 1993; KUTSCHERA, 1994). Dies spiegelt sich in den vorgestellten pH-Profilen wieder, in denen der pH-Wert in der Spitze (0-2 mm) bei geringer Zellstreckung am höchsten, im Bereich der Elongationszone am geringsten ist (**Abb. 22**). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von PILET *et al.* (1983) an Mais sowie ZIESCHANG *et al.* (1993) an *Phleum*. Eine direkte Ursächlichkeit Al-induzierter Änderungen des Zellwand-pH-Wertes in der Elongationszone für die Al-induzierte Hemmung des WLW erscheint jedoch unwahrscheinlich. Möglicherweise führt die geringe pH-Wert-Absenkung in der Elongationszone jedoch dazu, dass der optimale pH-Bereich bestimmter an der Zellwandauflockerung beteiligter Enzyme und Substanzen wie Xyloglucan-Endotransglycosylasen oder Expansine verlassen wird (MCQUEEN-MASON *et al.*, 1992; COSGROVE, 1997, 1998&1999). Die Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass die Ansäuerung der Zellwand nur einen Teilaspekt des Streckungswachstums darstellt und weitere Faktoren regulierend wirken (PETERS und FELLE, 1991&1999; PRITCHARD, 1994; COSGROVE, 1998).

4.5 Einfluss von Al auf die IES-Homöostase in der Wurzelspitze

Spezifische Al-Behandlung der 1-2 mm Zone, die selber nur unbedeutend zum Wurzellängenwachstum beiträgt (**Abb. 7**), führte innerhalb kurzfristiger Al-Behandlung von 1 h zu einer deutlichen Hemmung des WLW in der gesamten Elongationszone (**Abb. 8**). Ein Hineinwachsen in die Agaroseblöckchen kann für diesen Effekt nicht verantwortlich sein, da die Wachstumsrate bei den Experimenten zum Anteil spezifischer 1-mm Zonen an der Gesamtstreckung in der Al-Behandlung unter 1 mm h^{-1} betrug. Eine Signalweiterleitung des Al-Signals aus der 1-2 mm Zone zur Elongationszone erscheint daher notwendig, um die räumliche Trennung der Orte von Al-Perzeption und –Wirkung zu erklären. Als Botenstoffe mit Fernwirkung könnten Phytohormone an dieser Weiterleitung beteiligt sein. Auxine werden in der Pflanze mit einer Geschwindigkeit von etwa $5\text{-}20 \text{ mm h}^{-1}$ transportiert (LOMAX *et al.*, 1995) und wären somit theoretisch in der Lage, die schnelle Weiterleitung des Al-Signals zu vermitteln.

Koordinierter Auxintransport spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Wurzelwachstum, Morphologie und Graviperzeption (HASENSTEIN und EVANS, 1988; KAUFMANN *et al.*, 1995; EVANS und ISHIKAWA, 1997; RUEGGER *et al.*, 1997; MÜLLER *et al.*, 1998; REED *et al.*, 1998). In der Maiswurzel zeigten MEUWLY und PILET (1991), dass Indol-3-Essigsäure (IES) in einer Zone im Abstand von 1-3,5 mm von der Spitze ein Wachstumssignal induzierte, das basipetal in Richtung der 3,5-6 mm Elongationszone transportiert wurde. EVANS und ISHIKAWA (1997) beschrieben eine Beteiligung von Auxinen bei der Transduktion des Gravitations-Signals von der distalen Elongationszone (entspricht der 1-2 mm Zone) zur Hauptelongationszone mittels basipetalen Transportes. HASENSTEIN und EVANS (1988) konnten eine Hemmung des basipetalen Transportes von IES in der Maiswurzelspitze durch AI demonstrieren.

Da die Auxinwirkung stark dosisabhängig ist, ist die Auxin-Homöostase in der Pflanze komplex reguliert und die Orte von Synthese und Wirkung räumlich getrennt (NORMANLY, 1997). Indol-3-Essigsäure, das natürliche Auxin mit der größten Abundanz, wird im Sprossmeristem und in den Blattprimordien gebildet (LOMAX *et al.*, 1995; BARTEL, 1997). Die Verteilung an die Zielgewebe wird über polare Transportströme vermittelt (LOMAX *et al.*, 1995; ESTELLE, 1998). Der akropetale Transport in die Wurzelspitze erfolgt im Zentralzylinder. Im Meristem der Wurzelspitze kommt es zur lateralen Verteilung. In einem basipetalen Strom wird IES dann innerhalb der Rinde und der Rhizodermis in Richtung der Elongationszone transportiert (HASENSTEIN und EVANS, 1988; ESTELLE, 1998; REED *et al.*, 1998). Auf diese Weise stellt sich in den unterschiedlichen Geweben eine für die jeweilige Funktion notwendige IES-Homöostase ein (KERK und FELDMANN, 1994). Neben der Mobilität in konjugierter Form im Phloem (LOMAX *et al.*, 1995; NORMANLY, 1997) erfolgt der gerichtete, polare Transport von IES von Zelle zu Zelle entsprechend der zuerst 1974 von RUBERY und SHELDRAKE postulierten chemiosmotischen Hypothese des polaren Auxintransportes (siehe LOMAX *et al.*, 1995). Indol-3-Essigsäure ist eine schwache Säure mit einer Carboxylgruppe und einem pK_s von 4,7. Im Apoplasten (pH zwischen 5 und 6; FELLE, 1998) liegt sie hauptsächlich protoniert vor. Das undissoziierte Molekül ist membranpermeabel, gelangt aber zusätzlich über einen $2H^+/IAA^-$ Symport (RÜCK *et al.*, 1993) („Auxin Uptake Carrier“) ins Cytosol. Unter Bedingungen cytosolischer pH-Werte dissoziiert IES und das Anion wird aufgrund seiner geringen Membranpermeabilität akkumuliert (LOMAX *et al.*, 1995). Der Efflux erfolgt über ein IAA-Efflux Carrier System (siehe ESTELLE, 1998 und Referenzen darin), das durch Inhibitoren des polaren IES-Transportes wie 2,3,5-Triiodobenzoessäure (TIBA) und das

synthetische Phytotropin N-1-Naphthylphthalamsäure (NPA) allosterisch gehemmt wird (BERNASCONI *et al.*, 1996). Die Polarität der Transportströme wird auf die asymmetrische Anordnung des Efflux-Carriers in den Zellen zurückgeführt (LOMAX *et al.*, 1995).

Die Hemmung des polaren, speziell des basipetalen, Auxinflusses wurde in Verbindung gebracht mit starken Effekten auf Wurzelwachstum (KERK und FELDMAN, 1995; REED *et al.*, 1998) und -morphologie. Hierzu gehören Schwellungen der Wurzelspitze durch unkontrollierte perikline Zellteilung (BLANCAFLOR und HASENSTEIN, 1995; RUEGGER *et al.*, 1997) als Konsequenz von Auxinakkumulation im Bereich der ersten 2 mm der Wurzelspitze sowie die Unterdrückung der Gravitationsantwort (MÜLLER *et al.*, 1998; HASENSTEIN *et al.*, 1999) aufgrund von nicht ausreichender Auxinakkumulation und damit ausbleibender lateraler Hemmung des WLW auf der Unterseite der sich biegender Wurzel. Ähnliche Effekte auf WLW und Morphologie konnten an mit AI behandelten Wurzeln demonstriert werden (BLANCAFLOR *et al.*, 1998; SIVAGURU *et al.*, 1999a; VÁZQUEZ *et al.*, 1999). HASENSTEIN und EVANS (1988) zeigten deutlich, dass der basipetale Transport von [³H]-IES in Maiswurzelspitzen durch AI gehemmt wurde.

Indol-3-Essigsäure ist als Regulativ an einer Reihe physiologischer Prozesse in allen Pflanzenorganen beteiligt (DAVIES, 1995; NORMANLY, 1997; SITBON und PERROT-RECHENMANN, 1997; PHILIPPAR *et al.*, 1999), wobei die eigentlichen Mechanismen der Auxinperzeption und -Signaltransduktion noch wenig bekannt sind (HENDERSON *et al.*, 1997). Die Problematik wird durch die Tatsache verstärkt, dass (a) die Verhältnisse unterschiedlicher Phytohormone zueinander möglicherweise von größerer Bedeutung für die Wirkung sind als die absoluten Mengen einzelner Hormone und es (b) zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Synthese kommt (NORMANLY, 1997). Dabei variiert die IES-Sensitivität zwischen unterschiedlichen pflanzlichen Geweben in hohem Maße (KERK *et al.*, 2000). Während mikromolare Konzentrationen das Wachstum abgeschnittener Coleoptilen fördern, können sie die Streckung der Wurzel völlig hemmen (EVANS und ISHIKAWA, 1997; BÜNTEMEYER *et al.*, 1998).

Da die wachstumsstimulierende Wirkung von IES stark von der extern angebotenen Konzentration (EVANS *et al.*, 1980) und der Streckungsrate der Wurzel abhängt (MEUWLY und PILET, 1991), wurde in Vorversuchen eine wachstumsfördernde Konzentration (0,1 µM im Agarosegel mit Nährlösung; pH 4,3) ermittelt (**Abb. 1**). Die Tatsache, dass diese Konzentration in der Literatur als wachstumshemmend beschrieben wurde (BÜNTEMEYER *et al.*, 1998), zeigt die bei der Arbeit mit IES speziell

an der Wurzel auftretende Problematik, dass eine ganze Reihe an Faktoren wie Alter und Konstitution der Pflanzen (MEUWLY und PILET, 1991), Unversehrtheit der Wurzel (im Gegensatz zu Untersuchungen an abgeschnittenen Segmenten), Dauer der Behandlung sowie Form der Applikation (Flüssigmedium, Gel, Zusammensetzung der Nährlösung, pH-Wert) einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Zudem reagieren Pflanzen auf externe IES-Applikation durch Überführung derselben aus der aktiven, freien Form in inaktive Konjugate, die bis zu 90 % des Gesamtgehaltes an IES im Gewebe ausmachen können (NORMANLY, 1997; BARRATT *et al.*, 1999). Dieser Aspekt erschwert den Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen noch weiter, da der Einfluss exogener IES auf die endogenen Gehalte nur durch deren Analyse eindeutig festzustellen ist. Das wiederum ist bei einer hohen räumlichen Auflösung und den daraus resultierenden geringen Gewebemengen schwierig (EDLUND *et al.*, 1995; NORMANLY, 1997; REED *et al.*, 1998; RIBNICKY *et al.*, 1998; PHILIPPAR *et al.*, 1999) und konnte im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

In den Kontrollbehandlungen führte die externe Applikation von IES sowohl an die 0-1 mm Zone (MZ) als auch die Elongationszone (EZ) zu einer Steigerung der Streckungsrate gegenüber nicht mit IES behandelten Kontrollen, was (a) die Aufnahme und (b) den basipetalen Transport von extern applizierter IES bestätigt (**Abb. 26**). Bei Al-Behandlung der 1-2 mm Zone führte extern applizierte IES bei Behandlung der EZ zu einer Kompensation der Al-induzierten Hemmung des WLW. Wurde IES an der MZ appliziert, blieb dieser Effekt aus. Als Positivkontrolle diente TIBA. COLLINGS *et al.* (1992) konnten eine 40-60 % TIBA-induzierte Wachstumshemmung der Primärwurzel von Mais zeigen. Die in der hier vorgestellten Arbeit gezeigte TIBA-induzierte Wachstumshemmung entsprach der durch Al herbeigeführten, allerdings ohne Genotypenunterschied. Dieses Ergebnis wird von den Resultaten aus den Experimenten zur Aufnahme und Verteilung Tritium-markierter IES bestätigt (**Abb. 27&28**). TIBA oder NPA, an der 1-2 mm Zone appliziert, führten innerhalb von 30 min bei beiden Genotypen zu einem gegenüber der Kontrollbehandlung signifikant verminderten basipetalen Transport von markierter IES aus der Applikationszone (MZ) in die Elongationszone (3-5 mm). Gleichzeitig deutete sich eine Akkumulation von IES im Bereich von 0-2 mm an, was die Inhibition des IES-Efflux aus den Zellen widerspiegelt (LOMAX *et al.*, 1995). Aluminium führte zu vergleichbaren Effekten, die in Übereinstimmung mit der Al-Resistenz beim Al-resistenten Genotyp schwächer ausgeprägt waren. In Anlehnung an STINEMETZ (1995) sowie HASENSTEIN und EVANS (1988) wurde bei der Detektion von Tritium

davon ausgegangen, dass markierte IES transportiert wurde und somit transportiertes Tritium mit transportierter IES identisch ist.

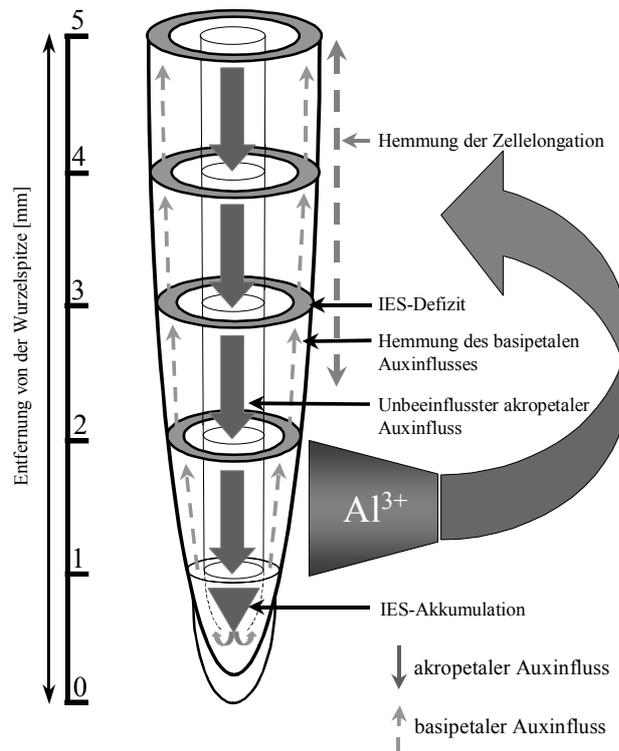


Abb. 49: Schema zur hypothetischen Wirkung von Al auf die polaren Auxintransportströme in der Maiswurzelspitze (modifiziert nach HASENSTEIN und EVANS, 1988; LOMAX *et al.*, 1995; RUEGGER *et al.*, 1997; ESTELLE, 1998; MÜLLER *et al.*, 1998; SIVAGURU *et al.*, 2000b).

Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Übermittlung des Al-Signals von der Al-sensitiven Zone zur Elongationszone über die Hemmung des basipetalen IES Transportstromes erfolgt. In **Abb. 49** ist ein Schema für die hypothetische Wirkung von Al auf die IES-Transportströme in der Wurzelspitze dargestellt. Durch die hemmende Wirkung von Al auf den basipetalen Rücktransport von IES aus der Spitze in die Elongationszone bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit des akropetalen Transportstromes (HASENSTEIN und EVANS, 1988) ist die für die Zellteilung in der MZ sowie für die Zellstreckung in der EZ notwendigen IES-Verteilung innerhalb des Gewebes (RUEGGER *et al.*, 1997) gestört. Während Akkumulation von IES in der Wurzelspitze zu den von BLANCAFLOR und HASENSTEIN (1995) sowie SIVAGURU *et al.* (1999a) beschriebenen morphologischen Veränderungen in diesem Bereich führt, ist die Hemmung der Zellstreckung in der EZ vermutlich auf suboptimale IES-Konzentrationen in diesem Bereich zurückzuführen. Eine mögliche Bedeutung von IES bei der Transduktion des Al-Signals wird durch die genotypischen Unterschiede in der Al-Sensitivität des basipetalen Transportes untermauert. Die unterschiedliche Wirkung von Al auf die beiden polaren Transportströme lässt sich entweder darüber

erklären, dass diesen unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen (LOMAX *et al.*, 1995) oder, bei Annahme desselben Mechanismus, der akropetale Transport im Zentralzylinder nicht gestört ist, da Al nach 1 h Behandlung noch nicht bis in diesen vorgedrungen ist.

In diesem hypothetischen Modell der Al-Wirkung auf den basipetalen IES-Transport in der Wurzelspitze bleibt der eigentliche Mechanismus der Al-Wirkung Objekt der Spekulation. Unterschiedliche Mechanismen bzw. eine Kombination derselben erscheinen möglich (siehe auch SIVAGURU *et al.*, 2000b): (1) Direkte Wirkung von Al auf den IES-Efflux Carrier ähnlich der NPA-Wirkung (RUEGGER *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 1997b). (2) Al-induzierte Veränderungen des Cytoskeletts in der Elongationszone (BLANCAFLOR *et al.*, 1998) bzw. der 1-2 mm Zone (SIVAGURU *et al.*, 1999a), wodurch dessen Funktionsweise im polaren Auxintransport beeinträchtigt wird (BLANCAFLOR und HASENSTEIN, 1995). (3) Al-Aktivierung des oxidativen IES-Katabolismus durch Peroxidasen bzw. Oxidasen (LAGRIMINI *et al.*, 1997; NORMANLY, 1997; KERK *et al.*, 2000). (4) Al-induzierte Änderungen der Ca-Homöostase, die sich auf den Auxinfluss auswirken könnten (HASENSTEIN und EVANS, 1988; YOUNG und EVANS, 1994; SANDERS *et al.*, 1999). (5) Hemmung des für den von MORRIS und ROBINSON (1998) postulierten hohen „Turnover“ des Auxin-Efflux-Carriers nötigen Vesikeltransportes zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran durch Al (BENNET *et al.*, 1985; PUTHOTA *et al.*, 1991; VITORELLO und HAUG, 1999). (6) Verminderung des symplastischen IES-Transportes über Plasmodesmata aufgrund Al-induzierter Calloseablagerungen in diesen Bereichen der Zellwand wie von SIVAGURU *et al.* (2000a) vorgeschlagen.

4.6 Die Exsudation der Anionen organischer Säuren als Mechanismus der Al-Resistenz

Die Ergebnisse zur Al-Akkumulation in dieser Arbeit (Abschnitt 3.3.1) und der Literatur (RINÓN und GONZALES, 1992; TICE *et al.*, 1992; DELHAIZE *et al.*, 1993a; LLUGANY *et al.*, 1994; LAZOF *et al.*, 1994b; RENGEL, 1996; MOON *et al.*, 1997; SAMUELS *et al.*, 1997; LARSEN *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2000) weisen auf einen Resistenz vermittelnden Mechanismus der Al-Exklusion hin. Die Anionen einiger organischer Säuren binden Aluminium mit hoher Affinität. Die entstehenden Komplexe sind nicht bzw. nur gering phytotoxisch und verfügen über hohe Stabilitätskonstanten (HUE *et al.*, 1986; OWNBY und POPHAM, 1989; JONES, 1998).

Wurden Wurzelspitzen intakter Maiskeimlinge im Agarosegel mit Nährlösung und einem Gemisch aus Al und verschiedenen organischer Anionen im molaren Verhältnis 1:1 behandelt, so führten Citrat und Oxalat zu einer deutlichen Verminderung der Al-induzierten Hemmung des WLW beim Al-sensitiven Genotyp (**Abb. 29**; siehe auch HUE *et al.*, 1986; OWNBY und POPHAM, 1989; JONES, 1998; MA, 2000). Die übrigen Anionen führten in diesem Mischungsverhältnis entweder zu gar keiner oder nur einer leichten Kompensation des Al-Effektes. Die unterschiedliche Bindungsaffinität ist abhängig von der strukturellen Konfiguration, d.h. der relativen Position der OH und COOH Gruppen im Molekül (HUE *et al.*, 1986). Die stabilsten Al-haltigen Komplexe sind dabei 5 oder 6 Bindungen enthaltende Ringstrukturen, wie sie von Citrat und Oxalat mit Al eingegangen werden. Auch wenn der Versuchsansatz mit externem Zusatz organischer Anionen artifiziell ist, so zeigt er doch deutlich das Potential von speziell Citrat und Oxalat zur Verminderung der Al-Toxizität.

In einer Reihe von Untersuchungen an unterschiedlichen Pflanzenarten konnte eine positive Korrelation zwischen Al-Resistenz und der Exsudation organischer Anionen gezeigt werden (Reviews: DELHAIZE und RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995; JONES, 1998; MA, 2000). Dabei unterscheiden sich die Arten bezüglich des am stärksten ausgeschiedenen Anions deutlich. So wird von Weizen vornehmlich Malat (DELHAIZE *et al.*, 1993b; RYAN *et al.*, 1995a&b; PELLET *et al.*, 1996), von Bohne, Mais, *Triticale* und Sojabohne Citrat (MIYASAKA *et al.*, 1991; PELLET *et al.*, 1995; JORGE und ARRUDA, 1997; LI *et al.*, 2000b; YANG *et al.*, 2000) und von Buchweizen und Taro Oxalat (MA *et al.*, 1997; MA und MIYASAKA, 1998; ZHENG *et al.*, 1998a) ausgeschieden.

Alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente zum Einfluss von Al auf die Exsudation organischer Anionen, deren Gehalte im Gewebe und die Enzymaktivitäten der an ihrem Metabolismus beteiligten Enzyme wurden nach Möglichkeit stets zwischen 13 und 15 Uhr gestartet, um vergleichbare physiologische Stadien innerhalb der diurnalen Rhythmik des Carbonsäuremetabolismus vergleichen zu können (siehe SCHEIBLE *et al.*, 2000).

4.6.1 Charakterisierung und Lokalisation der Exsudation

Aluminiumapplikation führte innerhalb von 2 h zu einer deutlichen Steigerung der Exsudationsrate organischer Anionen im Allgemeinen und Citrat und Malat im Speziellen aus dem Gesamtwurzelsystem 4 Tage alter Maiskeimlinge (**Abb. 30**). Die

Exsudationsrate war positiv mit der Al-Resistenz der Genotypen korreliert. Dies steht in Übereinstimmung mit den Studien von PELLET *et al.* (1995) sowie JORGE und ARRUDA (1997). Während die starke Exsudation von Succinat und *trans*-Aconitat für die Al-Problematik unerheblich ist, fiel doch die Tatsache auf, dass Malat in etwa zu denselben Anteilen wie Citrat exsudiert wurde. Dies deutete sich bereits in den Arbeiten von PELLET *et al.* (1995) sowie JORGE und ARRUDA (1997) an. Ein direkter Vergleich mit diesen Arbeiten ist jedoch nicht zu ziehen, da (a) die Pflanzen in den genannten Studien älter und (b) die Inkubationszeiten dort deutlich über den hier angewandten lagen, also keine Aussage über die kurzfristige Al-Antwort zulassen. Der Beitrag von Malat zur Verminderung der Al-Toxizität im Vergleich zu Citrat ist aufgrund der relativ geringen Affinität zu Al als gering einzustufen. Während Citrat in äquimolaren Mengen ausreicht, um Al zu detoxifizieren (DELHAIZE *et al.*, 1993b; MA, 2000), sind weitaus höhere Malat:Al Verhältnisse von zum Teil weit über 6:1 nötig, um einen vergleichbaren Effekt zu erreichen (DELHAIZE *et al.*, 1993b; BASU *et al.*, 1994; RYAN *et al.*, 1995b; ZHENG *et al.*, 1998b).

Um die Spezifität der Aktivierung der Exsudationsantwort für Al zu untersuchen, wurde Al in der Inkubationslösung durch La ersetzt. Dieses war unter den experimentellen Bedingungen jedoch nicht in der Lage, die Exsudation zu induzieren (**Abb. 35**), was Beobachtungen von DELHAIZE *et al.* (1993b) und RYAN *et al.* (1995a) an Weizen sowie ZHENG *et al.* (1998a) and Buchweizen bestätigt.

Aufgrund der unterschiedlichen Al-Sensitivität verschiedener apikaler Wurzelzonen (siehe auch RYAN *et al.*, 1993; SIVAGURU und HORST, 1998) waren bezüglich der Exsudation ebenfalls zonale Unterschiede zu erwarten. Zudem konnten DELHAIZE *et al.* (1993b) sowie RYAN *et al.* (1995a&b) für Weizen die Hauptexsudationszone auf die apikalen 3 mm eingrenzen. Allerdings basierten diese Untersuchungen auf der Verwendung abgeschnittener Wurzelspitzen oder auf Experimenten, in denen die Wurzeln horizontal wuchsen. Das in der hier vorgestellten Arbeit entwickelte Versuchssystem für die Sammlung von Exsudaten aus der Wurzelspitze intakter Maiskeimlinge ermöglichte ungestörtes vertikales Wurzelwachstum. Hierdurch konnten die bei horizontalem Wachstum der Wurzel auftretenden Änderungen der Phytohormonbalance (HASENSTEIN und EVANS, 1988), der Ionenfluxe und Oberflächen pH-Gradienten (COLLINGS *et al.*, 1992), des Membranpotentials (ISHIKAWA und EVANS, 1990b) sowie des apoplastischen pH-Wertes (PETERS und FELLE, 1999) vermieden werden.

Bei Sammlung des Exsudates aus 10- bzw. 5-mm Wurzelspitzen intakter 3 Tage alter Maiskeimlinge wurden die Ergebnisse für die Gesamtexsudationsrate sowie jene von

Citrat und Malat bei Exsudation aus dem gesamten Wurzelsystem qualitativ und quantitativ bestätigt (Abschnitt 3.6.1). Der Hauptanteil der Al-induzierten Exsudation organischer Anionen erfolgt also aus den apikalen 5 mm der Primärwurzel und schließt damit die 1-2 mm Zone ein. Die Gesamtexsudationsrate sowie die von Citrat und Malat waren im Bereich zwischen 0 und 100 μM Al im Inkubationsmedium positiv mit der Al-Konzentration korreliert (**Abb. 31**). Eine positive Beziehung zwischen externer Al-Konzentration und der Exsudationsrate konnte für Citrat und Malat aus Mais von JORGE und ARRUDA (1997), aus Roggen von LI *et al.* (2000b), aus *Triticale* von MA *et al.* (2000) sowie für Malat aus Weizen von DELHAIZE *et al.* (1993b), BASU *et al.* (1994), RYAN *et al.* (1995a) sowie PELLET *et al.* (1996) gezeigt werden. Bereits 10 μM Al stimulierten die Exsudation (siehe auch DELHAIZE *et al.*, 1993b). Ab einer Konzentration von 50 μM Al lag die Exsudationsrate des Al-sensitiven unter der des Al-resistenten Genotyps. Wurde die Al-Konzentration über 100 μM hinaus gesteigert, so stieg die Exsudationsrate nicht mehr weiter an (**Abb. 33**). Vielmehr deutete sich ein Sättigungseffekt bzw. eine Abnahme der Exsudationsrate an, was die Ergebnisse von BASU *et al.* (1994) an intakten Weizenwurzeln sowie RYAN *et al.* (1995a) an abgeschnittenen Weizenwurzelspitzen bestätigt.

Da das System zur Sammlung von Exsudat aus der Wurzelspitze intakter Keimlinge keine weitere Eingrenzung der Exsudationszone am intakten Objekt erlaubte, wurde die Exsudation aus abgeschnittenen 1-mm Wurzelsegmenten bestimmt. Trotz der erwarteten negativen Effekte des Heraustrennens der Segmente aus dem Gewebeverband auf deren Physiologie (BROUQUISSE *et al.*, 1991; VUČINIĆ und VULETIĆ, 1995; MEYER und WEISENSEEL, 1997; SAMUELS *et al.*, 1997) konnten abgeschnittene Wurzelspitzen wiederholt als einfaches System für Untersuchungen zu Al-Toxizität und -Resistenz verwendet werden (ZHANG und TAYLOR, 1989&1990; ZHANG *et al.*, 1994; RYAN *et al.*, 1995a&b). Neben der Trennung vom Gesamtorganismus mit den daraus resultierenden Folgen z.B. für den Phytohormonhaushalt und die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembranen in den der Schnittfläche angrenzenden Zelllagen ist das Auslaufen von Cytosol und Vakuolensaft in das Inkubationsmedium eine mögliche Fehlerquelle, die bei der Interpretation der an abgeschnittenen Wurzelsegmenten gewonnenen Ergebnisse beachtet werden muss. Aufgrund der gegenüber den Exsudationsmengen deutlich höheren Gewebegehalte der organischen Anionen waren hier besonders hohe Kontaminationen zu erwarten. Aus diesem Grund erfolgte nach dem Schneiden der Segmente und vor der eigentlichen Inkubation ein Waschschrift in Inkubationslösung ohne Al, durch den der durch Auslaufen

von Zellinhalten auftretende Fehler minimiert werden konnte (siehe auch RYAN *et al.*, 1995a). Trotzdem war der Efflux organischer Anionen in der Kontrollbehandlung deutlich (**Abb. 34**). Dennoch ließen sich Al-Effekte zeigen. Die Al-induzierte Stimulierung des Citratefflux war deutlich auf die apikalen 3-4 mm beschränkt und bestätigte die an intakten Pflanzen gezeigten genotypischen Unterschiede. Für die Gesamtexsudationsrate sowie die von Malat war eine derartige Lokalisation nicht möglich. Diese anscheinend widersprüchlichen Resultate lassen sich möglicherweise auf die unterschiedliche longitudinale (Abschnitt 3.6.5) sowie intrazelluläre Kompartimentierung der einzelnen organischen Säuren bzw. deren Anionen zurückführen. Hier ist eine Überlagerung des Al-Effektes durch Artefakte anzunehmen, die auf das Abschneiden und damit verbundene Auslaufen des Symplasten zurückzuführen sein kann. Dieser Befund wird zudem basalwärts durch die zunehmende Vakuolisierung der Zellen (die Rindenzellen der 1-2 mm Zone sind nur sehr schwach vakuolisiert; siehe hierzu PATEL *et al.*, 1990 und Referenzen darin) verstärkt, wodurch die durch Schnittverletzungen auftretenden Kontaminationen – bei Annahme von vakuolärer Speicherung organischer Anionen wie Malat (MARTINOIA und RENTSCH, 1994) – zunehmen. Neben den Schnittverletzungen ist auch eine direkte Schädigung exponierter Membranen durch Al zu erwarten (HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000), was das Auslaufen weiterer Zellen nach sich ziehen könnte.

4.6.2 Einfluss von Al auf den Carbonsäuremetabolismus

Carbonsäuren bzw. deren Anionen sind für die Pflanze wertvolle Kohlenstoffeinheiten (KOYAMA *et al.*, 2000). Voraussetzung für ihre Abgabe in den extrazellulären Raum ist daher eine über die Aufrechterhaltung der Zellbiochemie hinausreichende Abundanz. Die Abgabe kann nur solange aufrechterhalten werden wie der Stoffwechsel der betroffenen Zellen nicht gestört ist und die Zellen ausreichend mit Kohlenhydraten versorgt werden. Dieser Aspekt kann maßgeblich die Al-aktivierte Exsudation unterschiedlicher Anionen aus unterschiedlichen Pflanzenarten erklären (JONES, 1998; MA, 2000).

In der Literatur sind die Befunde zum Einfluss von Al auf die Gehalte organischer Säuren bzw. deren Anionen nicht einheitlich, was auf die unterschiedlichen Behandlungszeiträume und untersuchten Pflanzenarten zurückzuführen ist (MA, 2000). Ein weiterer Einflussfaktor ist die Frage, welche Wurzelbereiche analysiert wurden, da hier eine deutliche, von der jeweiligen Carbonsäure abhängige Zonierung

der Gehalte auftritt (Abschnitt 3.6.5; siehe auch RYAN *et al.*, 1995a). PELLET *et al.* (1995) sowie PINTRO *et al.* (1997) konnten in kompletten Maiswurzelsystemen nach 2 bzw. 7 Tagen Behandlung eine Al-induzierte Zunahme der Gehalte von Citrat, Malat, *trans*-Aconitat sowie der Summe aller detektierten Carbonsäuren zeigen, während die Gehalte an Isocitrat, Oxalat sowie Succinat vermindert waren. Allerdings ließen sich diese Effekte in beiden Studien nicht mit Al-Sensitivität bzw. -Resistenz in Verbindung bringen, was in Übereinstimmung mit den Schlussfolgerungen von LARSEN *et al.* (1998) steht, die in den Gehalten organischer Säuren in *Arabidopsis*-Wurzeln keinen Anhaltspunkt für deren Beteiligung an der differentiellen Al-Resistenz verschiedener *Arabidopsis*-Mutanten sahen. In einem wesentlich verfeinerten Ansatz zeigten DELHAIZE *et al.* (1993b), dass eine Al-Behandlung von 2 h keinen signifikanten Einfluss auf die Malatgehalte in 4 mm Wurzelapices einer Al-resistenten Weizenlinie hatte, während der Gehalt in einer Al-sensitiven Linie leicht abnahm.

In der Kontrollbehandlung zeigten die Genotypen bezüglich der Gehalte an organischen Anionen und deren Verteilung innerhalb des Wurzelapex mit Ausnahme von Malat keine deutlichen Unterschiede (**Abb. 37&38**). Das Verteilungsmuster entlang der Wurzelspitze für Citrat, 2-oxo-Glutarat, Succinat sowie Oxalat entsprach dem für Callosebildung (**Abb. 11**), Al-Akkumulation (**Abb. 14**) sowie die Gehalte von Mg und P (**Abb. 21**) gezeigten mit Maxima in der 1-2 mm Zone. Die Malatgehalte stiegen wie die K-Gehalte (**Abb. 21**) in gegenläufiger Tendenz von der Spitze her an, um ab dem 3. Millimeter gleich zu bleiben. Die Malatgehalte des Al-sensitiven lagen in der gesamten Wurzelspitze unter denen des Al-resistenten Genotyps. Auch wenn keine Informationen über die weitere Kompartimentierung innerhalb der Segmente vorliegen, scheint – unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die identischen Wachstumsraten der Genotypen in der Kontrolle (Abschnitt 3.1.1) eine ausreichende Versorgung beider mit Malat annehmen lassen – Genotyp ATP-Y über die höheren Malat-Reserven zu verfügen. Zudem waren die Malatgehalte von ATP-Y durch Al tendenziell gesteigert, was die Aufrechterhaltung des Nachschubes organischer Anionen für die Exsudation sichern könnte, während die Gehalte im Al-sensitiven Genotyp Lixis durch Al nicht beeinflusst wurden, dort also im Verlauf längerer Behandlung ein Mangel zu erwarten wäre.

Durch Al deutete sich bei beiden Genotypen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von PELLET *et al.* (1995) sowie PINTRO *et al.* (1997), eine Erhöhung des Gesamtgehaltes organischer Anionen an, der, wie schon die Exsudation, von Succinat und *trans*-Aconitat dominiert wurde. Diese Übereinstimmung spiegelt möglicherweise die

gute Permeabilität eines an der Exsudation beteiligten Anionenkanals für verschiedene im Cytosol lokalisierte organischen Anionen wieder (JONES, 1998). Während die Citratgehalte des Al-resistenten Genotyps ATP-Y durch Al nicht deutlich beeinflusst wurden, trat im Al-sensitiven Genotyp Lixis eine deutliche Abnahme, besonders in den apikalen 3 mm, auf (**Abb. 37**). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von DELHAIZE *et al.* (1993b) bezüglich der Gehalte von Malat in der Wurzelspitze isogener Weizenlinien unterschiedlicher Al-Resistenz. Er könnte die Beobachtung erklären, dass Lixis erst bei Al-Konzentrationen ab 50 μM weniger Citrat exsudierte als ATP-Y (**Abb. 31**): Hier scheint das ausgeschiedene Citrat nicht in ausreichendem Maße nachgebildet zu werden und wird zum limitierenden Faktor. Dieses Resultat deutet auf Stoffwechselstörungen im Al-sensitiven Genotyp Lixis hin, die möglicherweise in Zusammenhang stehen mit einer Al-induzierten Beeinträchtigung der Zellatmung im Allgemeinen (COLLIER *et al.*, 1993) sowie der Adenosintriphosphat-Bereitstellung aus den Mitochondrien im Speziellen (DELIMA und COPELAND, 1994; TONINELLO *et al.*, 2000).

Um die genotypischen Unterschiede in der Al-induzierten Exsudation von Citrat sowie der Änderung der Citratgewebegehalte in der Wurzelspitze besser erklären zu können, wurde der Einfluss von Al auf die spezifischen Aktivitäten von 5 Enzymen des Carbonsäuremetabolismus untersucht.

In **Abb. 50** ist ein schematisches Modell möglicher an der Bereitstellung von Malat und Citrat für die Exsudation beteiligter Stoffwechselprozesse dargestellt. Die Citrat-Synthase (CS) katalysiert im Citratzyklus die Kondensation von Oxalacetat mit dem Acetyl des Acetyl-CoA zu Citrat. Sie stellt daher, zusammen mit der Aconitase (ACO), die in zwei Schritten die Isomerisation von Citrat zu Isocitrat katalysiert, ein direktes Regulativ für die Bildung und den Abbau von Citrat dar (LI *et al.*, 2000b). Die Isocitratdehydrogenase (ICDH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-oxo-Glutarat. Sie tritt in Mitochondrien in einer NAD-abhängigen Form und in Cytosol, Plastiden und Mitochondrien in 4 verschiedenen Isoformen NADP-abhängig auf (GÁLVEZ *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2000b). Die NAD-Malatdehydrogenase (MDH) schließt, unter anderem, in Mitochondrien den Citratzyklus durch die Oxidation von Malat zu Oxalacetat als erneutem Akzeptor für den Acetylrest ab. Da der Citratzyklus nur ablaufen kann, wenn stets Oxalacetat regeneriert wird, erfordert die Abgabe von Intermediaten, beispielsweise durch Exsudation, ein Auffüllen der Lücke (JOHNSON *et al.*, 1994; HELDT, 1996). Eine dieser anaplerotischen Reaktionen wird

beispielsweise von der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) katalysiert. Diese carboxyliert Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat, das im Cytosol mittels der MDH wieder zu Malat reduziert oder direkt in die Mitochondrien transportiert werden kann (HELDT, 1996; HANNING *et al.*, 1999).

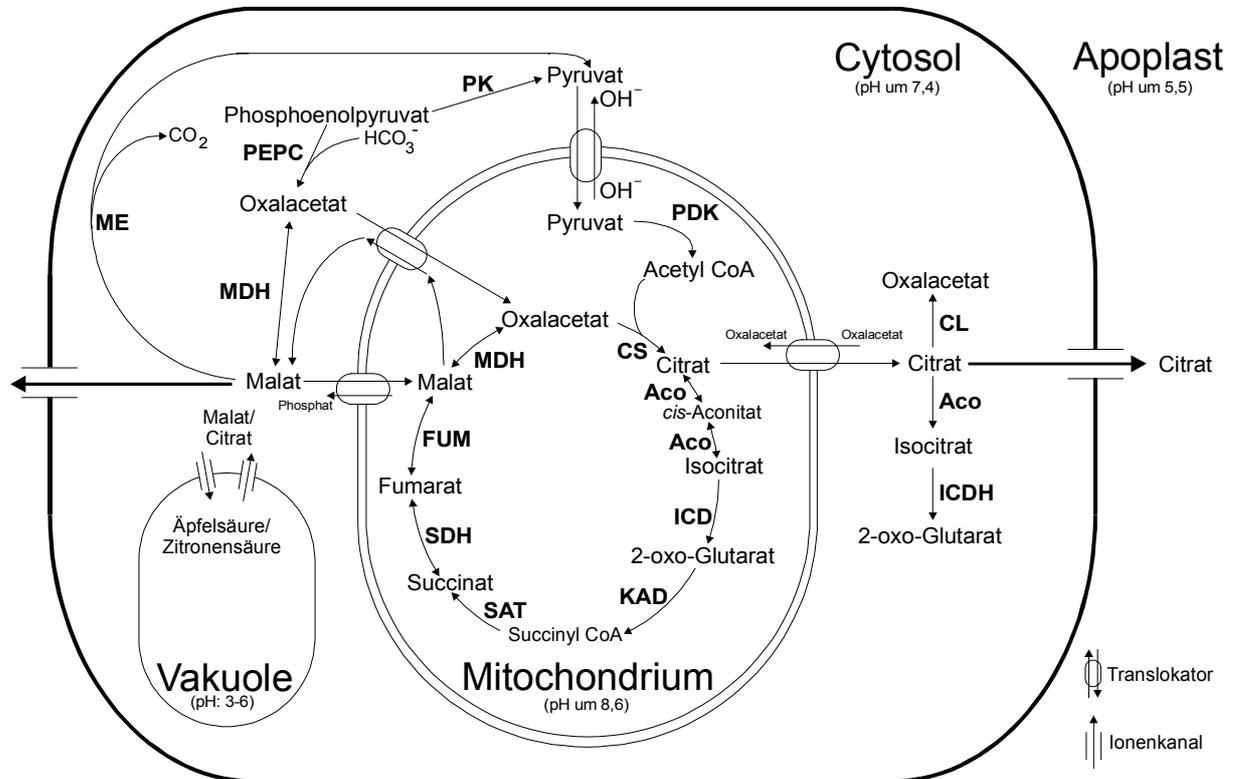


Abb. 50: Schematische Darstellung des bei der Al-induzierten Exsudation von Citrat möglicherweise involvierten Carbonsäuremetabolismus in Wurzelzellen. (Zusammengestellt nach IWASAKI *et al.*, 1992; PANTOJA *et al.*, 1992; STRYER, 1994; JOHNSON *et al.*, 1994; MARTINOIA und RENTSCH, 1994; MARSCHNER, 1995; HELDT, 1996; BARKLA und PANTOJA, 1996; HANNING *et al.*, 1999; TAKITA *et al.*, 1999). Protonen-Pumpen (siehe SZE *et al.*, 1999) sind der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet. ACO = Aconitase; CS = Citrat-Synthase; CL = Citrat-Lyase; ICD = NAD-Isocitratdehydrogenase; ICDH = NADP-Isocitratdehydrogenase; FUM = Fumarase; KAD = α -Ketoglutarat-Dehydrogenase Komplex; MDH = NAD-Malatdehydrogenase; ME = NADP-Malatenzym; PDK = Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex; PEPC = Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PK = Pyruvat-Kinase; SAT = Succinyl-CoA-Synthetase; SDH = Succinatdehydrogenase.

Die Aktivität der hier analysierten Enzyme folgte in ihrem Verteilungsmuster mit deutlichen Maxima in der 1-2 mm Zone den bereits für Callosebildung, Al-Akkumulation, Mg- und P-Gehalte sowie organische Anionen beschriebenen Verläufen entlang des Wurzelapex (**Abb. 39**). Dies unterstreicht den in dieser Zone herrschenden hohen Energiebedarf für die Vorbereitung der Zellen auf die schnelle Streckung (BALUŠKA *et al.*, 1996). Die Dominanz der MDH gegenüber den übrigen Enzymen steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen an Roggen und Weizen (RYAN *et al.*, 1995a; LI *et al.*, 2000b). Die höheren Enzymaktivitäten des Al-sensitiven Genotyps in der

Kontrollbehandlung sind möglicherweise auf dessen stärkere Protonensensitivität zurückzuführen (Untersuchungen am Institut, nicht gezeigt).

Studien zum Einfluss von Al auf die Aktivitäten der hier untersuchten Enzyme liegen für Mais derzeit nicht vor, eine Reihe Untersuchungen wurde jedoch an anderen Pflanzenarten durchgeführt (siehe MA, 2000). Innerhalb von 2 h Behandlung konnten RYAN *et al.* (1995a) keinen Einfluss von Al auf die spezifische Aktivität der MDH und PEPC in der Wurzelspitze (2 mm) von Weizen zeigen, während die Malatexsudation aus dem Apex der Al-resistenten Linie deutlich gesteigert war. Dieser Befund spricht dafür, dass der beteiligte Transportmechanismus (RYAN *et al.* 1997b) für die kurzfristige Al-Reaktion von größerer Bedeutung ist als metabolische Veränderungen (WATT und EVANS, 1999). LI *et al.* (2000b) fanden bei einem Vergleich von Weizen und Roggen nach 12 h Al-Behandlung ebenfalls keinen Einfluss der Behandlung auf die spezifische Aktivität der PEPC, MDH sowie der ICDH in den Apices (10 mm) beider Arten sowie der CS bei Weizen. Die Aktivität der CS war in Roggen, der primär Citrat exsudierte, jedoch um 30 % gegenüber der Kontrolle erhöht. Eine Bedeutung erhöhter Citrat-Gehalte bzw. -synthese für die Al-Resistenz konnte von DE LA FUENTE *et al.* (1997) gezeigt werden. Sie exprimierten eine CS aus *Pseudomonas aureginosa* im Cytosol von Tabak und Papaya und konnten daraufhin erhöhte Citrat-Synthese sowie -gehalte mit erhöhter Exsudation sowie Al-Resistenz korrelieren. Erhöhte Al-Resistenz durch verstärkte Citratsynthese konnten auch KOYAMA *et al.* (1999) an *Daucus carota* Zellen, die eine CS aus *Arabidopsis thaliana* überexprimierten, zeigen. TAKITA *et al.* (1999) demonstrierten, dass in einer Al-resistenten *Daucus carota* Zelllinie durch Al-Behandlung die CS-Aktivität, bei gleichzeitiger Erniedrigung der ICDH-Aktivität, erhöht war. MA (2000) berichtet zudem, dass die Aktivität der ICDH in *Cassia tora* durch Al gehemmt war, während in der Al-resistenten Baumart *Paraserianthes falcataria* die CS-Aktivität in den Mitochondrien durch Al erhöht wurde. Weitere Anhaltspunkte lassen sich aus Arbeiten zur Beeinflussung von Enzymen des Carbonsäuremetabolismus bei der P-Mangel-induzierten Exsudation organischer Anionen gewinnen (JONES, 1998). Auch hier tritt, analog zur Al-Problematik, ein Verlust an Carbonsäuren ein, der ausgeglichen werden muss (JOHNSON *et al.*, 1994; NEUMANN und RÖMHELD, 1999). *Lupinus albus* ist in der Lage, über Proteoidwurzeln große Mengen an Citrat in die Rhizosphäre abzugeben, die der P-Mobilisierung dienen. JOHNSON *et al.* (1994) konnten zeigen, dass die spezifischen Aktivitäten der PEPC, MDH und CS in den Proteoidwurzeln bei P-Mangel erhöht waren und führten die Bereitstellung von bis zu

30 % des exsudierten Citrats auf die Aktivität der PEPC zurück. NEUMANN und RÖMHELD (1999) zeigten ebenfalls für *Lupinus albus* neben der Erhöhung der PEPC-Aktivität eine Hemmung der Aconitaseaktivität und verbanden diesen Befund mit einer erhöhten Citrat-Akkumulation bzw. Exsudation.

Während die Einzeleffekte von AI auf die spezifischen Enzymaktivitäten innerhalb 2 h Behandlung in der hier vorgestellten Arbeit relativ gering erscheinen (**Abb. 40&41**), bieten sie doch in der Summe Erklärungsansätze für die genotypischen Unterschiede in den Effekten von AI auf Exsudation und Gewebegehalte von Citrat. Die AI-induzierte Steigerung der spezifischen Aktivität der CS, MDH sowie PEPC im AI-resistenten Genotyp ATP-Y gegenüber der Kontrolle ermöglicht eine erhöhte Citrat-Produktion und somit Kompensation des exsudationsbedingten Verlustes (siehe auch JOHNSON *et al.*, 1994). Das Fehlen dieser Aktivitätszunahme in Zusammenhang mit der erhöhten Aconitase-Aktivität im AI-sensitiven Genotyp Lixis kann, in Verbindung mit der Exsudation, die Verminderung der Citrat-Gehalte in der AI-Behandlung erklären. Die herausragende Rolle der 1-2 mm Zone deutet sich in den in diesem Segment deutlicheren AI-Effekten an (**Abb. 40**). Die erhöhte ICDH-Aktivität bei ATP-Y kann ein Indiz dafür sein, dass das über die innere Mitochondrienmembran ins Cytosol transportierte Citrat (HANNING *et al.*, 1999; GENCHI *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000b) dort – trotz der Exsudation – so stark akkumuliert wird, dass es verstärkt abgebaut werden muss, um nicht hemmend auf die Glykolyse zu wirken (JOHNSON *et al.*, 1994 und Referenzen darin).

Die zugrundeliegenden Mechanismen für die AI-induzierten Änderungen der Enzymaktivitäten bleiben Gegenstand der Spekulation. Ein direkter AI-Effekt während der Enzymassays war nicht festzustellen (nicht gezeigt), was eine direkte AI-Wirkung *in vivo* unwahrscheinlich erscheinen lässt. Wahrscheinlicher sind Sekundäreffekte als Reaktion auf den exsudationsbedingten Carbonsäureverlust. So schlagen SCHEIBLE *et al.* (2000) beispielsweise eine Regulation der Aktivitäten der CS, ICDH und PEPC über die Malatkonzentration vor. Die Aktivität der PEPC wird zudem über den cytosolischen pH-Wert reguliert (MARTINOIA und RENTSCH, 1994; MARSCHNER, 1995). Aufgrund der innerhalb der 2 h Behandlungsdauer auftretenden AI-induzierten Änderungen in den Gewebegehalten von K, Ca, Mg und P (**Abb. 21**), erscheint auch eine Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch AI-Effekte auf deren Kofaktoren (STRYER, 1994; MARTINOIA und RENTSCH, 1994) möglich.

4.6.3 Wird Resistenz ausschließlich über die Exsudation vermittelt?

Gegenüber der Fülle an Studien, die eine positive Beziehung zwischen der Exsudation organischer Anionen und Al-Resistenz beschrieben haben, erhoben PARKER und PEDLER (1998) für die Exsudation von Malat aus Weizen Einwände bezüglich ihrer Relevanz unter natürlichen Bedingungen. Diese sind nicht zuletzt auf das geringe Chelationsvermögen von Malat gegenüber Al und die geringen in den bisher veröffentlichten Exsudationsexperimenten detektierten Anion:Al Verhältnisse begründet. Dieser Kritik ist jedoch entgegenzusetzen, dass alle bisher publizierten Exsudationsexperimente auf der passiven Diffusion der organischen Anionen aus dem Apoplasten in die Inkubationslösung basieren. Die dort vorherrschenden Konzentrationen liegen dann in der Regel weit unter der Al-Konzentration. Relevant ist jedoch die Konzentration des Chelators am Wirkungsort von Al. Konzentration und Verteilung der jeweiligen Chelatoren sowie Al-Spezies im Apoplasten sind zur Zeit noch nicht messbar, sondern nur modellhaft zu berechnen (DELHAIZE *et al.*, 1993b; PELLET *et al.*, 1995). Hier sind die differentielle Al-Empfindlichkeit sowie der Exsudationsbeitrag unterschiedlicher Wurzelzonen (siehe auch RYAN *et al.*, 1993&1995a; PELLET *et al.*, 1995; SIVAGURU und HORST, 1998) von herausragender Bedeutung. Auch Mucilageproduktion (HORST *et al.*, 1982; LI *et al.*, 2000a), die Diffusionskoeffizienten der betreffenden organischen Anionen sowie die Mächtigkeit des „unstirred layer“ (PELLET *et al.*, 1995; FELLE, 1998) sind mit einzubeziehen. Vor diesem Hintergrund erscheint die von PARKER und PEDLER (1998) erhobene und in der Hauptsache auf Additionsexperimenten basierende Skepsis gegenüber den an Exsudationsexperimenten gewonnenen Schlüssen wenig substantiell, da im ersten Fall die Komplexierung des Aluminiums in der Inkubationslösung, im zweiten Fall jedoch lokal begrenzt im Apoplasten erfolgt.

Angesichts der hier vorgestellten Ergebnisse erhebt sich ferner die Frage, inwiefern die, im Vergleich zu Studien an Weizen, geringen genotypischen Unterschiede in der Citrat-Exsudation alleine ursächlich für die deutliche differentielle Al-Resistenz der beiden untersuchten Genotypen sein können. In Übereinstimmung mit TAYLOR (1991&1995) sowie PELLET *et al.* (1996) ist in einem integrativen Ansatz davon auszugehen, dass Al-Resistenz nicht monokausal, sondern durch das Zusammenspiel der Citrat-Exsudation mit weiteren, möglicherweise apoplastischen Faktoren am Wirkungsort von Al vermittelt wird. Eine Klärung dieser Interaktionen steht jedoch noch aus.

4.7 Ein Al-aktivierter Anionenkanal

Unter den schwach alkalischen Bedingungen im Cytosol (um pH 7,4) liegen die organischen Säuren in der Hauptsache deprotoniert in anionischer Form vor. In dieser Form sind sie kaum membranpermeabel. Eine Abgabe in komplexierter Form wäre möglich, erscheint jedoch wenig wahrscheinlich (JONES, 1998). Demgegenüber stellt die Abgabe über Anionenkanäle einen Mechanismus dar, der eine effektive Nutzung des negativen Membranpotentials und des starken Gradienten organischer Anionen zwischen intra- und extrazellulärem Raum erlaubt (JONES, 1998; PIÑEROS und KOCHIAN, 2001). Neben der Expression des Kanalproteins und dessen Aktivierung wäre für den eigentlichen Transport keine weitere Energie nötig, was, neben der mit bis zu 10^8 Ionen s^{-1} um den Faktor 100-1000 höheren Transportleistung pro Zeiteinheit, einen wesentlichen Vorteil gegenüber aktiven Transportsystemen bedeutet (TESTER, 1990; HILLE, 1994). Die Tatsache, dass die Exsudation aus der Wurzelspitze intakter Keimlinge durch Anionenkanalinhibitoren vermindert werden konnte (**Tab. 3**), ist ein deutliches Indiz für die Beteiligung eines solchen Anionenkanals auch in Mais und steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen an Weizen (DELHAIZE *et al.*, 1993b; RYAN *et al.*, 1995a) und Buchweizen (ZHENG *et al.*, 1998a).

In einer Reihe von Untersuchungen konnte eine hemmende Wirkung von Al auf Ionenkanäle demonstriert werden. So wurden ein K^+ -Einwärtsgerichteter in der Plasmamembran von Protoplasten aus Weizenwurzelspitzen (GASSMANN und SCHROEDER, 1994) sowie ein- und auswärtsgerichtete K^+ - (RYAN *et al.*, 1997b; ZHANG *et al.*, 2001) und Ca^{2+} -Kanäle in Protoplasten aus der Weizenwurzel (PIÑEROS und TESTER, 1993&1995; HUANG *et al.*, 1994&1996) durch Al gehemmt. DING *et al.* (1993) demonstrierten eine hemmende Wirkung von Al auf einen mechanosensorischen Ca^{2+} -Kanal in der Zwiebelepidermis. Berichte über eine aktivierende Wirkung von Al auf Ionenkanäle waren dagegen lange Zeit rar. RYAN *et al.* (1997b) konnten in der Plasmamembran von aus der Wurzelspitze einer Al-resistenten Weizenlinie isolierten Protoplasten als erste einen Al-aktivierten Ionenkanal nachweisen. Dieser Anionenkanal erlaubt den Efflux von Chlorid aus dem Protoplasten und wurde nach Al-Behandlung ohne (20 % der Protoplasten) bzw. nach einer Verzögerung von bis zu 90 min (30 % der Protoplasten) aktiviert. In einer Folgestudie konnten ZHANG *et al.* (2001) genotypische Unterschiede in der Aktivierungsfrequenz und Stromdichte zwischen isogenen Weizenlinien demonstrieren und eine gute Malatpermeabilität zeigen. PIÑEROS und KOCHIAN (2001) beschrieben an aus dem Wurzelapex (5 mm)

eines Al-resistenten Maisgenotypen isolierten Protoplasten eine Al-aktivierte große Leitfähigkeit (LCAC; 18-27 pS). Die Al-aktivierten Ströme traten in 25 % der Protoplasten ohne Verzögerung auf. Informationen über genotypische oder zonale Unterschiede bzw. Permeabilität gegenüber Malat und Citrat liegen für Al-aktivierte Anionenkanäle in Mais bisher nicht vor.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte in beiden Genotypen ein Al-aktivierter Anionenkanal ausschließlich in der Plasmamembran von Protoplasten aus der Rinde der 1-2 mm Zone nachgewiesen werden, während in Protoplasten aus der Elongationszone (EZ) keine Al-induzierten Ströme auftraten (Abschnitt 3.7.1; **Abb. 42**). Diese Anionenströme wurden häufiger beim Al-resistenten Genotyp detektiert (80 % bei ATP-Y, 33 % bei Lixis; **Abb. 43a**), was in Übereinstimmung mit der positiven Korrelation zwischen Al-Resistenz und Exsudation organischer Anionen steht (Abschnitt 3.6.1; DELHAIZE *et al.*, 1993b; RYAN *et al.*, 1995a&b; PELLET *et al.*, 1995; ZHENG *et al.*, 1998a). Auch der Al-aktivierte Anionenkanal in der Weizenwurzel zeigte genotypische Unterschiede in der Aktivierungsfrequenz und wies zudem in der Al-resistenten Linie höhere Stromdichten auf (ZHANG *et al.*, 2001). Nach erfolgter Kanalaktivierung waren dessen biophysikalische Eigenschaften bei den hier verglichenen Maisgenotypen dagegen identisch. Der Unterschied zwischen den Genotypen liegt demnach also weniger in der grundlegenden Fähigkeit, den betreffenden Anionenkanal exprimieren zu können, als in der Häufigkeit seines Vorkommens bzw. der Aktivierbarkeit. Besonders der letzte Aspekt wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die Kanalaktivierung nicht spontan erfolgte. Vielmehr wurden Kanalaktivierungen beim Al-sensitiven Genotyp ausschließlich nach Vorinkubation der intakten Wurzeln für 1 h in Gegenwart von Al detektiert. Wurden Protoplasten aus der 1-2 mm Zone des Al-resistenten Genotyps ATP-Y ohne Vorbehandlung mit Al in Kontakt gebracht, so traten einwärtsgerichtete Ströme erst nach einer Verzögerungszeit von 7-10 min auf. Diese Beobachtung entspricht den Beobachtungen von RYAN *et al.* (1997b) an einem Teil (30%) der von ihnen untersuchten Protoplastenpopulation. Dies könnte ein Indiz für einen komplexen Weg der Transduktion des Al-Signals sein.

Eine Reihe cytosolischer und externer Faktoren wie cytosolisches Calcium (PANTOJA *et al.*, 1992; ELZENGA und VANVOLKENBURGH, 1997), Nukleotide (HEDRICH *et al.*, 1990; ZIMMERMANN *et al.*, 1994;) und Phytohormone (BLATT und THIEL, 1993; ZIMMERMANN *et al.*, 1994; LOHSE und HEDRICH, 1995) wurden als Mediatoren für die Regulation von Anionenkanälen beschrieben. „Secondary messenger“ wie cytosoli-

sches Calcium (RENGEL, 1992a&b; LINDBERG und STRID, 1997; JONES *et al.*, 1998a&b; ZHANG und RENGEL, 1999) oder Inositol-1,4,5-Trisphosphat (HAUG *et al.*, 1994; JONES und KOCHIAN, 1995) werden als zelluläre Mediatoren des AI-Signals diskutiert. Auch ein AI-Einfluss auf den Adenosintriphosphat-Status (COLLIER *et al.*, 1993; TONINELLO *et al.*, 2000) sowie die Auxin-Homöostase (siehe Abschnitt 3.5) konnte gezeigt werden, was wiederum eine Beeinflussung der Kanalaktivierung nach sich ziehen könnte (HEDRICH *et al.*, 1990; BLATT und THIEL, 1993; ZIMMERMANN *et al.*, 1994; LOHSE und HEDRICH, 1995; THOMINE *et al.*, 1997). Der Grund für die Verzögerung der Kanalaktivierung bleibt Objekt der Spekulation. Allerdings kann ein Beitrag von Transkription und Translation in diesem Prozess als relativ unwahrscheinlich ausgegrenzt werden, da die Applikation von Cycloheximid, einem starken Inhibitor der Peptidyltransferaseaktivität der 60S Ribosomenuntereinheit eukaryotischer Zellen (STRYER, 1994), keine Auswirkung auf Aktivierungshäufigkeit sowie Kanalampplitude hatte. RYAN *et al.* (1995a) konnten zwar nach Cycloheximidapplikation zeigen, dass die Exsudation von Malat aus Weizenwurzeln innerhalb von 15 min aufhörte, was jedoch angesichts der fehlenden Verzögerungsphase in der AI-Aktivierung sowohl der Exsudationsantwort als auch des Anionenkanals (RYAN *et al.*, 1997b) eher als Nebeneffekt der direkten Cycloheximid-Behandlung auf den Gesamtstoffwechsel denn als ein Indiz für eine Involvierung von *de novo* Proteinsynthese in der Kanalaktivierung anzusehen ist. Posttranslationale Modifikationen des Kanalproteins bzw. dessen Zusammensetzung in der Plasmamembran aus bereits vor AI-Einfluss aufgebauten Komponenten unter Einbeziehung von Exocytoseprozessen erscheinen daher als Aktivierungsmechanismus naheliegender. Möglicherweise sind genotypische Unterschiede in der Beeinflussung des Vesikeltransportes in der Wurzelspitze an den Unterschieden in der Aktivierbarkeit beteiligt (BENNET *et al.*, 1985; PUTHOTA *et al.*, 1991; VITORELLO und HAUG, 1999). Eine mechanosensorische Kanalaktivierung, wie von COSGROVE und HEDRICH (1991) für Chlorid- sowie DING und PICKARD (1993) für Calciumkanäle beschrieben, wäre aufgrund der Auswirkungen von AI auf die physikalischen Plasmamembran- und Zellwandeigenschaften (HORST, 1995; MATSUMOTO, 2000) sowie das Zellwand-Plasmamembran-Cytoskelett Kontinuum (HORST *et al.*, 1999) ebenfalls möglich. Piñeros und Kochian (2001) konnten im Gegensatz zu den hier und von RYAN *et al.* (1997b) vorgestellten Daten bei der Untersuchung von „outside/out“ Membran-Patches allerdings keine Verzögerung der Kanalaktivierung bzw. deren Abhängigkeit von cytosolischen Faktoren feststellen. In diesem Fall könnte ein

Aktivierungsmechanismus vorliegen, in dem Al das Kanalprotein entweder direkt (Ligand-aktiviert) oder über eine schnelle membranassoziierte Signaltransduktion, die in unmittelbarer Nähe des Kanalproteins lokalisiert ist, aktivieren würde (PIÑEROS und KOCHIAN, 2001).

Die Aktivierung des Anionenkanals erfolgte für Al spezifisch. La induzierte Anionenströme weder nach Vorinkubation noch bei direkter Behandlung. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Exsudationsexperimenten (**Abb. 35**) und den Studien von DELHAIZE *et al.* (1993b), RYAN *et al.* (1995a, 1997) sowie ZHENG *et al.* (1998a). Auch Indium, Gallium, Scandium, Mangan, Zink sowie das ebenfalls als phytotoxisch beschriebene Triskaidekaaluminium (KOCHIAN, 1995) waren nicht in der Lage, die Exsudation von Malat aus Weizen zu induzieren (RYAN *et al.*, 1995a).

In Übereinstimmung mit den Exsudationsexperimenten wurden sowohl die makroskopischen Ströme als auch die Einzelkanäle innerhalb weniger Minuten durch DIDS deutlich und Nifluminsäure völlig inhibiert (**Tab. 3, Abb. 46**). Auch THOMINE *et al.* (1997) demonstrierten eine stärkere inhibitorische Wirkung von Nifluminsäure gegenüber DIDS auf Anionenkanäle an Protoplasten aus dem *Arabidopsis* Hypokotyl. Die hemmende Wirkung von Nifluminsäure auf den Al-induzierten Anionenkanal konnte ebenfalls von RYAN *et al.* (1995a, 1997b) an Weizen in Exsudations- und Patch-clamp Experimenten gezeigt werden. Die Übereinstimmung der in Patch-clamp- und Exsudationsexperimenten demonstrierten Effekte verdeutlicht noch einmal die Beteiligung des Anionenkanals an der Exsudation der Anionen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Beteiligung des beschriebenen Anionenkanals im Al-Resistenzmechanismus ist seine Permeabilität für organische Anionen wie Malat und Citrat. Permeabilität von Anionenkanälen für organische Anionen konnte wiederholt gezeigt werden (TYERMAN, 1992; HEDRICH und MARTEN, 1993; SCHMIDT und SCHROEDER, 1994; SCHROEDER, 1995). ZHANG *et al.* (2001) konnten für den Al-aktivierten Anionenkanal in Weizen eine vergleichsweise hohe relative Permeabilität von Malat gegenüber Chlorid von > 2 demonstrieren. Relative Permeabilitäten von Malat gegenüber Chlorid liegen in pflanzlichen Anionenkanälen ansonsten zwischen $< 0,1$ und $0,25$ (HEDRICH und MARTEN, 1993; SCHMIDT und SCHROEDER, 1994; FRACHISSE *et al.*, 1999). Der in dieser Arbeit vorgestellte Anionenkanal ist für Citrat und Malat permeabel. Die relativen Permeabilitäten gegenüber Chlorid lagen bei $0,25$ für Malat (vergleiche S_{LOW} -type anion channel in SCHMIDT und SCHROEDER, 1994) und $0,18$ für Citrat (Abschnitt 3.7.1.4, **Abb. 47**). Diese Eigenschaft, zusammen mit

der hohen Leitfähigkeit (144 pS bei einem Chloridverhältnis innen:außen von 104:22) und der Tatsache, dass der Kanal auch nach Entzug von Al aktiviert blieb, versetzt diesen Anionenkanal in die Lage, die für die Komplexbildung des Aluminiums notwendigen Mengen an organischen Anionen in den Apoplasten bzw. die Rhizosphäre abzugeben. Die Tatsache, dass der Anionenkanal auch nach Entfernen von Al aus der Inkubationslösung aktiv blieb, steht in Übereinstimmung mit den Experimenten an intakten Pflanzen (**Abb. 36**). Im Gegensatz dazu führte das Entfernen von Al aus der Inkubationslösung innerhalb von 15 min zum Nachlassen der Malat-Exsudation aus Weizenwurzeln (RYAN *et al.*, 1995a). Auch der von PIÑEROS und KOCHIAN (2001) beschriebene Al-aktivierte Anionenkanal in Mais deaktiviert nach Entfernen von Al wenn in der „outside/out“-Konfiguration gemessen wurde. Die hier gezeigten Patch-clamp Experimente wurden dagegen in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt, was den Unterschied erklären kann (PIÑEROS und KOCHIAN, 2001). Der in dieser Arbeit gezeigte fehlende Effekt des Entfernen von Al auf die Exsudation ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass Al schnell in der Zellwand gebunden wird (**Abb. 14**). Selbst nach dem Entfernen von Al aus dem Inkubationsmedium weist der Apoplast aufgrund dieser Akkumulation erhöhte Al-Konzentrationen auf (RENGEL, 1996), die durch Spülen in Wasser erst schrittweise verringert werden. Möglicherweise sind die Unterschiede zwischen Mais und Weizen auf eine unterschiedliche Bedeutung apoplastischen Aluminiums für die Kanalaktivierung bei Weizen und Mais zurückzuführen.

Die Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften (Aktivierung, Leitfähigkeit) zwischen dem in der vorliegenden Arbeit und dem von PIÑEROS und KOCHIAN (2001) charakterisierten Anionenkanal basieren mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem Vorhandensein mehrerer Anionenleitfähigkeiten in der Wurzelspitze von Mais (siehe PIÑEROS und KOCHIAN; 2001). Aufgrund der unterschiedlichen Isolationsprotokolle für die Protoplasten ist davon auszugehen, dass in den beiden Studien unterschiedliche Protoplastenpopulationen untersucht wurden. Dieser Aspekt unterstützt die Notwendigkeit der Beachtung zentraler Unterschiede in der Wurzelspitze bei Untersuchungen zu Al-Toxizität und -Resistenz.

Die Abgabe negativer Ladungsträger aus dem Cytosol führt zu einer Depolarisierung der Plasmamembran, die als schnelle Reaktion auf Al-Applikation wiederholt gezeigt werden konnte (PAPERNIK und KOCHIAN, 1997; TAKABATAKE und SHIMMEN, 1997; SIVAGURU *et al.*, 1999a). Relative Elektroneutralität muss über eine äquivalente Aufnahme von Anionen oder Abgabe von Kationen erreicht werden (DELHAIZE und RYAN,

1995; JONES, 1998). Hier werden in der Literatur Kalium- gegen Protonenefflux diskutiert (JONES, 1998). Abgabe von Kalium wäre insofern hinsichtlich der Al-Problematik effektiver, da die Abgabe von Protonen bei gleichzeitiger Komplexierung der Anionen mit Al zu einer weiteren Ansäuerung des Apoplasten und damit Erhöhung der Konzentration phytotoxischen Al^{3+} führen würde.

RYAN *et al.* (1995a) stellten in Weizen einen mit der Exsudation von Malat einhergehenden Efflux von K^+ fest, während ZHANG *et al.* (2001) in Protoplasten aus der Wurzelspitze einer Al-resistenten Weizenlinie eine Al-aktivierte, auswärtsgerichtete K^+ -Leitfähigkeit zeigten. MURPHY *et al.* (1999) demonstrierten an *Arabidopsis*, dass der Kupfer-induzierte Efflux von K^+ mit der Exsudation von Citrat gekoppelt war. Die in dieser Arbeit beobachtete geringe Al-Empfindlichkeit des K^+ -Auswärtsgleichrichters bietet ebenfalls das Potential zu einem den Anionenefflux begleitenden K^+ -Efflux in Mais (**Abb. 48a&b**). Diese Möglichkeit wird zudem von den in der Al-Behandlung gegenüber der Kontrolle verminderten K-Gehalten in der Wurzelspitze unterstützt (**Abb. 21**). Es fällt auf, dass der hier gezeigte Auswärtsgleichrichter erst bei vergleichsweise starker Depolarisierung aktiviert wird (weit positiv vom Umkehrpotential für K^+ ; vergleiche ROBERTS und TESTER, 1995; MAATHUIS *et al.*, 1997). Dies lässt sich möglicherweise auf die empfindliche Regulierung dieser Kanäle durch eine Reihe von Faktoren wie pH-Wert, cytosolischem Ca^{2+} , Kinasen, Phosphatasen und 14-3-3 Proteinen (siehe MAATHUIS *et al.*, 1997; BOOIJ *et al.*, 1999) zurückführen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht konsequent systematisch untersucht werden konnten.

Die Al-Empfindlichkeit des K^+ -Einwärtsgleichrichters (**Abb. 48c&d**) steht in Übereinstimmung mit den von GASSMANN und SCHROEDER (1994) an Protoplasten aus Weizenwurzelspitzen gezeigten Ergebnissen, wobei jedoch bei Mais höhere Al-Konzentrationen für die Blockierung notwendig waren (siehe auch PIÑEROS und KOCHIAN, 2001). Auch MIYASAKA *et al.* (1989) konnten mittels K^+ -selektiver Mikroelektroden eine Al-induzierte Hemmung des K^+ -Influx bei einem Al-sensitiven Weizengenotypen zeigen. Unter Berücksichtigung der von THIEL *et al.* (1996), CLAUSSEN *et al.* (1997), PHILIPPAR *et al.* (1999) und AMTMANN *et al.* (1999) demonstrierten Verbindung zwischen K^+ -Einwärtsgleichrichtern und dem Auxin-induzierten Wachstum in Coleoptile und Wurzel deutet sich hier eine mögliche Verbindung zur Al-induzierten Hemmung der Zellstreckung an. Auch die durch Al verminderten K-Gehalte in der Wurzelspitze (**Abb. 21**) können, neben verstärktem Efflux, auf verminderten Influx zurückzuführen sein.

Gegenüber den oben vorgestellten Untersuchungen zum Einfluss von Al auf die K^+ -Fluxe in der Wurzelspitze ist erwähnenswert, dass HORST *et al.* (1992) an Wurzeln sowie STAß und HORST (1995) an Zellkulturen der Sojabohne, einer als Reaktion auf Al ebenfalls Citrat exsudierenden Art (YANG *et al.*, 2000), eine Hemmung des K^+ -Effluxes und keine Auswirkung auf den K^+ -Influx feststellen konnten. Möglicherweise ist dies ein Zeichen für die Entwicklung unterschiedlicher Mechanismen der Al-induzierten Exsudation organischer Anionen in unterschiedlichen Pflanzenfamilien (siehe MA, 2000). Allerdings wurden die Fluxe über die K^+ -Konzentrationen in den Inkubationslösungen vor und nach Al-Behandlung ganzer Wurzelsysteme (HORST *et al.*, 1992) bzw. abgeschnittener Wurzelspitzen (RYAN *et al.*, 1995a) berechnet und spiegeln daher möglicherweise die Summe unterschiedlicher Prozesse und – wie auch die Studien an Zellkulturen (STAß und HORST, 1995) – nicht die Ionenfluxe am Ort der Al-Wirkung in der Wurzel wieder (siehe KOCHIAN, 1995). Demgegenüber ermöglichen die elektrophysiologischen Verfahren eine gezielte Untersuchung lokaler Effekte im besonders Al-empfindlichen Bereich. Der Nachteil der Patch-clamp Technik ist jedoch das Heraustrennen einzelner Protoplasten aus dem Gewebeverband. Ein geeignetes Verfahren zur Klärung des Einflusses von Al auf die K^+ -Fluxe wäre die Verwendung ionenselektiver Mikroelektroden an der Wurzeloberfläche oder im Apoplasten von Wurzeln intakter Pflanzen.

Zusammenfassend ermöglichen die Ergebnisse der Patch-clamp Untersuchungen eine Erweiterung des von DELHAIZE und RYAN (1995) vorgestellten Modells bezüglich der Al-Wirkung auf die Plasmamembran von Zellen der Wurzelspitze (**Abb. 51**).

In Mais aktiviert Al in der Plasmamembran von Rindenzellen der besonders Al-empfindlichen Wurzelzone (1-2 mm Zone) nach einer kurzen Verzögerung von ca. 10 min einen Anionenkanal mit großer Leitfähigkeit, der den Efflux von Anionen in den Apoplasten und damit die Verminderung der Konzentration an freiem Al^{3+} ermöglicht. In der Elongationszone ist dieser Kanal nicht vorhanden. Genotypische Unterschiede bestehen in der Häufigkeit der Expression bzw. Aktivierbarkeit. Dieser Kanal ist permeabel für Citrat und Malat und seine Aktivierung erfolgt Al-spezifisch. Die Rolle von Al bei der Kanalaktivierung bleibt jedoch unklar. Die Beteiligung transkriptioneller und translationeller Prozesse bei der Aktivierung ist unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist das reine Anschalten des bereits fertig synthetisierten Kanalproteins über eine nicht näher bekannte, membranassoziierte Signalkette und/oder posttranslationale

Modifikationen von bereits vor dem Einsetzen des Al-Stresses gebildeten Komponenten unter Einbeziehung von Exocytoseprozessen und Vesikelfusion.

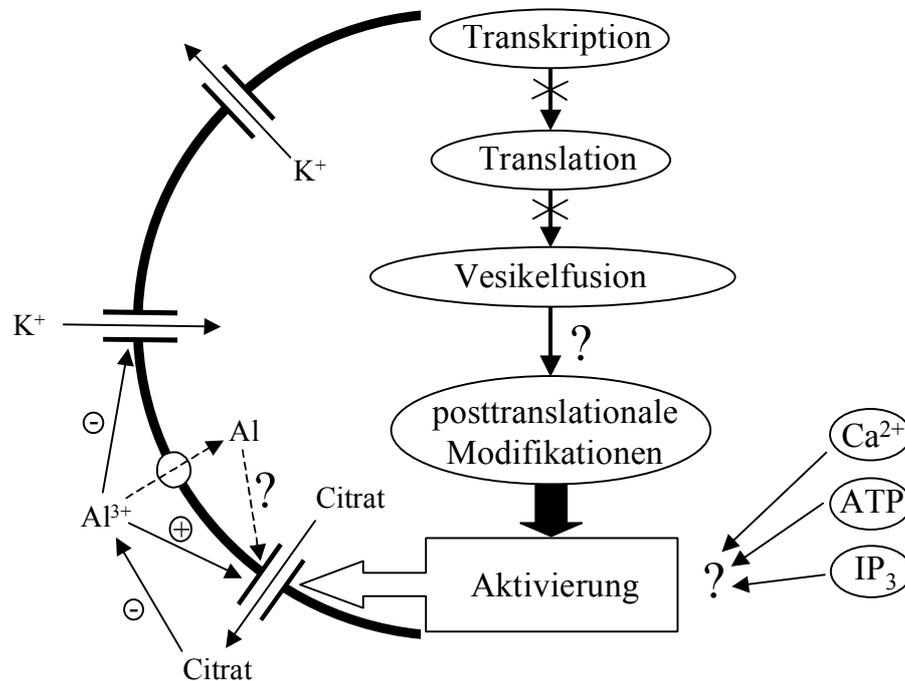


Abb. 51: Auswirkung von Al auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran von aus der 1-2 mm Wurzelzone isolierten Protoplasten (modifiziert nach DELHAIZE und RYAN, 1995). ATP = Adenosintriphosphat; IP₃ = Inositol-1,4,5-Trisphosphat; (+) = aktiviert; (-) = hemmt bzw. vermindert.

DELHAIZE und RYAN (1995) schlagen drei mögliche Mechanismen der Kanalaktivierung vor: (1) Aluminium interagiert direkt mit dem Kanalprotein und führt so durch Konformationsänderungen zu einer erhöhten Leitfähigkeit. (2) Aluminium interagiert mit einem spezifischen Rezeptor an der Membranoberfläche oder der Membran selber und löst eine den Kanal aktivierende Signaltransduktion aus. Dabei ist eine mögliche Beteiligung von Ca²⁺, Adenosintriphosphat oder Inositol-1,4,5-Trisphosphat ungeklärt (vergleiche ZHANG *et al.*, 2001). (3) Aluminium tritt ins Cytoplasma ein und führt dort direkt oder indirekt zur Kanalaktivierung. Die Verzögerung der Kanalaktivierung spricht dabei entweder für eine Al-induzierte Signaltransduktion und/oder das Eintreten von Al in den Symplasten.

Ein K⁺-Auswärtsgleichrichter ist nicht Al empfindlich, was den konkomitanten Efflux von K⁺ und somit die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ermöglicht. Demgegenüber ist ein K⁺-Einwärtsgleichrichter durch Al gehemmt, was sich negativ auf K-Homöostase sowie die beginnende Zellstreckung auswirkt.

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen die herausragende Bedeutung der 1-2 mm Zone der Primärwurzelspitze von Mais für Al-Toxizität und -Resistenz. Die Notwendigkeit der Übertragung einer feinen longitudinalen Zonierung auf weitere Aspekte der Al-Problematik erscheint zwingend.

Wenngleich die Experimente zur Wirkung von Al auf die Auxin-Homöostase in der Wurzelspitze darauf hinweisen, dass die schnelle Wachstumshemmung nach Al-Behandlung auf gestörten basipetalen IES-Transport zurückzuführen ist, so wäre doch in diesem Zusammenhang die Bestimmung der endogenen IES-Gehalte in den unterschiedlichen Wurzelzonen wünschenswert, sobald eine hinreichend sensitive und reproduzierbare Methodik bei gleichzeitigem hohem Probendurchsatz verfügbar ist. Auch das Zusammenspiel unterschiedlicher Phytohormone ist in diesem Zusammenhang von Interesse. Der Frage nach dem Mechanismus der Al-Wirkung auf den polaren Transport könnte mittels Mutanten mit verändertem IES-Metabolismus bzw. Abundanz und Verteilung des Auxin-Efflux-Carriers nachgegangen werden. Die Frage nach der radialen sowie subzellulären Verteilung von Al im Gewebe ist nach wie vor nicht befriedigend geklärt und auch hier besteht Bedarf an hochsensitiver Analytik. Während die Exsudation von Citrat Al-Resistenz vermittelt, bleibt offen, inwiefern die gezeigten genotypischen Unterschiede in der Exsudationsrate allein für die starken differentiellen Wachstumseffekte verantwortlich sein können. Hier ist – ausgehend von einem integrativen Modell – die Beteiligung weiterer Faktoren zu klären. Die zunehmende Verfeinerung der elektrophysiologischen Methoden zur Untersuchung von Ionenfluxen im Apoplasten wird es in Zukunft ermöglichen, den Al-Einfluss auf unterschiedliche Bereiche der Wurzel am intakten System mit wesentlich höherer Präzision als derzeit möglich zu untersuchen.

Neben der weiteren physiologischen Charakterisierung unterschiedlicher Wurzelzonen bzw. -gewebe hinsichtlich ihrer Al-Sensitivität bzw. ihres Beitrages zur Al-Resistenz ist in Zukunft die Anwendung molekularbiologischer bzw. -genetischer Methoden an genetisch klarer definiertem Pflanzenmaterial erforderlich, um die physiologischen Phänomene der Al-Problematik erklären zu können. Auf diese Weise erst können die zellulären Ursachen für die Empfindlichkeit bzw. Resistenz von Geweben gegenüber Al erarbeitet werden. Zu diesem Zwecke sind weitere interdisziplinäre Forschungsansätze mit dem Ziel der Anwendung leistungsfähiger Methoden auf die Aluminiumproblematik wünschenswert.

5 Zusammenfassung

Aluminium-(Al)-Toxizität auf sauren Böden ist weltweit einer der bedeutendsten, den Ertrag von Nutzpflanzen beeinträchtigenden abiotischen Faktoren. Primäres Symptom der Al-Schädigung ist die Hemmung des Wurzellängenwachstums (WLW). Während die zellulären Ursachen dieser Hemmung noch weitgehend ungeklärt sind, besteht zunehmend Einigkeit darüber, dass der primäre Angriffsort von Al in der Wurzelspitze lokalisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Primärwurzelspitze von Mais hinsichtlich zonaler Unterschiede in der Al-Sensitivität charakterisiert. Den Schwerpunkt bildete dabei die Bedeutung der Zone im Abstand von 1-2 mm von der Wurzelspitze (1-2 mm Zone) für Aluminium-Toxizität und -Resistenz. Kurzzeiteffekte (1-3 h) wurden an 3-4 Tage alten, an niedrige pH-Werte adaptierten Keimlingen zweier unterschiedlich Al-resistenter Maisgenotypen nach Al-Behandlung in Agarosegelen untersucht. Agaroseblocksysteme ermöglichten die spezifische Behandlung von 1-mm Segmenten intakter, vertikal wachsender Wurzeln mit Al oder anderen Substanzen. Alle erhobenen Parameter wurden mit einer longitudinalen Auflösung von 1-mm in den apikalen 5-10 mm untersucht.

Behandlung von Wurzeln mit Al führte innerhalb von 1 h zu einer deutlichen Hemmung des WLW gegenüber der Kontrollbehandlung, die beim Al-sensitiven Genotyp stärker ausfiel. Callosebildung und Al-Akkumulation zeigten ein typisches Verteilungsmuster entlang der Wurzelspitze, mit Maxima in der 1-2 mm Zone und basalwärts abnehmenden Werten. Callosebildung und Al-Akkumulation waren beim Al-sensitiven Genotyp stärker ausgeprägt, wobei deutliche Unterschiede in den apikalen 3 mm, speziell in der 1-2 mm Zone, auftraten. Bei spezifischer Behandlung der 1-2 mm Zone entsprachen die Al-induzierte Hemmung des WLW sowie die Verteilungsmuster für Al-induzierte Callosebildung und Al-Akkumulation entlang der Wurzelspitze denen bei Behandlung der gesamten Wurzelspitze, was die besondere Empfindlichkeit dieser Zone gegenüber Al verdeutlicht. Spezifische Behandlung der 0-1 mm Zone (meristematische Zone; MZ) führte zu wesentlich schwächer ausgeprägten Symptomen, während die Behandlung des Bereiches 3-5 mm von der Wurzelspitze keine Effekte hervorrief.

In Versuchen zum Beitrag einzelner Wurzelzonen zur Gesamtstreckung zeigte sich, dass die Hauptelongationszone (EZ) im Bereich 2 bis 5 mm von der Wurzelspitze

lag. Die 1-2 mm Zone trug nur unwesentlich zum Gesamtstreckungswachstum der Wurzel bei.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Al-Perzeption und Wachstumsreaktion in räumlich voneinander getrennten Wurzelzonen erfolgen, was die Frage nach der Signalweiterleitung aufwirft. Daher wurde der Einfluss von Al auf Transport und Verteilung von Indol-3-Essigsäure (IES) in der Wurzelspitze untersucht. Bei spezifischer Behandlung an die 1-2 mm Zone rief 2,3,5-Triiodobenzoe-Säure (TIBA), ein Inhibitor des basipetalen IES-Transports, ähnlich wachstumshemmende Effekte hervor wie Al, allerdings ohne genotypische Unterschiede. Der hemmende Einfluss von Al auf das WLW konnte durch Applikation von 0,1 μM IES an die EZ, nicht jedoch an die MZ, bei beiden Genotypen deutlich verringert werden. Zudem hemmte Al bei spezifischer Applikation an die 1-2 mm Zone den basipetalen Transport Tritium-markierter IES aus der 0-1 mm Zone in die Elongationszone in ähnlicher Weise wie TIBA und N-1-Naphthylphthalam-Säure (NPA). Dieser Al-Effekt fiel beim Al-sensitiven Genotyp stärker aus. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Al-Signal von der 1-2 mm Zone durch einen gehemmten basipetalen Auxinfluss in der Wurzelrinde zur Elongationszone geleitet wird.

Der Einfluss von Al auf das pH-Profil entlang der Rhizoplane wurde in einem Abstand von 20 μm von der Oberfläche mittels pH-selektiver Mikroelektroden untersucht. Kontrollpflanzen zeigten ein typisches pH-Profil mit einer Alkalisierungszone im Bereich der apikalen 3 mm, deren stärkste Ausprägung um 0,6-1,6 mm von der Wurzelspitze entfernt lag. Der pH-Wert war hier um bis zu 0,9 Einheiten gegenüber dem der Perfusionslösung erhöht. In der Elongationszone war der pH-Wert nur gering gegenüber dem der Perfusionslösung erhöht. Durch Al-Behandlung über den gesamten Apex kam es innerhalb von 15 min zu einer deutlichen Abnahme der pH-Werte in der Alkalisierungszone, die beim Al-resistenten Genotyp schwächer ausfiel. Es kam zudem zu einer pH-Wert-Abnahme in der Elongationszone (4-5 mm). Spezifische Al-Behandlung der 1-2 mm Zone führte zu identischen Effekten. Behandlung der MZ bzw. eines Teiles der EZ (2,5-3,5 mm) hatte nur einen leichten bzw. keinen Einfluss auf das pH-Profil. Die genotypischen Unterschiede in der Stärke der pH-Absenkung im Bereich der 1-2 mm Zone sind vermutlich nicht die Ursache, sondern die Folge unterschiedlicher Al-Resistenz.

Mittels der bildgebenden Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) wurde die radiale Verteilung von Al in Kryoschnitten (300 nm) in einem Abstand von 0-1, 1-2

sowie 3-4 mm von der Wurzelspitze untersucht. Aluminium lag in allen Zonen nach 1 h Behandlung in den Zellwandbereichen vor. Mögliches cytosolisches Al war vor dem Hintergrund der hohen Zellwandgehalte nicht detektierbar. Die radiale Mobilität von Al reichte in der 1-2 mm Zone bis in die 5. Rindenschicht, wobei ein steiler Gradient zwischen Rhizodermis und Rinde bestand.

Die Verteilung von K, Ca, Mg sowie P in der Wurzelspitze wurde untersucht. Mg und P folgten in ihrer Verteilung dem für die Callosebildung und Al-Akkumulation beschriebenen Muster mit signifikanten Maxima in der 1-2 mm Zone. Die Gehalte für K und Ca stiegen von der Spitze aus an, um dann konstant zu bleiben (K), oder nach einer leichten Senke in der Elongationszone wieder anzusteigen (Ca). Aluminium-Behandlung (2 h) führte zu einer Abnahme der K-Gehalte beider Genotypen besonders in der 1-2 mm Zone. Die Gehalte von Ca und P waren in der 1-2 mm Zone des Al-sensitiven Genotyps deutlich vermindert, während der Mg-Gehalt in der 1-2 mm Zone beider Genotypen vermindert war.

Um die genotypischen Unterschiede in der Al-Resistenz erklären zu können, wurde der Einfluss von Al auf die Exsudation der Anionen organischer Säuren untersucht. Aluminium führte innerhalb von 2 h zu einer deutlichen Steigerung der Gesamtexsudationsrate sowie der Exsudationsraten von Citrat und Malat aus dem Gesamtwurzelsystem. Dabei schied der Al-resistente Genotyp signifikant mehr Anionen aus. Citrat ist das die Resistenz vermittelnde Anion. Um die Hauptexsudationszone näher charakterisieren zu können, wurde eine Technik entwickelt, die die Exsudatsammlung aus intakten 10- bzw. 5-mm Wurzelspitzen ermöglicht. Der Hauptteil der Exsudation erfolgte aus den apikalen 5 mm. Mittels Inkubation abgeschnittener 1-mm Wurzelsegmente konnte die Hauptexsudationszone für Citrat auf die apikalen 3-4 mm eingengt werden. Die Exsudationsrate war zwischen 10 und 100 μM Al positiv mit der Al-Konzentration im Inkubationsmedium korreliert. Eine weitere Steigerung der Al-Konzentration führte zu einem Sättigungseffekt. Lanthan war nicht in der Lage die Exsudation zu induzieren, was die Spezifität des Exsudationsprozesses für Al zeigt. Die Anionenkanal-Inhibitoren Nifluminsäure und 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonsäure (DIDS) führten zu einer drastischen Verminderung der Al-induzierten Exsudationsrate, was auf die Beteiligung eines Anionenkanals an der Exsudation hinweist.

Die Verteilung organischer Säuren bzw. deren Anionen entlang der Wurzelspitze zeigte, dass Citrat, Oxalat, Succinat und 2-oxo-Glutarat die stärkste Häufigkeit in der

1-2 mm Zone zeigten und die Verteilungsmuster denen für Callosebildung, Al-Akkumulation sowie den Gehalten von Mg und P entsprachen, was die hohe Stoffwechselaktivität in dieser Zone widerspiegelt. Die Malatgehalte hingegen stiegen (wie die K-Gehalte) von der Spitze aus an und blieben ab dem 2-3 mm Segment konstant. Die Genotypen unterschieden sich in den Kontrollen darin, dass der Al-sensitive Genotyp deutlich geringere Malatgehalte aufwies. Aluminium hatte einen konsistenten Effekt nur auf die Citratgehalte des Al-sensitiven Genotypen: Diese nahmen innerhalb von 2 h Behandlung über den gesamten Apex deutlich ab.

Die Verteilung der Aktivitäten der Citrat-Synthase (CS), Aconitase (ACO), NADP-Isocitratdehydrogenase (ICDH), NAD-Malatdehydrogenase (MDH) sowie Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) bestätigte die hohe Stoffwechselaktivität in den apikalen 2 mm der Wurzelspitze. Aluminium führte innerhalb von 2 h zu leichten Veränderungen der spezifischen Aktivitäten, die bei beiden Genotypen unterschiedlich ausfielen und in der Summe möglicherweise mit für die unterschiedlichen Effekte von Al auf Exsudation sowie Gewebegehalte von Citrat ursächlich sein können. So waren die spezifischen Aktivitäten der MDH und PEPC in der Wurzelspitze des Al-resistenten Genotyps signifikant, die der CS und ICDH tendenziell erhöht, während beim Al-sensitiven Genotyp die ACO-Aktivität in den apikalen 3 mm erhöht war, während die Aktivitäten der CS, MDH, PEPC sowie ICDH nicht beeinflusst wurden.

Um den molekularen Mechanismus der Al-induzierten Exsudation organischer Anionen aus der Wurzelspitze näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss von Al auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran von aus Rindenzellen der 1-2 mm sowie der Elongationszone isolierten Protoplasten mittels der Patch-clamp Technik untersucht. In der EZ waren keine Al-induzierten Ströme messbar, während in der 1-2 mm Zone nach 1 h Vorinkubation der Wurzeln in Agarosegel mit Al vor der Protoplastenisolation Al-induzierte Einwärtsströme auftraten. Diese Ströme traten ohne Verzögerung in 80 % der Protoplasten des Al-resistenten und 33 % des Al-sensitiven Genotyps auf. Ohne Vorinkubation betrug die Induktionsfrequenz 33 % bzw. 0 % nach einer Verzögerungsphase von 7-10 min. Die einwärtsgerichteten Ströme wurden durch Chlorid getragen und waren durch die Anionenkanalinhibitoren Nifluminsäure und DIDS völlig bzw. teilweise blockiert. Lanthan war nicht in der Lage, diese Ströme zu aktivieren. Unter den experimentellen Bedingungen war die Leitfähigkeit im linearen Bereich zwischen

-132 und -52 mV mit 144 pS für pflanzliche Anionenkanäle hoch. Zudem war der Kanal für Malat und Citrat permeabel, was eine Beteiligung am untersuchten Resistenzmechanismus ermöglicht. Da Inkubation in Cycloheximid keine Auswirkung auf Frequenz der Kanalaktivierung sowie Kanalamplitude hatte, ist davon auszugehen, dass Transkription sowie Translation keine Rolle bei der Kanalaktivierung spielen. Der Grund für die Verzögerungsphase ist möglicherweise auf einen membranlokalisierten Signaltransduktionsweg, posttranslationale Modifikationen des bereits in der Membran eingebauten Kanalproteins oder Zusammensetzung bereits synthetisierter Komponenten zurückzuführen. Aluminium blockierte einen K^+ -Einwärtsgleichrichter, während ein K^+ -Auswärtsgleichrichter Al-unempfindlich war.

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen ist zu folgern, dass die 1-2 mm Zone der Primärwurzelspitze von *Zea mays* (L.) von herausragender Bedeutung für Al-Toxizität sowie -Resistenz ist. Kurzfristige Al-Behandlung führt in dieser Zone zu physiologischen Veränderungen, die die weitere Zellentwicklung in genotypisch unterschiedlicher Weise beeinflussen. Ferner wird das Al-Signal aus dieser Zone an die Elongationszone geleitet und führt dort zur schnellen Hemmung des Streckungswachstums.

6 Literaturverzeichnis

- AMOR Y, HAIGLER CH, JOHNSON S, WAINSCOTT M, DELMER DP** (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9353-9357
- AMTMANN A, JELITTO TC, SANDERS D** (1999) K⁺-selective inward-rectifying channels and apoplastic pH in barley roots. *Plant Physiol* **119**: 331-338
- ARCHAMBAULT DJ, ZHANG G, TAYLOR GJ** (1996) Accumulation of Al in root mucilage of an Al-resistant and an Al-sensitive cultivar of wheat. *Plant Physiol* **112**: 1471-1478
- BALUŠKA F, VOLKMANN D, BARLOW PW** (1996) Specialized zones of development in roots. View from the cellular level. *Plant Physiol* **112**: 3-4
- BARKLA BJ, PANTOJA O** (1996) Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 159-184
- BARRATT NM, DONG W, GAGE DA, MAGNUS V, TOWN CD** (1999) Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: Identification of the conjugate N_α-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiol Plant* **105**: 207-217
- BARTEL B** (1997) Auxin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 51-66
- BASU U, GODBOLD D, TAYLOR GJ** (1994) Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J Plant Physiol* **144**: 747-753
- BENNET RJ, BREEN CM, FEY MV** (1985) The primary site of aluminium injury in the root of *Zea mays* L. *S Afr J Plant Soil* **2**: 8-17
- BENNET RJ, BREEN CM** (1991) The aluminium signal: New dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. *Plant Soil* **134**: 153-166
- BERNASCONI P, PATEL BC, REAGEN JD, SUBRAMANIAN MV** (1996) The N-1-naphthylphthalamic acid-binding protein is an integral membrane protein. *Plant Physiol* **111**: 427-432
- BERNT E, BERGMAYER HU** (1974) Isocitrat-Dehydrogenase: UV-Test. *In: Methoden der enzymatischen Analyse*. 3. Aufl. HU Bergmeyer, Hrsg. Verlag Chemie, Weinheim. 660-663
- BLAMEY FPC, DOWLING AJ** (1995) Antagonism between aluminium and calcium for sorption by calcium pectate. *Plant Soil* **171**: 137-140
- BLAMEY FPC, ASHER CJ, EDWARDS DG, KERVEN GL** (1993) *In vitro* evidence of aluminum effects on solution movement through root cell walls. *J Plant Nutr* **16**: 555-562
- BLAMEY FPC, EDMEADES DC, WHEELER DM** (1990) Role of cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of *Lotus* species. *J Plant Nutr* **13**: 729-744

- BLANCAFLOR EB, HASENSTEIN KH** (1995) Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots. *Protoplasma* **185**: 72-82
- BLANCAFLOR EB, JONES DL, GILROY S** (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol* **118**: 159-172
- BLATT MR, GRADMANN D** (1997) K⁺-sensitive gating of the K⁺ outward rectifier in *Vicia* guard cells. *J Membrane Biol* **158**: 241-256
- BLATT MR, THIEL G** (1993) Hormonal control of ion channel gating. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 543-567
- BOCKSTALLER C, GIRARDIN P** (1994) Effects of seed size on maize growth from emergence to silking. *Maydica* **39**: 213-218
- BÖHLEN P, STEIN S, DAIRMAN W** (1973) Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch Biochem Biophys* **155**: 213-220
- BOOIJ PP, ROBERTS MR, VOGELZANG SA, KRAAYENHOF R, DEBOER AH** (1999) 14-3-3-proteins double the number of outward-rectifying K⁺ channels available for activation in tomato cells. *Plant J* **20**: 673-683
- BORLAUG NE** (2000) Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiol* **124**: 487-490
- BREGANTE M, CARPANETO A, PASTORINO F, GAMBALE F** (1997) Effects of mono- and multi-valent cations on the inward-rectifying potassium channel in isolated protoplasts from maize roots. *Eur Biophys J* **26**: 381-391
- BROUQUISSE R, JAMES F, RAYMOND P, PRADET A** (1991) Study of glucose starvation in excised maize root tips. *Plant Physiol* **96**: 619-626
- BROWNLEADER MD, HOPKINS J, MOBASHERI A, DEY PM, JACKSON P, TREVAN M** (2000) Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta* **210**: 668-676
- BUDÍKOVÁ S, MISTRÍK I** (1999) Cultivar characterisation of aluminium tolerance of barley seedlings by root growth, aluminium and callose distribution. *Biol Bratislava* **54**: 447-451
- BÜNTEMEYER K, LÜTHEN H, BÖTTGER M** (1998) Auxin-induced changes in cell wall extensibility of maize roots. *Planta* **204**: 515-519
- CAKMAK I, HORST WJ** (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* **83**: 463-468
- CALBA H, JAILLARD B, FALLAVIER P, ARVIEU JC** (1996) Agarose as a suitable substrate for use in the study of Al dynamics in the rhizosphere. *Plant Soil* **178**: 67-74

- CARPITA NC** (1996) Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 445-476
- CARPITA NC, GIBEAUT DM** (1993) Structural models of the primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**: 1-30
- CLAUSSEN M, LÜTHEN H, BLATT M, BÖTTGER M** (1997) Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* **201**: 227-234
- COCKER KM, EVANS DE, HODSON MJ** (1998) The amelioration of aluminium toxicity by silicon in wheat (*Triticum aestivum* L.): Malate exudation as evidence for an *in planta* mechanism. *Planta* **204**: 318-323
- COLLET L** (2001) Screening maize (*Zea mays* L.) for aluminium resistance – Contribution to the selection for adaptation to acid soils. Dissertation Universität Hannover
- COLLIER DE, ACKERMANN F, SOMERS DJ, CUMMINS WR, ATKIN OK** (1993) The effect of aluminum exposure on root respiration in an aluminum-sensitive and an aluminum-tolerant cultivar of *Triticum aestivum*. *Physiol Plant* **87**: 447-452
- COLLINGS DA, WHITE RG, OVERALL RL** (1992) Ionic current changes associated with the gravity-induced bending response in roots of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **100**: 1417-1426
- COSGROVE DJ** (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**: 1031-1041
- COSGROVE DJ** (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol* **118**: 333-339
- COSGROVE DJ** (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 391-417
- COSGROVE DJ, HEDRICH R** (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**: 143-153
- DAVIES PJ** (1995) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. *In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. PJ Davies, Hrsg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 1-12
- DEGENHARDT J, LARSEN PB, HOWELL SH, KOCHIAN LV** (1998) Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol* **117**: 19-27
- DE LA FUENTE JM, RAMIREZ-RODRIGUEZ V, CABRERA-PONCE JL, HERRERA-ESTRELLA L** (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**: 1566-1568
- DEL CÓRDOBA-PEDREGOSA M, GONZÁLES-REYES JA, DELSAGRARIO CAÑADILLAS M, NAVAS P, CÓRDOBA F** (1996) Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol* **112**: 1119-1125

- DELHAIZE E, CRAIG S, BEATON CD, BENNET RJ, JAGADISH VC, RANDALL PJ** (1993a) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol* **103**: 685-693
- DELHAIZE E, RYAN PR** (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol* **107**: 315-321
- DELHAIZE E, RYAN PR, RANDALL PJ** (1993b) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol* **103**: 695-702
- DELIMA ML, COPELAND L** (1994) The effect of aluminium on respiration of wheat roots. *Physiol Plant* **90**: 51-58
- DELMER DP** (1987) Cellulose biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **38**: 259-290
- Delmer DP** (1999) Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 245-276
- DING JP, BADOT PM, PICKARD BG** (1993) Aluminium and hydrogen ions inhibit a mechanosensory calcium-selective cation channel. *Aust J Plant Physiol* **20**: 771-778
- DING JP, PICKARD BG** (1993) Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *Plant J* **3**: 83-110
- EDLUND A, EKLÖF S, SUNDBERG B, MORITZ T, SANDBERG G** (1995) A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. *Plant Physiol* **108**: 1043-1047
- ELZENGA JTM, VANVOLKENBURGH E** (1997) Kinetics of Ca^{2+} - and ATP-dependent, voltage-controlled anion conductance in the plasma membrane of mesophyll cells of *Pisum sativum*. *Planta* **201**: 415-423
- Ernst, W.H.O.** (1998): Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. *In: Ecotoxicology*. G Schürmann, B Markert, Hrsg. Wiley & Son, New York, USA. 587-620
- ESTELLE M** (1998) Polar auxin transport: New support for an old model. *Plant Cell* **10**: 1775-1778
- EVANS NA, HOYNE PA, STONE BA** (1984) Characteristics and specificity of the interaction of a fluorochrome from anilin blue (Sirufluor) with polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **4**: 215-230
- EVANS ML, ISHIKAWA H** (1997) Cellular specificity of the gravitropic motor response in roots. *Planta* **203**: 115-122
- EVANS ML, MULKEY TJ, VESPER MJ** (1980) Auxin action on proton influx in corn roots and its correlation with growth. *Planta* **148**: 510-512

- EZAKI B, GARDNER RC, EZAKI Y, MATSUMOTO H** (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol* **122**: 657-665
- FANSLER B, LOWENSTEIN JM** (1969) Aconitase from pig heart. *Methods Enzymol* **13**: 26-30
- FATT P, GINSBORG BL** (1958) The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibers. *J Physiol* **142**: 516-543
- FEDOROFF NV, COHEN JE** (1999) Plants and population: Is there time? *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5903-5907
- FELLE HH** (1993) Ion-selective microelectrodes: Their use and importance in modern plant cell biology. *Bot Acta* **106**: 5-12
- FELLE HH** (1994) The H⁺/Cl⁻ symporter in root hair cells of *Sinapsis alba*. *Plant Physiol* **106**: 1131-1136
- FELLE HH** (1998) The apoplastic pH of *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: Aspects of regulation. *J Exp Bot* **49**: 987-995
- FELLE HH, Bertl A** (1986) The fabrication of H⁺-selective liquid-membrane microelectrodes for use in plant cells. *J Exp Bot* **37**: 1416-1428
- FELLE HH, HANSTEIN S, STEINMEYER R, HEDRICH R** (2000) Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *Plant J* **24**: 297-304
- FLURI, M** (1909) Der Einfluß von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma. *Flora* **99**: 81-126
- FOWLER JE, QUATRANO RS** (1997) Plant cell morphogenesis: Plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 697-743
- FOY CD** (1988) Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. *Commun Soil Sci Plant Anal* **19**: 959-987
- FRACHISSE JM, THOMINE S, COLCOMBET J, GUERN J, BARBIER-BRYGOO H** (1999) Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. *Plant Physiol* **121**: 253-261
- GÁLVEZ S, HODGES M, DECOTTIGNIES P, BISMUTH E, LANCIEN M, SANGWAN RS, DUBOIS F, LEMARÉCHAL P, CRÉTIN P, GADAL P** (1996) Identification of a tobacco cDNA encoding a cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase. *Plant Mol Biol* **30**: 307-320
- GASSMANN W, SCHROEDER JI** (1994) Inward-rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat. A mechanism for aluminum-sensitive low affinity K⁺ uptake. *Plant Physiol* **105**: 1399-1408

- GENCHI G, SPAGNOLETTA A, DESANTIS A, STEFANIZZI L, PALMIERI F** (1999) Purification and characterization of the reconstitutively active citrate carrier from maize mitochondria. *Plant Physiol* **120**: 841-847
- GERLACH D** (1984) Botanische Mikrotechnik. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GIERTH M** (2000) Untersuchungen zur Funktion der Exodermis von Gerstenwurzeln (*Hordeum vulgare* L. cv Alexis) im Hinblick auf den radialen Transport anorganischer Ionen im Apoplasten. Dissertation Universität Hannover
- GIERTH M, STELZER R, LEHMANN H** (2000) A method for the cryosectioning of plant roots for analytical electron microscopy. *Microsc Anal* **64**: 5-7
- GODBOLD DL, FRITZ E, HÜTTERMANN A** (1988) Aluminium toxicity and forest decline. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3888-3892
- GODBOLD DL, JENTSCHKE G** (1998) Aluminium accumulation in root cell walls coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. *Physiol Plant* **102**: 553-560
- GODBOLD DL, JENTSCHKE G, MARSCHNER P** (1995) Solution pH and the response of Norway spruce seedlings to aluminium. *Plant Soil* **171**: 175-178
- GOLDMAN DE** (1943) Potential, impedance and rectification in membranes. *J Gen Physiol* **27**: 37-60
- GRABSKI S, SCHINDLER M** (1995) Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol* **108**: 897-901
- GRANT GT, MORRIS ER, REES DA, SMITH PJC, THOM D** (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett* **32**: 195-198
- GRAUER UE, HORST WJ** (1992) Modelling cation amelioration of aluminium toxicity. *Soil Sci Soc Am J* **56**: 166-172
- GUNSÉ B, POSCHENRIEDER C, BARCELÓ J** (1997) Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiol* **113**: 595-602
- HAGER A, MENZEL H, KRAUSS A** (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* **100**: 47-75
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**: 85-100
- HANNING I, BAUMGARTEN K, SCHOTT K, HELDT HW** (1999) Oxaloacetate transport into plant mitochondria. *Plant Physiol* **119**: 1025-1031
- HANSON WD** (1991) Root characteristics associated with divergent selection for seedling aluminum tolerance in soybean. *Crop Sci* **31**: 125-129

- HARTWELL BL, PEMBER FR** (1918) The presence of aluminium as a reason for the difference in the effect of so-called acid soils on barley and rye. *Soil Sci* **6**: 259
- HASENSTEIN KH, BLANCAFLOR EB, LEE JS** (1999) The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots. *Physiol Plant* **105**: 729-738
- HASENSTEIN KH, EVANS ML** (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol* **86**: 890-894
- HATCH MD, OLIVER IR** (1978) Activation and inactivation of Phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf extracts from C₄ species. *Aust J Plant Physiol* **5**: 571-580
- HAUG A** (1984) Molecular aspects of aluminum toxicity. *Cri Rev Plant Sci* **1**: 345-373
- HAUG A, SHI B, VITORELLO V** (1994) Aluminium interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch Toxicol* **69**: 1-7
- HEDRICH R, BUSCH H, RASCHKE K** (1990) Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J* **9**: 3889-3892
- HEDRICH R, MARTEN I** (1993) Malate induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide CO₂ sensor to guard cells. *EMBO J* **12**: 897-901
- HELDT HW** (1996) *Pflanzenbiochemie*. Spektrum, Heidelberg.
- HENDERSON J, BAULY JM, ASHFORD DA, OLIVER SC, HAWES CR, LAZARUS CM, VENIS MA, NAPIER RM** (1997) Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: Quantifying escape and the role of auxin. *Planta* **202**: 313-323
- HILLE B** (1994) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2. Ausg. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
- HODGKIN AL, KATZ B** (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* **108**: 37-77
- HORST WJ** (1995) The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: A review. *Z Pflanzenernähr Boden* **158**: 419-428
- HORST WJ, ASHER CJ, CAKMAK I, SZULKIEWICZ P, WISSEMEIER AH** (1992) Short-term responses of soybean roots to aluminium. *J Plant Physiol* **140**: 174-178
- HORST WJ, KLOTZ F** (1990) Screening soybean for aluminium tolerance and adaptation to acid soils. *In: Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. N Bassam, M Dambroth, BC Loughman, Hrsg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 355-360
- HORST WJ, PÜSCHEL AK, SCHMOHL N** (1997) Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil* **192**: 23-30

- HORST WJ, SCHMOHL N, KOLLMEIER M, BALUSKA F, SIVAGURU M** (1999) Does aluminium inhibit root growth of maize through interaction with the cell wall – plasma membrane – cytoskeleton continuum? *Plant and Soil* **215**: 163-174
- HORST WJ, WAGNER A, MARSCHNER H** (1982) Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z Pflanzenphysiol* **109**: 95-103
- HUE NV, CRADDOCK GR, ADAMS F** (1986) Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci Soc Am J* **50**: 28-34
- HUANG JW, GRUNES DL, KOCHIAN LV** (1994) Voltage-dependent Ca^{2+} influx into right-side-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: Characterization of a putative Ca^{2+} channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3473-3477
- HUANG JW, PELLET DM, PAPERNIK LA, KOCHIAN LV** (1996) Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and -resistant wheat cultivars. *Plant Physiol* **110**: 561-569
- HUETT DO, MENARY RC** (1980) Aluminum distribution in freeze-dried roots of cabbage, lettuce and kikuyu grass by energy-dispersive X-ray analysis. *Aust J Plant Physiol* **7**: 101-111
- ISHIKAWA H, EVANS ML** (1990a) Electrotropism of maize roots: Role of the root cap and relationship to gravitropism. *Plant Physiol* **94**: 913-918
- ISHIKAWA H, EVANS ML** (1990b) Gravity-induced changes in intra-cellular potentials in elongating cortical cells of mung bean roots. *Plant Cell Physiol* **31**: 457-462
- ISHIKAWA H, EVANS ML** (1993) The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol* **102**: 1203-1210
- ISHIKAWA H, EVANS ML** (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol* **109**: 725-727
- ISHIKAWA S, WAGATSUMA T** (1998) Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant Cell Physiol* **39**: 516-525
- IWABUCHI A, YANO M, SHIMUZU H** (1989) Development of extracellular electric pattern around *Lepidium* roots: Its possible role in root growth and gravitropism. *Planta* **183**: 381-390
- IWASAKI I, ARATA H, KIJIMA H, NISHIMURA M** (1992) Two types of channels involved in the malate ion transport across the tonoplast of a crassulacean acid metabolism plant. *Plant Physiol* **98**: 1494-1497
- JOHNSON JF, ALLAN DL, VANCE CP** (1994) Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiol* **104**: 657-665
- JONES DL** (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* **205**: 25-44

- JONES DL, GILROY S, LARSEN PB, HOWELL SH, KOCHIAN LV** (1998a) Effect of aluminum on cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Planta* **206**: 378-387
- JONES DL, KOCHIAN LV** (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: A role in aluminum toxicity? *Plant Cell* **7**: 1913-1922
- JONES DL, KOCHIAN LV, GILROY S** (1998b) Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiol* **116**: 81-89
- JORGE RA, ARRUDA P** (1997) Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. *Phytochem* **45**: 675-681
- KAUFMANN PB, WU LL, BROCK TG, KIM D** (1995) Hormones and the orientation of growth. *In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. PJ Davies, Hrsg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 547-571
- KAUSS H** (1987) Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* **8**: 47-72
- KAUSS H** (1989) Fluorimetric measurement of callose and other 1,3- β -glucans. *In: Modern Methods of Plant Analysis, New series, Vol 10 Plant fibers*. HF Linskens, JF Jackson, Hrsg. Springer, Berlin, Heidelberg. 127-137
- KAUSS H** (1996) Callose synthesis. *In: Membranes: Specialized Functions in Plants*. M Smallwood, JP Knox, DJ Bowles, Hrsg. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. 77-92
- KERK NM, FELDMAN LJ** (1994) The quiescent center in roots of maize: Initiation, maintenance and role in organization of the root apical meristem. *Protoplasma* **183**: 100-106
- KERK NM, FELDMAN LJ** (1995) A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent center: Implications for organization of root meristems. *Development* **121**: 2825-2833
- KERK NM, JIANG K, FELDMAN LJ** (2000) Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol* **122**: 925-932
- KERVEN GL, EDWARDS DG, ASHER CJ, HALLMAN PS, KOKOT S** (1989) Aluminum determination in soil solution. II. Short term colorimetric procedures for the measurement of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Aust J Soil Res* **27**: 91-102
- KINRAIDE TB** (1991) Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* **134**: 167-178
- KINRAIDE TB** (1993) Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media: A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. *Physiol Plant* **88**: 619-625

- KINRAIDE TB, Ryan, PR, Kochian LV** (1992) Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol* **99**: 1461-1468
- KINRAIDE TB, RYAN PR, KOCHIAN LV** (1994) Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminium rhizotoxicity. II. Evaluating the Ca^{2+} -displacement hypothesis. *Planta* **192**: 104-109
- KINZEL H** (1983) Influence of limestone, silicates and soil pH on vegetation. *In: Physiological Plant Ecology III, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 12.* OLC Lange, A Pirson, MH Zimmermann, Hrsg. Springer, Berlin. 201-244
- KLEBER HP, SCHLEE D, SCHÖPP W** (1997) *Biochemisches Praktikum: Methoden für Studium, Praxis, Forschung.* 5. Aufl. Gustav Fischer, Stuttgart.
- KOCHIAN LV** (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 237-260
- KOCHIAN LV, LUCAS WJ** (1983) Potassium transport in roots II. The significance of the root periphery. *Plant Physiol* **73**: 208-215
- KÖHLE H, JEBLICK W, POTEN F, BLASCHKE W, KAUSS H** (1985) Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. *J Plant Physiol* **77**: 544-551
- KOYAMA H, KAWAMURA A, Kihara T, HARA T, TAKITA E, SHIBATA D** (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol* **41**: 1030-1037
- KOYAMA H, TAKITA E, KAWAMURA A, HARA T, SHIBATA D** (1999) Overexpression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol* **40**: 482-488
- KUTSCHERA U** (1994) The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytol* **126**: 549-569
- LAGRIMINI LM, JOLY RJ, DUNLAP JR, LIU TTY** (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth development. *Plant Mol Biol* **33**: 887-895
- LARKIN PJ** (1976) Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta* **128**: 213-216
- LARSEN PB, DEGENHARDT J, TAI CY, STENZLER LM, HOWELL SH, KOCHIAN LV** (1998) Aluminum-resistant *arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from root tips. *Plant Physiol* **117**: 9-18
- LAZOF DB, GOLDSMITH JG, RUFTY TW, LINTON RW** (1996) The early entry of Al into cells of intact soybean roots. A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. *Plant Physiol* **112**: 1289-1300
- LAZOF DB, GOLDSMITH JG, SUGGS C, RUFTY TW, LINTON RW** (1994a) Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol* **106**: 1107-1114

- LAZOF DB, RINCON M, RUFTY TW, MACKDOWN CT, CARTER TE** (1994b) Aluminum accumulation and associated effects on $^{15}\text{NO}_3^-$ influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance. *Plant Soil* **164**: 291-297
- LI XF, MA JF, HIRADATE S, MATSUMOTO H** (2000a) Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. *Physiol Plant* **108**: 152-160
- LI XF, MA JF, MATSUMOTO H** (2000b) Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol* **123**: 1537-1543
- LINDBERG S, STRID H** (1997) Aluminium induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* **99**: 405-414
- LLUGANY M, MASSOT N, WISSEMEIER AH, POSCHENRIEDER C, HORST WJ, BARCELÓ J** (1994) Aluminum tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. *J Plant Nutr Soil Sci* **157**: 447-451
- LLUGANY M, POSCHENRIEDER C, BARCELÓ J** (1995) Monitoring aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in resistance to aluminium and proton toxicity. *Physiol Plant* **93**: 265-271
- LOHSE G, HEDRICH R** (1995) Anions modify the response of guard-cell anion channels to auxin. *Planta* **197**: 546-552
- LOMAX TL, MUDAY GK, RUBERY PH** (1995) Auxin transport. *In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. PJ Davies, Hrsg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 509-530
- LUKASZEWSKI KM, BLEVINS DG** (1996) Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiol* **112**: 1135-1140
- MA JF** (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol* **41**: 383-390
- MA JF, HIRADATE S, MATSUMOTO H** (1998) High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol* **117**: 753-759
- MA JF, MIYASAKA SC** (1998) Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol* **118**: 861-865
- MA JF, TAKITA S, YANG ZM** (2000) Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in *Triticale*. *Plant Physiol* **122**: 687-694
- MA JF, YAMAMOTO R, NEVINS DJ, MATSUMOTO H, BROWN PH** (1999) Al binding in the epidermis cell wall inhibits cell elongation of Okra hypocotyl. *Plant Cell Physiol* **40**: 549-556
- MA JF, ZHENG SJ, HIRADATE S, MATSUMOTO H** (1997) Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature* **390**: 569-570

- MAATHUIS FJM, ICHIDA AM, SANDERS D, SCHROEDER JI** (1997) Roles of higher plant K^+ channels. *Plant Physiol* **114**: 1141-1149
- MACNICOL PK, JACOBSEN JV** (1992) Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. *Plant Physiol* **98**: 1098-1104
- MALHÓ, R** (1999) Coding information in plant cells: The multiple roles of Ca^{2+} as a second messenger. *Plant Biol* **1**: 487-494
- MALTHUS TR** (1798/1970) *An Essay on the Principle of Population*. A Flew, Hrsg. Penguin, London.
- MARIENFELD S, LEHMANN H, STELZER R** (1995) Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil* **171**: 167-173
- MARIENFELD S, SCHMOHL N, KLEIN M, SCHRÖDER WH, KUHN AJ, HORST WJ** (2000) Localisation of aluminum in root tips of *Zea mays* and *Vicia faba*. *J Plant Physiol* **156**: 666-671
- MARIENFELD S, STELZER R** (1993) X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *J Plant Physiol* **141**: 569-573
- MARSCHNER H** (1991) Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* **134**: 1-20
- MARSCHNER H** (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2. Aufl. Academic Press, London.
- MARTELL AE, MOTEKAIKIS RJ** (1989) Coordination chemistry and specification of Al(III) in aqueous solution. *In: Environmental Chemistry and Toxicology of Aluminum*. TE Lewis, Hrsg. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA. 3-17
- MARTIN RB** (1988) Bioinorganic chemistry of aluminum. *In: Metal Ions in Biological Systems*. Vol. 24. Aluminum and its Role in Biology. H Sigel, Hrsg. Marcel Dekker, NY, USA. 1-57
- MARTINOIA E, RENTSCH D** (1994) Malate compartmentation – responses to a complex metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 447-467
- MATSUMOTO H** (2000) Cell biology of Al tolerance and toxicity in higher plants. *Int Rev Cytol* **200**: 1-46
- MCQUEEN-MASON S, DURACHKO DM, COSGROVE DJ** (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433
- MEYER AJ, WEISENSEELE MH** (1997) Wound-induced changes of membrane voltage, endogenous currents, and ion fluxes in primary roots of maize. *Plant Physiol* **114**: 989-998
- MEUWLY P, PILET EP** (1991) Local treatment with indole-3-acetic acid influences differential growth responses in *Zea mays* L. roots. *Planta* **185**: 58-64

- MILLER AL, GOW NAR** (1989a) Correlation between profile of ion-current circulation and root development. *Physiol Plant* **75**: 102-108
- MILLER AL, GOW NAR** (1989b) Correlation between root generated ionic currents, pH, fusicoccin, indoleacetic acid and growth of the primary root of *Zea mays*. *Plant Physiol* **89**: 1198-1206
- MILLER DD, DERUIJTER NCA, EMONS AMC** (1997a) From signal to form: Aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips. *J Exp Bot* **48**: 1881-1896
- MILLER D, HABLE W, GOTTWALD J, ELLARD-IVEY M, DEMURA T, LOMAX T, CARPITA N** (1997b) Connections: The hard wiring of the plant cell for perception, signaling, and response. *Plant Cell* **9**: 2105-2117
- MIYASAKA SC, BUTA JG, HOWELL RK, FOY CD** (1991) Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol* **96**: 737-743
- MIYASAKA SC, KOCHIAN LV, SHAFF JE, FOY CD** (1989) Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺ transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol* **91**: 1188-1196
- MONSHAUSEN GB, ZIESCHANG HE, SIEVERS A** (1996) Differential proton secretion in the apical elongation zone caused by gravistimulation is induced by a signal from the root cap. *Plant Cell Environ* **19**: 1408-1414
- MOON DH, OTTOBONI LMM, SOUZA AP, SIBOV ST, GASPAR M, ARRUDA P** (1997) Somaclonal-variation-induced aluminum-sensitive mutant from an aluminum-inbred maize tolerant line. *Plant Cell Rep* **16**: 686-691
- MORRIS DA, ROBINSON JS** (1998) Targeting of auxin carriers to the plasma membrane: Differential effects of brefeldin A on the traffic of auxin uptake and efflux carriers. *Planta* **205**: 606-612
- MÜLLER A, GUAN C, GÄLWEILER L, TÄNZLER P, HUIJSER P, MARCHANT A, PARRY G, BENNETT A, WISMAN E, PALME K** (1998) *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* **17**: 6903-6911
- MURPHY AS, EISINGER WR, SHAFF JE, KOCHIAN LV, TAIZ L** (1999) Early copper-induced leakage of K⁺ from *arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol* **121**: 1375-1382
- NEHER E** (1992) Corrections for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* **207**: 123-131
- NEUMANN G, RÖMHELD V** (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* **211**: 121-130
- NICK P** (1999) Signals, motors, morphogenesis – the cytoskeleton in plant development. *Plant Biol.* **1**: 169-179
- NORMANLY J** (1997) Auxin metabolism. *Physiol Plant* **100**: 431-442

- OWNBY JD, POPHAM HR** (1989) Citrate reverses the inhibition of wheat root growth caused by aluminum. *J Plant Physiol* **135**: 588-591
- PANTOJA O, GELLI A, BLUMWALD E** (1992) Characterization of vacuolar malate and K⁺ channels under physiological conditions. *Plant Physiol* **100**: 1137-1141
- PAPERNIK LA, KOCHIAN LV** (1997) Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. *Plant Physiol* **115**: 657-667
- PARKER DR, NORWELL WA, CHANEY RL** (1995) GEOCHEM-PC: A chemical speciation program for IBM and compatible personal computers. *In: Chemical Equilibria and Reaction Models*. RH Loeppert, AP Schwab, S Goldberg, Hrsg. Soil Science Society of America, Madison, USA. 253-269
- PARKER DR, PEDLER, JF** (1998) Probing the "malate hypothesis" of differential aluminum tolerance in wheat by using other rhizotoxic ions as proxies for Al. *Planta* **205**: 389-396
- PATEL DD, BARLOW PW, LEE RB** (1990) Development of vacuolar volume in the root-tips of pea. *Ann Bot* **65**: 159-169
- PELLET DM, GRUNES DL, KOCHIAN LV** (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**: 788-795
- PELLET DM, PAPERNIK LA, KOCHIAN LV** (1996) Multiple aluminum-resistance in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiol* **112**: 591-597
- PETERS WS, FELLE HH** (1991) Control of apoplast pH in corn coleoptile segments. II. The effects of various auxins and auxin analogues. *J Plant Physiol* **137**: 691-696
- PETERS WS, FELLE HH** (1999) The correlation of profiles of surface pH and relative elemental growth rates in maize roots. *Plant Physiol* **121**: 905-912
- PETERS WS, LÜTHEN H, BÖTTGER M, FELLE H** (1998) The temporal correlation of changes in apoplast pH and growth rate in maize coleoptile segments. *Aust J Plant Physiol* **25**: 21-25
- PHILIPPAR K, FUCHS I, LÜTHEN H, HOTH S, BAUER CS, HAGA K, THIEL G, LJUNG K, SANDBERG G, BÖTTGER M, BECKER D, HEDRICH R** (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12186-12191
- PILET PE, SENN A** (1980) Root growth gradients: A critical analysis. *Z Pflanzenphysiol* **99**: 121-130
- PILET PE, VERSEL JM, MAYOR G** (1983) Growth distribution and surface pH patterns along maize roots. *Planta* **158**: 398-402
- PIÑEROS MA, KOCHIAN LV** (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. *Plant Physiol* **125**: 292-305

- PIÑEROS M, TESTER M** (1993) Plasma membrane Ca^{2+} channels in roots of higher plants and their role in aluminium toxicity. *Plant Soil* **155/156**: 119-122
- PIÑEROS M, TESTER M** (1995) Characterization of a voltage dependent Ca^{2+} -selective channel from wheat roots. *Planta* **195**: 478-488
- PINTRO J, BARLOY J, FALLAVIER P** (1997) Effects of low aluminum activity in nutrient solutions on organic acid concentrations in maize plants. *J Plant Nutr* **20**: 601-611
- POLLE E, KONZAK CF, KITTRICK JA** (1978) Visual detection of aluminium tolerance levels of wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci* **18**: 823-827
- PRITCHARD J** (1994) The control of cell expansion in roots. *New Phytol* **127**: 3-26
- PUTHOTA V, CRUZ-ORTEGA R, JOHNSON J, OWNBY J** (1991) An ultrastructural study of the inhibition of mucilage secretion in the wheat root cap by aluminium. *In: Plant-Soil Interactions at Low pH*. RJ Wright, Hrsg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 779-787
- RAYLE DL, CLELAND R** (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**: 1271-1274
- REED RC, BRADY SR, MUDAY GK** (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**: 1369-1378
- REID RJ, TESTER MA, SMITH FA** (1995) Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta* **195**: 362-368
- RENGEL Z** (1992a) Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol* **121**: 499-513
- RENGEL Z** (1992b) Disturbance of cell Ca^{2+} homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant Cell Environ* **15**: 931-938
- RENGEL Z** (1996) Uptake of aluminium in plant cells. *New Phytol* **134**: 389-406
- RENGEL Z, PIÑEROS M, TESTER M** (1995) Transmembrane calcium fluxes during Al stress. *Plant Soil* **171**: 125-130
- RENGEL Z, REID RJ** (1997) Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant Soil* **192**: 31-35
- RIBNICKY DM, COOKE TJ, COHEN JD** (1998) A microtechnique for the analysis of free and conjugated indole-3-acetic acid in milligram amounts of plant tissue using a benchtop gas chromatograph-mass spectrometer. *Planta* **204**: 1-7
- RICHARDS KD, SCHOTT EJ, SHARMA YK, DAVIS KR, GARDNER RC** (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 409-418
- RINCÓN M, GONZALES RA** (1992) Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol* **99**: 1021-1028

- ROBINSON DG** (1996) SuSy ergo GluSy: New developments in the field of cellulose biosynthesis. *Botanica Acta* **109**: 261-263
- ROBERTS SK, TESTER M** (1995) Inward and outward K⁺-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. *Plant J* **8**: 811-825
- RÜCK A, PALME K, VENIS MA, NAPIER RM, FELLE HH** (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J* **4**: 41-46
- RUEGGER M, DEWEY E, HOBBIIE L, BROWN D, BERNASCONI P, TURNER J, MUDAY G, ESTELLE M** (1997) Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a regulation in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* **9**: 745-757
- RYAN PR, DELHAIZE E, RANDALL PJ** (1995a) Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* **196**: 103-110
- RYAN PR, DELHAIZE E, RANDALL PJ** (1995b) Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum are highly correlated in wheat. *Aust J Plant Physiol* **22**: 531-536
- RYAN PR, DiTOMASO JM, KOCHIAN LV** (1993) Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J Exp Bot* **44**: 437-446
- RYAN PR, KINRAIDE TB, KOCHIAN LV** (1994) Al³⁺-Ca²⁺ interactions in aluminum rhizotoxicity. *Planta* **192**: 98-103
- RYAN PR, KOCHIAN LV** (1993) Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. *Plant Physiol* **102**: 975-982
- RYAN PR, REID RJ, SMITH FA** (1997a) Direct evaluation of the Ca²⁺-displacement hypothesis for Al toxicity. *Plant Physiol* **113**: 1351-1357
- RYAN PR, SHAFF JE, KOCHIAN LV** (1992) Aluminum toxicity in roots. Correlations among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol* **99**: 1193-1200
- RYAN PR, SKERRETT M, FINDLAY GP, DELHAIZE E, TYERMAN SD** (1997b) Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6547-6552
- SAKMANN B, NEHER E** (1995) *Single-Channel Recording*. 2. Aufl. Plenum Press, New York, USA.
- SAMUELS TD, KÜCÜKAKYÜZ K, RINCÓN-ZACHARY M** (1997) Al partitioning patterns and root growth as related to Al sensitivity and Al-tolerance in wheat. *Plant Physiol* **113**: 527-534

- SANDERS D, BROWNLEE C, HARPER J** (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**: 691-706
- SCHEFFER F, SCHACHTSCHABEL P** (1982) *Lehrbuch der Bodenkunde*. 11. Aufl. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- SCHEIBLE WR, KRAPP A, STITT M** (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environ* **23**: 1155-1167
- SCHMIDT C, SCHROEDER JI** (1994) Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Plant Physiol* **106**: 383-391
- SCHMOHL N** (2001) Bedeutung des Apoplasten für die Aluminiumtoxizität bei höheren Pflanzen. Dissertation Universität Hannover
- SCHMOHL N, HORST WJ** (2000) Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant Cell Environ* **23**: 735-742
- SCHMOHL N, PILLING J, FISAHN J, HORST WJ** (2000) Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* **109**: 419-427
- SCHOFIELD RMS, PALLON J, FISKESJÖ G, KARLSSON G, MALMQUIST KG** (1998) Aluminum and calcium distribution patterns in aluminum-intoxicated roots of *Allium cepa* do not support the calcium-displacement hypothesis and indicate signal-mediated inhibition of root growth. *Planta* **205**: 175-180
- SCHROEDER JI** (1995) Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Mol Biol* **28**: 353-361
- SILVA IR, SMYTH TJ, MOXLEY DF, CARTER TE, ALLEN NS, RUFTY TW** (2000) Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol* **123**: 543-552
- SITBON F, PERROT-RECHENMANN C** (1997) Expression of auxin-regulated genes. *Physiol Plant* **100**: 443-455
- SIVAGURU M, BALUŠKA F, VOLKMANN D, FELLE HH, HORST WJ** (1999a) Impacts of aluminum on the maize cytoskeleton. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol* **119**: 1-10
- SIVAGURU M, FUJIWARA T, ŠAMAJ J, BALUŠKA F, YANG Z, OSAWA H, MAEDA T, MORI T, VOLKMANN D, MATSUMOTO H** (2000a) Aluminum-induced 1,3-β-D-Glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol* **124**: 991-1005
- SIVAGURU M, HORST WJ** (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

- SIVAGURU M, MATSUMOTO H, HORST WJ** (2000b) Control of the response to aluminum stress. *In: Plant Microtubules*. P Nick, Hrsg. Springer, Heidelberg. 103-120
- SIVAGURU M, YAMAMOTO Y, MATSUMOTO H** (1999b) Differential impacts of aluminium on microtubules depends on the growth phase in suspension cultured tobacco cells. *Physiol Plant* **107**: 110-119
- SRERE PA** (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol* **13**: 3-11
- STAß A, HORST WJ** (1995) Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. *Plant Soil* **171**: 113-118
- STINEMETZ CL** (1995) Transport of [³H]IAA label in gravistimulated primary roots of maize. *Plant Growth Regul* **16**: 83-92
- STRYER L** (1994) Biochemie. Spektrum, Heidelberg
- SZE H, LI X, PALMGREN MG** (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATP-ases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**: 677-689
- TAKABATAKE R, SHIMMEN T** (1997) Inhibition of electrogenesis by aluminum in characean cells. *Plant Cell Physiol* **38**: 1264-1271
- TAKITA E, KOYAMA H, HARA T** (1999) Organic acid metabolism in aluminum-phosphate utilizing cells of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Physiol* **40**: 489-495
- TANG Y, SORRELLS ME, KOCHIAN LV, GARVIN DF** (2000) Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. *Crop Sci* **40**: 778-782
- TAYLOR, GJ** (1991) Current views of the aluminium stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem Physiol* **10**: 57-93
- TAYLOR GJ** (1995) Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminum resistance. *Plant Soil* **171**: 89-103
- TESTER M** (1990) Plant ion channels: Whole-cell and single-cell studies. *New Phytol* **114**: 305-340
- THIEL G, BRÜDERN A, GRADMANN D** (1996) Small inward rectifying K⁺ channels in coleoptiles: Inhibition by external Ca²⁺ and function in cell elongation. *J Membrane Biol* **150**: 9-20
- THOMINE S, GUERN J, BARBIER-BRYGOO H** (1997) Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: Nucleotide regulation and pharmacological properties. *J Membrane Biol* **159**: 71-82
- TICE KR, PARKER DR, DEMASON DA** (1992) Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol* **100**: 309-318
- TONINELLO A, CLARI G, MANCON M, TOGNON G, ZATTA P** (2000) Aluminum as an inducer of the mitochondrial permeability transition. *JBIC* **5**: 612-623

- TYERMAN SD** (1992) Anion channels in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 351-373
- VÁZQUEZ MD, POSCHENRIEDER C, CORRALES I, BARCELÓ J** (1999) Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol* **119**: 435-444
- VITORELLO VA, HAUG A** (1999) Capacity for aluminium uptake depends on brefeldin A-sensitive membrane traffic in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2) cells. *Plant Cell Reports* **18**: 733-736
- VUČINIĆ Ž, VULETIĆ M** (1995) The effect of addition of sucrose on the energy status and the trans-root electrical potential difference of excised maize roots. *Plant Cell Physiol* **36**: 45-52
- VON UEXKÜLL HR, MUTERT E** (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* **171**: 1-15
- WATT M, EVANS JR** (1999) Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Physiol* **120**: 705-716
- WINCH S, PRITCHARD J** (1999) Acid-induced wall loosening is confined to the accelerating region of the root growing zone. *J Exp Bot* **50**: 1481-1487
- WISSEMEIER AH, DIENING A, HERGENRÖDER A, HORST WJ, MIX-WAGNER G** (1992) Callose formation as parameter for assessing genotypical plant tolerance of aluminium and manganese. *Plant Soil* **146**: 67-75
- WISSEMEIER AH, HAHN G, MARSCHNER H** (1998) Callose in roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) is a sensitive parameter for aluminium supply at a forest site (Höglwald). *Plant Soil* **199**: 53-57
- WISSEMEIER AH, HORST WJ** (1995) Effect of calcium supply on aluminium-induced callose formation, its distribution and persistence in roots of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J Plant Physiol* **145**: 470-476
- WISSEMEIER AH, KLOTZ F, HORST WJ** (1987) Aluminium-induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.). *J Plant Physiol* **129**: 487-492
- WYATT SE, CARPITA NC** (1993) The plant cytoskeleton-cell wall continuum. *Trends Cell Biol* **3**: 413-417
- YAMAMOTO Y, KOBAYASHI Y, MATSUMOTO H** (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol* **125**: 199-208
- YANG ZM, SIVAGURU M, HORST WJ, MATSUMOTO H** (2000) Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* **110**: 72-77

- YOSHINO M, ITO M, HANEDA M, TSUBOUCHI R, MURAKAMI K** (1999) Prooxidant action of aluminum-ion - stimulation of iron-mediated lipid peroxidation by aluminum. *BioMetals* **12**: 237-240
- YOUNG LM, EVANS ML** (1994) Calcium-dependent asymmetric movement of ³H-indole-3 acetic acid across gravistimulated isolated root caps of maize. *Plant Growth Reg* **14**: 235-242
- YU Q, TANG C, KUO J** (2000) A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. *Plant Soil* **219**: 29-40
- ZHANG G, HODDINOTT J, TAYLOR GJ** (1994) Characterisation of 1-3-β-glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminium toxicity. *J Plant Physiol* **144**: 229-234
- ZHANG G, ŚLASKI JJ, ARCHAMBAULT DJ, TAYLOR GJ** (1997) Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiol Plant* **99**: 302-308
- ZHANG G, TAYLOR GJ** (1989) Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol* **91**: 1094-1099
- ZHANG G, TAYLOR GJ** (1990) Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. Identity of the linear phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars. *Plant Physiol* **94**: 577-584
- ZHANG WH, RYAN PR, TYERMAN SD** (2001) Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiol* **125**: 1459-1472
- ZHANG WJ, RENGEL Z** (1999) Aluminium induces an increase in cytosolic calcium in intact root apical cells. *Aust J Plant Physiol* **26**: 401-409
- ZIMMERMANN S, THOMINE S, GUERN J, BERBIER-BRYGOO H** (1994) An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. *Plant J* **6**: 707-716
- ZHENG SJ, MA JF, MATSUMOTO H** (1998a) High aluminum resistance in buckwheat. 1. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol* **117**: 745-751
- ZHENG SJ, MA JF, MATSUMOTO H** (1998b) Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiol Plant* **103**: 209-214
- ZIESCHANG HE, KÖHLER K, SIEVERS A** (1993) Changing proton concentrations at the surfaces of gravistimulated *Phleum* roots. *Planta* **190**: 546-554

Mein aufrichtiger Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. J. Horst für die wissenschaftlichen Möglichkeiten, die er mir eröffnet hat und die konstruktive Zusammenarbeit

Herrn Prof. Dr. H. Lehmann für die Übernahme des Koreferates und die überaus freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe zur Anfertigung der Kryoschnitte

Der DFG für die Förderung der vorliegenden Arbeit im Rahmen des Schwerpunktprogramms 717: "Der Apoplast der Höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum"

Herrn Prof. Dr. H. H. Felle, Gießen, für die erfrischenden Einblicke in die Geheimnisse der Elektrophysiologie sowie die Möglichkeit, bei ihm arbeiten zu dürfen

Herrn Prof. Dr. R. Hedrich, Würzburg, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Patch-clamp Arbeitsplatzes

Dr. Mayandi Sivaguru für die freundliche Unterstützung in der Einarbeitungsphase

Drs. R. Stelzer und M. Gierth für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei den Kryoarbeiten

Dr. W. Schröder, Jülich, für die freundliche Unterstützung der SIMS-Messungen

Drs. C. Bauer und P. Dietrich für die Einführung in die Patch-clamp Technik

Drs. N. Schmohl und L. Collet für die Durchsicht dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik

Den KollegInnen am Institut für Pflanzenernährung, besonders Marion, Peter und Kirsten

Meinen Eltern, Ellen und Dr. Jörg Kollmeier, ohne deren stetige Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre

Meike, die nicht unerheblichen Anteil am Gelingen dieser Unternehmung trug

Knöpfchen und Gandalf, den charismatischen Feliden, für die diese Arbeit eigentlich stets nur die Abwesenheit ihres Dosenöffners bedeutet hat

Lebenslauf

Name, Vorname:	Kollmeier, Malte
Geburtsdatum:	11.11.1970
Geburtsort:	Duisburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:	1977-81:	Besuch der Luthergrundschule in Gladbeck
	1981-82:	Besuch des Städt. Ratsgymnasiums in Gladbeck
	1982-83:	Besuch der Orientierungsschule Marklohe
	1983-90:	Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Nienburg
	1990:	Abitur (Biologie, Englisch, Geschichte, Latein)
Zivildienst:	1990-1991	Krankenhaus Nordstadt Hannover
Hochschulausbildung:	1991-1992	Studium der Elektrotechnik
	1992-1997	Studium der Biologie und Anglistik für das Lehramt an Gymnasien
	Dez. 1997	1. Staatsexamen
	Dez. 1999	Kenntnisprüfung Botanik und Zoologie
Berufstätigkeit:	Seit Jan. 1998 experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für Pflanzenernährung der Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. W. J. Horst. Davon von April 1998 bis Dezember 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter.	
	30. März 2001: Abgabe der Dissertation	