

Bedeutung des Apoplasten für die Aluminiumtoxizität bei höheren Pflanzen

Von dem Fachbereich Biologie

der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Nicole Schmohl

geboren am 30. 03. 1969, in Hannover

2001

Referent: Prof. Dr. W.J. Horst

Korreferent: Prof. Dr. H. Lehmann

Tag der Promotion: 17. Januar 2001

Abstract

The adverse effects of aluminium (Al) on growth of plants is primary caused by inhibition of root elongation. The mechanism of Al-induced inhibition of root growth is still not fully understood. In the presented study, it was investigated if the composition of the cell wall can modulate Al-toxicity and if Al can alter the activity of enzymes which are involved in the modification of cell walls. Three plant species which are similarly sensitive to Al were used: potato, broad bean and maize. These species have different composition of their cell wall; maize contains only low amounts of pectin, while broad bean has higher pectin contents. Transgenic lines of potato differing in grade of expression of pectinmethyl esterase (PME) were used to determine the effect of DM (degree of methylation) of pectins on Al-toxicity.

It is still unclear if Al-toxicity is generated from the apoplastic or symplastic site. Therefore, the distribution of Al in root tips of maize and broad bean was investigated via LAMMA (laser microprobe mass analysis).

The radial mobility of Al was lower in broad bean than in maize. In root tips of maize Al reached the stele within one hour. In broad bean Al was confined to rhizodermis and outer cortex cell, which implies a stronger binding of Al in the cell wall of the latter plant. After 3 h symplastic Al could be detected in both plant species, although in much lower concentrations than in the apoplast. The total contents of Al in roots of broad bean was higher than in maize. The different distribution and contents of Al in the roots of these species was not reflected in their sensitivity to Al since both are approximately similarly sensitive. The role of the cell wall for Al-toxicity in the comparison of both plant species was most probably overlaid by different expression of resistance mechanisms e.g. release of complexors (organic anions, mucilage).

Pectins are possible binding sites for Al in the apoplast. The pectin content was higher in broad bean than in maize which was reflected in the higher Al-contents of root tips of broad bean. Pectin is not evenly distributed along the root but showed a gradient in both plant species with its maximum in the very tip of the root (0-1 mm). There was a positive correlation between the pectin and the Al-contents of individual root segments within one plant species as well as when both species were combined.

The pectin content of cell suspension cultures was lowered by short-term treatment with pectolytic enzymes or enriched by long-term adaptation to NaCl and 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB). There was a close positive correlation of pectin content and Al-content of the different cell cultures.

PME is an enzyme which cleaves the methylester from pectin, thus releasing methanol and creating a free carboxylic group in the pectin. In this manner PME is regulating the degree of methylation of the pectins. In transgenic lines of potato differing in expression of PME Al-sensitivity was higher in lines overexpressing PME than in the wild type, antisense inhibition of PME resulted in a slight decrease of Al-sensitivity. The degree of methylation of pectin in differently adapted cell cultures showed a negative correlation to the Al-contents of these cells. An exception are the cells which were short-term treated with pectolyase. It could be clarified that not the degree of methylation per se, but the content of unmethylated pectin was important for the binding of Al.

Increasing Al-contents in root tips resulted in higher lesions by Al in all investigated plant species and differently adapted cell cultures. For the determination of Al-toxicity both inhibition of root elongation and callose induction was used.

Al-induced callose formation is a sensitive parameter of Al-injury, but it is not suitable to compare the Al-sensitivity of different plant species or tissues. Therefore, this parameter was modified to take the differences in species and tissue into account, while it remains easily determined as it is necessary for a parameter used in screening. In the modified version Al-induced callose was set into relation to digitonin-induced callose formation (relative callose formation). When combining the data of different genotypes of potato, broad bean and maize there was a positive correlation between the inhibition of root growth and relative callose induction after Al-treatment.

The treatment of plants with Al resulted in changes in enzyme activity. Al resulted in higher PME-activity within 2 h especially in root tips (0-1 cm) of Al-sensitive potato genotypes. The increased PME-activity resulted in reduction of degree of methylation, thus higher Al-contents of the root tips.

The activity of peroxidase was increased after 2 h of Al treatment especially in root tips (0-1 cm). In sensitive genotypes the activity of peroxidase of younger root segments (0-1 and 1-2 cm) reached the level of the older regions (3-6 cm). In cell cultures of maize the increase of peroxidase activity was accompanied by a decrease of extractable phenols, which might indicate oxidative crosslinking of the phenols in the cell wall.

The activity of apoplastic acid phosphatase was reduced by Al as well as the exsudation of the enzyme.

The exsudation of proteins and pectins was inhibited by Al. The transport of PTS (1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonic acid), a fluorescent dye which is used to mark apoplastic transport, was reduced by Al and the dye accumulated in the root tips. This indicates that Al inhibits the mobility and exsudation of molecules in the apoplast by altering its mobility.

In closing, it can be summarised that binding of Al in the apoplast does not result in detoxification of Al but is a step in perception of Al-toxicity. The binding of Al is determined by the content of unmethylated pectin and results in physical alterations of the cell wall (porosity). Al is altering the activity of enzymes which take part in modification of the cell wall and regulation of growth processes. Thus, Al-toxicity can at least in parts be explained by effects in the apoplast.

Keywords: Aluminium toxicity, apoplast, pectin

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	12
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
2.1	PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHT	16
2.1.1	Mais	16
2.1.2	Ackerbohne	17
2.1.3	Kartoffel	17
2.1.4	Suspensionszellkultur	18
2.2	VERSUCHE MIT INTAKTEN PFLANZEN	18
2.2.1	Nährlösungsversuche	18
2.2.2	Bestimmung des Wurzellängenwachstums	19
2.2.3	Bestimmung des PTS-Transports	19
2.2.4	Präparation von symplastischer und apoplastischer Enzymfraktion	20
2.3	VERSUCHE MIT ISOLIERTEN WURZELSPITZEN	20
2.3.1	Inkubation von isolierten Wurzelspitzen	20
2.3.2	Bestimmung von exsudierter und apoplastischer Saurer Phosphatase	21
2.4	VERSUCHE MIT SUSPENSIONSZELLEN	21
2.4.1	Vorbehandlung von Suspensionszellen mit pektinmodifizierenden Enzymen	21
2.4.2	Inkubation von Suspensionszellen	22
2.4.3	Bestimmung der Gehalte von Gesamt- und schweraustauschbarem Al	22
2.4.4	Bestimmung von exsudierter und apoplastischer Saurer Phosphatase	22

2.4.5	Bestimmung der Abgabe von Pektinen und Proteinen	23
2.4.6	Preparation von symplastischer, ionischer und kovalenter Peroxidase	23
2.5	BESTIMMUNG DER RADIALEN VERTEILUNG VON AL	23
2.5.1	Inkubation von Wurzel	23
2.5.2	Gefriersubstitution und Einbettung	24
2.5.3	Bestimmung von Al mittels LAMMA	24
2.6	ANALYTIK	25
2.6.1	Mineralstoffanalyse	25
2.6.2	Kallosebestimmung	25
2.6.3	Bestimmung des Phenolgehaltes von Suspensionszellen	26
2.6.4	Proteinbestimmung	27
2.6.5	Bestimmung von Enzymaktivitäten	27
2.6.5.1	Saure Phosphatase	27
2.6.5.2	Peroxidase	27
2.6.5.3	Pektinmethylesterase	28
2.6.6	Bestimmung von Zellwandbestandteilen	29
2.6.6.1	Qualitative Pektinbestimmung	29
2.6.6.2	Herstellung von Zellwandmaterial	29
2.6.6.3	Quantitative Pektinbestimmung	29
2.6.6.4	Methylierungsgrad	30
2.6.7	Statistik	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	BESTIMMUNG DER AL-TOXIZITÄT ANHAND VERSCHIEDENER PARAMETER IN NÄHR- LÖSUNGSVERSUCHEN	32
3.1.1	Einfluß von Al auf Ackerbohne und verschiedene Maisgenotypen	32
3.1.2	Einfluß von Al auf verschiedene Kartoffelgenotypen	36

3.1.3	Beziehung zwischen Wurzellängenwachstum und Kalloseinduktion	38
3.2	LOKALISATION VON AL UND KALLOSE IN WURZELN VON ACKERBOHNE UND MAIS	40
3.2.1	Differenzierung der räumlichen Verteilung von Aluminium in Wurzeln	40
3.2.1.1	Radiale Verteilung von Al	40
3.2.1.2	Longitudinale Verteilung von Al	44
3.2.2	Vergleich der Al-Empfindlichkeit von individuellen Wurzelsegmenten	44
3.2.2.1	Al-Gehalte	44
3.2.2.2	Kalloseinduktion	45
3.3	BEDEUTUNG DES PEKTINGEHALTS FÜR DIE AL-TOXIZITÄT	48
3.3.1	Qualitative Verteilung von Pektin in Wurzeln von Mais und Ackerbohne	48
3.3.2	Quantitative Verteilung von Pektin in Wurzeln von Mais und Ackerbohne	50
3.3.2.1	Beziehung zwischen Pektingehalt und Parametern der Al-Toxizität in unterschiedlichen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne	50
3.3.3	Einfluß des Pektingehaltes bei Maiswurzeln auf Parameter der Al-Toxizität	51
3.3.3.1	Al-Gehalte von Maiswurzeln nach Behandlung mit Pectolyase	52
3.3.3.2	Auswirkung der NaCl-Adaptation von Maispflanzen auf die Al-Empfindlichkeit	52
3.3.4	Veränderung des Pektingehalts durch Adaptation an NaCl und DCB bei Maissuspensionszellkulturen	55
3.3.5	Einfluß der Pektingehalten bei Maiszellkulturen auf Parameter der Al-Toxizität	57
3.3.5.1	Einfluß des Pektingehalts auf die Kalloseinduktion	57
3.3.5.2	Einfluß des Pektingehalts auf die Al-Gehalte	59
3.3.5.3	Beziehung zwischen Pektingehalt und Parametern der Al-Toxizität	60
3.4	BEDEUTUNG DES METHYLIERUNGSGRADS VON PEKTIN FÜR DIE AL-TOXIZITÄT	62
3.4.1	Al-Gehalte von Maiswurzeln nach Behandlung mit PME	62
3.4.2	Einfluß von Al auf Parameter der Al-Toxizität bei transgenen Kartoffelgenotypen mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME	62
3.4.3	Einfluß von Al auf die Aktivität von PME in Wurzeln von Ackerbohne und verschiedenen Kartoffelgenotypen	66
3.4.4	Behandlung von Maiszellsuspensionskulturen mit PME	69
3.4.4.1	Einfluß von PME auf Parameter der Al-Toxizität	69
3.4.4.2	Beziehung zwischen Methylierungsgrad und Parametern der Al-Toxizität	71

3.5	EINFLUß VON AL AUF MOBILITÄT VON HÖHERMOLEKULAREN STOFFEN IM APOPLASTEN	75
3.5.1	Transport von PTS in Maispflanzen	75
3.5.2	Einfluß von Al auf Saure Phosphatase	76
3.5.2.1	Einfluß von Al auf exsudierte und apoplastische Saure Phosphatase bei Maiswurzeln	76
3.5.2.2	Einfluß von Al auf exsudierte und apoplastische Saure Phosphatase bei Zellsuspensionskulturen von Mais	77
3.5.3	Einfluß von Al auf die Exsudation von Proteinen und Pektin bei Maiszellkulturen	79
3.6	EINFLUß VON AL AUF OXIDATIVE PROZESSE	81
3.6.1	Einfluß von Al auf Peroxidaseaktivität bei Wurzeln von verschiedenen Pflanzenarten	81
3.6.2	Einfluß von Al auf Peroxidaseaktivität und Phenolgehalt bei Maiszellkulturen	83
3.6.2.1	Einfluß von Al auf verschiedene Fraktionen von Peroxidase in Zellsuspensionskulturen von Mais	83
3.6.2.2	Einfluß von Al auf die Extrahierbarkeit von Phenolen bei Zellsuspensionskulturen von Mais	84
4	<u>DISKUSSION</u>	85
4.1	Al-Toxizität	85
4.2	Lokalisation von Al in der Wurzel	86
4.3	Zellwandmodifikationen	88
4.4	Parameter zur Bestimmung von Al-Toxizität	91
4.5	Apoplast und Al	95
4.6	Zellwand, Wachstumsprozesse und Al	99
4.7	PME und Al	104
4.8	Wassertransport und Al	107
4.9	Porosität und Al	107
4.10	Sekretion, Plasmamembran und Al	110
4.11	Ca-Signale und Al	112

4.12	Cytoskelett-Plasmamembran-Zellwand-Kontinuum	114
4.13	Oxidativer Streß und AI	117
4.14	Schlußfolgerungen und Ausblick	120
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>122</u>
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>125</u>

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ADH	Adelheid
AFR	Freies Ascorbatradikal
Al	Aluminium
Ba	Barium
Ca	Calcium
CEC	Kationenaustauschkapazität
d	Tag
DCB	2,6-Dichlorbenzonnitril
I	Intensität
EZ	Elongationszone
DTZ	Distaler Teil der Transitionszone
GsE	Galakturonsäureequivalente
h	Stunde
HRGP	Hydroxyprolinreiches Glycoprotein
KsE	Kaffeesäureequivalent
LAMMA	Laser Microprobe Mass Analysis
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid (Salz)
NL	Nährlösung
PE	Pachymanequivalente
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PME	Pektinmethylesterase
ppb	pars per billion
PTS	1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure
RMC	Red McClure
rpm	Umdrehungszahl pro Minute
RR	Ruthenium Rot
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Transf.	Transformante (Pool aus PetBin 3 und PetBin 5)
U	units, Enzymeinheit, def. als Menge Enzym, die 1 µmol Substrat pro min umsetzt.
WLW	Wurzellängenwachstum
WT	Wildtyp
XET	Xyloglucanendotransglycosylase

1 Einleitung

Die Toxizität von Aluminium (Al) ist einer der wichtigsten Faktoren, der sowohl die Verteilung von Pflanzenarten und Ökotypen als auch das Wachstum und den Ertrag von landwirtschaftlichen Kulturpflanzen auf sauren Mineralböden beeinflusst (Kinzel, 1983; von Uexküll und Mutert, 1995). Al hemmt das Wurzellängenwachstum und aufgrund des reduzierten Wurzelsystems können Wasser und Nährstoffe weniger effektiv aufgenommen werden. Dieses führt oft auch zu Phosphat- und Calciummangelsymptomen am Sproß, und es kommt zu einem schlechteren Wachstum der Gesamtpflanze (Taylor, 1988). Besonders die humiden Tropen sind von diesem Problem betroffen, da deren Böden infolge der raschen Verwitterung stark entbast sind und sich sowohl Al-Verbindungen als auch Eisenoxide angereichert haben (Osmond et al., 1980). Dieses natürliche Phänomen kann durch Einflüsse des Menschen wie z.B. unsachgemäße Düngung und saure Deposition noch verstärkt werden (Haug, 1984; Hem, 1986).

Die Konzentration von Al-Ionen in der Bodenlösung und das Verhältnis der möglichen Aqua-Hydroxy-Komplexe von Al hängen vor allem vom pH-Wert des Bodens ab (Jabuke und Jeschkeit, 1987; Kinraide, 1997). Das reduzierte Wurzelwachstum wird durch phytotoxische Al-Formen verursacht, die entstehen, wenn der pH-Wert der Bodenlösung unter 5,5 fällt (Foy et al., 1978). Die monomeren Al-Formen Al^{3+} , AlOH^{2+} und $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ (Alva et al., 1986; Noble et al., 1988) und das polymere Al_{13} (Wagatsuma und Kaneko, 1987; Parker et al., 1988) werden hierbei als besonders toxisch eingestuft. Im allgemeinen treten Al-Toxizitätssymptome bei den meisten Kulturpflanzen ab einer Konzentration von 50 ppm gelöstem Al auf (Beaudet, 1984). Die Tatsache, daß ca. 30%, fast 4000 Millionen ha, der eisfreien Landfläche einen Boden-pH unterhalb von 5,5 aufweisen, unterstreicht, wie groß die Bedeutung von Al-Toxizität für die landwirtschaftliche Produktion und die Ernährung der Bevölkerung ist (von Uexküll und Mutert, 1995).

Kalkung stellt ein Mittel dar, den pH-Wert des Bodens zu erhöhen und auf diese Weise Al-Toxizität zu vermindern (Dowswell et al., 1996), außerdem wird auch die Aufnahme von Nitrat, Phosphat und Kalium gefördert. Dennoch ist Kalkung nicht immer ein probates Mittel, denn durch Kalkung wird nur der pH-Wert im Oberboden erhöht, so daß Al in toxischer Form im Unterboden verbleibt und weiterhin zur Hemmung des Wachstums führt (Foy et al., 1978). Darüber hinaus ist Kalk, sowie andere Dünger für Landwirte in armen, strukturschwachen Gebieten aus ökonomischen oder logistischen Gründen nicht verfügbar (Dowswell et al., 1996). Deshalb spielt die Züchtung von Al-resistenten Genotypen eine Schlüsselrolle in der nachhaltigen Produktion von landwirtschaftlichen Kulturpflanzen auf sauren Böden.

Obwohl Al-Toxizität bereits Anfang dieses Jahrhunderts beschrieben (Fluri, 1909) und seitdem intensive Forschung betrieben wurde, ist der Mechanismus von Al-Toxizität und Resi-

stanz bisher noch nicht ausreichend erklärt (Taylor, 1991; Horst, 1995). Die zur Zeit diskutierten Resistenzmechanismen lassen sich in zwei Strategien einteilen: Immobilisierung bzw. Detoxifizierung im Symplasten (innere Resistenz) und Al-Ausschluß (externe Resistenz) (Taylor, 1991).

Zu den internen Toleranzmechanismen zählen die Komplexierung von Al im Cytosol (Lee und Foy, 1986), die Kompartimentierung in der Vakuole (Vázquez et al., 1999) und die Bildung von Al-resistenten Enzymen oder Ausgleich der Al-Wirkung durch veränderte Enzymaktivität (Slaski, 1989; 1990).

Zu den externen Mechanismen gehören die Erhöhung des pH-Werts in der Rhizosphäre bzw. im Apoplasten (Degenhardt et al., 1998), die Ausscheidung von verschiedenen Komplexbildnern (Basu et al., 1994; Horst et al., 1982; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000) und eine geringere Oberflächennegativität der Plasmamembran (Wagatsuma und Akiba, 1989; Wagatsuma et al., 1997).

Die physiologische Wirkungsweise von Al ist noch weitgehend unbekannt (Horst, 1995; Taylor, 1995; Kochian, 1995). Inzwischen ist aber bewiesen, daß der Wurzelapex den Hauptort der Perzeption von und Reaktion auf Al darstellt (Delhaize et al., 1993a; Ryan et al., 1993) und daß zumindest bei Mais ein bestimmter Bereich des Wurzelapex, 1-2 mm von der Wurzelspitze entfernt (Sivaguru und Horst, 1998), besonders empfindlich auf Al reagiert.

Zur Beurteilung der Al-Empfindlichkeit von Pflanzenarten oder Genotypen können verschiedene Versuche durchgeführt und unterschiedliche Parameter herangezogen werden. In Feldversuchen bietet sich die Möglichkeit, die Wirkung von Al unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen und dabei den Ertrag als Parameter zu verwenden, dem in der landwirtschaftlichen Realität die höchste Priorität zukommt. Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß sich Umwelteinflüsse wie die räumliche Variabilität der Al-Verfügbarkeit im Boden, klimatische Faktoren und der Befall durch Pflanzenkrankheiten oder Schadorganismen nicht kontrollieren lassen. Außerdem sind diese Versuche sehr arbeitsintensiv und zeitraubend (Blum, 1988). Nährlösungsversuche bieten den Vorteil, Al unter kontrollierten Bedingungen zu applizieren, wobei als Parameter die Hemmung des Wurzellängenwachstums (Llugany et al., 1995; Horst et al., 1997), die Al-Gehalte der Pflanze (Delhaize et al., 1993a; Llugany et al., 1994; Rincon und Gonzales, 1992) und die Kalloseinduktion (Wissemeier und Horst, 1995; Zhang et al., 1994) bereits nach einem Tag herangezogen werden können.

Aufgrund der geringen radialen Mobilität von Al in der Wurzel (Marienfeld und Stelzer, 1993) und durch die unterschiedliche Empfindlichkeit einzelner Wurzelzonen kommt in solchen Versuchen letztendlich nur ein kleiner Anteil von relevanten Zellen mit Al in Kontakt. Da Al-Toxizität auf zellulärer Ebene ausgebildet wird (Taylor, 1991), können auch Suspensionszellen zur Untersuchung der Al-Wirkung herangezogen werden (Steiß, 1995). Zellsuspensionen

sionskulturen weisen darüber hinaus noch den Vorteil auf, daß sie eine homogene Zellpopulation mit einer großen Oberfläche darstellen, die gleichzeitig mit Al behandelt werden kann.

Der Angriffsort von Al auf zellulärer Ebene ist noch nicht bekannt. Sowohl symplastische als auch apoplastische Läsionen werden diskutiert. Symplastisches Al wurde bisher über Desorption des apoplastischen Al mittels Austauschern, Aufnahmekinetiken oder Zellfraktionierung bestimmt. Dabei wurden intrazelluläre Al-Konzentrationen berechnet die 30-90% des Gesamtgehalts an Al ausmachten (Tice et al., 1992; Taylor, 1995). Diese Methoden scheinen jedoch die tatsächlich im Symplasten vorhandenen Mengen weit zu überschätzen, weil es zu Kontamination durch apoplastisches Al kommt, das sich nicht vollständig desorbieren läßt (Rengel, 1996). In den letzten Jahren hat es immer mehr Hinweise für die Hypothese gegeben, daß der Wurzelapoplast eine bedeutende Rolle für die Al-Toxizität und Al-Resistenz spielt (Blamey et al., 1993; Horst, 1995; Rengel, 1996). Symplastische Schädigungen, wie die beobachtete Veränderung des Cytoskeletts (Sivaguru et al., 1999a; Horst et al., 1999) müssen nicht unbedingt auf symplastisches Al zurückzuführen sein, sondern lassen sich auch mit der Bindung von Al im Apoplasten erklären, denn es hat sich gezeigt, daß Apoplast und Symplast nicht unabhängig voneinander existieren. Das Modell des "cell-wall plasmamembrane cytoskeleton continuum" (Miller et al., 1997ab; Wyatt und Carpita, 1993) legt nahe, daß sich Symplast und Apoplast gegenseitig beeinflussen, es wäre demnach denkbar, daß sich die Bindung von Al im Apoplasten auf das Cytoskelett auswirkt.

Die Ausprägung von genotypischen Unterschieden in der Al-Empfindlichkeit, aber auch die Verteilung von Schädigungssymptomen entlang des Wurzelapex (Sivaguru und Horst, 1998; Kollmeier et al., 2000) steht in Zusammenhang mit der Akkumulation von Al (Rincon und Gonzales, 1992; Llugany et al., 1994), was nahelegt, daß Al-Resistenz den Ausschluß von Al aus dem Apoplasten beinhaltet. In der Zellwand stellen die Carboxylgruppen des Pektins den größten Anteil an möglichen Bindungsstellen für Al zur Verfügung (Blamey et al., 1990). Zellwände können in zwei verschiedene Typen eingeteilt werden, die bestimmte Pflanzengruppen umschließen, wobei Dicotyle und nicht-graminäe Monocotyle zum Typ I, und graminäe Monocotyle zum Typ II gehören (Carpita und Gibeaut, 1993). Die Zellwände des Typs I bestehen aus verflochtenen Netzwerken aus Cellulose/Xyloglukan, Pektin und Strukturproteinen, während die Wände von Typ II aus einem Netzwerk aus Cellulose und Glucuronoarabinoxylan und einem geringen Anteil an Pektin, Xyloglucan und Proteinen gebildet werden. Als Beispieldpflanzen für Typ I wurden in dieser Arbeit Ackerbohne und Kartoffel verwendet und für Typ II Mais.

Der Pektingehalt von Zellwänden kann auch durch Umwelteinflüsse modifiziert werden. So resultiert die Anpassung von Pflanzen (Zhong und Läuchli, 1993) oder Suspensionszellen (Iraki et al., 1989) an Salz (NaCl) in der Erhöhung des Pektingehalts. Auch die Adaptation

von Zellkulturen an das Herbizid 2,6-Dichlorbenzotrifluorid (DCB) führt durch Hemmung der Cellulosesynthese zum Anstieg der Pektinhalte (Shedletzky et al., 1990; 1992). Die Molekulargenetik stellt weitere Möglichkeiten zur Verfügung, die Zusammensetzung der Zellwand gezielt zu verändern. So konnten Pflanzen gewonnen werden, die das Enzym Pektinmethylesterase (PME) in unterschiedlicher Stärke exprimieren (Pilling, 1999). PME ist ein apoplastisches Enzym (Goldberg et al., 1992), das die Spaltung von Methylestern am Pektin katalysiert und dabei freie Carboxylgruppen in der Zellwand schafft (Bordendave, 1996). Diese Carboxylgruppen bestimmen die Festigkeit des Pektinnetzwerks (Morris et al., 1980) und beeinflussen auf diese Weise die physikalischen Eigenschaften der Zellwand und damit auch das Wachstum (McCann et al., 1994).

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Frage zu klären, in welchem Umfang Al im Apoplasten gebunden und wodurch diese Bindung beeinflusst wird. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Al sich auf die Aktivität verschiedener Enzyme, die im Apoplasten vorkommen bzw. die Struktur des Apoplasten verändern, auswirkt. Weiterhin soll diskutiert werden, inwieweit der Apoplasten für die Perzeption und Modifikation von Al-Toxizität von Bedeutung ist.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

2.1.1 Mais

Untersucht wurden drei verschiedene Genotypen von *Zea mays* (L.). Die Genotypen Lixis (Limagrain, Darmstadt) und ATP-Y (CIRAD, Kamerun) sind sowohl am Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover als auch in Feldversuchen (persönliche Mitteilung, L. Collet) als Al-sensitiv bzw. Al-resistent charakterisiert worden. Der Genotyp Helix (Limagrain, Darmstadt) sollte innerhalb dieser Arbeit auf seine Al-Empfindlichkeit untersucht werden, dabei wurden die beiden anderen Genotypen als Referenz verwendet.

Zum Vorkeimen wurde das Saatgut zwischen Filterpapier ausgelegt, mit autoklavierten Schaumstoffmatten bedeckt und zwischen zwei PVC-Platten vorsichtig eingeklemmt (Sandwich-System). Die Platten wurden am oberen Ende des "Sandwich" mit einer Plastikfolie abgeschlossen und senkrecht in eine Wanne mit Leitungswasser gesetzt. Dadurch wurde eine ausreichende Befeuchtung der Samen gewährleistet. Die Keimung erfolgte in einer Klimakammer bei 27°C bzw. 25°C während der Tag- (16 h) bzw. der Nachtphase (8 h) mit 70% relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach vier (Lixis: drei) Tagen Keimung wurden die Pflanzen in Kunststofftöpfe (22 L Fassungsvermögen) mit Nährlösung eingesetzt und belüftet. Die Nährlösung setzte sich wie folgt zusammen [μM]: CaSO_4 , 250; KNO_3 , 400; MgSO_4 , 100; FeEDTA, 20; MnSO_4 , 1; ZnSO_4 , 0,2; CuSO_4 , 0,2; KH_2PO_4 , 100; H_3BO_3 , 8; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,1; NH_4NO_3 , 200.

Zur Adaptation an Salzstress wurde 4 d alte Maispflanzen für einen Tag in normaler Nährlösung kultiviert, anschließend wurden täglich 50 mM NaCl schrittweise zugesetzt, so daß nach drei Tagen die Pflanzen 150 mM NaCl in der Nährlösung vorfanden. Nach zwei weiteren Tagen wurden die Pflanzen für 24 in normaler Nährlösung ohne NaCl weiter kultiviert, damit die Pflanzen überschüssiges NaCl abgeben konnten, um Interaktionen zwischen NaCl und Al zu vermeiden. Abschließend wurden die Pflanzen wie unter 2.3 beschrieben im Versuch verwendet.

2.1.2 Ackerbohne

Von *Vicia faba* (L.) wurde der Genotyp "Herz Freya" (Fa. Limagrain, Darmstadt) verwendet. Das Saatgut wurde im Sandwichsystem (siehe 2.2.1) für 7 Tage bei 21 °C angekeimt und anschließend in Kunststofftöpfe (22 L) mit belüfteter Nährlösung eingesetzt. Die Nährlösung setzte sich wie folgt zusammen [μM]: CaSO_4 , 250; KNO_3 , 400; MgSO_4 , 500; FeEDTA , 10; MnSO_4 , 0,5; ZnSO_4 , 0,5; CuSO_4 , 0,2; KH_2PO_4 , 100; H_3BO_3 , 10; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,01; KCl , 100.

2.1.3 Kartoffel

Bei den untersuchten Pflanzen von *Solanum tuberosum* (L.) handelte es sich um die beiden Genotypen Adelheid (ADH, Herkunftsland Deutschland) und Red McClure (RMC, Herkunftsland USA), die von der Arbeitsgruppe Mix-Wagner (BFA, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurden.

Der Genotyp Desiree wurde von der Arbeitsgruppe Fisahn als Wildtyp (WT) zur Transformation verwendet, dabei wurden in bezug auf Pektinmethylesterase (PME) sowohl überexprimierende als auch Antisense-Linien hergestellt (Pilling, 1999). Sowohl der Wildtyp als auch vier überexprimierende bzw. vier Antisense-Linien wurden uns für Versuchszwecke von dieser Arbeitsgruppe überlassen.

Die Pflanzen wurden *in vitro* auf Festmedium vermehrt. Dazu wurden aus einem Ausgangsproß die Nodien mit den Achselknospen herausgetrennt und auf Nähragar kultiviert. Der Nährboden setzte sich wie folgt zusammen [μM]: CaCl_2 , 3000; KNO_3 , 1900; MgSO_4 , 1800; FeEDTA , 100; MnSO_4 , 130; ZnSO_4 , 30; CuSO_4 , 0,1; KH_2PO_4 , 1250; H_3BO_3 , 1000; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,2; NH_4NO_3 , 20600; KI , 5; CoCl_2 , 0,1 mit 0,65 % (w/v) Agar (Merck, Darmstadt) und 1 % (w/v) Saccharose als Zuckerquelle bei pH 5,7. Die Pflanzen wurden in einem Klimaschrank bei konstant 20°C während der Tag- (16 h) und der Nachtphase (8 h) kultiviert.

Für Versuche wurde ausschließlich Kopfstecklinge verwendet. Im Alter von 12 Tagen wurden die Pflanzen vorsichtig dem Nährboden entnommen und der Agar mit lauwarmen Wasser und Zellstofftüchern entfernt. Anschließend wurden die Pflanzen in Kunststofftöpfe (22 L) mit belüfteter Nährlösung eingesetzt. Die Nährlösung setzte sich wie folgt zusammen [μM]: CaSO_4 , 250; KNO_3 , 800; MgSO_4 , 250; FeEDTA , 25; MnSO_4 , 2; ZnSO_4 , 0,5; CuSO_4 , 0,5; KH_2PO_4 , 100; H_3BO_3 , 20; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,01; NH_4NO_3 , 350.

2.1.4 Suspensionszellkultur

Die Maissuspensionszellkultur (*Zea mays* L. H99xFR-16) wurde von der Arbeitsgruppe Lörz (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Kulturraum bei 27°C im Dunklen in 250 ml Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalrotationsschüttler (Gyro Gyratory Shaker) in modifiziertem L3-Medium kultiviert: Makro- und Mikronährsalze, Vitamine, Aminosäuren von L3 (Jähne et al., 1991) mit 30 g L⁻¹ Maltose und 2 mg L⁻¹ 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure). Die Zellkultur wurde nach 8 Tagen subkultiviert.

Die Zellkultur wurde auf ein Wachstum in Anwesenheit von 1 µM DCB (1,6-Dichlorbenzonitril) adaptiert. Dabei wurde mit einem DCB-Zusatz von 0,2 µM begonnen und die Konzentration immer dann erhöht, wenn sich nach zeitweiliger Wachstumsdepression erneut starkes Teilungswachstum zeigte. Ähnlich wurde bei einer zweiten Subkultur die Adaptation an Salzstreß vorgenommen, bis die Zellen in der Gegenwart von 200 mM NaCl gutes Wachstum zeigten. Sowohl die DCB- als auch die NaCl-Adaptation benötigte sechs Monate. Die Kulturen wurden weitere vier Monate kultiviert bevor erste Versuche mit ihnen durchgeführt wurden.

Salzadaptierte Kulturen wurden vor einem Versuch für unterschiedliche lange Zeit (0, 2, 7, 14, 21 d) ohne Salzstreß kultiviert. Falls nicht anders angegeben wurden sie für 2 d ohne NaCl kultiviert, damit sollte den Zellen die Möglichkeit gegeben werden, überschüssiges NaCl abzugeben, um auf diese Weise Interaktionen zwischen NaCl und Al zu vermeiden.

Zur Bestimmung der Wachstumsphasen der Zellkultur wurde sowohl das Zellvolumen (SCV, sedimentiert und PCV, gepackt) nach Lorences und Fry (1991) als auch der Zuwachs an Frischgewicht herangezogen.

2.2 Versuche mit intakten Pflanzen

2.2.1 Nährlösungsversuche

Die Toxizität von Al ist anhängig von pH-Wert und Ionenzusammensetzung der entsprechenden Lösung (Foy et al. 1978; Kinraide et al., 1992). Um Al-Toxizität vergleichsweise bei Mais, Ackerbohne und Kartoffel untersuchen zu können wurden die jeweiligen Nährlösungen für die Versuchsdurchführung vereinheitlicht und die Konzentration von Calcium und Phosphat deutlich reduziert.

Die Versuchsnährlösung setzte sich deshalb wie folgt zusammen [µM]: CaSO₄, 100; KNO₃, 400; MgSO₄, 100; FeEDTA, 10; MnSO₄, 0,5; ZnSO₄, 0,2; CuSO₄, 0,2; KH₂PO₄, 10; H₃BO₃, 8; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0,01; NH₄NO₃, 200.

Für die Versuche wurden im allgemeinen junge Pflanzen verwendet, d.h. 5 d bei Mais bzw. 9 d bei NaCl-adaptierten Maispflanzen, 8 d bei Ackerbohne und 28 d bei Kartoffel (bestehend aus 21 d in der *in-vitro*-Kultur und 7 d in Nährlösung zur Anpassung an das Flüssigmedium).

Die Pflanzen wurden in die Versuchsnährlösung gesetzt und der pH-Wert innerhalb von 12 Stunden schrittweise auf 4,3 abgesenkt. Nach weiteren 12 Stunden bei diesem pH-Wert wurden die Pflanzen in 22L-Nährlösungsgefäßen mit zuvor präparierter Nährlösung der jeweiligen Al-Konzentrationen (0; 10; 25; 50 μM) bzw. mit Digitonin (10 μM) umgesetzt.

Bei dem Vergleich der neun Kartoffelgenotypen wurde die Vorkultur und Adaptation an den niedrigen pH-Wert zwar in 22-L-Gefäßen durchgeführt, aber der eigentliche Versuch wurde in PVC-Wannen mit einem Fassungsvermögen von 100 L) durchgeführt.

2.2.2 Bestimmung des Wurzellängenwachstums

Zur Bestimmung des Wurzellängenwachstums (WLW) wurden die Wurzeln vor Beginn des Versuches markiert. Diese Markierung wurde im Abstand von 3 cm von der Wurzelspitze angebracht. Um Beschädigungen der Wurzel zu minimieren wurde die Markierung nicht direkt auf die Wurzel aufgetragen, sondern auf eine Glasplatte wurde ein Farbtupfer eines wasserfesten Stiftes (Staedler, Lumocolor 317, schwarz) gesetzt und die Wurzel durch diesen Farbfleck gerollt. Nachdem die Farbe angetrocknet war, wurde die Pflanzen in die Nährlösung eingesetzt. Nach 24 h wurde der Wurzellängenzuwachs anhand der Markierung gemessen. Nach der Bestimmung des Wurzelwachstums standen die Wurzeln für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.2.3 Bestimmung des PTS-Transports

PTS (1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure) wird in der Literatur als Marker für apoplastische Transportprozesse beschrieben (Yeo et al., 1987).

Um den Einfluß von Al auf den apoplastischen Transport zu untersuchen wurden 10 d alte pH-adaptierte Maispflanzen für 3 h in Versuchsnährlösung (siehe 2.2.1) mit verschiedenen Al-Konzentrationen (0; 25; 50; 200 μM) bei pH 4,3 vorbehandelt. Anschließend wurden die Pflanzen in Nährlösung mit 0,01% (w/v) PTS und entsprechenden Al-Konzentrationen überführt. Nach 3 h wurde der Sproß 1 cm oberhalb des Samenkorns abgetrennt und der erste Tropfen Flüssigkeit wurde verworfen. Anschließend wurde das sich bildende Schnittexsudat gesammelt und in Probencups (1,5 ml) überführt. Nach 1 h wurde das Volumen per differentieller Gewichtsbestimmung der Probencups ermittelt.

Das Wurzelsystem wurde mit viel Wasser gewaschen und anschließend 5 mm der Wurzelspitzen abgeschnitten. Jeweils eine Wurzelspitze wurde in einem Probencup mit 1 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6 versetzt und für 2 min mittels Ultraschall bei 70% Leistung und 70% Impuls (Sonoplus HD 70 mit Sonotrode MS 73, Bandelin) homogenisiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 10.000 x *g* (Sorvall MC 12, Du Pont) zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PTS-Quantifizierung verwendet.

Um die PTS-Menge zu bestimmen wurden 50 µl des Schnittexsudats mit 1 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6 versetzt. Die Fluoreszenz wurde am Fluoreszenzspektrophotometer (F-2000, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan) bei Ex 405 und Em 515 nm bestimmt. Es erfolgte keine Eichung, sondern die Fluoreszenz wurde in gerätespezifischen Einheiten (Intensität [I] pro Wurzelspitze) angegeben. Anhand des Schnittexsudats wurde der Bypass-Flow wie in Yeo et al. (1987) beschrieben aus dem Quotienten aus Fluoreszenzintensität des Schnittexsudats und der Inkubationslösung pro Volumeneinheit berechnet.

2.2.4 Präparation von symplastischer und apoplastischer Enzymfraktion

Nach Inkubation von Pflanzen wurden Wurzelspitzen oder -segmente unterschiedlicher Länge (Gesamtlänge der Wurzelsegmente je Probe: 3 cm) abgeschnitten und mit dem Homogenisier (RW 20, Jahnke und Kunkel) bei 2000 rpm in 1 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6) zerkleinert. Anschließend wurden die Proben für 15 bei 10.000 x *g* (Sorvall MC 12, Du Pont) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als symplastische Enzymfraktion bezeichnet. Das Pellet wurde mit 1 ml 1 M NaCl in 0,01 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6) aufgenommen und die Proben wurden auf einem Taumelrollenmischer (TRM 50, IDL) für 3 h gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und als ionische Fraktion bezeichnet. Alle Arbeiten zur Präparation der Enzyme wurden bei 4°C im Kühllabor durchgeführt und die Überstände (symplastische und ionische Enzymfraktion) wurden eingefroren und bis zur späteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.3 Versuche mit isolierten Wurzelspitzen

2.3.1 Inkubation von isolierten Wurzelspitzen

Wurzelspitzen (6 cm) wurden von pH-adaptierten Pflanzen (siehe 2.2.1) abgeschnitten und mit 100 µM CaCl₂ gespült. Anschließend wurden die Wurzelspitzen in Nährlösung (2.2.1) ± 50 µM Al für 3 h inkubiert. Parallel dazu wurden ganze (intakte) Pflanzen in Nährlösungsgefäßen, wie unter 2.2 beschrieben, ebenfalls für 3 h inkubiert.

In einigen Fällen wurden 40 Wurzelspitzen (1 cm) in 15 ml Lösung bestehend aus 0,2% (w/v) BSA (Fraktion V, Biomol, Hamburg) in 100 μM CaCl_2 mit 0,2% (w/v) Pectolyase Y-23 (Seishin, Tokyo, Japan) oder 400 U PME (aus Orangenschale, Sigma, Steinheim) für 0; 15; 30 min behandelt bevor sie im Versuch verwendet wurden.

Nach Versuchsende wurden die Wurzeln mit 100 μM CaCl_2 gewaschen und für die spätere Kalloseuntersuchung in 96% Ethanol fixiert. Von anderen Wurzelspitzen wurden definierte Bereiche direkt abgeschnitten und in HCl-gespülte Gläschen (3 ml Volumen) überführt. Je Gläschen wurden insgesamt 1 cm Wurzelmaterial für die spätere Al-Bestimmung verwendet.

2.3.2 Bestimmung von exsudierter und apoplastischer Saurer Phosphatase

Nach pH-Adaptation (2.2.1) wurde von Maispflanzen die Wurzelspitze (1 cm) abgetrennt und mit 100 μM CaCl_2 gewaschen. 18 Wurzelspitzen wurden in 20 ml Lösung (100 μM CaCl_2 , KCl, MgCl_2 , \pm 50 μM Al, pH 4,5) für 1 h auf einem Horizontalrotationsschüttler mit 50 rpm (Gio Gyrotory Shaker) bei 26°C inkubiert (Vorinkubation). Anschließend wurden die Wurzelspitzen über ein Sieb vom Medium getrennt, dann in 5 ml Exsudationsmedium überführt und anschließend für 1 h auf dem Schüttler weiter inkubiert. Als Exsudationsmedium wurde entweder die gleiche Lösung wie zur Vorinkubation oder 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,5) verwendet. Nach der Exsudation wurden Exsudat und Wurzeln wie unter 2.6.5.1 beschrieben auf die Aktivität von Saurer Phosphatase untersucht.

2.4 Versuche mit Suspensionszellen

2.4.1 Vorbehandlung von Suspensionszellen mit pektinmodifizierenden Enzymen

Normale und NaCl-adaptierte Zellen wurden zur Veränderung der Pektinzusammensetzung ihrer Zellwände mit Enzymlösungen behandelt. Dazu wurden 20 g Zellen auf 200 ml Lösung eingewogen und bei 26° auf dem Horizontalrotationsschüttler mit 100 rpm (Gio Gyrotory Shaker) inkubiert. Nach 5; 10 und 15 min wurden Unterproben entnommen. Die Zellen wurden vom Medium mittels einer Nutsche getrennt und mit insgesamt 500 ml CaCl_2 (100 μM) gewaschen bevor sie im Versuch (siehe 2.5.2) eingesetzt wurden.

Die Enzymlösungen setzten sich wie folgt zusammen: 0,4% (w/v) BSA (Fraktion V, Biomol, Hamburg) in 100 μM CaCl_2 mit 2 U ml^{-1} PME (aus Orangenschale, Sigma, Steinheim) oder 0,08% (w/v) Pectolyase (Seishin, Tokyo, Japan).

2.4.2 Inkubation von Suspensionszellen

Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (Normal: 5 d, NaCl-adaptiert: 16 d, DCB-adaptiert: 11 d) wurden über Gazefilter (20 µm Porengröße) abgesaugt und mit einer Lösung aus 2% (w/v) Saccharose gespült. Aufgrund der unregelmäßigen und teilweise großen Aggregate der adaptierten Zellen konnten die Zellen nicht pipettiert werden, sondern es wurden 0,2 g Zellen direkt in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml 2% (w/v) Saccharoselösung eingewogen. Der Versuch wurde durch Zugabe von 90 ml Inkubationsmedium gestartet. Das Inkubationsmedium setzte sich wie folgt zusammen: 2% (w/v) Saccharose in 100 µM CaCl₂, 0; 25; 50; 100; 200 µM Al oder 20 µM Digitonin. Nach der angegebenen Zeit, im allgemeinen nach 2 h wurden die Zellen mit einer Multifiltriereinheit (Millipore, Eschborn) über Gazefilter (20 µm Porengröße) abgesaugt und mit 20 ml 100 µM CaCl₂ gespült. Die Zellen wurden entweder sofort weiterverwendet (Enzympräparation, Phenolbestimmung) oder in 96% Ethanol fixiert (Kallosebestimmung).

2.4.3 Bestimmung der Gehalte von Gesamt- und schweraustauschbarem Al

Nach der Inkubation der Zellen (wie unter 2.4.2 beschrieben) wurden die Zellen über Celluloseacetatfilter (Porendurchmesser 10 µm, Satorius, Göttingen) abgesaugt und mit 20 ml 100 µM CaCl₂ gespült. Die Hälfte der Proben wurde auf dem Filter belassen (Gesamt-Aluminium) während die andere Hälfte mit 10 ml 50 mM BaCl₂ versetzt und vermischt wurde. Nach 15 min wurde die Lösung abgesaugt und verworfen und die Zellen wurden zur Bestimmung von schweraustauschbarem Aluminium verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Filter in HCl-gespülte Gläschen (10 ml Volumen) überführt, die Weiterverarbeitung ist in 2.6.1 beschrieben.

2.4.4 Bestimmung von exsudierter und apoplastischer Saurer Phosphatase

Zellen (ca. 0,3 g) wurden in 50 ml Medium (100 µM CaCl₂, ± 50 µM Al, pH 4,3) für 1 h auf dem Horizontalrotationsschüttler (Gio Gyrotory Shaker) mit 100 rpm bei 26°C inkubiert (Vorinkubation). Anschließend wurden die Zellen abgesaugt, in 10 ml Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) ± 50 µM Al überführt und erneut für 1 h inkubiert (Exsudation). Anschließend wurden Zellen mittels der Multifiltriereinheit (Millipore, Eschborn) abgesaugt und das Filtrat aufgefangen. Die Zellen (apoplastische Saure Phosphatase) und das Filtrat (exsudierte Saure Phosphatase) wurden im Enzymassay wie in 2.6.5.1 beschrieben untersucht.

2.4.5 Bestimmung der Abgabe von Pektinen und Proteinen

Zellen (ca. 0,5 g) wurden in 25 ml Medium (100 μM CaCl_2 , \pm 200 μM Al, pH 4,3) für 3 h auf dem Horizontalschüttler (Gio Gyrotory Shaker) mit 100 rpm bei 26°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Celluloseacetatfilter (2 μm Porengröße, Satorius, Göttingen) abgesaugt und das Filtrat zur Bestimmung von Pektinen und Proteinen verwendet. Von dem Filtrat wurden 3 ml in Gläschen (10 ml Volumen) überführt, im Trockenschrank bei 70°C eingetrocknet und anschließend zur quantitativen Bestimmung von Pektinen (siehe 2.6.6.3) verwendet.

Weiter Unterproben des Filtrats wurden bei -20°C bis zur Proteinbestimmung (2.6.4) gelagert.

2.4.6 Preparation von symplastischer, ionische und kovalenter Peroxidase

Nach der Inkubation (2.4.2) wurden ca. 0,3 g Zellen mit 2 ml Natriumphosphat-Puffer (0,01 M, pH 6) gemörsert und anschließend bei 2500 x *g* für 15 min zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau). Der Überstand (symplastische Fraktion) wurde abgenommen und das Pellet mit 2 ml NaCl (1 M in 0,01 M Natriumphosphat-Puffer, pH 6) resuspendiert. Die Proben wurden für 4 Stunden auf dem Taumelrollenmischer (TRM 50, IDL) gemischt und anschließend erneut zentrifugiert. Der gewonnene Überstand stellte die ionische Enzymfraktion dar. Das Pellet wurde mit 2 ml Enzymlösung resuspendiert und für 2 h bei 26°C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Die Enzymlösung setzte sich wie folgt zusammen: 1% (w/v) Onozuka-Cellulase R-10 (Sigma, Steinheim) in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer bei pH 6. Der nach einer weiteren Zentrifugation gewonnene Überstand stellte die kovalent gebundene Fraktion dar.

Bis auf die Gewinnung der kovalenten Enzymfraktion wurden alle Arbeiten bei 4°C im Kühl-labor durchgeführt. Die Überstände wurden bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

2.5 Bestimmung der radialen Verteilung von Al

2.5.1 Inkubation von Wurzel

Nach Pflanzenanzucht und pH-Adaptation (2.2.1) wurden 40 Wurzelspitzen (1,5 cm) abgeschnitten und für 1 h in 300 ml Medium (250 μM MgCl_2 , 250 μM KCl, 500 μM CaCl_2) equilibriert. Anschließend wurden die Wurzelspitzen in frischem Medium \pm 50 μM Al für 5; 30 bzw. 180 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Wurzeln ungespült in flüssigem Propan schockgefroren und in Kunststoffszintillationsgefäßen abgelegt. Diese Gefäße ent-

hielten 10 ml gefrorenen, wasserfreies Aceton mit 0,5% (w/v) OsO₄ und wurden anschließend bei -80°C in der Tiefkühltruhe zur Gefriersubstitution aufgetaut.

2.5.2 Gefriersubstitution und Einbettung

Zur Gefriersubstitution wurden die Proben für 5 Tage bei -80°C belassen. Am 6. und am 8. Tag wurde die Substitutionslösung durch frisches wasserfreies Aceton mit 0,5% (w/v) OsO₄ ersetzt. Am 10. und am 13. Tag wurden die Lösung gegen reines wasserfreies Aceton ausgetauscht. Am 15. Tag wurde erneut das Aceton ausgetauscht und nun die Proben bei -20°C aufbewahrt. Am 17. Tag wurden die Proben auf 4°C gebracht und ein letztes Mal das Aceton erneuert, bevor die Proben bei Raumtemperatur aufgestellt wurden. Am 18. Tag wurde das Aceton soweit entfernt, daß ein letzter Rest die Proben bedeckte, danach wurde 1:1 (w/w) mit Aceton verdünntes Einbettungsmedium nach Spurr (1969) zugesetzt. Die Proben wurden mit Deckeln verschlossen, in denen sich kleine Löcher befanden, so daß ein Teil des Acetons verdampfen konnte und sich die Konzentration an Spurr langsam erhöhte. Nach drei Stunden wurden die Wurzeln aus den Gefäßen entfernt und in Spurr eingebettet. Die Aushärtung des Epoxydharzes erfolgte im Trockenschrank für 3 h bei 30°C, gefolgt von weiteren 12 h bei 50°C. Anschließend wurden die Proben in der FZ, Jülich von Dr. S. Marienfeld weiter bearbeitet.

Auf dem Mikrotom (Reichert Ultracut E) wurden mit trockenem Glasmesser Querschnitte von ca. 1 µm Schichtdicke gefertigt und auf Sandwichgrids transferiert. Schnitte wurden von der Calyptra (0-0,3 mm), der Übergangszone zwischen Zellteilung und Zellstreckung (1-2 mm) und der Elongationszone (EZ, 3- >10 mm) gemacht.

2.5.3 Bestimmung von Al mittels LAMMA

Die angefertigten Schnitte wurden mit Laser Microprobe Mass Analysis (LAMMA 500, Leybold, Köln) analysiert. Ein kleines Gebiet von ca. 1-3 µm Durchmesser wurde dabei von einem Ziellaser ausgesucht, dann verdampft und durch den Pluslaser ionisiert. Eine optische Kontrolle stellte sicher, daß ausschließlich das Zielgebiet verdampft wurde. Die laterale Auflösung von LAMMA war ausreichend um apoplastische "Verunreinigungen" von symplastischen Messungen trennen zu können, jedoch nicht vice versa. Das Detektorsignal wird in relative Einheiten umgesetzt. Quantitative Ergebnisse oder Konzentrationen von Elementen sind mit LAMMA nicht möglich, aber es können die Signalintensitäten innerhalb eines Schnittes oder zwischen Proben verglichen werden.

Auf Gewebebasis wurden Analysen von Rhizodermis, äußerer, mittlerer und innerer Cortex und Stele gemacht. Auf Zellebene wurde zwischen Zellwand und zellwandfreiem Lumen (Symplast) unterschieden.

Die Signalausbeute kann durch verschiedene Parameter (Laserintensität, Schnittdicke, u.ä.) beeinflusst werden. Um dennoch Spektren mit unterschiedlicher Signalausbeute vergleichen zu können wurde das Al-Signal auf das ^{41}K -Signal bezogen. Zwar ist Kalium nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt, aber aufgrund der Tatsachen, daß ^{41}K nur in verhältnismäßig geringen Mengen (6,73 % des Gesamt K-Gehaltes) vorkommt, ist der durch die variierende Verteilung entstehende Fehler vernachlässigbar gering.

Die Kaliumgehalte der unterschiedlichen Wurzelsegmente wurde mittels Mineralstoffanalyse (siehe 2.6.1) bestimmt.

2.6 Analytik

2.6.1 Mineralstoffanalyse

Für die Mineralstoffanalyse wurde das Pflanzenmaterial (1 cm Wurzel bzw. 0,2 g FG Zellen) in HCl-gespülte Gläschen überführt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (24 h bei 70°C) und im Muffelofen (M 110, Heraeus, Hanau) bei 450°C für 8 h verascht. Die Proben wurden in 100 µl konzentrierter HNO_3 (Ultra-Pure, Fluka, doppelt-destilliert) aufgenommen. Anschließend wurden 900 µl $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ zugesetzt. Für die Bestimmung von Al wurden diese Proben am Atomabsorptionsspektrometer (AAS) mittels Graphitrohr (Unicam 939 QZ, Analytical Technologies Inc., Cambridge, GB) im Bereich 0-200 ppb gemessen. Kalium wurde direkt am AAS (AAS Z 8000, Hitachi, Tokyo, Japan) bestimmt, wobei den Proben $\text{CsCl}_2/\text{LaCl}_3$ -Puffer (nach Schinkel, Merck) zugesetzt wurde, um Ionisationsstörungen zu verhindern (Schinkel, 1991).

2.6.2 Kallosebestimmung

Das Pflanzenmaterial wurde aus dem Ethanol entfernt und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden 1 cm Wurzel bzw. ca. 0,2 g Zellen in 1 M NaOH (1 ml bei Wurzeln bzw. 3 ml bei Zellen) aufgenommen und per Ultraschall (Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) für 1 min mit der Sonotrode M73 (70% Leistung, 70% Impuls) homogenisiert. Die Extraktion der Kallose erfolgte durch 30 min Inkubation im Wasserbad bei 80°C. Nach der Zentrifugation bei 2500 x g (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) für 10 min wurde der Überstand zur Kallosebestimmung herangezogen.

Die quantitative Kallosebestimmung erfolgte nach der Methode von Köhle et al. (1985). Die Färbelösung enthielt 1 M Glycinpuffer (pH 9,5), 0,1% (w/v in H₂O) Anilinblau (Wasserblau, Fluka, Buchs, CH) und 1 M HCl, im Verhältnis 3:2:1. Zur Bestimmung der Autofluoreszenz der Proben, verursacht u.a. durch Phenole, wurde anstelle des Anilinblaus nur Wasser verwendet und die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden bei der Berechnung der Kallosegehalte später abgezogen.

Zu 160 µl Probe wurde 1 ml Färbelösung zugesetzt und für 20 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert, wobei sich die Proben entfärbten. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Fluoreszenz in einem Spektrofluorometer (F 2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 394 nm und Emissionswellenlänge von 484 nm gemessen. Im Bereich von 0-20 µg ml⁻¹ wurde eine Eichreihe mit dem 1,3-β-Glukan Pachyman aus *Poria coccus* (Calbiochem, Deisenhofen) mit Polymerisationsgrad 250-690 (Kauss, 1989) erstellt. Die Kallosegehalte werden daher als Pachyman Equivalente (PE) angegeben. Zur Bestimmung der Al-induzierten Kallosebildung (Kalloseinduktion) wurden die Kallosegehalte der Kontrollen (0 µM Al) von denen der Behandlungen (Al oder Digitonin) abgezogen.

2.6.3 Bestimmung des Phenolgehaltes von Suspensionszellen

Die Phenolbestimmung erfolgte modifiziert nach Swain und Hillis (1959). Dazu wurden Zellen (ca. 0,3 g) nach dem Versuch (2.4.2) gemörsert, in Reagenzgläser überführt und mit 3 ml kochendem Ethanol (80%) versetzt und für 15 min im Wasserbad weiter gekocht. Anschließend wurden die Proben per Ultraschall (Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) für 3 min mit der Sonotrode M73 (70% Leistung, 70% Impuls) homogenisiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 2500 x g (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) wurden 0,5 ml des Überstandes mit 6,5 ml H₂O versetzt.

Anschließend wurden 0,5 ml Folin-Denis-Reagenz (Sigma, Steinheim) zugesetzt, die Proben gut gemischt und nach 3 min Inkubation wurde 1 ml einer übersättigten Na₂CO₃-Lösung zugefügt. Die Proben wurden erneut gut vermischt und nach 1h Inkubation wurden die Proben über Blaubandfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) filtriert. Die Absorption des Filtrats wurden im Photometer (Lamda 15, UV/VIS, Perkin Elmer) bei 725 nm gemessen. Außerdem wurde eine Eichreihe aus "Kaffeesäure" 3,4-Dihydroxizimtsäure (Sigma, Steinheim) im Bereich von 0-150 µM angesetzt. Die Phenolgehalte wurden daher in Kaffesäureequivalenten (KsE) ausgedrückt.

2.6.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Böhlen et al. (1973). Dabei wurden 150 μl Probe in 600 μl 0,05 M Natriumphosphat-Puffer (pH 8) aufgenommen und anschließend unter beständigem Mischen 250 μl Fluorescaminlösung (0,3 mg ml^{-1} Aceton) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden die Proben am Spektrofluorometer (F 2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und Emissionswellenlänge von 475 nm gemessen. Die Eichreihe wurde aus BSA (Fraktion V, Biomol, Hamburg) im Bereich von 0-60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ erstellt.

2.6.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.6.5.1 Saure Phosphatase

Die Bestimmung der Aktivität von Saurer Phosphatase (EC 3.1.3.2) erfolgte nach der Methode von McLachlan (1980). Als Substrat wurde *para*-Nitrophenylphosphat (*p*-NPP) verwendet. Das Assaymedium bestand aus 50 mM Acetat-Puffer mit pH 4,5 und 1,35 mM *p*-NPP.

Zu 5 ml (Zellen: 10 ml) Assaymedium wurden 1 ml Exsudat bzw. 18 Wurzelspitzen oder 0,3 g Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 26°C auf dem Horizontalrotationsschüttler bei 100 rpm (Gio Gyrotory Shaker) für 60 min (Exsudate) bzw. 20 min (Wurzeln und Zellen). Nach dieser Zeit wurde die enzymatische Reaktion mit der Zugabe von 1 ml 0,5 N NaOH abgestoppt. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 410 nm am Spektralphotometer (Lamda 15, UV/VIS, Perkin Elmer) gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Nitrophenol in 50 mM Acetat-Puffer, pH 11 im Bereich von 0-300 μM angelegt. Die Enzymaktivität wurde in Units (U) angegeben, wobei 1 U, die Menge Enzym bezeichnet die bei 26°C 1 $\mu\text{mol p-NPP}$ pro Minute umsetzt.

In einigen Tests wurde eine kommerzielle Präparation von Saurer Phosphatase aus Weizenkorn (Sigma, Steinheim) verwendet, um die Auswirkung von Al (10-200 μM) im Assaymedium auf die Enzymreaktion zu untersuchen.

2.6.5.2 Peroxidase

Die Bestimmung der Aktivität von Peroxidasen (EC 1.11.1.7) erfolgte nach einer Methode von Hammerschmidt (1982).

Die Enzymreaktion wurde in einem Assaymedium durchgeführt das sich wie folgt zusammensetzte: 0,25% (v/v) 2-Methoxyphenol (Guaiacol, Fluka, Buchs, Schweiz), 0,1 M H_2O_2 , 0,01 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6). Von diesem Assaymedium wurden 980 μl vorgelegt,

20 µl Probe zugefügt und sofort vermischt. Nach 10 Sekunden Verzögerungszeit wurde die Absorptionsänderung über einen Zeitraum von 60 s am Spektralphotometer (Lambda 15, UV/VIS, Perkin Elmer) verfolgt. Zur Kalibration wurde eine Eichreihe mit einer kommerziellen Peroxidasepräparation aus Rettich (Sigma, Steinheim) im Bereich von 0,005 - 50 U ml⁻¹ erstellt.

In einigen Tests wurde diese kommerzielle Peroxidase auch verwendet, um die Auswirkung von Al (10-200 µM) im Assaymedium auf die Enzymreaktion zu untersuchen.

2.6.5.3 Pektinmethylesterase

Die Aktivität von Pektinmethylesterase (PME, EC 3.1.1.11) wurde nach Wojciechowski und Fall (1996) mit Modifikationen durchgeführt.

Dazu wurden in eine Küvette folgende Lösungen gegeben: 600 µl Pektinlösung (400 µg ml⁻¹, Pektin aus Zitronenfrucht, Veresterungsgrad 92%, Sigma, Steinheim), 855 µl Kaliumphosphat-Puffer pH 6, 25 µl Fluoral-P 0,15 g ml⁻¹ (Molecular Probes, Leiden, NL) und 10 µl (= 4 U) Alkoholoxidase EC 1.1.3.13 (aus *Piccia pastoris*, Sigma, Steinheim). Anschließend wurden 15 µl Probe zugesetzt, gut vermischt und nach einer Verzögerungszeit von 10 s wurde die Zunahme der Fluoreszenz über den Zeitraum von 30 min verfolgt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Methanol (Ultrapure, Sigma, Steinheim) im Bereich 0-200 µM erstellt und anstelle der Pektinlösung im Assay zusammen mit 15 µl H₂O anstelle der Enzymprobe eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde in Units (U) angegeben, wobei 1 U die Menge Enzym bezeichnet, die bei 26°C 1 µmol Methanol pro Minute vom Pektin abspaltet.

Sowohl der natürliche Zerfall von Fluoral als auch bereits vorhandene Spuren von Methanol in der Pektinlösung oder Probe wurden erfaßt und bei der Berechnung der Enzymaktivität berücksichtigt.

In einigen Tests wurde eine kommerzielle PME-Preparation aus Orangenschalen (Sigma, Steinheim) verwendet, um die Auswirkung von Al (10-200 µM) im Assaymedium auf die Enzymreaktion zu untersuchen.

2.6.6 Bestimmung von Zellwandbestandteilen

2.6.6.1 Qualitative Pektinbestimmung

Um die radiale Verteilung von vorwiegend unmethylierten Pektinen zu untersuchen, wurden von pH-adaptierten Mais- bzw. Ackerbohnenpflanzen Handschnitte gefertigt. Diese wurden mit 0,05% (w/v) Ruthenium Rot angefärbt und nach 15 min mit Wasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte im Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena) betrachtet und repräsentative Schnitte wurden mit einer Aufsetzkamera (M 35 W, Zeiss, Jena) und Kunstlichtfilm (Ektachrome 64 T, Kodak) fotografiert.

2.6.6.2 Herstellung von Zellwandmaterial

Die Gewinnung von Zellwandmaterial (ZWM) erfolgte aus Pflanzenmaterial, das für 24 h bei 4°C in 96% Ethanol aufbewahrt worden war. Wurzelsysteme wurden anschließend kurzfristig mit Wasser gewaschen und nachfolgend definierte Wurzelsegmente (in mm-Schritten) abgeschnitten und in Probencups (2 ml Volumen) gesammelt, so daß jede Probe 3 cm Wurzelmaterial enthielt. Zellen wurden ebenfalls kurz mit Wasser gewaschen und danach wurden ca. 4 g Zellen in Reagenzgläsern weiterverarbeitet. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend in Ethanol (Wurzeln: 1,5 ml, Zellen: 15 ml) zerkleinert. Dabei wurden die Wurzeln für 2 min im Homogenisier (RW 20, Jahnke und Kunkel) bei 2000 rpm bzw. die Zellen wurden im Mörser zerkleinert. Anschließend wurden die Proben per Ultraschall (Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) für 3 min mit der Sonotrode M73 (70% Leistung, 70% Impuls) weiter homogenisiert. Die Wurzelproben wurden für 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert (Sorvall MC 12, Du Pont) und der Überstand abgesaugt ohne das lose Pellet aufzuwirbeln. Bei den Zellproben wurde der Ethanol über Gazefilter mit Porendurchmesser 10 µm abgesaugt. Das so gewonnene Zellwandmaterial wurde bei 70°C in Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann weiter untersucht.

2.6.6.3 Quantitative Pektinbestimmung

Die Quantifizierung der Pektine wurde modifiziert nach den Methoden von Ahmend und Labavitch (1977) und Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) durchgeführt.

Dazu wurde ca. 1 mg ZWM in ein Probencup eingewogen und mit 400 µl eisgekühlter, konzentrierter H₂SO₄ versetzt. Die Proben wurden bei 4°C im Kühllabor für 10 min auf dem Traumelrollenmischer (TRM 50, IDL) vermischt, bevor 100 µl H₂O zugefügt wurde. Nach 2 h Vermischung auf dem TRM wurde erneut 100 µl H₂O zugesetzt, anschließend wurden die

Proben für weitere 8 Stunden bei 4°C auf dem TRM bewegt. Auf diese Weise wurde auch mit den eingedampften Pektinlösungen (2.4.5) verfahren.

Die bei der Hydrolyse frei gewordenen Uronsäuren wurden wie folgt bestimmt: 200 µl Probe wurde mit 1,2 ml Schwefelsäure/Tetraboratgemisch (0,0125 M Na₂B₄O₇ in H₂SO₄ konz.) versetzt, gemischt und im Eisbad abgekühlt. Die Proben wurden für 5 min im Wasserbad bei 100°C inkubiert und erneut im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 20 µl Hydroxybiphenyl (0,15% (w/v) in 0,5% (w/v) NaOH) zugesetzt und die Proben kräftig vermischt. Nach 30 min wurde die Absorption der Proben am Spektralphotometer (Lamda 15, UV/VIS, Perkin Elmer) bei 520 nm gemessen.

Da reduzierende Zucker in der hydrolysierten Probe mit dem Natriumtetraborat zu einer rosa Färbung führen können, war es notwendig für jede Probe einen Blindwert zu erstellen. Dabei wurde auf den Farbstoff Hydroxybiphenyl verzichtet und statt dessen nur NaOH (0,5% w/v) zugesetzt. Die Blindwerte wurden vor der Berechnung der Uronsäurekonzentration von den eigentlichen Proben abgezogen.

Zur Kalibration wurde eine Eichreihe im Bereich von 0-100 µg ml⁻¹ Galakturonsäure verwendet. Der Pektingehalt wurde daher als Galakturonsäureequivalent (GsE) ausgedrückt.

2.6.6.4 Methylierungsgrad

Der Methylierungsgrad von Pektin wurde über die Freisetzung von Methanol aus präpariertem Zellwandmaterial (ZWM) durch Verseifung (Fry, 1988) bestimmt. Dazu wurden ca. 5 mg ZWM in Kunststoffgefäße (25 ml) eingewogen und 5 ml kaltes Wasser zugeführt. Anschließend wurden 1,33 ml 200 mM KOH zugesetzt, die Gefäße gasdicht verschlossen und bei 4°C für 5 h auf dem Horizontalschüttler (LS 30 / RO 30, Gerhardt, Bonn) bei 80 rpm geschüttelt. Die Proben wurden dann mit 0,44 ml 1 M K₂HPO₄ neutralisiert und die Menge des entstandenen Methanol wie unter 2.6.5.3 beschrieben bestimmt, wobei die 600 µl Pektinlösung durch die Methanolprobe ersetzt und anstelle von 15 µl PME nur Wasser zugefügt wurde.

Der Methylierungsgrad vom Pektin wurde rechnerisch in Mol-Prozent (Mol Methanol pro 100 Mol Galakturonsäureequivalente) ausgedrückt. Der Gehalt an unmethyliertem Pektin wurde ebenfalls rechnerisch bestimmt, indem zunächst der Gehalt an methyliertem Pektin berechnet und dann vom Gesamtpektingehalt abgezogen wurde.

2.6.7 Statistik

Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse dokumentieren jeweils typische Einzelexperimente aus mehreren, mindestens jedoch zwei Versuchswiederholungen. Eine Ausnahme bildet hierbei der Versuch mit den transgenen Kartoffelpflanzen, der nur ein mal durchgeführt werden konnte.

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Statistikprogramm SAS, Version 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Jeder Meßpunkt in den aufgeführten Graphiken und Tabellen setzt sich aus mindestens 3 Wiederholungen zusammen (genaue Angabe in der jeweiligen Legende) und ist mit der Standardabweichung dargestellt.

Unterschiede zwischen Mittelwerten ($p \leq 0,05$) wurden mit dem Tukey-Test oder F-Test ermittelt und durch unterschiedliche Buchstaben kenntlich gemacht. Die Bestimmtheitsmaße bei Korrelationen sind entsprechend ihrem Signifikanzgrad mit ***, ** bzw. * für $p \leq 0,001$; $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,1$ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Al-Toxizität anhand verschiedener Parameter in Nährlösungsversuchen

3.1.1 Einfluß von Al auf Ackerbohne und verschiedene Maisgenotypen

Der Maisgenotyp Helix sollte im Rahmen dieser Arbeit als Standardgenotyp verwendet werden, war aber bisher noch nicht auf seine Al-Empfindlichkeit getestet worden. Auch über die Reaktion der Ackerbohnen Sorte "Herz Freya" auf Al lagen bisher keine konkreten Daten vor, so daß Herz Freya und Helix zusammen mit zwei Maissorten, deren Al-Empfindlichkeit bekannt war, zunächst in einem Nährlösungsversuch untersucht wurden. Lixis (Al-sensitiv) und ATP-Y (Al-resistent) wurden dabei als Referenz verwendet.

Um die Al-Empfindlichkeit von Mais und Ackerbohne zu vergleichen wurde in Nährlösungsversuchen das Wurzellängenwachstum als primärer Parameter, aber auch Kalloseinduktion und Al-Gehalte der Wurzelspitzen untersucht.

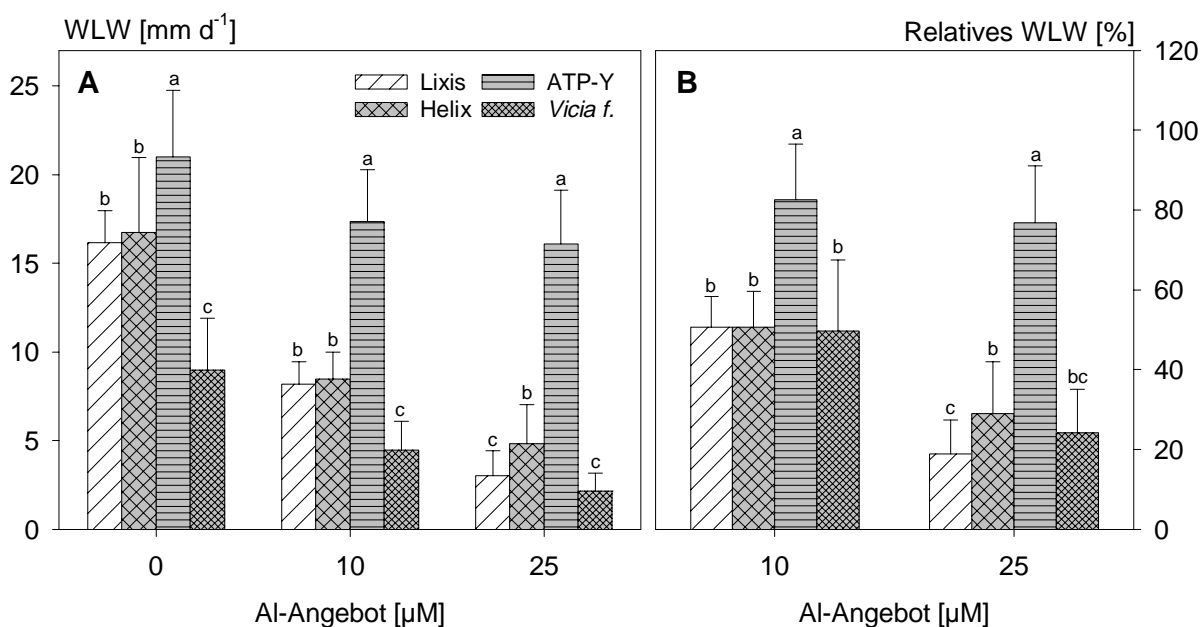


Abb. 1: Einfluß des Al-Angebots auf das Wurzellängenwachstum (A) und das relative Wurzellängenwachstum (B) bei drei verschiedenen Maisgenotypen und einer Ackerbohnen Sorte. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 20$.

In Abb. 1A ist das Wurzellängenwachstum (WLW) dargestellt. Steigendes Al-Angebot führte sowohl bei Mais als auch bei Ackerbohne zur Verringerung des Wurzelwachstums. In Abwesenheit von Al zeigten sich bei den untersuchten Pflanzen große Unterschiede im Wurzelwachstum, wobei Ackerbohne den geringsten Zuwachs aufwies. Der Maisgenotyp ATP-Y zeichnete sich durch ein besonders starkes Wachstum (23 mm d^{-1}) aus, während das Wachstum von Lixis und Helix mit ca. 16 mm d^{-1} deutlich geringer war. Aufgrund der unterschiedlichen Wüchsigkeit der Genotypen wurde das relative Wurzellängenwachstum ($0 \mu\text{M Al} = 100\%$) bestimmt und in Abb. 1B dargestellt. Bei einem Al-Angebot von $10 \mu\text{M}$ war das Wurzelwachstum des resistenten Genotyps ATP-Y auf 82% reduziert, während sich Helix und Ackerbohne ähnlich verhielten wie der sensitive Genotyp Lixis (ca. 50% relatives WLW). Eine Erhöhung des Al-Angebots auf $25 \mu\text{M}$ verminderte das relative WLW weiter, Lixis reagierte mit einem relativem WLW von weniger als 20% am empfindlichsten. Das relative WLW von Ackerbohne und Helix war auf 22% bzw. 28% reduziert, während ATP-Y mit knapp 80% am wenigsten von Al-Toxizität betroffen war.

Als weiterer Parameter wurde die Al-induzierte Kallosebildung in Wurzelspitzen (1 cm) bestimmt. Sowohl bei 10 als auch bei $25 \mu\text{M Al}$ wies Lixis gefolgt von Helix die höchste Kalloseinduktion auf, während ATP-Y nur wenig Kallose bildete. Die Al-induzierte Kallosebildung von Ackerbohne entsprach der von ATP-Y.

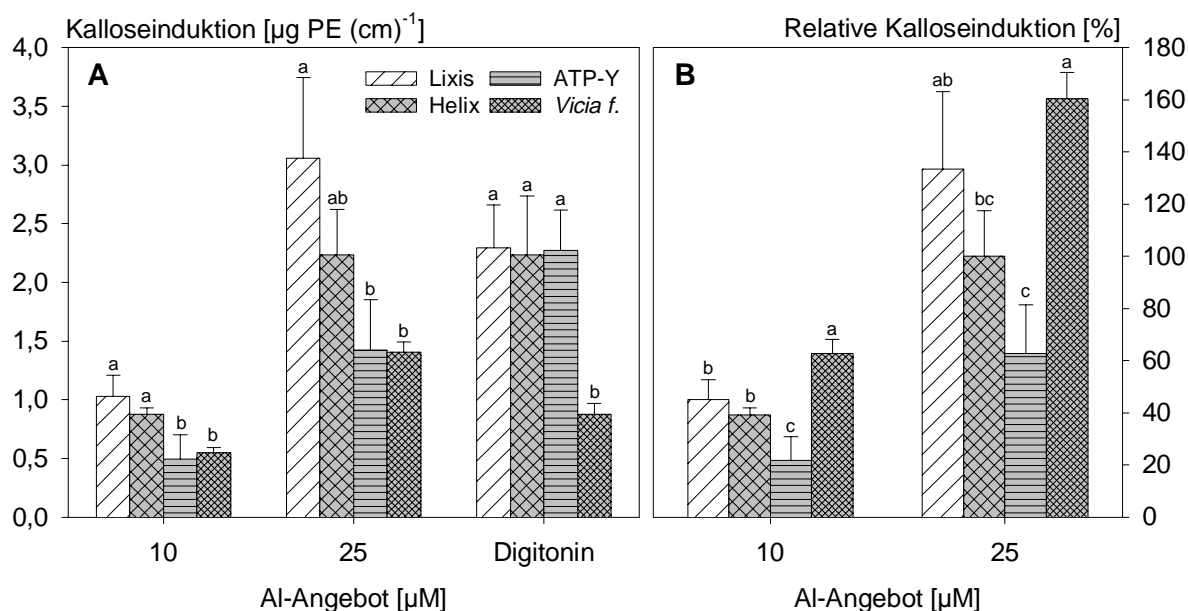


Abb. 2: Einfluß des Al-Angebots auf die Kalloseinduktion (A) und die relative Kalloseinduktion (B) bei Wurzelspitzen (1 cm) von 3 verschiedenen Maisgenotypen und 1 Ackerbohnenorte. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bzw. $10 \mu\text{M}$ Digitonin bei pH $4,3$. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 4$.

Kallosebildung war bislang als Parameter der Al-Toxizität nur für die Untersuchung von genotypischen Unterschieden innerhalb einer Pflanzenart verwendet worden. Aus der Literatur (Kauss, 1996; und Referenzen darin) ist bekannt, daß Kallose, ein 1,3- β -Glucan, in verschiedenen Pflanzenarten sehr unterschiedlich strukturiert sein (Polymerisationsgrad etc.). Sowohl die Struktur der Kallose als auch die Struktur der sie umgebenden Zellwand können die Extraktion bzw. Quantifizierung beeinflussen. Aus diesem Grund wurde ein Elicitor der Kallosesynthese gesucht, der unabhängig ist von Mechanismen der Al-Resistenz, wie z.B. die Exsudation von organischen Säuren und anderen Al-Komplexoren (Basu et al., 1994; Horst et al., 1982; Delhaize et al., 1993b; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000) oder Kompartimentierung wie von Vázquez et al. (1999) beschrieben.

Digitonin ist bereits als Elicitor der Kallosesynthese beschrieben (Waldmann et al., 1988) und stellte sich für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pflanzenarten und Zellsuspensionskulturen als geeignet heraus. Digitonin wurde als Maßstab für die grundlegende Fähigkeit einer Pflanze Kallose zu bilden und zur Standardisierung der Quantifizierung von Kallose verwendet.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß bei einer Konzentration von 10 μ M Digitonin ca. 50% der maximalen Kallosebildungsleistung der untersuchten Pflanzenarten erreicht wurde. In Abb. 2A ist zu erkennen, daß sich die Digitonin-induzierte Kallosebildung zwischen den Maisgenotypen nicht unterschied und wesentlich höher als bei Ackerbohne war. Um diesem Unterschied Rechnung zu tragen, wurde ähnlich wie beim Wurzellängenwachstum ein relativer Wert bestimmt, die relative Kalloseinduktion (Digitonin = 100%). Dabei blieben die Unterschiede bei den Maisgenotypen erhalten, d.h. Lixis und Helix wiesen eine höhere relative Kalloseinduktion sowohl bei 10 als auch bei 25 μ M Al auf als ATP-Y (Abb. 2B). Im Gegensatz zu den absoluten Werten war die relative Kalloseinduktion bei Ackerbohne bei beiden Al-Angeboten höher als bei allen Maisgenotypen.

In Abb. 3 sind die Al-Gehalte von Wurzelspitzen (1 cm) dargestellt. Mit einer Steigerung des Al-Angebots kam es zu einer Erhöhung der Al-Gehalte bei allen vier Genotypen. Dabei wies Ackerbohne die höchsten Al-Gehalte auf, während die Maisgenotypen Lixis und Helix höhere Al-Gehalte hatten als ATP-Y.

Es bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen dem relativen WLW und den Al-Gehalten (Abb. 4A) sowie eine signifikante positive Beziehung zwischen den Al-Gehalten und der relativen Kalloseinduktion (Abb. 4B). Auch zwischen relativem Wurzellängenwachstums und relativer Kalloseinduktion bestand eine negative Korrelation ($r^2 = 0,688$; nicht dargestellt).

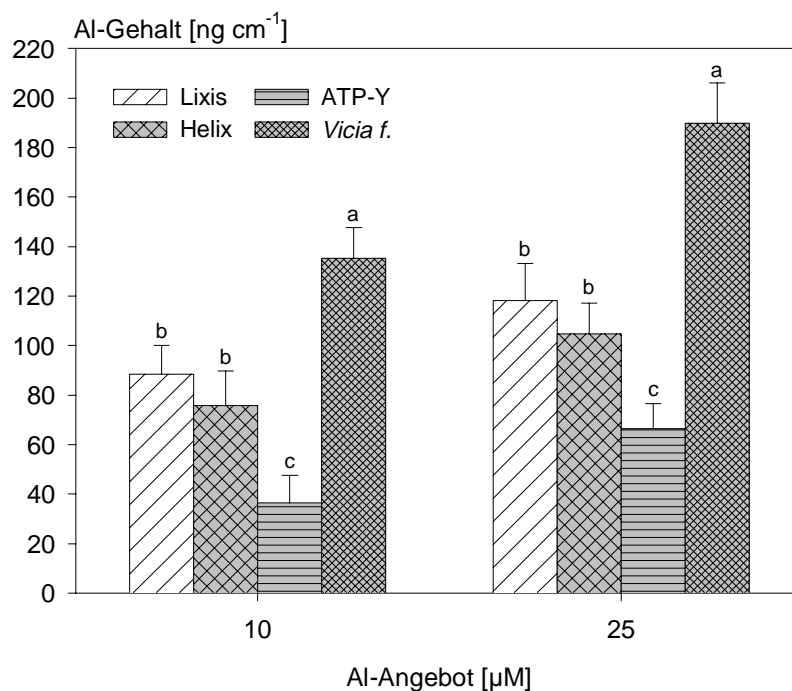


Abb. 3: Einfluß des Al-Angebots auf die Al-Gehalte von Wurzelspitzen (1 cm) von 3 verschiedenen Maisgenotypen und 1 Ackerbohnsensorte. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 4$.

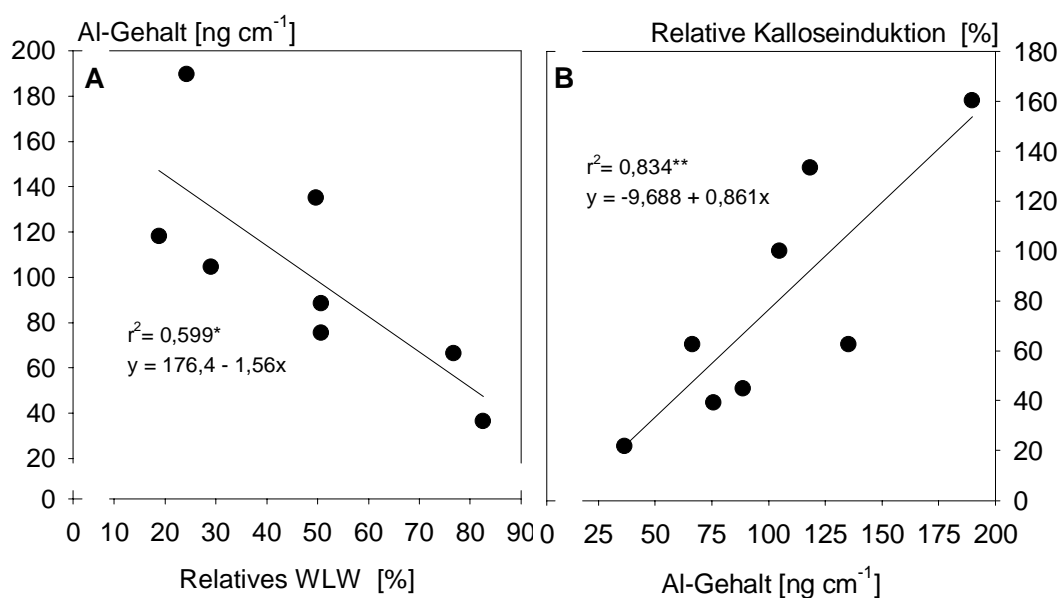


Abb. 4: Beziehung zwischen relativem Wurzellängenwachstum und Al-Gehalt (A) bzw. Al-Gehalt und relativer Kalloseinduktion (B) von 3 verschiedenen Maisgenotypen und 1 Ackerbohnsensorte. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bzw. 10 µM Digitonin bei pH 4,3. Mittelwerte aus $n = 20$ (WLW), $n = 4$ (Al, Kallose), *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

3.1.2 Einfluß von Al auf verschiedene Kartoffelgenotypen

Aus einem größeren Sortiment, das bereits auf seine Al-Empfindlichkeit untersucht worden war (Kühling, 1997) wurden zwei Genotypen von *Solanum tuberosum* (L.) ausgesucht, die sich in ihrer Al-Empfindlichkeit unterscheiden. Red McClure (RMC) wurde dabei als Standard für einen Al-resistenten und Adelheid (ADH) als Al-sensitiven Genotyp ausgewählt. Um zu untersuchen, ob die Veränderung des Expressionsgrads von Pektinmethylesterase (PME) die Al-Empfindlichkeit modifizieren kann wurden transgene Pflanzen in Nährlösungsversuchen verwendet. Am Max-Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie (Golm, Arbeitsgruppe Fisahn) wurde der Genotyp Desiree als Wildtyp (WT) zur Transformation verwendet und zusammen mit verschiedenen Transformanten zur Verfügung gestellt (siehe auch 3.4.2). In einem ersten Versuch wurde neben dem WT eine Mischung (Pool) aus zwei überexprimierenden Linien (PetBin 3, PetBin 5) verwendet und im folgenden als Transformante (Transf.) bezeichnet.

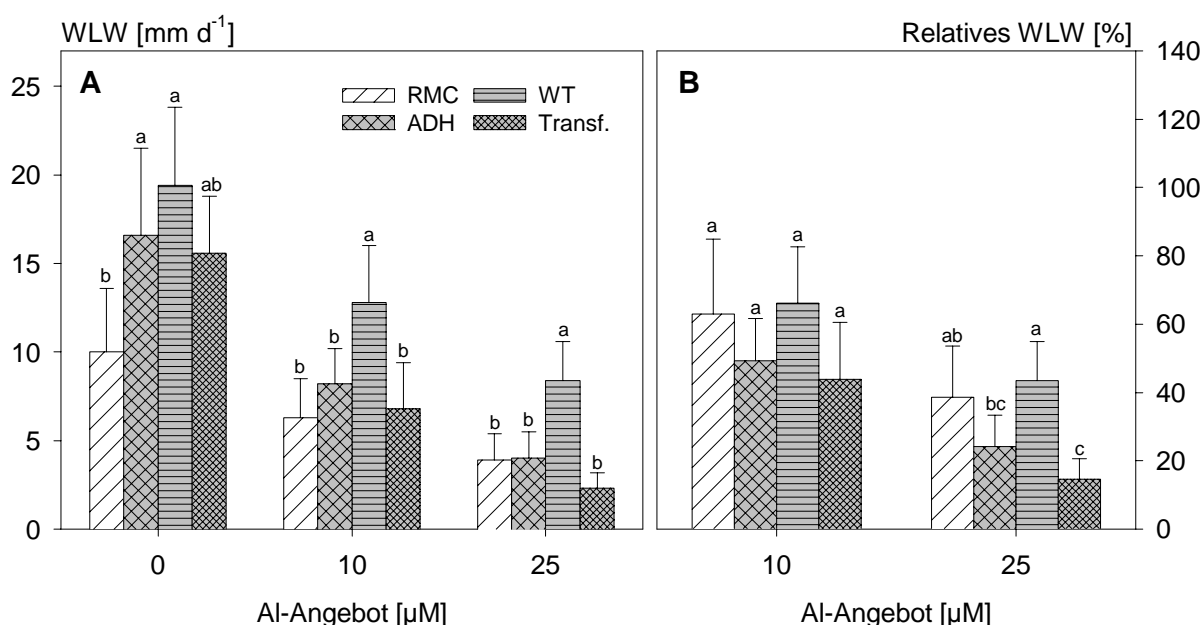


Abb. 5: Einfluß des Al-Angebots auf das Wurzellängenwachstum (A) und das relative Wurzellängenwachstum (B) bei vier verschiedenen Kartoffelgenotypen. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in Bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 10$.

In Abwesenheit von Al war das WLW am stärksten beim Wildtyp (Abb. 5A), gefolgt von ADH und der Transformante, während RMC das geringste Wachstum zeigte. Mit steigendem Al-Angebot kam es bei allen Genotypen zu einer Reduktion des Wurzellängenwachstums. Um die unterschiedliche Wüchsigkeit der Genotypen zu berücksichtigen, wurde das relative WLW berechnet (Abb. 5B). Dabei zeigte sich, daß bei einem Angebot von 10 μM Al das WLW von ADH und der Transformante auf 49 bzw. 44% reduziert war, während bei RMC

und dem Wildtyp nur ein Rückgang auf 63 bzw. 66% zu beobachten war. Bei einer Steigerung des AI-Angebots auf 25 μM zeigte sich ein ähnliches Bild, das WLW war am stärksten bei ADH und der Transformante eingeschränkt, während RMC und der Wildtyp weniger stark betroffen waren. Wurden beide AI-Angebote in der statistischen Analyse berücksichtigt konnten die Genotypen in zwei Gruppen unterteilt werden: RMC und der Wildtyp waren signifikant (F-Test, $p \leq 0,05$) weniger in ihrem relativen WLW eingeschränkt als ADH und die Transformante.

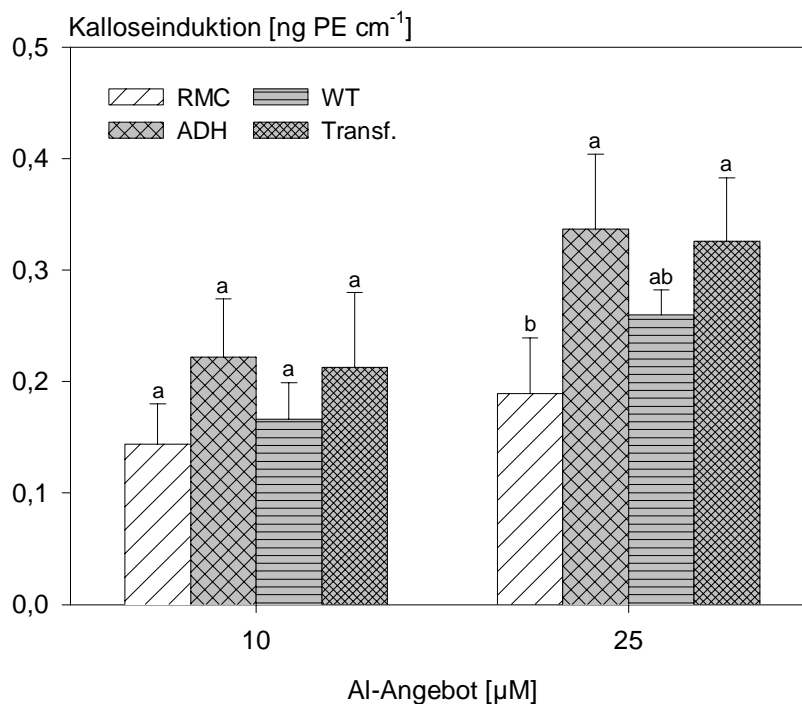


Abb. 6: Einfluß des AI-Angebots auf die Kalloseinduktion bei Wurzelspitzen (1 cm) von vier verschiedenen Kartoffelgenotypen. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen AI-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 6$.

Durch ein steigendes AI-Angebot kam es zu einer Erhöhung der Kalloseinduktion bei allen vier Genotypen (Abb. 6). Bei 10 μM AI waren aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten, aber es deutete sich an, daß durch AI bei ADH und der Transformanten mehr Kallose induziert wurde als bei RMC und WT. Diese Unterschiede in der AI-induzierten Kallosebildung waren bei der Erhöhung des AI-Angebots auf 25 μM ausgeprägter, zwischen ADH und der Transformanten war die Induktion signifikant höher als bei RMC. Wie bereits beim relativen WLW kam es bei der Berücksichtigung beider AI-Angebote in der statistischen Auswertung zu einem signifikanten (F-Test, $p \leq 0,05$) Unterschied zwischen dem AI-sensitiven Genotyp ADH und der Transformanten gegenüber dem AI-resistenten Genotyp RMC und dem Wildtyp.

Nach Inkubation der Wurzeln mit 10 μM Al waren die Al-Gehalte in den Wurzelspitzen der Transformanten am höchsten, während ADH und der Wildtyp ähnliche Gehalte hatten und RMC den geringsten Gehalt aufwies (Abb. 7). Nur die Unterschiede zwischen der Transformante und RMC waren signifikant. Die Steigerung des Al-Angebots auf 25 μM führte zu einer Erhöhung der Al-Gehalte. Auch bei diesem Angebot wies die Transformante den höchsten und RMC den niedrigsten Gehalt auf, während sich ADH und der Wildtyp durch sehr ähnliche, mittlere Gehalte auszeichneten. Unter Berücksichtigung beider Al-Angebote zeigte die Transformante signifikant höhere (F-Test, $p \leq 0,05$) Al-Gehalte als alle anderen Genotypen.

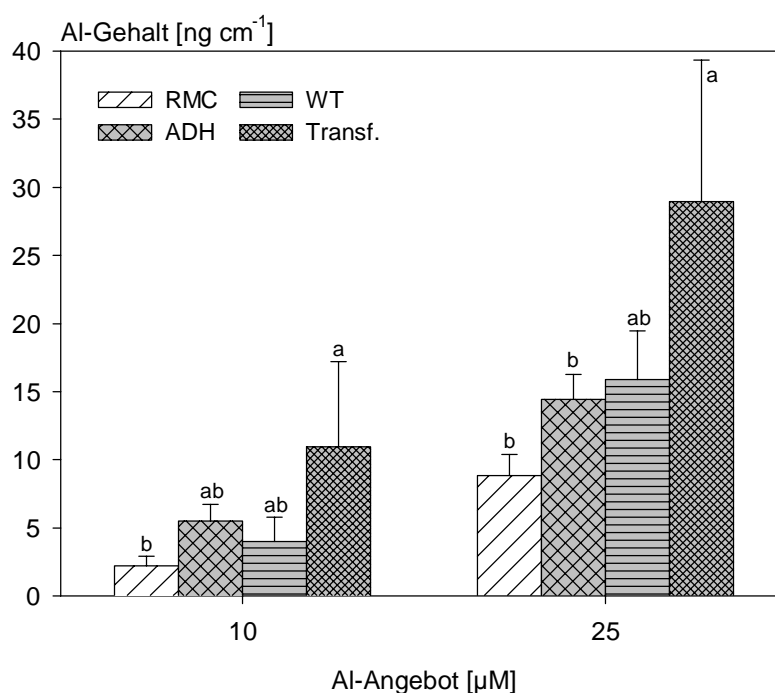


Abb. 7: Einfluß des Al-Angebots auf die Al-Gehalte bei Wurzelspitzen (1 cm) von vier verschiedenen Kartoffelgenotypen. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 4$.

3.1.3 Beziehung zwischen Wurzellängenwachstum und Kalloseinduktion

Bei dem Vergleich von Ackerbohne und Mais (3.1.1) in Hinblick auf WLW und Kallose hatte sich bereits gezeigt, daß sich Genotypen und Arten aufgrund der relativen Werte vergleichen ließen. Im folgenden soll nun untersucht werden, ob dies auch möglich ist, wenn eine weitere Pflanzenart (Kartoffel) mit 9 Genotypen (3.4.2) und auch Maispflanzen nach Adaptation an Salzstreß (3.3.3.2) in diese Beziehung mit einfließen.

Zwischen den absoluten Werten des WLW und der Kalloseinduktion bestand keine Beziehung, auch mit den Al-Gehalten der Wurzelspitzen ließ sich keine Beziehung wie sie z.B. beim Vergleich Mais / Ackerbohne (3.1.1) oder Kartoffelgenotypen (3.4.2) entstanden war wiederfinden. Hingegen bestand eine hochsignifikante, negative Beziehung zwischen dem relativem WLW und der relativen Kalloseinduktion.

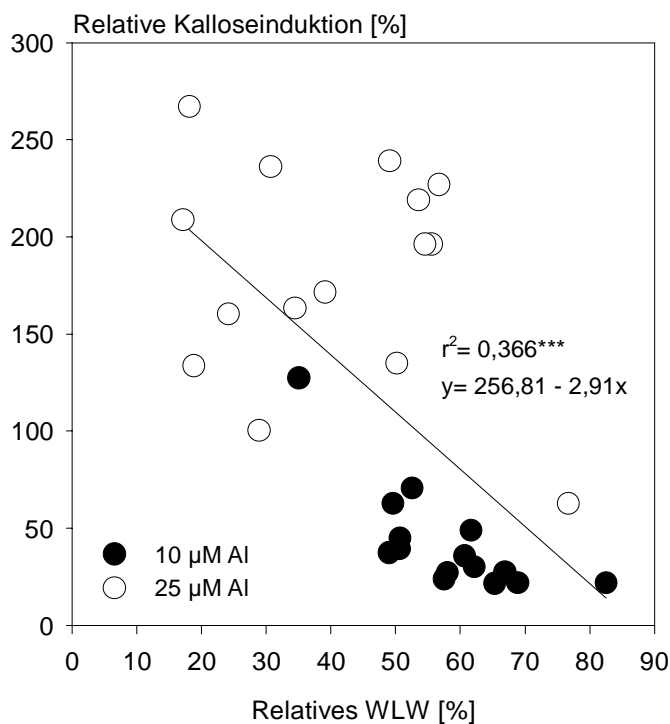


Abb. 8: Beziehung zwischen relativem Wurzellängenwachstum und der relativen Kalloseinduktion von 3 verschiedenen Maisgenotypen, Maisgenotyp Helix nach NaCl-Adaptation, 1 Ackerbohnenart und 9 verschiedenen Kartoffelgenotypen. Inkubation für 24 h in NL mit 10 oder 25 µM Al bzw. 10 µM Digitonin bei pH 4,3. Mittelwerte aus verschiedenen Versuchen, WLW: n = 20 (Mais, Ackerbohne) bzw. 10 (Kartoffel), Kallose: n = 4 (Mais, Ackerbohne) bzw. 5 (Kartoffel), *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

3.2 Lokalisation von Al und Kallose in Wurzeln von Ackerbohne und Mais

3.2.1 Differenzierung der räumlichen Verteilung von Aluminium in Wurzeln

3.2.1.1 Radiale Verteilung von Al

Das Schockgefrieren und die Gefriersubstitution der Wurzeln resultierte in einer zufriedenstellenden Strukturhaltung (Abb. 9), so daß die Unterscheidung von Zellkompartimenten (Vesikel, Vakuolen, Zellkern) möglich und somit symplastische Messungen möglich waren. Allerdings wurde bei der LAMMA-Messung (durchgeführt von S. Marienfeld, FZ Jülich) nicht zwischen einzelnen Zellkompartimenten unterschieden, so daß die intrazellulären (symplastischen) Messungen sowohl zytoplasmatische, nukleare, als auch vakuoläre Kompartimente umfassen.

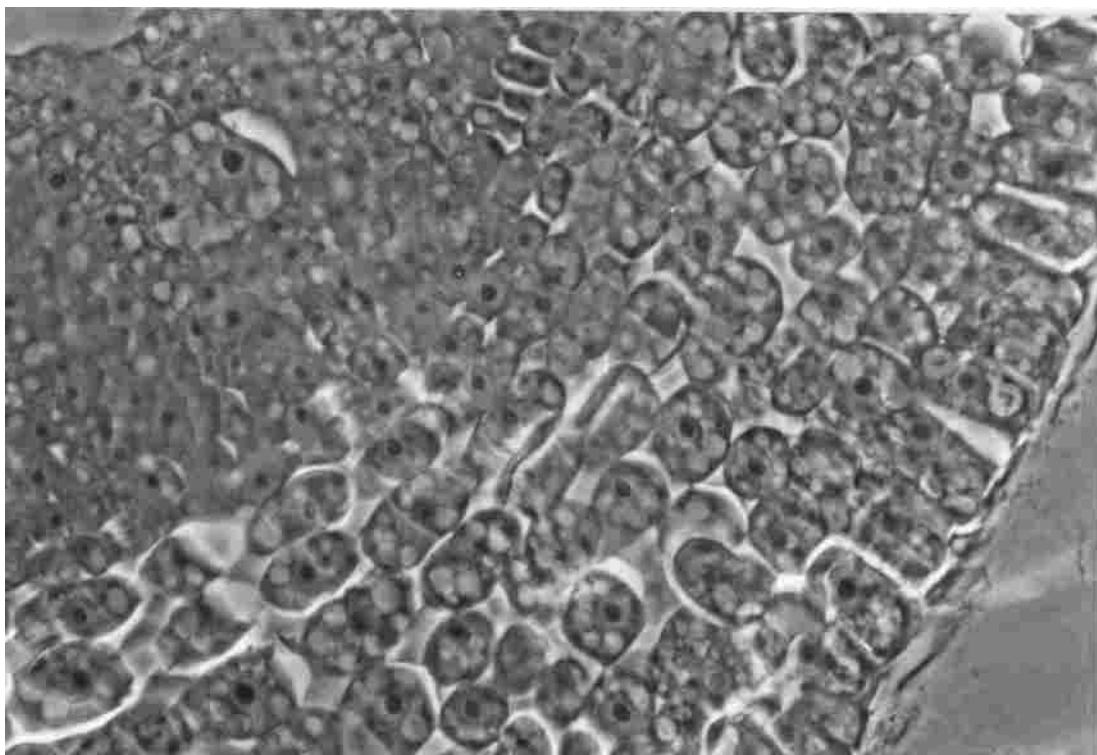


Abb. 9: Lichtmikroskopisches Bild eines lateralen Schnittes im Abstand von 1 mm von der Spitze einer Maiswurzel. Färbung mit Methylenblau, Phasenkontrastaufnahme, 200 x Vergrößerung.

Um zu untersuchen, ob Al während der Präparation der Proben verlagert wurde, wurden Wurzeln für 5 sec in eine Lösung mit 50 μM Al eingetaucht. In Abb. 10 ist zu sehen, daß es nicht zu einer Verlagerung des Al aus der Rhizodermis in tiefere Zellschichten kam, und bereits in der äußeren Cortex das Al-Signal so niedrig wie in der Kontrolle war.

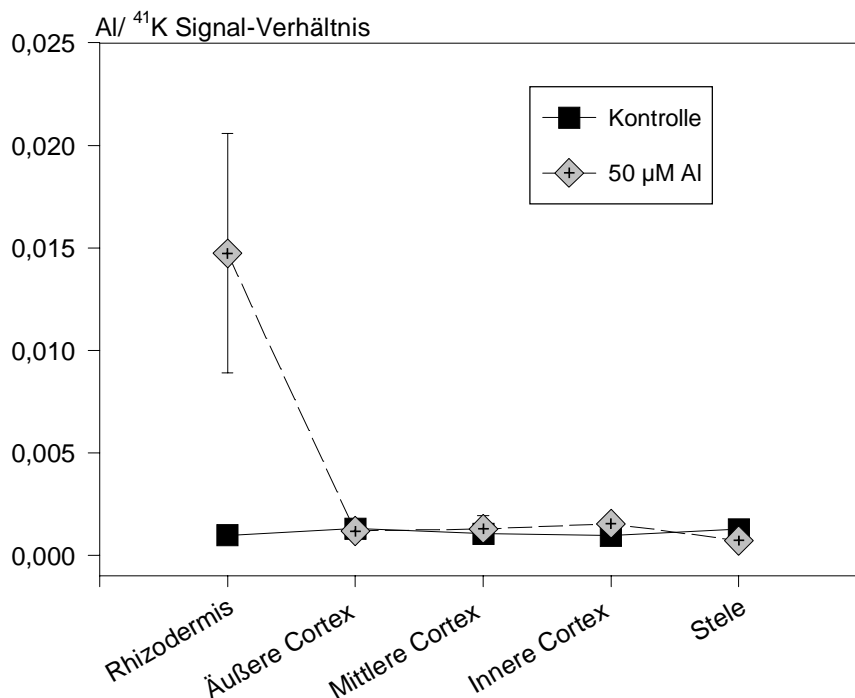


Abb. 10: Radiale Verteilung von Al in Maiswurzeln (Abstand 1-2 mm von der Wurzelspitze) nach kurzfristiger Behandlung mit Al. Inkubation der Wurzeln für 5 sec. $\pm 50 \mu\text{M}$ Al bei pH 4,3. Mittelwerte \pm SD mit n = 5.

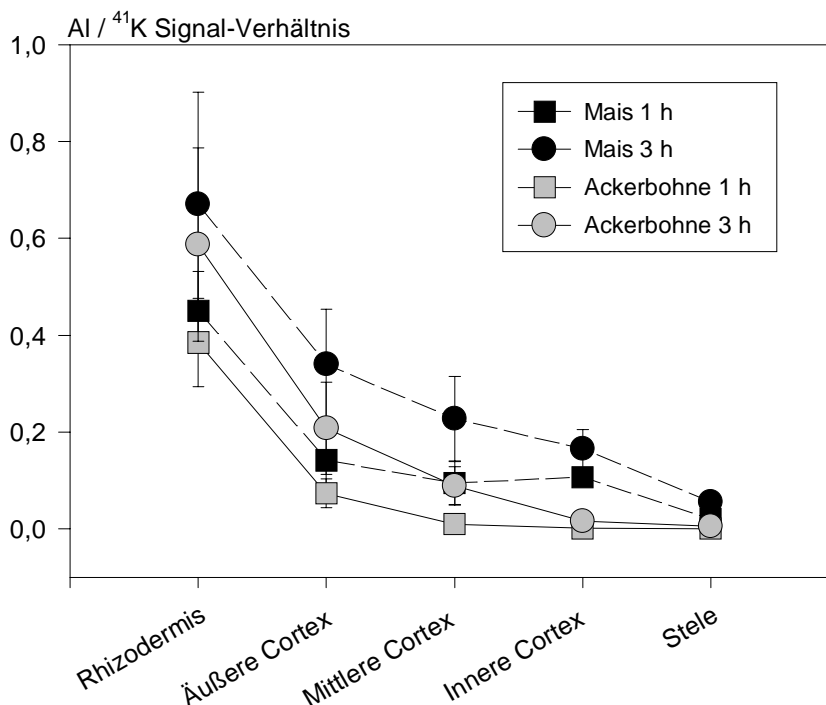


Abb. 11: Radiale Verteilung von Al in Wurzeln (Abstand 1-2 mm von der Wurzelspitze) von Mais und Ackerbohne nach Behandlung mit Al. Inkubation der Wurzeln für 1 bzw. 3 h $\pm 50 \mu\text{M}$ Al bei pH 4,3. Mittelwerte \pm SD mit n = 5.

Im Bereich 1-2 mm von der Wurzelspitze war das Al-Signal in der Rhizodermis immer am höchsten (Abb. 11), wobei der Gradient der Al-Verteilung bei Mais und Ackerbohne unterschiedlich war. Bei Ackerbohne wurde Al vorwiegend in den äußeren Zellschichten zurückgehalten, während Al in Maiswurzeln tiefer eindrang und bereits nach 1 h die Stele erreichte. Somit stellte die sich differenzierende Endodermis in Mais keine Barriere gegen Al dar.

Die Al-Signale des Symplasten betrug sowohl bei Mais als auch Ackerbohne nur 1-5% der Signale der Zellwand (Abb. 12). In Maiswurzeln war Al im Symplasten aller Cortexzellen zu finden während in Ackerbohnenwurzeln symplastisches Al nur in Zellen der Rhizodermis und des äußeren Cortex detektierbar war.

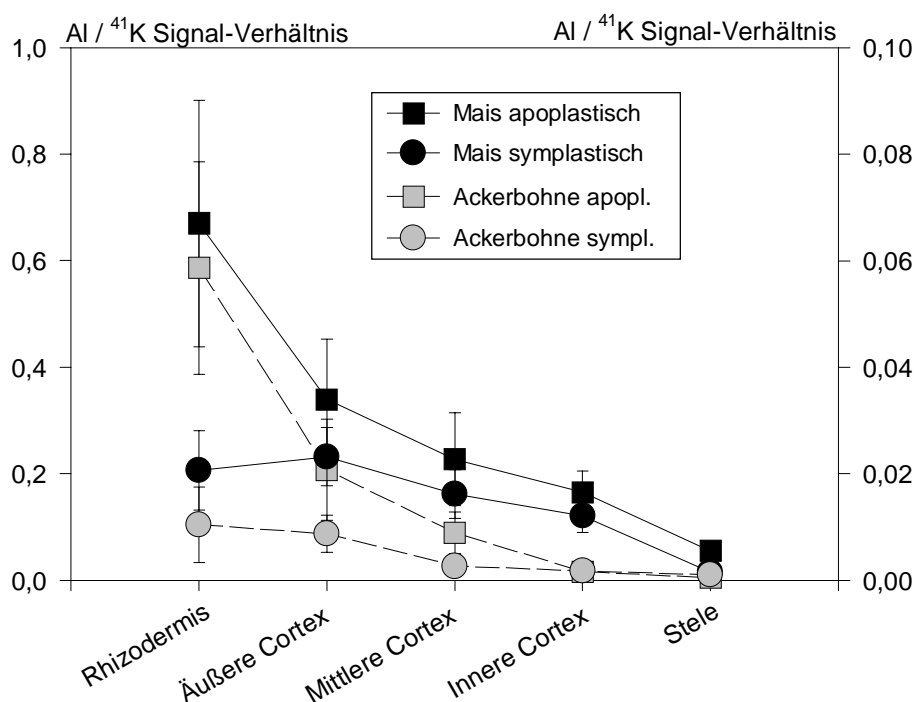


Abb. 12: Vergleich der radialen Verteilung von Al in der Zellwand (linke Achse) und im Symplasten (rechte Achse) in Wurzeln von Mais und Ackerbohne. Inkubation der Wurzeln für 3 h \pm 50 μ M Al bei pH 4,3. Mittelwerte \pm SD mit n = 5.

Die Tatsache, daß die Signale bei Ackerbohne höher waren als bei Mais macht die Problematik der Quantifizierung erneut deutlich. Denn im Gegensatz zu den LAMMA-Messungen waren die Gesamtgehalte (Bestimmung mittels AAS) an Al, aber auch die Al/⁴¹K-Verhältnisse in Wurzelspitzen von Ackerbohne höher als bei Mais (Tab. 1). Auch wenn im Zusammenhang mit LAMMA von Konzentrationen gesprochen wird, so sind doch Signalintensitäten gemeint.

Tab. 1: Al- und K-Gesamtgehalte und berechnete Ionenverhältnisse bei Wurzelspitzen (5 mm) von Mais und Ackerbohne, ausgehend von 6,73% natürlichem Vorkommen von ^{41}K . Inkubation für 3 h $\pm 50 \mu\text{M}$ Al bei pH 4,3. Quantifizierung der Ionen mittels AAS, Mittelwerte \pm SD mit n = 5.

Pflanze	Al-Angebot	Ionengehalt [μmol (g TS) $^{-1}$]		Ionenverhältnis	
		Al	K	Al / K	Al / ^{41}K
Mais	-	1,04 \pm 0,08	441,4 \pm 84,37	0,002	0,032
	+	46,30 \pm 5,88	502,5 \pm 25,21	0,093	1,378
Ackerbohne	-	2,23 \pm 0,10	610,7 \pm 3,37	0,004	0,063
	+	57,27 \pm 1,24	541,8 \pm 40,32	0,106	1,575

3.2.1.2 Longitudinale Verteilung von Al

Zur Bestimmung der longitudinalen Verteilung von Al in Maiswurzeln wurden aus verschiedenen Wurzelzonen radiale Schnitte gefertigt und am LAMMA von S. Marienfeld (FZ, Jülich) untersucht. Höhere Al-Signale entlang des gesamten Wurzelradius der Zone 1-2 mm im Vergleich zur Calyptra, der Elongationszone und der Differenzierungszone (> 10 mm) wiesen auf eine höhere Al-Aufnahme und -Mobilität in dieser Zone hin (Abb. 13). Die reife Endodermis in der Differenzierungszone stellte eine Barriere für den Eintritt von Al in die Stele dar.

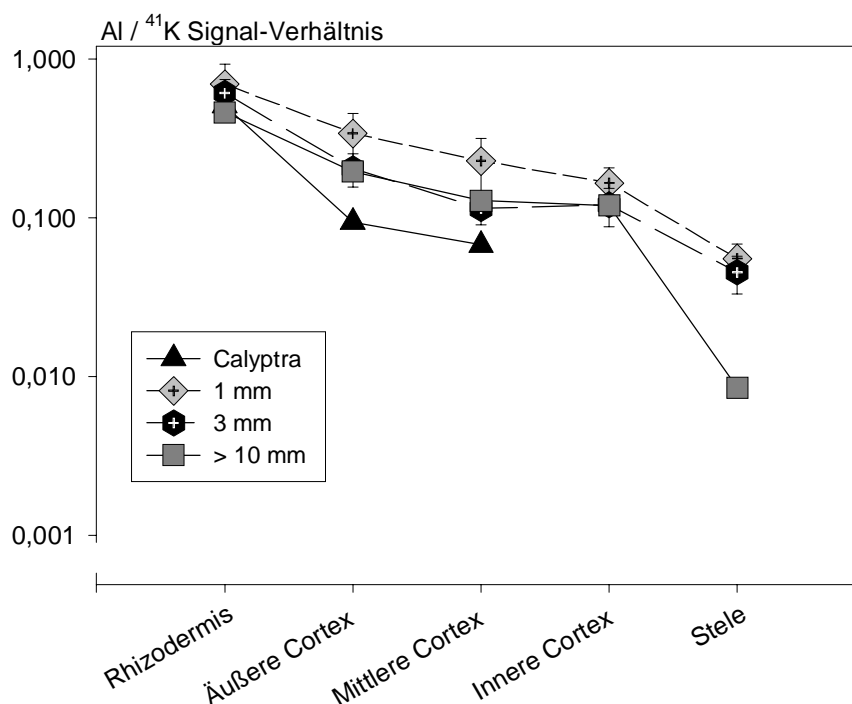


Abb. 13: Radiale Verteilung von Al in verschiedenen Zonen von Maiswurzeln. Inkubation für 3 h $\pm 50 \mu\text{M}$ Al bei pH 4,3. Mittelwerte \pm SD mit n = 5.

3.2.2 Vergleich der Al-Empfindlichkeit von individuellen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne

3.2.2.1 Al-Gehalte

Da sich bei den LAMMA-Messungen bereits abgezeichnet hatte, daß die Al-Verteilung in der Wurzel einen starken Gradienten aufweist, wurden die Al-Gehalte von einzelnen Wurzelsegmenten (1 mm) bei Mais und Ackerbohne mittels AAS genau quantifiziert (Abb. 14). Die Al-Gehalte zeigten sowohl bei Mais als auch bei Ackerbohne einen deutlichen Gradienten entlang des Wurzelapex, mit dem höchsten Gehalt im ersten Millimetersegment und den

niedrigstem Gehalt im Bereich 4-5 mm (Mais) bzw. 2-5 mm (Ackerbohne). Insgesamt waren die Al-Gehalte bei Ackerbohne höher und der Gradient steiler als bei Mais.

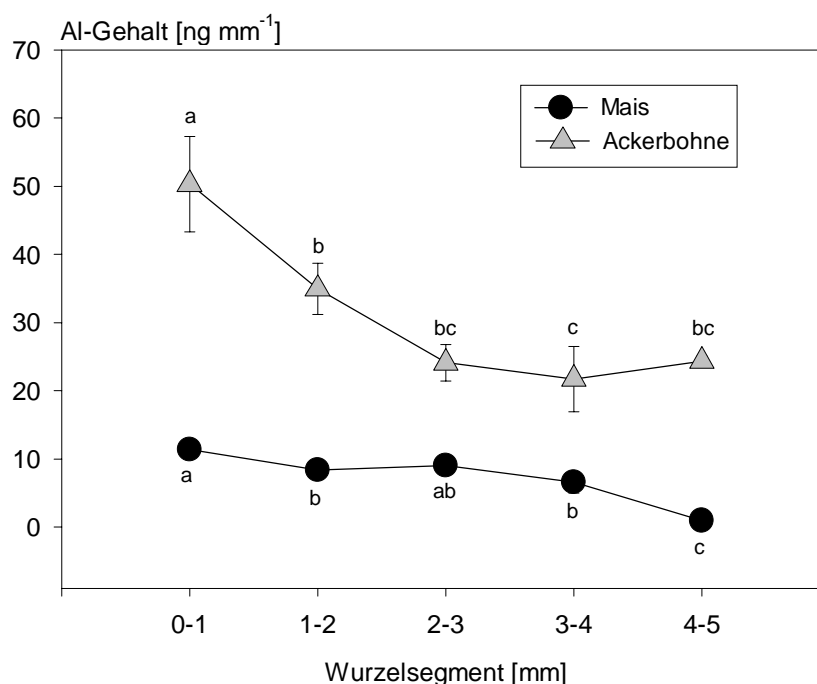


Abb. 14: Longitudinale Verteilung von Al in einzelnen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne. Inkubation für 3 h in NL $\pm 50 \mu\text{M}$ Al bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Segmente ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ von 7 Wiederholungen bestehend aus 10 einzelnen mm-Segmenten.

3.2.2.2 Kalloseinduktion

Die unterschiedliche longitudinale Verteilung der Al-Gehalte legte nahe, auch die Kalloseinduktion der einzelnen Wurzelsegmente zu untersuchen. Bei der Al-induzierten Kallosebildung (Abb. 15) zeigte sich ein anderes Verteilungsmuster als bei den Al-Gehalten. Auch hier gab es bei beiden Pflanzenarten einen Gradienten, aber das Maximum war im zweiten Millimetersegment (1-2 mm) zu finden, gefolgt von einem Abfall der Kalloseinduktion in basaleren Wurzelregionen, der bei Maiswurzeln besonders steil ausfiel. Das erste Segment wies eine ähnliche Kalloseinduktion auf wie folgende Wurzelabschnitte. Wie bereits in 3.1.1 festgestellt, war die Kalloseinduktion bei Ackerbohnen deutlich niedriger als bei Mais.

Um die grundlegende Fähigkeit zur Kallosebildung der einzelnen Segmente zu bestimmen, wurden die Wurzeln mit Digitonin behandelt (siehe auch 3.1.1). Auch bei Inkubation mit Digitonin war die Kallosebildung bei Ackerbohne geringer als bei Mais (Abb. 16). Während bei Mais die Digitonin-induzierte Kallosebildung einen steilen Gradienten mit einem Maximum im ersten Segment aufwies, zeigte der erste Millimeter von Ackerbohnenwurzeln die geringste

Kallosebildung. Die Region 1-4 mm zeichnete sich durch höhere Induktion aus, die im späteren Segment (4-5 mm) wieder etwas abnahm.

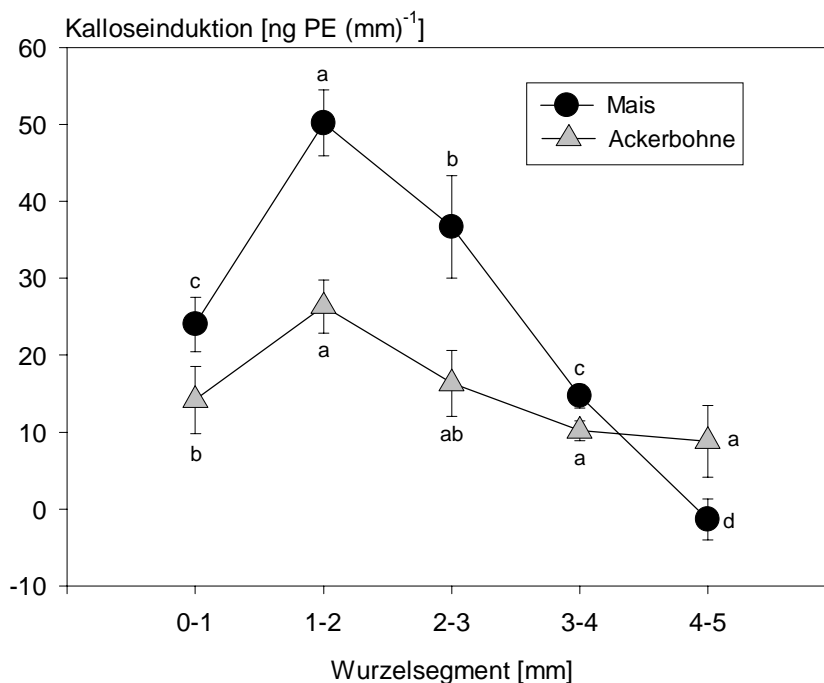


Abb. 15: Longitudinale Verteilung der Al-induzierten Kallosebildung in einzelnen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne. Inkubation für 3 h in NL $\pm 50 \mu\text{M}$ Al bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Segment ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ von 3 Wiederholungen bestehend aus 5 einzelnen Millimetersegmenten.

Um die unterschiedliche Fähigkeit zur Kallosebildung der beiden Pflanzenarten und der einzelnen Segmente zu berücksichtigen, wurde die relative Al-induzierte Kallosebildung berechnet und in Abb. 17 dargestellt. Sowohl Mais als auch Ackerbohne zeigten einen Gradienten in der relativen Kalloseinduktion, wobei es in Höhe und Verlauf Unterschiede zwischen den beiden Pflanzenarten gab. Ackerbohne zeigte einen steilen Gradienten mit einem Maximum im ersten Segment und eine Stagnation der relativen Kalloseinduktion ab dem 2. mm. Das Maximum war bei Mais hingegen im Segment 1-2 mm zu finden, in allen weiter basal gelegenen Segmenten kam es zu einer Verminderung der relativen Kalloseinduktion (bis zu 5 mm).

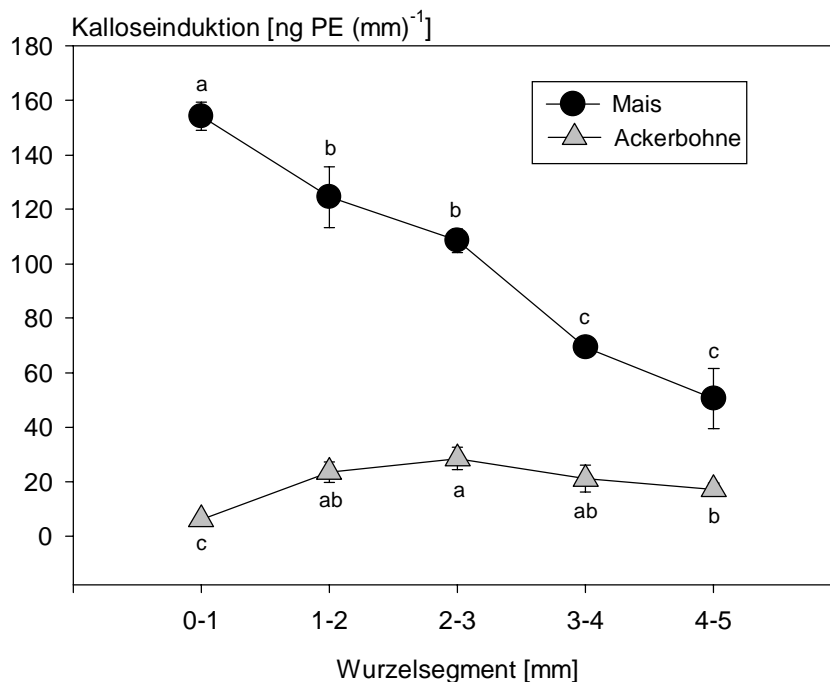


Abb. 16: Longitudinale Verteilung der Digitonin-induzierten Kallosebildung in einzelnen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne. Inkubation für 3 h in NL $\pm 10 \mu\text{M}$ Digitonin. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Segment ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ von 3 Wiederholungen bestehend aus 5 einzelnen Millimetersegmenten.

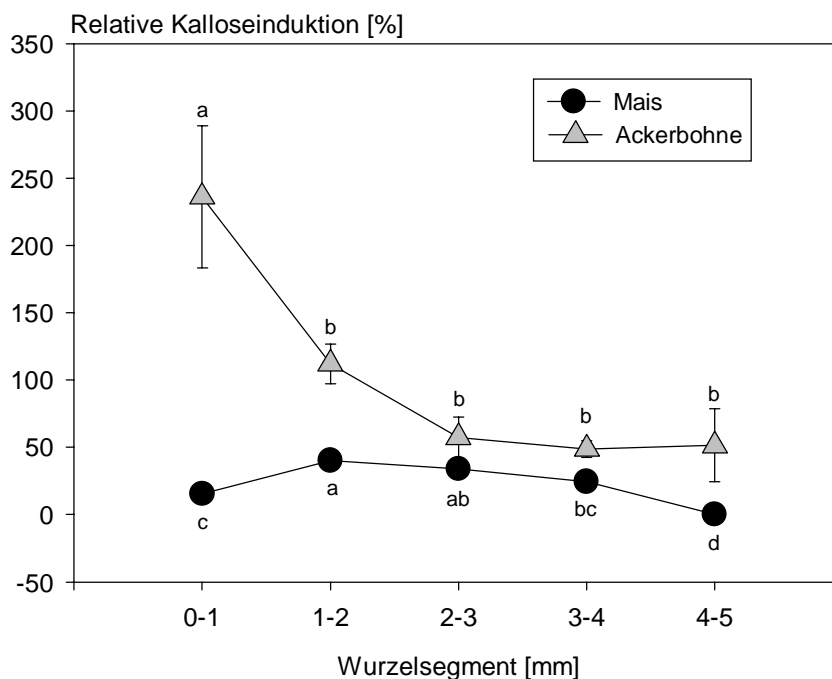


Abb. 17: Longitudinale Verteilung der relativen Kalloseinduktion in einzelnen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne. Inkubation für 3 h in NL $\pm 50 \mu\text{M}$ Al oder $10 \mu\text{M}$ Digitonin bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Segment ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ von 3 Wiederholungen bestehend aus 5 einzelnen Millimetersegmenten.

3.3 Bedeutung des Pektingehalts für die Al-Toxizität

3.3.1 Verteilung von Pektin in Wurzeln von Mais und Ackerbohne - qualitative Bestimmung

Ruthenium Rot (RR) ist ein Farbstoff der an Pektine bindet. Die Voraussetzung für die Bindung ist das Vorhandensein von zwei negativen Ladungen die sich im Abstand von 4,2 Å am Pektin befinden (Sterling, 1970), so daß nicht das gesamte Pektin erfaßt wird, sondern vorwiegend Domänen des Polymers, die nicht verestert sind. Folglich sind Bereiche ohne RR-Färbung nicht zwangsläufig frei von Pektinen, sondern es können sich dort auch Pektine mit hohem Veresterungsgrad befinden. Die Färbung mit RR zeigt also Regionen auf, die Pektine mit zum Teil freien Carboxylgruppen besitzen.

Bei der Färbung von radialen (ohne Bild) und longitudinalen Schnitten war im Lichtmikroskop zu erkennen, daß sich bei Mais nur die Calyptra und die ersten 2 mm der Wurzelspitze anfärben ließen. Nur die äußerste Zellschicht (Epidermis) wies hier eine Färbung auf (Abb. 18). Bei Ackerbohnen ließ sich ein längerer Teil der Wurzel anfärben, darüber hinaus waren mehrere Zellschichten der Wurzel betroffen (Abb. 19). Dies zeigt, daß sich die Verteilung von vorwiegend unmethyliertem Pektin in Mais und Ackerbohne unterschiedlich verhielt.

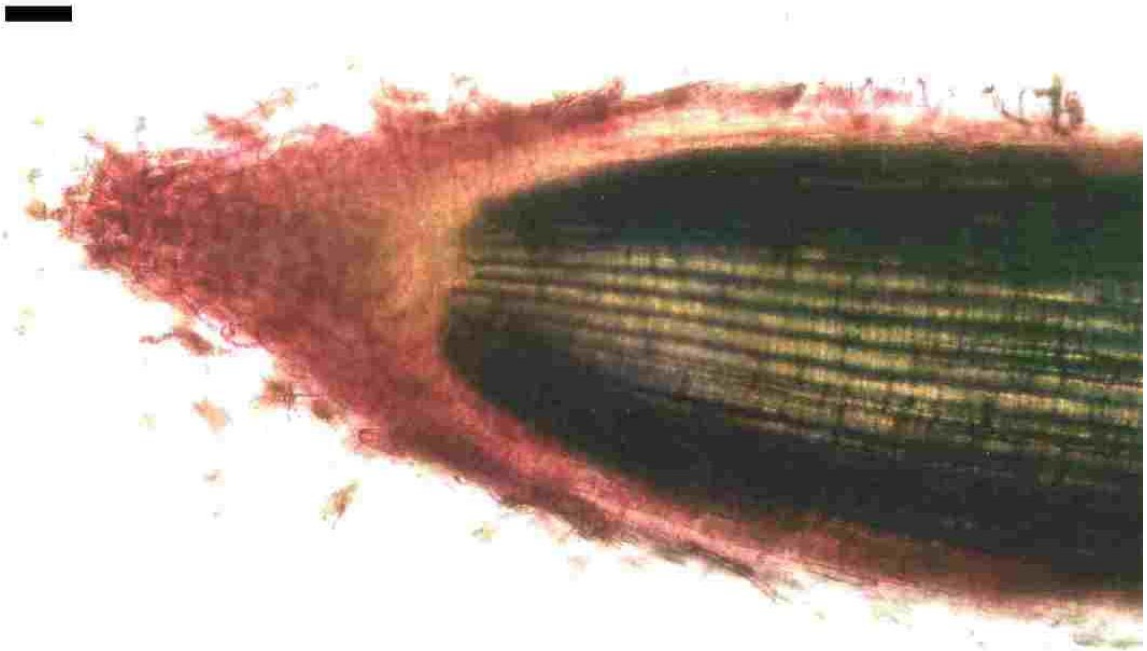


Abb. 18: Lichtmikroskopische Aufnahme eines longitudinalen Schnittes einer Maiswurzel. Färbung mit Ruthenium Rot, 10 x Vergrößerung, der Balken repräsentiert 0,15 mm.

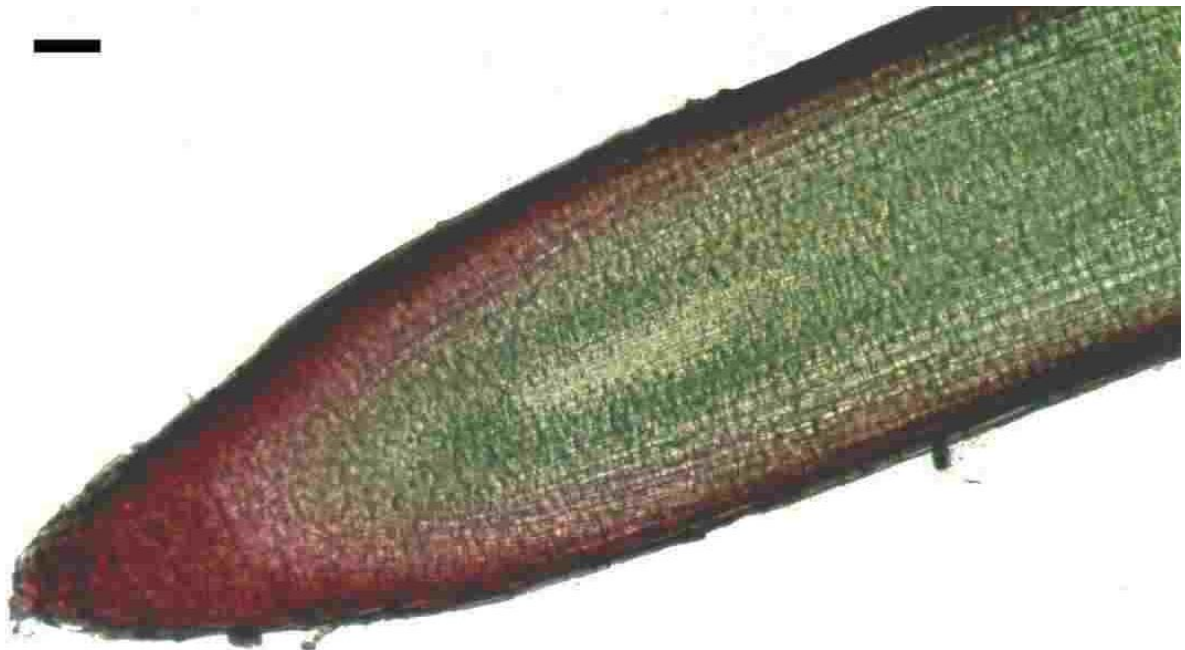


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahme eines longitudinalen Schnittes einer Ackerbohnenwurzel. Färbung mit Ruthenium Rot, 10 x Vergrößerung, der Balken repräsentiert 0,15 mm.

3.3.2 Verteilung von Pektin in Wurzeln von Mais und Ackerbohne - quantitative Bestimmung

Nicht nur die qualitative Verteilung von Pektin war unterschiedlich, sondern auch bei der Quantifizierung des Pektins zeigte sich ein steiler Gradient entlang der Wurzel, wobei der erste Millimeter der Wurzelspitze die höchsten Pektingehalte aufwies (Abb. 20). Sowohl bei Mais als auch bei Ackerbohne verringerte sich der Pektingehalt und stagnierte ab dem dritten Wurzelsegment (2-3 mm). Ackerbohne, eine dicotyle Pflanze, besaß, wie laut Carpita und Gibeaut (1993) zu erwarten, wesentlich höhere Pektingehalte auf als der monocotyle Mais.

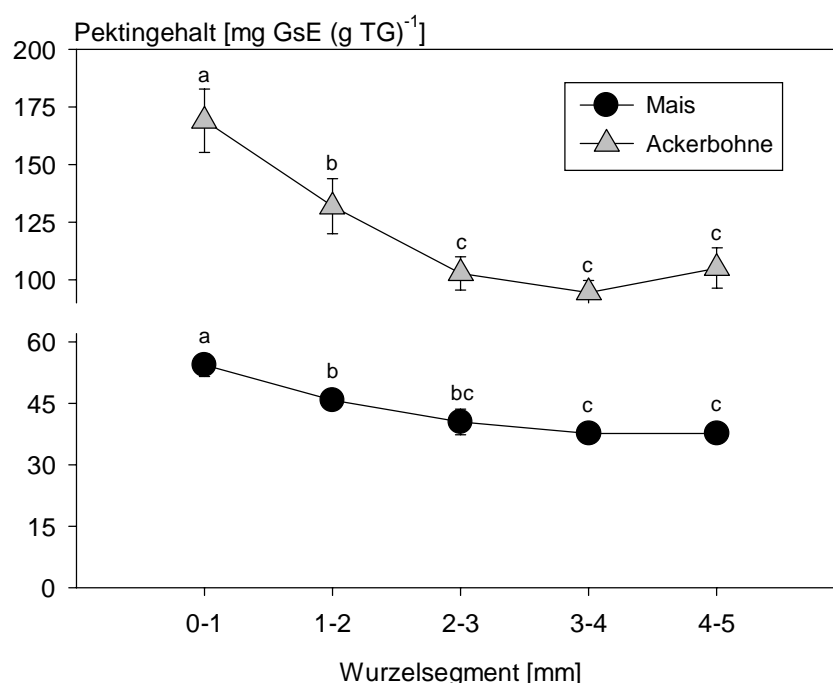


Abb. 20: Pektingehalte von einzelnen Wurzelsegmenten bei Mais und Ackerbohne. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Segment ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD von 12 Wiederholungen bestehend aus 15 einzelnen Millimetersegmenten.

3.3.2.1 Beziehung zwischen Pektingehalt und Parametern der Al-Toxizität in unterschiedlichen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne

Der Pektingehalt einzelner Wurzelsegmente von Mais und Ackerbohne stand in einer hochsignifikanten, positiven linearen Beziehung zum Al-Gehalt (Abb. 21A). Darüber hinaus kam es mit steigendem Al-Gehalt zu einer Steigerung der relativen Kalloseinduktion. Diese ebenfalls hochsignifikante lineare Beziehung ist in Abb. 21B dargestellt. Auch für die Beziehung zwischen Pektingehalt und relativer Kalloseinduktion wurde die Korrelation be-

rechnet, die mit einem Koeffizienten von $r^2 = 0,781^{***}$ ebenfalls hochsignifikant war (nicht dargestellt).

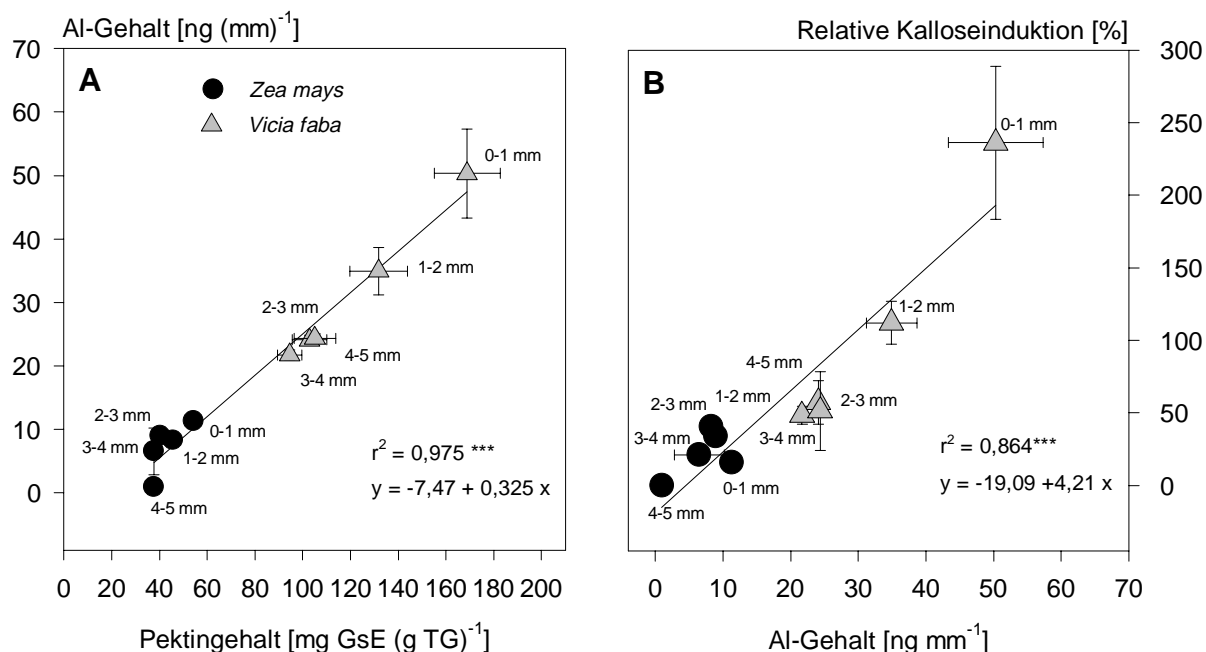


Abb. 21: Beziehung zwischen Pektin Gehalt und Al-Gehalt (A) und Al-Gehalt und relativer Kalloseinduktion (B) von einzelnen Wurzelsegmenten von Mais und Ackerbohne. Inkubation für 3 h in NL $\pm 50 \mu\text{M}$ Al oder $10 \mu\text{M}$ Digitonin bei pH 4,3. Mittelwerte \pm SD aus $n = 12$ (Pektin), $n = 7$ (Al), $n = 3$ (Kallose) bestehend aus 15 (Pektin), 10 (Al), 5 (Kallose) einzelnen Millimetersegmenten. *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

3.3.3 Einfluß von veränderten Pektingehalten bei Maiswurzeln auf Parameter der Al-Toxizität

Nachdem sich gezeigt hatte, daß der Pektin Gehalt eine wichtige Rolle für die Bindung von Al und für die Schädigung durch Al, gemessen anhand der relativen Kalloseinduktion, spielt, sollte im folgenden der Pektin Gehalt von Wurzeln verändert werden. Eine einfache Möglichkeit den Pektin Gehalt von Wurzeln zu verändern, stellte die kurzfristige (bis zu 30 min) Behandlung von Wurzeln mit Pectolyase dar. Dieses Enzym katalysiert die Depolymerisation des Pektins durch Spaltung der Glykosidbindung in der Polygalakturonankette (Rexova-Benkova und Markovic, 1976; Baldwin und Pressey, 1989) und reduziert auf diese Weise den Pektin Gehalt. Darüber hinaus haben Zhong und Läuchli (1988; 1993) gezeigt, daß Salzstreß bei Baumwolle zur Erhöhung der Pektin Gehalte bei Primärwurzeln von Baumwolle führte. Beide Verfahren wurden angewendet und die Ergebnisse sind im folgenden dargestellt.

3.3.3.1 Al-Gehalte von Maiswurzeln nach Behandlung mit Pectolyase

Nach der Behandlung der Wurzeln mit Pectolyase stellte sich der Ausgangpektingehalte nach wenigen, spätestens nach 5 Stunden wieder ein (nicht dargestellt), so daß keine längerfristigen Versuche wie sie im allgemeinen bei der Bestimmung des WLW (12 oder 24 h) benötigt werden, durchgeführt worden sind. Zur Vereinfachung des Systems wurde mit abgeschnittenen, 6 cm langen Wurzeln gearbeitet, von denen zur Bestimmung des Pektin- und Al-Gehalts nur der erste cm untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, daß es mit längerer Behandlung der Wurzel zu einer signifikanten Abnahme der Pektingehalte und nachfolgend zu sinkenden Al-Gehalten kam (Tab. 2).

Tab. 2 : Pektin- und Al-Gehalte in Wurzelspitzen (1 cm) nach unterschiedlich langer Behandlung mit Pectolyase. Behandlung der Wurzeln mit Pectolyase mit anschließender Inkubation in Nährlösung $\pm 50 \mu\text{M}$ Al für 3 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Behandlungsdauer ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 4$ (Pektin), $n = 3$ (Al).

	Behandlung mit Pectolyase [min]		
	0	15	30
Al-Gehalt [ng cm^{-1}]	82,11 \pm 4,85 a	56,32 \pm 3,22 b	39,63 \pm 6,16 c
Pektingehalt [mg GsE (g ZWM) $^{-1}$]	53,43 \pm 4,58 a	37,43 \pm 2,42 b	31,03 \pm 5,91 b

3.3.3.2 Auswirkung der Adaptation von Maispflanzen an Salzstreß auf die Al-Empfindlichkeit

Die Adaptation von Maispflanzen an Salzstreß (150 mM NaCl) führte zu einer Erhöhung des Pektingehalts. Um eine Beeinträchtigung der Pflanzen durch aufgenommenes NaCl zu vermeiden, wurden sie vor dem eigentlichen Versuch zur Bestimmung der Al-Toxizität zwei Tage ohne Salzstreß kultiviert. Der Pektingehalt in Wurzelspitzen (5 mm) von normalen Pflanzen betrug 53 mg und war bei den adaptierten Pflanzen nach zwei Tagen ohne Salzstreß auf 78 mg GsE (g ZWM) $^{-1}$ erhöht.

Obwohl sich der NaCl-Gehalt der Pflanzen nach 2 Tagen Kultur ohne Salzstreß normalisiert hatte (nicht dargestellt), war das Wurzellängenwachstum im Vergleich zu den normalen

Pflanzen (nicht adaptiert) signifikant geringer (Abb. 22A). Eine Erhöhung des Al-Angebots führte bei den normalen und adaptierten Pflanzen zu einer deutlichen Reduktion des WLW.

Um der unterschiedlichen Wüchsigkeit Rechnung zu tragen, wurde das relative WLW berechnet (Abb. 22B). Dabei zeigte sich, daß das Wurzellängenwachstum der adaptierten Pflanzen signifikant stärker reduziert war als das der normalen Pflanzen.

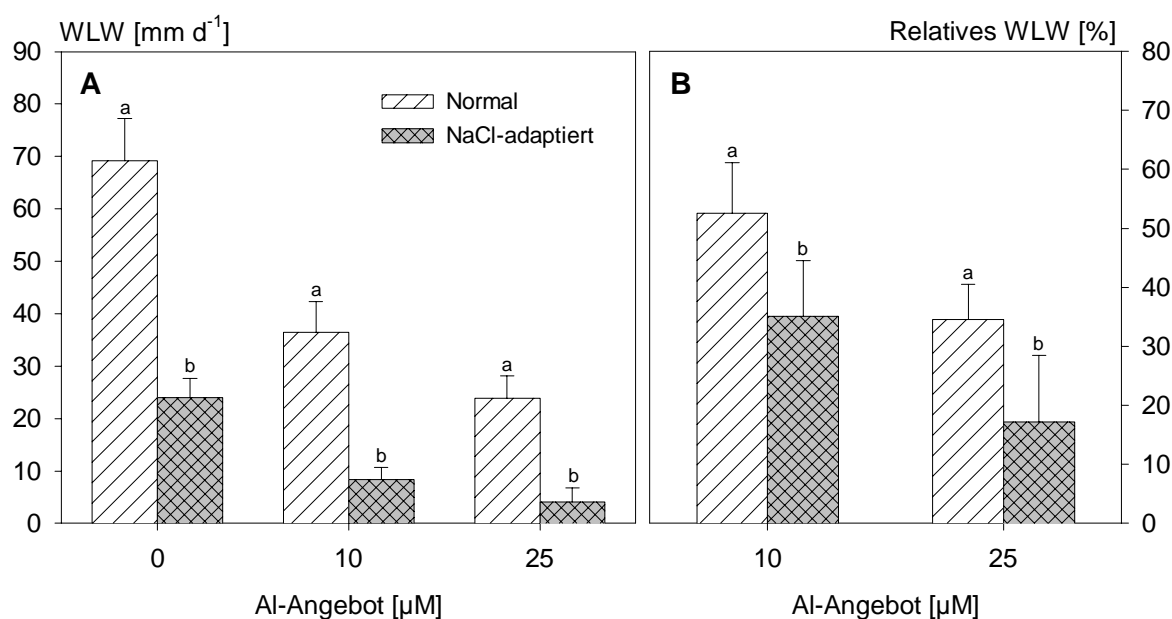


Abb. 22: Einfluß des Al-Angebots auf das Wurzellängenwachstum (A) und das relative Wurzellängenwachstum (B) bei normalen und NaCl-adaptierten Maispflanzen. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Adaptation ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 20$.

Bei der Kalloseinduktion als Maß für die Schädigung der Wurzeln durch Al zeigte sich ein ähnliches Bild, die adaptierten Pflanzen wiesen in beiden Al-Angeboten eine höhere Kalloseinduktion als die normalen Pflanzen auf. Dieser Unterschied war aufgrund der hohen Standardabweichung nur bei einem Al-Angebot von 10 μM signifikant (Abb. 23).

Die Adaptation der Pflanzen an Salzstreß führte außerdem in diesen Wurzelspitzen zu höheren Al-Gehalten als in Wurzelspitzen von normalen Pflanzen (Abb. 24A). Bei den adaptierten Pflanzen war nicht nur der Gesamtgehalt von Al in den Wurzelspitzen erhöht sondern auch der Gehalt an schwer-austauschbarem Al (Al-Gehalt nach Austausch mit Ba, Abb. 24B).

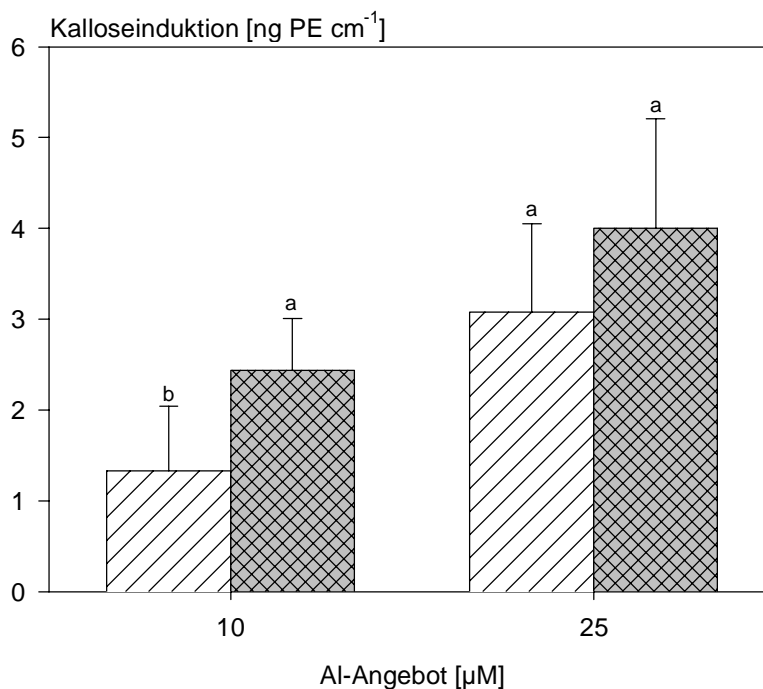


Abb. 23: Einfluß des Al-Angebots auf die Kalloseinduktion bei normalen und NaCl-adaptierten Maispflanzen. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Adaptation ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 6$.

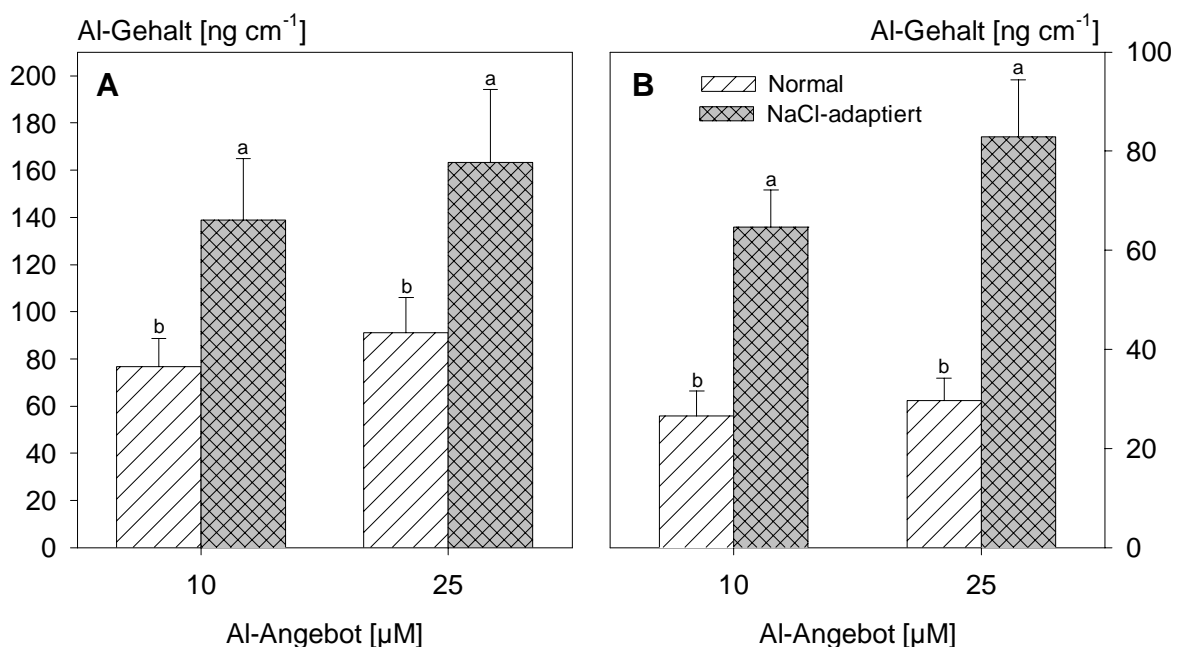


Abb. 24: Einfluß des Al-Angebots auf den Al-Gehalt vor (A) und nach (B) Austausch mit Ba bei normalen und NaCl-adaptierten Maispflanzen. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3, Austausch für 15 min mit 50 mM BaCl₂. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Adaptation ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit 7 Wiederholungen bestehend jeweils aus 2 Wurzelsegmenten (5 mm).

3.3.4 Veränderung des Pektingehalts durch Adaptation an NaCl und DCB bei Maissuspensionszellkulturen

Zellsuspensionskulturen sind für die Untersuchung von Al-Toxizität bereits mehrfach verwendet worden. Sie bieten den Vorteil, daß eine großen Anzahl von Zellen bzw. eine große Oberfläche dem Einfluß von Al gleichmäßig ausgesetzt werden kann.

Analog zu den Maispflanzen wurde mit Zellsuspensionskulturen von Mais eine Veränderung des Pektingehalts über Adaptation an Salzstreß (200 mM NaCl) durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, daß dies zur Veränderung der Zellwandzusammensetzung, u.a. zu einer Erhöhung des Pektingehalts, führt (Iraki et al., 1989; Zhong und Läuchli, 1993). Eine weitere Erhöhung des Pektingehalts kann über die Anpassung der Zellkultur an 2,6-Dichlorbenzotrinitril (DCB) erreicht werden (Shedletzky et al., 1990; 1992).

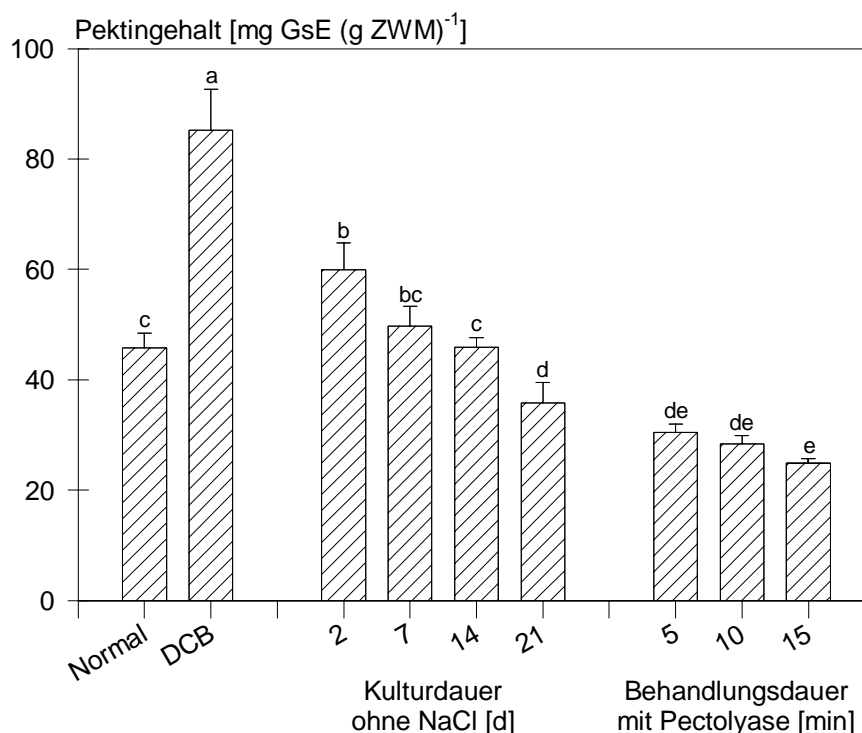


Abb. 25: Pektingehalte von Zellsuspensionskulturen von Mais nach langfristiger Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μ M) und kurzfristiger Behandlung mit Pectolyase. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 4$.

Die Adaptation der Zellen an DCB führte zu einem starken Anstieg (86%) des Pektingehalts im Vergleich zu den normalen (unadaptierten) Zellen (Abb. 25). Ein Anstieg des Pektingehalts um 31% war nach der Adaptation an NaCl zu beobachten. Die NaCl-adaptierten Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen in Abwesenheit von NaCl weiter kultiviert, was den Pektingehalt reduzierte. Nach 14 Tagen war der Pektingehalt ähnlich wie

bei normalen Zellen, nach 21 Tagen lag er sogar darunter. Die Behandlung von Zellen mit Pectolyase führte bereits nach 5 min zu einer deutlichen Reduktion des Pektingehalts auf 46%. Eine längere (10 und 15 min) Enzymbehandlung verringerte den Pektingehalt nur noch wenig.

Um Interaktionen zwischen NaCl und Al in den Zellkulturen zu verhindern (siehe auch 3.3.3.2) wurde bei den NaCl-adaptierten Zellen das Kulturmedium mehrfach täglich ausgetauscht. Nach 2 Tagen hatte sich der Salzgehalt der NaCl-adaptierten Zellen normalisiert (nicht dargestellt) und sie wurden in Versuchen zur Al-Toxizität eingesetzt.

Die Adaptation an NaCl und DCB hatte außerdem Auswirkungen auf das Wachstum der Zellkulturen (Abb. 26). Das Frischgewicht nahm bei den NaCl-adaptierten wesentlich langsamer zu als bei den normalen und bei den DCB-adaptierten Zellen. Eine Stagnation des Wachstums trat bei den normalen Zellen nach 15 Tagen ein, während das Wachstum bei DCB- und NaCl-adaptierten Zellen länger anhielt (23 d bzw. 30 d). In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß hauptsächlich Zellen aus der linearen Wachstumsphase empfindlich auf Al reagierten (nicht dargestellt), deshalb wurden für die eigentlichen Versuche Zellen nach 5, 16 bzw. 11 Tagen (normale, NaCl- bzw. DCB-adaptierte Zellen) Kultur eingesetzt.

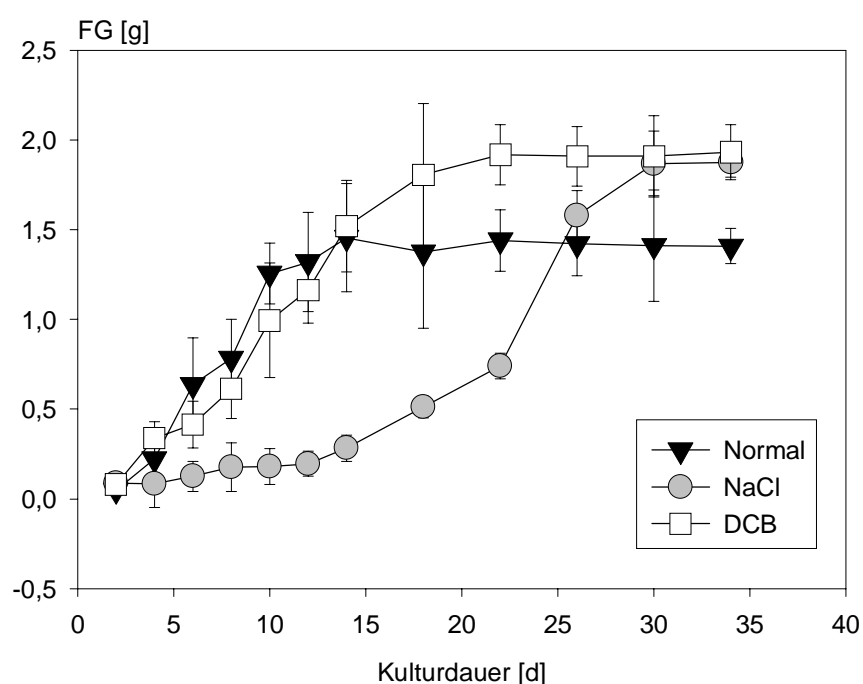


Abb. 26: Wachstum von Zellsuspensionskulturen von Mais nach Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μ M). Mittelwerte \pm SD mit n = 6.

3.3.5 Einfluß von veränderten Pektingehalten bei Suspensionszellkulturen von Mais auf Parameter der Al-Toxizität

3.3.5.1 Einfluß des Pektingehalts auf die Kalloseinduktion

Ein steigendes Al-Angebot führte in allen Zellen zu steigender Kalloseinduktion (Abb. 27). Allerdings war der Gehalt an Kallose, der von einer bestimmten Al-Konzentration induziert wurde, zwischen verschiedenen behandelten Zellen sehr unterschiedlich. Die niedrigste Kalloseinduktion trat bei NaCl-adaptierten Zellen auf, die anschließend für 2 bzw. 7 Tage ohne NaCl subkultiviert wurden. Zellen, die für längere Zeit ohne NaCl subkultiviert wurden, zeigten eine ähnliche Kalloseinduktion wie normale Zellen. Bei Vorbehandlung der Zellen mit Pectolyase verringerte sich die Kalloseinduktion mit der Verlängerung der Enzymbehandlung.

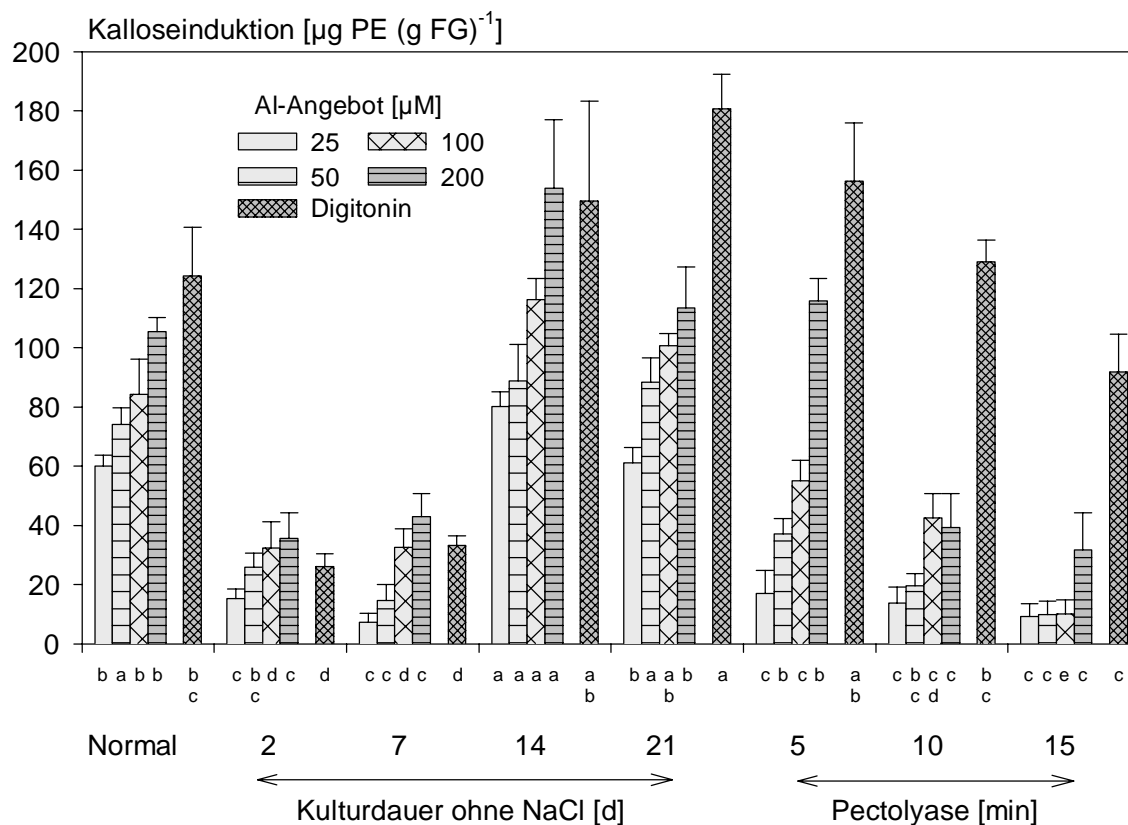


Abb. 27: Einfluß von Al-Angebot und Digitoninbehandlung auf die Kalloseinduktion bei Zellsuspensionskulturen von Mais mit unterschiedlichem Pektingehalt. Inkubation mit verschiedenen Al-Konzentrationen oder Digitonin ($20 \mu\text{M}$) für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$.

Wie bereits in 3.1.1 für intakte Pflanzen beschrieben, wurde die Fähigkeit der verschiedenen Zelltypen, Kallose zu bilden, mit Hilfe von Digitonin untersucht. Die Digitonin-induzierte Kallosebildung (Abb. 27) war in den NaCl-adaptierten Zellen wesentlich geringer als bei den normalen Zellen. Eine Subkultivierung der Zellen ohne NaCl führte dazu, daß sich die Fähigkeit der Zellen zur Kallosebildung wieder den Normalzustand erreichte und nach 14 d sogar das Niveau der normalen Zellen übertraf. Längere Behandlung der Zellen mit Pectolyase reduzierte die Digitonin-induzierte Kallosebildung im Vergleich zu den normalen Zellen, während die DCB-adaptierten Zellen ihre Fähigkeit, Kallose zu bilden, unabhängig vom Elicitor (AI oder Digitonin) verloren (nicht dargestellt).

Um der unterschiedlichen Fähigkeit der einzelnen Zelltypen, Kallose zu bilden, Rechnung zu tragen, wurde die relative Kalloseinduktion (Digitonin = 100 %) berechnet (Abb. 28).

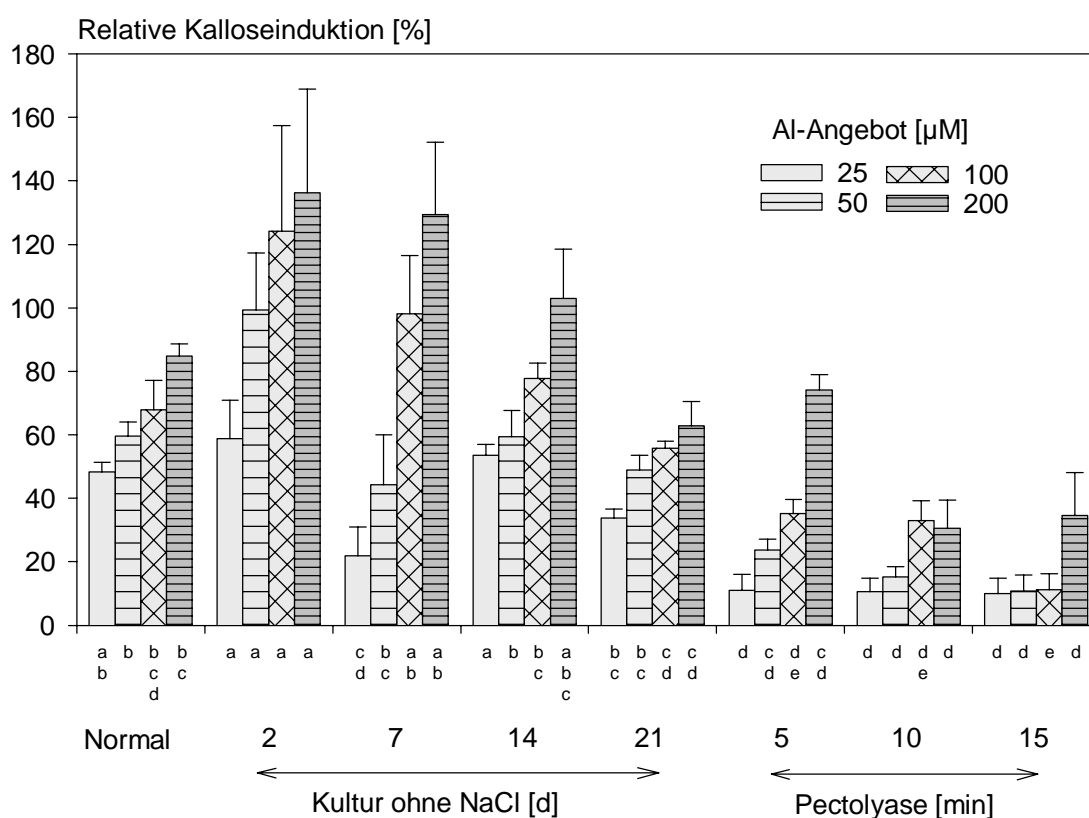


Abb. 28: Einfluß des AI-Angebots auf die relative Kalloseinduktion bei Zellsuspensionskulturen von Mais mit unterschiedlichem Pektingehalt. Inkubation mit verschiedenen AI-Konzentrationen oder Digitonin (20 µM) für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 3$.

Durch diese Darstellung änderte sich die grundsätzliche Reaktion der Zelltypen auf AI nicht. Mit Erhöhung des AI-Angebot kam es zu einer Steigerung der relativen Kalloseinduktion. Bei einem Vergleich der einzelnen Zelltypen fällt jedoch auf, daß die relative Kalloseinduktion bei den NaCl-adaptierten Zellen am höchsten war. Diese Erhöhung verschwand nach weiterer

Subkultivierung ohne NaCl. Die Behandlung der Zellen mit Pectolyase verringerte mit zunehmender Behandlungsdauer die relative Kalloseinduktion.

3.3.5.2 Einfluß des Pektingehalts auf die Al-Gehalte

DCB-adaptierte Zellen wiesen die höchsten Al-Gehalte von allen untersuchten Zelltypen auf (Abb. 29). Hohe Al-Gehalte fanden sich aber auch bei den NaCl-adaptierten Zellen. Verlängerte Subkultivierung der NaCl-adaptierten Zellen ohne Salzstreß führte zu einer Reduktion der Al-Gehalte. Nach 14 d ohne Salzstreß waren die Al-Gehalte auf dem gleichen Niveau wie bei normalen Zellen. Behandlung der Zellen mit Pectolyase verringerte die Al-Gehalte unabhängig von der Behandlungsdauer mit dem Enzym. Nicht nur die absoluten Al-Gehalte waren vom Zelltyp beeinflusst, sondern auch die Konzentration, bei der die Sättigung mit Al auftrat. In normalen und Pectolyase-behandelten Zellen reagierten die Al-Gehalte nicht auf eine Steigerung des Al-Angebots über 50 μM hinaus. Bei den DCB- und NaCl-adaptierten Zellen führte eine Steigerung des Al-Angebots bis zu 200 μM zu einer Erhöhung der Al-Gehalte.

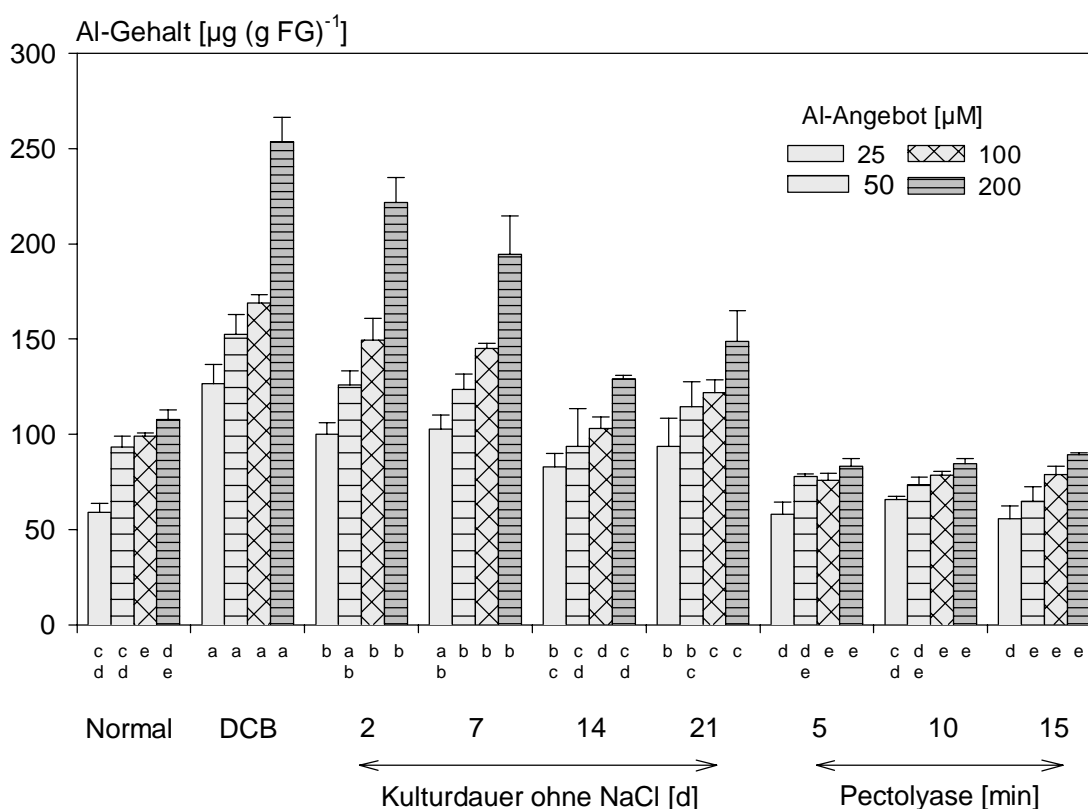


Abb. 29: Einfluß des Al-Angebots auf die Al-Gehalte bei Zellsuspensionskulturen von Mais mit unterschiedlichem Pektingehalt. Inkubation mit verschiedenen Al-Konzentrationen für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$.

3.3.5.3 Beziehung zwischen Pektingehalt und Parametern der Al-Toxizität

Zwischen dem Pektingehalt und dem Al-Gehalt vor (Gesamt-Al, Abb. 30A) und nach (schwer-austauschbares Al, Abb. 30B) dem Austausch mit Ba bestand eine hochsignifikante Beziehung. Das heißt, mit steigendem Pektingehalt wurde mehr Al und dieses auch fester gebunden.

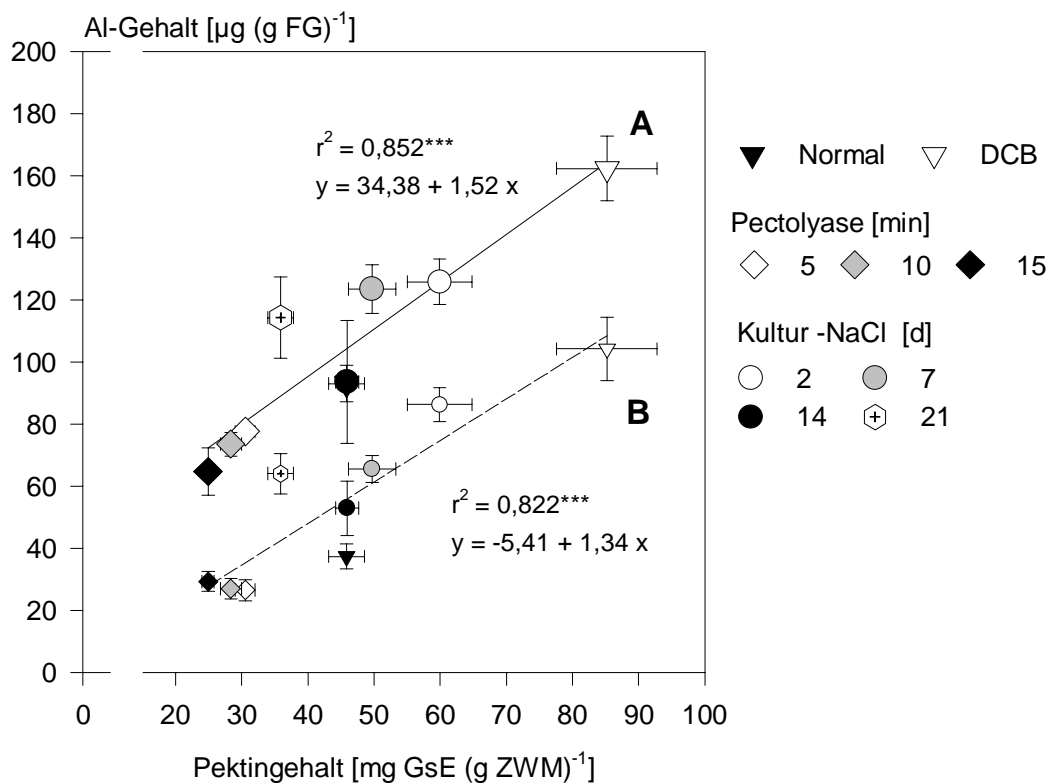


Abb. 30: Beziehung zwischen dem Pektingehalt und dem Al-Gehalt vor (A) oder nach (B) Austausch mit Ba von Zellsuspensionskulturen von Mais mit unterschiedlichem Pektingehalt. Inkubation mit $50 \mu\text{M Al}$ für 2 h bei pH 4,3 und Austausch mit 50 mM BaCl_2 für 15 min. Mittelwerte $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$. *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

Der Gesamtgehalt an Al korrelierte hochsignifikant, positiv mit der relativen Kalloseinduktion (Abb. 31), d.h. mit steigenden Al-Gehalten wurden die Zellen zunehmend geschädigt.

Auch zwischen Pektingehalt und relativer Kalloseinduktion bestand eine mit $r^2 = 0,862$ hochsignifikante, positive Beziehung (nicht dargestellt).

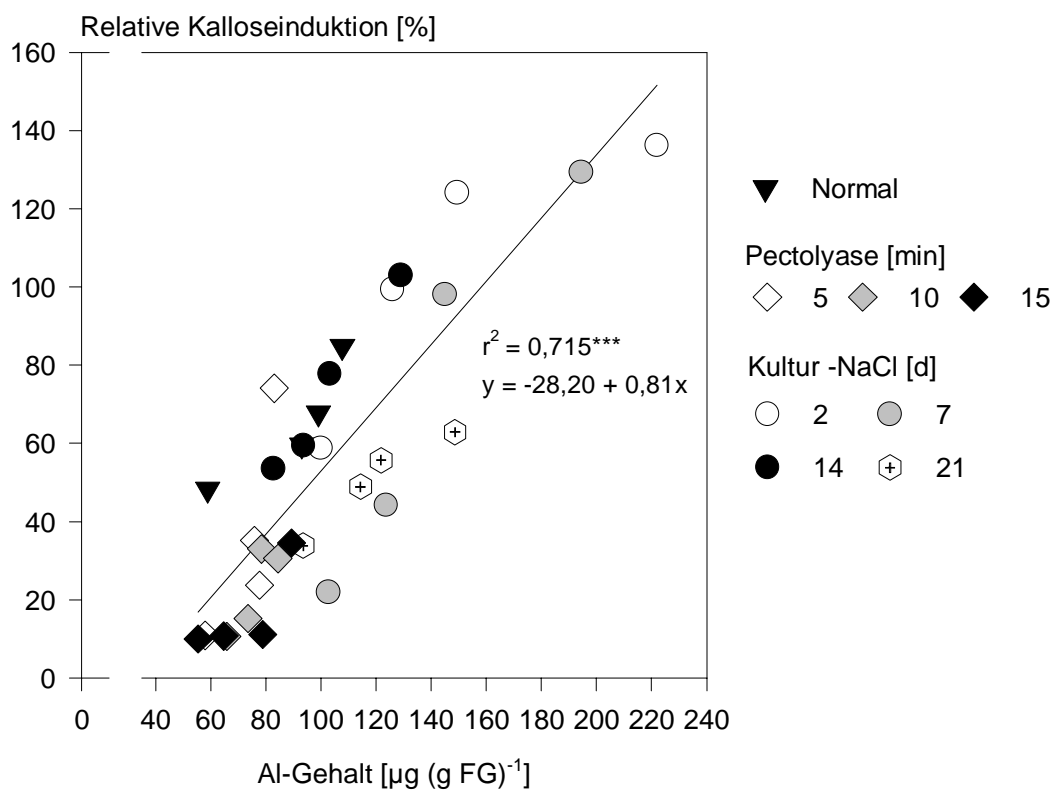


Abb. 31: Beziehung zwischen dem Al-Gehalt und der relativen Kalloseinduktion von Zellsuspensionskulturen mit unterschiedlichem Pektingehalt. Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ Al für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte \pm SD mit $n = 3$. *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

3.4 Bedeutung des Methylierungsgrads von Pektin für die Al-Toxizität

3.4.1 Al-Gehalte von Maiswurzeln nach Behandlung mit PME

Pektinmethylesterase ist ein Enzym, das die Hydrolyse von Methylestern im Pektin katalysiert und dabei freie Carboxylgruppen im Pektin schafft (Rexova-Benkova und Markovic, 1976; Bordendave, 1996). Analog zu dem unter 3.3.3.1 beschriebenen Versuch wurden abgeschnittene Maiswurzelspitzen (6 cm) kurzfristig (bis zu 30 min) mit PME behandelt, anschließend wurden sie in Nährlösung \pm Al inkubiert. Dabei stellte sich heraus, daß es mit längerer Behandlung der Wurzel, und somit der Zunahme von freien Carboxylgruppen im Pektin, zu signifikant steigenden Al-Gehalten kam (Tab. 3).

Tab. 3 : Al-Gehalte in Maiswurzelspitzen (1 cm) nach unterschiedlich langer Behandlung mit PME. Behandlung der Wurzeln mit PME mit anschließender Inkubation in Nährlösung \pm 50 μ M Al für 3 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Behandlungsdauer ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 3$.

	Behandlung mit Pektinmethylesterase [min]		
	0	15	30
Al-Gehalt [ng cm^{-1}]	82,11 \pm 4,85 b	100,66 \pm 17,52 ab	133,86 \pm 15,77 a

3.4.2 Einfluß von Al auf Parameter der Al-Toxizität bei transgenen Kartoffelgenotypen mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME

Die verwendeten transgenen Kartoffelpflanzen wurden vom MPI, Golm zur Verfügung gestellt (siehe auch 3.1.2).

In Abwesenheit von Al zeigten die überexprimierenden Linien (PetBin) beinahe keine Unterschiede im WLW im Vergleich zum Wildtyp (WT) (Abb. 32). Das Wurzelwachstum der Antisense-Linien (PPBin) hingegen war im Vergleich zum WT eingeschränkt, eine Ausnahme stellte dabei PPBin 20 dar, die ein ähnlich gutes Wachstum wie der WT aufwies.

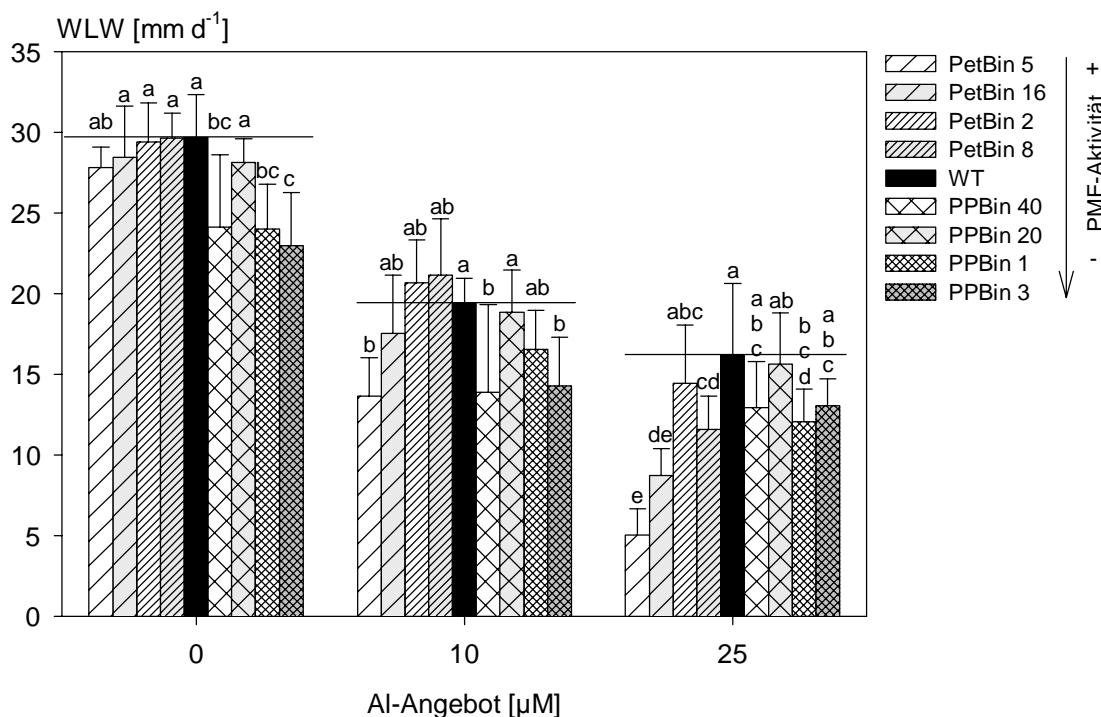


Abb. 32: Einfluß des Al-Angebots auf das Wurzellängenwachstum bei 9 transgenen Linien von Kartoffel mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Linie ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 10$.

Mit steigendem Al-Angebot kam es zu einer Verringerung des WLW bei allen untersuchten Linien. Aufgrund der unterschiedlichen Wüchsigkeit der Genotypen ließ sich anhand des reinen WLW in Anwesenheit von Al keine genaue Aussage über die Al-Empfindlichkeit der einzelnen Linien machen. Aus diesem Grund wurde das relative WLW berechnet und in Abb. 33 dargestellt. Bei einem Al-Angebot von 10 µM zeigte allein der Genotyp PetBin 5, der die stärkste Überexpression von PME aufwies, eine im Vergleich zu allen anderen Linien signifikant stärkere Hemmung des WLW. Insgesamt zeigte sich jedoch die Tendenz, daß die überexprimierenden Pflanzen eher von einer Reduktion des WLW betroffen waren als der WT oder die Antisense-Linien. Bei der Erhöhung des Al-Angebots auf 25 µM wurden diese Unterschiede zwischen den Linien verstärkt. PetBin 5 wies dabei die größte Einschränkung des WLW auf, aber auch PetBin 16 und PetBin 8 waren signifikant stärker durch Al im Wachstum gehemmt als der WT oder die Antisense-Linien. Mit Ausnahme von PetBin 2 zeigte sich außerdem, daß es mit steigendem Grad der Überexpression von PME zu einer stärkeren Al-induzierten Hemmung des WLW kam. Bei den Antisense-Linien gab es auch bei einem Al-Angebot von 25 µM keine signifikanten Unterschiede zum WT. PPBin 3, die Linie mit dem niedrigsten Expressionsgrad an PME, war aber tendenziell weniger stark im WLW eingeschränkt als der WT.

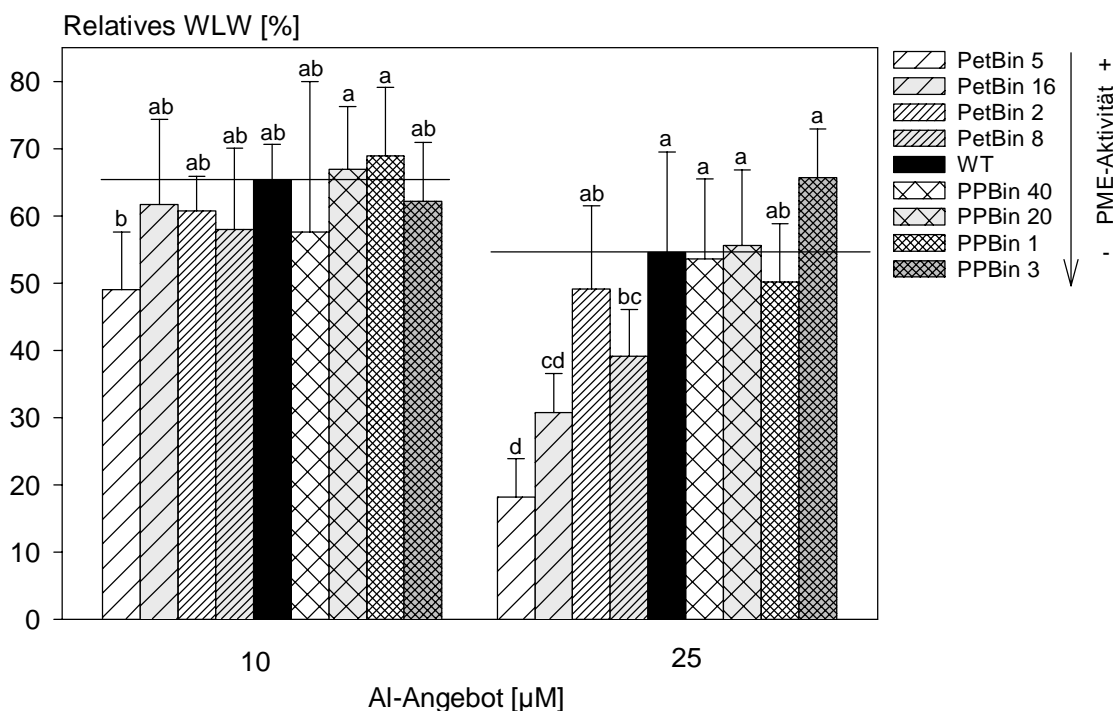


Abb. 33: Einfluß des Al-Angebots auf das relative Wurzellängenwachstum bei 9 transgenen Linien von Kartoffel mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Linie ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 10$.

Mit einer Steigerung des Al-Angebots kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Kalloseinduktion (Abb. 34). Bei 10 μM Al gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Linien, mit Ausnahme von PPBin 40, die eine signifikant geringere Kallosebildung als PetBin 16 zeigte. Insgesamt läßt sich jedoch die Tendenz erkennen, daß es mit Verringerung der PME-Expression zu einer Abnahme der Al-induzierten Kallosebildung kam. Die Erhöhung des Al-Angebots auf 25 μM hatte zur Folge, daß sich die genotypischen Unterschiede zwischen den Linien, aber auch der Zusammenhang zwischen geringerer Expression von PME und geringer Kalloseinduktion durch Al stärker ausprägten. PetBin 5 zeigte die signifikant höchste Kalloseinduktion, während PPBin 20 und PPBin 1 die geringste Induktion aufwiesen.

Mit Steigerung des Al-Angebots kam es zur Erhöhung der Al-Gehalte in den Wurzelspitzen aller untersuchten Linien (Abb. 35). In beiden Angebotsstufen zeigte sich der Trend, daß die PME-überexprimierenden Linien höhere Al-Gehalte aufwiesen als der WT. Die verringerte Expression von PME in den Antisense-Linien führte im Vergleich zum WT kaum zu einer Änderung des Al-Gehalts.

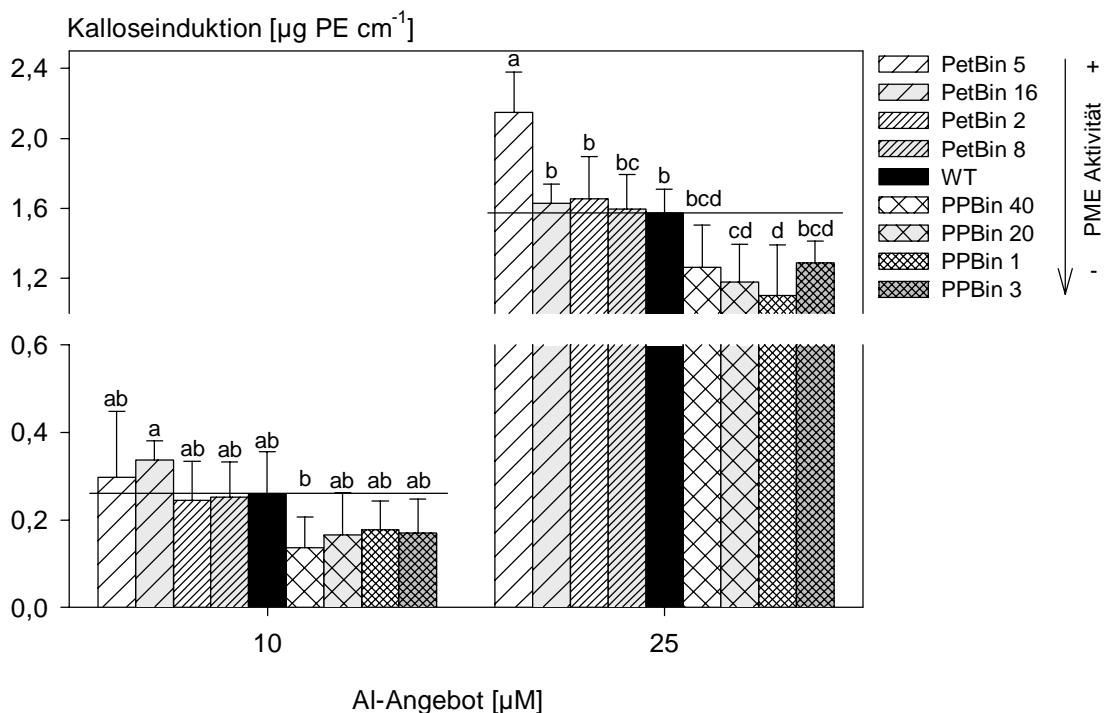


Abb. 34: Einfluß des Al-Angebots auf die Kalloseinduktion in Wurzelspitzen (1 cm) von 9 transgenen Linien von Kartoffel mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Linie ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 5$.

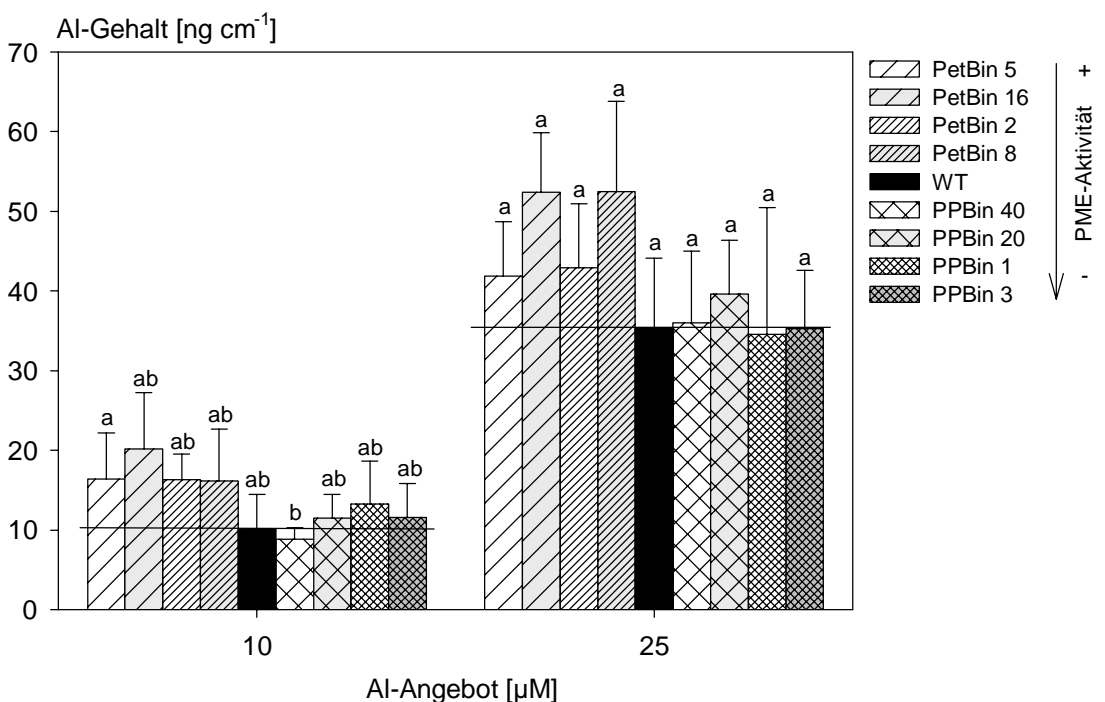


Abb. 35: Einfluß des Al-Angebots auf die Al-Gehalte in Wurzelspitzen (1 cm) von 9 transgenen Linien von Kartoffel mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf die Linie ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 5$.

Es bestand eine hochsignifikante, negative Beziehung zwischen dem Al-Gehalt der Wurzelspitzen und dem relativen Wurzellängenwachstum (Abb. 36A). Außerdem ließ sich eine signifikant, positive Beziehung zwischen Al-Gehalt und Kallosebildung in der Wurzelspitze herstellen (Abb. 36B). Ebenso zeigte sich eine negative Beziehung zwischen relativem WLW und der Kalloseinduktion, die mit $r^2 = 0,65$ eine geringere Bestimmtheit aufwies als die beiden Beziehungen in Abb. 36.

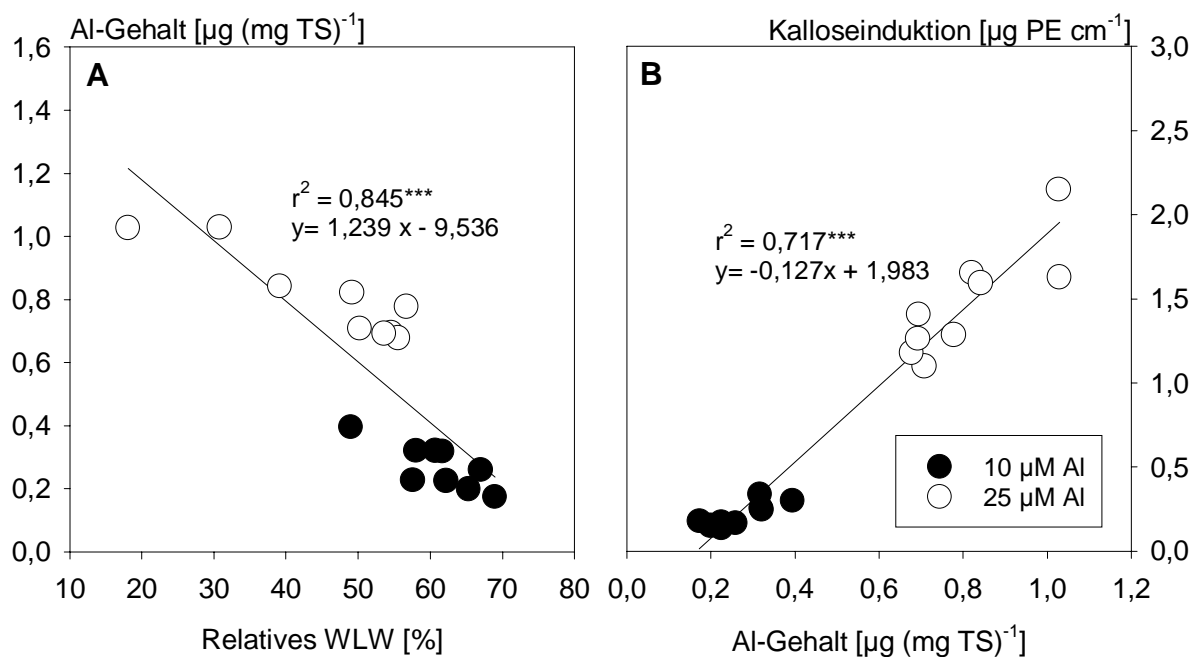


Abb. 36: Beziehung zwischen relativem Wurzellängenwachstum und Al-Gehalt (A) bzw. zwischen Al-Gehalt und relativer Kalloseinduktion (B) von 9 transgenen Linien von Kartoffel mit unterschiedlichem Expressionsgrad von PME. Inkubation für 24 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte aus $n = 10$ (WLW), $n = 5$ (Al, Kallose), *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

3.4.3 Einfluß von Al auf die Aktivität von PME in Wurzeln von Ackerbohne und verschiedenen Kartoffelgenotypen

Die Aktivität von Pektinmethylesterase (PME) wurde *in vitro* nicht von Al-Konzentrationen im Bereich von 10-200 μM beeinflusst (nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu konnte eine Veränderung der PME-Aktivität in Wurzelhomogenaten beobachtet werden. Bei der Gewinnung von PME wurden Wurzeln zuerst mit Natriumphosphat-Puffer homogenisiert und extrahiert (lösliche Enzymfraktion). Der verbleibende Rest aus Pflanzenmaterial wurde mit 1 M NaCl erneut extrahiert (ionische Enzymfraktion). Es erfolgte keine Aufreinigung der Enzymproben, so daß im folgenden zwar von Aktivitäten gesprochen wird, sich aber keine Aussage darüber machen läßt, ob sich tatsächlich die Aktivität im Sinne der Geschwindigkeit des Substrat-

umsatzes oder aber die Enzymmenge im untersuchten Material verändert hat. Da Al die Proteingehalte der Wurzeln beeinflussen kann, wurde auch darauf verzichtet, die Aktivitäten auf die Proteinmenge der Probe zu beziehen. Dies wurde zwar berechnet, führte jedoch zu einer deutlichen Erhöhung der Standardabweichung und erschien auch im Hinblick auf die unbekannte Proteinzusammensetzung problematisch.

Es stellte sich heraus, daß die lösliche PME-Fraktion geringere Enzymaktivität aufwies als die ionische Fraktion. Dies ist am Beispiel von Ackerbohne in Abb. 37 dargestellt.

Das Al-Angebot hatte keinen Einfluß auf die PME-Aktivität in der löslichen Fraktion, führte aber bei der ionischen Fraktion zu einem Anstieg der Aktivität. Eine Steigerung der Al-Konzentrationen über 10 μM hinaus hatte keinen weiteren Einfluß auf die Enzymaktivität.

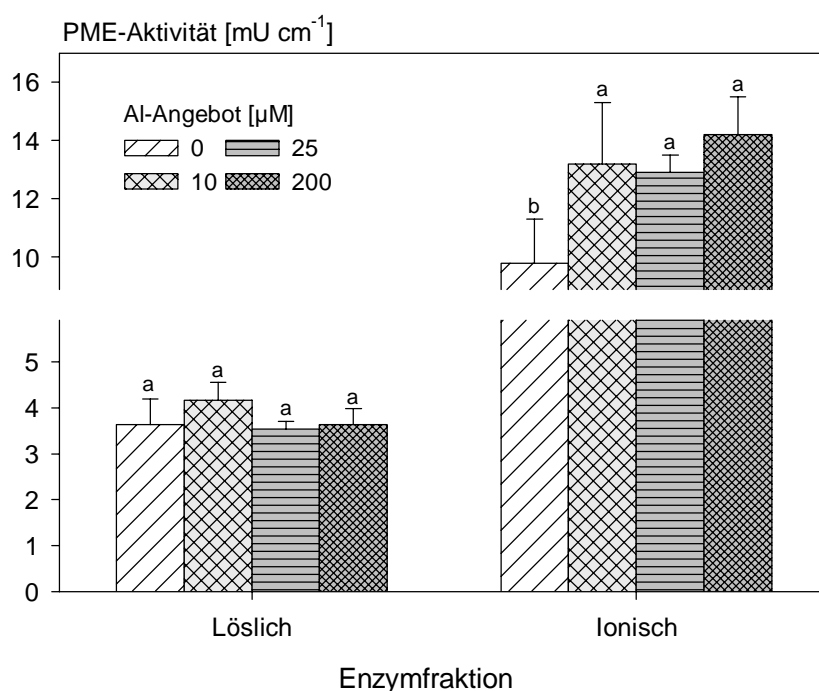


Abb. 37: Einfluß von Al auf die PME-Aktivität in der löslichen und der ionischen Enzymfraktion von Ackerbohnenwurzelspitzen (1 cm). Inkubation für 2 h in NL mit verschiedenen Al-Konzentrationen bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 4$ bestehend aus jeweils 3 cm Wurzelmaterial.

Während bei Mais keine PME-Aktivität bestimmt werden konnte, zeigte sich bei Kartoffel ebenfalls, daß sich Al nur auf die Aktivität der ionischen PME-Fraktion auswirkte. Im Gegensatz zu Ackerbohne wurde hier eine deutliche Steigerung durch 50 μM Al erreicht (nicht dargestellt).

Am Beispiel von Kartoffel wurde nun der Einfluß von Al auf die PME-Aktivität anhand der ionischen Fraktion von zwei verschiedenen Wurzelsegmenten weiter untersucht. Dabei wurde der Pool aus zwei transgenen Linien (Transformante, Transf.) wie bereits in 3.1.2 beschrieben zusammen mit dem Wildtyp (WT) und den Genotypen Adelheid (ADH) und Red McClure (RMC) getestet.

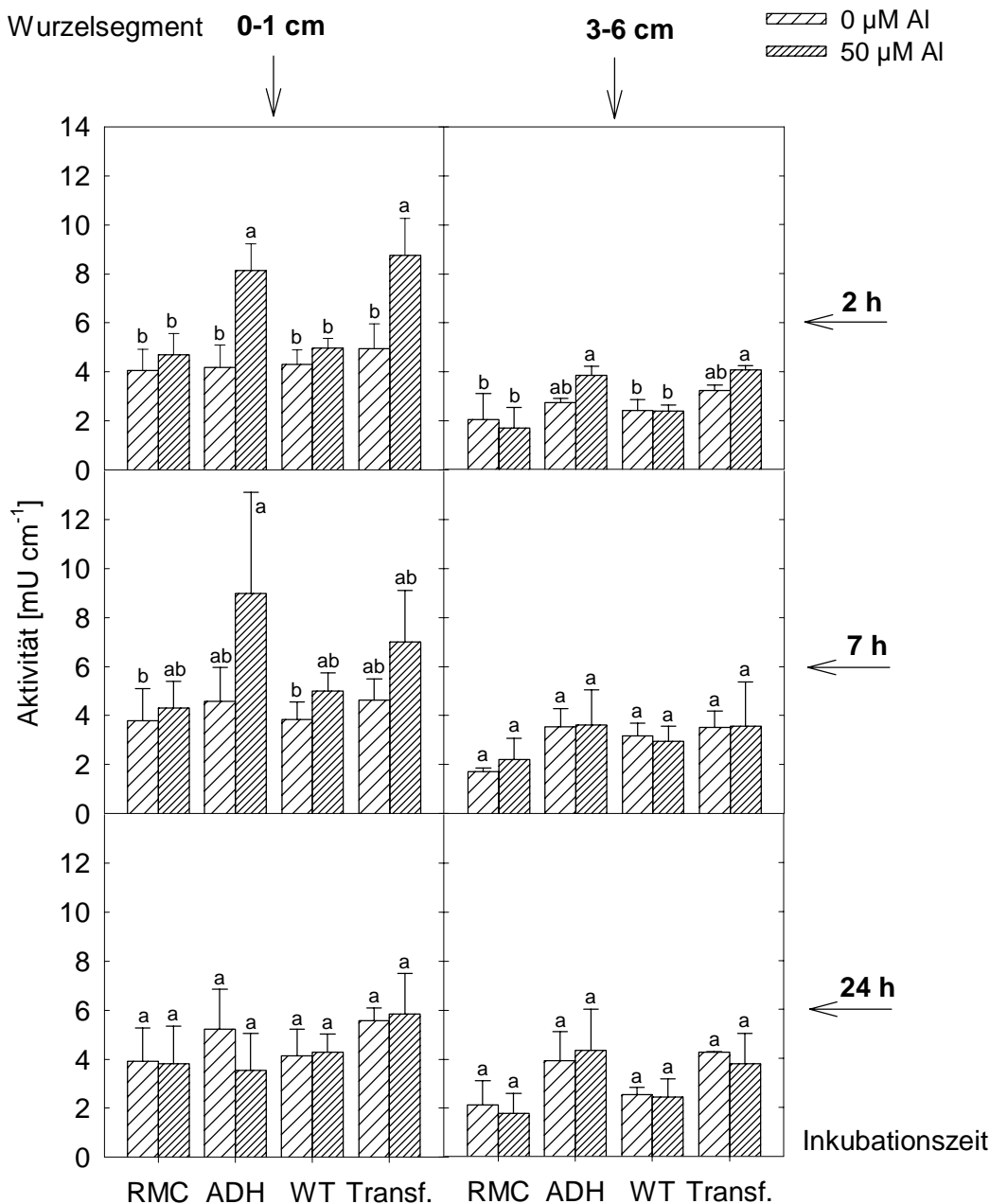


Abb. 38: Einfluß von Al auf die PME-Aktivität in verschiedenen Wurzelsegmenten von 4 Kartoffelgenotypen. Inkubation für 2; 7; 24 h in NL ±50 µM Al bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 3$ bestehend aus jeweils 3 cm Wurzelmaterial.

Es stellte sich heraus, daß die Transformante in allen Wurzelsegmenten und zu jedem untersuchten Zeitpunkt in Abwesenheit von Al die höchste PME-Aktivität aufwies (Abb. 38). Grundsätzlich war die PME-Aktivität in Wurzelspitzen (0-1 cm) höher als in basaleren Wurzelbereich (3-6 cm). Kurzfristiges Al-Angebot für 2 aber auch für 7 h erhöhte die PME-Aktivität vor allem in den Wurzelspitzen der Transformante und dem Al-sensitiven Genotyp ADH, und nur in sehr geringem Maße beim Wildtyp und dem Al-resistenten Genotyp RMC. Nach 24 h Inkubation der Pflanzen mit Al verschwanden die Unterschiede sowohl zwischen den Genotypen als auch den Behandlungen.

3.4.4 Behandlung von Maiszellsuspensionskulturen mit PME

3.4.4.1 Einfluß von PME auf Parameter der Al-Toxizität

Normale (nicht-adaptierte) und NaCl-adaptierte Zellkulturen wurden für 5 oder 10 min mit PME behandelt und anschließend mit unterschiedlichen Al-Konzentrationen oder 20 μM Digitonin inkubiert. Mit steigenden Al-Konzentrationen kam es zu steigender Kalloseinduktion (Abb. 39).

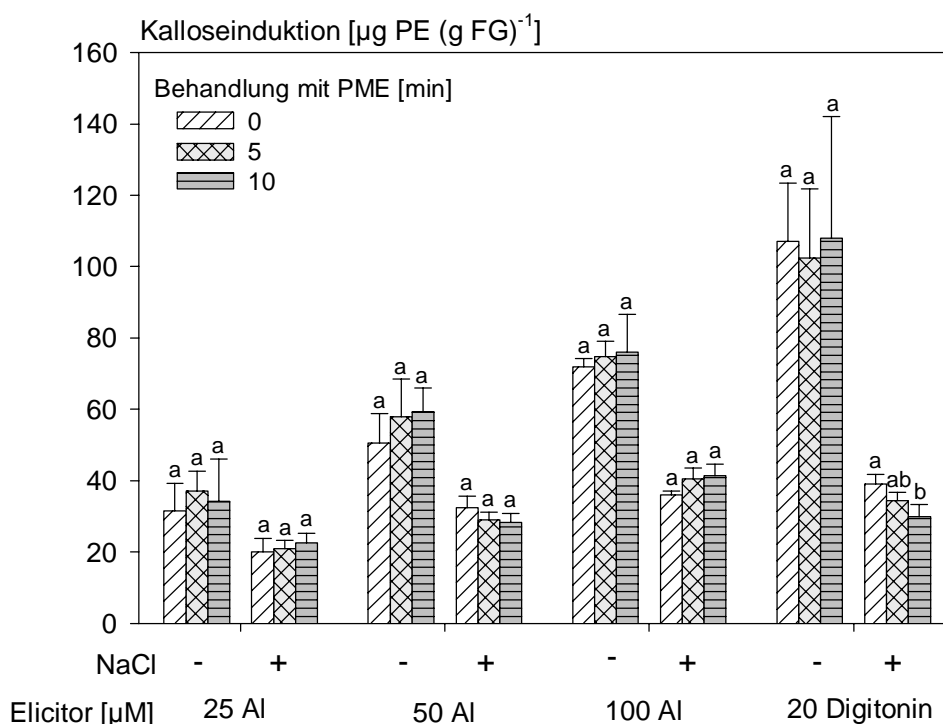


Abb. 39: Einfluß von Al-Angebot und Digitoninbehandlung auf die Kalloseinduktion bei normalen und NaCl-adaptierten Zellsuspensionskulturen von Mais nach Behandlung mit PME. Behandlung mit PME für 0; 5; 10 min, Inkubation mit verschiedenen Al-Konzentrationen oder Digitonin (20 μM) für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$.

NaCl-adaptierte Zellen bildeten weniger Kallose nach Al-Behandlung als die normalen Zellen. Bei den normalen Zellen stellte Digitonin einen effektiveren Elicitor der Kallosebildung dar, während 50-100 μM Al bei den NaCl-adaptierten Zellen Kallose in ähnlicher Größenordnung induzierte. Die Behandlung der Zellen mit PME hatte keinen signifikanten Effekt auf die Al-induzierte Kallosebildung der Zellen, nur die Digitonin-induzierte Kallosebildung wurde bei den NaCl-adaptierten Zellen durch die PME-Behandlung vermindert.

Um die unterschiedliche Fähigkeit der Zellen, Kallose zu bilden, zu berücksichtigen, wurde die relative Kalloseinduktion (Digitonin = 100%) berechnet (Abb. 40). Auch mit diesem Parameter wurde deutlich, daß eine Steigerung des Al-Angebots zu einer Erhöhung der relativen Kalloseinduktion sowohl in normalen als auch NaCl-adaptierten Zellen führte. Im Gegensatz zur absoluten Kalloseinduktion (Abb. 39) war die relative Kalloseinduktion bei den NaCl-adaptierten Zellen höher. Nach längerer Behandlungsdauer der NaCl-adaptierten Zellen mit PME kam es aufgrund der Abnahme der Digitonin-induzierten Kallosebildung zur Verstärkung der relativen Kalloseinduktion. Dieser Effekt konnte bei den normalen Zellen nicht beobachtet werden.

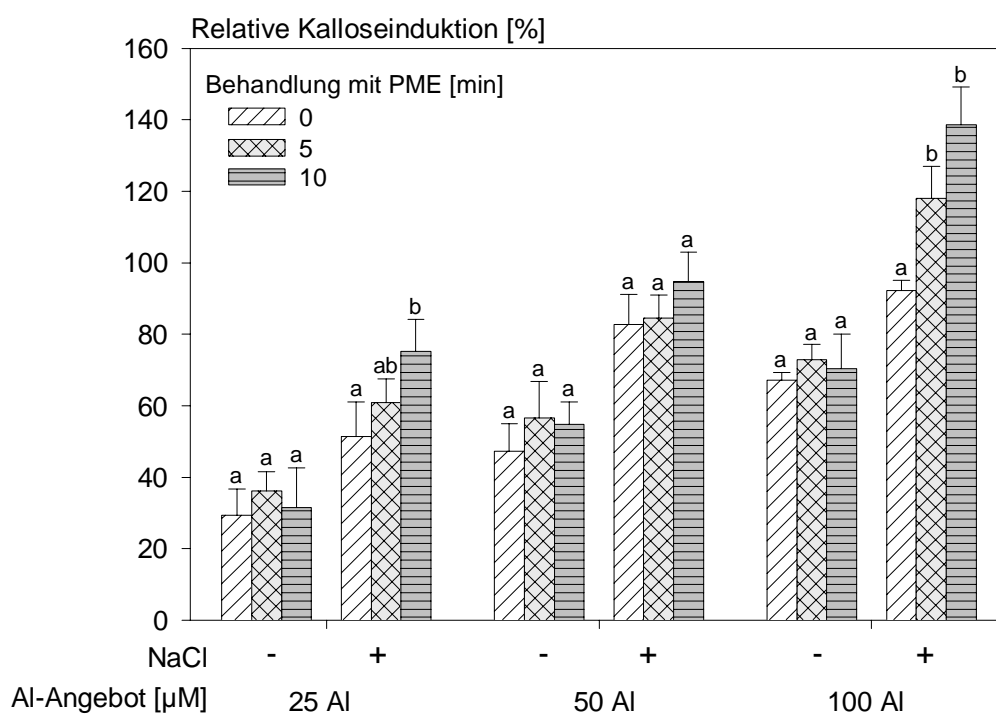


Abb. 40: Einfluß des Al-Angebots auf die relative Kalloseinduktion bei normalen und NaCl-adaptierten Zellsuspensionskulturen von Mais nach Behandlung mit PME. Behandlung mit PME für 0; 5; 10 min, Inkubation mit verschiedenen Al-Konzentrationen oder Digitonin (20 μM) für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$.

Die PME-Behandlung der normalen Zellen hatte keinen Einfluß auf die absoluten Al-Gehalte (vor Austausch mit Ba), und die fest-gebundenen Al-Gehalte (nach Austausch mit Ba) waren nur tendenziell erhöht (Abb. 41). Bei den NaCl-adaptierten Zellen führte die PME-Behandlung bereits nach 5 min zur Erhöhung der Al-Gehalte, sowohl vor als auch nach Austausch mit Ba.

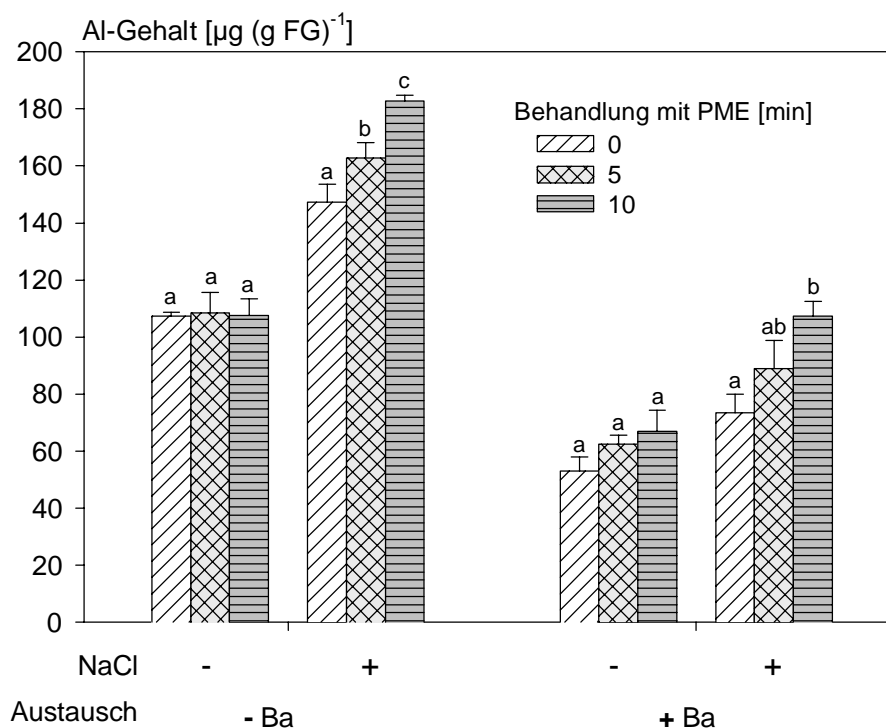


Abb. 41: Einfluß des Al-Angebots auf die Al-Gehalte vor und nach Austausch mit Ba bei normalen und NaCl-adaptierten Zellsuspensionskulturen von Mais nach Behandlung mit PME. Behandlung mit PME für 0; 5; 10 min, Inkubation $\pm 100 \mu\text{M}$ Al für 2 h bei pH 4,3, Austausch mit 50 mM BaCl_2 für 15 min. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$.

3.4.4.2 Beziehung zwischen Methylierungsgrad des Pektins und Parametern der Al-Toxizität

Nachdem festgestellt worden war, daß die Behandlung von Zellen mit PME einen Einfluß auf die Schädigung der Zellen durch Al (anhand des Parameters relative Kalloseinduktion) und auf die Al-Gehalte der Zellen hatte, wurde der Methylierungsgrad des Pektins der verschiedentlich adaptierten und vorbehandelten Zellen bestimmt (Abb. 42). Normale Zellen besaßen einen Methylierungsgrad von ca. 72%, während der Methylierungsgrad der NaCl-adaptierten Zellen mit 36% deutlich niedriger war. Längere Subkultivierung der adaptierten Zellen ohne

Salzstreß führte dazu, daß der Methylierungsgrad wieder anstieg und nach 21 d sogar den Wert der normalen Zellen übertraf. Die Adaptation an DCB verursachte einen niedrigen Methylierungsgrad von 26%, während die Behandlung mit Pectolyase in den niedrigsten Werten (ca. 12%) aller untersuchten Zellen resultierte. Die kurzfristige Behandlung der normalen Zellen mit PME beeinflusste den Methylierungsgrad kaum, während es bei NaCl-adaptierten Zellen mit längerer Behandlung der Zellen zu einer signifikanten Abnahme des Methylierungsgrads kam.

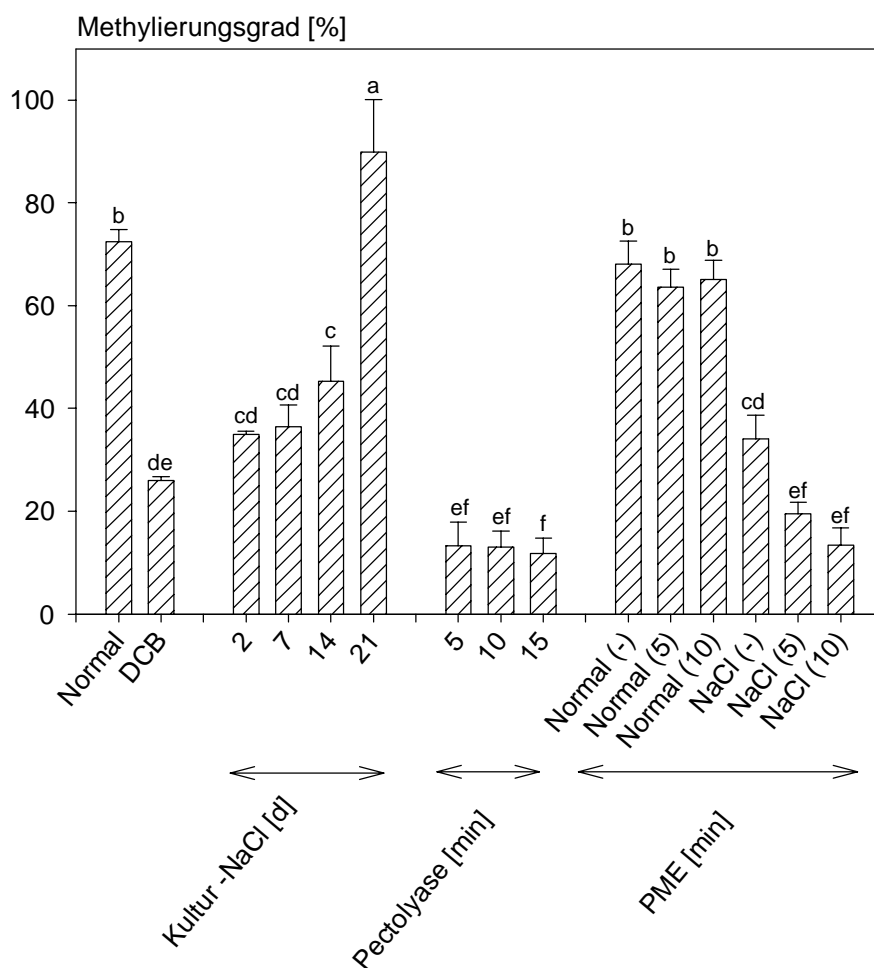


Abb. 42: Methylierungsgrad von unterschiedlich adaptierten und vorbehandelten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μ M) und kurzfristige Behandlung mit Pectolyase oder PME (0; 5; 10 min). Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Zelltyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 3$.

Die verschiedenen Behandlungen der Zellen führten zu einem breiten Spektrum des Methylierungsgrades, der mit dem AI-Gehalt der Zellen in einer hochsignifikanten negativen Beziehung stand (Abb. 43A) - unter der Voraussetzung, daß die Pectolyase-behandelten Zellen

von der Korrelation ausgeschlossen wurden. Diese Zellen zeichneten sich durch einen sehr niedrigen Methylierungsgrad aus und zeigten niedrigere Al-Gehalte und relative Kallose-induktion als von der Korrelation prognostiziert. Wurden die Al-Gehalte mit dem Gehalt an "unmethyliertem Pektin" (siehe 2.7.6.4) korreliert, zeigte sich eine signifikante, positive Beziehung bei der die Pectolyase-behandelten Zellen mit eingeschlossen waren (Abb. 43B).

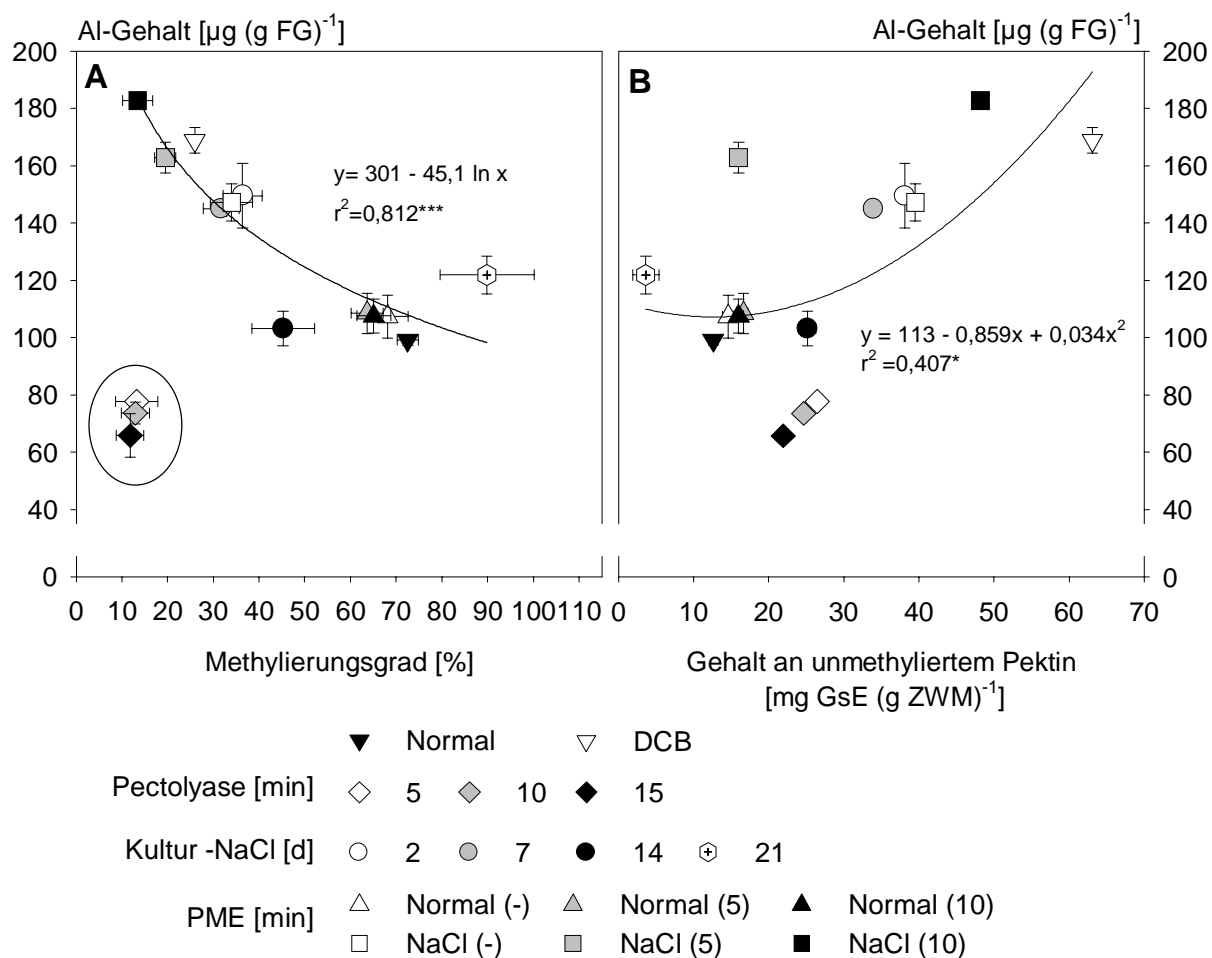


Abb. 43: Beziehung zwischen dem Methylierungsgrad (A) oder dem Gehalt an unmethyliertem Pektin (B) und dem Al-Gehalt von unterschiedlich adaptierten und vorbehandelten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μM) und kurzfristige Behandlung mit Pectolyase oder PME (0; 5; 10 min). Inkubation $\pm 100 \mu\text{M}$ Al für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit $n = 3$. *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; 0,01 bzw. 0,001.

Zwischen den Al-Gehalten der Zellen und der relativen Kalloseinduktion bestand eine hochsignifikante positive Beziehung (Abb. 44).

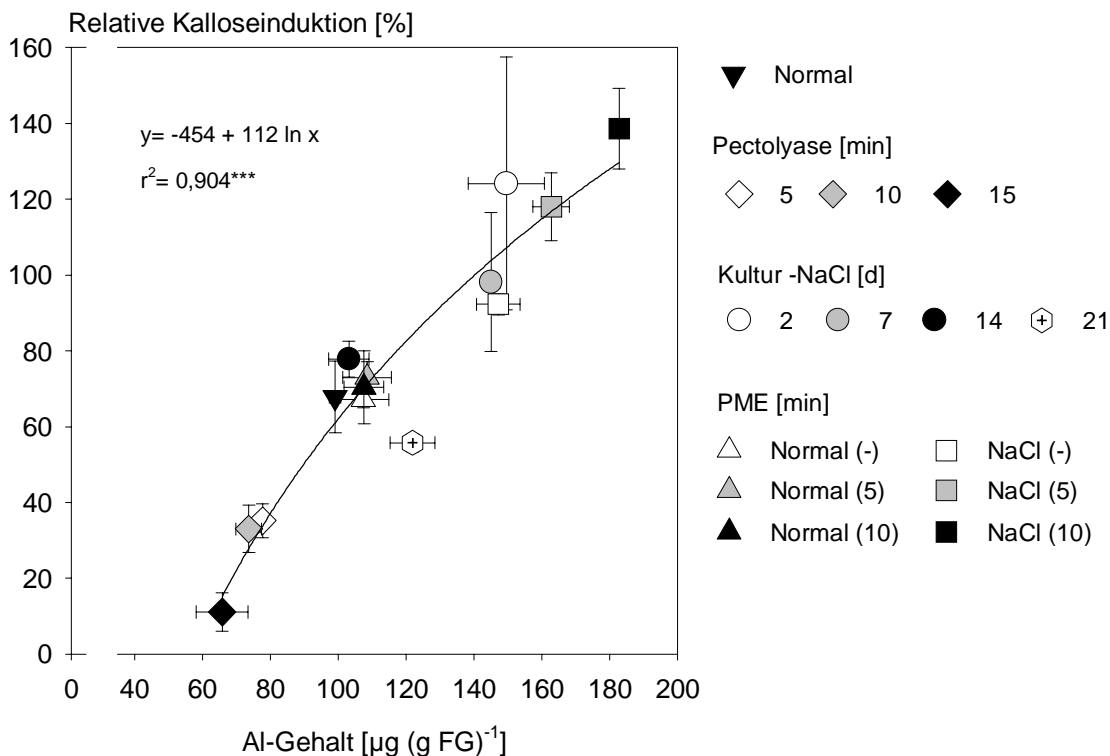


Abb. 44: Beziehung zwischen den Al-Gehalten und der relativen Kalloseinduktion von unterschiedlichen adaptierten und vorbehandelten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) und kurzfristige Behandlung mit Pectolyase oder PME (0; 5; 10 min). Inkubation $\pm 100 \mu\text{M}$ Al oder $20 \mu\text{M}$ Digitonin für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit $n = 3$. *, ** bzw. *** = signifikant bei $p \leq 0,05$; $0,01$ bzw. $0,001$.

3.5 Einfluß von Al auf Mobilität von höhermolekularen Stoffen im Apoplasten

3.5.1 Transport von PTS in Maispflanzen

PTS wurde in der Vergangenheit als Marker des apoplastischen Wassertransports verwendet. Inzwischen ist jedoch bekannt, daß es mit PTS zu Fehleinschätzungen kommen kann. Im folgenden ist PTS nicht zur Erfassung des Wassertransports verwendet worden, sondern um die Mobilität dieses Stoffes, als Beispiel für höhermolekulare Substanzen, in Wurzeln nach Al-Behandlung zu verfolgen.

Mit steigender Al-Konzentration kam es zu einer Verminderung des PTS-Transports, dargestellt als PTS-Bypass-Flow, diese Verminderung war aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant (Abb. 45A). Im Gegensatz dazu war die Retention von PTS in der Wurzelspitze (5 mm) der Pflanzen mit zunehmenden Al-Angebot signifikant erhöht. (Abb. 45B).

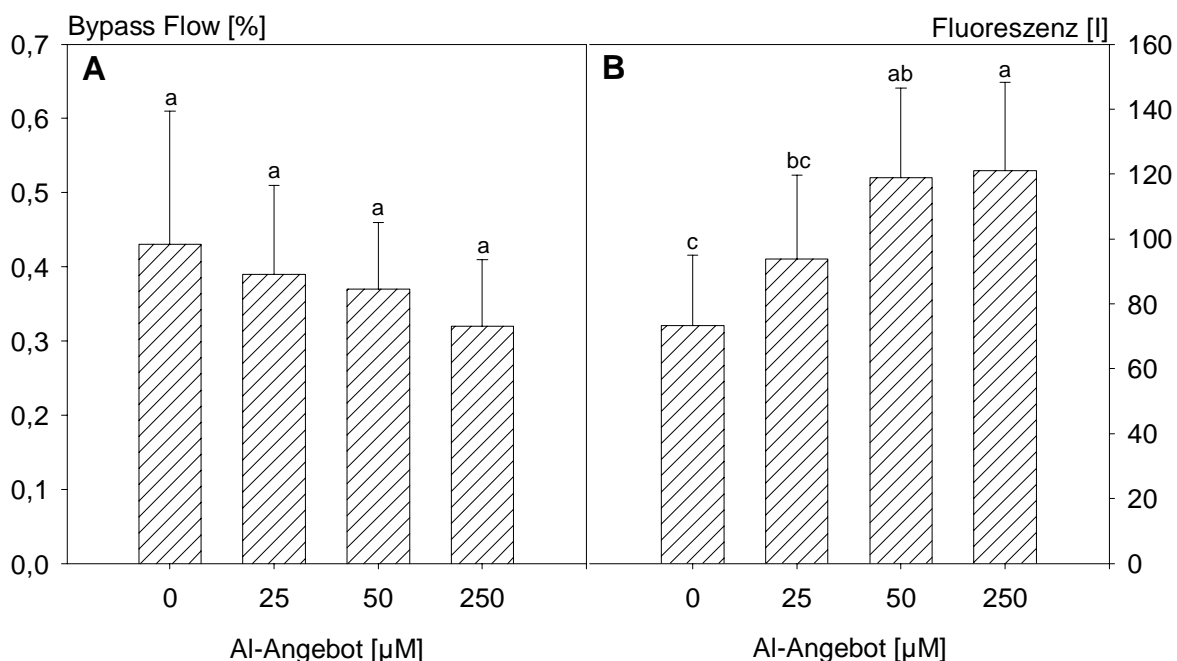


Abb. 45: Einfluß des Al-Angebots auf den Bypass-Flow (A) und die Retention in Wurzelspitzen (5 mm) (B) von PTS. Inkubation der Pflanzen mit verschiedenen Al-Konzentrationen für 3 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 6$.

3.5.2 Einfluß von Al auf Saure Phosphatase

Im Bereich von 10 bis 200 μM hatte Al keinen Einfluß auf die Aktivität einer kommerziellen Präparation von Saurer Phosphatase (nicht dargestellt).

Um den Einfluß von Al auf Saure Phosphatase von Wurzeln oder Zellen zu untersuchen wurde das folgende Versuchssystem entwickelt. Das Pflanzenmaterial wurde für 1 h \pm Al in einer wäßrigen Lösung (siehe 2.5.4) behandelt und anschließend in eine Lösung aus Acetat-Puffer mit der entsprechenden Al-Konzentration überführt und für 1 h inkubiert (Vorinkubation). Während dieser Vorinkubation wurde Saure Phosphatase vom Pflanzenmaterial an das Außenmedium abgeben, sowohl in diesem "Exsudat" als auch im Pflanzenmaterial ("apoplastische" bzw. Aktivität der Oberfläche) konnte die Aktivität von Saurer Phosphatase untersucht werden.

3.5.2.1 Einfluß von Al auf exsudierte und apoplastische Saure Phosphatase bei Maiswurzeln

Die Enzymaktivität von Wurzeln und Wurzelexsudaten wurde sowohl mit als auch ohne Al im Assaymedium bestimmt (Abb. 46). Die Vorinkubation der Wurzeln mit Al führte dazu, daß die Aktivität des Exsudats um ca. 50% gegenüber der Kontrolle reduziert war (Abb. 46A).

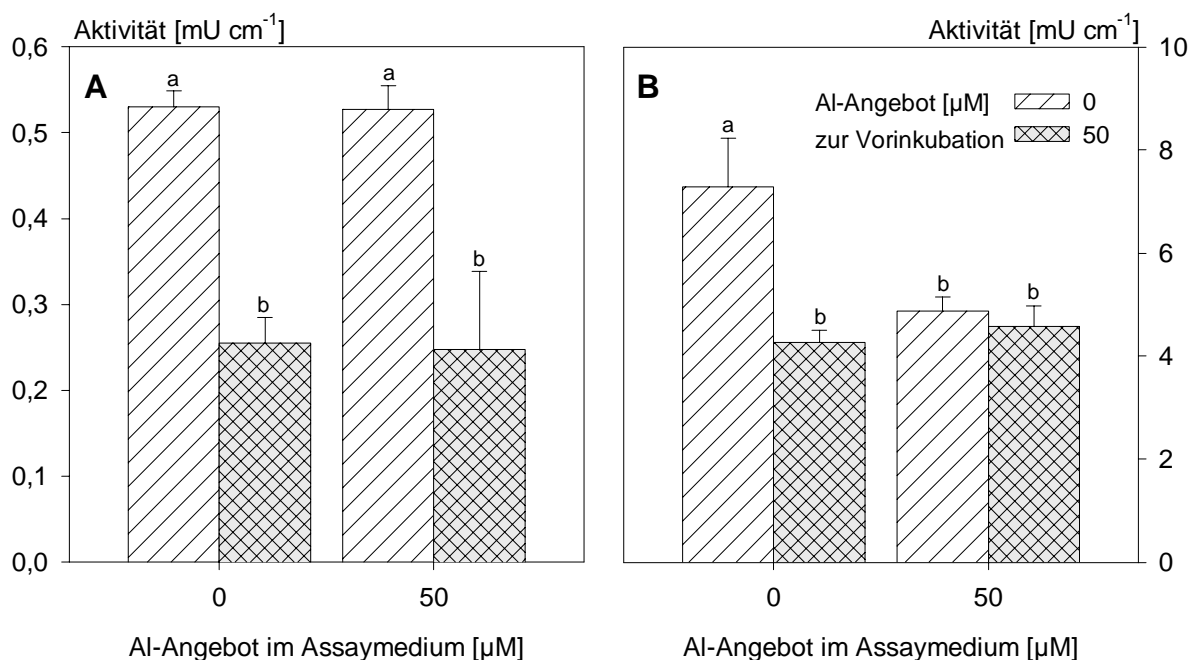


Abb. 46: Einfluß von Al während der Vorinkubation und im Enzymassay auf die Aktivität von Saurer Phosphatase in Exsudaten (A) und Wurzeln (B) von Maiswurzelspitzen (1 cm). Inkubation und Enzymassay \pm Al für 1 h bei pH 4,5. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 8$.

Die Anwesenheit von Al im Assaymedium hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der Exsudate. Die Phosphataseaktivität der Wurzeln (apoplastisch, bzw. Oberfläche) war um den Faktor 10 höher als die Aktivität der Exsudate (Abb. 46B). Die Gegenwart von Al in der Vorinkubation führte zu einer Verringerung der Aktivität um ca. 60%. Wie bei den Exsudaten verstärkte die Zugabe von Al zum Assaymedium diesen Effekt nicht. Aber im Gegensatz zu den Exsudaten führte Al im Assaymedium zu einer Verringerung der Aktivität bei Wurzeln, die in der Vorinkubation nicht mit Al behandelt worden waren.

Wurden die Aktivitäten der Exsudate auf den Proteingehalt der Proben bezogen, zeigte sich kein Effekt der Al-Behandlung. Die Aktivität betrug im Mittel $1,35 \text{ mU } (\mu\text{g Protein})^{-1}$ (nicht dargestellt).

3.5.2.2 Einfluß von Al auf exsudierte und apoplastische Saure Phosphatase bei Zellsuspensionskulturen von Mais

Nachdem bei Maiswurzelspitzen festgestellt wurde, daß Al in der Vorinkubation (gleichbedeutend mit der Exsudation) die Aktivität von Saurer Phosphatase veränderte, wurde anschließend untersucht, ob der Pektingehalt von Zellkulturen diesen Al-Einfluß modifizierte. Dazu wurden normale, NaCl- und DCB-adaptierte und Pectolyase-behandelte Zellen verwendet.

Die Aktivität von apoplastischer Saurer Phosphatase (Abb. 47B) war nur wenig von der Vorinkubation betroffen. Steigendes Al-Angebot führte zu einer Verringerung der Aktivität in allen Zellen, dieser Effekt war in normalen und Pectolyase-behandelten Zellen nicht signifikant. Im Gegensatz zur apoplastischen Sauren Phosphatase war die Aktivität des exsudierten Enzyms bei den einzelnen Zelltypen sehr unterschiedlich (Abb. 47A). Besonders die NaCl-adaptierten, aber auch die Pectolyase-behandelten Zellen zeichneten sich durch höhere Aktivitäten im Vergleich zu den normalen und DCB-adaptierten Zellen aus. Das Al-Angebot hatte keinen Einfluß auf die normalen Zellen, während es bei den anderen Zelltypen mit steigendem Al-Angebot zu einer Verringerung der Aktivität kam. Wurde die Enzymaktivität auf den Proteingehalt des Exsudats bezogen, waren keine Unterschiede mehr erkennbar (nicht dargestellt).

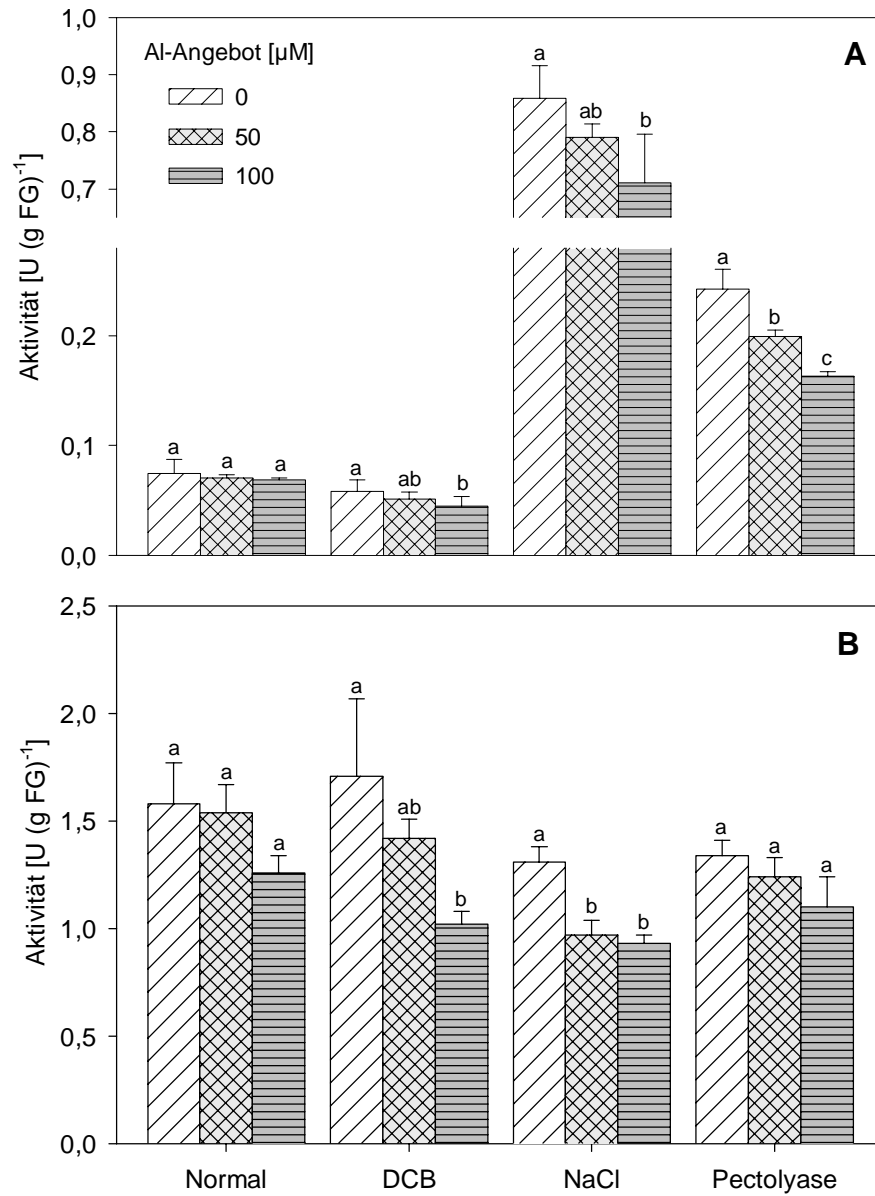


Abb. 47: Einfluß des Al-Angebots auf die Aktivität von exsudierter (A) und apoplastischer (B) Saurer Phosphatase bei unterschiedlich adaptierten oder vorbehandelten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μM) oder kurzfristige Behandlung mit Pectolyase (5 min). Vorinkubation mit Al für 1 h bei pH 4,5. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 6$.

3.5.3 Einfluß von Al auf die Exsudation von Proteinen und Pektin bei Zellsuspensionskulturen von Mais

Nachdem sich mittels PTS und Saurer Phosphatase abgezeichnet hatte, daß Al die Mobilität von höhermolekularen Stoffen beeinflussen kann, wurde anhand von Suspensionszellen die Wechselwirkung von Al und Pektin in bezug auf die Exsudation von Protein und Pektin untersucht.

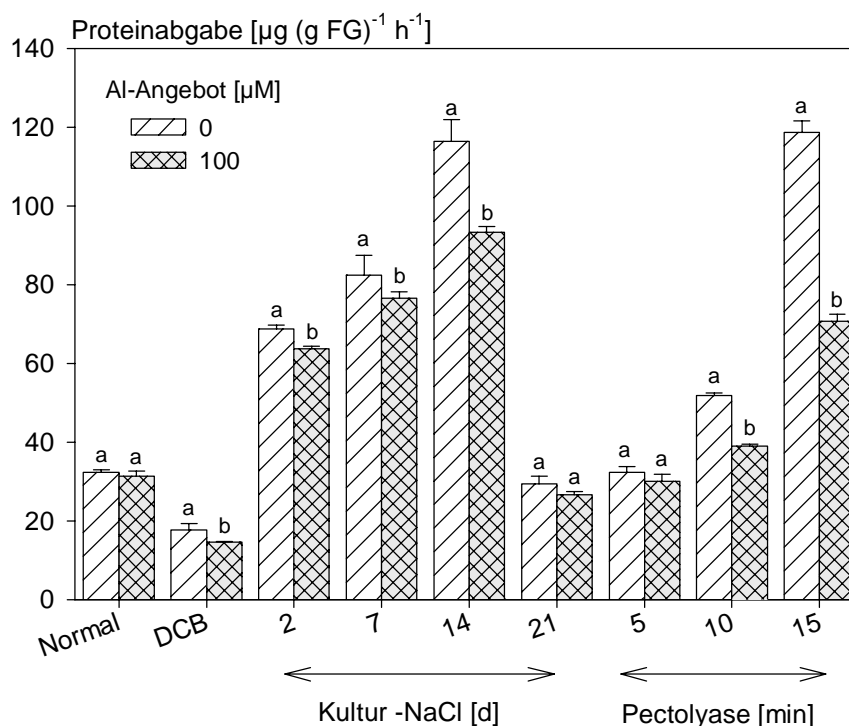


Abb. 48: Einfluß von Al auf die Abgabe von Protein bei unterschiedlich adaptierten oder vorbehandelten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 µM) oder kurzfristige Behandlung mit Pectolyase. Inkubation ±100 µM Al für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 3$.

In Abb. 48 ist die Abgabe von Protein dargestellt. Längere Behandlung der Zellen mit Pectolyase führte zur höchsten Proteinabgabe beim Vergleich aller untersuchter Zellen. Auch längere, bis zu 14-tägige Subkultivierung von NaCl-adaptierten Zellen ohne Salzstreß resultierte in einer Steigerung der Proteinabgabe. Nach weiteren 7 Tagen war die Proteinabgabe auf das Niveau der normalen Zellen abgesunken. Die niedrigste Proteinabgabe fand sich bei den DCB-adaptierten Zellen. Aluminium führte zu einer Verringerung der Abgabe in allen Zelltypen, mit Ausnahme der normalen, der für 21 d ohne NaCl-Streß subkultivierten und der für 5 min mit Pectolyase behandelten Zellen. Die stärkste Hemmung der Proteinabgabe wurde in den für 15 min mit Pectolyase behandelten Zellen beobachtet (60 % Abgabe im Vergleich zur Kontrolle). Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem

Pektingehalt der Zellen und der Al-induzierten Hemmung der Proteinabgabe (nicht dargestellt).

Nicht nur die Abgabe von Protein sondern auch von Pektin war vom Zelltyp beeinflusst (Abb. 49). Die höchste Pektinabgabe ohne Al-Behandlung wurde in den Zellen beobachtet, die für 5 min mit Pectolyase behandelt worden waren. Eine längere Behandlungszeit reduzierte die Pektinabgabe. NaCl-adaptierte Zellen exsudierten mehr Pektin als normale Zellen, aber längere Subkultivierung ohne Salzstreß führte zu einer Abnahme der Exsudation, bis nach 14 Tagen das Niveau der normalen Zellen erreicht bzw. nach 21 d sogar unterschritten war. DCB-adaptierte Zellen zeigten wie schon bei der Proteinabgabe, die geringste Exsudation. Aluminium reduzierte die Pektinabgabe in allen Zellen, aber in normalen und in für 2 d ohne Salzstreß subkultivierten Zellen war diese Verringerung nicht signifikant. Mit verlängerter Behandlung der Zellen mit Pectolyase kam es zu einer Verringerung der Exsudationshemmung. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Pektingehalt der Zellen und der Al-induzierten Hemmung der Pektinabgabe (nicht dargestellt).

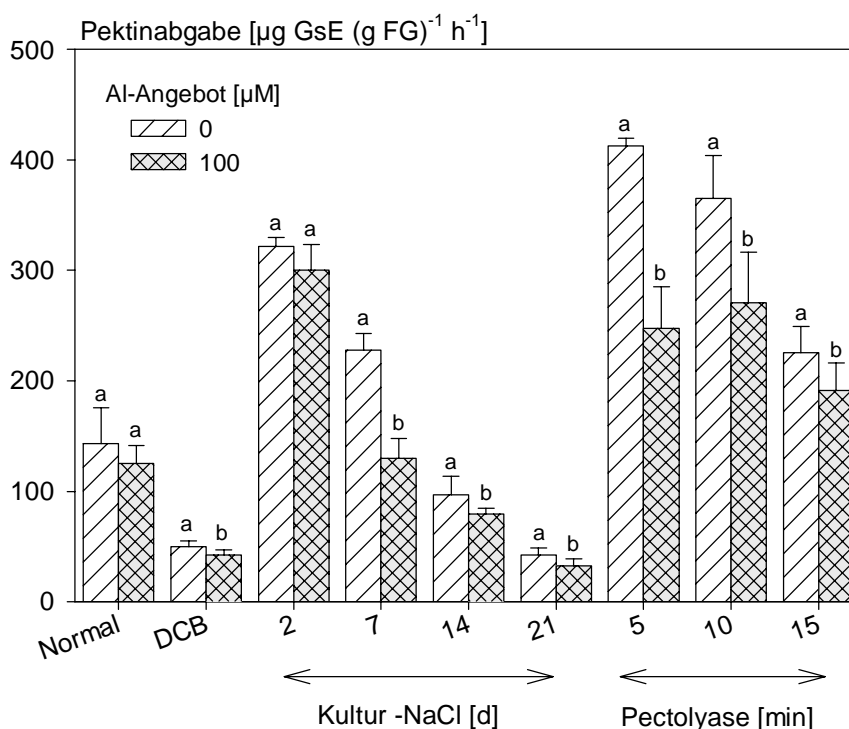


Abb. 49: Einfluß von Al auf die Abgabe von Pektin bei unterschiedlich adaptierten oder vorbehandelten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 µM) oder kurzfristige Behandlung mit Pectolyase. Inkubation $\pm 100 \mu\text{M}$ Al für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 3$.

3.6 Einfluß von Al auf oxidative Prozesse

3.6.1 Einfluß von Al auf Peroxidaseaktivität bei Wurzeln von verschiedenen Pflanzenarten

Die Aktivität von Peroxidase wurde *in vitro* nicht von Al-Konzentrationen im Bereich von 10-200 μM beeinflusst (nicht dargestellt). Wie bereits unter 2.5.6 beschrieben, wurden zwei Enzymfraktionen (lösliche und ionisch) gewonnen und die Enzymaktivität nur auf den Substratumsatz und eine Einheit Pflanzenmaterial bezogen.

Die Aktivität von Peroxidase war bei Ackerbohnenwurzeln in der ionischen Fraktion um das dreifache höher als in der löslichen Fraktion (Abb. 50). Bereits ein Al-Angebot von 10 μM führte in der löslichen Fraktion zu einer signifikanten, aber auch in der ionischen zu einer Erhöhung der Aktivität. Eine weitere Erhöhung des Al-Angebots hatte keinen deutlichen Einfluß. Auch bei Mais war die Aktivität in der ionischen Fraktion höher, jedoch kam es erst zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität bei einem Al-Angebot von 25 μM , eine weitere Erhöhung des Angebots hatte auch hier keinen verstärkenden Einfluß (nicht dargestellt).

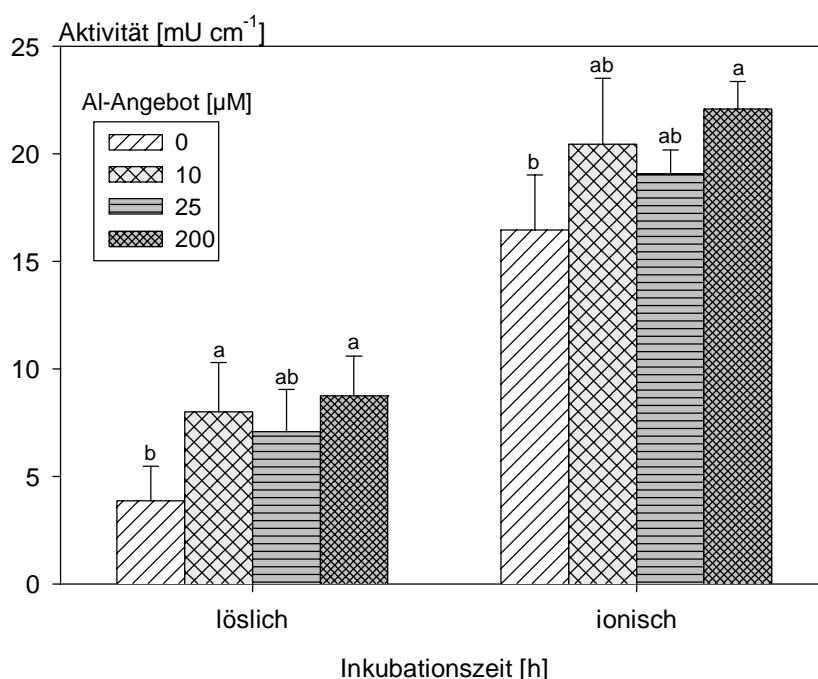


Abb. 50: Einfluß des Al-Angebots auf die Aktivität von löslicher und ionischer Peroxidase in Wurzelspitzen (1 cm) von Ackerbohne. Inkubation mit verschiedenen Al-Konzentrationen für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 4$ bestehend aus 3 cm Wurzelmaterial.

Der Einfluß von Al auf die Aktivität von ionischer Peroxidase in 4 Kartoffelgenotypen ist in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Wurzelsegment in Abb. 51 dargestellt. Die Aktivität der Kontrollen (0 μM Al) zeigte keine genotypischen Unterschiede innerhalb eines Segments und einer Behandlungszeit. Ein deutlicher Gradient der Peroxidaseaktivität war entlang der Wurzel zu erkennen, wobei ältere Wurzelsegmente eine höhere Aktivität aufwiesen als jüngere. Eine längere Behandlung der Pflanzen führte in den Kontrollen ebenfalls zu einer Erhöhung der Aktivität.

Bereits nach 2 h Inkubation bewirkte Al eine Erhöhung der Aktivität gegenüber den Kontrollen aller Genotypen. Dieser Effekt verlor sich jedoch bei den älteren Wurzelsegmenten, bereits 2 cm hinter der Wurzelspitze war kein signifikanter Al-Einfluß mehr zu beobachten. Nach 7 h Inkubation schwächte sich der Einfluß von Al ab und nach 24 h war er nur noch ansatzweise erkennbar. Im genotypischen Vergleich zeigten Adelheid (ADH, Al-sensitiv) und die Transformante einen stärkeren Al-induzierten Anstieg der Peroxidaseaktivität als Red McClure (RMC, Al-resistent) und der Wildtyp (WT), so daß nach 24 h bereits bei 1-2 cm das Niveau der Kontrollen im ältesten Segment (3-6 cm) erreichten.

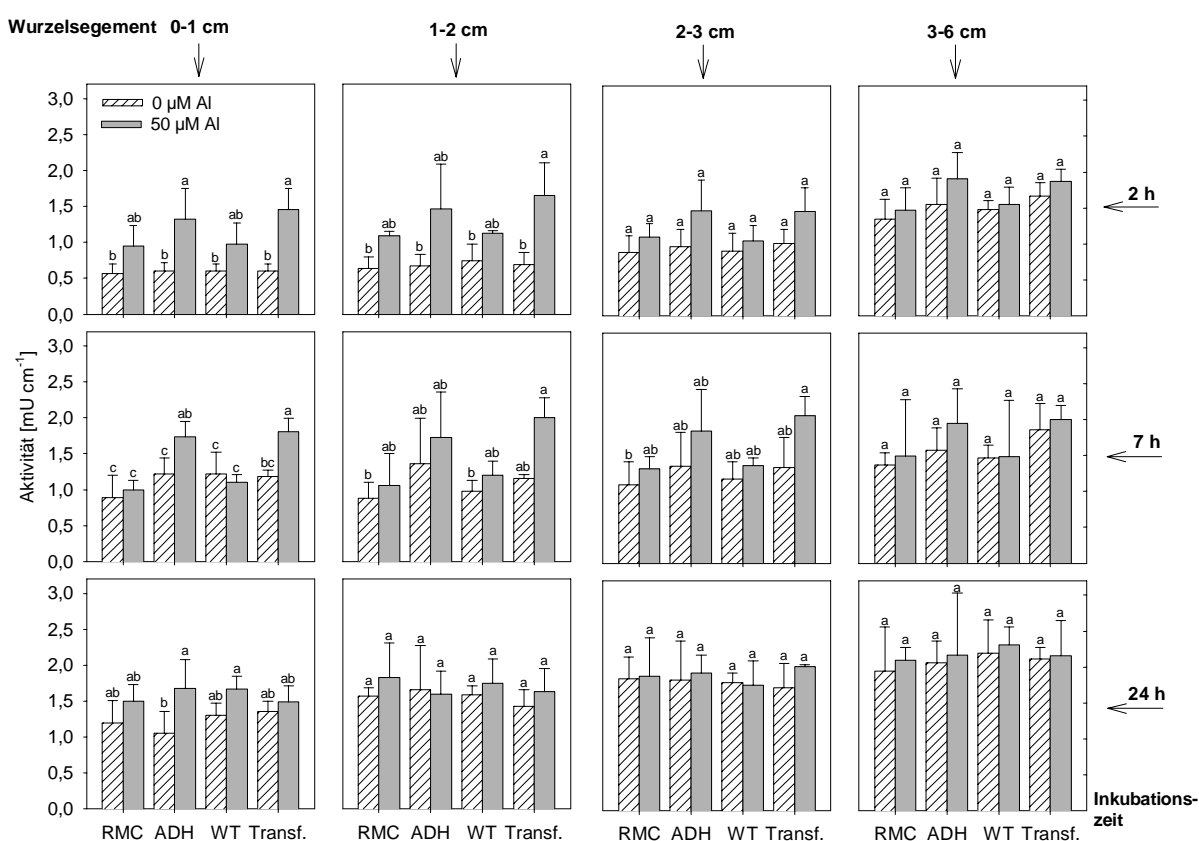


Abb. 51: Einfluß von Al auf die Aktivität von ionischer Peroxidase von 4 Kartoffelgenotypen in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Wurzelsegment. Inkubation \pm 50 μM Al für 2; 7; 24 h in vier verschiedenen Wurzelsegmenten bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf den Genotyp ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), \pm SD mit $n = 3$ bestehend aus 3 cm Wurzelmaterial.

3.6.2 Einfluß von Al auf Peroxidaseaktivität und Phenolgehalt bei Zellsuspensionskulturen von Mais

3.6.2.1 Einfluß von Al auf verschiedene Fraktionen von Peroxidase in Zellsuspensionskulturen von Mais

Nachdem festgestellt worden war, daß Al die Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit von Genotyp und des Wurzelsegment veränderte, wurde anschließend die Wechselwirkung mit dem Pektin Gehalt von Zellsuspensionskulturen untersucht. Grundsätzlich war die Aktivität von Peroxidase in der löslichen Fraktion (Abb. 52A) höher als in der ionischen Fraktion (Abb. 52B). Die niedrigsten Aktivitäten wurden in der kovalenten Fraktion (Abb. 52C) gemessen.

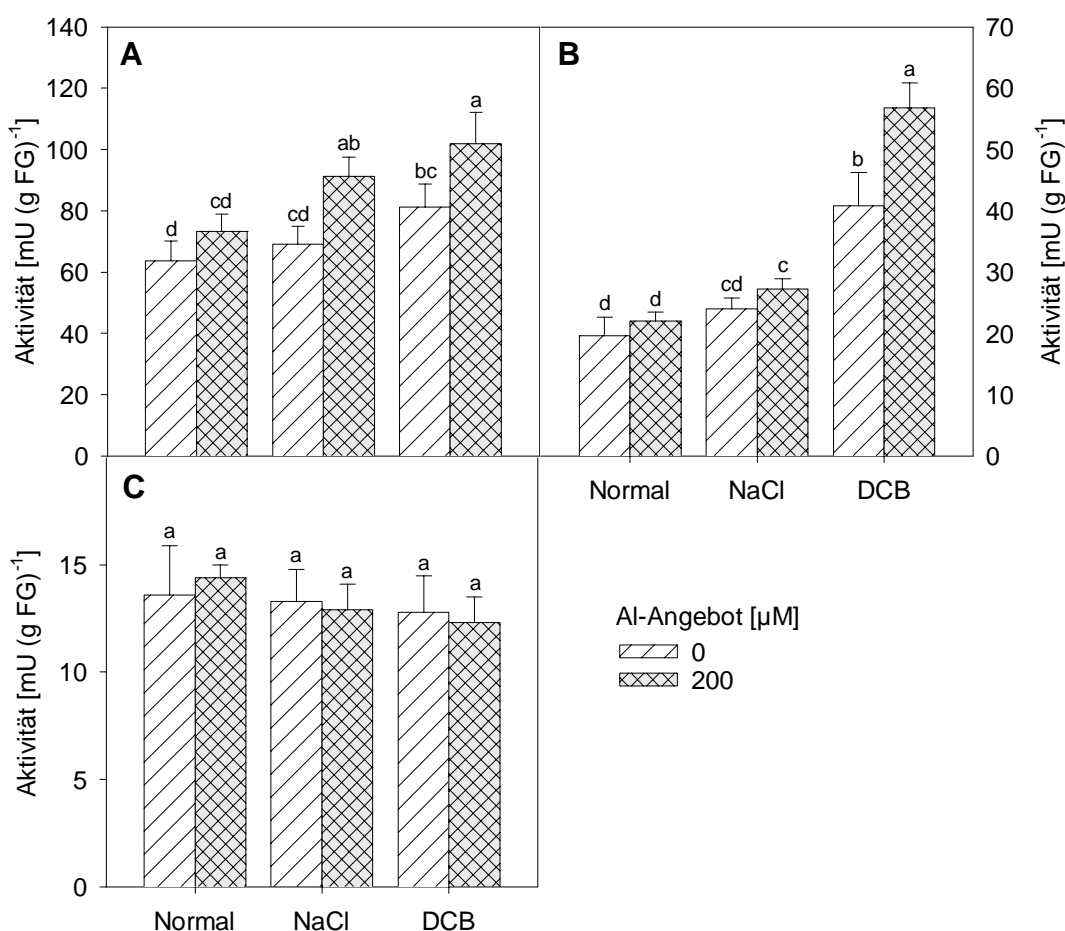


Abb. 52: Einfluß von Al auf die Aktivität von löslicher (A), ionischer (B) und kovalent-gebundener Peroxidase bei unterschiedlich adaptierten Zellsuspensionskulturen von Mais. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μM). Inkubation ±100 μM Al für 2 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), ±SD mit $n = 3$.

Sowohl in der löslichen als auch in der ionischen Fraktion war die Aktivität der Kontrollen bei den DCB-adaptierten Zellen am höchsten. Bei der kovalent-gebundenen Peroxidase zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Zelltypen. Aluminium führte bei allen Zelltypen in der löslichen und der ionischen Fraktion zu einer Erhöhung der Aktivität während bei der kovalenten Peroxidase kein Al-Effekt zu verzeichnen war. Der Anstieg der Aktivität von löslicher Peroxidase war in Relation zur jeweiligen Kontrolle bei den verschiedenen Zelltypen gleichermaßen ausgeprägt (ca. 136%). Bei der ionischen Peroxidase kam es bei den DCB-adaptierten Zellen zu einer stärkeren Erhöhung der Aktivität durch Al als bei den normalen oder NaCl-adaptierten Zellen.

3.6.2.2 Einfluß von Al auf die Extrahierbarkeit von Phenolen bei Zellsuspensionskulturen von Mais

Die verschiedenen Zelltypen wurden mit Al behandelt und anschließend Phenole extrahiert und quantifiziert. Dabei zeigte sich, daß sich aus NaCl- und DCB-adaptierten Zellen größere Phenolmengen extrahieren ließen als bei den normalen Zellen (Abb. 53). Ein Al-Angebot von 50 μM führte bei allen Zelltypen zu einer Verringerung der Phenolgehalte, wobei dieser Effekt nur bei den normalen Zellen signifikant war. Eine Erhöhung des Al-Angebots auf 200 μM hatte keinen weiteren Effekt auf die Phenolbestimmung.

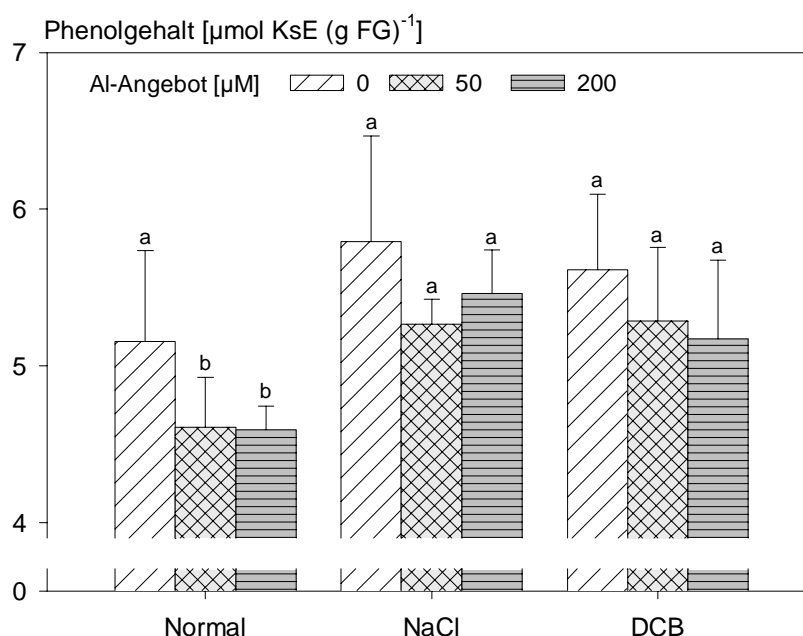


Abb. 53: Einfluß des Al-Angebots auf die Extrahierbarkeit von Phenolen aus unterschiedlich adaptierten Zellsuspensionskulturen. Adaptation an NaCl (200 mM) oder DCB (1 μM). Inkubation $\pm\text{Al}$ für 8 h bei pH 4,3. Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich in bezug auf das Al-Angebot ($p \leq 0,05$; Tukey-Test), $\pm\text{SD}$ mit $n = 4$.

4 Diskussion

4.1 Al-Toxizität

Die Toxizität von Al wurde bereits 1909 von Fluri wissenschaftlich beschrieben. Aufgrund der Tatsache, daß Al- zusammen mit Mangan-Toxizität die Erträge auf sauren Böden, vor allem der Tropen, stark beeinträchtigt (von Uexküll und Mutert, 1995), besteht ein deutliches Interesse, die Toxizität von Al bei höheren Pflanzen zu untersuchen. Der Schwerpunkt wurde zunächst darauf gelegt, nach Resistenzmechanismen zu suchen, um auf diese Weise den Züchtern Auswahlkriterien an die Hand zu geben, nach denen sie sich, in ihren Bestrebungen Al-resistente Nutzpflanzen zu züchten, orientieren konnten. Dabei wurde die Frage, wie Al zu Toxizität führt, nur wenig beachtet. Die Ursache der durch Al-induzierten Hemmung des Wurzellängenwachstums ist nach wie vor nicht geklärt (Taylor, 1995; Kochian, 1995; Horst, 1995). Bekannt ist, daß nicht alle Formen von Al toxisch oder gleichermaßen toxisch sind (Wagatsuma und Ezoe, 1985; Kinraide, 1991; Kinraide, 1997 und Referenzen darin). In welcher Form Al in Lösung vorliegt, hängt dabei vor allem vom pH-Wert des umgebenden Mediums ab. Bei pH-Werten unterhalb von 5 liegt Al zunehmend in der toxischen, monomeren Form (Al^{3+}) vor. Kationen können den Effekt von Al meliorieren (Edmeades et al., 1991; Alva et al., 1986), wobei Calcium sich besonders eignet, so konnte ca. die zehnfache Menge an Ca die Schädigung durch Al verhindern (Matsumoto et al., 1992; Sasaki et al., 1997). Aus diesem Grund können Böden gekalkt werden, was sowohl den Ca-Gehalt als auch den pH-Wert erhöht und auf diese Weise den Pflanzen auch auf sauren, Al-toxischen Böden ein normales Wachstum erlaubt. Aufgrund von ökologischen und ökonomischen Schwierigkeiten ist die Kalkung der Böden keine echte Alternative und es wird deshalb versucht, Pflanzen anzubauen, die weniger empfindlich auf Al reagieren.

Ein wichtiger Resistenzmechanismus der Pflanzen beruht auf der Vermeidung des Kontakts der Wurzel mit Al. Es sind verschiedene Methoden beschrieben worden, z. B. die Erhöhung des lokalen pH-Werts (Miyasaka et al., 1989; Degenhardt et al., 1998) oder die Ausscheidung von Substanzen, die Al komplexieren können, wie z. B. Polypeptide oder Mucilage (Basu et al., 1994; Horst et al., 1982), und vor allem organische Anionen (Delhaize et al., 1993b; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000). Kommt es zum Kontakt von Al mit der Wurzel führt dies zur Schädigung, wobei nach wie vor unklar ist, welcher Bereich der Wurzel den eigentlichen Angriffsort für Al darstellt - sowohl der Apoplast (Grauer und Horst, 1992) als auch der Symplast wurden in der Vergangenheit (Taylor, 1987) als Ziel genannt.

4.2 Lokalisation von Al in der Wurzel

Das Vorkommen von symplastischem Al war lange Zeit umstritten, da große analytische Schwierigkeiten in der Detektion bestanden, vorwiegend weil die apoplastische Al-Konzentration sehr groß ist und es sich nur schwer und meist nicht vollständig entfernen läßt, ohne das Gewebe der Wurzel zu zerstören (Rengel, 1996).

Die Kombination aus Gefriersubstitution der Wurzeln und die Messung von Al mittels LAMMA bietet eine gute Möglichkeit der Ionenlokalisation und Bestimmung der relativen Verteilung mit hoher Sensitivität (ca. 20 ppm, Verbueken et al., 1984; Schröder et al., 1988; Kuhn et al., 1995). Quantitative Bestimmungen sind jedoch aufgrund unterschiedlicher Ionisation, Ausbeute und Detektorempfindlichkeit für verschiedene Elemente und von Matrixeffekten nicht möglich. Um diese Effekte auszugleichen, wurde das Verhältnis von Al/⁴¹K bestimmt, so daß ein Vergleich von Spektren mit unterschiedlicher Signalausbeute vorgenommen werden konnte. Aus diesen Gründen ist es nicht ganz korrekt von Konzentrationen zu sprechen, der Begriff wird dennoch verwendet, obwohl es sich dabei tatsächlich um Signalintensitäten handelt.

Intrazelluläres Al war nach 3 h Behandlungsdauer deutlich bestimmbar (Abb. 12), was mit Ergebnissen von Lazof et al. (1994; 1996) und Vázquez et al. (1999) übereinstimmt. Im Gegensatz zu Vázquez et al. (1999) war die Al-Konzentration in der Zellwand jedoch wesentlich höher als im Zellumen. Auch Lazof et al. (1996) beschrieben Al-Akkumulation im Zellumen, ohne apoplastisches Al zu finden, wobei sie davon ausgingen, daß sie durch Waschung der Wurzeln mit Citrat (10 mM) vor der Probenaufarbeitung nahezu 100% des apoplastischen Aluminiums hatten entfernen können. Allerdings erscheint dies unwahrscheinlich, denn Al bindet sehr fest an Zellwandbestandteile (Rengel, 1996). So waren bei EDX-Bestimmungen von Al nach Kryopräparation zwar immer hohe Konzentrationen von Al in der Zellwand zu finden, aber nur mit keinen oder nur Spuren von Al im Symplasten, sofern physiologische Al-Konzentrationen angeboten wurden (Marienfeld und Stelzer; 1993; Godbold et al., 1995; Delhaize et al., 1993a).

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, in der ein Al-sensitiver Maisgenotyp verwendet wurde, benutzten Vázquez et al. (1999) einen Al-toleranten Maisgenotyp. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß das Fehlen von Al in der Zellwand ein Charakteristikum für Al-Resistenz ist und die Akkumulation von Al in der Vakuole einen Detoxifizierungsmechanismus darstellt, wie er für verschiedene Schwermetalle (Ernst, 1998) beschrieben wurde. Beide Ergebnisse stimmen mit der Annahme von Horst (1995) überein, daß Al-Toxizität vorwiegend durch Interaktion von Al mit dem Apoplasten entsteht, denn der sensitive Genotyp wies hohe apoplastische Al-Konzentrationen auf, während sie bei dem resistenten unerheblich waren.

Die vorliegenden Daten zur Lokalisation zeigen außerdem, daß der Apoplast ein Hindernis in der radialen Mobilität von Al ist. Zumindest über den Zeitraum von 3 h hinweg gab es einen steilen Gradienten der Al-Akkumulation im Apoplasten und deutliche Unterschiede zwischen den Pflanzenarten, wobei Al bei Mais tiefer vordringen konnte (Abb. 11, 12). Dies ist ein längerer Zeitraum der apoplastischen Al-Bindung als er z.B. von Zhang und Taylor (1989; 1990) für Weizen berechnet wurde. Ähnliche Verteilungsmuster wurden sowohl durch Kryo-EDX als auch durch EDX nach Gefriertrocknung oder Gefriersubstitution in verschiedenen Spezies bestimmt. Dabei wurden unterschiedliche Behandlungszeiten, sogar bis zu mehreren Tagen verwendet (Godbold et al., 1995; Hodson und Sangster, 1993; Marienfeld und Stelzer, 1993; Delhaize et al., 1993a). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichteten Lazof et al. (1996) von einer beinahe gleichmäßigen Verteilung von Al in der Cortex, was sich vielleicht durch die Waschung der Wurzeln mit Citrat vor der Präparation des Gewebes erklären läßt, da Citrat auch ungeladene Komplexe mit Al bilden kann und Al auf diese Weise mobilisiert und die Membranpermeation erleichtert wird (Martin, 1988; Akeson et al., 1989).

In der hier vorliegenden Untersuchung bedurfte es einer dreistündigen Behandlung, bevor symplastisches Al in der Epidermis oder den äußeren Cortexzellen detektierbar war. Die Hemmung des Wurzellängenwachstums und andere Veränderungen der Wurzel wie z.B. die Kalloseinduktion sind jedoch bereits innerhalb von 1 h zu beobachten (Sivaguru und Horst, 1998; Sivaguru et al., 1999a). Al bindet sehr schnell, innerhalb von Sekunden (Abb. 10) an die negativen Ladungen im Apoplasten (Rengel, 1996 und Referenzen darin). In Aufnahme-kinetiken bei *Chara*-Zellen konnten Rengel und Reid (1997) feststellen, daß mehr als 99% des „absorbierten“ Al in der Zellwand lokalisiert war, während sich die berechneten symplastischen Al-Konzentrationen im nanomolaren Bereich befanden. Diese Untersuchung zeigte aber auch, daß der Transport dieser geringen Mengen von Al über die Plasmamembran schnell erfolgte. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Aufnahme von geringen Mengen Al in den Symplasten eine Ursache für die beobachteten Änderungen des Cytoskeletts darstellt (Blancaflor et al., 1998; Horst et al., 1999; Sivaguru et al., 1999ab), so erscheint es aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wahrscheinlicher, daß die Bindung von Al bereits in der Zellwand, und möglicherweise auch an der Außenseite der Plasmamembran, zu ausreichenden Veränderungen in der Zelle führt um Symptome von Al-Toxizität auszulösen. Im folgenden sollen Möglichkeiten erörtert werden, wie Al über den Apoplasten das Wurzelwachstum beeinflussen kann.

4.3 Zellwandmodifikationen

Der Apoplast wurde 1930 von Münch als das Kompartiment der Pflanze definiert, welches außerhalb der Plasmamembran liegt. Inzwischen wird auch die Außenseite der Plasmamembran dem Apoplasten zugeordnet bzw. der Apoplast verliert zunehmend seinen vom Symplasten isolierten Charakter, da sich ein neues Verständnis für die Zusammenhänge in der Pflanzenzelle entwickelt hat und in dem Begriff "cell-wall plasmamembrane cytoskeleton continuum" zum Ausdruck gebracht wurde (Miller et al., 1997 ab; Wyatt und Carpita, 1993; siehe hierzu Kap. 4.12). Der Apoplast spielt eine bedeutende Rolle bei der Stoffaufnahme, Signaltransduktion, Pathogenabwehr und dem Wachstum (Carpita und Gibeaut, 1993). Die treibende Kraft des Zellwachstums ist der Turgordruck, der durch den Gegensatz zwischen dem Wassereinstrom in die Zelle durch Osmose über die semipermeable Plasmamembran und der Festigkeit der Zellwand entsteht (Pritchard, 1994). Das eigentliche Wachstum kann aber nur stattfinden, wenn sich die Wand dem neuen Zellvolumen anpaßt, wobei die Dehnbarkeit der Zelle durch biochemische Veränderung der Zellwand ermöglicht wird (Cosgrove, 1998). Man könnte sagen, daß der Turgordruck der Motor ist, und die dynamische Veränderung der Zellwand die Feinregulation des Wachstums bewirkt (Passioura und Fry, 1992; Cosgrove, 1993b).

Da Al das Wurzellängenwachstum beeinflusst und Al zuerst und in großen Mengen im Apoplasten gebunden wird, erscheint es angebracht, die Wechselwirkung zwischen Zellwand und Al zu untersuchen. Dieser Ansatz ist nicht neu, bereits in den sechziger Jahren haben Rorison (1965) und Clarkson (1967) in die Diskussion gebracht, daß Al an die negativen Ladungen der Zellwand bindet, die im Apoplasten vorwiegend von den Carboxylgruppen des Pektins zur Verfügung gestellt werden (Carpita und Gibeaut, 1993). Aus diesem Grund erschien es zunächst sinnvoll, sich mit Pflanzen zu beschäftigen, deren Pektingehalt bzw. Zusammensetzung der Zellwand grundverschieden ist.

Die primäre Zellwand besteht grundsätzlich aus mehreren einzelnen, aber co-existenten Polymernetzwerken (Bacic et al., 1988; Carpita und Gibeaut, 1993). Es wurde eine Klassifizierung in zwei verschiedene Zellwandtypen vorgenommen, die bestimmte Pflanzengruppen umschließen. Dicotyle und nicht-graminäe Monocotyle gehören zum Typ I und graminäe Monocotyle zum Typ II (Carpita und Gibeaut, 1993). Als Beispieldpflanzen für Typ I wurden in dieser Arbeit Ackerbohne, aber auch Kartoffel, und für Typ II Mais verwendet. Die Zellwände des Typs I bestehen aus verflochtenen Netzwerken aus Cellulose/Xyloglucan, Pektin und Strukturproteinen wie z.B. dem Glycoprotein Extensin (Miller und Fry, 1992). Die Wände von Typ II bestehen aus einem Netzwerk aus Cellulose und Glucuronoarabinoxylan, welches in Glucanen mit unterschiedlicher Verknüpfung eingebettet ist und einen geringen Anteil an Pektin, Xyloglucan und Extensin-ähnlichen Proteinen aufweist. Die Netzwerke sind über

Wasserstoffbrückenbindungen evt. aber auch über kovalente Bindungen verknüpft (Carpita und Gibeaut, 1993). Der Hauptunterschied zwischen den beiden Zellwandtypen, der für die Bindung von Al relevant ist, besteht daher im Pektingehalt.

Pektin ist ein Polysaccharid aus α -1,4-D-Galakturonan, welches Rhamnose-Reste, aber auch neutrale Seitenketten besitzen kann (Jarvis et al., 1988). Rhamnose-reiche Segmente des Pektins verzweigen oft in Seitenketten aus Arabinogalaktan und besitzen häufig einen hohen Grad an Methylierung. Unverzweigte Segmente mit wenigen Rhamnoseeinheiten wechseln sich ab mit stark verzweigten Bereichen (Jarvis, 1984). Die Pektine werden im Golgi Apparat gebildet (Zhang und Staehelin, 1992), wobei zuerst das Gerüst synthetisiert wird. Anschließend werden die Galakturonsäureeinheiten am C₆ im Endomembransystem methyliert (Vannier et al., 1992; Delmer und Stone, 1988), so daß es in hochmethyliertem Zustand sezerniert und in die Zellwand entlassen wird (Liners und van Cutsem, 1992). Die Demethylierung des Pektins erfolgt im Apoplasten durch Pektinmethylesterase (PME, Gaffe et al., 1992), ein Enzym, das zu ca. 97% im Apoplasten lokalisiert ist (Goldberg et al., 1992).

Wie nach Carpita und Gibeaut (1993, und Referenzen darin) zu erwarten war, waren die Pektingehalte der Ackerbohne höher als bei Mais (Abb. 20). Es zeigte sich dabei auch, daß es einen Gradienten der Gehalte entlang der Wurzel gab. So waren sowohl bei Mais als auch bei Ackerbohne die Gehalte im ersten Millimeter der Wurzelspitze am höchsten, aber auch das nächste Segment hatte höhere Gehalte als der Rest der Wurzel. Der besonders hohe Gehalt an Pektin im ersten mm-Segment ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß sich an den Wurzeln Mucilage befand, die verschiedene Bestandteile enthält, unter anderem auch Pektine bzw. Galakturonsäuren (Peretto et al., 1990; Harris und Northcote, 1970).

Nicht nur die longitudinale Verteilung von Pektin war unterschiedlich, sondern auch die radiale Distribution (Abb. 18, 19). Dabei ist es wichtig zu betonen, daß sich mit der Färbung durch Ruthenium Rot nicht Pektin im allgemeinen nachweisen läßt, sondern nur eine bestimmte Art von Pektin, da der Farbstoff Ruthenium Rot nur an vorwiegend unmethyliertes Pektin bindet (Sterling, 1970). Dabei wurde deutlich, daß sich unmethyliertes Pektin vorwiegend in der Rhizodermis und in der Cortex befindet, und weniger Schichten bei Mais damit versehen waren als bei Ackerbohne. Die Unterschiede im Pektin zwischen den untersuchten Pflanzen standen im Zusammenhang mit der Al-Verteilung, so wies die Ackerbohne nicht nur die höchsten Pektin- sondern auch die höchsten Al-Gehalte auf. Darüber hinaus hatte sich bei den LAMMA-Messungen (Kap. 4.2) gezeigt, daß Al bei Mais in tiefere Zellschichten vordrang als bei Ackerbohne (Abb. 11, 12), was damit erklärt werden kann, daß bei Ackerbohne Al bereits in den ersten Zellschichten mehr Bindungsplätze fand und auf diese Weise die Retention größer war als bei Mais, wo mehr Al frei passieren konnte.

Sowohl die quantitativ als auch qualitativ unterschiedliche Verteilung von Pektin läßt sich im Zusammenhang mit der Literatur verstehen, da sich gezeigt hat, daß Pektin die physikalischen Eigenschaften der Zellwand stark beeinflussen kann und auf diese Weise mit der Funktion bzw. dem Alter der Zellwand in Beziehung steht (McCann et al., 1994; MacDougall et al., 1996; Goldberg et al., 1996; Bush und McCann, 1999). Diese Zusammenhänge sind für Al-Toxizität von besonderem Interesse und sollen an späterer Stelle ausführlich diskutiert werden (Kap. 4.6).

Der Vergleich zweier Pflanzenarten zur Untersuchung der Bedeutung des Apoplasten für Al-Toxizität hat jedoch den Nachteil, daß unterschiedliche Mechanismen vorliegen können, die Al-Toxizität ebenfalls modifizieren, wie z.B. die Ausscheidung von organischen Anionen (Delhaize et al., 1993b; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000). Aus diesem Grund wurde der Pektingehalt bei Wurzeln und Zellsuspensionskulturen von Mais verändert. Dazu wurden die in Nährlösung kultivierten Pflanzen bzw. die Zellkulturen an Salzstreß (150 mM bzw. 200 mM NaCl) adaptiert. Die Adaptation führte zu einer Erhöhung des Pektingehalts wie sie auch von Zhong und Läuchli (1993) bei Baumwollwurzeln und McCann et al. (1994) für Tabakzellkulturen beschrieben wurde. Dieser Anstieg des Pektingehalts war vermutlich das Resultat der Cellulosesynthesehemmung, möglicherweise bewirkt durch eine Störung der Plasmamembranintegrität (Zhong und Läuchli, 1988). Aber auch durch die Behinderung der Abgabe von uronsäurereichem Material aus der Zellwand kann es zur Erhöhung des Pektingehalts kommen (Iraki et al., 1989). Die Adaptation der Pflanzen führte zur Reduktion des Wurzelängenwachstums, die jedoch nicht durch osmotische Effekte verursacht worden war, sondern eher durch eine Festigung der Zellwand (Pritchard et al., 1987; Cramer et al., 1988).

Ein wesentlich höherer Pektingehalt bei den Maiszellkulturen (Abb. 25) konnte durch die Adaptation an 2,6-Dichlorbenzonnitril (DCB) erreicht werden, was ebenfalls von Shedletzky et al. (1990; 1992) bei Tomate, Tabak und Gerste festgestellt werden konnte. DCB ist ein Herbizid, das die Cellulosesynthese hemmt, indem es die Einbindung von Glukose in das Cellulose-Molekül behindert (Edelmann und Fry, 1992) und die Anordnung der Cellulosefibrillen stört (Bergfeld et al., 1988). DCB wurde früher bereits zur Erforschung von Synthese und Struktur der Zellwand verwendet (Wells et al., 1994; Shedletzky et al., 1990; 1992). Die Erhöhung des Pektingehalts ergibt sich aus der Notwendigkeit, daß die Zelle ohne den üblichen Gehalt an Cellulose dem Turgordruck standhalten muß, wobei die fehlende Cellulose überwiegend durch Xyloglukan, aber auch Pektin ersetzt wurde (Shedletzky et al., 1992).

Eine weitere Änderung des Pektingehalts von Wurzelspitzen (Tab. 2) und Maissuspensionszellen (Abb. 25) wurde durch die Behandlung mit Enzymen erreicht. Sowohl Pektinase als auch Pectolyase sind Enzyme, die Pektin abbauen (Rexova-Benkova und Markovic, 1976). In ersten Versuchen erwies sich die eingesetzte Pectolyase als effizienter als Pektinase und wurde aus diesem Grund weiter verwendet. Später zeigte sich, daß Pectolyase-behandelte

Zellen einen besonders niedrigen Methylierungsgrad im Pektin aufwiesen (Abb. 42), was mit der Substratspezifität des Enzyms erklärbar ist. Während Pektinase Pektin mit niedrigem Methylierungsgrad bevorzugt, ist Pectolyase bei Pektin mit hohem Methylierungsgrad effektiver (Baldwin und Pressey, 1989), so daß nach der Behandlung mit Pectolyase vorwiegend unmethyliertes Pektin in der Zellwand verblieb.

Aber nicht nur der Pektingehalt, sondern auch die Qualität des Pektins bzw. die Anzahl der freien Carboxylgruppen im Pektin konnte variiert werden. Die Spaltung von Methylestern im Pektin wird von dem Enzym Pektinmethylesterase (PME) katalysiert. Dabei entsteht Methanol und eine freie Carboxylgruppe (Rexova-Benkova und Markovic, 1976). Die Behandlung von Zellen oder Wurzelspitzen von Mais mit dem Enzym sollte also zu einer Verringerung des Methylierungsgrads führen. Zwar war der Methylierungsgrad bei den Wurzeln nicht bestimmt worden, aber anhand der Zellkulturen läßt sich erkennen, daß die Behandlung mit PME tatsächlich den Methylierungsgrad veränderte (Abb. 42). Dabei war das Enzym unterschiedlich erfolgreich. Bei den NaCl-adaptierten Zellen kam es zu einer deutlichen Reduktion des Methylierungsgrads, nicht jedoch bei den normalen Zellen. Dieser Unterschied ist eine Konsequenz aus den Voraussetzungen für die kinetischen Eigenschaften von PME. Nari et al. (1991) postulierten, daß PME für die Demethylierung von Pektin eine freie Carboxylgruppe in der Nähe zum Substrat (dem Methylester am Pektin) vorfinden muß. Zellen mit einem höheren Pektingehalt und niedrigem Methylierungsgrad wie die NaCl-adaptierten Zellen bieten in diesem Fall bessere Voraussetzungen für die Enzymaktivität, was in einer effektiveren bzw. schnelleren Demethylierung resultierte als bei den normalen Zellen.

Mit Hilfe der Gentechnik konnten Pflanzen hergestellt werden, die PME überexprimieren bzw. als PME-antisense-Pflanzen transformiert wurden und von der Arbeitsgruppe Fisahn (MPI, Golm) zur Verfügung gestellt wurden.

4.4 Parameter zur Bestimmung von Al-Toxizität

Um die Auswirkung von Al-Toxizität erfassen zu können, mußte zunächst ein geeigneter Parameter gefunden werden. Dabei haben sich Nährlösungsversuche mit jungen Pflanzen bewährt. Die Nährlösung wird dabei den Bedürfnissen der Pflanzen, aber auch den Bedingungen von Al-toxischen Böden (wenig Calcium und Phosphat, niedriger pH-Wert) angepaßt. Die Problematik der Entwicklung eines geeigneten Inkubationsmediums ist bei Taylor (1995) beschrieben. Das Wurzelwachstum wird dann über einen bestimmten Zeitraum verfolgt, der von der Wachstumsrate bestimmt wird - je schneller eine Pflanze wächst, desto früher kann zuverlässig die Wirkung von Al bestimmt werden. So ist es bei Mais möglich, die Beeinflussung des Wachstums bereits nach 30 bis 90 min nachzuweisen (Llugany et al.,

1995). Bei der Bestimmung des Wachstums von Ackerbohne, Kartoffel und Mais hat sich eine Behandlungsdauer von einem Tag als geeignet erwiesen, was auch mit Ergebnissen von Collet (pers. Mitteilung) übereinstimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Wüchsigkeit von Pflanzenarten, aber auch von einzelnen Genotypen (Abb. 1, 5, 32) ist es wenig sinnvoll, das absolute Wachstum zu vergleichen. Statt dessen wurde das relative Wachstum (Kontrolle = 100%) bestimmt, ein Verfahren, das auch in der Literatur üblich ist (Horst et al., 1997; Sapro et al., 1982). Über den in dieser Arbeit verwendeten Mais-Genotyp Helix lagen bisher noch keine Daten zur AI-Empfindlichkeit vor. Aus diesem Grund wurde er zusammen mit einem empfindlichen (Lixis) und resistenten (ATP-Y) (Llugany et al., 1995; Horst et al., 1997) Genotyp untersucht. Anhand des relativen Wurzellängenwachstums konnte festgestellt werden, daß der Genotyp Helix AI-empfindlich war, ebenso wie die verwendete Ackerbohnenart Herz Freya (Abb. 1B). Somit standen zwei Pflanzen mit unterschiedlichem Zellwandtyp zur Verfügung, die sich in ihrer AI-Empfindlichkeit kaum voneinander unterschieden.

Die Bestimmung des Wurzellängenwachstums als System zum Screening von Genotypen auf AI-Empfindlichkeit hat sich zwar bewährt, ist jedoch zeitlich sehr aufwendig, und hat den Nachteil, daß sich kurzfristige (2 h) Wirkungen von AI nicht zuverlässig erfassen lassen. Aus diesem Grund wurde nach Alternativen gesucht. Kalloseinduktion als Folge von AI-Wirkung wurde erstmals von Wissemeier et al. (1987) für Sojabohnenwurzeln beschrieben und erfolgt ausschließlich in der Rhizodermis und den äußeren Cortezellen. Kalloseinduktion ist zwar einer der Faktoren die Resistenz gegenüber Pathogenen ausmacht (Bayles et al., 1990), ist aber nicht in der Lage, AI-Toxizität zu vermindern. AI-induzierte Kallosebildung ist als Parameter für die Schädigung zu sehen. Mit steigendem AI-Angebot kam es bei den hier untersuchten Pflanzen zu einer Steigerung der Kalloseinduktion und einer Zunahme der Hemmung des Wurzellängenwachstums (Abb. 2, 6, 34). Auch aus der Literatur ist Kalloseinduktion als sensitives Zeichen von Schädigung durch AI bekannt und konnte bereits nach 30 min in Wurzelspitzen (Wissemeier und Horst, 1995; Zhang et al., 1994) und bei Protoplasten sogar schon nach 15 min (Schmohl, 1994) bestimmt werden. Darüber hinaus hat sich in einigen Fällen auch gezeigt, daß Kalloseinduktion als Parameter geeignet ist, um genotypische Unterschiede in der AI-Resistenz aufzuzeigen. So bestand eine negative, signifikante Beziehung zwischen dem relativen Wurzellängenwachstum und der Kalloseinduktion bei den untersuchten transgenen Linien von Kartoffel (Abb. 36), aber auch für Mais ist eine solche Beziehung beschrieben worden (Horst et al., 1997; Massot et al., 1999). Im Gegensatz dazu haben Larsen et al. (1996) bei Mutanten von Arabidopsis nicht immer einen Zusammenhang zwischen der Hemmung des Wurzelwachstums und der Kalloseinduktion finden können. Auch beim Vergleich von verschiedenen Pflanzenarten innerhalb der vorliegenden Arbeit erwies sich die absolute Kalloseinduktion durch AI nicht als geeigneter Parameter, da die Kal-

loseinduktion bei Ackerbohne wesentlich geringer war als bei einem sensitiven Mais, das Wachstum jedoch in gleichem Maße eingeschränkt war (Abb. 1, 2).

Auch für Zellkulturen ist die Kalloseinduktion als geeigneter Parameter für Al-Schädigung beschrieben worden (Steiß, 1995; Chang et al., 1999). Bei der hier verwendeten Maiszellkultur führte Al in einer Dosis-Effekt-Beziehung ebenfalls zur Kalloseinduktion. Allerdings war die Induktion sowohl bei den NaCl-adaptierten und kurzfristig mit Enzym-behandelten Zellen gegenüber den normalen Zellen vermindert, und bei den DCB-adaptierten Zellen ließ sich gar keine Kalloseinduktion feststellen. Um diese Effekte erklären zu können, ist es erforderlich, sich eingehender mit der Kallosebildung zu beschäftigen.

Kallose ist ein 1,3- β -D-Glukan, das einen Polymerisationsgrad zwischen 300 und 1200 aufweist (Hayashi et al., 1987) und dessen Grad an 1,6-Verzweigungen variieren kann (Kauss, 1996), wobei diese Verzweigungen vermutlich erst in der Zellwand vorgenommen werden (Hartland et al., 1991). Die Struktur des Kallosemoleküls, aber auch die sie umgebende Zellwand kann die Löslichkeit von Kallose stark beeinflussen. So ist sie nicht immer restlos in Lauge löslich, manchmal lösen sich Anteile erst in HCl oder DMSO, oder es müssen sogar Glukanasen eingesetzt werden um die Kallose vollständig zu erfassen (Kauss, 1989). Abgesehen von der Möglichkeit, daß sich verschiedene Pflanzenarten in ihrer Fähigkeit zur Kallosebildung unterscheiden können, ist die deutliche Differenz der Kallosebildung bei Ackerbohne, Kartoffel und Mais (Abb. 2) auch damit zu erklären, daß nicht gewährleistet werden konnte, daß die Kallose vollständig quantifiziert wurde. Deshalb wurde nach einer Möglichkeit gesucht, Kallose mit einer anderen Substanz zu induzieren, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzenmaterialien in der Kallosebildung und -extraktion zu erfassen. Dazu wurde Digitonin verwendet, ein Steroidsaponin, das aus den Samen des Roten Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) gewonnen wird. Es induziert die Kallosebildung vermutlich über Interaktion mit den Sterolen der Plasmamembran (Kauss et al., 1989).

Digitonin ist bereits von Waldmann et al. (1988) als effektiver Elicitor der Kallosesynthese bei Zellkulturen beschrieben worden und erwies sich auch bei Maiszellkulturen als geeigneter Elicitor (Abb. 27). Darüber hinaus ist Digitonin als Elicitor nicht spezifisch für eine Pflanzenart wie es z.B. bei pathogenen Elicitoren der Fall sein kann (Kauss, 1990) und ist weitgehend unabhängig von Resistenzmechanismen wie sie für Al beschrieben wurden, wie z.B. die Erhöhung des pH-Werts (Miyasaka et al., 1989; Degenhardt et al., 1998) oder die Ausscheidung von organischen Anionen, wie Citrat oder Malat (Delhaize et al., 1993b; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000), oder anderen Komplexoren (Basu et al., 1994; Horst et al., 1982). Die Digitonin-induzierte Kallosebildung wurde daher als Referenz herangezogen und die Al-induzierte Kallosebildung dazu in Relation gesetzt (Digitonin-Induktion = 100%), und dieser Parameter als relative Kalloseinduktion bezeichnet.

Innerhalb der neun verschiedenen Linien von Kartoffel, aber auch bei den untersuchten Maisgenotypen gab es keine Unterschiede in der Digitonin-induzierten Kallosebildung, so daß sich die genotypischen Unterschiede durch die Verwendung von relativer Kalloseinduktion als Parameter nicht veränderten. Im Vergleich von drei Pflanzenarten (Kartoffel, Mais, Ackerbohne) spiegelte die relative Kalloseinduktion den Einfluß von AI auf das Wurzel-längenwachstum wider (Kap. 3.1.1) und erwies sich somit als geeigneter Parameter zur Erfassung von AI-Toxizität.

Auch bei den unterschiedlich adaptierten und vorbehandelten Zellen wurde Digitonin zur Induktion von Kallose verwendet (Abb. 27, 28). Bei den NaCl-adaptierten Zellen war die Kalloseinduktion wesentlich geringer als bei den normalen, nicht-adaptierten Zellen und nahm erst nach längerer Weiterkultivierung in Abwesenheit von NaCl wieder zu. Da die Zellen vor dem Versuch für 2 d ohne Salzstreß kultiviert worden waren und sich die Salzgehalte der Zellen normalisiert hatten, ist ein direkter Einfluß von NaCl auszuschließen. Bei den DCB-adaptierten Zellen blieb die Kalloseinduktion, unabhängig vom Elicitor, vollständig aus. Dies ist besonders interessant, da es die Hypothese unterstützt, daß Kallose und Cellulose vom gleichen plasmamembranständigen Enzymkomplex synthetisiert werden. Dabei wird die Frage, ob Cellulose oder Kallose gebildet wird, durch den Gradienten von Ca^{2+} zwischen Symplast und Apoplast entschieden (Amor et al., 1995; Robinson, 1996), wobei der Influx von Ca^{2+} Bestandteil der Signaltransduktionskette für Kallose ist (Kauss et al., 1991). Wenn es sich tatsächlich um einen solchen Enzymkomplex handelt oder die beiden Enzyme zumindest große Homologie aufweisen, ist es wahrscheinlich, daß der Cellulosesyntheseinhibitor DCB (Edelmann und Fry, 1992) auch die Kallosesynthese hemmt. Analog dazu läßt sich wohl auch erklären, daß die NaCl-adaptierten Zellen eine verringerte Kalloseinduktion aufwiesen, da hier NaCl die Plasmamembranintegrität beeinflusst (Zhong und Läuchli, 1988), was zur Störung der Cellulose- und somit auch der Kallosesynthese führen könnte. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, daß die Zellwandänderungen, die durch Adaptation an NaCl und DCB entstanden sind, die Extraktion von Kallose beeinflussen. So war es auch bei den Zellkulturen angebracht, die relative Kalloseinduktion als Parameter für AI-Toxizität zu verwenden.

Genaugenommen ist die Kalloseinduktion der einzige Parameter, der in kurzzeitigen Versuchen (2 h) mit Zellkulturen zur Verfügung stand, da innerhalb dieser Zeit weder das Wachstum noch die Vitalität derart durch AI beeinflusst waren, als daß man diese als Parameter hätte verwenden können. Sowohl Wachstum als auch Vitalität sind in der Literatur erst nach ein oder mehreren Tagen bestimmt worden (Yokota und Ojima, 1995; Koyama et al., 1995). Bei den hier verwendeten Zellkulturen konnte der Einfluß von AI auf die Vitalität erst nach 12 h mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden, zeigte dann jedoch eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kalloseinduktion nach 2 h (Schmohl und Horst,

2000). Dies untermauert die Eignung der Kalloseinduktion als Parameter für Al-Toxizität bei den Zellkulturen.

In der Literatur ist die Akkumulation von Al in der Wurzel als Zeichen für Al-Sensitivität beschrieben worden (Delhaize et al., 1993a; Llugany et al., 1994; Rincon und Gonzales, 1992; Massot et al. 1999). Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Kationenaustauschkapazität (CEC), der Bindung von Al im Apoplasten und der Hemmung des Wurzellängenwachstums bei *Picea abies* beschrieben (Godbold und Jentschke, 1998). Dies konnte in eigenen Versuchen bestätigt werden, denn sowohl bei Mais als auch bei Kartoffel wiesen Genotypen, deren Wachstum besonders stark von Al gehemmt war, auch die höchsten Al-Gehalte in den Wurzelspitzen auf (Abb. 4, 36). Auch bei den Zellkulturen bestand ein Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Al und der relativen Kalloseinduktion (Abb. 31). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß eine vermehrte Bindung von Al im Apoplasten zur stärkeren Hemmung des Wurzelwachstums bzw. einer stärkeren Schädigung führte.

4.5 Apoplast und Al

Carboxylgruppen im Apoplasten stellen die meisten Bindungsstellen für Al dar. Diese Bindungsstellen definieren die Kationenaustauschkapazität (CEC) und bilden einen Gradienten im elektrischen Potential, welches die Bindung und Verteilung von Ionen im Wurzelapoplasten bestimmt. Kinraide et al. (1992) haben dieses Konzept verwendet, um zu erklären, wie H^+ , Ca^{2+} und andere Kationen die Aktivität von Al^{3+} an der Plasmamembran schwächen können. Blamey et al. (1990), aber auch Grauer und Horst (1992) und Horst (1995) schlußfolgerten ebenfalls, daß der Apoplast eine wichtige Rolle für Al-Toxizität spielt, wobei nach ihrer Theorie die Bindung von Al an Al-sensitive Stellen im Apoplasten zur Hemmung des Wurzellängenwachstums (WLW) führt. Die Bedeutung der Bindungsstellen im Apoplasten wird durch andere Arbeiten weiter unterstützt, die zeigen konnten, daß es eine negative Beziehung zwischen der CEC, der Al-Akkumulation und der Adaptation von Genotypen an saure, Al-toxische Böden gab (Blamey et al., 1990; Büscher et al., 1990; Maison und Bretsch, 1997). Wurde jedoch eine größere Anzahl an Genotypen untersucht, konnte eine solche Beziehung nicht mehr gefunden werden (Grauer, 1992; Wagatsuma et al., 1997). Horst (1995) erklärte das damit, daß diese Beziehung durch andere Resistenzmechanismen verwässert wurde, die von ebenso hoher oder noch stärkerer Bedeutung sind, wie z.B. die Abgabe von Komplexoren (Delhaize et al., 1993b; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000, Li et al., 2000, Horst et al., 1982, Basu et al., 1994). Ein weiterer Kritikpunkt ist in der Bestimmung der CEC zu sehen. So wurde zum Teil mit ganzen Wurzeln bzw. isoliertem Zellwandmaterial (Wagatsuma et al., 1997) gearbeitet, was dazu führt, daß nicht ausschließlich der Bereich

der Wurzel erfaßt wurde, der für Al-Toxizität relevant ist. Im allgemeinen gilt, daß nur die Wurzeloberfläche, Rhizodermis und Cortex für Al-Toxizität wichtig ist (Delhaize et al., 1993a; Wagatsuma et al., 1997; Fujii, 1997). Auch die longitudinale Empfindlichkeit ist sehr unterschiedlich, so konnte bei Mais der Bereich 1-2 mm Entfernung von der Wurzelspitze als besonders empfindlich identifiziert werden (Sivaguru und Horst, 1998; Sivaguru et al., 1999a). Aus diesem Grund sollte bei Untersuchungen zur CEC und Al-Toxizität nur mit intakten Wurzeln bzw. Wurzelspitzen gearbeitet werden. Damit wird gewährleistet, daß vor allem die Wurzeloberfläche erfaßt wird - der Bereich, der mit Al in Kontakt kommt - so wie Godbold und Jentschke (1998) ihre Versuche durchführten.

Wurde bei Maiswurzeln die CEC verändert, kam es ebenfalls zur Änderung der Al-Empfindlichkeit. Wurde der Pektingehalt durch Adaptation an Salzstreß erhöht, zeigten sich diese Pflanzen empfindlicher gegenüber Al, insofern als das Wurzellängenwachstum stärker gehemmt und die Al-Gehalte, aber auch die Kalloseinduktion höher waren als bei Pflanzen mit normalem Pektingehalt (Kap. 3.3.3.2). Wurden Wurzelspitzen mit Enzym behandelt, das den Pektingehalt verminderte (Pectolyase, Tab. 2) wurde weniger Al gebunden. Wurde ein Enzym eingesetzt, was zu einer Erhöhung der Anzahl an Carboxylgruppen im Pektin führte (PME, Tab. 3), kam es zur Erhöhung der Al-Gehalte. Diese ersten Ergebnisse ermutigten, sich den Pektingehalt der Wurzeln genauer anzusehen.

Bei der Untersuchung der Wurzelspitzen von Mais und Ackerbohne zeigte sich, daß Pektin nicht gleichmäßig in der Wurzel verteilt war. Sowohl Mais als auch Ackerbohne wiesen in der Wurzelspitze höhere Pektingehalte auf als in mehr basal gelegenen Wurzelzonen (Abb. 20). Zwischen den Pektingehalten einzelner Wurzelsegmente und den Al-Gehalten bestand eine hochsignifikante, positive Beziehung (Abb. 21A). Bei der Betrachtung der Al-Schädigung zeigte sich jedoch, daß der erste Millimeter zwar die höchsten Pektin- und Al-Gehalte aufwies, sich jedoch die maximale Schädigung des Gewebes erst im darauffolgenden Bereich 1-2 mm zeigte, der „Distalen Transitionszone“, dem Bereich, in dem sich die Zellen von mitotischer Teilung auf schnelles Elongationswachstums umstellen (DTZ; Baluška et al., 1996b), was bei Mais mit Ergebnissen von Sivaguru und Horst (1998) übereinstimmt. Der hohe Pektingehalt der Wurzelspitze ist damit zu erklären, daß sich hier Mucilage befindet. Mucilage besteht aus einem Gemisch an Polymeren, das je nach Pflanzenart sehr unterschiedlich zusammengesetzt sein kann (Chaboud, 1983; Rougier, 1981). Mucilage enthält oft einen hohen Anteil an uronsäurehaltigem Material (Peretto et al., 1990 und Referenzen darin). Für Mais haben Harris und Northcote (1970) Glucose, Galaktose, Fucose und Uronsäuren als Hauptkomponenten bestimmt. Aufgrund der Ladung sind es vor allem Uronsäuren, die Grundelemente des Pektins, die Al stark binden können (Archaumbault et al., 1996).

Zhang und Taylor (1989) haben bei der Al-Aufnahme bei Weizen zwei Phasen unterscheiden können. Eine Phase der sehr schnellen Aufnahme, die innerhalb von 30 min abgeschlossen

ist, und eine Phase der langsameren, nahezu linearen Aufnahme. Die Phase der schnellen Aufnahme schrieben sie der Bindung von Al in der Mucilage und dem Apoplasten zu. Die Bindung von Al an Mucilage verringert lokal die Toxizität, da sie Al komplexiert (Horst et al., 1982; Puthota et al., 1991; Li et al., 2000). Dies macht verständlich, warum im ersten Millimetersegment die Pektin- und Al-Gehalte bei Mais und Ackerbohne hoch waren, aber die Schädigung nur sehr gering ausfiel.

Interessant bleibt die Feststellung, daß bei Mais die sogenannte „DTZ“ (1-2 mm) die Al-sensitivste Zone darstellt, aber die Elongationszone (EZ) sich im Bereich 2,5-5 mm befindet (Blancaflor et al., 1998; Pilet et al., 1983) und auch nur dort das Wachstum durch Al gehemmt wird (Sivaguru und Horst, 1998; Sivaguru et al., 1999a). Dies deutet darauf hin, daß es zu einem Informationsaustausch zwischen diesen Zonen kommt. Das Model eines Al-"Signals", das von der Wurzelhaube aus vermittelt wird, wurde von Bennet et al. (1985) und Bennet und Breen (1991) vorgestellt. Inzwischen haben Ryan et al. (1993) gezeigt, daß die Wurzelhaube keine besondere Rolle in der Rezeption von Al-Toxizität spielt. Ergebnisse von Kollmeier et al. (2000) deuten darauf hin, daß ein Signal zwischen der Zone 1-2 mm und der EZ über Beeinflussung des basipetalen Auxinflusses übertragen werden könnte. Auf die Bedeutung von Auxin in diesem Zusammenhang soll später noch einmal eingegangen werden.

Auch bei den Zellkulturen zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen den Pektin- und Al-Gehalten bzw. dem Gehalt an Pektin und Al und dem Ausmaß der Schädigungssymptome in Form der relativen Kalloseinduktion (Abb. 30, 31). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß der Methylierungsgrad des Pektins eine wichtige Rolle spielte. So wurde mit längerer Behandlungszeit der NaCl-adaptierten Zellen mit PME mehr Al gebunden und es kam zu einer verstärkten Schädigung der Zellen (Abb. 40, 41), was auf eine Veränderung der Anzahl von Carboxylgruppen in der Zellwand zurückzuführen war. Wurden alle untersuchten, unterschiedlich vorbehandelten Zellkulturen betrachtet, zeigte sich, daß es mit steigendem Methylierungsgrad zur Abnahme der Al-Bindung kam (Abb. 43A). Allerdings erfolgte dies unter der Voraussetzung, daß die Pectolyase-behandelten Zellen von der Korrelation ausgeschlossen wurden, welche wesentlich niedrigere Al-Gehalte aufwiesen, als von der Korrelation vorausgesagt wurde. In Anbetracht der Tatsache, daß Pectolyase eine höhere Affinität zu methyliertem Pektin aufweist (Baldwin und Pressey, 1989), wurde bei diesen Zellen vorwiegend methyliertes Pektin abgebaut, so daß das übrige Pektin einen niedrigen Methylierungsgrad aufwies. Da allerdings auch der Pektingehalt niedrig war, ist es nicht weiter verwunderlich, daß nur wenig Al gebunden wurde. Offensichtlich ist der Methylierungsgrad als solcher nicht absolut aussagekräftig, sondern es ist sinnvoller, den Gehalt an unmethyliertem bzw. wenig methyliertem Pektin anzugeben. Bei der Verwendung des Gehalts an unmethyliertem Pektin ergab sich über alle untersuchten Zelltypen hinweg eine

signifikante Beziehung zum Al-Gehalt und der Schädigung durch Al (Abb. 43B): je mehr unmethyliertes Pektin vorlag, desto mehr Al wurde gebunden und desto stärker wurden die Zellen geschädigt.

Interessant ist hierbei zu vermerken, daß zu dem Al-Gehalt der Zellen die Plasmamembran als Ladungsträger mit möglichen Bindungsplätzen für Al (Wagatsuma et al., 1995, Wagatsuma und Akiba, 1989) nur einen geringen Beitrag leistete, andernfalls hätten die Pectolyase-behandelten Zellen höhere Gehalte aufweisen müssen. Bei den Pectolyase-behandelten Zellen war der Pektingehalt deutlich reduziert, so daß im Apoplasten eine große Anzahl von möglichen Bindungsplätzen gegenüber den normalen Zellen fehlte, was letztendlich bedeutet, daß Al in geringerem Maß in der Zellwand ausgetauscht und absorbiert werden kann. Dies sollte dazu führen, daß Al schneller zur Plasmamembran vordringen und dort gebunden oder sogar aufgenommen werden kann. Außerdem kann man aus dieser Beobachtung ableiten, daß die Bindung von Al an die Plasmamembran in den hier durchgeführten Versuchen zu geringeren Schäden führte als das Al, das am Pektin gebunden wurde.

Im Gegensatz zu der gerade vorgestellten Bedeutung des Methylierungsgrads für die Bindung von Al hatte der Veresterungsgrad nur einen geringen Einfluß auf die Al-Bindung an künstlichen Pektingelen (Blamey et al., 1997). Bei genauerer Betrachtung der Versuchsdurchführung fällt jedoch auf, daß zwei verschiedene Pektine benutzt wurden, die sich mit 15 bzw. 21% nur wenig im Veresterungsgrad unterschieden. Diese Spanne erscheint in Anbetracht der hier verwendeten Variation bei Zellkulturen als zu gering und reflektiert auch nicht die im Laufe der Gewebeeralterung vorkommenden Änderungen, wie sie von McCann et al. (1994) mit einer Spanne von 53-78% beschrieben wurden.

Die Auswirkung der Methylierung von Pektin auf die Al-Toxizität ließ sich mit den transgenen Linien von Kartoffel, bei denen das Enzym PME inhibiert (Antisense) oder überexprimiert vorlag auch indirekt demonstrieren. Mit steigendem Expressionsgrad von PME kam es zur vermehrten Empfindlichkeit gegenüber Al, d.h. das Wurzellängenwachstum wurde stärker gehemmt und die Wurzeln wiesen höhere Al-Gehalte und Kalloseinduktion auf (Abb. 34). Dies mag nicht nur an bereits vorliegenden Änderungen des Apoplasten durch die Transformation (Pilling, 1999) liegen, sondern auch daran, daß Al die PME aktiviert (Abb. 38), was zur Vermehrung der möglichen Bindungsstellen für Al im Apoplasten führen kann. Die Beeinflussung von PME durch Al wird an späterer Stelle weiter ausgeführt.

4.6 Zellwand, Wachstumsprozesse und Al

Nachdem festgestellt wurde, daß ein größerer Gehalt an Pektin zu mehr Al-Bindung und Schädigung führte, drängt sich die Frage auf, wie die Bindung von Al im Apoplasten zu Schäden führen kann und wie die Hemmung des Wachstums hervorgerufen wird.

Für das Wurzellängenwachstum ist eine gerichtete Zellvergrößerung, also die Elongation der Zellen nötig. Die physikalische Voraussetzung dafür ist, daß sich die Zellwand "entspannt", was bedeutet, daß der Zusammenhalt der Zellwand vermindert wird ("Loosening", Carpita und Gibeaut, 1993). Dies ermöglicht die Aufnahme von Wasser, was dann zur Vergrößerung der Zelle führt (Cosgrove, 1993a). Wenn Phytohormone oder andere Substanzen die Zellwachstum modifizieren, dann geschieht das üblicherweise über die Änderung von Zellwand-eigenschaften (Cosgrove, 1997), so geht die Auflockerung der Zellwand einher mit verstärkter Aktivität von 1,4- β -Glukanasen, und auch nach der Induktion des Wachstums durch Auxin konnte ein starker Turnover von Matrixglukanen beobachtet werden (Hoson, 1993 und Referenzen darin).

Die Dehnbarkeit der Zellwand wird nicht zuletzt von der Zusammensetzung des Pektinanteils bestimmt. Wie bereits erwähnt, ist Pektin ein Polysaccharid, das sich in Polymerisationsgrad, Veresterungsgrad (sowohl Methyl- als auch Acetylcster) und Art und Länge der Seitenketten sehr stark unterscheiden kann (Jarvis et al., 1988). Das Pektin bildet mit Wasser und Ionen in der Zellwand eine Art Gel aus, auch als Pektinmatrix bezeichnet, in das die anderen Zellwandkomponenten, vor allem das Cellulosegerüst, eingebettet sind (Carpita und Gibeaut, 1993). Die Verteilung von Pektin kann sehr unterschiedlich sein, sowohl longitudinal (Abb. 20) als auch radial (Abb. 18,19). So wird Pektin bei Maiswurzeln sowohl in äußerer als auch innerer Cortex und Stele eingebaut, aber in stärkerem Umfang in die Rhizodermis (Roberts und Butt, 1968).

Die Festigkeit des Pektin gels ist ein wichtiger Faktor für das Zellwachstum (McCann et al., 1994) und wird beeinflusst von verschiedenen Faktoren wie dem Grad der Veresterung, pH-Wert, Ionenkonzentration, Kationensättigung, Temperatur und elektrischen Feldern (Tanaka et al., 1980; Tanaka et al., 1982). Die Gelstärke steigt mit zunehmendem Veresterungsgrad an und erreicht ihr Maximum bei einem Veresterungsgrad von 70%, sinkt dann aber bei 80% steil ab (Morris et al., 1980). McCann et al. (1994) bestimmten den Veresterungsgrad von Pektinen von Tabakzellkulturen und fanden dabei einen Wechsel des Veresterungsgrads von 53 (exponentielles Wachstum) zu 78 (Elongationswachstum) zu 68% (stationäre Phase), was darauf hindeutet, daß der Veresterungsgrad und die Gelstärke eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen spielen. Auf der Basis des "eggbox model" (Grant et al., 1973; Powell et al., 1982) haben MacDougall et al. (1996) vorgeschlagen, daß hochverestertes Pektin in der Gegenwart von Ca^{2+} ein elastisches Gel bildet, während ein Gel mit

niedrigem Veresterungsgrad an Dehnbarkeit verliert. Die Dehnbarkeit des Pektinergels stellt einen wichtigen Faktor in der Regulation des Wachstums dar (Pritchard, 1994). Dabei kann die Auflockerung der Zellwand sehr lokal erfolgen, so konnte Pritchard et al. (1993) im Bereich 1-3 mm in der Wurzelspitze von Mais ein Maximum der Auflockerung bestimmen.

Die Spaltung von Pektinestern steht sowohl bei Monokotylen als auch bei Dikotylen mit der Einstellung des Wachstums in Zusammenhang und kann auf diese Weise zur Verfestigung der Zellwand beitragen (Yamaoka und Chiba, 1983; Yamaoka et al., 1983; Goldberg, 1984; Quentin et al., 1997). Die Anordnung von Pektinen in der Wand unterliegt der apoplastischen Kontrolle, da Pektine in hochmethyliertem Zustand sezerniert (Liners und van Cutsem, 1992) und erst im Apoplasten weiter modifiziert werden (Gaffe et al., 1992). Auf diese Weise wird das Pektin der Funktion in bestimmten Bereichen der Zellwand angepaßt. So ist zum Beispiel die Pektinzusammensetzung in Kartoffelknollen nicht homogen sondern unterliegt strikter räumlicher Kontrolle. Dabei ist mäßig unmethyliertes und methyliertes Pektin überall zu finden, aber Homogalakturonan, das für die Ca^{2+} -Querverknüpfung im Pektin verantwortlich ist, liegt vorwiegend in der äußeren Cortex vor (Bush und McCann, 1999). Die mechanische Beanspruchung in der Zellwand ist in den Zellecken am stärksten, wo die Zellen die Interzellularräume bilden (Goldberg et al., 1996). Um dieser Kraft zu widerstehen, sind diese Ecken reich an Ca^{2+} (Jauneau et al., 1998) und es kommt hier zu einer Anhäufung von unverzweigtem, unmethyliertem Pektin, welches dann zusammen mit dem Ca ein festes Gel ergibt (Goldberg et al., 1996).

Es ist anzunehmen, daß Al die Stärke des Pektinergels, und damit auch das Wachstum verändert, indem es direkt an Pektine bindet und die Kationensättigung verändert, vor allem die Verteilung von Ca^{2+} . Auch ist es denkbar, daß Al die Regulation des apoplastischen pH-Werts verändert, wie von Degenhardt et al. (1998) berichtet wurde und auf diese Weise das Pektinergel beeinflusst. Aber auch eine direkte, physikalische Wirkung ist denkbar, denn Cosgrove (1989) konnte zeigen, daß der „acid creep“ von isolierten Zellwänden des Gurkenhypokotyls durch 1 mM Cu^{2+} , Hg^{2+} oder Al^{3+} stark gehemmt wurde, während Ca^{2+} fast keinen Effekt hatte. An künstlichen Pektinergeln konnten Blamey und Dowling (1995) zeigen, daß Al zur Freisetzung von Ca aus dem Pektin führte, wobei auch Ca Al verdrängen konnte. Dabei ist das Mengenverhältnis entscheidend, zwei Teile Al verdrängten drei Teile Ca. Dieser Effekt läßt sich mit den Ladungen der beiden Ionen (Al^{3+} , Ca^{2+}) erklären, und könnte außerdem erklären, wie die Bindung von Al in der Pektinmatrix zu einer stärkeren Festigung des Gels führt als Ca. Im gleichen Versuchsansatz konnten Blamey und Dowling (1995) zeigen, daß der Wassergehalt des Gels reduziert war wenn mehr Al im Gel vorlag. Die Erklärung hierfür stellt ebenfalls die stärkere Festigkeit des Gels dar, denn auf diese Weise waren die Poren im Pektin kleiner, so daß weniger Wasser im Pektin gebunden werden konnte.

Während des Wachstums findet eine fortlaufende Veränderung der Pektine statt. Neue Pektine werden ähnlich wie Hemicellulose über den Golgiapparat bzw. über die Fusion von Vesikeln mit der Membran in die Zellwand geschleust (Liners und van Cutsem., 1992; Driouich et al., 1993) und eingebaut (MacDougall et al., 1996). Dort werden die Pektine deesterifiziert (Gaffe et al., 1992; McCann et al., 1994), durch pectolytische Enzyme abgebaut und an das Außenmedium abgegeben (Iraki et al., 1989), wobei die Abgabe von altem, abgebauten Pektin einen wichtigen Faktor für die Kontrolle des Wachstums darstellen kann (McCann et al., 1994; Asamizu et al., 1984; Chambat et al., 1997). Außerdem werden Pektine auch im Rahmen der Mucilagebildung an das Außenmedium abgeben.

Bei den hier untersuchten Zellkulturen konnte beobachtet werden, daß Al zu einer Hemmung der Abgabe von Pektinen an das Außenmedium führte (Abb. 49) und Puthota et al. (1991) konnten zeigen, daß Al nicht nur den sekretorischen Prozeß bei der Mucilagebildung hemmt, sondern auch die extrazelluläre Bewegung von Polysacchariden der Mucilage behinderte, was zu einer Anhäufung der Polysaccharide zwischen Plasmamembran und Zellwand führte. Wenn Al die Abgabe sowohl von altem Pektin als auch von Mucilage behindert, wird so der Austausch von altem gegen neues Pektin vermindert, was dazu führt, daß es zu einer Akkumulation von Pektin kommt, was die beobachtete Anschwellung der Zellwand (Eleftheriou et al., 1993) und Zunahme der Trockenmasse der Wurzeln nach Al-Behandlung (Blancaflor et al., 1998) erklären kann. Diese Akkumulation könnte außerdem interferieren mit der Phasentrennung von Pektinen, die wichtig ist, um die Deposition von neuem Pektin in der Wand zu regulieren (Masion und Bretsch, 1997). In eigenen Untersuchungen hatte sich in mikroskopischen Beobachtungen (nicht dargestellt) außerdem gezeigt, daß es bei Ackerbohne nach zwei Tagen mit 50 µM Al zu erhöhten Pektingehalten und zu einer Zunahme der Färbung mit Ruthenium Rot in der Wurzelspitze kam. Dies deutet darauf hin, daß die Inkubation mit Al auch zur Erhöhung des Anteils an unmethyliertes Pektin in der Rhizodermis und der äußeren Cortex führte. Die Tatsache, daß nach der Al-Behandlung mehr Pektin in unmethyliertem Zustand vorlag, könnte darauf zurückzuführen sein, daß durch die Behinderung der Abgabe das Pektin länger in der Zellwand verblieb und somit PME länger auf diese Pektin einwirken konnte. Dies verringerte den Methylierungsgrad und erhöhte auf diese Weise die Festigkeit des Pektinogels, was wiederum das Wachstum behindern kann (s.o.).

Der Abbau von Pektin in der Zellwand hat aber auch noch andere Bedeutungen. Pektinstücke, α -1,4-Oligogalakturonide, sind als apoplastische Signalmoleküle beschrieben worden, wobei sie verschiedene Prozesse in der Wand modulieren können, und die Auswirkung von Konzentration, Polymerisationsgrad, Pflanzenart und Wirkort in der Pflanze abhängig ist (Messiaen und van Cutsem, 1999 und Referenzen darin). Unter anderem kann es zur Bildung von H₂O₂ kommen (Legendre et al., 1993) bzw. es können Gene aktiviert werden, die bei der Pathogenabwehr eine wichtige Rolle spielen (Messiaen und van Cutsem, 1993). Die

biologische Aktivität ist besonders hoch, wenn der Polymerisationsgrad über neun liegt und das Oligogalakturonide mit Ca^{2+} eine Verbindung eingeht (Messiaen und van Cutsem, 1994). Das Pektinsignal kann vor und nach der Freisetzung moduliert werden, wobei seine Signalwirkung von den lokalen Gegebenheiten der Zellwand abhängt: der Kationenverfügbarkeit zur Regulation von pectolytischen Enzymen, dem Vorkommen von Polygalakturonase-Hemmstoffen (De Lorenzo et al., 1991), dem Methylierungs- und Acetylierungsgrad des Pektins (Jin und West, 1984) und dem pH-Wert in der Zellwand (De Lorenzo et al., 1991).

Es ist denkbar, daß Al die Bildung der Oligogalakturonide beeinflusst, entweder indem es an das Pektin bindet und auf diese Weise die Spaltung des Pektins verändert, aber auch durch Modifikation des Methylierungsgrads (s.o. und Kap. 4.7) von Pektin oder durch Beeinflussung der pectolytischen Enzyme. Im Moment ist dies noch reine Spekulation, aber es könnte verschiedene Prozesse erklären, die im Zusammenhang mit Al beobachtet wurden, wie z.B. eine erhöhte Aktivität von Peroxidase (Abb. 51). Auch hat sich gezeigt, daß die Oligogalakturonide zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen können (Messiaen und van Cutsem, 1994; Messiaen et al., 1993), was Bestandteil der Signaltransduktionskette bei Pathogenbefall (Kenton et al., 1999) und der Kalloseinduktion (Kauss et al., 1990) ist.

In der Literatur ist die Hypothese des "Acid Growth" immer wieder diskutiert worden (Rayle und Cleland, 1992; Pritchard, 1994). Kollmeier et al. (2000) konnten demonstrieren, daß Al zur Absenkung des pH-Werts an der Wurzeloberfläche eines sensitiven Maisgenotyps führte, bei dem toleranten Genotyp war dieser Effekt weniger ausgeprägt. Dieser Effekt wurde nur beobachtet, wenn die gesamte Wurzel oder der Bereich 1-2 mm entfernt von der Wurzelspitze mit Al behandelt wurde. Außerdem war die Änderung des pH-Werts nur in dem Bereich 1-2 mm besonders ausgeprägt. Die Elongationszone (4-6 mm, Baluška et al., 1996b) war nicht von der Al-induzierten pH-Absenkung beeinflusst, was erklärt, warum Al nicht entsprechend der „Acid Growth“-Theorie das Wachstum stimulierte.

Winch und Pritchard (1999) haben zeigen können, daß die Wachstumsstimulation durch niedrigen pH-Wert bei Mais nicht durch eine Änderung des Einzelzell-Turgors entsteht, auch der osmotische Druck und das Wasserpotential waren nicht durch den pH-Wert beeinflusst. Sie schlußfolgerten daraus, daß die Auflockerung der Zellwand nicht direkt vom pH-Wert beeinflusst wird, sondern der pH-Wert auf indirekte Weise, z.B. durch Aktivierung von bestimmten Enzymen dazu führt. Ein solches Enzym stellt die Xyloglucanendotransglycosylase (XET) dar, welche die Zellwand auflockert, indem sie Xyloglucanketten, die mit den Cellulosefibrillen über Wasserstoffbrücken verknüpft sind, trennt und neu verbindet (Smith und Fry, 1991). Es konnte gezeigt werden, daß schnelle Elongation, Auflockerung der Zellwand und hohe XET-Aktivität zusammenfallen (Pritchard et al., 1993; Wu et al., 1994), wobei das pH-Optimum für XET bei 5,5 liegt (Fry et al., 1992). Die von Kollmeier et al. (2000) gemessenen pH-Werte waren in der Elongationszone jedoch wesentlich niedriger (Kontrolle 4,6) als für

optimale XET-Aktivität erforderlich, was durch die gewählte Meßmethode erklärbar ist, denn der pH-Wert der Wurzeloberfläche spiegelt nur eine Relation zum apoplastischen pH wieder. So hat Felle (1998) im Bereich der EZ bei Mais einen pH von 5,5 im Apoplasten gemessen, was dem Optimum der XET entspricht. Interessant ist nun zu vermerken, daß bei den Kontrollen der pH-Wert der Wurzeloberflächen bei 4,6 lag und nach Al-Behandlung auf 4,5 absackte (Kollmeier et al., 2000). Wenn man davon ausgeht, daß sich diese Absenkung auch auf den Apoplasten ausweitet, dann könnte es zur Reduktion der XET-Aktivität kommen, weil nun der pH-Wert in der EZ zu niedrig ist.

Eine weitere Möglichkeit das „Acid Growth“ zu erklären, stellen Expansine dar. Expansine bestehen aus einer Klasse von Proteinen, die sich dadurch auszeichnen, daß sie sogar bei isolierten bzw. toten Zellwände Verlängerung induzieren (Cosgrove, 1993a). Sie können gewebespezifisch gebildet werden und spielen nicht nur für die Elongation eine wichtige Rolle, sondern auch für Blattbildung, Fruchterweichung und Zellwandabbau (McQueen-Mason und Rochange, 1999 und Referenzen darin). Die Zellwandelongation durch Expansine beruht wahrscheinlich darauf, daß Expansine die Wasserstoffbrücken zwischen den Cellulosefibrillen schwächen, die sich dann an anderer Stelle neu bilden (McQueen-Mason und Cosgrove, 1994; 1995). Dabei sind Expansine vom pH-Wert abhängig, so waren sie bei pH 4,5 effektiver als bei pH 7 (McQueen-Mason et al., 1992; Cosgrove, 1998 und Referenzen darin). Um ihre Wirkung zu entfalten, müssen Expansine in der Zellwand mobil sein. Abgesehen von möglichen Veränderung des pH-Werts durch Al könnte Al-Bindung in der Zellwand die Mobilität von Expansin einschränken, da sich bereits gezeigt hat, daß Al die Abgabe von Pektin und Protein vermindert (Abb. 48, 49), was in Kap. 4.9 näher diskutiert wird.

Die Einstellung des Wachstums während der Reifung ist meist nicht reversibel und wird begleitet von der Versteifung (Verfestigung) der Zellwand, wodurch sie ihre Flexibilität verliert (Kutschera, 1996). Dies wird verursacht durch strukturelle Veränderungen der Zellwand, bestehend aus einer verminderten Auflockerung der Zellwand, Zunahme von Querverknüpfung und Änderung der Zusammensetzung des Apoplasten (Cosgrove, 1997 und Referenzen darin). Solche Veränderungen werden u.a. durch die gezielte Aktivität bestimmter Enzyme verursacht, wie z.B. PME (Quentin et al., 1997) oder Peroxidase (Schopfer, 1996; Hoson et al., 1995; Goldberg et al., 1987).

Die Bestimmung von Enzymen im Hinblick auf Al-Effekte verursacht gewisse Probleme, wenn die direkte Wirkung von Al auf das Enzym bestimmt bzw. Al während des Enzym-Assays appliziert werden sollen, wie es z.B. beim Test für apoplastische Aktivität von Saurer Phosphatase der Fall war (Kap. 2.4.4 und Kap. 4.9). Zunächst muß gewährleistet sein, daß Al bei dem für die Bestimmung des Enzyms benötigten pH-Wert in Lösung bleibt, denn oberhalb von pH 5 ist Al nur wenig löslich und nicht toxisch (Foy et al., 1978). Bei der Bestimmung von Saurer Phosphatase war die Frage des pH-Werts unproblematisch, da das pH-

Optimum diese Enzyms bei pH 4,5 liegt (Pfeiffer, 1998), einem pH-Wert bei dem ausreichend toxisches Al vorliegt. Anders sieht es bei Enzymen wie Peroxidase und PME aus. PME hat eine Optimum von 7 - 8 (Bordendave, 1996 und Referenzen darin) und bei Peroxidase kann es sehr unterschiedlich sein, aber es liegt oft im Bereich von 6 - 7 (De Marco et al., 1999). Ein weiteres Problem bei der Bestimmung von Al-Effekten auf Enzymaktivitäten ist in der Notwendigkeit zu sehen, den pH-Wert während der Bestimmung stabil zu halten, was im allgemeinen mittels biologischer Puffer erreicht wird. Die Puffer, die für den Al-relevanten pH-Bereich von 4,3 - 4,7 in Frage kommen und pflanzenverträglich sind, führen jedoch zur Komplexierung von Al, was die Toxizität vermindert. Berechnung mit GEOCHEM-PC (Parker et al., 1992) zeigen, daß bei einer Kombination aus 50 µM Al mit 50 mM Acetat kein monomeres, phytotoxisches Al vorliegt. Dennoch konnte sowohl mit 50 mM Acetat-Puffer als auch mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer Al-Bindung bei Wurzeln gemessen werden. Bereits nach 1 h hatten die Wurzeln erhöhte Al-Gehalte (114 ng Al pro cm, nicht dargestellt), wenn auch nicht in dem Umfang wie nach Inkubation mit der Versuchsnährlösung. Das deutet darauf hin, daß das thermodynamische Gleichgewicht im Inkubationsmedium noch nicht erreicht war bzw. die Stabilität des Al-Acetat-Komplexes schwächer war als die Affinität von Al zur Zellwand, welche nicht in die Berechnung von GEOCHEM-PC eingeht.

Abgesehen von der Sauren Phosphatase, bei der sowohl die Extraktion als auch die Bestimmung von apoplastischer Aktivität mit Acetat-Puffer vorgenommen wurde, wurden die angesprochenen Probleme bei der Bestimmung von Peroxidase und PME umgangen, indem das Pflanzenmaterial zuerst mit Al inkubiert wurde. Anschließend wurden die Enzyme aus Wurzelhomogenaten bzw. fraktionierter Waschung der Homogenate gewonnen und unter optimierten Bedingungen (pH-Wert, Puffer) bestimmt.

4.7 PME und Al

Wie bereits beschrieben (Kap. 4.6) spielt der Methylierungsgrad des Pektins eine wichtige Rolle bei der Modulation von Al-Toxizität. Aus diesem Grund war es naheliegend, sich weiter mit dem Enzym zu beschäftigen, das den Methylierungsgrad *in vivo* variiert.

PME liegt vorwiegend ionisch gebunden in Zellwand vor (Giovane et al., 1990; Goldberg et al., 1992), dabei gibt es verschiedene Isoformen, die sowohl organ- als auch entwicklungs-spezifisch sein können (Bordendave, 1996 und Referenzen darin). PME liegt vorwiegend in der Mittellamelle und den Zellecken vor, ein Bereich in dem viel unmethyliertes Pektin vorkommt, während methyliertes Pektin überall in der Zellwand anzutreffen ist (Goldberg et al., 1986; Goldberg et al., 1992a). Die Demethylierung des Pektins verläuft blockweise und startet in der Nähe einer freien Carboxylgruppe oder vom reduzierenden Ende der Pektin-

kette aus (Rexova-Benkova und Markovic, 1976; Markovic und Kohn, 1984; Nari et al., 1991). Aus diesem Grund ist die Aktivität von PME in der Umgebung von verestertem Pektin geringer als bei Pektinen mit einem Veresterungsgrad von 20-30% (Evans und MacHale, 1978; Seymour et al., 1991), die Gründe dafür sind in der Elektrostatik und der Enzymkonformation zu suchen (s.u.).

Die Wirkung von PME auf Wachstumsprozesse kann vielseitig sein, da es sich um ein komplexes System handelt (Moustacas et al., 1991; Charnay et al., 1992). Goldberg et al. (1992b) haben festgestellt, daß Bereiche mit hoher PME-Aktivität ihr Wachstum einstellen, was durch die Veränderung im Pektin verursacht wird (McCann et al., 1994; Goldberg et al.; 1996, Bush und McCann, 1999). So ist der Abbau von Pektinen durch Polygalacturonase ein Bestandteil von Fruchtreife- und Wachstumsprozessen, wobei die Aktivität der Polygalacturonase abhängig ist von der Art des Pektins und größer ist, wenn unmethyliertes Pektin vorliegt. Das bedeutet, daß PME den Weg für die Aktivität von Polygalacturonase vorbereitet, so fand sich in Antisense-Pflanzen mit geringer PME-Aktivität eine Anhäufung von langem, methyliertem Pektin (Tiemann et al., 1992). PME reduziert den Methylierungsgrad, vermehrt auf diese Weise die Anzahl der Carboxylgruppen, die dann mit anderen Kationen (vor allem Ca) interagieren und so für eine Verstärkung der Wand sorgen können (Kap. 4.6). Auf diese Weise setzt PME aber auch Protonen frei, die den pH-Wert in der Wand absenken. Der niedrige pH-Wert kann dann andere Zellwandenzyme aktivieren, wie z.B. Glukanasen und Polygalacturonasen, von denen angenommen wird, daß sie für eine Hydrolyse der Zellwand und in Folge für eine Auflockerung der Wand sorgen. Dem pH-Wert kommt aber noch eine weitere Bedeutung zu, denn mit sinkendem pH-Wert nimmt die Aktivität von PME ab, so daß von einer Art Feedback-Regulation der Aktivität ausgegangen wird (Moustacas et al., 1991; Moustacas et al., 1986; Nari et al., 1986).

Die AI-Inkubation von Pflanzen hatte einen deutlichen Einfluß auf die PME-Aktivität (Kap. 3.4.3). Sowohl bei Ackerbohne als auch bei Kartoffel war bereits nach kurzzeitigem AI-Angebot (2 h) die PME-Aktivität erhöht. Besonders deutlich wurde dies im Wurzelapex (1. cm) von Kartoffel, im Gegensatz dazu war im älteren Teil der Wurzel (3-6 cm) kaum ein Effekt von AI zu erkennen (Abb. 38). Da es nicht möglich war, daß Enzym aus den Proben aufzureinigen, konnte nicht bestimmt werden, ob es zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität oder aber einer Erhöhung der PME-Gehalte in den Pflanzen kam. Die Zugabe von AI (10-200 µM) zur Enzymprobe oder zu einer kommerziellen Präparation von PME führte zu keiner Veränderung der Aktivität. Das legt nahe, daß AI zumindest nicht direkt die PME-Aktivität beeinflussen kann, sondern es eher zu einem Anstieg der Enzymmenge kam und Interaktion zwischen AI, Pektin und PME bestanden. Es ist festzustellen, daß die Aktivität vor allem bei den sensitiven Genotypen anstieg und dort eine Stärke erreichte, wie sie im älteren Teil der Wurzeln (3-6 cm) vorzufinden war, der bereits zur Differenzierungszone gehört. Die erhöhte

PME-Aktivität hat zur Folge, daß mehr Bindungsstellen für Al zur Verfügung stehen, was bedeutet, daß Al auf diese Weise in der Lage ist sich selbst neue Bindungsstellen zu schaffen. Mit diesem Effekt lassen sich die von Zhang und Taylor (1989, 1990) gemachten Untersuchungen zur Aufnahmekinetik von Al neu interpretieren. An abgeschnittenen Weizenwurzeln konnten sie feststellen, daß die Aufnahme von Al in zwei Phasen verläuft. Zunächst gab es eine sehr schnelle Aufnahme, die innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen war, und die sie mit der Bindung von Al im Apoplasten erklärten, gefolgt von einer langsameren, linearen Phase. Nach ihrer Interpretation stellte diese zweite Phase den Transport von Al über die Membran ins Cytoplasma dar. Zhang und Taylor (1990) bestimmten den Gehalt an symplastischen Al nach Austausch mit Citrat und kamen zu dem Ergebnis, daß sich ca. 50% des gesamten Al im Symplasten befand. Aufgrund eigener Ergebnisse (Kap. 4.2) und der Tatsache, daß sich Al kaum vollständig aus dem Apoplasten entfernen läßt (Rengel, 1996), erscheint es aber unwahrscheinlich, daß sich die zweite Phase der Al-Aufnahme ausschließlich mit dem Transport über die Plasmamembran erklären läßt. Diese zweite, lineare Phase könnte teilweise auf die beschriebene Erhöhung der PME-Aktivität zurückzuführen sein.

Wie aber kann Al zu einer Erhöhung der PME-Aktivität führen? Eine Möglichkeit ist in der Kationenkonzentration des Apoplasten zu suchen, denn es hat sich gezeigt, daß Kationen einen großen Einfluß auf die PME-Aktivität haben können (Nari et al., 1991). Goldberg et al. (1992) konnten zeigen, daß Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} die Aktivität auf 400 bzw. 240% erhöhen konnten, während monovalente Kationen weniger effektiv waren. Auch Sajjaanantakul und Pitifier (1991) konnten zeigen, daß mit der Zunahme der Ca-Konzentration auch zu einer Zunahme der PME-Aktivität kam und diese Prozesse einer verfrühten Seneszenz des Gewebes vorausgingen. Al selbst könnte in ähnlicher Weise die PME-Aktivität modifizieren oder aber durch die Verdrängung von Ca aus Bindungsstellen (Blamey und Dowling, 1995; Demarty et al., 1984) die Konzentration an freiem Ca im Apoplasten, und somit die PME-Aktivität erhöhen.

Gebundene PME ist wesentlich aktiver als freies Enzym (Goldberg et al., 1992; Bordendave und Goldberg, 1994), und die Bindung des Enzyms an Pektine wirkt sich auf die Konformation und somit die Aktivität aus (Borrego et al., 1989). Die Festigkeit der Bindung von PME im Apoplasten wird vom ionischen Milieu reguliert (Bordendave, 1996). Al könnte die Bindung des Enzyms im Apoplasten verändern, und auf diese Weise zur Erhöhung der Aktivität führen.

4.8 Wassertransport und AI

Blamey et al. (1993) konnten zeigen, daß AI die Wasserpermeabilität bei künstlichen Pektinmembranen reduzierte. In eigenen Versuchen wurde der Transport des Fluoreszenzfarbstoffs PTS untersucht. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede im Bypass-Flow von PTS im Xylem zu bestimmen waren, war jedoch die eindeutige Tendenz zu erkennen, daß es mit steigendem AI-Angebot zur Reduktion des Bypass-Flows kam (Abb. 45). Parallel dazu kam es zu einem signifikanten Anstieg der Retention von PTS in der Wurzelspitze. Die Eignung von PTS als Marker des apoplastischen Wasserflusses ist fragwürdig (Yeo et al., 1987), unter anderem weil PTS mit einem Durchmesser von 1,1 nm als Marker für Wasser zu groß ist (Moon et al., 1986). Allerdings ist PTS kleiner als die Größe von Transwall-Kanälen bzw. von Poren der Zellwand wie sie von Baron-Epel et al. (1988) mit 6,6 - 6,8 nm oder Carpita et al. (1979) mit 10 nm bestimmt worden sind. Die Veränderung des PTS-Transports deutet also eher darauf hin, daß es zu Veränderungen der Porosität der Zellwand durch AI kam.

Eine andere Möglichkeit den Wassertransport zu untersuchen, stellt die Bestimmung des Xylemdrucks mittels Xylem-Pressure-Probe dar. Dabei konnte bei dem Maisgenotyp *Helix* kein Einfluß von AI bestimmt werden (pers. Mitteilung Dr. H. Schneider, Universität Würzburg). Im Gegensatz dazu haben Gunsé et al. (1997) bei Mais eine Änderung einzelner Parameter des Wassertransports bestimmen können, aber es gab keine Übereinstimmung mit der AI-Empfindlichkeit der Genotypen. Die Frage, ob AI den apoplastischen Wassertransport beeinträchtigt, ist also noch nicht ausreichend geklärt.

4.9 Porosität und AI

Der Apoplast ist nicht frei passierbar, sondern die Mobilität von höhermolekularen Stoffen wird von der Porosität der Zellwand bestimmt (Baron-Epel et al., 1989; Carpita, 1982; Read und Bacic, 1995). Baron-Epel et al. (1988) konnte zeigen, daß Pektin die Porosität des Apoplasten bestimmt, denn Behandlung mit pectolytischen Enzymen erhöhte die Porosität. Dies gilt vor allem für Zellwände vom Typ I, die mehr Pektin aufweisen als Wände des Typ II (s. Kap. 4.5). Shedletzky et al. (1992) haben aufgrund ihrer Studien an DCB-adaptierten Zellkulturen vorgeschlagen, daß bei Zellwänden des Typ II die Porosität von Querverknüpfungen im Glukoronoarabinoxylan-Netzwerk bestimmt wird. Wenn man berücksichtigt, daß sich in der Rhizodermis des monocotylen Mais unmethyliertes Pektin ähnlich gut anfärben ließ wie bei der dicotylen Ackerbohne (Abb. 18, 19), liegt es nahe anzunehmen, daß auch bei Mais in der Rhizodermis Pektin die Porosität bestimmen kann.

Viele Enzyme werden in die und durch die Zellwand sezerniert (Lampert und Catt, 1981; Frau, 1988), wie z.B. Enzyme, die Nährstoffe verarbeiten (z. B. Invertase), die Zellwandstruktur verändern z.B. Endohydrolasen, Transglykosidase während des Wachstums, Peroxidase und PME während der Reifung, Cellulase während der Abscission oder Enzyme, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind wie Glukanasen und Chitinasen. Der Zugang dieser Enzyme zum Substrat (Read und Bacic, 1995; Iraki et al., 1989), aber auch von Wachstumsregulatoren wie Oligosacchariden (Lorences und Fry, 1991; McDougal und Fry, 1990) hängt von der Porosität der Wand ab. Da diese Moleküle sehr groß sind (MW von 10^5 bis 10^8), ist es eher unwahrscheinlich, daß sie die Wand frei passieren können, so daß spezielle Wandporen für deren Transport im Gespräch sind (Read und Bacic, 1995). Pektin liegt teilweise in festen Domänen vor, ist aber ansonsten sehr mobil, so daß sich durch den Zusammenschluß von kleinen Poren zeitweise größere Poren bilden können, auf diese Weise können auch Moleküle mit einem Durchmesser von bis zu 9 nm problemlos durch die Zellwand transportiert werden (Taylor et al., 1990).

Zwar ließ sich bei allen untersuchten Zellen eine Hemmung der Abgabe von Proteinen und Pektinen durch Al-Behandlung beobachten, aber es bestand kein Zusammenhang zum Pektin Gehalt der Zellen (Abb. 48, 49). Dies läßt sich damit begründen, daß die bestimmten Polymere nicht unbedingt die gleiche Molekülgröße besaßen. So konnte Iraki et al. (1989) zeigen, daß sich nach NaCl-Adaptation von Zellkulturen die Zusammensetzung von extrazellulären Proteinen und Kohlenhydraten von der nicht-adaptierter Kulturen unterschied. Es könnte also gut sein, daß die Größe der zur Abgabe gedachten Polymere unterschiedlich war und je nach Größe nur zu bestimmten Anteilen abgegeben werden konnten. Basu et al. (1994) konnten zeigen, daß sich die Polypeptidzusammensetzung in Exsudaten von Wurzeln nach Al-Behandlung veränderte und sie identifizierten ein Polypeptid, welches eine Rolle bei der Detoxifizierung von Al spielen könnte (Taylor, 1995). Es wäre daher sinnvoll, die Exsudate der Zellen nach Größe aufzureinigen, um den Einfluß von Al in Zusammenhang mit dem Pektin Gehalt der Zellen genauer untersuchen zu können.

Wurde die Abgabe eines bestimmten Proteins, nämlich des Enzyms Saure Phosphatase gemessen, so ließ sich erkennen, daß mit zunehmendem Pektin Gehalt die Abgabe stärker gehemmt war als bei Zellen mit geringerem Gehalt (Abb. 47A). Eine Ausnahme stellten hierbei die Pectolyase-behandelten Zellen dar, denn hier war die Abgabe am stärksten gehemmt. In Anbetracht der Tatsache, daß bei diesen Zellen im Apoplasten nur wenig Bindungsstellen für Al zur Verfügung standen, liegt es nahe anzunehmen, daß Al an die Plasmamembran band und auf diese Weise zur Hemmung der Abgabe führte. Eine solche Wirkungsweise soll später genauer besprochen werden (Kap. 4.10).

Nicht nur die Abgabe von Saurer Phosphatase war durch Al beeinflusst, sondern auch die apoplastische Aktivität des Enzyms, unabhängig davon, ob die Wurzeln vor der Enzymbe-

stimmung oder während der Bestimmung mit Al behandelt wurden (Abb. 46B, 47B). Allerdings hatte die Al-Behandlung zu beiden Zeitpunkten keinen additiven Effekt. Auch konnte anhand der spezifischen Aktivität und bei *in vitro*-Tests gezeigt werden, daß Al nicht direkt die Aktivität von Saurer Phosphatase modifiziert. Die Veränderung der Aktivität durch Al muß also andere Gründe haben, die vielleicht analog zu denen bei der PME (Kap. 4.7) oder der Peroxidase sind (Kap. 4.13) sind und auf einer Änderung des Bindungsverhalten des Enzyms in der Zellwand beruhen. Cashikar et al. (1997) konnten zeigen, daß Bindung von Saurer Phosphatase an Pektin die kinetischen Eigenschaften veränderte, insofern als daß sich die K_m , also die Substratspezifität, verringerte. Die Hemmung der apoplastischen Aktivität von Saurer Phosphatase könnte auf einer festeren Bindung des Enzyms an die Pektinmatrix beruhen, was möglicherweise den Kontakt zwischen Enzym und Substrat erschwert.

Saure Phosphatase ist hier bislang nur im Hinblick auf Bindung und Mobilität bzw. Porosität besprochen worden, ohne direkt mit Al-Toxizität in Kontakt gebracht zu werden. Dies liegt vor allem daran, daß mögliche Substrate, und damit die Bedeutung für apoplastische Vorgänge, von Saurer Phosphatase *in vivo* nicht bekannt sind (Staswick et al., 1994). Die Effekte von Al auf die Aktivität von apoplastischer Saurer Phosphatase waren zwar signifikant, erscheinen aber im Vergleich zur Veränderung der Aktivität von PME oder Peroxidase als relativ gering. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Standard-Verfahren benutzt, das *p*-Nitrophenylphosphat (*p*-NPP) als künstliches Substrat verwendet (McLachlan, 1980). Cashikar et al. (1997) konnten zeigen, daß die Substratspezifität für *p*-NPP im Vergleich zu Polyphosphat oder ATP sehr gering ist. Es erscheint daher naheliegend, daß auch für mögliche *in vivo* Substrate die Affinität größer ist, so daß sich auch der Effekt von Al stärker auswirken könnte.

Saure Phosphatase ist für Dephosphorylierungsprozesse verantwortlich, die im Apoplasten eine wichtige Rolle für die Regulation des Wachstums spielen. Kürzlich hat Pfeiffer (1998) vermutet, daß Saure Phosphatase an der Elongation von abgeschnittenen Maiswurzelspitzen beteiligt ist. Er konnte zeigen, daß die longitudinale Verteilung der Aktivität von Saurer Phosphatase ein Maximum in 2,5 mm Entfernung von der Wurzelspitze aufwies, was sich mit einem Maximum der Elongation im Bereich 2,4 mm überschneidet. In diesem Bereich ist auch die Al-Toxizität besonders hoch (Sivaguru und Horst, 1998, Kollmeier et al., 2000), so daß man davon ausgehen kann, daß hier auch die Hemmung von Saurer Phosphatase involviert sein könnte. Auch in Hinblick auf Auxin-stimuliertes Wachstum gibt es Berührungspunkte mit Saurer Phosphatase. So konnte Pfeiffer (1996) bei Maiskoleoptilen zeigen, daß Auxin die Exocytose von Saurer Phosphatase stimulierte. Al könnte Saure Phosphatase also nicht nur über die Veränderung der Substratspezifität beeinflussen, sondern auch durch Hemmung des basipetalen Auxintransports vom Meristem zur Elongationszone, wie er von Horst et al. (1999) vorgeschlagen und von Kollmeier et al. (2000) dokumentiert wurde.

Sowohl die Abgabe von Pektinen, Proteinen und Saurer Phosphatase als auch der Transport von PTS deuten daraufhin, daß sich die Porosität mit Al-Behandlung verkleinerte. Die Veränderung der Porosität hat Konsequenzen für die Wachstumsphasen bei Zellkulturen (Titel et al., 1997). Auch Fleischer et al. (1998) konnten zeigen, daß es für ihre Zellkultur nötig war, die Porosität zu verkleinern, nicht nur um den Übergang von Wachstums- zu stationärer Phase zu bewirken, sondern auch um in der stationären Phase zu überleben. Die Bedeutung der Änderung der Porosität für diese Umstellung soll darin beruhen, daß sie physiologische Prozesse wie Polymersekretion, aber auch Diffusion und Aktivität von apoplastischen Enzymen variiert (O'Driscoll et al., 1993). Die Retention der Moleküle ist besonders wichtig für die lokale Wirkung von Enzymen, aber auch die Wirkdauer von Substanzen wie Expansin, die für die Zellstreckung wichtig sind (Cosgrove, 1993a; McQueen-Mason und Rochange, 1999; Wu et al., 1996). Al könnte eine Verkleinerung der Porosität hervorrufen und auf diese Weise vorzeitig zur Reduktion des Wachstums führen.

4.10 Sekretion, Plasmamembran und Al

Die Tatsache, daß bei den Pectoylase-behandelten Zellen die Abgabe von Saurer Phosphatase und Proteinen besonders stark durch Al gehemmt war, deutet daraufhin, daß es sich hierbei nicht um die Hemmung der Abgabe durch den Apoplasten handelte, die sich laut den Ergebnissen von Baron-Epel et al. (1988) bei der Behandlung mit Pectolyase hätte verbessern müssen. Da sich nur wenig unmethyliertes Pektin in diesen Zellen befand, waren die Bindungsstellen für Al im Apoplasten sehr schnell besetzt, und es kam bereits bei einem Al-Angebot von 50 µM nach 2 h zur Sättigung der Zellen mit Al (Abb. 29). Sobald die negativen Bindungsstellen im Apoplast besetzt sind, sollte sich weiteres Al leichter im Apoplasten bewegen können (verringerte Retention) und auf diese Weise leichter die Plasmamembran erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht zwischen Zellwand- und Plasmamembrangebundenem Al unterschieden, aber in der Literatur ist die Bindung von Al an die Membran dokumentiert (Wagatsuma et al., 1995). Bei Weizen konnte sogar die Oberflächennegativität von Plasmamembranvesikeln die Unterschiede in der Al-Resistenz zweier Genotypen widerspiegeln (Yermiyahu et al., 1997).

Es erscheint daher als sehr wahrscheinlich, daß die Bindung von Al an die Membran die Abgabe von Protein und Pektin behinderte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Versuche mit Protoplasten durchgeführt, um an diesen die Abgabe von Proteinen über die Membran unter Al-Einfluß zu untersuchen. Die Ergebnisse waren jedoch nicht schlüssig, denn es stellte sich heraus, daß auch ohne Al-Behandlung einzelne Protoplasten starben

oder zumindest die Membranen undicht wurden. Dabei trat der Inhalt der Protoplasten aus und verfälschte die Ergebnisse (nicht dargestellt).

Auch wenn es keinen schlüssigen Beweis für die Annahme gibt, daß Al die Abgabe von Substanzen über die Membran beeinflusst, so lassen sich doch die hier beobachteten Effekte mit Ergebnissen anderen Arbeiten in Verbindung bringen. Die bereits erwähnte Änderung der Pektinzusammensetzung (Kap. 4.3 und 4.6) stimmt mit Ergebnissen von Le Van et al. (1994) überein, die ebenfalls eine Änderung der Zellwandzusammensetzung nach Al-Behandlung bestimmen konnten. Diese Änderungen lassen sich teilweise mit der veränderten Aktivität von PME erklären (Kap. 4.7), aber es gibt Hinweise darauf, daß sich Al auch auf die Abgabe von Zellwandmaterial, somit den sekretorischen Haushalt der Zelle auswirkt. So haben Bennet und Breen (1991) nach Al-Behandlung eine Veränderung der Ultrastruktur des Golgiapparats und eine Verringerung der Aktivität von sekretorischen Vesikeln an der Peripherie von Wurzelhaubenzellen feststellen können. Der Golgiapparat spielt eine wichtige Rolle für Synthese, Transport und Verteilung von nicht-cellulose-haltigem Material, das für die Zelloberfläche bestimmt ist (Staelin und Moor, 1995). Dabei wird Pektin und Hemicellulose über den Golgiapparat, durch die Fusion von Vesikeln mit der Membran in die Wand eingebracht (Driouch et al., 1993). Allerdings wurde auch von speziellen carrier-Vesikeln für diesen Transport berichtet (Lazar et al. 1997, Finger und Novick, 1998).

Puthota et al. (1991) konnten zeigen, daß die Mucilagebildung bei einem sensitiven Weizen-genotyp nach Al-Behandlung um den Faktor 3 im Vergleich zum toleranten Genotypen reduziert war, bzw. es beim toleranten Genotypen einer wesentlich höheren Al-Konzentration bedurfte, um die Bildung von Mucilage zu hemmen. Parallel dazu fanden sie bei dem sensitiven Genotypen, daß es zu einer Akkumulation von sekretorischen Vesikeln kam. Aus diesen und weiteren Beobachtungen schlußfolgerten sie, daß Al den Transport von Mucilage-enthaltenden Vesikeln und dem Turnover von Dictyosomen beeinflusst. Horst et al. (1982) konnten zeigen, daß die Bindung von Al an Mucilage die Toxizität reduzierte. Mucilage besteht aus einem Gemisch von Polymeren (Chaboud, 1983; Rougier, 1981) und weist die Eigenschaften eines Pektinels auf (Wright und Northcote, 1974). Von Mucilage wird angenommen, daß sie einen hohen Anteil an uronsäurehaltigem Material enthält (Peretto et al., 1990 und Referenzen darin). Allerdings kann die Zusammensetzung bei verschiedenen Pflanzen sehr unterschiedlich sein, so enthält sie bei Mais relativ wenig Pektin, ca. 3% (Bacic et al., 1986) während sie mit 11,5% bei Cowpea deutlich mehr enthält (Moody et al., 1988). Die Carboxylgruppen des Pektins bzw. der Uronsäuren stellen Bindungsstellen für Metallionen in der Mucilage dar (Morel et al., 1986). Li et al. (2000) und Archambault et al. (1996) konnten zeigen, daß Al sehr fest an Mucilage bindet und mitverantwortlich für die schnelle Phase der Al-Aufnahme ist (Zhang und Taylor, 1989). Mucilage-gebundenes Al ist jedoch nicht toxisch (Horst et al., 1982), so konnte im 1. mm der Wurzel keine Al-induzierte Kallose-

bildung festgestellt werden obwohl der Al-Gehalt hier am höchsten war (Abb. 16, 17, 14). Die Präsenz von Mucilage kann jedoch nicht die gesamte Wurzel vor Al-Toxizität schützen, in den Versuchen von Li et al. (2000) besaßen die Maispflanzen Mucilage, in der Al gebunden wurde, dennoch kam es zur Hemmung des Wurzellängenwachstums. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, daß bei Mais die Al-sensitive Wurzelzone im Bereich 1-2 mm entfernt von der Wurzelspitze zu finden ist (Sivaguru und Horst, 1998), Mucilage sich jedoch hauptsächlich an der Wurzelspitze (0-1 mm, Robert und Jones, 1975) befindet.

Nicht nur der Transport von Mucilage ist von der Al-Behandlung betroffen, sondern auch der von Proteinen und Enzyme, wie z. B. Saurer Phosphatase. Daher ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, daß auch andere für das Wachstum wichtige sekretorische Prozesse betroffen sind. An diesem Punkt stellt sich die Frage, wie Al die Sekretion modifizieren kann. Zwei Ansatzpunkte, nämlich Ca-Signale und das Cytoskelett (Battey et al., 1999, und Referenzen darin) sollen im folgenden in Hinblick auf Al-Toxizität weiter diskutiert werden.

4.11 Ca-Signale und Al

Foy et al. (1978) beschrieben die antagonistische Beziehung zwischen Al und Ca. Darüber hinaus ist inzwischen dokumentiert, daß Al Ca aus Bindungsstellen im Apoplasten verdrängen kann (Blamey und Dowling, 1995; Demarty et al., 1984), und es wurde über den Verbleib bzw. die Bedeutung des freigesetzten Ca spekuliert. Ca ist als "second messenger" in Pflanzen etabliert und spielt eine wichtige Rolle bei Morphogenese, Polarität und Osmoregulation (Hepler und Wayne, 1985; Brownlee et al., 1999; Trewavas und Malho, 1997). Aus diesem Grund hat Rengel (1992) die Störung der cytoplasmatischen Ca-Homeostasis als Trigger für Al-Toxizität bezeichnet.

Über die Änderung der cytosolischen Ca-Konzentration durch Al gibt es unterschiedliche Aussagen. Jones et al. (1998a) haben gezeigt, daß Al die cytosolische Ca-Konzentration bei Tabakzellkulturen senkt. Im Gegensatz dazu beobachteten Sivaguru et al. (1999b), daß die Beeinflussung der cytosolischen Ca-Konzentration bei Zellsuspensionskulturen von Tabak abhängig ist von der Wachstumsphase der Kultur – in der stationären Phase kam es zu keiner Änderung, während es in der log-Phase nach Al-Behandlung zur Erhöhung der cytosolischen Ca-Konzentration kam. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Lindberg und Strid (1997) konnten Jones et al. (1998b) dann aber bei Wurzelhaaren von *Arabidopsis* eine Erhöhung der cytosolischen Ca-Konzentration finden, und zwar nur im Wildtyp und sensitiven Mutanten, während resistente Mutanten keine Änderung des cytosolischen Ca erkennen ließen. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht völlig konsistent, teilweise blieb die Erhöhung des cytosolischen Ca bei den sensitiven Mutanten aus.

Da Ca eine besondere Rolle in der Regulation von Exocytose und Endocytose spielt (Steer, 1988; Battey et al., 1999), erscheint es wahrscheinlich, daß Al auch durch die Veränderung der Ca-Homeostasis die Abgabe von Protein, Pektin und Saurer Phosphatase (Abb. 46-49) hemmen konnte bzw. erklärt wie es zur Modifikation von sekretorischen Prozessen durch Al kommen kann, wie sie von Bennet und Breen (1991) und Puthota et al. (1991) beschrieben wurde.

Auch in Hinblick auf die Phytopathogenabwehr sind Ca-Signale wichtig. So ist der Influx von Ca ein wichtiger Schritt in der Signaltransduktionkette, die zur Kallosebildung führt (Kauss et al., 1991). Daß auch Al zur Kalloseinduktion führt, unterstreicht die Annahme, daß Al in die Ca-Homeostasis eingreift.

Einen weiteren Schritt in der Signaltransduktionskette zur Kalloseinduktion stellt die Veränderung des Membranpotentials dar (Waldmann, 1992). Hierbei gibt es Parallelen zu Wirkungen von Al, auch wenn der Einfluß von Al auf das Membranpotential unterschiedlich in der Literatur beschrieben wurde. Takabatake und Shimmen (1997) konnten bei *Chara* eine Depolarisation feststellen, während Papernik und Kochian (1997) eine solche Depolarisation nur im Al-resistenten Genotyp von Weizen, nicht im sensitiven finden konnten. Sie erklärten die beobachtete Depolarisation mit der Aktivität eines Ionenkanals, der für die Ausscheidung von organischen Anionen verantwortlich war, und dadurch zur Detoxifizierung von Al beitrug (de la Fuente et al., 1997, Delhaize et al., 1993b). Der Einfluß von Al auf das Verhalten von Ionenkanälen ist auch an anderer Stelle dokumentiert, so hemmte Al den Kalium-Efflux bei Soyabohnenwurzeln (Cakmak und Horst, 1991a) und Sojazellen (Steiß und Horst, 1995).

Ionenkanäle der Plasmamembran können unter anderem auch über mechanische Belastung aktiviert werden (Perbal et al., 1997; Cosgrove und Hedrich, 1991). So ist bereits darüber spekuliert worden, ob die Erhöhung der cytosolischen Ca-Konzentration durch Kanäle, wie z.B. „stretch-activated channels“ verursacht wird (Blatt und Thiel, 1993). Damit könnte erklärt werden, wie es durch mechanischen Streß (Kauss, 1996), aber auch durch Bindung von Al im Apoplasten (Kap. 4.5 und 4.6) zur Kalloseinduktion kommen kann. Solche mechano-sensorischen Ca-selektiven Kanäle sind in Wurzelspitzen beschrieben worden und sollen eine Rolle bei der Regulation des Auxintransports spielen (Ding und Pickard, 1993). Am Beispiel der Zwiebelepidermis konnte demonstriert werden, daß Al einen solchen mechano-sensorischen Ca-Kanal hemmt (Ding et al. 1993). Dies könnte die Hemmung des basipetalen Auxintransports erklären, die von Kollmeier et al. (2000) beschrieben wurde. Die Frage, wie sich die Bindung von Al auf die Plasmamembran und Ionenkanäle, aber auch Apoplast und Symplast auswirken kann, soll im weiteren diskutiert werden.

4.12 Cytoskelett-Plasmamembran-Zellwand-Kontinuum

Das Cytoskelett spielt eine bedeutsame Rolle in der Regulation von pflanzlichen Wachstumsprozessen (Barlow und Parker, 1996; Baluška et al., 1997). Bei Mais konnte beispielsweise festgestellt werden, daß das Aktin und dessen Änderung das Wachstum und die Entwicklung des Wurzelapex von Mais beeinflusst (Baluška et al., 1997).

Die Behandlung von Weizenwurzeln mit Al führte zu einer Depolymerisation oder zur Stabilisierung der cortikalen Mikrotubuli (Sasaki et al., 1997). Bei Maiswurzeln kam es drei Stunden nach der Behandlung mit Al zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli und einer Reorientierung der Aktinfilamente (Blancaflor et al., 1998). Diese Ergebnisse wurden von Horst et al. (1999) bestätigt, wobei hier die Störung der cortikalen Microtubuli und Änderungen im Polymerisierungsgrad des Aktins vor allem im Bereich 1-2 mm Entfernung von der Wurzelspitze ausgeprägt waren. Neuere Ergebnisse lassen außerdem darauf schließen, daß bei Tabakzellkulturen die Wirkung von Al auf das Cytoskelett von der Wachstumsphase abhängt, so kam es in der log-Phase zur Depolymerisation und in der stationären Phase hingegen zur Stabilisierung der Mikrotubuli (Sivaguru et al., 1999b). Wie aber kann Al das Cytoskeletts beeinflussen?

Auch wenn symplastisches Al als Ursache für die Veränderungen des Cytoskeletts im Moment nicht ausgeschlossen werden kann (Kap. 4.2, Horst et al., 1999; Sivaguru et al., 1999b), so sind aufgrund der Literatur eine Reihe anderer Wege ebenfalls wahrscheinlich. Veränderung des Cytoskeletts können unter anderem auch durch Depolarisation der Plasmamembran ausgelöst werden (Giddings und Staehelin, 1991), die ebenfalls durch Al bewirkt werden kann (Takabatake und Shimmen, 1997; Papernik und Kochian, 1997). Auch Auxin wirkt sich auf das Cytoskelett aus (Blancaflor und Hasenstein, 1995; Baluška et al., 1996a), so daß die Veränderung des Auxintransports durch Al (Kollmeier et al., 2000) indirekt zur Störung des Cytoskeletts führen könnte.

Nebel und Fischer (1997) konnten zeigen, daß der Anstieg der cytosolischen Ca-Konzentration zur Depolymerisation des Cytoskeletts führt. Ein Anstieg der cytosolischen Ca-Konzentration durch Al ist bereits beschrieben worden (Sivaguru et al., 1999b; Jones et al., 1998b; Lindberg und Strid, 1997) und neuere Arbeiten von Grabski et al. (1998) haben zu der Annahme geführt, daß Al das Cytoskelett mittels Ca^{2+} -regulierten Phosphatasen und Kinasen beeinflusst, was auch mit Ergebnissen von Baskin und Wilson (1997) übereinstimmt.

Die Kalloseinduktion, an der Ca als Teil der Signalkette beteiligt ist (Kap.4.4, Kauss et al., 1991) und die u.a. von Al ausgelöst wird (Kap 4.4), kann ebenfalls mit dem Cytoskelett in Verbindung gebracht werden, denn es ist ein Zusammenhang zwischen der Kalloseablagerung und der Desorganisation von cortikalen Mikrotubuli in Pollenschläuchen beobachtet worden (Pierson und Cresti, 1992). Zu diesem Zeitpunkt kann nicht bestimmt werden, ob die

Änderung der cytosolischen Ca-Konzentration sowohl die Depolymerisation des Cytoskeletts als auch die Kalloseinduktion auslöst oder ob die Induktion der Kallose einen Schritt in der Veränderung des Cytoskeletts darstellt.

Wie sich bereits angedeutet hat, ist das Cytoskelett nicht unabhängig von anderen Kompartimenten der Zelle. Es gibt eine Vielzahl an Daten, die Wechselwirkungen zwischen Cytoskelett, Plasmamembran und der Zellwand beschreiben, so daß sich inzwischen ein sehr komplexes Bild ergeben hat, das mit der Bezeichnung „cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum“ (Wyatt und Carpita, 1993; Miller et al., 1997ab) zusammengefaßt wurde. Dabei geht man davon aus, daß die corticalen Mikrotubuli durch die Zellwand stabilisiert werden (Akashi et al., 1990). Ebenso sind Transmembranproteine im Gespräch, welche die Mikrotubuli mit der Zellwand verbinden (Nick, 1999 und Referenzen darin). Durch diese Transmembranproteine könnte mechanischer Streß in der Zellwand von der apoplastischen Seite auf das Cytoskelett übertragen werden. Das wiederum würde in einer entsprechenden Änderung der Orientierung der Mikrotubuli resultieren (Williamson, 1991; Fischer und Schopfer, 1998). Fischer und Cyr (1998) stellten fest, daß die Bildung von Cellulosefibrillen während des Elongationswachstums Voraussetzung für eine normale Anordnung der corticalen Mikrotubuli war, was sie dazu veranlaßte, einen bidirektionalen Informationsaustausch zwischen Mikrotubuli und Cellulosefibrillen bzw. Symplast und Apoplast vorzuschlagen. Die Mikrotubuli und die Cellulosefibrillen stehen in Wechselwirkung, wobei die Anordnung der Cellulosefibrillen die Dehnbarkeit der Zellwand und somit das Wachstum bestimmt. Stehen die Cellulosefibrillen im rechten Winkel, „transverse“, zur Wachstumsrichtung kann Elongation stattfinden, sind sie parallel, „oblique“, ausgerichtet, kommt das Wachstum zum Stillstand (Taiz, 1984; Preston, 1988).

Die Bindung von Al im Apoplasten ist dokumentiert (Kap. 4.2 und 4.5), wobei Al fester in der Zellwand gebunden wird als Ca und dieses verdrängen kann (Blamey und Dowling, 1995). Dies führt offensichtlich zu Änderungen in der Porosität der Zellwand (Kap. 4.9). Die Verringerung der Porosität kann mechanischen Streß in der Zellwand bedeuten, denn es gibt verschiedene Parallelen zwischen der Behandlung mit Al und mechanischem Streß. Zum Beispiel kommt es in beiden Fällen zur Aktivierung der Peroxidaseaktivität (Kap. 4.13) und zur Induktion von Kallose (Kap. 4.4), aber auch zur Induktion bestimmter Gene, die in der Wurzelspitze lokalisiert sind (Snowden et al., 1995).

Physikalische Veränderungen im Apoplasten können über die Plasmamembran auch Signaltransduktionswege beeinflussen, an denen unter anderem auch Phospholipase C beteiligt ist (Haley et al., 1995; Ingber, 1997). So konnten Jones und Kochian (1995) an Weizenwurzeln beobachten, das Al zu einer Hemmung der Phospholipase C führt.

Die Bindung von Al im Apoplasten, aber auch an der Plasmamembran könnte eine Art mechanischen Streß darstellen, der sich durch die erwähnten Transmembranproteine auf das

Cytoskelett auswirkt. Auf diese Weise könnte Al die geordnete Deposition von neuen Cellulosefibrillen stören und dem zielgerichteten Transport von Vesikeln, die andere Zellwandkomponenten befördern (Kap. 4.9, Battey et al., 1999, und Referenzen darin), beeinflussen, wodurch das Wachstum gehemmt würde.

Die bisher erwähnten Resistenzmechanismen wie die Abgabe von Komplexoren (Basu et al., 1994; Horst et al., 1982; Pellet et al., 1995; Ma et al., 2000), die Erhöhung des pH-Werts (Degenhardt et al., 1998) oder die Kompartimentierung (Vázquez et al., 1999) beruhen darauf, daß Al außerhalb oder innerhalb der Wurzel detoxifiziert wird. Trotzdem wird Al auch bei resistenten Genotypen oder Pflanzen in der Zellwand gebunden, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei sensitiven (Delhaize et al., 1993a; Llugany et al., 1994; Rincon und Gonzales, 1992). Entweder reicht bei diesen resistenten Pflanzen die gebundene Al-Menge nicht aus, um Toxizität durch mechanischen Streß auszulösen, oder sie sind in der Lage, diesen Streß zu vermindern bzw. vermeiden, ihn auf die Membran oder das Cytoskelett zu übertragen.

Aus Maiswurzeln isolierte Protoplasten zeigten die gleichen genotypischen Unterschiede in ihrer Al-Resistenz, wie sie bereits in Feldversuchen und Nährlösungsversuchen bestimmt worden waren. So zeigten Protoplasten aus sensitiven Genotypen höhere Kalloseinduktion als aus toleranten Genotypen (Schmohl, 1995; Horst et al., 1997). Außerdem war zu erkennen, daß die Protoplasten nach der Inkubation mit Al Aggregate bildeten, was auf eine Verknüpfung mehrerer Protoplasten durch Al hindeutet. Die genotypischen Unterschiede in der Al-Resistenz bei Mais traten nur auf, wenn die Protoplasten aus der Wurzelspitze (0-1 cm) isoliert wurden. Protoplasten aus älteren Wurzelsegmenten (3-6 cm) reagierten nicht auf Al (Schmohl, 1995). Da während der Inkubation immer wieder Protoplasten Membranschäden erlitten oder auch starben, war der Anteil an möglichen Komplexoren so groß, daß die Ausscheidung solcher Substanzen für die genotypischen Unterschiede in der Al-Resistenz nicht relevant sein konnte. Ein möglicher Resistenzfaktor könnte eher in der Negativität der Plasmamembran zu suchen sein (Wagatsuma und Akiba, 1989), aber auch in der Zusammensetzung derselben.

In Versuchen mit künstlichen Membranen konnten Feigin et al. (1995) zeigen, daß die Zusammensetzung der Membran die Stabilität bzw. die Aufrechterhaltung der Fluidität während der Behandlung mit Toxinen beeinflusst, wobei der Einbau von Phytosterolen vor der Toxinwirkung schützen kann (Julmanop et al., 1993). Al könnte entweder direkt oder indirekt über die Zellwand auf die Membran wirken, und deren Zusammensetzung könnte die Wirkung von Al modifizieren – der Einbau von Phytosterol, vor allem Cholesterol und Sitosterol kann die Membranfluidität verbessern (Feigin, et al., 1995; Stalleart und Geuns, 1994) - und könnte auf diese Weise gegen Al schützen. Nachdem Zhang et al. (1996) nachweisen konnten, daß eine Al-Behandlung bereits nach 3 h zur Veränderung der Phospholipidzusammensetzung

von Microsomen führte, könnte sogar darüber nachgedacht werden, ob eine nachträgliche Umgestaltung der Plasmamembran zur Adaptation an Al-Toxizität führen kann.

Ein weiterer Resistenzmechanismus könnte in der Vermeidung von Membranschädigung durch oxidative Prozesse zu suchen sein, denn Al kann zur Fe-vermittelten Lipidperoxidation führen, was anschließend zu Zellschäden oder sogar Zelltod führt und durch Antioxidantien vermieden werden kann (Yamamoto et al., 1998, Yamaguchi et al., 1999).

4.13 Oxidativer Streß und Al

Oxidative Prozesse in Pflanzen bilden ein sehr komplexes System (Lamb und Dixon, 1997) und wurde im Rahmen dieser Arbeit nur anhand der Aktivität von Peroxidase untersucht.

Peroxidasen stellen eine große Familie von Enzymen dar, die in der Lage ist verschiedene Substrate in der Gegenwart von H₂O₂ zu oxidieren. Es gibt viele verschiedene Isoformen von Peroxidase, und sie werden zum Teil gewebe- und entwicklungspezifisch gebildet, aber auch durch verschiedenen Faktoren induziert (Van Engelken et al., 1991; Welinder et al., 1996; Mohan et al., 1993; Klotz et al., 1998), wobei es auch oft zu Polymerisationsreaktionen kommt (Eberhardt et al., 1993). Die Regulation der Peroxidasen erfolgt sowohl durch die Lokalisation, die Substratspezifität als auch den pH-Wert (De Marco et al., 1999). Peroxidasen sind sowohl an der Wundheilung (Lagrimini, 1991; Bradley et al., 1992) als auch der Pathogenabwehr (Thordal-Christensen et al., 1995; Scott-Craig et al., 1995) beteiligt. Ihre Aktivität kann aber auch eine Antwort auf mechanischen Streß bzw. Verletzung sein (Lagrimi und Rothstein, 1987), und es wird angenommen, daß sie während der Elongation eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellwandelastizität spielt (Hoson et al., 1995).

Cakmak und Horst (1991b) konnten bei Sojabohne feststellen, daß Al zur Erhöhung der Peroxidaseaktivität führt. Dies ließ sich bei den hier untersuchten Pflanzen, aber auch bei den Zellkulturen bestätigen (Kap. 3.6). Dieser Anstieg war bereits nach 2 h deutlich meßbar und war bei den sensitiven Kartoffelgenotypen besonderes ausgeprägt. Die Aktivität von Peroxidase in der Wurzelspitze (0-1 cm) erreicht nach Al-Behandlung das Niveau von älteren, nicht mit Al behandelten Wurzelzonen – Al beeinflusst offenbar die entwicklungspezifische Verteilung dieser Enzymaktivität.

Bei *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, daß Al Gene aktiviert, die unter anderem Peroxidase, Glutathione-S-Transferase und Superoxid-Dismutase codieren, also Enzyme die auch bei Behandlung mit Ozon induziert werden, woraus man schließen kann, daß Al oxidativen Streß auslöst (Richards et al., 1998). Ergebnisse von Ezaki et al. (2000) unterstützen diese

Theorie ebenfalls, denn sie konnten bei transgenen Linien von *Arabidopsis* Gene induzieren, die sowohl vor AI als auch oxidativem Streß schützen konnten.

Die Frage, wie es zur Aktivierung der Gene bzw. zur Erhöhung der Peroxidaseaktivität kommt, ist noch nicht geklärt. Es gibt verschiedene Anknüpfungspunkte. So hat sich zum Beispiel gezeigt, daß die Bindung von Peroxidase an Pektin die Enzymaktivität modifiziert (Penel et al., 1996), so daß an dieser Stelle Wechselwirkungen mit AI mehr als wahrscheinlich sind (Kap. 4.5 und 4.6). Eine andere Möglichkeit stellt die Involvierung eines Signals dar, so haben Legendre et al. (1993) gezeigt, daß Oligogalakturonide einen oxidativen Burst induzieren können. Die Möglichkeit der Entstehung von Oligogalakturoniden im Zusammenhang mit AI ist in Kap. 4.6 besprochen worden. Darüber hinaus gibt es eine Parallele zur Kallosebildung, die sowohl von AI als auch von pilzlichen Elicitoren (Kauss, 1996) induziert wird. Pilzliche Elicitoren können aber auch oxidativen Burst auslösen, der dann zur Festigung der Zellwand führt (Bradley et al., 1992; Otte und Barz, 1996). Eine solche Festigung der Zellwand wird durch ionische oder kovalente Querverknüpfung von Pektinen oder anderen Matrixkomponenten ermöglicht (Jarvis, 1984; Kim und Carpita, 1992; Li et al.; 1994; McCann und Roberts, 1994; McCann et al., 1994). Darüber hinaus sind solche Querverknüpfungen wichtig für die Regulation der Zellwandplastizität während der Zellelongation (Schopfer, 1996; Hoson et al., 1995). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß Peroxidase zusammen mit H₂O₂ zur Querverknüpfung von hydroxyprolinreichen Glycoproteinen (HRGP) durch intermolekulare Dityrosine-Verknüpfung führen kann (Fry, 1986; Varner und Lin, 1989). Solche oxidativen Querverknüpfungen verlaufen sehr schnell, so begann die Querverknüpfung von Strukturproteinen bereits 2-3 min nach Elicitorzugabe, war schon nach 10-20 min abgeschlossen und führte zur Festigung der Zellwand (Bradley et al., 1992; Otte und Barz, 1996). Zu den Strukturproteinen gehören auch Extensine. Diese können direkt von einer spezifischen Peroxidase oxidiert werden (Schnabelrauch et al., 1996), aber auch ihre Vorstufen können polymerisiert werden (Everdeen et al., 1988). Auch eine Polymerisation von Monoligninen ist in der Zellwand beobachtet worden (Eberhardt et al., 1993), und Wallace und Fry (1994) konnten zeigen, daß zwischen Pektinen Esterbindungen über die Verknüpfung von Phenoldimeren, wie z.B. Diferulsäure, entstehen können.

Bei den untersuchten Zellkulturen konnte beobachtet werden, daß nach AI-Behandlung weniger Phenole extrahiert wurden, als bei den Kontrollen (Abb. 52). Dies deutet daraufhin, daß auch AI Querverknüpfung über Phenole in der Wand induziert. Auch in der Literatur ist die durch AI verursachte Lingnifizierung bei Weizen (Sasaki et al., 1997) und Mais (Budikova, 1999) beschrieben worden.

Die Querverknüpfung von Phenolgruppen, Strukturproteinen und Pektinen fällt zeitlich mit der Reifung bzw. Alterung der Zellwand zusammen, und Peroxidasen, die diese Reaktionen katalysieren, werden als Enzyme der Wandreifung angesehen (Goldberg et al., 1987; Tan et

al., 1991). Al könnte also durch Erhöhung der Peroxidaseaktivität dazu führen, daß die Zellwand früher altert und sich somit vorzeitig verfestigt, wodurch das Elongationswachstum gehemmt wird. Die erhöhte Peroxidaseaktivität kann aber auch zum Abbau von Substanzen führen, die für das Wachstum wichtig sind, wie z.B. Auxin und Ascorbinsäure.

Auxin ist wichtig für die Regulation von Gravitropismus, Morphologie und Wurzelwachstum (Ruegger et al., 1997; Evans und Ishikawa, 1997; Kaufmann et al., 1995). Es wird im Sproß gebildet und wird dann über das Phloem in das Wurzelmeristem transportiert. Dort wird es vermutlich über die Stele in die Zellen der Cortex und der Epidermis abgegeben, von wo aus es dann basipetal in die Elongationszone befördert wird (Estelle, 1998). Auxin stimuliert die Bildung von Expansinen (Hutchinson et al., 1999) und Zellwand-Glycosidasen, die den Abbau von Polysacchariden in der Wand katalysieren, was in einer Auflockerung der Zellwand resultiert (Hoson et al., 1995). Wird der basipetale Auxintransport durch Al gehemmt (Kollmeier et al., 2000), wird die Auflockerung der Wand verhindert und somit das Wachstum gehemmt (Kap. 4.6).

Nicht nur der Transport von Auxin kann von Al betroffen sein, sondern es ist auch möglich, daß Al den Abbau von Auxin beschleunigt, denn es gibt Hinweise darauf, daß Peroxidasen die Auxingehalte vermindern (Normanly, 1997; Östin et al., 1998). Bei Mais konnte beobachtet werden, daß Ascorbatoxidase zur oxidativen Decarboxylierung von Auxin führte (Kerk et al., 2000). Dies tritt besonderes in Erscheinung, wenn wenig Ascorbat vorliegt. Eine Verringerung der Ascorbatgehalte ist nach Behandlung mit Al mehrfach beschrieben worden. Bei Kürbiswurzeln kam es nach Al-Behandlung zur Hemmung des Wachstums und einem Rückgang der Ascorbatgehalte (Lukaszewski und Blevins, 1996). Auch bei Kartoffel war dies zu beobachten, wobei hier gleichzeitig ein Anstieg der Peroxidaseaktivität verzeichnet wurde (Plitzner, 1998).

Die Reduktion der Ascorbatgehalte ist jedoch nicht nur relevant für die Ascorbatoxidasevermittelte Decarboxylierung von Auxin (Kerk et al., 2000), sondern Ascorbat selbst ist für Wachstumsprozesse wichtig (Arrigoni et al., 1997). Gebiete mit hohem Wachstum weisen oft hohe Ascorbatgehalte auf (Lin und Varner, 1991). Dabei soll Ascorbat als Elektronendonator für verschiedene Enzyme dienen, die Zellwandproteine modifizieren, die ihrerseits für die Zellwandgestaltung wichtig sind (Arrigoni et al., 1997; Schopfer, 1996). Außerdem ist es möglich, daß höhere Ascorbatgehalte die Bildung von Ascorbatperoxidase stimulierten, so daß weniger H_2O_2 für andere Peroxidasen zur Verfügung steht und so oxidative Querverknüpfung vermieden wird (Schopfer, 1996; Hoson et al., 1995). Durch die Bildung von freien Ascorbatradikalen (AFR) soll außerdem der pH-Wert der Zellwand gesenkt werden (De Cabo et al., 1993; Gonzales-Reyes et al., 1994) und durch den niedrigen pH-Wert kann dann die Elongation stimuliert werden (Rayle und Cleland, 1992; Pritchard, 1994).

Eine Erhöhung der Ascorbatgehalte konnte durch Bor stimuliert werden (Mondy und Munshi, 1993). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Zugabe von Bor Al-Toxizität meliorieren kann. Bei Weizen konnte ein solcher Effekt nicht bestimmt werden (Taylor und Macfie, 1994). Im Gegensatz dazu führte Bor-Zugabe bei Kürbis zur Verminderung der Al-Symptome, was mit einer Zunahme der Ascorbatgehalte erklärt werden konnte (Lukaszewski und Blevins, 1996; Lenoble et al., 1996ab). Der meliorierende Effekt von Bor läßt sich aber auch im Zusammenhang mit Pektin sehen. Kobayashi et al. (1996) haben Boratdiester aus Rhamnogalacturonan II identifiziert, die offenbar zusammen mit Ca^{2+} die Pektinstruktur in der Zellwand erhalten (Kobayashi et al., 1999). Findeklee und Goldbach (1996) haben festgestellt, daß die Elastizität der Zellwand sensitiv auf den Borstatus reagiert, was nahelegt, daß die Boratdiester hier ebenfalls eine Rolle spielen. Wenn man davon ausgeht, daß Al zu strukturellen Veränderungen in der Zellwand, vor allem in der Pektinmatrix, führt (Kap. 4.6), dann könnte Bor evt. dazu beitragen, den geordneten, natürlichen Zustand zu erhalten und auf diese Weise Al-Toxizität zu meliorieren.

4.14 Schlußfolgerungen und Ausblick

Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, daß die Bindung von Al im Apoplasten die Aufnahme in den Symplasten erleichtert (Haynes, 1980), aber aufgrund des zeitlichen Verlaufs der Al-Aufnahme und der hier präsentierten Ergebnisse läßt sich schlußfolgern, daß bereits die Bindung von Al in der Zellwand Al-Toxizität auslöst und nicht, wie vermutet, zur Detoxifizierung von Al führt.

Die Bindung von Al im Apoplasten und somit Al-Toxizität wird vom Pektingehalt und dem Methylierungsgrad des Pektins bestimmt. Die Präsenz von Al in der Zellwand verändert offensichtlich die physikalischen Eigenschaften des Apoplasten. Die Festigkeit des Pektin角度 erhöht sich und die Porosität der Wand nimmt ab. Dies hat Auswirkungen auf die Mobilität von Enzymen und Wachstumsfaktoren, so daß die Regulation des Wachstums gestört wird. Darüber hinaus werden Prozesse aktiviert, die zu einer verfrühten Alterung der Zellwand und somit zur Einstellung des Wachstums führen. Die durch Al ausgelösten physikalischen Änderungen in der Zellwand können über die Plasmamembran auf das Cytoskelett übertragen werden, und die daraus folgende Umgestaltung der Mikrotubuli wirkte sich auf die geordnete Deposition von Cellulosefibrillen aus, was ebenfalls zur Hemmung des Wachstums führt. Offenbar ist Al auch in der Lage durch Wechselwirkung von Zellwand und Plasmamembran die Ca-Homeostasis und die Aktivität von Ionenkanälen zu beeinflussen, so daß es auf diesem Weg zur Signaltransduktion kommt und Al-Toxizität auf diese Weise vermittelt werden kann. In diesem Zusammenhang können auch Signalmoleküle, die aus Zellwandbestandtei-

len gebildet werden, eine Rolle spielen. Da das Wurzellängenwachstum von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst wird und die Wechselwirkungen zwischen Zellwand, Plasmamembran und Cytoskelett immer deutlicher zu Tage treten, ist es schwierig, zwischen Ursache und Wirkung zu unterscheiden. Um Al-Toxizität verstehen zu können, ist es daher erforderlich, die Regulationsmechanismen des Wachstums genauer und, möglichst an einer ausgesuchten Pflanzenart bzw. einem Genotypen zu untersuchen. Dabei sollte die Wirkung von Al auf die Zellwandstruktur im allgemeinen und im speziellen auf die Orientierung der Cellulosefibrillen untersucht werden. Weiterhin sollten das Enzym XET, oxidative Prozesse und die Proteine Expansin und Extensin auf Modulation durch Al getestet werden. Darüber hinaus sollten physikalische Änderungen durch Al bei künstlichen Pektinellen und Plasmamembranen untersucht werden, wobei die Zusammensetzung den in Pflanzen vorkommenden Verhältnissen angepaßt sein sollte, bevor Veränderungen, wie z.B. in der Konzentration an Phytosterolen vorgenommen werden. Sollte sich dabei herausstellen, daß die Phytosterole tatsächlich Al-Toxizität modifizieren können, sollten unterschiedlich Al-resistente Genotypen auf die Zusammensetzung ihrer Plasmamembran hin untersucht werden.

Aufgrund der Komplexität des Themas ist diese Aufgabe nur möglich, wenn kooperativ mit anderen Arbeitsgruppen zusammengearbeitet wird, die sich sowohl vom Fachwissen als auch von der instrumentellen Ausstattung auf einzelne der angesprochenen Bereiche spezialisiert haben.

5 Zusammenfassung

Die schädigende Wirkung von Al auf das Wachstum von Pflanzen ist primär auf eine Hemmung des Wurzellängenwachstums zurückzuführen. Der Mechanismus der Al-induzierten Wachstumshemmung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Zusammensetzung der Zellwand Al-Toxizität modulieren kann und ob sich Al auf die Aktivität von verschiedenen Enzymen auswirkt, die an der Modifikation der Zellwand beteiligt sind. Diese Untersuchungen wurden an Kartoffel, Ackerbohne und Mais durchgeführt, die in ihrer Al-Empfindlichkeit sehr ähnlich sind. Ausgewählt wurden diese Pflanzen aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung ihrer Zellwand, wobei sich Mais durch sehr niedrige und Ackerbohne durch hohe Pektingehalte auszeichnen. Von Kartoffel lagen transgene Linien mit unterschiedlichem Expressionsgrad von Pektinmethyl-esterase (PME) vor, so daß der Methylierungsgrad des Pektins in Hinblick auf Al-Toxizität untersucht werden konnte.

Nach wie vor läßt sich nicht sagen, ob die Al-Toxizität durch apoplastisches oder symplastisches Al verursacht wird. Deshalb wurde auch die Verteilung von Al in der Wurzelspitze von zwei Pflanzenarten mittels LAMMA (Laser Microprobe Mass Analysis) untersucht.

Die radiale Mobilität von Al war bei Ackerbohne geringer als bei Mais. In Maiswurzelspitzen erreichte Al die Stele bereits nach 1 h, während bei Ackerbohne Al auf die Rhizodermis und die äußeren Cortezellen beschränkt war, was auf eine stärkere Bindung von Al in der Zellwand der Ackerbohne hindeutet. Nach 3 h war in beiden Pflanzenarten symplastisches Al nachzuweisen, jedoch in wesentlich geringeren Konzentrationen als im Apoplasten. Die Gesamtgehalte an Al waren in den Wurzeln von Ackerbohne höher als in Maiswurzeln. Die unterschiedliche Verteilung und Konzentration von Al in Wurzeln der beiden Pflanzenarten spiegelte sich jedoch nicht in ihrer Al-Empfindlichkeit wider, denn beide erwiesen sich als gleichermaßen sensitiv. Die Bedeutung der Zellwand für die Al-Toxizität wurde beim Vergleich der beiden Pflanzenarten durch unterschiedliche Ausprägung anderer Resistenzmechanismen, wie z.B. die Abgabe von Komplexbildner (org. Anionen, Mucilage) überlagert.

Mögliche Bindungsplätze für Al im Apoplasten stellen die Pektine dar. Der Gehalt an Pektin ist bei Ackerbohne wesentlich höher als bei Mais, was sich auch in den höheren Al-Gehalten der Ackerbohne widerspiegelte. Darüber hinaus war das Pektin entlang der Wurzelspitze nicht gleichmäßig verteilt, sondern bildete bei beiden Pflanzenarten einen Gradienten, der sein Maximum in der Wurzelspitze (0-1 mm) aufwies. Wurden die Al-Gehalte der einzelnen Wurzelsegmente untersucht, zeigte sich eine positive Beziehung zwischen den Pektin- und den Al-Gehalten innerhalb einer, aber auch unter Einbeziehung beider Pflanzenarten.

Bei Zellsuspensionskulturen von Mais wurde der Pektingehalt durch kurzfristige Applikation von pectolytischen Enzymen verringert oder durch die langfristige Adaptation an Salz (NaCl) und 2,6-Dichlorbenzonitril (DCB) erhöht. Dabei zeigte sich, daß es mit steigendem Pektin-gehalt zur verstärkten Bindung von Al kam.

PME ist ein Enzym, daß die Methylester im Pektin spaltet und auf diese Weise Methanol bildet und freie Carboxylgruppen im Pektin schafft, somit den Methylierungsgrad des Pektins reguliert. Bei der Bestimmung der Al-Toxizität bei transgenen Kartoffellinien mit unterschiedlichem Expressionsgrad an PME zeigte sich, daß mit steigendem Expressionsgrad die Al-Empfindlichkeit zunahm. Wurde der Methylierungsgrad von unterschiedlich adaptierten und vorbehandelten Maissuspensionszellen bestimmt, zeigte sich, daß es mit sinkendem Methylierungsgrad zur vermehrten Bindung von Al kam. Eine Ausnahme stellten dabei Zellen dar, die kurzfristig mit Pectolyase behandelt worden waren. Es stellte sich heraus, daß nicht der Methylierungsgrad an sich, sondern der Gehalt an unmethyliertem Pektin für die Bindung von Al in der Zellwand von entscheidender Bedeutung ist.

Mit vermehrter Bindung von Al kam es bei allen untersuchten Pflanzenarten und den unterschiedlich adaptierten Zellkulturen zur Steigerung der Schädigung durch Al. Als Parameter der Schädigung wurde die Hemmung des Wurzellängenwachstums und die Kalloseinduktion herangezogen.

Al-induzierte Kallosebildung ist ein sensitiver Parameter der Al-Schädigung, ist aber offenbar nicht geeignet, um unterschiedliches Gewebe oder verschiedene Pflanzenarten in Hinblick auf die Al-Empfindlichkeit vergleichen zu können. Aus diesem Grund wurde dieser Parameter so modifiziert, daß er die Unterschiede der Gewebe und Pflanzenarten berücksichtigt und trotzdem schnell zu erheben ist, wie es für ein Screeningverfahren notwendig ist. Dabei wird die Al-induzierte Kallosebildung in Relation zur Digitonin-induzierten gesetzt (relative Kalloseinduktion). Bei den verschiedenen Genotypen von Ackerbohne, Kartoffel und Mais fand sich eine positive Beziehung zwischen der Hemmung des Wurzellängenwachstums und der relativen Kalloseinduktion.

Die Behandlung von Pflanzen mit Al führte zur Veränderung von Enzymaktivitäten. Bereits nach 2 h führte Al zur Erhöhung der PME-Aktivität vor allem in der Wurzelspitze (0-1 cm) von Al-sensitiven Kartoffelgenotypen. Die erhöhte PME-Aktivität führt zur Verringerung des Methylierungsgrads und damit zur verstärkten Bindung von Al im Apoplasten.

Auch die Aktivität von Peroxidase war nach Al-Behandlung in den Wurzelspitzen (0-1 cm) erhöht und erreichte bei Al-sensitiven Genotypen das Niveau von älteren Regionen der Wurzel (3-6 cm). In Zellkulturen ging die Erhöhung der Peroxidaseaktivität mit einer Verringerung der Extrahierbarkeit von Phenolen einher, was auf eine oxidative Querverknüpfung der Phenole in der Zellwand schließen läßt.

Die Aktivität von apoplastischer Saurer Phosphatase wurde durch Al vermindert, außerdem wurde die Exsudation des Enzyms gehemmt.

Die Abgabe von Proteinen und Pektinen wurde durch Al inhibiert. Der Transport von PTS (1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure), einem Fluoreszenzfarbstoff der für die Markierung von apoplastischen Transportwegen verwendet wird, wurde gehemmt und es kam zu einer Anreicherung des Farbstoffs in der Wurzelspitze. Dies deutet daraufhin, daß Al die Mobilität im und die Abgabe von Substanzen aus dem Apoplasten behindert indem es die Porosität des Apoplasten vermindert.

Abschließend kann festgehalten werden, daß die Bindung von Al im Apoplasten nicht zu dessen Detoxifizierung führt, sondern einen Schritt in der Perzeption von Al darstellt. Die Bindung von Al wird dabei durch den Gehalt an unmethyliertem Pektin beeinflusst und führt offenbar zu physikalischen Veränderungen in der Zellwand (Porosität) und beeinflusst die Aktivität von Enzymen, die an der Gestaltung der Zellwand und an der Regulation von Wachstumsprozessen beteiligt sind. Al-Toxizität kann somit zumindest teilweise durch Wirkungen im Apoplasten erklärt werden.

Schlagwörter: Aluminiumtoxizität, Apoplast, Pektin

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed, A.E.R., Labavitch, J.M.** (1977): A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.* **1**, 361-365.
- Akashi, T., Kawasaki, S., Shibaoka, H.** (1990): Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells. Effects of extensin on the cold-stability of cortical micro-tubules. *Planta* **182**, 363-369.
- Akeson, M. A., Munns, D. N., Bura, R.G.** (1989): Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles. *BBA* **986**, 33-40.
- Alva, A.K., Asher, C.J., Edwards, D.G.** (1986): The role of calcium in alleviating aluminium toxicity. *Aust. J. Agric. Res.* **37**, 375-382.
- Amor, Y., Haigler, C.H., Johnson, S., Wainscott, M., Delmer, D.P.** (1995): A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 9353-9357.
- Archambault, D.J., Zhang, G., Taylor, G.J.** (1996): Accumulation of Al in root mucilage of an Al-resistant and an Al-sensitive cultivar of wheat. *Plant Physiol.* **112**, 1471-1478.
- Arrigoni, O., Calabrese, G., De Gara, L., Bitonti, M.B., Liso, R.** (1997): Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *J. Plant Physiol.* **150**, 302-308.
- Asamizu, T., Nakayama, N., Nishi, A.** (1984): Pectic polysaccharides in carrot cells growing in suspension culture. *Planta* **160**, 469-473.
- Bacic, A., Moody, S.F., Clarke, A.E.** (1986): Structure analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* **80**, 771-777.
- Bacic, A., Harris, P.J., Stone, B.A.** (1988): Structure and function of plant cell walls. In: *The biochemistry of plants*. Vol. 14 (J. Preiss, ed.) pp 297-371, Academic Press, London, UK.
- Baldwin, E.A., Pressey, R.** (1989): Pectic enzymes in pectolyase. Separation, characterisation, and induction of ethylene in fruits. *Plant Physiol.* **90**, 191-196.
- Baluška, F., Barlow, P.W., Volkmann, D.** (1996a): Complete disintegration of the microtubular cytoskeleton precedes auxin-mediated reconstruction in postmitotic maize root cells. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1013-1021.
- Baluška, F., Volkmann, D., Barlow, P.W.** (1996b): Specialized zones of development in roots. View from the cellular level. *Plant Physiol.* **112**, 3-4.
- Baluška, F., Vitha, S., Barlow, P.W., Volkmann, D.** (1997): Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissue: a major developmental switch in the postmitotic transition region. *Eur. J. Cell Biol.* **72**, 113-121.
- Barlow, P.W., Parker, J.S.** (1996): Microtubular cytoskeleton and root morphogenesis. *Plant Soil* **187**, 23-36.
- Baron-Epel, O., Gharyl, P.K., Schindler, M.** (1988): Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* **175**, 389-395.
- Baskin, T.I., Wilson, J.E.** (1997): Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganise cortical microtubules. *Plant Physiol.* **113**, 493-502.
- Basu, U., Basu, A., Taylor, G.J.** (1994): Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. *Plant Physiol.* **106**, 151-158.
- Batley, N.H., James, N.C., Greenland, A.J., Brownlee, C.** (1999): Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* **11**, 643-659.
- Bayles, C.J., Ghemawat, M.S., Aist, J.R.** (1990): Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papilla deposition, and resistance to powdery mildew in an *ml-o* barley mutant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**, 63-72.

- Beaudet, E.** (1984): Influence des conditions de sols minéraux sur la croissance des plantes. Mémoire de fin d'étude, ENITA d'Angers.
- Bennet, R.J., Breen, C.M., Fey, M.V.** (1985): The primary site of aluminium injury in the root of *Zea mays* L. *S. Afr. J. Bot.* **51**, 355-362.
- Bennet, R.J., Breen, C.M.** (1991): The aluminium signal: New dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. In: *Plant-soil interactions at low pH*. (R.J. Wright, ed.), pp 779-787. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Bergfeld, R. Speth, V., Schopfer, P.** (1988): Reorientation of microfibrils and microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles during auxin-mediated growth. *Bot. Acta* **101**, 57-67.
- Blamey, F.P.C., Dowling, A.J.** (1995): Antagonism between aluminium and calcium for sorption by calcium pectate. In: *Plant soil interactions at low pH*. (R.J. Wright, ed.), pp 303-306. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Blamey, F.P.C., Edmeades, D.C., Wheeler, D.M.** (1990): Role of cation-exchange capacity in differential aluminium tolerance of Lotus species. *J. Plant Nutr.* **13**, 729-744.
- Blamey, F.P.C., Asher, C.J., Edwards, D.C., Kerven, G.L.** (1993): In vitro evidence of aluminum effects on solution movement through root cell walls. *J. Plant Nutr.* **16**, 555-562.
- Blamey, F.P.C., Ostatek-Boczynski, Z., Kerven, G.L.** (1997): Ligand effects on aluminium sorption by calcium pectate. *Plant Soil* **192**, 269-275.
- Blancaflor, E.B., Hasenstein, K.H.** (1995): Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots. *Protoplasma* **185**, 72-82.
- Blancaflor, E. B., Jones, D. L., Gilroy, S.** (1998): Alterations in the cytoskeleton accompany aluminium-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* **118**, 159-172.
- Blatt, M.R., Thiel, G.** (1993): Hormonal control of ion channel gating. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 543-567.
- Blum, A.** (1988): Plant Breeding for stress environments. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G.** (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**, 484-489.
- Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W.** (1973): Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 213-220.
- Bordendave, M.** (1996): Analysis of pectin methyl esterase. In: *Modern methods in plant analysis*. Vol. 17 Plant cell wall analysis. (H-F- Linskens und J.F. Jackson, eds.) pp 165-180, Springer Verlag, Berlin.
- Bordendave, M., Goldberg, R.** (1994): Immobilized and free apoplastic pectinmethylesterases in mung bean hypocotyl. *Plant Physiol.* **106**, 1151-1156.
- Borrego, F., Tari, M., Manjon, A., Iborra J.L.** (1989): Properties of pectinesterase immobilized on glycophasse-coated controlled-pore glass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **22**, 129-140.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J.** (1992): Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of plant cell wall proline-rich protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30.
- Brownlee, C., Goddard, H., Hetherington, A.M., Peake, L.-A.** (1999): Specificity and integration of responses: Ca²⁺ as a signal in polarity and osmotic regulation. *J. Exp. Bot.* **50**, 1001-1011
- Budikova, S.** (1999): Structural changes and aluminium distribution. *Biol. Plant.* **42**, 259-266.
- Büscher, P., Koedam, N., Van Speybroek, D.** (1990): Cation exchange properties and adaptation to soil acidity in bryophytes. *New Phytol.* **115**, 177-186.
- Bush, M.S., McCann, M.C.** (1999): Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol. Plant.* **107**, 201-213.
- Cakmak, I., Horst, W.J.** (1991a): Effect of aluminium on net efflux of nitrate and potassium from root tips of soybean (*Glycine max* L.). *J. Plant Physiol.* **138**, 400-403.
- Cakmak, I., Horst, W.J.** (1991b): Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean. *Physiol. Plant.* **83**, 463-468.

- Carpita, N.C.** (1982): Limiting diameters of pores and the surface structure of plant cell walls. *Science* **218**, 813-814.
- Carpita, N. C.** (1996): Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 445-476.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M.** (1993): Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.
- Carpita, N.C., Sabulase, D., Montezinos, D., Delmer, D.P.** (1979): Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* **205**, 1144-1147.
- Cashikar, A.G., Kumaresan, R., Rao, N.M.** (1997): Biochemical characterisation and sub-cellular localization of the red kidney bean purple acid phosphatase. *Plant Physiol.* **114**, 907-915.
- Chaboud, A.** (1983): Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant Soil* **73**, 395-402.
- Chambat, G., Cartier, N., Lefebvre, A., Marais, M.F., Joseleau, J.P.** (1997): Changes in cell wall and extracellular polysaccharides during the culture cycle of *Rubus fruticosus* cells in suspension culture. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 655-664.
- Chang, Y.-Ch., Yamamoto, Y., Matsumoto, H.** (1999): Enhancement of callose production by a combination of aluminium and iron in suspension-cultured tobacco (*Nicotiana tabacum*) cells. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**, 337-347.
- Charnay, D., Nari, J., Noat, G.** (1992): Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines - interaction with the effects of metal ions. *Eur. J. Biochem.* **205**, 711-714.
- Clarkson, D.T.** (1967): Interactions between aluminium and phosphorus on root surfaces and cell wall material. *Plant Soil* **27**, 347-356.
- Cosgrove, D.J.** (1987): Wall relaxation in growing stems: comparison of four species and assessment of measurement techniques. *Planta* **171**, 266-278.
- Cosgrove, D.J.** (1989): Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* **177**, 121-130.
- Cosgrove, D.J.** (1993a): How do plant cell walls extend? *Plant Physiol.* **102**, 1-6.
- Cosgrove, D.J.** (1993b): Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytol.* **124**, 1-13.
- Cosgrove, D.J.** (1997): Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**, 1031-1041.
- Cosgrove, D.J.** (1998): Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.* **118**, 333-339.
- Cosgrove, D.J., 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.
- Cramer, G.R., Epstein, E., Läuchli, A.** (1988): Kinetics of root elongation of maize in response to short term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. *J. Exp. Bot.* **39**, 1513-1523.
- De Cabo, R.C., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P.** (1993): The onset of cell proliferation is stimulated by ascorbate free radical in onion root primordia. *Biol. Cell* **77**, 231-233.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V.** (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, J.M., Ramirez-Rodriguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L.** (1997): Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**, 1566-1658.
- Delhaize, E., Craig, S., Beaton, C. D., Bennet, R. J., Jagdish, V. C., Randall, P.J.** (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, P.R., Randall, P.J.** (1993b): Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* **103**, 695-702.

- Delmer, D.P., Stone, B.A.** (1988): Biosynthesis of plant cell walls. In: *The biochemistry of plants*, Vol. 14 (P.K. Stumpf, E.E. Conn, eds.) pp 373-420. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- De Lorenzo, G., Cervone, F., Hanh, M.G., Darvill, A., Albersheim, P.** (1991): Bacterial endopectate lyase: evidence that plant cell wall pH prevents tissue maceration and increases the half-life of the elicitor-active oligogalacturonides. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 335-344.
- De Marco, A., Guzzardi, P., Jamet, E.** (1999): Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol.* **120**, 371-381.
- Demarty, M., Morvan, C., Thellier, M.** (1984): Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* **7**, 449-456.
- Ding, J.P., Pickard, B.G.** (1993): Mechanosensory calcium-selective cation channels in onion epidermis. *Plant J.* **3**, 93-110.
- Ding, J.P., Badot, P.-M., Pickard, B.G.** (1993): Aluminium and hydrogen ions inhibit a mechanosensory calcium-selective cation channel. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, 771-778.
- Driouch, A., Faye, L., Staehelin, L.A.** (1993): The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 210-214.
- Dowswell, C. R., Paliwal, R.L., Cantrell, R.P.** (1996): Maize in the third world. 1st edit. Winrock development-oriented literature series (Breth, S. A., Ed.), Westview Press, Boulder, Colorado, USA.
- Eberhardt, T.L., Bernards, M.A., He, L., Davin, L.B., Wooten, J.B., Lewis, N.G.** (1993): Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda*. *J. Biol. Chem.* **268**, 21088-21096.
- Edelmann, H.G., Fry, S.C.** (1992): Effect of cellulose synthesis inhibition on growth and integration of xyloglucan into pea internode cell walls. *Plant Physiol.* **100**, 993-997.
- Edmeades, D.C., Wheeler, D.M., Blamey, F.P.C., Christie, R.A.** (1991): Calcium and magnesium amelioration of aluminium toxicity in Al-sensitive and Al-tolerant wheat. In: *Plant-soil interactions at low pH*. (R.J. Wright, ed.), pp 779-787. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nederlande.
- Eleftheriou, E.P., Moustakas, M., Fragiskos, N.** (1993): Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. *J. Exp. Bot.* **44**, 427-436.
- Ernst, W.H.O.** (1998): Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. In: *Ecotoxicology*. (G. Schürmann, B. Markert, eds.) pp 587-620, Wiley & Son, New York, USA.
- Estelle, M.** (1998): Polar auxin transport - new support for an old model. *Plant Cell* **10**, 1775-1778.
- Evans, M.L., Ishikawa, H.** (1997): Cellular specificity of the gravitropic motor response in roots. *Planta* **203**, 115-122.
- Evans, R., MacHale, D.** (1978): Multiple forms of pectinesterase in limes and oranges. *Phytochem.* **17**, 1073-1075.
- Everdeen, D.S., Kiefer, S., Willard, J.J., Muldoon, E.P., Dey, P.M., Li, X.-B., Lampport, D.T.A.** (1988): Enzymic crosslinkage of monomeric extensin precursors *in vitro*. *Plant Physiol.* **87**, 616-621.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., 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.
- Feigin, A.M., Teeter, J.H., Brand, J.G.** (1995): The influence of sterols on the sensitivity of lipid bilayers to melittin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **211**, 312-317.
- Felle, H.H.** (1998): The apoplastic pH of *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *J. Exp. Bot.* **49**, 987-995.
- Findelee, P., Goldbach, H.E.** (1996): Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Curcubita pepo* roots. *Bot. Acta* **109**, 463-465.
- Finger, F.P., Novick, P.** (1998): Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J. Cell Biol.* **142**, 609-612.
- Fischer, K., Schopfer, P.** (1998): Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. *Plant J.* **15**, 119-123.

- Fisher, D.D., Cyr, R.J.** (1998): Extending microtubule/microfibril paradigm. Cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiol.* **116**, 1043-1051.
- Fleischer, A., Titel, C., Ehwald, R.** (1998): The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiol.* **117**, 1401-1410.
- Fluri, M.** (1909): Der Einfluss von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma. *Flora* **99**, 81-126.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C.** (1978): The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**, 511-566.
- Fry, S.C.** (1986): Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 165-186.
- Fry, S.C.** (1988): The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longamn, New York, USA.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K. F., Martin, D.J., Hodge, S.K., Matthews, K.J.** (1992): Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme-activity from plants. *Biochem. J.* **282**, 821-828.
- Fujii, H.** (1997): Aluminium distribution and its related mechanisms in roots and other parts of some Japanese tree species. In: *Plant nutrition - for sustainable food production and environment.* (T. Ando et al., eds.) pp 463-464. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Gaffe, J., Morvan, C., Jauneau, A., Demarty, M.** (1992): Partial purification of flax cell wall pectin methylesterase. *Phytochem.* **31**, 761-765.
- Giddings, T.H., Staehelin, L.A.** (1991): Microtubule-mediated control of microfibril deposition: A re-examination of the hypothesis. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form.* (C.W. Lloyd, ed.) pp 85-99. Academic Press, San Diego.
- Giovanne, A. Quagliuolo, L., Castaldo, D., Servillo, L., Balestrieri, C.** (1990): Pectin-methylesterase from *Actinidia chinensis* fruit. *Phytochem.* **29**, 2821-2823.
- Godbold, D.L., 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, D. L., Jentschke, G., Marschner, P.** (1995): Solution pH and the response of Norway spruce seedlings to aluminium. *Plant Soil* **171**, 175-178.
- Goldberg, R.** (1984): Changes in the properties of cell wall pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyl. *Plant Physiol.* **61**, 58-63.
- Goldberg, R., Morvan, C., Roland, J.C.** (1986): Composition, properties and localization of pectins in young and mature cells of the mung bean hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* **27**, 417-429.
- Goldberg, R., Liberman, M., Mathieu, C., Pierron, M., Catesson, A.M.** (1987): Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: Possible involvement in the cell wall stiffening process. *J. Exp. Bot.* **38**, 1378-1390.
- Goldberg, R., Pierron, M., Durand, L., Mutaftschiev, S.** (1992a): In vitro and in situ properties of cell wall pectinmethylesterases from mung bean hypocotyls. *J. Exp. Bot.* **43**, 41-46
- Goldberg, R., Bordendave, M., Pierron, M., Prat, R., Mutaftschiev, S.** (1992b): Enzymatic process in growing cell walls, possible control by pectinmethylesterase. In: *Plant cell walls as biopolymers with physiological functions.* (Y. Masuda, ed) pp 269-274, Yamada Science Foundation, Osaka, Japan.
- Goldberg, R., Morvan, C., Jauneau, A., Jarvis, A.** (1996): Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In: *Pectins and pectinases.* (J. Visser, A.G.J. Vorhagen, eds.) pp 151-171. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande.
- Gonzalez-Reyes, J.A., Alcain, F.J., Caler, J.A., Serrano, A., Cordoba, F., Navas, P.** (1994): Relationship between apoplastic ascorbate regeneration and the stimulation of root growth in *Allium cepa* L. *Plant Sci.* **100**, 23-29.
- Grabski, S., Schindler, M.** (1995): Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* **108**, 897-901.

- Grabski, S., Arnoys, E., Busch, B., Schindler, M.** (1998): Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases. *Plant Physiol.* **116**, 279-290.
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D.** (1973): Biological inter-actions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* **32**, 195-198.
- Grauer, U.E.** (1992): Faktoren der Aluminium-Toleranz bei verschiedenen Pflanzen. Diss. Universität Hohenheim, Institut für Pflanzenernährung.
- Grauer, U.E., Horst, W.J.** (1992): Modelling cation amelioration of aluminium toxicity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **56**, 166-172.
- Grunwald, C.** (1975): *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 209-214.
- Gunse, B., Poschenrieder, C., Barcelo, J.** (1997): Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiol.* **113**, 595-602.
- Haley, A., Russel, A., Wood, N., Allan, A., Knight, M.R., Campbell, A.K.C., Trewavas, A.J.** (1995): Mechanical effects on cytoplasmic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4124-4128.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., Kuc, J.** (1982): Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum laenarium*. *Physiol. Plant.* **20**, 73-82.
- Harris, P.J., Northcote, D.H.** (1970): Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of the maize root cap. *Biochem. J.* **120**, 479-491.
- Hartland, R.P., Emerson, G.W., Sullivan, P.A.** (1991): A secreted β -glucan branching enzyme from *Candida albicans*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **246**, 155-160.
- Haug, A.** (1984): Molecular aspects of aluminium toxicity. *CRC Critical Rev. Plant Sci.* **1**, 345-373.
- Haug, A., Shi, B., Vitorello, V.** (1994): Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* **68**, 1-7.
- Hayashi, T., Read, S.M., Bussel, J., Thelen, M., Lin, F.C., Brown, R.M., Delmer, D.P.** (1987): UDP-glucose: (1-3)- β -glucan synthase from mung bean and cotton. Differential effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on enzyme properties and on macromolecular structure of the glucan product. *Plant Physiol.* **83**, 1054-1062.
- Haynes, R.J.** (1980): Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *Bot. Rev.* **46**, 75-99.
- Hem, J.D.** (1986): Geochemistry and aqueous chemistry of aluminium. *Kidney Int.* **29**, 3-7.
- Hepler, P.K., Wayne, R.O.** (1985): Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
- Hodson, M. J., Sangster, A.G.** (1993): The interaction between silicon and aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: growth analysis and X-ray microanalysis. *Annu. Bot.* **72**, 389-400.
- Horst, W.J.** (1995): The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **158**, 419-428.
- Horst, W.J., Wagner, A., Marschner, H.** (1982): Mucilage protects root meristem from aluminium injury. *Z. Pflanzenphys.* **105**, 435-444.
- Horst, W.H., Püschel, A.-K., Schmohl, N.** (1997): Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil* **192**, 23-30.
- Horst, W. J., Schmohl, N., Kollmeier, M., Baluška, F., Sivaguru, M.** (1999): Does aluminium affect root growth of *Zea mays* through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? *Plant Soil* **215**, 163-174.
- Hoson, T.** (1993): Regulation of polysaccharide breakdown during auxin-induced cell wall loosening. *J. Plant Res.* **103**, 369-381.
- Hoson, T., Wakabayashi, K., Masuda, Y.** (1995): Inhibition of the breakdown of xyloglucans in azuki bean epicotyls by concavalin A. *Plant Cell Physiol.* **36**, 897-902.
- Hutchison, K.W., Singer, P.B., McInnis, S., Diaz-Sala, C., Greenwood, A.S.** (1999): Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exo-genous auxin. *Plant Physiol.* **120**, 827-831.

- Ingber, E.** (1997): Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 575-599.
- Iraki, N.M., Bressan, R.A., Carpita, N.C.** (1989): Extracellular polysaccharides and proteins of tobacco cell cultures and changes in composition associated with growth-limiting adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol.* **91**, 54-61.
- Jähne, A., Lazzeri, P.A., Jäger-Gussen, M., Lörz, H.** (1991): Plant regeneration from embryogenic cellsuspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* **82**, 74-80.
- Jabuke, H.-D., Jenschkeit, H.** (1987): Fachlexikon ABC Chemie. 3. Aufl., Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main.
- Jarvis, M.C.** (1984): Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant cell Environ.* **7**, 153-164.
- Jarvis, M.C., Forsyth, W., Duncan, H.J.** (1988): A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiol.* **88**: 309-314.
- Jauneau, A., Roy, S., Reis, D., Vian, B.** (1998): Probes and microscopical methods for the localisation of pectins in plant cells. *Int. J. Plant Sci.* **159**, 1-13.
- Jin, D.F., West, C.A.** (1984): Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of chitinase synthase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol.* **74**, 989-992.
- Jones, D.L., Kochian, L.V.** (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, D.L., Kochian, L.V., Gilroy, S.** (1998a) Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* **116**, 81-89.
- Jones, D.L., Gilroy, S., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V.** (1998b): Effect of aluminum on cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Planta* **206**, 378-387.
- Julmanop, C., Takano, Y., Takemoto, J.Y., Miyakawa, T.** (1993): Protection by sterols against cytotoxicity of syringomycin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2323-2327
- Kaufmann, P.B., Wu, L.L., Brock, T.G., Kim, D.** (1995): Hormones and the orientation of growth. In: *Plant Hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology.* (P.J. Davies, ed.) pp 547-571, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Kauss, H.** (1989): Fluorometric measurement of callose and other 1,3-β-glucans. In: *Modern methods in plant analysis.* Vol. 10 Plant fibers. (H-F. Linskens und J.F. Jackson, eds.) pp 127-137, Springer Verlag, Berlin.
- Kauss, H.** (1990): Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. In: *The plant plasma membrane - Structure, function and molecular biology.* (C. Larsson und I.M. Möller, eds.) pp 320-350, Springer Verlag, Berlin.
- Kauss, H.** (1996): Callose synthesis. In: *Membranes: Specialized functions in plants.* (M. Smallwood et al., eds.) pp 77-92. Bios Scientific Publisers, Oxford, UK.
- Kauss, H., Jeblick, W., Dormand, A.** (1989): The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**, 385-392.
- Kauss, H., Waldmann, T., Quader, H.** (1990): Ca²⁺ as a signal in the induction of callose synthesis. In: *Signal Perception and Transduction in Higher Plants.* (R. Ranjeva, A.M. Boudet, eds.) pp 117-131. Springer-Verlag, Berlin.
- Kauss, H., Waldmann, T., Jeblick, W., Takemoto, T.Y.** (1991): The phytotoxin syringomycin elicits Ca²⁺-dependent callose synthesis in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **81**, 134-138.
- Kenton, P., Mur, L.A.J., Draper, J.** (1999): A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf acid phosphatase specific activity. *J. Exp. Bot.* **50**, 1331-1341.
- Kerk, N.M., Jiang, K., Feldman, L.J.** (2000): Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* **122**, 925-932.

- Kim, J.-B., Carpita, N.C.** (1992): Changes in the esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiol.* **98**, 646-653.
- Kinraide, T.B.** (1991): Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* **134**, 167-178.
- Kinraide, T.B.** (1997): Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *J. Exp. Bot.* **48**, 1115-1124.
- Kinraide, T.B., Ryan, P.R., Kochian, L.V.** (1992): Interaction effects of Al^{+3} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol.* **99**, 1461-1468.
- Kinzel, H.** (1983): Influence of limestone, silicates and soil pH on vegetation. In: *Physiological Plant Ecology III*, Encyclopaedia of Plant Physiol. New Series, Vol 12. (O.L.C. Lange et al., eds.) pp 201-244. Springer Verlag, Berlin.
- Klotz, K.L., Liu, T.-T.Y., Liu, L., Lagrimini, L.M.** (1998): Expression of the tobacco anionic peroxidase gene is tissue-specific and developmentally regulated. *Plant Mol. Biol.* **36**, 509-520.
- Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, J.** (1996): Two chains of rhamnogalacturonan II are crosslinked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* **110**, 1017-1020.
- Kobayashi, M., Nakagawa, H., Asaka, T., Matoh, T.** (1999): Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca^{2+} retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol.* **119**, 199-203.
- Kochian, L.V.** (1995): Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **49**, 237-260.
- Köhle, H., Jeblick, W., Poten, W., Blashek, W., Kauss, H.** (1985): Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. *Plant Physiol.* **77**, 544-551.
- Kollmeier, M., Felle, H.H., Horst, W.J.** (2000): Genotypical differences in Al resistance of *Zea mays* (L.) are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by Al? *Plant Physiol.* **122**, 945-956.
- Koyama, H., Toda, T., Yokota, S., Dawair, Z., Hara, T.** (1995): Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture. *Plant Cell Physiol.* **36**, 205-205.
- Kühling, A.** (1997): Unterschiede in der Aluminium-Toleranz in-vitro vermehrter Kartoffelgenotypen (*Solanum tuberosum* L.). Staatsexamensarbeit, Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover.
- Kuhn, A.J., Bauch, J., Schröder, W.H.** (1995): Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* **168-169**, 135-150.
- Kutschera, U.** (1996): Cessation of cell elongation in rye coleoptiles is accompanied by a loss of cell-wall plasticity. *J. Exp. Bot.* **47**, 1387-1394.
- Lagrimini, L.M.** (1991): Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants over-expressing peroxidase. *Plant Physiol.* **114**, 1187-1196.
- Lagrimini, L.M., Rothstein, S.** (1987): Tissue specificity of tobacco peroxidase isoenzymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **84**, 438-442.
- Lamb, C., Dixon, R.A.** (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Lamport, D.T.A., Catt, J.W.** (1981): Glycoproteins and enzymes of the cell wall. In: *Encyclopedia of plant physiology, Vol. 13B. Plant carbohydrates. II. Extracellular carbohydrates.* (W. Tanner und F.A: Loewus, eds.) pp 133-165, Springer Verlag, Berlin.
- Larsen, P.B., Tai, C.-H., Kochian, L.V., Howell, S.H.** (1996): *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol.* **110**, 743-751.
- Lazar, T. Götte, M., Gallwitz, D.** (1997): Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make an eucariotic cell? *Trends Biochem. Sci.* **22**, 468-472.
- Lazof, D.B., Goldsmith, J.G., Rufty, T.W., Linton, R.W.** (1994): Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. *Plant Physiol.* **106**, 1107-1114.

- Lazof, D.B., Goldsmith, J.G., Ruffy, T.W., Linton, R.W.** (1996): The early entry of Al into cells of intact soybean roots. *Plant Physiol.* **112**, 1289-1300.
- Lee, E.H., Foy, C.D.** (1986): Aluminium tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high-performance liquid chromatography. *J. Plant Nutr.* **9**, 1481-1498.
- Legendre, L., Rueter, S., Heinstejn, P.F., Low, P.S.** (1993): Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.* **102**, 233-240.
- Lenoble, M.E., Blevins, D.G., Sharp, R.E., Cumbie, B.G.** (1996a): Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron. I. Maintenance of root elongation and cellular structure. *Plant Cell Environ.* **19**, 1132-1142.
- Lenoble, M.E., Blevins, D.G., Miles, R.J.** (1996b): Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron. II. Stimulation of root growth in an acidic, high-aluminium subsoil. *Plant Cell Environ.* **19**, 1143-1148.
- Le Van, H., Kuraishi, S., Sakurai, N.** (1994): Aluminium-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. *Plant Physiol.* **106**, 971-976.
- Li, Y.Q., Chen, F., Linskens, H.F., Cresti, M.** (1994): Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod.* **7**, 145-152.
- Li, X.F., Ma, J.F., Hiradate, S., Matsumoto, H.** (2000): Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. *Physiol. Plant.* **108**, 152-160.
- Lin, L.S., Varner, J.E.** (1991): Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Curcubita pepo* L.) *Plant Physiol.* **96**, 159-165.
- 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* L.). *Physiol. Plant.* **99**, 405-414.
- Liners, F., Van Cutsem, P.** (1992): Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. An immunocytochemical study. *Protoplasma* **170**, 10-21.
- Lorences, E.P., Fry, S.C.** (1991): Absolute measurement of cell expansion in plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **24**, 211-215.
- Llugany, M., Massot, N., Wissemeier, A.H., Poschenrieder, C., Horst, W.J., Barcelo, J.** (1994): Aluminum tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **157**, 447-451.
- Llugany, M., Poschenrieder, C., Barcelo, J.** (1995): Monitoring of aluminum-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminum and proton toxicity. *Physiol. Plant.* **93**, 265-271.
- Lukaszewski, K.M., Blevins, D.G.** (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, J.F., Taketa, S., Yang, Z.M.** (2000): Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol.* **122**, 687-694.
- MacDougall, A.J., Rigby, N.M., Ring, S.G.** (1996): Calcium gelation of pectic polysaccharides isolated from unripe tomato fruit. *Carbohydr. Res.* **293**, 235-249.
- MacDougall, A.J., Rigby, N.M., Ring, S.C.** (1997): Phase separation of plant cell wall polysaccharides and its implications for cell wall assembly. *Plant Physiol.* **114**, 353-362.
- MacDougall, G.J., Fry, S.C.** (1990): Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase in cell expansion. *Plant Physiol.* **93**, 1042-1048.
- Masion, A., Bretsch, P.M.** (1997): Aluminium speciation in the presence of wheat root cell walls: a wet chemical study. *Plant Cell Environ.* **20**, 504-512.
- Marienfeld, S., Stelzer, R.** (1993): X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *J. Plant Physiol.*, **141**, 569-573.
- Markovic, O., Kohn, R.** (1984): Mode of pectin deesterification by *Trichoderma reesei* pectinesterase. *Experientia* **40**, 842-843.

- Martin, R. B.** (1988): Bioinorganic chemistry of aluminium. In: *Metal ions in biological systems. Vol. 24. Aluminium and its role in biology.* (H. Sigel, ed.) pp 1-57. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Massot, N., Llugany, M., Poschenrieder, C., Barcelo, J.** (1999): Callose production as indicator of aluminium tolerance in bean cultivars. *J. Plant Nutr.* **22**, 1-10.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Kasai, M.** (1992): Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminium stress: membrane-associated ATPase, aluminium and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* **38**, 411-419.
- McCann, M.C., Roberts, K.** (1994): Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J. Exp. Bot.* **45**, 1683-1691.
- McCann, M.C., Shi, J., Roberts, K., Carpita, N.C.** (1994): Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant J.* **5**, 773-785.
- McLachlan, K.D.** (1980): Acid phosphatase activity of intact roots and phosphorus nutrition in plants. I. Assay conditions and phosphatase activity. *Aust. J. Agri. Res.* **31**, 429-440.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J.** (1994): Disruption of hydrogen bonding between cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 6574-6578.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J.** (1995): Expansion mode of action on cell walls - analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* **107**, 87-100.
- McQueen-Mason, S., Rochange, F.** (1999): Expansins in plant growth and development: an update on an emerging topic. *Plant Biol.* **1**, 19-25.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J.** (1992): Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**, 1425-1433.
- Messiaen, J., van Cutsem, P.** (1993): Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol.* **34**, 1117-1123.
- Messiaen, J., van Cutsem, P.** (1994): Pectic signal transduction in carrot cells: membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol.* **34**, 677-689.
- Messiaen, J., van Cutsem, P.** (1999): Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta* **208**, 247-256.
- Messiaen, J., Read, N.D., van Cutsem, P., Trewavas, A.J.** (1993): Cell wall elicitors increase cytosolic free Ca²⁺ in plant cells. *J. Cell Sci.* **104**, 365-371.
- Miller, J.G., Fry, S.C.** (1992): Production and harvesting of ionically wall-bound extensin from living cell-suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **31**, 61-66.
- Miller, D., Hable, W., Gottwald, J., Ellard-Ivey, M., Demura, T., Lomax, T., Carpita, N.C.** (1997a): Connections: The hard wiring of the plant cell for perception, signalling, and response. *Plant Cell* **9**, 2105-2117.
- Miller, D.D., de Ruijter, N.C.A., Emons, A.M.C.** (1997b): From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips. *J. Exp. Bot.* **48**, 1881-1896.
- Miyasaka, S.C., Kochian, L.V., Shaff, J.E., Foy, C.D.** (1989): Mechanisms of aluminium 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.
- Mohan, R., Vijayan, P., Kolattukudy, P.E.** (1993): Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (*tap1*) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region. *Plant Mol. Biol.* **22**, 475-490.
- Mondy, N.I., Munshi, C.B.** (1993): Effect of boron on enzymatic discoloration and phenolic and ascorbic acid content of potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 554-556.
- Moody, S.F., Clark, A.E., Bacic, A.** (1988): Structure analysis of secreted slime from wheat and cowpea roots. *Phytochem.* **27**, 2861-2875.
- Moon, G.J., Clough, B.F., Peterson, C.A., Allaway, W.G.** (1986): Apoplastic and sym-plastic pathway in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Roots revealed by fluorescent tracer dyes. *Austr. J. Plant Physiol.* **13**, 637-648.
- Morel, J.L., Mench, M., Guckert, A.** (1986): Measurement of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils* **2**, 29-34.

- Morris, E.R., Gidley, M.J., Murray, E.J., Powell, D.A., Rees, D.A.** (1980): Characterization of pectin gelation under conditions of low water activity, by circular dichroism, competitive inhibition and mechanical properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2**, 327-330.
- Moustacas, A.-M., Nari, J., Diamantidis, G., Noat, G., Crasnier, M., Borel, M., Ricard, J.** (1986): Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 2. The role of pectin methyl esterase in the modulation of electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J. Biochem.* **155**, 191-197.
- Moustacas, A.M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., Ricard, J.** (1991): Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem. J.*, **279**, 351-354.
- Münch, E.** (1930): Die Stoffbewegung in der Pflanze. Fischer Verlag, Jena.
- Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M., Ricard, J.** (1986): Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reaction at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J. Biochem.* **155**, 199-202.
- Nari, J., Noat, G., Ricard, J.** (1991): Pectin methylesterase, metal ions and plant cell wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase. *Biochem J.* **279**, 343-350.
- Nick, P.** (1999): Signals, motors, morphogenesis - the cytoskeleton in plant development. *Plant Biol.* **1**, 169-179.
- Noble, A.D., Sumner, M.E., Alva, A.K.** (1988): The pH dependency of aluminium toxicity alleviation by calcium sulfate. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **52**, 1398-1402.
- Normanly, J.** (1997): Auxin metabolism. *Physiol. Plant.* **100**, 431-442.
- O'Driscoll, D., Read, S.M., Steer, M.W.** (1993): Determination of cell wall porosity by microscopy: walls of cultured cells and pollen tubes. *Acta Bot. Neerl.* **42**, 237-244.
- Osmond, C.B., Chaney, R.L., White, M.C.** (1980): Physiological processes in plant ecology. Springer Verlag Berlin.
- Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R.P., Sandberg, G.** (1998): Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **118**, 285-296.
- Otte, O., Barz, W.** (1996): The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* **200**, 238-246.
- Papernik, L.A., Kochian, L.V.** (1997): Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. *Plant Physiol.* **115**, 657-667.
- Parker, D.R., Kinraide, T.B., Zelazny, L.W.** (1988): Aluminium speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy-aluminium solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**, 348-444.
- Parker, D.R., Norwell, W.A., Chaney, R.L.** (1992): GEOCHEM-PC: A chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: *Chemical equilibrium and reaction models*. (R.H. Loeppert et al., eds.), SSSA, Spec. Publ.
- Passioura, J.B., Fry, S.C.** (1992): Turgor and cell expansion: beyond the Lockhart equation. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 565-576.
- Paull, R.E., Jones, R.L.** (1978): Regulation of synthesis and secretion of fucose-containing polysaccharides in cultured sycamore cells. *Aust. J. Plant Physiol.* **5**, 457-467.
- Pellet, D.M., Grunes, D.L., Kochian, L.V.** (1995): Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**, 788-795.
- Penel, C., Crevecoeur, M., Greppin, H.** (1996): The binding of peroxidases to pectins. In: *Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology*. International symposium of plant per-oxidases. (C. Obinger et al., eds.), pp 259-263. Universität Genf, Schweiz.
- Perbal, G., Driss-Ecole, D., Tewinkel, M., Volkmann, D.** (1997): Statocyte polarity and gravisensitivity in seedling roots grown in microgravity. *Planta* **203**, 57-62.
- Peretto, R., Perotto, S., Faccio, A., Bonfante-Fasolo, P.** (1990): Cell surface in *Calluna vulgaris* L. hair roots. *In situ* localisation of polysaccharidic components. *Protoplasma* **155**, 1-18.

- Pfeiffer, W.** (1996): Auxin induces exocytosis of acid phosphatase in coleoptiles from *Zea mays*. *Plant Physiol.* **98**, 773-779.
- Pfeiffer, W.** (1998): Expression and low pH increase the activity of apoplastic acid phosphatase in growing tissues from *Zea mays*. *Plant Physiol.* **102**, 111-118.
- Pierson, E.C., Cresti, M.** (1992): Cytoskeleton and cytoplasmic organisation of pollen and pollen tubes. *Int. Rev. Cytol.* **140**, 73-125.
- Pilet, P.E., Versel, J.M., Mayor, G.** (1983): Growth distribution and surface pH patterns along maize roots. *Planta* **158**, 398-402.
- Pilling, J.** (1999): Genetic modification of the pectin structure of *Solanum tuberosum*. Shaker Verlag, Aachen.
- Plitzner, M.** (1998): Wirkung von Aluminium auf physiologische und biochemische Parameter in Wurzelspitzen von *Solanum tuberosum* L. Genotypen. Staatsexamensarbeit, Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover.
- Preston, R.D.** (1988): Cellulose microfibril orientating mechanisms in plant cell walls. *Planta* **174**, 67-74.
- Pritchard, J.** (1994): The control of cell expansion in roots. *New Phytol.* **127**, 3-26.
- Pritchard, J., Tomos, A.D., Wyn-Jones, R.G.** (1987): Control of wheat root elongation rate. I. Effects of ions on growth rate, wall rheology and cell water relations. *J. Exp. Bot.* **38**, 948-959.
- Pritchard, J., Hetherington, P.R., Fry, S.C., Tomos, A.D.** (1993): Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along the growing regions of maize roots. *J. Exp. Bot.* **44**, 1281-1289.
- 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*. (R.J. Wright, ed.), pp 779-787. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Quentin, M., Jauneau, A., Morvan, O., Mareck, A., Gaffe, J., Morvan, C.** (1997): Immunolocalization of pectin methylesterases in the hypocotyl tissues of flax. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 475-482.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E.** (1992): The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* **99**, 1271-1274.
- Read, S.M., Bacic, A.** (1995): Cell wall porosity and its determination. In: *Modern Methods of plant analysis*. Vol. 17 (H.-F. Linskens und F.J. Jackson, ed.), pp 63-80. Springer-Verlag Berlin.
- Rengel, Z.** (1992): 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 by plant cells. *New Phytol.* **134**, 389-406.
- Rengel, Z., Reid, R.J.** (1997): Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant Soil* **192**, 31-35.
- Rexova-Benkova, L., Markovic, O.** (1976): Pectic enzymes. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (R.S. Tipson, D. Horten, eds.), Vol. 33, pp 232-385.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., Gardner, R.C.** (1998): Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**, 409-418.
- Rincon, M., Gonzales, R.A.** (1992): Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol.* **99**, 1021-1028.
- Robert, E.P., Jones, P.L.** (1975): Studies on the secretion of maize root cap slime. *Plant Physiol.* **56**, 307-312.
- Roberts, R.M., Butt, V.S.** (1968): Patterns of incorporation of pentose and uronic acid into the cell walls of maize root tips. *Exp. Cell Res.* **51**, 519-530.
- Robinson, D.G.** (1996): SuSy ergo GluSy: New developments in the field of cellulose biosynthesis. *Bot. Acta* **109**, 261-263.

- Rougier, M.** (1981): Secretory activity of the root cap. In: *Encyclopedia of plant physiology, Vol. 13B. Plant carbohydrates. II. Extracellular carbohydrates.* (W. Tanner und F.A. Loewus, eds.) pp 542-574. Springer Verlag, Berlin.
- Rorison, I.H.** (1965): The effect of aluminium on the uptake and incorporation of phosphate by exised sanfoin roots. *New Phytol.* **64**, 23-27.
- Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G., Estelle, M.** (1997): Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabi-dopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* **9**, 745-757.
- Ryan, P.R., Ditomaso, J.M., Kochian, L.V.** (1993): Aluminium toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* **44**, 437-446.
- Sajjaanantakul, T., Pitifer, L.A.** (1991): Pectinesterase. In: *The chemistry and technology of pectin.* (R.H. Walter, ed.), pp 135-164. Academic Press, San Diego, USA.
- Sakurai, N.** (1991): Cell wall functions in growth and development - a physical and chemical point of view. *Bot. Mag. Tokyo* **104**, 235-251.
- Sapra, V.T., Mebrahtu, T., Mugwira, L.W.** (1982): Soybean germplasm and cultivar aluminium tolerance in nutrient solution and Bladen clay loam soil. *Agronom. J.* **74**, 687-690.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H.** (1997): Aluminum inhibits growth and stability of cortical microtubules in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Soil Sci. Plant. Nutr.* **43**, 469-472.
- Schinkel, H.** (1991): Die Verwendung spektrochemischer Puffer in der Flammen-AAS. *GIT Fachz. Lab.* **34**, 25-30.
- Schmohl, N.** (1994): Charakterisierung genotypischer Unterschiede in der Aluminium-toleranz bei *Zea mays* an aus Wurzeln isolierten Protoplasten. Diplomarbeit. Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover.
- Schmohl, N., Horst, W.J.** (2000): Cell-wall pectin-content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant Cell Environm.* **23**, 735-742.
- Schnabelrauch, L.S., Kieliszewski, M., Upham, B.L., Alizedeh, H., Lampport, D.T.A.** (1996): Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* **9**, 477-489.
- Schopfer, P.** (1996): Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening *in vitro*. *Planta* **199**, 43-49.
- Schröder, W. H., Bauch, J., Endeward, R.** (1988): Microbeam analysis of Ca exchange and uptake in the fine roots of spruce: influence of pH and aluminium. *Trees* **2**, 96-103.
- Scott-Craig, J.S., Kerby, K., Stein, B.D., Sommerville, S.C.** (1995): Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**, 407-418.
- Selvendran, R.R., Ryden, P.** (1990): Isolation and analysis of plant cell walls. In: *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 2: Carbohydrates.* (P.M. Dey, ed.), pp 549-579, Academic Press, London, UK.
- Seymour, T.A., Preston, J.F., Wickler, L., Lindsay, J.A., Wei, J., Marshall, M.R.** (1991): Stability of pectinesterase of marsh white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1075-1079.
- Sivaguru, M., Horst, W.J.** (1998): The distal part of the transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **116**, 155-163.
- Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H.H., Horst, W.J.** (1999a): Impacts of aluminum on the *Zea mays* cytoskeleton. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* **119**, 1-10.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H.** (1999b): Differential impacts of aluminium on microtubule organisation depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* **107**, 110-119.
- Shedletzky, E., Shmuel, M., Delmer, D.P., Lampport, D.T.A.** (1990): Adaption and growth of tomato cells on the herbicide 2,6-Dichlorobenzonitriloe leads to production of unique cell walls virtually lacking a cellulose-xyloglucan network. *Plant Physiol.* **94**, 980-987.

- Shedletzky, E., Shmuel, M., Trainin, T., Kalman, S., Delmer, D.** (1992): Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitile. *Plant Physiol.* **100**, 120-130.
- Slaski, J.J.** (1989): Effect of aluminium on calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase activity in wheat (*Triticum aestivum*) root tips. *J. Plant Physiol.* **133**, 696-701.
- Slaski, J.J.** (1990): Response of calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase to aluminium in root tips from various cultivated plants. *J. Plant Physiol.* **136**, 40-44.
- Smith, R.C., Fry, S.C.** (1991): Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem. J.* **279**, 529-535.
- Snowden, K.C., Richards, K.D., Gardner, R.C.** (1995): Aluminum-induced genes: Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.* **107**, 341-348.
- Spurr, A.R.** (1969): A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.* **1**, 239-246.
- Staelin, L.A., Moore, I.** (1995): The plant Golgi apparatus: structure and functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **46**, 261-288.
- Stalleart, V.M., Geuns, J.M.** (1994): Phospholipid and free sterol composition of hypocotyl plasma membranes of ageing mung bean seedlings. *Phytochem.* **36**, 1177-1180.
- Staß, A.** (1995): Kurzfristige Wirkung von Aluminium auf Suspensionszellen von *Gycine max*. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Staß, A., Horst, W.J.** (1995): Effect of aluminum on membrane properties of soybean (*Glycine max* L.) cells in suspension culture. *Plant Soil* **171**, 113-118.
- Staswick, P.E., Papa, C., Huang, J.-F., Rhee, Y.** (1994): Purification of the mayor soybean leaf acid phosphatase that is increased by see-pod removal. *Plant Physiol.* **104**, 49-57.
- Steer, M.W.** (1988): The role of calcium in exocytosis and endocytosis in plant cells. *Plant Physiol.* **72**, 213-220.
- Sterling, C.** (1970): Crystal-structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectin stain. *Am. J. Bot.* **57**, 172-175.
- Taiz, L.** (1984): Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 585-657.
- Takabatake, R., Shimmen, T.** (1997): Inhibition of electrogenesis by aluminum in characean cells. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1264-1271.
- Tan, K.-S., Hoson, T., Masuda, Y., Kamisaka, S.** (1991): Correlation between cell wall extensibility and the content of diferulic acid and ferulic acids in cell walls of *Oryza sativa* coleoptiles grown under water and in air. *Physiol. Plant.* **83**, 397-403.
- Tanaka, T., Fillmore, D., Sun, S.-T., Nishio, I., Swislow, G., Shah, A.** (1980): Phase transitions in ionic gels. *Phys. Rev. Lett.* **45**, 1336-1339.
- Tanaka, T., Nishio, I., Sun, S.-T., Ueno-Nishio, S.** (1982): Collapse of gels in an electric field. *Science* **218**, 467-469.
- Taylor, G.J.** (1988): The physiology of aluminum tolerance in higher plants. *Commu. Soil Sci. Plant Anal.* **19**, 1179-1194.
- Taylor, G.J.** (1991): Current views of the aluminium stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **10**, 57-93.
- Taylor, G.L.** (1995): Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. *Plant Soil* **173**, 89-103.
- Taylor, G.J., Macfie, S.M.** (1994): Modelling the potential for boron amelioration of aluminum toxicity using the Weibull function. *Can. J. Bot.* **72**, 1187-1196.
- Taylor, I.E.P., Wallace, J.C., MacKay, A.L., Volke, F.** (1990): Use of chemical fractionation and proton nuclear magnetic resonance to probe the physical structure of the primary plant cell wall. *Plant Physiol.* **94**, 174-178.

- Tice K. R., D. R. Parker and D. A. DeMason** (1992): Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* **100**, 309-318.
- Tieman, D.M., Harriman, R.W., Ramamohan, G., Handa, A.K.** (1992): An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* **4**, 667-679.
- Titel, C., Woehlecke, H., Afifi, I., Ehwald, R.** (1997): Dynamics of limiting cell wall porosity in plant suspension cultures. *Planta* **203**, 320-326.
- Thordal-Christensen, H., Brandt, J., Cho, B.H., Rasmussen, S.K., Gregersen, P.L., Smedegaard-Petersen, V., Collinge, D.B.** (1992): cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **40**, 395-409.
- Trewavas, A.J., Malho, R.** (1997): Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* **9**, 1181-1195.
- Van Engelen, F.A., Sterk, P., Booij, H., Cordewener, J.H.G., Rook, W., van Kammen, A., deVries, S.C.** (1991): Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiol.* **96**, 705-712.
- Vannier, M.P., Thoiron, B., Morvan, C., Demarty, M.** (1992): Localization of hemicellulose and pectin methyltransferase throughout the endomembrane complex. *Biochem J.* **286**, 843-868.
- Varner, J.E.; Lin, L.-S.** (1989): Plant cell wall architecture. *Cell* **56**, 231-239.
- Vázquez, M. D., Poschenrieder, C., Corrales, I., Barcelo, J.** (1999): Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant *Zea mays* variety. *Plant Physiol.* **119**, 435-444.
- Verbueken, A. H., Van Grieken, R.E., Paulus, G.J., de Bruijn, W.C.** (1984): Embedded ion exchange beads as standards for laser microprobe mass analysis of biological specimen. *Anal. Chem.* **56**, 1362-1370.
- von Uexküll, H.R., Mutert, E.** (1995): Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* **171**, 1-15.
- Wagatsuma, T., Akiba, R.** (1989): Low surface negativity of root protoplasts from aluminum-tolerant plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* **35**, 443-452.
- Wagatsuma, T., Ezo, Y.** (1985): Effect of pH on ionic species of aluminum in medium and on aluminum toxicity under solution culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* **31**, 547-561.
- Wagatsuma, T., Kaneko, M.** (1987): High toxicity of hydroxy-aluminium polymer ions to plant roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* **33**, 57-67.
- Wagatsuma, T., Ishikawa, S., Obata, H., Tawaraya, K., Katohda, S.** (1995): Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium toxicity in roots. *Plant Soil* **171**, 105-112.
- Wagatsuma, T., Hitomi, H., Ishikawa, S., Tawaraya, K.** (1997): Al-binding capacity of plasma membrane of root-tip portion in relation to Al tolerance. In: *Plant nutrition for sustainable food production and environment*. (T. Ando et al., eds.) pp 467-468. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nederlande.
- Waldmann, T.** (1992) Untersuchungen zur Regulation der elicitor-induzierten Callose-Synthese bei Suspensionszellkulturen von *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Waldmann, T., Jeblick, W., Kauss, H.** (1988): Induced net Ca²⁺ uptake and callose bio-synthesis in suspension-cultured plant cells. *Planta* **173**, 88-95.
- Wallace, G., Fry, S.C.** (1994): Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* **151**, 229-268.
- Welinder, K.G.** (1985): Plant peroxidases: their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* **151**, 497-504.
- Wells, B., McCann, M.C., Shedletzky, E., Delmer, D., Roberts, K.** (1994): Structural features of cell walls from tomato cells adapted to grow on the herbicide 2,6-dichloro-benzonitrile. *J. Microscopy* **173**, 155-164.

- Williamson, R.E.** (1991): Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **129**, 135-206.
- 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.
- Wissemeyer, A.H., Klotz, F., Horst, W.J.** (1987): Aluminium induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max. L.*). *Plant Physiol.* **129**, 487-492.
- Wissemeyer, A.H., Horst, W.J.** (1995): Effect of calcium supply on aluminium-induced callose formation, its distribution and persistence in roots of soybean (*Glycine max L.*). *J. Plant Physiol.* **145**, 470-476.
- Wojciechowski, C.L., Fall, R.** (1996): A continuous fluorometric assay for pectin methyl-esterase. *Anal. Biochem.* **237**, 103-108.
- Wright, K., Northcote, D.H.** (1974): The relationship of root-cap slimes to pectins. *Biochem. J.* **139**, 525-534.
- Wu, Y.J., Spollen, W.G., Sharp, R.E., Hetherington, P.R., Fry, S.C.** (1994): Root growth maintenance at lower water potentials - increased activity of xyloglucan endotrans-glycosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol.* **106**, 607-615.
- Wu, Y.J., Sharp, R.E., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J.** (1996): Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* **111**, 765-772.
- Wyatt, S.E., Carpita, N.C.** (1993): The plant cytoskeleton-cell wall continuum. *Trends Cell Biol.* **3**, 413-417.
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Ikegawa, H., Matsumoto, H.** (1999): Protective effect of glutathione on the cytotoxicity caused by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* **105**, 417-422.
- Yamamoto, Y., Hachiya, A., Hamada, H., Matsumoto, H.** (1998): Phenylpropanoids as a protectant of aluminum toxicity in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* **39**, 950-957.
- Yamaoka, T., Chiba, N.** (1983): Changes in the coagulating ability of pectin during growth of soybean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **24**, 1281-1290.
- Yamaoka, T., Tsukada, K., Takahashi, H., Yamauchi, N.** (1983): Purification of a cell wall-bound pectin-gelatinizing factor and examination of its identity with pectin methylesterase. *Bot. Mag. Tokyo* **96**, 139-144.
- Yeo, A.R., Yeo, M.E., Flowers, T.J.** (1987): The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* **38**, 1141-1153.
- Yermiyahu, U., Brauer, D.K., Kinraide, T.B.** (1997): Sorption of aluminium to plasma membrane vesicles isolated from roots of Scout 66 and Atlas 66 cultivars of wheat. *Plant Physiol.* **115**, 1119-1125.
- Yokota, S., Ojima, K.** (1995): Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminium stress in water culture. *Plant Soil* **171**, 163-165.
- Zhang, G., Taylor, G.J.** (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, G.J.** (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, G.F., Staehelin, L.A.** (1992): Functional compartmentation of the golgi apparatus of plant cells. *Plant Physiol.* **99**, 1070-1083.
- Zhang, G., Hoddinott, J., Taylor, G.J.** (1994): Characterization of 1,3- β -D-glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminium toxicity. *J. Plant Physiol.* **144**, 229-234.
- Zhang, G., Slaski, J.J., Archambault, D.J., Taylor, G.J.** (1996): Aluminum-induced alterations in lipid composition of microsomal membranes from an aluminum-resistant and an aluminum-sensitive cultivar of *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* **96**, 683-691.

- Zhong, H., Läuchli, A.** (1988): Incorporation of [¹⁴C] glucose into cell wall polysaccharides of cotton roots: Effects of NaCl and CaCl₂. *Plant Physiol.* **88**, 511-514.
- Zhong, H., Läuchli, A.** (1993): Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity. *J. Exp. Bot.* **44**, 773-778.

Lebenslauf

Zur Person

Nicole Schmohl
Helmkestr. 15
30165 Hannover

geboren am 30.03.1969 in Hannover

Schulbildung

1975-1979

Fichteschule, Hannover

1979-1981

Orientierungsstufe Büssingweg, Hannover

1981-1988

Lutherschule, Hannover

Hochschulstudium

1988-1995

Studium der Biologie an der Universität Hannover

Abschluss Dipl. Biol.

Jan 2001

Promotion zum Dr. rer. nat.

Berufsweg

08/95 – 12/99

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenernährung,
Universität Hannover

01/00 – 08/00

Schriftliche Ausfertigung der Dissertation