

**Lösliche Oligogalakturonide im Blattapoplasten
unterschiedlich Ca-effizienter Kartoffelsorten
bei Ca-Mangel**

Von dem Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Gartenbauwissenschaften
- Dr. rer. hort. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Ing. agr. Simone Seling
geboren am 22.09.1968, in Düsseldorf

2002

Referent: Prof. Dr. A.H. Wissemeier

Korreferent: Prof. Dr. G. Scherer

Tag der Promotion : 10.07.2001

Abstract

Soluble oligogalacturonides in the leaf apoplast of potato cultivars differing in Ca-efficiency at Ca deficiency

Ca deficiency may arise in the whole plant, or in a particular organ of the plant, but relatively little is known about the way in which calcium deficiency causes the observed symptoms. Typically, the symptoms of Ca deficiency, in addition to growth reduction, also comprise browning phenomena and, in severe cases, necrosis of whole areas of plant tissue.

In contrast to other macronutrients, a high proportion of the total Ca in plant tissue is located in the apoplast. The main known functions of Ca in the apoplast are to maintain the integrity of the plasmalemma and to stabilize the pectins both intra- and inter-molecularly. Pectic fragments (oligogalacturonides) of a degree of polymerization > 9 are known to be biologically active and can elicit browning of cells and may even lead to cell death.

The underlying hypothesis of this study was, that under Ca deficiency in leaves a degradation of pectic material of the cell wall takes place and biologically active oligogalacturonides are released in the apoplastic fluid, which may be involved in the formation of Ca-deficiency symptoms such as browning and necrosis. To test the hypothesis not only different Ca supplies were used, but also different genotypes, which differ in growth and in the appearance of Ca-deficiency symptoms at low Ca supply and thereby differ in their Ca efficiency.

The first experiments were conducted to identify *Solanum*-genotypes which differ in Ca efficiency and to look for the influence of environmental conditions (growth chamber *versus* greenhouse) and of the form of nitrogen nutrition (nitrate-, ammoniumnitrate-, ammonium-nutrition) on the genotypical differences in Ca efficiency.

The further studies to look for the relationship between the Ca status of leaves and changes in the leaf apoplast in respect of Ca, pectin and pectic fragments were conducted with the two cultivars 'Adelheid' (Ca-inefficient) and 'Bintje' (Ca-efficient) under controlled growth chamber conditions at different levels of Ca supply (1000, 60, 30 μM) in nutrient solution.

Despite the differences in the symptom intensity between 'Adelheid' and 'Bintje', no cultivar-specific differences in the total leaf Ca content was found. A low Ca supply reduced the Ca concentration both in the apoplastic fluid of the leaves and in the cell walls. But neither the concentration of Ca (total as well as ionic) in the apoplastic fluid of younger leaves nor Ca content of isolated cell walls differed among the cultivars at low Ca supply.

At high Ca supply (1000 μM Ca) the amount of oligogalacturonides (determined by quantification of the monomers, the uronic acids) in the apoplastic fluid of younger leaves accounted for 1 % of the uronic acid content of isolated cell walls. At the lowest Ca supply of 30 μM , but not at 60 μM , there was an increase in the uronic acid concentration in the apoplastic fluid, which was more pronounced in leaves of the Ca-inefficient cultivar 'Adelheid' than of the Ca-efficient cultivar 'Bintje'. But such an increase of the uronic acid concentration could not be observed in an early, but in a later stage of the development of Ca-deficiency symptoms. The uronic acids additionally solubilised in the apoplast at the lowest Ca supply accounted for not more than 0,6 % of the uronic acid content of isolated cell walls. The latter one was not influenced neither by the Ca supply nor by the cultivar and consisted out of 15 % uronic acids.

The size, that means, the degree of polymerization (DP) of the oligogalacturonides in the apoplastic fluid of younger leaves was influenced by the Ca supply, as the analysis with HPAEC-PAD showed. The potential biologically active oligogalacturonides with a degree of polymerization of 9 – 20 increased compared to the control Ca level (1000 μM) substantially at the lowest Ca supply of 30 μM , but not at 60 μM . This increase was more pronounced in the Ca-inefficient cultivar 'Adelheid' than in the Ca-efficient cultivar 'Bintje'. Also, comparing the two cultivars, 'Adelheid' showed a higher level of oligogalacturonides with DP 9 – 20 than 'Bintje'.

A time study conducted with the Ca-inefficient cultivar 'Adelheid' showed, that the increase in the uronic acids in the apoplastic fluid is not an early event, but a late one in the development of appearance of visual Ca-deficiency symptoms.

In summary, the study has indicated, that under low Ca supply there was an increase of uronic acids in the apoplastic fluid of younger leaves, which can be seen as a sign of desintegration or degradation of pectic material, and also an increase in potential biological oligogalacturonides and both was more pronounced in the leaves of the Ca-inefficient cultivar compared to Ca-efficient cultivar, but these events seemed not to be the first events at or before the appearance of Ca-deficiency symptoms.

Keywords: *Solanum tuberosum*, calcium deficiency, oligogalacturonides

Lösliche Oligogalakturonide im Blattapoplasten unterschiedlich Ca-effizienter Kartoffelsorten bei Ca-Mangel

Genotypische Unterschiede sind sowohl in dem Auftreten von physiologischem Ca-Mangel als auch in der Empfindlichkeit gegenüber absolutem Ca-Mangel beschrieben. Nicht in jedem Fall können diese genotypischen Unterschiede durch die Gesamt-Ca-Gehalte des Gewebes erklärt werden können. In diesen Fällen besteht die Vermutung, daß genotypische Unterschiede in der Nutzung oder Kompartimentierung von Ca auf Gewebe- bzw. Zellebene bestehen, die bei der Bestimmung des Gesamt-Ca-Gehaltes des Gewebes nicht erfasst werden.

Im Gegensatz zu anderen Makronährstoffen ist ein hoher Anteil des Ca im Apoplasten lokalisiert. Hier ist Ca von struktureller und funktioneller Bedeutung für die Plasmamembran und sorgt des weiteren durch die Vernetzung schwach methylierter Pektine für die Stabilität und Integrität des Pektin-Netzwerkes der Zellwand. Physiologisch bedeutsam ist eine mögliche Pektin-Degradation bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad des Gewebes insbesondere vor dem Hintergrund, daß Oligogalakturonide mit einem Polymerisationsgrad von 9 bis 16 als Signalmoleküle verschiedene Reaktionen auslösen können, wie Verbräunungen von Zellen und Nekrotisierung von Geweben.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit am Modell der Kartoffelpflanze untersucht, ob bei Ca-Mangel in Blättern eine Degradation der Pektinsubstanz der Zellwand stattfindet und biologisch aktive Oligogalakturonide in die Blattapoplastenflüssigkeit freigesetzt werden, welche ursächlich an der Ausbildung von Ca-Mangelsymptomen, wie Verbräunungen und Nekrosen, beteiligt sind. Durch einen Vergleich von Kartoffelsorten, die sich in ihrer Ca-Effizienz und

damit in ihrer Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigem Ca-Angebot voneinander unterscheiden, wurden sich zudem Hinweise auf die Physiologie dieser Unterschiede erhofft.

Die ersten Nährlösungs-Versuche wurden zur Identifizierung unterschiedlich Ca-effizienter *Solanum*-Genotypen und zur Untersuchung der Stabilität genotypischer Effizienzunterschiede unter verschiedenen Umweltbedingungen (Klimakammer *versus* Gewächshaus) und unterschiedlicher Form der Stickstoff-Ernährung (Nitrat-, Ammoniumnitrat- sowie Ammonium-Ernährung) durchgeführt.

Die weiteren Versuche zur Untersuchung der Vorgänge im Blattapoplasten bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad des Gewebes wurden mit den beiden Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' unter kontrollierten Klimakammer-Bedingungen bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung (1000, 60, 30 μM Ca) durchgeführt.

Die Unterschiede in der Stärke der Ca-Mangelsymptome bei niedrigem Ca-Angebot der Nährlösung zwischen den unterschiedlich Ca-effizienten Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) konnten durch die Gesamt-Ca-Gehalte junger Blätter nicht hinreichend erklärt werden. Die höhere Ca-Effizienz der Sorte 'Bintje' im Vergleich zu der Sorte 'Adelheid' konnte aber auch nicht über den Ca-Gehalt isolierter Zellwände sowie durch eine höhere Ca-Konzentration oder einer höheren Ca^{2+} -Aktivität in der wässrigen Phase des Blattapoplasten junger Blätter erklärt werden.

Der Uronsäure-Gehalt isolierter Zellwände junger Kartoffelblätter betrug 15 % und wurde durch das Ca-Angebot der Nährlösung nicht beeinflusst. Die in der Blattapoplastenflüssigkeit gelösten Uronsäure-Mengen entsprachen weniger als 2 % der Uronsäure-Mengen der Zellwand junger Kartoffelblätter.

Bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' traten bei Ca-Mangel nicht nur höhere Uronsäure-Konzentrationen in der Blattapoplastenflüssigkeit auf als bei der Ca-effizienten Sorte 'Bintje', sondern auch verstärkt potentiell biologisch aktive Oligogalakturonide mit DP 9-20. Aber sowohl ein Anstieg in der Uronsäure-Konzentration als auch eine Zunahme an Oligogalakturonide mit DP 9-20 in der Blattapoplastenflüssigkeit konnte nur bei stärkerer Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und nicht bei schwächerer Ausprägung festgestellt werden.

In einer mit der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' durchgeführten Zeitstudie konnte ein Anstieg in den diffusiblen Uronsäure-Gehalten des Blattapoplasten nicht vor, sondern vielmehr erst bei einer starken Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten deuten letztlich nicht auf eine ursächliche Beteiligung von Oligogalakturoniden an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen an Kartoffelblättern hin.

Schlagworte: *Solanum tuberosum*, Calcium-Mangel, Oligogalakturonide

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Symbole	V
1 Einleitung	1
<hr/>	
2 Material und Methoden	5
2.1 Pflanzenmaterial, Kultur der Pflanzen und Nährstoffangebot	5
2.1.1 Pflanzenmaterial und <i>in vitro</i> Kultur	5
2.1.2 Versuchsaufbau und Kultur der Pflanzen	5
2.2 Bonitur von Ca-Mangelsymptomen	12
2.3 Bestimmung des physiologischen Pflanzen- und Blattalters	13
2.3.1 Zulässigkeit der Verwendung des Plastochron-Index bei Kartoffelpflanzen	13
2.3.2 Bestimmung des physiologischen Pflanzenalters (PI)	15
2.3.3 Bestimmung des physiologischen Blattalters (BPI)	16
2.4 Methoden zur Bestimmung der Ionen-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit	17
2.4.1 Infiltrations-Zentrifugations-Methode	17
2.4.1.1 Infiltration	17
2.4.1.2 Zentrifugation	18
2.4.1.3 Ermittlung der Ionen-Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit	22
2.4.1.3.1 Ermittlung des Infiltrationsvolumens (V_{Inj})	23
2.4.1.3.2 Bestimmung des Volumens der Apoplastenwaschflüssigkeit (V_{AWF})	26
2.4.2 Infiltrations-Diffusions-Methode	27
2.4.3 Analysen der Apoplastenwaschflüssigkeit sowie der Aussenlösung	28
2.5 Zellwand-Präparation und Pektin-Fraktionierung	29
2.6 Quantitative Uronsäure-Bestimmung	30
2.7 Qualitative Charakterisierung der Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit	33
2.8 Chemische Untersuchungen	35
2.8.1 Mineralstoffanalysen	35
2.8.2 Bestimmung der Konzentration reduzierender Zucker	35
2.8.3 Bestimmung der Glukose-Konzentration	36
2.8.4 Bestimmung der Konzentration organischer Säuren	36
2.8.5 Bestimmung der Osmolalität	36

2.9	Bestimmung der Aktivität von Enzymen	36
2.9.1	Malat-Dehydrogenase	36
2.9.2	Pektinmethylesterase	37
2.9.3	β -Galaktosidase	37
2.9.4	Polygalakturonase	38
2.9.5	Polyphenoloxidase (Catechol-Oxidase)	38
2.10	Statistik	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Einfluß des Ca-Angebots der Nährlösung auf Wachstum und Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei Kartoffelpflanzen	40
3.1.1	Einfluß des Ca-Angebots auf das Wachstum	40
3.1.2	Ausprägung von Ca-Mangelercheinungen	41
3.2	Genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz	44
3.2.1	Vergleich der Ca-Effizienz von sechs Kartoffelsorten bei unterschiedlichen klimatischen Bedingungen	44
3.2.2	Untersuchung der Ca-Effizienz von vier Kartoffelsorten	53
3.2.3	Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Ca-Effizienz von zwei Kartoffelsorten	58
3.3	Uronsäuren im Apoplasten junger Kartoffelblätter	63
3.3.1	Quantitative Charakterisierung der Uronsäuren im Blattapoplasten	63
3.3.2	Qualitative Charakterisierung der Oligogalakturonide der Blattapoplastenflüssigkeit	66
3.3.3	Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Uronsäure-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit	71
3.3.4	Diffusible Uronsäuren des Blattapoplasten in zeitlicher und räumlicher Auflösung	76
3.3.5	Induktion von Ca-Mangelsymptomen durch Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit ?	79
3.4	Ca-Konzentration im Zellwandbereich	81
3.4.1	Methodische Voruntersuchungen	81
3.4.2	Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit	83
3.4.3	Konzentration an ionischem Ca^{2+} und organischen Säuren in der Apoplastenflüssigkeit	85
3.4.4	Ca-Gehalt der Zellwand	89
3.5	Untersuchung der Aktivität Pektin-modifizierender Enzyme	91

<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>94</u>
	Genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz	94
	Oligogalakturonide im Blattapoplasten	103
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>118</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>121</u>
<u>7</u>	<u>Anhang</u>	<u>132</u>
7.1	Methodische Untersuchungen zur Präparation von Zellwandmaterial aus Blättern	132
7.2	Methodische Untersuchungen zur Charakterisierung der Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit	136
7.2.1	Immunologische Untersuchungen der Apoplastenwaschflüssigkeit auf Oligogalakturonide	136
7.2.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	137
7.2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	138
7.2.4	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	140
7.3	Screening von 16 Solanum-Genotypen auf Ca-Effizienz	142
7.3.1	Wahl des geeigneten Wachstumsparameters	142
7.3.2	Einfluß des Ca-Angebotes auf das Wachstum und die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen	145
7.3.3	Beziehung zwischen dem Wachstum und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei niedrigem Ca-Angebot	146
7.3.4	Charakterisierung der Ca-Effizienz	148
7.3.5	Beziehung zwischen morphologischen Parametern und der Ca-Effizienz	150
7.3.6	Beziehungen zwischen Mineralstoff-Gehalten und der Ca-Effizienz	151
7.3.7	Aufnahme-Effizienz versus Verwertungs-Effizienz	154

Abkürzungen und Symbole

A	Ampere
Aq. demin.	Demineralisiertes Wasser
AWF	Apoplastenwaschflüssigkeit
AWG	Apoplastenwassergehalt
AIR	alcohol insoluble residue
BLH	Blatthomogenat
BPI	Blatt-Plastochron-Index
BS	Blattscheibe
CDTA	Diaminocyclohexantetraessigsäure
d	Tag(e)
DP	Polymerisationsgrad
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Freiheitsgrad
FM	Frischmasse
g	Gramm <i>oder</i> Erdbeschleunigung
Gal-US	Galakturonsäure
Gal-US-Eq.	Galakturonsäure-Equivalent
Glc	Glukose
H	Stunde(n)
HPLC	High performance liquid chromatography
HPAEC-PAD	High performance anionic exchange chromatography pulsed amperometric detection
IZV	Interzellulärvolumen
λ	Wellenlänge
L	Liter
ln	Logarithmus zur Basis e
log	Logarithmus zur Basis 10
M	mol L^{-1}
m	Meter
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MSD	Minimale signifikante Differenz
MRW	Mittlere relative Wachstumsrate
Mw	Mittelwert
n	Wiederholungszahl
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p	Statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa	Pascal
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung
PI	Plastochron-Index
r	Korrelationskoeffizient
r_s	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
r^2	Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)

sd	Standardabweichung
t	Zeitdauer
TM	Trockenmasse
U	Einheit der Aktivität eines Enzyms
V	Volt
WSD	Wasserdampf-Sättigungsdefizit

∅	Durchmesser
*, **, ***	Signifikant auf dem 5, 1 oder 0,1 % Niveau nach 2-seitigem Test
°C	Grad Celsius
c	centi (10^{-2})
m	milli (10^{-3})
μ	micro (10^{-6})

1 EINLEITUNG

Ein unzureichendes Calcium (Ca)-Angebot des Bodens bedingt sogenannten absoluten Ca-Mangel. Weltweit betrachtet kann dies vor allem ein Problem auf den stark verwitterten, sauren Böden der humiden Tropen und Subtropen sein (MALAVOLTA, 1979; RITCHEY et al., 1982; NJOKU et al., 1987; SMYTH & CRAVO, 1992). Für Kulturpflanzen auf den landwirtschaftlich genutzten Böden unserer Breitengrade stellt absoluter Ca-Mangel nur selten ein Problem dar (MENGEL & KIRKBY, 1978; BANGERTH, 1979). Neben zu niedrigen Ca-Konzentrationen im Wurzelraum kann durch hohe Konzentrationen an H^+ , Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , und NH_4^+ die Ca-Aufnahme der Pflanzen beeinträchtigt sein und damit Ca-Mangel induziert werden (WILCOX et al., 1973; KIRKBY, 1979; GRIEVE & MAAS, 1988; BERGMANN, 1993). Während absoluter und induzierter Ca-Mangel durch eine Erhöhung des Ca-Angebotes im Wurzelraum vermieden werden können, ist dieses bei dem sogenannten physiologischen Ca-Mangel nicht mit Sicherheit möglich (BANGERTH, 1979). Physiologischer Ca-Mangel kann bei vielen gartenbaulichen Kulturen, sowohl an vegetativen (Innenblattnekrosen bei Salat und Kohlpflanzen) wie auch an generativen Organen (Stippigkeit von Äpfeln, Blütenendfäule von Tomaten), auftreten, wodurch die äußere Qualität und daher der ökonomische Wert von Obst und Gemüse gemindert wird (SHEAR, 1975; BATTAY, 1990; BERGMANN, 1993).

Genotypische Unterschiede sind sowohl in dem Auftreten von physiologischem Ca-Mangel (BURDON et al., 1991; JOHNSON, 1991; ADAMS & HO, 1992; WISSEMEIER, 1996) als auch in der Empfindlichkeit gegenüber absolutem Ca-Mangel (CLARK, 1978; ENGLISH & MAYNARD, 1981; ENGLISH & BARKER, 1982; GABELMAN & GERLOFF, 1983; HORST et al., 1992) beschrieben. Diese genotypischen Unterschiede in der Empfindlichkeit für Ca-Mangelercheinungen werden im Folgenden als Unterschiede in der Ca-Effizienz bezeichnet. Gemeinsam ist absoluten wie physiologischen Ca-Mangelercheinungen, daß nicht in jedem Fall diese genotypischen Unterschiede durch die Gesamt-Ca-Gehalte des Gewebes erklärt werden können (BRUMAGEN & HIATT, 1966; ENGLISH & BARKER, 1982; BURDON et al., 1991; JOHNSON, 1991; HORST et al., 1992; WISSEMEIER, 1996). In diesen Fällen besteht die Vermutung, daß genotypische Unterschiede in der Nutzung oder Kompartimentierung von Ca auf Gewebe- bzw. Zellebene bestehen, die bei der Bestimmung des Gesamt-Ca-Gehaltes des Gewebes nicht erfasst werden. Selbst eine sequentielle Extraktion von Ca aus gemahlene Pflanzenproben, die unterschiedliche Bindungsformen im Gewebe erfassen soll, konnte die genotypischen Unterschiede in der Symptomausprägung bei Cowpea (HORST et al., 1992) oder Tomate (ENGLISH & BARKER, 1982) nicht erklären. Auf eine Homogenisation des pflanzlichen Materials und damit auf eine Aufhebung der Kompartimentierung verzichtet die von BEHLING et al. (1989) verwendete Methode, bei der an weitgehend intaktem Blattgewebe die wasserlöslichen sowie chelatorlöslichen Ca-Gehalte des Blattapoplasten von

Tomatenblättern bestimmt wurden. Bei absolutem Ca-Mangel zeigte sich dabei, daß eine Ca-effiziente Tomatenlinie spezifisch im Apoplasten jüngerer Blätter höhere wasserlösliche Ca-Mengen aufwies als eine Ca-ineffiziente Tomatenlinie. Möglicherweise ist die Ca-Konzentration im Zellwandbereich für die genotypische Ca-Effizienz von größerer Bedeutung als der Gesamt-Ca-Gehalt, so daß der Apoplast das Kompartiment ist, in dem sich genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz manifestieren.

Im Gegensatz zu anderen Makronährstoffen ist ein hoher Anteil des Gesamt-Ca im Apoplasten lokalisiert (DEMARTY et al., 1984; MARSCHNER, 1986). Hier ist Ca von struktureller und funktioneller Bedeutung für die Plasmamembran und sorgt des weiteren durch die Vernetzung schwach methylierter Pektine für die Stabilität und Integrität des Pektin-Netzwerkes der Zellwand (BANGERTH, 1979; HANSON, 1984). Eine deutliche Desintegration der Pektinsubstanz im Bereich der Mittellamelle von Epidermis-Zellen des Hypokotylgewebes von Lein konnte elektronenmikroskopisch nach Behandlung mit einem Ca-Chelator (CDTA) festgestellt werden (JAUNEAU et al., 1994). Verschiedene Arbeiten an isolierten Zellwänden (HOMBLÉ et al., 1989; SAGASAKI & NAGAHASHI, 1989; GILLET et al., 1992) und an Zellsuspensionskulturen sowie Sämlingen (KONNO et al., 1984, 1999) deuten auf eine verstärkte Desintegration und Degradation der Pektinsubstanz bei verringertem Ca-Status der Zellwand hin. Physiologisch bedeutsam ist eine mögliche Pektin-Degradation bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad des Gewebes nicht nur im Hinblick auf die Stabilität der Zellwand und den Zusammenhalt des Zellverbandes (SIMON, 1978), sondern vielmehr vor dem Hintergrund, daß dabei Oligogalakturonide bestimmter Größe freigesetzt werden können, die als Signalmoleküle verschiedene Reaktionen auslösen können (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984; DARVILL et al., 1985; RYAN & FARMER, 1991; VAN CUTSEM & MESSIAEN, 1993; JOHN et al., 1997). Für die biologische Aktivität von Pektin-Fragmenten (Oligogalakturoniden) ist zum einen das Vorhandensein des reduzierenden Endes von Bedeutung (MOLOSHOK et al., 1992; SPIRO et al., 1998) und zum zweiten der Polymerisationsgrad. So berichten übereinstimmend verschiedene Autoren (CERVONE et al., 1987; CAMPBELL & LABAVITCH, 1991; SVALHEIM & ROBERTSEN, 1993), daß das Monomer (Galakturonsäure) keine biologische Aktivität besitzt. Bei Applikation gleicher Konzentration zeigten Oligogalakturonide mit einem Polymerisationsgrad zwischen 9 und 16 die größte biologische Aktivität (WEST et al., 1985; BRUCE & WEST, 1989; MESSIAEN et al., 1993; MESSIAEN & VAN CUTSEM, 1994; SVALHEIM & ROBERTSEN, 1993). Allerdings sind elicitierende Wirkungen auch von Oligogalakturoniden mit einem Polymerisationsgrad kleiner als 9 (FORREST & LYON, 1990; MOLOSHOK et al., 1992; WEBER et al., 1996) sowie größer als 16 (REYMOND et al., 1995) beschrieben.

Erstmals wurde Anfang der achtziger Jahre von ALBERSHEIM und seinen Mitarbeitern die Induktion des Phytoalexins Glyceollin in Kotyledonen-Blättern von Sojabohne (*Glycine max*) nach Applikation einer Galakturonid-reichen Zellwandfraktion beschrieben (HAHN et al., 1981;

NOTHNAGEL et al., 1983; DAVIS et al., 1984). Diese biologisch aktiven Pektin-Fragmente konnten aus isoliertem Zellwandmaterial sowohl durch partielle Säure-Hydrolyse (HAHN et al., 1981; NOTHNAGEL et al., 1983) als auch durch Degradation mit einer bakteriellen *endo*-Pektat-Lyase (DAVIS et al., 1984) oder einer pilzlichen *endo*-Polygalakturonase (BISHOP et al., 1981; DAVIS et al., 1986b; BRANCA et al., 1988) gewonnen werden. Mittlerweile sind eine Reihe von Reaktionen beschrieben worden, die durch Oligogalakturonide beeinflusst werden können (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984; RYAN & FARMER, 1991; JOHN et al., 1997). Zum einen können Oligogalakturonide morphogenetische Prozesse beeinflussen, wie beispielsweise die Blütenbildung und die Rhizogenese von Tabak-Explantaten (BELLINCAMPI et al., 1993; ZABOTINA et al., 1996; SPIRO et al., 1998). Die hierfür erforderlichen Konzentrationen an Oligogalakturoniden liegen im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-6} M (SPIRO et al., 1998). Wesentlich höhere Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-4} M (SPIRO et al., 1998; MESSIAEN et al., 1993) sind erforderlich, damit Oligogalakturonide Reaktionen induzieren, die in Zusammenhang mit Pathogen-Abwehr-Reaktionen der Pflanze gesehen werden. So konnten in Modellsystemen durch biologisch aktive Oligogalakturonide die Bildung von Phytoalexinen (WALKER-SIMMONS et al., 1983; BRUCE & WEST, 1989; FORREST & LYON, 1990), Lignin (BRUCE & WEST, 1989), H_2O_2 (APOSTOL et al., 1989; SVALHEIM & ROBERTSEN, 1993; ROUET-MAYER et al., 1997; LEE et al., 1999), Inhibitoren pilzlicher Polygalakturonasen (CERVONE et al., 1996), Protease-Inhibitoren (RYAN, 1978; RYAN et al., 1985; DOHERTY et al., 1988) sowie die Transkription der Phenylammonium-Lyase (PAL) (MESSIAEN & VAN CUTSEM, 1993) induziert werden. Die PAL katalysiert die oxidative Deaminierung von Phenylalanin unter Bildung von Zimtsäure, und gilt als Schlüsselenzym bei der Bildung phenolischer Verbindungen (TAIZ & ZIEGLER, 2000). Über eine Erhöhung der Aktivität der PAL erklären verschiedene Autoren zum einen die Akkumulation phenolischer Phytoalexine (WALKER-SIMMONS et al., 1983) und zum anderen die zu beobachtende Verbräunung von Zellsuspensionskulturen (MESSIAEN & VAN CUTSEM, 1994) nach Applikation biologisch aktiver Oligogalakturonide. Durch Injektion biologisch aktiver Oligogalakturonide konnten auch nekrotische Gewebeveränderungen in Samenhülsen von Cowpea (*Vigna unguiculata*) induziert werden (CERVONE et al., 1987).

Neben der für starken Ca-Mangel typischen Nekrotisierung von Gewebe (SIMON, 1978; BERGMANN, 1993) konnten auch die für Ca-Mangel bekannten Veränderung wie Verbräunungen von Zellen (MESSIAEN & VAN CUTSEM, 1994), sowie eine verstärkte Ethylen-Biosynthese (TONG et al., 1986; CAMPBELL & LABAVITCH, 1991) in Modellsystemen durch biologisch aktive Oligogalakturonide induziert werden.

Somit sind zwar physiologische Reaktionen, die durch die Applikation von Oligogalakturoniden induziert werden können, insbesondere bei Zellsuspensionskulturen gut dokumentiert, aber für die Klärung der biologischen Relevanz von Oligogalakturoniden als endogene Signalmoleküle ist das *in vivo* Auftreten dieser Oligogalakturonide von Bedeutung, und damit zusammenhängend auch

der Mechanismus und die Regulation der Freisetzung aus der Zellwand (COTE & HAHN, 1994). Biologisch aktive Oligogalakturonide mit DP 4-12 konnten zwar schon in der Fraktion der wasserlöslichen Pektine von isoliertem Zellwandmaterial von Pflanzen, die nicht mit einem Pathogen infiziert worden waren, nachgewiesen werden (MELOTTO et al., 1996). Damit aber diese Oligogalakturonide als Signalmoleküle aktiv sein können, ist zuerst eine Freisetzung aus dem Pektin-Netzwerk in die wäßrige Phase des Apoplasten erforderlich, damit sie anschließend zu einem geeigneten Rezeptor an der Plasmamembran gelangen können. Aufschlußreicher als die Untersuchung der wasserlöslichen Pektin-Fraktion isolierter Zellwände sollte daher die Untersuchung der apoplastischen Flüssigkeit auf ihre qualitative Oligogalakturonid-Zusammensetzung sein.

Vor diesem Hintergrund sollen in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

- 1) Kann bei Ca-Mangel in Blättern eine verstärkte Freisetzung von Oligogalakturoniden aus der Zellwand in die Apoplastenflüssigkeit festgestellt werden ?
- 2) Welchen Polymerisationsgrad weisen die Oligogalakturonide in der Blattapoplastenflüssigkeit bei optimalem und bei suboptimalem Ca-Angebot auf ?
- 3) Lassen sich Hinweise auf eine Degradation der Pektinsubstanz zeitlich vor dem Auftreten makroskopisch sichtbarer Ca-Mangelsymptome (Nekrosen) finden ?

Die Untersuchungen sollten an Kartoffelpflanzen vorgenommen werden, die bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung kultiviert wurden. Die Betrachtung unterschiedlich Ca-effizienter Sorten sollte die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen und Hinweise zur Physiologie der Unterschiede liefern. Aus diesem Grunde wurde im ersten Teil der Arbeit ein weites genotypisches Spektrum in bezug auf deren Ca-Effizienz untersucht. Weiterhin wurden Einflussfaktoren, wie unterschiedliche Umwelten und die Form der N-Ernährung, auf die genotypische Ca-Effizienz geprüft. Im zweiten Teil der Arbeit wurde, für die Untersuchung der Vorgänge im Blattapoplasten bei Ca-Mangel, sich auf zwei Sorten konzentriert, die sich stabil in ihrer Ca-Effizienz voneinander unterscheiden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial, Kultur der Pflanzen und Nährstoffangebot

2.1.1 Pflanzenmaterial und *in vitro* Kultur

Als Pflanzenmaterial wurden *in vitro* vermehrte Kopfstecklinge von Sorten der Kulturkartoffel (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) sowie von Wildarten und Primitivformen der Kartoffel verwendet, die Frau Dr. Mix-Wagner (FAL Braunschweig) freundlicherweise zur Verfügung stellte. Für die einzelnen Versuche wurden die Pflanzen *in vitro* weitervermehrt, ähnlich wie von MIX-WAGNER (1996) beschrieben. Bei der *in vitro* Vermehrung wurden aus einem Ausgangsproß Nodien mit mindestens einer Achselknospe herausgeschnitten und in festes Nährmedium gesteckt. Das Nährmedium (pH-Wert 5,8) enthielt 6 - 7 g L⁻¹ Agar (Merck 101615) sowie 10 g L⁻¹ Saccharose und wies folgende weitere Zusammensetzung nach MURASHIGE & SKOOG (1962) auf (µM): NH₄NO₃ (20000), KNO₃ (19000), CaCl₂ (3000), MgSO₄ (1790), KH₂PO₄ (1250), MnSO₄ (100), H₃BO₃ (100), FeSO₄ (100), Na₂EDTA (100), ZnSO₄ (30), KJ (5), Na₂MoO₄ (1), CuSO₄ (0,1), CoCl₂ (0,1).

Die Kultur erfolgte in einem Klimaschrank (Rumed; Rubarth Apparate, Hannover) bei 20 °C (Tag und Nacht) und einer Tageslänge von 16 h bei 4000 lux. Nach 14 - 18 Tagen wurden von den entwickelten Pflanzen Kopfstecklinge genommen und erneut in festes Nährmedium obiger Zusammensetzung gesteckt. Nach weiteren 14 - 18 Tagen wurden die, aus den Kopfstecklingen gewachsenen, Pflanzen in die Nährlösung überführt. Hierzu wurden die Pflanzen vorsichtig aus dem Agar gezogen und an den Wurzeln haftende Agarreste mit demineralisiertem Wasser abgespült. Damit die Pflanzen die Änderung der klimatischen Bedingungen, insbesondere die Änderung des Wasserdampf-Sättigungsdefizits der Luft und die damit stärkere Verdunstungsbeanspruchung schadlos überstehen, erwies es sich als vorteilhaft, die Pflanzen die ersten 1 bis 2 Tage in der Nährlösung in der Klimakammer unter durchsichtiger Polyethylenfolie zu kultivieren.

2.1.2 Versuchsaufbau und Kultur der Pflanzen

Vorkultur

Die Pflanzen wurden vor der Ca-Differenzbehandlung je nach Versuch 5 - 12 Tage in 120 L Becken (mit maximal 96 Pflanzen je Becken) mit ständig belüfteter Nährlösung mit der in Tab. 1 aufgeführten Zusammensetzung und 1000 µM CaCl₂ vorkultiviert. Die Vorkultur erwies sich als vorteilhaft, damit stets von einer ausreichenden Bewurzelung der Pflanzen zu Beginn der Differenzbehandlung ausgegangen werden konnte.

Die Klimabedingungen während der Vorkultur in einer Klimakammer betragen 20/13 °C bei 16/8 h Licht-Dunkelrhythmus mit einer PAR von durchschnittlich 200 µmol s⁻¹ m⁻² (Na-

Hochdruck-dampflampen SON-T 400 W, Fa. Philipps) auf Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn in der Lichtphase, und 50-70 % relative Luftfeuchte in der Licht- bzw. Dunkelphase.

Tab. 1: Zusammensetzung der Nährlösung (ausgenommen Ca)

Nährstoffverbindung	Konzentration [μM]
KNO_3	1500
NaNO_3	1500
MgSO_4	500
KH_2PO_4	100
H_3BO_3	10
FeEDTA (Fetrilon [®] 13)	10
MnSO_4	1
ZnSO_4	0,5
CuSO_4	0,2
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,01

Ca-Steigerungsversuch

Die Pflanzen der Sorte 'Adelheid' wurden nach der Vorkultur (10 Tage) in 4 L Nährlösungstöpfe überführt (je Topf 3 Pflanzen) und 35 Tage in ständig belüfteter Nährlösung (Zusammensetzung wie in Tab. 1) mit einem Ca-Angebot von 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 oder 30000 μM CaCl_2 bei einer Wiederholungszahl von 3 kultiviert. Die Nährlösung wurde alle 3 Tage komplett gewechselt. Der pH-Wert der Nährlösung betrug direkt nach dem Nährlösungswechsel 5,5 und wurde täglich einmal auf $\text{pH } 5,5 \pm 0,2$ eingestellt. Die Klimabedingungen entsprachen denen der Vorkultur.

Screening von 16 *Solanum*-Genotypen auf Ca-Effizienz

Das Screening umfasste acht Wildarten, drei Primitivformen sowie fünf Kartoffelsorten mit einer Wiederholungszahl von sechs je Ca-Angebotsstufe. Die untersuchten Genotypen und ihre Stellung in der Taxonomie sind Tab. 2 zu entnehmen. Die Zuordnung der Arten, die alle zu der knollentragenden Subsektion *Hyperbasarthrum* gehören, zu den jeweiligen Serien sowie die Bezeichnung als Wildart und Primitivform (= kultivierte Wildart) geht auf HAWKES (1958) und HAWKES & HJERTING (1989) zurück.

Die Pflanzen wurden nach 5 Tagen Vorkultur in 120 L Becken (96 Pflanzen je Becken) mit ständig belüfteter Nährlösung der in Tab. 1 aufgeführten Zusammensetzung bei $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$ kultiviert. Die Klimabedingungen entsprachen der Vorkultur.

Tab. 2: Übersicht über die untersuchten *Solanum*-Genotypen und ihre Stellung in der Taxonomie (BGRC = Braunschweig Genetic Resource Collection)

Genotyp	BGRC / Sorte	Serie	Typ
<i>Solanum chacoense</i>	16979	Commersoniana	Wildart
<i>S. fendleri</i>	8088	Longipedicellata	Wildart
<i>S. hawkesii</i>	16955	Megistacroloba	Wildart
<i>S. pampasense</i>	8161	Tuberosa	Wildart
<i>S. sparsipilum</i>	24687	Tuberosa	Wildart
<i>S. spegazzini</i>	18326	Tuberosa	Wildart
<i>S. tarijense</i>	24717	Commersoniana	Wildart
<i>S. vernei</i>	15451	Tuberosa	Wildart
<i>S. stenotomum</i>	18478	Tuberosa	Primitivform
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 1	28043	Tuberosa	Primitivform
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> 2	7463	Tuberosa	Primitivform
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	'Bintje'	Tuberosa	Kultursorte
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	'Ijsselster'	Tuberosa	Kultursorte
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	'Norchip'	Tuberosa	Kultursorte
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	'Peconic'	Tuberosa	Kultursorte
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	'San Michele'	Tuberosa	Kultursorte

Die Kontrollvariante wurde bei einem Ca-Angebot von 1000 μM CaCl_2 kultiviert. Die erste Ca-Mangelstufe (60/30 μM) enthielt die ersten 14 Tage 60 μM CaCl_2 und die letzten 7 Tage 30 μM . Die zweite Ca-Mangelstufe (30/15 μM) enthielt die ersten 14 Tage 30 μM CaCl_2 und die letzten 7 Tage 15 μM . Die Ionenstärke der Nährlösung der Varianten mit einem Ca-Angebot niedriger als 1000 μM wurde durch die Zugabe von NaCl ausgeglichen, so daß die Ionenstärke bei 1000, 60, 30 sowie 15 μM Ca-Angebot sich um weniger als 0,1 % voneinander unterschied. Die höchste NaCl-Konzentration bei der 15 μM Ca-Variante betrug 2775 μM .

Nach 21 Tagen Behandlungsdauer wurden die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bonitiert und die Pflanzen fraktioniert geerntet. Dabei wurden die Blattpfiedern, die Stengel (zusammen mit Rachis und Petiolen) und die Wurzeln getrennt geerntet. Nach trockener Veraschung des zuvor getrockneten und gemahlten Pflanzenmaterials wurden Mineralstoffanalysen (siehe 2.8.1) durchgeführt.

Die Ca-Effizienz der untersuchten Genotypen wurde an Hand der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und des Wachstums bei dem niedrigsten Ca-Angebot eingestuft. Um zu prüfen, ob die genotypischen Unterschiede in der Ca-Effizienz auf Unterschieden in der Ca-Aufnahme und / oder Ca-Verwertung beruhen, wurden verschiedene, aus der Literatur bekannte, Effizienz-Verhältnisse entsprechend Tab. 3 berechnet. Für die Bestimmung des Beitrages der Effizienzkomponenten zur Varianz der nach MOLL et al. (1982) definierten Nutzungs-Effizienz (Tab. 3) wurde jeweils der Regressionsparameter der Beziehung zwischen den logarithmierten Werten der Nut-

zungs-Effizienz (x) und den logarithmierten Werten der Aufnahme-Effizienz (y) oder der Verwertungs-Effizienz (y) ermittelt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Effizienz-Verhältnisse und die Art ihrer Berechnung

Effizienz-Verhältnis	Berechnungsweise	Quelle
Nutzungs-Effizienz	$\frac{\text{Trockenmasse (g Pflanze}^{-1}\text{)}}{\text{Ca-Angebot (g Pflanze}^{-1}\text{)}}$	MOLL et al., 1982
Aufnahme-Effizienz	$\frac{\text{Ca-Aufnahme (g Pflanze}^{-1}\text{)}}{\text{Ca-Angebot (g Pflanze}^{-1}\text{)}}$	MOLL et al., 1982
Verwertungs-Effizienz	$\frac{\text{Trockenmasse (g Pflanze}^{-1}\text{)}}{\text{Ca-Aufnahme (g Pflanze}^{-1}\text{)}}$	MOLL et al., 1982
Effizienz-Verhältnis	$\frac{\text{Trockenmasse (g Pflanze}^{-1}\text{)}}{\text{Ca-Aufnahme (g Pflanze}^{-1}\text{)}}$	ENGLISH & MAYNARD, 1981
Verwertungs-Index	$\frac{\text{Trockenmasse (g Pflanze}^{-1}\text{)}}{\text{Ca-Gehalt (mg (g Trockenmasse)}^{-1}\text{)}}$	SIDDIQI & GLASS, 1981

Einfluß der Umweltbedingungen auf die Ca-Effizienz von sechs Kartoffelsorten

Die Pflanzen der Sorten 'Adelheid', 'Arnika', 'Bintje', 'Ijsselster', 'San Michele' und 'Ultimus' wurden nach einheitlicher Vorkultur (10 Tage) in der Klimakammer in 120 L Nährlösungswannen überführt, wobei parallel ein Versuch in einem Gewächshaus und ein Versuch in der Klimakammer, unter den der Vorkultur entsprechenden Klimabedingungen, durchgeführt wurde. Im Gewächshaus betrug die Lufttemperatur während der Versuchsdauer tagsüber im Mittel 27 °C, und nachts im Mittel 19 °C. Die relative Luftfeuchte lag tagsüber im Mittel bei 50 % (dies entspricht einem Wasserdampf-Sättigungsdefizit (WSD) von 1,79 kPa) und nachts bei 80 % (WSD = 0,44 kPa). Die tägliche Sonnenscheindauer betrug im Mittel 8,4 h und die astronomische Tageslänge betrug zu Versuchsbeginn 15,3 h und zu Versuchsende 13,4 h (Messung bzw. Angabe des Instituts für Meteorologie, Universität Hannover). Die PAR auf Pflanzenhöhe lag im Gewächshaus in der Mittagszeit (13-14 Uhr) zu Versuchsbeginn bei 700 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ und zu Versuchsende bei 520 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Die Pflanzen wurden in ständig belüfteter Nährlösung, mit der in Tab. 1 aufgeführten Zusammensetzung, bei einem Ca-Angebot von 1000 μM (Kontrolle) sowie von 30 μM CaCl_2 mit einer Wiederholungszahl von sechs kultiviert. Wie in dem vorherigen Versuch beschrieben, erfolgte ein Ausgleich der Ionenstärke der Nährlösung durch Zusatz von NaCl. Die Nährlösung wurde zweimal pro Woche gewechselt. Der pH-Wert der Nährlösung betrug direkt nach dem Nährlösungswechsel 5,5 und wurde täglich einmal auf pH 5,5 \pm 0,2 eingestellt.

Nach 29 - 30 Tagen erfolgten die Bonitur der Ca-Mangelsymptome und die fraktionierte Ernte der Pflanzen. Die Ca-Gehalte der Wurzeln, Stengel (zusammen mit Rachis und Petiolen) sowie der Blattnerven wurden nach trockener Veraschung atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt.

Vergleich von vier Kartoffelsorten hinsichtlich ihrer Ca-Effizienz

Die Pflanzen der Sorten 'Adelheid', 'Bintje', 'San Michele' und 'Ultimus' wurden nach der Vorkultur (12 Tage) in 4 L Nährlösungstöpfe überführt (je Sorte 1 Pflanze pro Topf) und in ständig belüfteter Nährlösung (Zusammensetzung wie in Tab. 1) mit einem Ca-Angebot von 1000 μM als Kontrollvariante sowie 90, 60 und 30 μM CaCl_2 mit einer Wiederholungszahl von 11 kultiviert. Die Ionenstärke der Nährlösung der Varianten mit einem Ca-Angebot niedriger als 1000 μM wurde durch die Zugabe von NaCl ausgeglichen. Die Nährlösung wurde zweimal pro Woche komplett gewechselt. Der pH-Wert der Nährlösung betrug direkt nach dem Nährlösungswechsel 5,5 und wurde täglich einmal auf $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$ eingestellt. Die Klimabedingungen entsprachen denen der Vorkultur.

Nach 27 - 30 Tagen erfolgte die Ernte, wobei an jedem Erntetag die Bonitur der Ca-Mangelsymptome und die fraktionierte Ernte von 2 bzw. 3 Pflanzen von jeder Variante und von jeder Sorte durchgeführt wurde. Dabei wurden von Blattnerven mit einem physiologischen Blattalter (BPI, siehe 2.3.3) von 2 - 4 nach trockener Veraschung die Ca-Gehalte atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt.

Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Ca-Effizienz von zwei Kartoffelsorten

Die Pflanzen der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' wurden in der Klimakammer bei 20/18 °C und 16/8 h Licht-Dunkelrhythmus mit einer PAR von durchschnittlich 200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ in der Lichtphase, und 60-80 % relative Luftfeuchte in der Licht- bzw. Dunkelphase, in 8 L Töpfen (mit 3 Pflanzen je Sorte) in ständig belüfteter Nährlösung kultiviert. Zur Vorkultur (6 Tage) erhielten alle Pflanzen Stickstoff als Nitrat und ein Ca-Angebot von 1000 μM CaCl_2 .

In dem Versuch wurden die Pflanzen bei einem Ca-Angebot von 1000, 60 oder 30 μM CaCl_2 und jeweils bei einem Angebot von 1000 μM N als Nitrat, Ammoniumnitrat oder Ammonium ($n = 6$) kultiviert (Tab. 4, Tab. 5). Die Zusammensetzung der Nährlösung ist in Tab. 5 abgesehen von Ca aufgelistet.

Tab. 4: Versuchsvarianten des N-Formen-Versuchs

N-Ernährung:	NO_3	NH_4NO_3	NH_4
Ca-Angebot [μM]	1000	1000	1000
	60	60	60
	30	30	30

Tab. 5: Zusammensetzung der Nährlösung des N-Formen-Versuches (ausgenommen Ca)

N-Ernährung	NO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄
Nährstoffverbindung	Konzentration [μ M]		
KNO ₃	1000	500	
NH ₄ Cl		500	500
(NH ₄) ₂ SO ₄			250
KCl	500		
K ₂ SO ₄		500	750
MgSO ₄	500	500	500
KH ₂ PO ₄	100	100	100
H ₃ BO ₃	10	10	10
FeEDTA (Fetrilon [®] 13)	10	10	10
MnSO ₄	1	1	1
ZnSO ₄	0,5	0,5	0,5
CuSO ₄	0,2	0,2	0,2
Na ₂ MoO ₄	0,01	0,01	0,01

Der pH-Wert der Nährlösungen wurde durch automatische Titration mit 0,1 N NaOH oder 0,1 N H₂SO₄ mit Hilfe einer pH-STAT-Anlage konstant auf $5,5 \pm 0,1$ gehalten.

In Abhängigkeit von den täglich überprüften Ca-, K- und NO₃-Konzentrationen der Nährlösung erfolgte alle 3 bis 5 Tage ein kompletter Nährlösungswechsel. Die Ca- und K-Konzentration wurde flammenphotometrisch, und die Nitrat-Konzentration mit Hilfe von Nitrat-Test Analysestäbchen und einem Reflektometer (Nitrachek[™]), bestimmt. Nach jedem Nährlösungswechsel wurde allen N-Varianten der Nitrifikationshemmer DIDIN (50 μ M Dicyandiamid) zugegeben. Nitrit konnte mittels Merckoquant[®] 10020 Teststäbchen zu keinem Zeitpunkt in den Nährlösungen festgestellt werden.

Die Ernte wurde 21, 22 bzw. 23 Tage nach Beginn der Differenzbehandlung durchgeführt. An jedem Erntetag wurde die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen an je zwei Pflanzen von jeder Variante und jeder Sorte bonitiert, welche dann fraktioniert beerntet wurden. Dabei wurden von jungen Blattfiedern mit einem BPI von 1,5, 2,5, 3,5 und 4,5 Apoplastenwaschflüssigkeit gewonnen (siehe 2.4.1), und auf Ca, K, Mg, Fe, Uronsäuren, Glukose, reduzierende Zucker sowie organische Säuren untersucht. Mineralstoffgehalte der getrockneten Blattfiedern wurden nach trockener Veraschung atomemissionsspektrometrisch bestimmt.

Zeitstudie

Die Kultur der Pflanzen der Sorte 'Adelheid' erfolgte in ständig belüfteter Nährlösung (Zusammensetzung wie in Tab. 1) bei pH $5,5 \pm 0,3$ unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer

(20/15 °C für 16/8 h; rel. Luftfeuchte 45 bis 65 %; PAR auf Pflanzhöhe ca. 200 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$). Die Pflanzen wurden nach der Vorkultur (10 Tage) in 4 L Nährlösungstöpfe überführt (je 4 Pflanzen pro Topf) und in ständig belüfteter Nährlösung mit einem Ca-Angebot von 1000 μM als Kontrollvariante sowie 60 und 30 μM CaCl_2 kultiviert. Die Nährlösung wurde zweimal pro Woche komplett gewechselt. Die Ernte von sechs Pflanzen jeder Ca-Variante erfolgte nach 27, 32, 37 und 49 Tagen. Dabei wurden von Blattscheiben des Blattrandes und der Blattmitte junger Blätter (BPI 1,5 sowie BPI 2,5), mit der Infiltrations-Diffusions-Methode (siehe 2.4.2), die diffusiblen Uronsäure-Gehalte des Blattapoplasten ermittelt. Des Weiteren wurden aus Blattsegmenten des Blattrandes sowie der Blattmitte junger Blätter (BPI 1,5 sowie 2,5) Zellwandmaterial (AIR; siehe 2.5) präpariert und die Gehalte an wasserlöslichen, chelatorlöslichen Pektinen sowie der Gesamt-Pektin-Gehalt bestimmt. Außerdem wurden Blattsegmente des Blattrandes sowie der Blattmitte junger Blätter (BPI 2,5) für die Untersuchung der Aktivität der Polyphenoloxidase (siehe 2.9.5) verwendet.

Weitere Nährlösungsversuche

Neben diesen explizit dargestellten Versuchen wurde eine Reihe von Versuchen nur mit den Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' durchgeführt, die stets einen ähnlichen Versuchsaufbau besaßen: Die Pflanzen wurden nach der Vorkultur (10 Tage) in 4 L Nährlösungstöpfe überführt (je Sorte 2 Pflanzen pro Topf) und in ständig belüfteter Nährlösung (Zusammensetzung wie in Tab. 1) mit einem Ca-Angebot von 1000 μM als Kontrollvariante sowie 60 und 30 μM CaCl_2 kultiviert. Je nach Versuch und Versuchsfrage lag die Anzahl der Pflanzen je Sorte und Ca-Stufe zwischen 6 und 40. Die Nährlösung wurde zweimal pro Woche komplett gewechselt. Die Klimabedingungen entsprachen denen der Vorkultur. Die Ernte erfolgte 28 - 30 Tage nach Behandlungsbeginn.

2.2 Bonitur von Ca-Mangelsymptomen

Die Ausprägung von Randaufhellungen und Randnekrosen eines Blattes wurde jeweils getrennt bonitiert. Dabei wurde der betroffene Blattrand in Relation zu dem Gesamtblattrand auf einer Skala von 0 bis 4 folgendermaßen eingeschätzt:

Boniturnote	Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen
0	keine Symptome
1	bis zu 25% des Blattrandes wies Symptome auf
2	mehr als 25% und bis zu 50% des Blattrandes wies Symptome auf
3	mehr als 50% und bis zu 75% des Blattrandes wies Symptome auf
4	mehr als 75% des Blattrandes wies Symptome auf

Die dargestellten Ergebnisse der Stärke von Ca-Mangelsymptomen der Kartoffelpflanzen sowie einzelner und mehrerer Blätter beruhen auf der Auswertung der Stärke von Blattrandnekrosen. Bei der Prüfung von Zusammenhängen zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und einem weiteren Parameter, ergab sich bei Verwendung der Ausprägung von Blattrandaufhellungen in keinem Fall ein engerer Zusammenhang als bei der Verwendung der Ausprägung von Blattrandnekrosen.

Die durchschnittliche Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) einer Pflanze wurde aus der Summe der Boniturnoten dividiert durch die Anzahl der Fiederblätter berechnet.

Bei der Verwendung von ausgestanzten Blattscheiben und von Blattmaterial unterschiedlicher Blattbereiche (Gewebe des Blattrandes sowie der Blattmitte) wurde die Ausprägung von Ca-Mangel-symptomen (Nekrosen) bonitiert, indem die betroffene Fläche in Relation zu der Gesamtfläche der Blattscheiben auf einer Skala von 0 bis 4 folgendermaßen abgeschätzt wurde: Note 0 = keine Symptome; Note 1 = bis zu 25 % der Fläche wies Symptome auf; Note 2 = 25 bis 50 % der Fläche wies Symptome auf; Note 3 = 50 bis 75 % der Fläche wies Symptome auf; Note 4 = mehr als 75 % der Fläche wies Symptome auf.

2.3 Bestimmung des physiologischen Pflanzen- und Blattalters

Pflanzen können bei gleichem chronologischen Alter erhebliche Unterschiede in ihrem Entwicklungsstadium und in ihrem physiologischen Alter erreicht haben. Auch können morphologisch ähnliche Pflanzen sich in ihrem chronologischen Alter unterscheiden. Als Maß für das Entwicklungsstadium einer Pflanze wurde daher der von ERICKSON & MICHELINI (1957) eingeführte Plastochron-Index verwendet. Da zwar Kenntnisse über die Zulässigkeit der Verwendung des Plastochron-Index als Maß für das physiologische Alter u.a. von *Xanthium italicum* (ERICKSON & MICHELINI, 1957) sowie *Vigna unguiculata* (WISSEMEIER, 1988), nicht jedoch von Kartoffelpflanzen, vorlagen, galt es zunächst dieses zu überprüfen.

2.3.1 Zulässigkeit der Verwendung des Plastochron-Index bei Kartoffelpflanzen

Zur Bestimmung des physiologischen Alters einer Pflanze mittels des Plastochron-Index (PI) müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1) Konstanz des Plastochrons, d.h. Konstanz des Zeitraumes zwischen der Entstehung aufeinanderfolgender Blätter
- 2) Linearität des Blattlängenwachstums bei logarithmischem Auftrag gegen die Zeit
- 3) Gleiche Blattzuwachsrate, d.h. Parallelität der Blattwachstumsgeraden aufeinanderfolgender Blätter bei logarithmischem Auftrag gegen die Zeit

Die Überprüfung dieser Voraussetzungen erfolgte durch Messung der Blattlänge im Verlauf der Zeit. Berücksichtigt wurden nur Fiederblätter, deren terminale Blattfieder eine Länge ≥ 10 mm aufwies, da eine nicht-destruktive und verletzungsfreie Messung der Blattlängen von Kartoffelpflanzen erst ab einer Blattfiederlänge von 10 mm bzw. einer Fiederblattlänge von 30 mm gewährleistet werden konnte. Nicht unerwähnt bleiben darf, daß auf diese Weise nicht der Zeitpunkt der Entstehung der Blätter (und damit nicht das Plastochron), sondern vielmehr der Zeitpunkt des Erscheinens (und damit das Phyllochron) bestimmt wird (DALE, 1982).

Die Darstellung der Längen der Fiederblätter (Abb. 1B) sowie der terminalen Blattfiedern (Abb. 1A) zeigt bei logarithmischem Auftrag gegen das chronologische Pflanzenalter sowohl Konstanz des Plastochrons als auch Linearität und Parallelität des Blattlängenwachstums aufeinanderfolgender Blätter. Die Voraussetzungen für die Verwendung des Plastochron-Index zur Bestimmung des physiologischen Pflanzenalters sind bei Kartoffelpflanzen somit erfüllt, wobei sowohl die Längenmessung der terminalen Blattfieder als auch die Länge der Fiederblätter herangezogen werden kann.

Oberhalb der meßtechnisch bedingten Grenze der Längenmessungen zeigte sich eine lineare signifikante Beziehung (Abb. 2) zwischen der Länge der terminalen Blattfieder und der Fiederblattlänge eines Kartoffelblattes (d.h. incl. Lamina, Rachis und Petiole), die für alle vier untersuchten

Kartoffelsorten bestand (Tab. 6). Aufgrund der Beziehung zwischen der Länge der terminalen Blattfieder und der Länge des Fiederblattes, wurde die Längenmessung der terminalen Blattfieder als ausreichend für die Bestimmung des physiologischen Pflanzen- und Blattalters betrachtet.

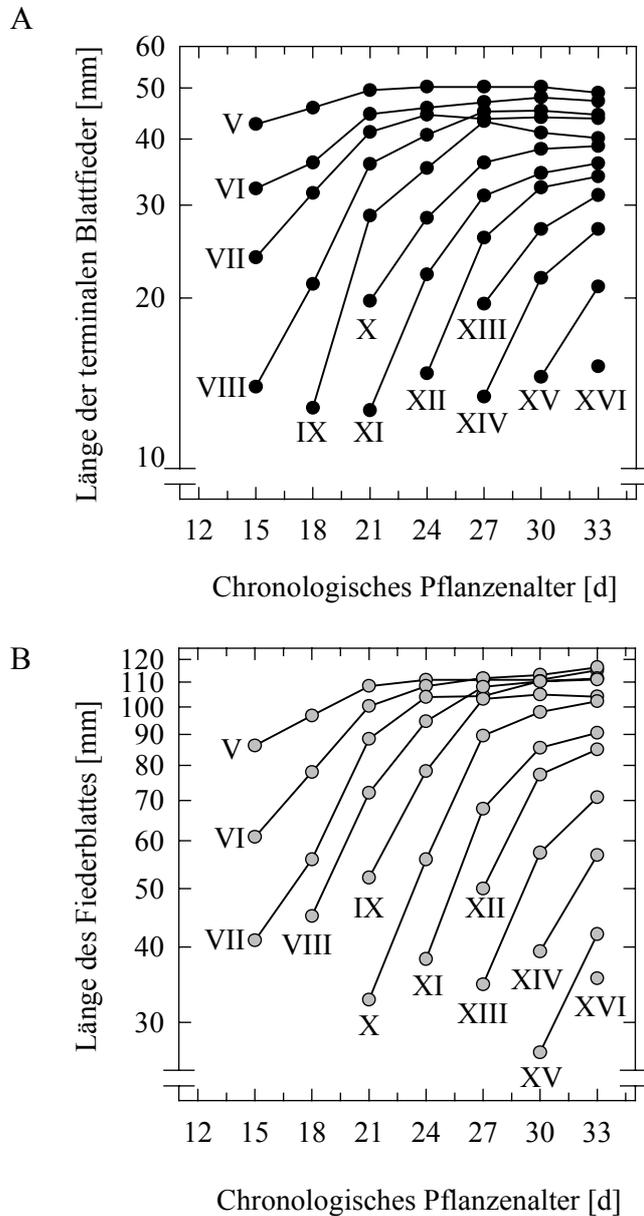


Abb. 1: (A) Längen der terminalen Blattfieder und (B) Längen der Fiederblätter unterschiedlicher Insertion (in akropetaler Zählung ohne die Insertionen I bis V) in Abhängigkeit des chronologischen Alters der Kartoffelpflanzen der Sorte 'Bintje' bei $1000 \mu\text{M}$ Ca-Angebot in der Nährlösung ($n = 6 - 8$)

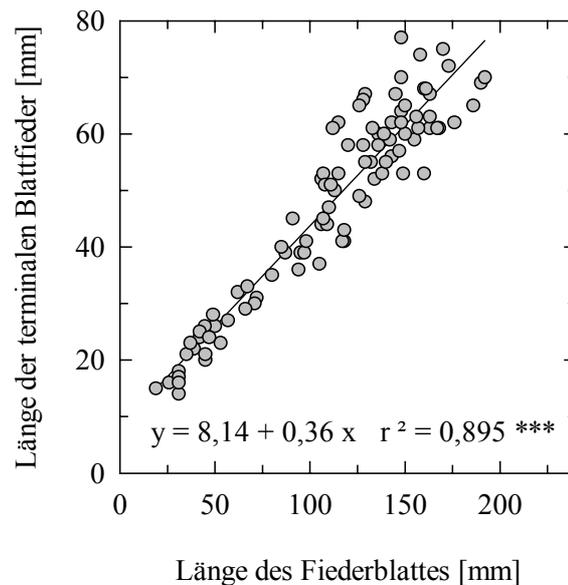


Abb. 2: Zusammenhang zwischen der Länge der terminalen Blatffieder und der Fiederblattlänge von Blättern unterschiedlicher Insertion von Kartoffelpflanzen der Sorte 'Bintje' nach 30 d bei 1000 µM Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 95)

Tab. 6: Beziehungen zwischen der Länge der terminalen Blatffieder (y) und der Fiederblattlänge (x) bei vier Kartoffelsorten nach 30 d bei 1000 µM Ca-Angebot in der Nährlösung

Kartoffelsorte	Beziehung	Bestimmtheitsmaß (r^2)
'Adelheid'	$y = 8,77 + 0,37 x$	0,830 *** (n = 92)
'Bintje'	$y = 8,14 + 0,36 x$	0,895 *** (n = 95)
'San Michele'	$y = 8,69 + 0,30 x$	0,764 *** (n = 98)
'Ultimus'	$y = 8,02 + 0,35 x$	0,946 *** (n = 80)

2.3.2 Bestimmung des physiologischen Pflanzenalters (PI)

Das physiologische Pflanzenalter, ausgedrückt in Form des Plastochron-Index (PI), errechnet sich gemäß ERICKSON & MICHELINI (1957) entsprechend der Gleichung:

$$PI = n + \frac{\ln L_n - \ln L_R}{\ln L_n - \ln L_{n+1}}$$

L_R = Referenzlänge (hier: 30 mm)

n = Insertion des Blattes, welches gerade länger als die Referenzlänge ist

n + 1 = Insertion des Blattes, welches gerade kürzer als die Referenzlänge ist

L_n, L_{n+1} = Länge des Blattes mit der Insertion n bzw. n+1

Bei der Pflanzenernte wurden in akropetaler Richtung alle Längen der terminalen Fiederblattlaminae mit einer Länge ≥ 10 mm erfaßt, wobei das erste Nodium der Insertion des ersten Fiederblattes entspricht. Als Referenzlänge wurde eine Länge der terminalen Blatffieder von 30 mm gewählt, da

hier auch die verletzungsfreie Messung der Länge der nächst jüngeren Blatffieder gewährleistet war.

2.3.3 Bestimmung des physiologischen Blattalters (BPI)

Das physiologische Alter eines Blattes i läßt sich durch den Blatt-Plastochron-Index (BPI) angeben, der sich berechnet, indem von dem Plastochron-Alter der Pflanzen die Insertion des Blattes i subtrahiert wird (ERICKSON & MICHELINI, 1957).

$$\text{BPI}_i = \text{PI} - i$$

BPI_i	=	Blatt-Plastochron-Index des Blattes mit der Insertion i
PI	=	Plastochron-Index der Pflanze
i	=	Nummer der Insertion des Blattes

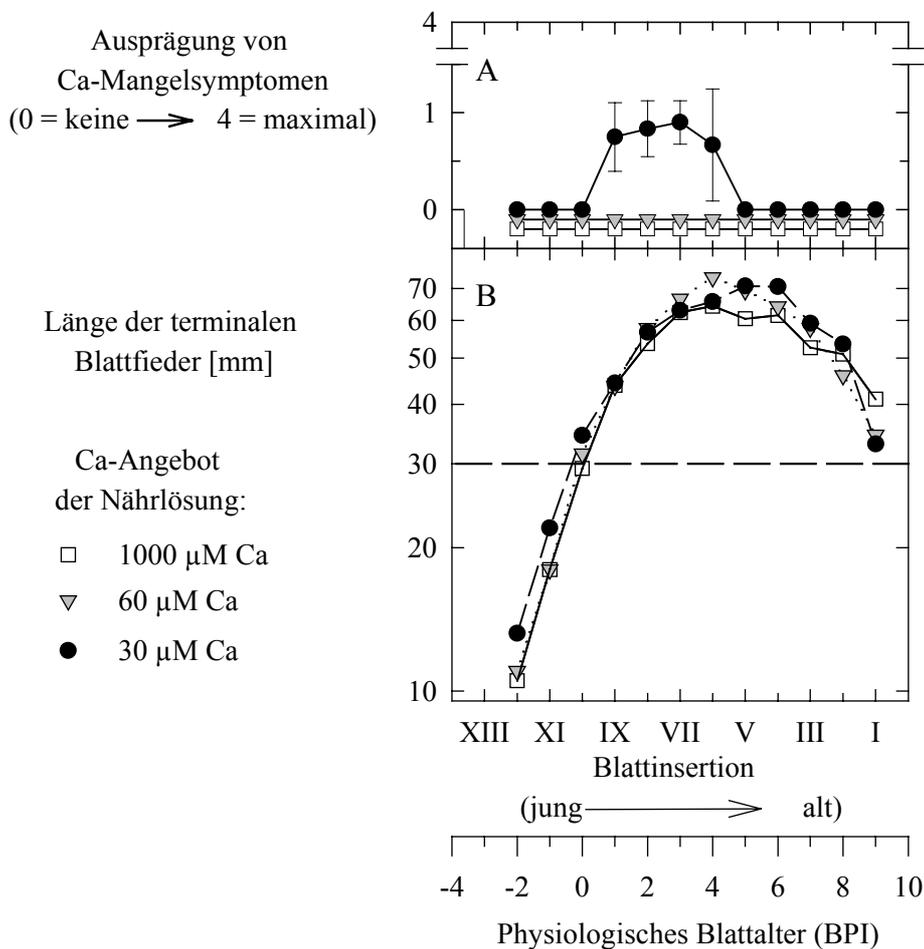


Abb. 3: (A) Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und (B) Länge der terminalen Blatffieder in Abhängigkeit der Insertion der Fiederblätter (in akropetaler Zählung) sowie des physiologischen Blattalters (Blatt-Plastochron-Index, BPI) von Kartoffelpflanzen der Sorte 'Adelheid' nach 21 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 6; (A) ± sd; (B) keine signifikanten Unterschiede nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Beispielhaft dargestellt ist in Abb. 3 das so ermittelte physiologische Alter von Kartoffelblättern der Sorte 'Adelheid', zusammen mit der Länge der terminalen Blattfieder, der Blattinsertion und der Stärke der Ca-Mangelsymptome nach 21 d in Nährlösung bei unterschiedlichem Ca-Angebot. Da im Zentrum der Arbeit die physiologischen Primärreaktionen im Sproß bzw. in Blättern bei absolutem Ca-Mangel stehen, ergibt sich aus Abb. 3, daß die Blattfiedern mit einem BPI von 0 bis 4 von besonderem Interesse sind, da hier die makroskopisch sichtbaren Ca-Mangelsymptome stets zuerst auftraten.

Während bisher zwischen Fiederblatt und Blattfieder unterschieden wurde, so wird im Folgenden nur noch der Begriff Blatt bzw. Blätter verwendet, womit stets die Blattfieder(n) und nie das Fiederblatt angesprochen wird.

2.4 Methoden zur Bestimmung der Ionen-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit

2.4.1 Infiltrations-Zentrifugations-Methode

Die Durchführung der Infiltrations-Zentrifugations-Methode erfolgte in Anlehnung an die Methoden von KLEMENT (1965) und ROHRINGER et al. (1983). Das Prinzip der Infiltrations-Zentrifugations-Methode besteht darin, das Blattgewebe durch Evakuieren und anschließender Wiederherstellung des normalen Druckes mit einer Lösung zu infiltrieren, wobei sich Infiltrationsflüssigkeit und Apoplastenflüssigkeit mischen. Die entstandene sogenannte Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF) läßt sich dann aus dem Gewebe zentrifugieren (Abb. 4).

2.4.1.1 Infiltration

Die abgeschnittenen Blätter wurden nach der Bestimmung der Frischmasse in Gaze-Streifen (1 mm Maschenweite) eingerollt und in 200 mL Saugflaschen mit der jeweiligen Infiltrationslösung gelegt. Durch das Einrollen in die Gaze-Streifen konnte sichergestellt werden, daß die Blätter während der gesamten Infiltration vollständig von der Lösung bedeckt waren. Dieses war unabdingbare Voraussetzung für eine vollständige Infiltration. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde innerhalb von 2 min ein Unterdruck von ca. 950 mbar (unter Normaldruck) erreicht, der 1 min aufrecht erhalten wurde. Der Druckausgleich erfolgte innerhalb von ca. 3 min. Der Infiltrationsvorgang wurde grundsätzlich zweimal durchgeführt, wodurch i.d.R. eine vollständige Infiltration gewährleistet war, wie an der einheitlichen dunkelgrünen Färbung des Blattgewebes zu erkennen war.

2.4.1.2 Zentrifugation

Nach beendeter Infiltration wurden die Blätter vorsichtig mit Filterpapier abgetupft und gewogen. Die Blätter wurden (sofern nicht anders vermerkt) mit Streifen aus Polyethylenfolie um eine 25 mL Eppendorf-Spritze gewickelt, welche dann in eine 50 mL Eppendorf-Spritze eingesetzt wurde. Diese wurde, mit einem 1,5 mL Eppendorf-Cup an der Spitze, in die Zentrifugenbehälter eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte (sofern nicht anders vermerkt) mit einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Heraeus Christ GmbH, Typ 03400; mittlerer Abstand von der Rotorachse: 9,8 cm) bei Raumtemperatur (20 – 22 °C).

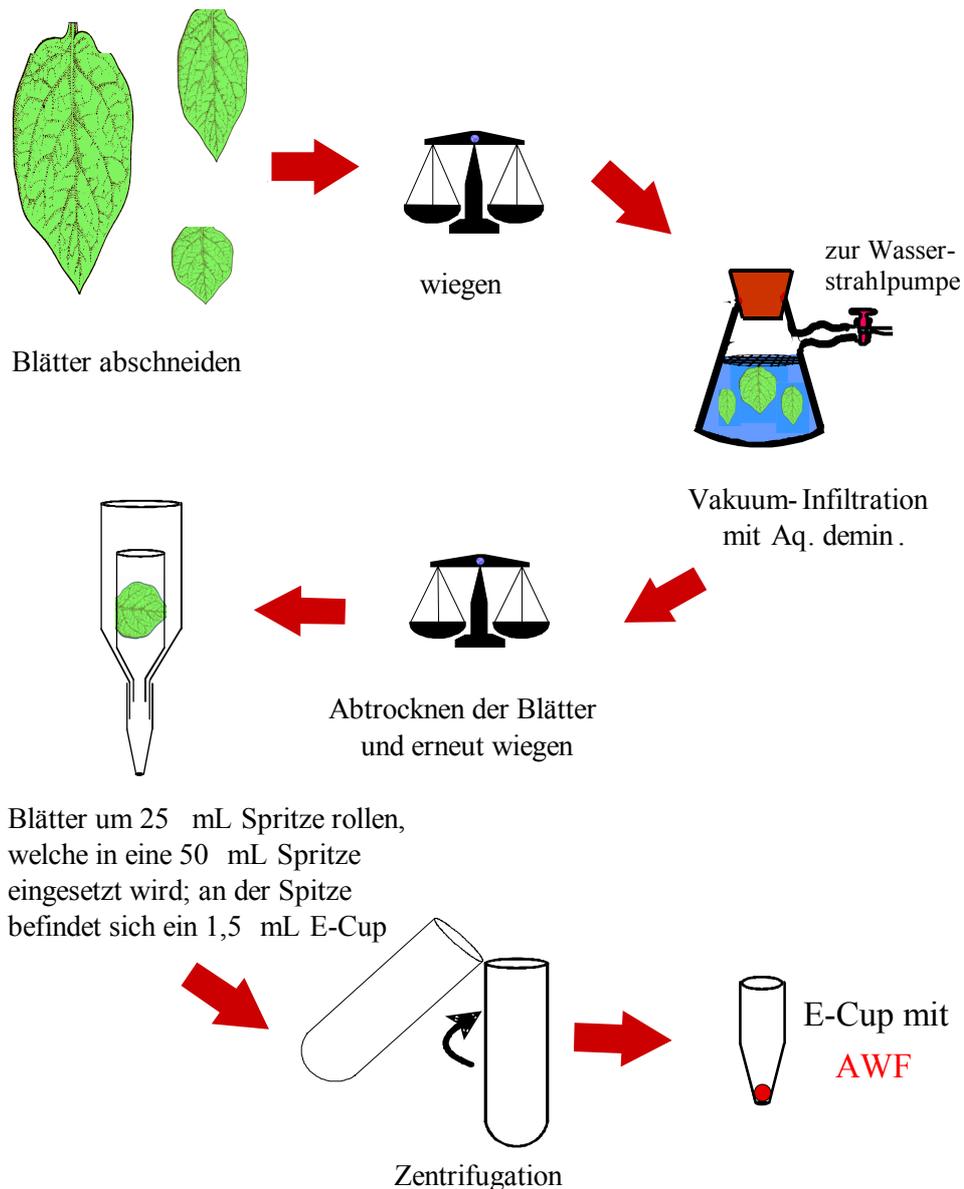


Abb. 4: Schematische Darstellung der Infiltrations-Zentrifugations-Methode für die Gewinnung der Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF)

Von elementarer Bedeutung für die Qualität der gewonnenen AWF ist die Integrität des Gewebes, damit symplasmatische Kontaminationen der AWF durch Zellschäden minimal sind. Im Hinblick darauf kommen neben der Art der Infiltrationslösung insbesondere Dauer, Stärke und weitere Randbedingungen wie Temperatur und Winkel zwischen Rotorachse und den Blättern während der Zentrifugation eine besondere Bedeutung zu.

Das Ziel der Ermittlung der optimalen Zentrifugationsbedingungen besteht darin, bei minimaler symplasmatischer Kontamination den größten AWF-Ertrag innerhalb der kürzesten Zeit zu erreichen. Eine Erhöhung der Zentrifugationsdauer von 5 min auf 15 min führte bei der niedrigsten angewendeten Zentrifugalbeschleunigung (250 x g) sowie bei 690 x g zu signifikant größeren Mengen an isolierter AWF; bei den anderen Zentrifugalbeschleunigungen zeigte sich dieses tendenziell (Abb. 5). Zentrifugationszeiten von über 15 min führten bei keiner Zentrifugalbeschleunigung zu absicherbar, höheren AWF-Erträgen (Abb. 5). Eine Zentrifugationsdauer von 15 min wurde daher als Standard gewählt.

Der gegenüber den übrigen Zentrifugalbeschleunigungen geringere AWF-Ertrag bei 690 x g erklärt sich dadurch, daß das Infiltrationsvolumen, der Blätter die bei 690 x g auszentrifugiert wurden, mit $0,22 (\pm 0,03) \text{ mL (g FM)}^{-1}$ geringer war als das der übrigen Blätter mit $0,25 - 0,29 \text{ mL (g FM)}^{-1}$ (Daten nicht dargestellt).

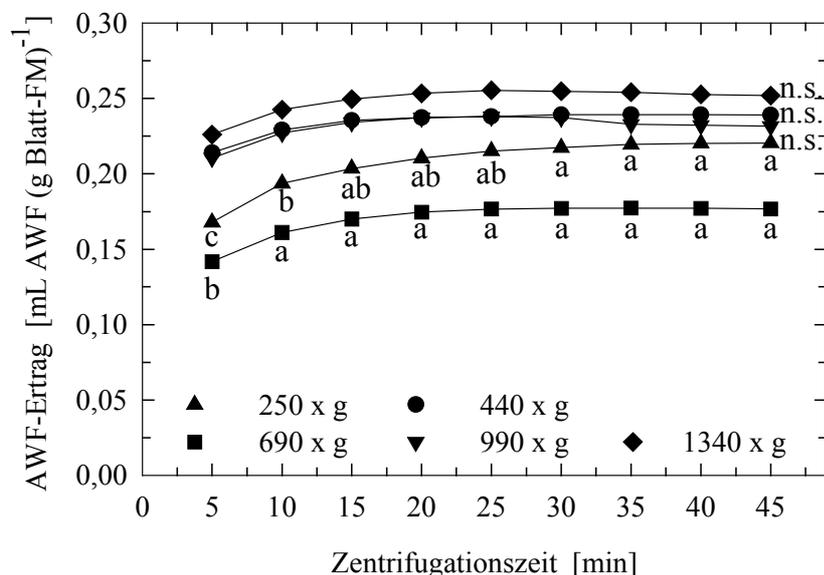


Abb. 5: Einfluß der Zentrifugationsdauer bei unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung auf die Menge isolierter Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF) von infiltrierten Blättern der Kartoffelsorte 'Adelheid' bei $1000 \mu\text{M}$ Ca-Angebot in der Nährlösung ($n = 8$; Mittelwertvergleich zwischen den Zentrifugationszeiten innerhalb einer Zentrifugalbeschleunigung mittels Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Die symplasmatische Kontamination der AWF wurde, ähnlich wie von RATHMEL et al. (1973), anhand der Aktivität der Malat-Dehydrogenase (MDH) der AWF in Prozent der Aktivität der MDH des Blatthomogenats bestimmt. Bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 250 x g, 440 x g sowie 690 x g und 15 min Zentrifugationszeit betrug die symplasmatische Kontamination im Mittel 0,2 % (Abb. 6). Höhere Zentrifugalbeschleunigungen als 690 x g führten zu signifikant höheren symplasmatischen Kontaminationen der AWF (Abb. 6).

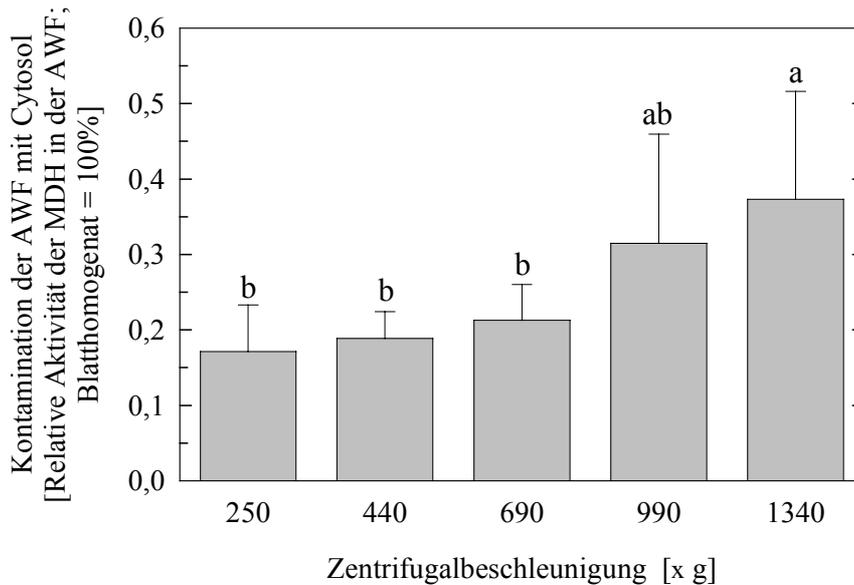


Abb. 6: Einfluß der Zentrifugalbeschleunigung bei 15 min Zentrifugationszeit auf die symplasmatische Kontamination der Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF) infiltrierter Blätter (BPI 2,5) der Kartoffelsorte 'Adelheid' bei 1000 µM Ca-Angebot in der Nährlösung gemessen an der Aktivität der Malat-Dehydrogenase (MDH) der AWF relativ zu der des Blatthomogenats (n = 8, außer bei 690 x g n = 7; Mittelwertvergleich mittels Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Diese erhöhte symplasmatische Kontamination der AWF bei höherer Zentrifugalbeschleunigung ging einher mit höheren Ionengehalten der AWF. So waren die K-, Ca-, und Mg-Gehalte der AWF bei Zentrifugalbeschleunigungen größer als 690 x g tendenziell und zum Teil auch signifikant höher als bei niedrigeren Zentrifugalbeschleunigungen (Abb. 7).

Somit konnte im Gegensatz zu einer Zentrifugalbeschleunigung von 250 x g bei 440 x g davon ausgegangen werden, daß nach 15 min der maximal mögliche AWF-Ertrag erreicht wurde (Abb. 5), ohne daß eine größere symplasmatische Kontamination (Abb. 6) oder veränderte Ionengehalte der AWF (Abb. 7) festgestellt werden konnten. Eine Zentrifugalbeschleunigung von 690 x g zeigte gegenüber 440 x g keine Vorteile, und höhere Zentrifugalbeschleunigungen als 690 x g wurden aufgrund der erhöhten symplasmatischen Kontamination nicht gewählt.

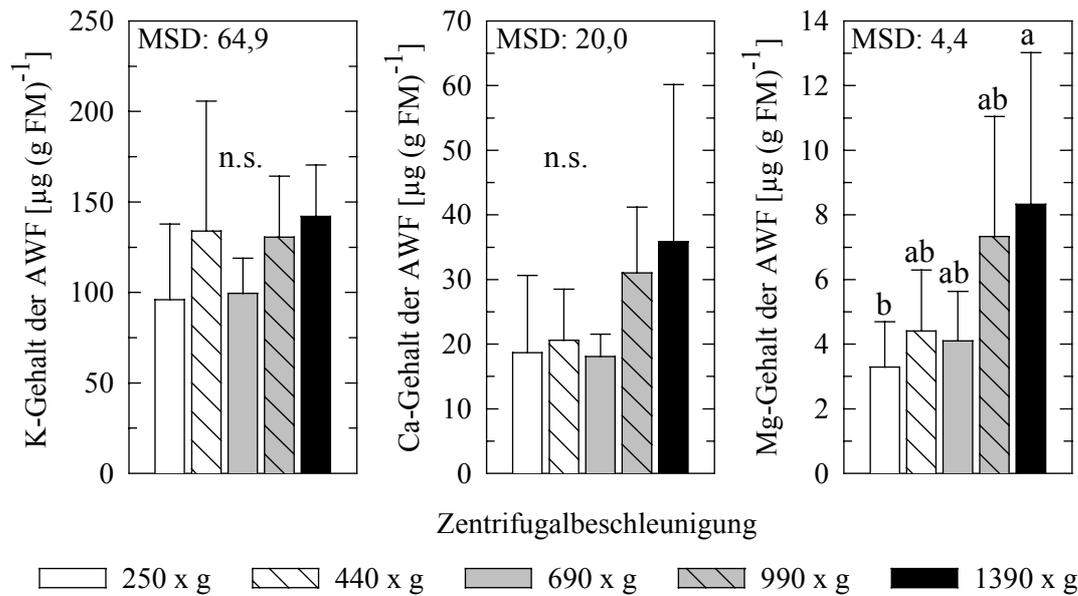


Abb. 7: Einfluß der Zentrifugalbeschleunigung bei 15 min Zentrifugationszeit auf die K-, Ca- und Mg-Gehalte der Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF) infiltrierter Blätter (BPI 2,5) der Kartoffelsorte 'Adelheid' bei 1000 μM Ca-Angebot in der Nährlösung ($n = 8$, außer bei 690 x g $n = 7$; Mittelwertvergleich und MSD-Werte nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Abschließend wurde noch untersucht, ob die symplasmatische Kontamination durch eine niedrigere Zentrifugations-Temperatur (4 °C *versus* 20 °C) sowie durch die Lage der Blätter zur Rotorachse während der Zentrifugation (Festwinkelrotor *versus* Ausschwingrotor) vermindert werden konnte. Es zeigte sich, daß sowohl durch eine niedrigere Temperatur bei der Zentrifugation als auch durch Verwendung eines Festwinkelrotors die symplasmatische Kontamination im Mittel um 7 % (allerdings nicht statistisch absicherbar) gegenüber der Zentrifugation mit Ausschwingrotor bei Raumtemperatur vermindert wurde (nicht dargestellt). Allerdings brachte, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, sowohl die Verwendung eines Festwinkelrotors wie auch die Zentrifugation bei 4 °C den wesentlichen Nachteil mit sich, daß im Vergleich zur Verwendung eines Ausschwingrotors bei 20 °C die AWF unvollständiger aus den Blättern zentrifugiert wurde (siehe 2.4.1.3.1, Tab. 8).

Als optimale Zentrifugationsbedingungen für den größten AWF-Ertrag innerhalb der kürzesten Zeit bei minimaler symplasmatischer Kontamination haben sich somit 15 min bei 440 x g mit einem Ausschwingrotor bei Raumtemperatur herausgestellt.

Bei Anwendung der Infiltrations-Zentrifugations-Methode auf Ca-Mangelblätter zeigte sich (Tab. 7), daß Ca-Mangelblätter (30 μM Ca-Angebot) gegenüber Blättern der Kontrollvariante (1000 μM Ca) eine deutlich höhere Aktivität der MDH in der AWF aufwiesen. Bei Ca-Mangelblättern konnte somit mit einer höheren symplasmatischen Kontamination der AWF gerechnet werden, wobei diese Kontamination allerdings weniger als 0,5 % betrug und bei der großen Streuung sich nicht signifikant von den Kontrollblättern unterschied.

Tab. 7: Aktivität der Malat-Dehydrogenase des Blatthomogenats und der Apoplastenwaschflüssigkeit (absolut und in Prozent der Aktivität des Blatthomogenats (BLH)) von Blättern (BPI 2) der Kartoffelsorte 'Adelheid' nach 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (Mittelwertvergleich mittels Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Ca-Angebot	Aktivität der Malat-Dehydrogenase					
	Blatthomogenat (BLH)		Apoplastenwaschflüssigkeit			
	[mU (g FM) ⁻¹]		[mU (g FM) ⁻¹]		[% des BLH]	
	Mw	sd	Mw	sd	Mw	sd
1000 μ M (n = 7)	11140	\pm 3212	25,4	\pm 13,3	0,26	\pm 0,16
		n.s.		a		n.s.
30 μ M (n = 6)	12000	\pm 2500	52,5	\pm 12,3	0,45	\pm 0,14
			b			

2.4.1.3 Ermittlung der Ionen-Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit

Das Ziel besteht in der Ermittlung der Ionen- und insbesondere Ca-Konzentration in der wässrigen Phase des Blattapoplasten. Die dafür erforderlichen Größen bei der verwendeten Infiltrations-Zentrifugations-Methode sind in Abb. 8 dargestellt.

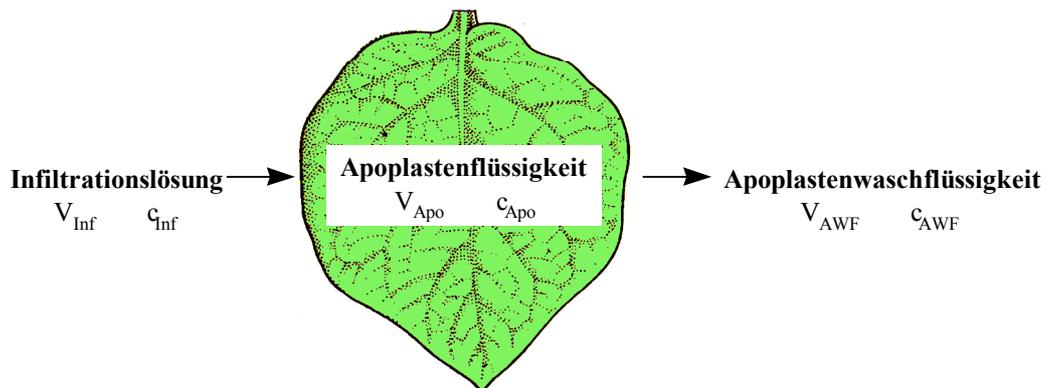


Abb. 8: Größen zur Bestimmung der Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit durch die Infiltrations-Zentrifugations-Methode

V_{Inf}	=	Volumen der infiltrierten Lösung
c_{Inf}	=	Konzentration der Infiltrationslösung
V_{Apo}	=	Volumen des wässrigen Apoplasten
c_{Apo}	=	Konzentration der Apoplastenflüssigkeit
V_{AWF}	=	Volumen der Apoplastenwaschflüssigkeit
c_{AWF}	=	Konzentration der Apoplastenwaschflüssigkeit

Die in Blattapoplastenflüssigkeit vorhandenen Ca-Mengen lassen sich wie folgt berechnen:

$$V_{Inf} * c_{Inf} + V_{Apo} * c_{Apo} = V_{AWF} * c_{AWF}$$

$$V_{Apo} * c_{Apo} = V_{AWF} * c_{AWF} - V_{Inf} * c_{Inf}$$

Die Ca-Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit ergibt sich dann wie folgt:

$$c_{Apo} = (V_{AWF} * c_{AWF} - V_{Inf} * c_{Inf}) / V_{Apo}$$

Einer direkten Messung zugänglich sind die Konzentrationen der Infiltrationslösung (c_{Inf}) und die der gewonnenen Apoplastenwaschflüssigkeit (c_{AWF}). Die Ermittlung übrigen Größen, d.h. des

Volumens der Infiltrationslösung (V_{Inf}), der Apoplastenflüssigkeit (V_{Apo}) sowie der Apoplastenwaschflüssigkeit (V_{AWF}) ist im folgenden beschrieben.

2.4.1.3.1 Ermittlung des Infiltrationsvolumens (V_{Inf})

Durch Wägung der Blätter vor und nach der Infiltration kann unter Berücksichtigung der Dichte der Infiltrationslösung das Volumen berechnet werden, welches durch die Infiltration in den ehemals luftgefüllten Apoplastenbereich eingedrungen ist. Das Infiltrationsvolumen V_{Inf} (bezogen auf die Frischmasse) entspricht dem Interzellularvolumen (IZV), sofern keine Aufnahme der Infiltrationslösung in den Symplasten stattfindet und die Menge der an den Blattoberflächen sowie Blatthaaren anhaftenden Infiltrationslösung nur vernachlässigbar gering ist.

Die Bestimmung des IZV mit Hilfe der Infiltration von Silikonöl (COSGROVE & CLELAND, 1983) erwies sich bei den behaarten Kartoffelblätter als ungeeignet, da vergleichsweise große Mengen an den Blattoberflächen haften blieben (Daten nicht dargestellt).

Die Infiltration von Blättern mit demineralisiertem Wasser führte im Vergleich zu einer Infiltration mit einem dem Zellsaft isoosmotischen MES-Puffer zu signifikant höheren Infiltrationsvolumina, bezogen auf die Frischmasse (Tab. 8). Eine zumindest naheliegende Erklärung kann in einer symplasmatischen Aufnahme des demineralisierten Wassers liegen, wodurch dann das Interzellularvolumen überschätzt wird. Die in den Symplasten aufgenommene Flüssigkeit wird nicht auszentrifugiert und kann durch Wägung der Blätter nach der Zentrifugation erfaßt werden (Tab. 8). Durch Subtraktion des Volumens der symplasmatischen Aufnahme (Restflüssigkeit im Blatt) von dem Infiltrationsvolumen errechnet sich bei Infiltration mit demineralisiertem Wasser das (korrigierte) Infiltrationsvolumen und entspricht dem bei MES-Infiltration ermittelten Infiltrationsvolumen (Tab. 8). Die symplasmatische Aufnahme von demineralisiertem Wasser entsprach im Mittel 18 % der insgesamt infiltrierte Flüssigkeit (berechnet unter Berücksichtigung der bei MES-Infiltration verbleibenden Restflüssigkeit im Blatt).

Die im Blatt verbleibende Restflüssigkeit bei Infiltration mit isoosmotischem MES-Puffer (Tab. 8) kann zwei Ursachen haben: Entweder wird das Infiltrationsvolumen überschätzt durch an der Blattoberfläche anhaftende Flüssigkeit, und / oder bei der durchgeführten Zentrifugation wird nicht das gesamte infiltrierte Flüssigkeitsvolumen auszentrifugiert. Ein wiederholt durchgeführtes Eintauchen von Blättern in die Infiltrationslösung sowie Abtrocknen und Wiegen dieser Blätter machte allerdings deutlich, daß die an den Blattoberflächen anhaftende Lösung durchaus in der Größenordnung von 20-30 $\mu\text{L} (\text{g FM})^{-1}$ liegen kann und damit ganz oder zu einem großen Anteil die Größe der "Restflüssigkeit" erklären kann (Daten nicht dargestellt).

Neben dem Vergleich unterschiedlicher Infiltrationslösungen wurde auch der Einfluß der Zentrifugationsbedingungen untersucht. Bei einer niedrigeren Zentrifugations-Temperatur (4 °C *versus* 20 °C) sowie bei einer anderen die Lage der Blätter zur Rotorachse während der Zentrifugation

(Festwinkelrotor *versus* Ausschwingrotor) war die im Blatt verbleibende Restflüssigkeit nach der Zentrifugation signifikant höher als bei Verwendung eines Ausschwingrotors bei Raumtemperatur (Tab. 8). Bei Verwendung eines Ausschwingrotors bei Raumtemperatur wurde somit eine deutlich höherer Anteil der infiltrierten Flüssigkeit auszentrifugiert (92 %) als bei niedriger Zentrifugations-Temperatur (60 %) oder bei Verwendung eines Ausschwingrotors (55 %) (berechnet unter Berücksichtigung der symplasmatischen Aufnahme des demineralisierten Wassers in der Größenordnung von 18 % des Infiltrationsvolumens).

Tab. 8: Einfluß von Infiltrationslösung und Zentrifugationsbedingungen auf das Infiltrationsvolumen und die Restflüssigkeit in Blättern (BPI 2,5) der Kartoffelsorte 'Bintje' nach der Zentrifugation (MES = MES-Puffer (280 mosmol kg⁻¹; pH 5,5); Aq.demin. = demineralisiertes Wasser; AR = Ausschwingrotor; FR = Festwinkelrotor; RT = Raumtemperatur; Infiltrationsvolumen = (FM_{nach Infiltration} – FM_{vor Infiltration}); Restflüssigkeit = (FM_{nach Zentrifugation} – FM_{vor Infiltration}); korrigiertes Infiltrationsvolumen = (Infiltrationsvolumen – Restflüssigkeit); n = 4; Mittelwertvergleich mittels Tukey-Test bei p < 0,05)

Infiltrations- lösung	Zentrifu- gationsbe- dingungen	Infiltrationsvolumen [mL (g FM) ⁻¹]	Restflüssigkeit [mL (g FM) ⁻¹]	Korrigiertes Infiltra- tionsvolumen [mL (g FM) ⁻¹]
MES	AR / RT	0,3127 ± 0,0359 b	0,0278 ± 0,0241 c	0,2849 ± 0,0284 a
Aq.demin.	AR / RT	0,3759 ± 0,0186 a	0,0993 ± 0,0296 bc	0,2766 ± 0,0477 a
Aq.demin.	AR / 4 °C	0,3818 ± 0,0295 a	0,1468 ± 0,0315 ab	0,2351 ± 0,0585 a
Aq.demin.	FR / RT	0,4034 ± 0,0274 a	0,1816 ± 0,0564 a	0,2218 ± 0,0631 a

Die Angabe einer durchschnittlichen Größe des Interzellularvolumen von Kartoffelblättern ist nur bedingt möglich, da berücksichtigt werden muß, daß das physiologische Blattalter, die Kartoffelsorte, die Form der N-Ernährung der Pflanzen (NO₃, NH₄NO₃, NH₄) und in Grenzen auch das Ca-Angebot der Nährlösung die Größe des Interzellularvolumens beeinflussen (Tab. 9). Beispielhaft dargestellt ist in Abb. 9 das Interzellularvolumen (nach Infiltration mit demineralisiertem Wasser und Korrektur um die nach der Zentrifugation im Blatt verbliebene Flüssigkeitsmenge) physiologisch unterschiedlich alter Kartoffelblätter der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei 1000 µM Ca-Angebot und unterschiedlicher Form der N-Ernährung (NO₃, NH₄NO₃, NH₄). Unabhängig von Sorte und Form der N-Ernährung nahm das Interzellularvolumen mit zunehmendem physiologischen Blattalter zu (Abb. 9), wobei dieser Effekt bei NH₄NO₃- und NO₃-Ernährung stärker ausgeprägt war als bei NH₄-Ernährung. Das Interzellularvolumen von Blättern bei NH₄-Ernährung der Pflanzen war deutlich kleiner als bei NO₃- oder NH₄NO₃-Ernährung (Abb. 9).

Tab. 9: Ergebnis der mehrfaktoriellen Varianzanalyse des Interzellularvolumen von physiologisch unterschiedlich alten Blättern der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 21 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot (1000, 60, 30 μM) und unterschiedlicher Form der N-Ernährung (NO_3 , NH_4NO_3 , NH_4)

Varianzursache	FG	Interzellularvolumen	
		F-Wert	P > F
Sorte	1	28,93	0,0001 ***
N-Form	2	17,65	0,0001 ***
Ca-Angebot	2	2,78	0,0637 n.s.
BPI	3	136,33	0,0001 ***
Sorte x N-Form	2	1,60	0,2034 n.s.
Sorte x Ca-Angebot	2	2,15	0,1178 n.s.
Sorte x BPI	3	8,08	0,0001 ***
N-Form x Ca-Angebot	4	2,32	0,0564 n.s.
N-Form x BPI	6	2,57	0,0191 ***
Ca-Angebot x BPI	6	0,76	0,6050 n.s.

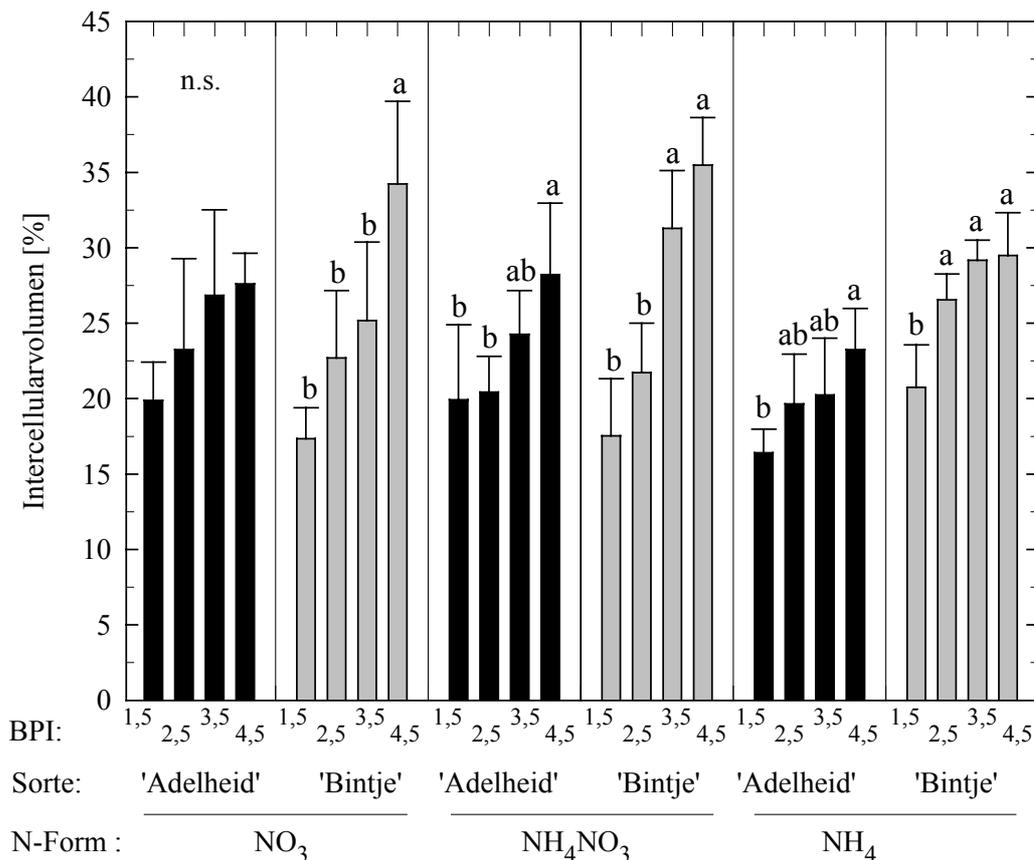


Abb. 9: Interzellularvolumen physiologisch unterschiedlich alter Blätter der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 21 d bei 1000 μM Ca-Angebot und unterschiedlicher N-Form (NO_3 , NH_4NO_3 , NH_4) in der Nährlösung (n = 4 - 6; Mittelwertvergleich innerhalb einer Sorte und N-Form mittels Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Dabei war allerdings der Einfluß der Form der N-Ernährung bei Blätter mit einem BPI von 1,5 und 2,5 nicht so stark ausgeprägt wie bei Blättern mit einem BPI von 3,5 und 4,5. Unterschiede in dem Interzellularrvolumen zwischen den beiden Sorten ließen sich vor allem bei Blättern mit einem BPI von 3,5 und 4,5 feststellen. Dabei besaßen die Blätter der Sorte 'Bintje' ein tendenziell größeres Interzellularrvolumen als die Blätter der Sorte 'Adelheid' (Abb. 9).

2.4.1.3.2 Bestimmung des Volumens der Apoplastenwaschflüssigkeit (V_{AWF})

Das Volumen der Apoplastenwaschflüssigkeit (V_{AWF}) wurde additiv aus dem Infiltrationsvolumen (V_{Inf}) und dem Volumen des Apoplastenwasser (V_{Apo}) berechnet, unter der Annahme, daß kein Unterschied in der Dichte zwischen V_{Inf} und V_{Apo} besteht.

$$V_{AWF} = V_{Inf} + V_{Apo}$$

Das Volumen des wäßrigen Apoplasten (V_{Apo}) kann durch Infiltration mit dem Farbstoff Indigo-carmin, Auszentrifugation des, durch das Apoplastenwasser verdünnten, Farbstoffes und anschließender spektralphotometrischer Bestimmung der Verdünnung des Farbstoffes bestimmt werden (HUSTED & SCHJOERRING, 1995). Das Volumen der Apoplastenflüssigkeit (V_{Apo}) läßt sich aus den gemessenen Absorptionsunterschieden (und dem daraus berechneten Verdünnungsfaktor) wie folgt berechnen:

$$V_{Apo} = \frac{VF \cdot V_{Inf}}{1 - VF} \quad [mL]$$

VF = Verdünnungsfaktor des Farbstoffes mit $0 \leq VF \leq 1$

Das Volumen der Apoplastenflüssigkeit bezogen auf die Frischmasse ergibt den Apoplastenwassergehalt (AWG):

$$AWG = \frac{V_{Apo}}{FM} \quad \left[\frac{mL}{g} \right]$$

Es konnten keine Unterschiede in dem Apoplastenwassergehalt zwischen den beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' sowie zwischen unterschiedlich hohen Ca-Angeboten festgestellt werden (Tab. 10). Im Mittel über die Sorten und Ca-Stufen betrug der Apoplastenwassergehalt junger Kartoffelblätter $0,065 \text{ mL (g FM)}^{-1}$.

Geht man von einem Interzellularrvolumen von 0,2 bis 0,3 mL (g FM)^{-1} aus (Abb. 9), so bedeutet das, daß bei Blättern mit einer Frischmasse von 1 g 0,065 mL Apoplastenflüssigkeit mit 0,2 bis 0,3 mL Infiltrationslösung gemischt werden, und die Apoplastenflüssigkeit somit um Faktor 4 bis 5 verdünnt wird. Routinemäßig wurden die Blätter mit demineralisiertem Wasser infiltriert und die gewonnene AWF bis zu weiteren Analysen eingefroren ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Die gemessene Ionenkonzentration der AWF wurde in die Konzentration der Apoplastenflüssigkeit umgerechnet. Die Ionenkonzentration der Apoplastenflüssigkeit (c_{Apo}) berechnet sich aus der gemessenen Konzentrationen der Infiltrationslösung (c_{Inf}) sowie der gemessenen Konzentration der gewonnenen

Apoplastenwaschflüssigkeit (c_{AWF}) und dem Volumen der Apoplastenwaschflüssigkeit (additiv berechnet aus dem Volumen des Apoplastenwassers (V_{Apo}) und dem (um die symplasmatische Aufnahme korrigierten) Infiltrationsvolumen (V_{Inf}):

$$c_{Apo} = ((V_{Inf} + V_{Apo}) * c_{AWF} - V_{Inf} * c_{Inf}) / V_{Apo}$$

Für alle im Ergebnisteil dargestellten Ionen-Konzentrationen der Blattapoplastenflüssigkeit wurden nach diesen Voruntersuchungen das jeweils ermittelte Interzellularvolumen (korrigiert um die symplasmatische Wasseraufnahme) berücksichtigt und stets ein Apoplastenwassergehalt von $0,065 \text{ mL (g FM)}^{-1}$ zu Grunde gelegt.

Tab. 10: Apoplastenwassergehalt von jungen Kartoffelblättern (BPI 2) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 29 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (Apoplastenwassergehalt wurde bestimmt durch Infiltration mit Indigocarmin ($50 \mu\text{M}$ in $280 \text{ mosmol kg}^{-1}$ MES-Puffer, pH 6,0); $n = 6 - 7$; keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten sowie zwischen den Ca-Angeboten nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Ca-Angebot [μM]	Apoplastenwassergehalt [mL (g FM)^{-1}]	
	'Adelheid'	'Bintje'
1000	$0,067 \pm 0,012$	$0,063 \pm 0,010$
60	$0,061 \pm 0,011$	$0,067 \pm 0,009$
30	$0,070 \pm 0,015$	$0,062 \pm 0,012$

2.4.2 Infiltrations-Diffusions-Methode

Die Infiltrations-Diffusions-Methode basiert auf einer von BEHLING et al. (1989) vorgestellten Methode zur Bestimmung des wasserlöslichen, diffusiblen Ca des Blattapoplasten.

Blattscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm wurden mittels Korkbohrer aus abgeschnittenen Blättern gestanzt und mit demineralisiertem Wasser vakuum-infiltriert wie unter 2.4.1.1 beschrieben. Nach beendeter Infiltration wurden die Blattscheiben vorsichtig mit Filterpapier abgetupft und gewogen (Abb. 10). Nach Überführung der Blattscheiben in die Inkubationsgefäße wurde als Inkubationslösung (= zukünftige Aussenlösung) demineralisiertes Wasser zugegeben und die Inkubationsgefäße geschlossen. Das Inkubationsvolumen betrug je nach Fragestellung 1 oder 10 mL und die verwendete Anzahl der Blattscheiben je nach Fragestellung 3 oder 6. Nach der Inkubation, deren Länge je nach Fragestellung zwischen 0,5 und 24 h lag, wurden die Blattscheiben aus der Lösung genommen, mit Filterpapier abgetupft und für Mineralstoffanalysen im Trockenschrank bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet oder für Zellwandpräparationen sowie für Untersuchungen von Enzym-Aktivitäten in flüssigem N_2 schockgefroren und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Die Aussenlösung wurde bis zu weiteren Analysen zunächst eingefroren ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Blätter abschneiden

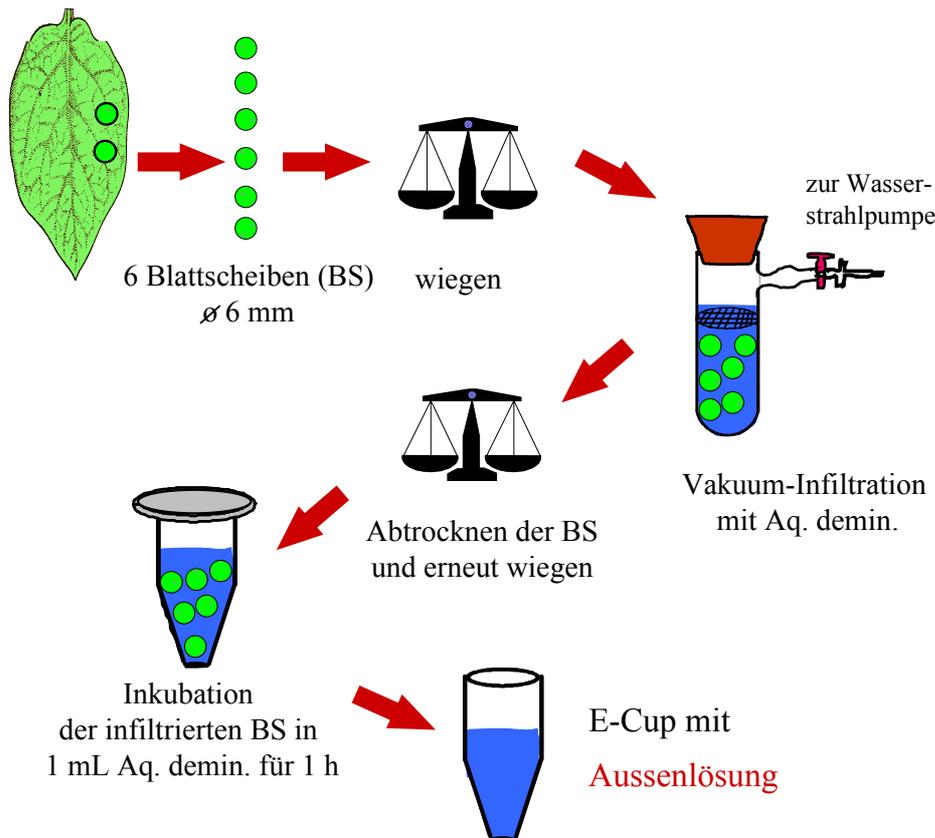


Abb. 10: Schematische Darstellung der Infiltrations-Diffusions-Methode

2.4.3 Analysen der Apoplastenwaschflüssigkeit sowie der Aussenlösung

Ca-, K- und Mg-Konzentration der Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF) sowie der Aussenlösung inkubierter Blattscheiben wurden mit dem Atomabsorptionsspektrometer (Hitachi Z-8000) in der Flamme mit dem Hintergrund von 0,6 M HCl und 1:50 verdünnter CsCl/LaCl₃-Lösung (Merck 116755) (nach SCHINKEL, 1984) gemessen. Bei Analysen mittels Atomemissionsspektrometer (ICP, Spectro) wurden die Proben mit dem Hintergrund von 0,48 M HNO₃ gemessen.

Die Ca²⁺-Aktivität der AWF wurde in einem Probenvolumen von 70 µL mittels einer Ca-sensitiven Mikroelektrode (Fa. Lange, MI-600) bestimmt. Die Ca-Elektrode wurde 2 h vor Meßbeginn in einer 1 mM CaCl₂-Lösung konditioniert. Die Kalibrierlösungen enthielten CaCl₂ in dem Konzentrationsbereich von 0,03 mM bis 3 mM. Die Ca²⁺-Aktivität der Kalibrierlösungen wurde aus dem Produkt der Konzentration und des Aktivitätskoeffizienten berechnet. Der Aktivitätskoeffizient wurde nach der Debye-Hückel-Regel folgendermaßen berechnet (CAMMAN & GALSTER, 1996):

$$\log f_{\text{Ca}^{2+}} = - (A * z_{\text{Ca}^{2+}}^2 * \sqrt{I}) / (1 + B * k_{\text{Ca}^{2+}} * \sqrt{I})$$

- $f_{\text{Ca}^{2+}}$ = Aktivitätskoeffizient für Ca
 A, B = Lösungsmittel- und Temperatur-abhängige Konstanten
 (Wasser bei 25 °C: A = 0,512 und B = 0,329 10⁸)
 $z_{\text{Ca}^{2+}}$ = Ionenladung
 I = Ionenstärke der Lösung, definiert als $I = \frac{1}{2} \sum c_i * z_i^2$
 mit c_i = Konzentration des betreffenden Ions in mol L⁻¹
 $k_{\text{Ca}^{2+}}$ = ionenspezifische Konstante ($k_{\text{Ca}^{2+}} = 5 \cdot 10^{-9} \text{ m}$)

Die Empfindlichkeit der Elektrode für Ca²⁺ wurde in dem Konzentrationsbereich von 0,03 mM bis 3 mM CaCl₂ durch die Gegenwart von K⁺ (25 mM KCl), Mg²⁺ (10 mM MgCl₂) oder Na⁺ (10 mM NaNO₃) nicht beeinträchtigt (Daten nicht dargestellt). Der Einfluß höherer Konzentrationen dieser möglichen Störionen auf die Empfindlichkeit der Ca-Elektrode wurde nicht untersucht, da die Konzentration dieser Ionen in der AWF deutlich geringer war als die geprüfte Konzentration der möglichen Störionen. So betrug in den untersuchten AWF-Proben der Kartoffelblätter die K-Konzentration 1,9 - 8,5 mM, die Mg-Konzentration 0,5 - 2,6 mM und die Na-Konzentration 0,05 - 0,12 mM.

Des Weiteren wurde in der AWF die Konzentration organischer Säuren (siehe 2.8.4), reduzierender Zucker (siehe 2.8.2) und von Glukose (siehe 2.8.3) bestimmt. Die Uronsäure-Konzentration wurde ohne bzw. nach 5-facher Aufkonzentrierung durch Gefriertrocknung nach der unter 2.6 beschriebenen colorimetrischen Methode von BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973) ermittelt.

2.5 Zellwand-Präparation und Pektin-Fraktionierung

Zellwandmaterial, korrekter bezeichnet als alkohol-unlöslicher Rest des pflanzlichen Materials (alcohol insoluble residue = AIR), wurde in Anlehnung an die Methode von HU et al. (1996) präpariert, wobei einige Veränderungen vorgenommen wurden, deren Basis die im Anhang (siehe 7.1) dargestellten methodischen Voruntersuchungen waren.

Die Durchführung der Aufreinigung und Isolierung von Zellwandmaterial (AIR) aus jungen Kartoffelblättern wird im folgenden kurz beschrieben:

Das pflanzliche Material wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in Reagenzgläser eingewogen (ca. 0,5 g FM) und in 4 mL demineralisiertem Wasser mittels Ultra-Turrax (1 min) und anschließendem Ultraschall (1 min), weiter zerkleinert und homogenisiert. Das Homogenat wurde quantitativ (unter Verbrauch von insgesamt 16 mL Wasser) auf eine Filtrationseinheit mit 40 µM Gaze überführt und abgenutscht. Das auf der Gaze verbleibende Material wurde anschließend mit insgesamt 20 mL 80 %igem Ethanol gewaschen. Danach erfolgte ein Waschschriff mit 20 mL Chloroform : Methanol (1:1 v/v) und ein abschließender Waschschriff mit 20 mL Aceton. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Aufarbeitungszeit betrug insgesamt ca. 90 min je Probe.

Für die AIR-Präparation und anschließende Pektin-Fraktionierung aus einer vergleichsweise geringen Menge an Blattmaterial von nur 0,03 g FM wurde die Methode so vereinfacht, daß praktisch kein Blattmaterial verloren gehen konnte. Das Blattmaterial wurde hierzu direkt in 80 %igem Ethanol homogenisiert. Die weitere Aufreinigung des Materials erfolgte, nach jeweiligem zentrifugieren (15 min bei 10000 x g) und dekantieren, durch einen Waschschrift mit Chloroform : Methanol (1:1 v/v) und anschließend mit Aceton.

Die Fraktion der wasserlöslichen Pektine des isolierten Zellwandmaterials (AIR) wurde nach Inkubation des AIRs für 1 h in demineralisiertem Wasser bei 4 °C gewonnen. Für die Extraktion chelatorlöslicher Pektine wurde in Anlehnung an SELVENDRAN et al. (1985) eine Lösung mit 50 mM CDTA (pH 6,5 eingestellt mit 0,1 M KOH) bei Raumtemperatur für 4 h verwendet. Die dann noch in dem AIR verbliebenen Pektine wurden durch 80 %ige H₂SO₄ hydrolysiert.

2.6 Quantitative Uronsäure-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung von Uronsäuren lehnt sich an die colorimetrische Methode von BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973) an. Dabei werden in der Originalarbeit 200 µL wäßrige Probe und 1200 µL Na-Tetraborat (0,0125 M Na₂B₄O₇ in 96 % H₂SO₄) gemischt (eisgekühlt) und anschließend 5 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht. Ein Probenansatz wird mit 20 µL m-Hydroxybiphenyl (0,15 % (w/v) in 0,5 % NaOH), dem Farbreagenz, und ein weiterer Ansatz als Blindwert nur mit 20 µL 0,5 % NaOH, versetzt. Nach 5 min werden spektralphotometrisch die Absorptionen beider Ansätze bei 520 nm gemessen. Aus der Differenz der Absorptionen ((Absorption + Hydroxybiphenyl) – (Absorption – Hydroxybiphenyl)) und einer gemessenen Eichreihe läßt sich die Uronsäure-Konzentration berechnen. Als Standard wurde D-Galakturonsäure (Fluka 48280) verwendet und die Uronsäure-Gehalte- bzw. Konzentrationen werden als Galakturonsäure-Equivalente (Gal-US-Eq.) angegeben. Der lineare Meßbereich liegt zwischen 1,5 und 15 µg Gal-US-Eq. (mL Reagenzmix)⁻¹.

Die Methode wurde dahingehend verändert, daß nur ein Probenansatz erforderlich war. Nach dem Kochen wurde als Blindwert die Absorption des Probenansatzes gemessen, und zu demselben Ansatz wurden dann 20 µL m-Hydroxybiphenyl zugegeben und 5 min später die Absorption gemessen.

Da nicht bei allen Analysen 200 µL wäßrige Probe zur Verfügung standen (z.B. mit H₂SO₄ versetztes Zellwandmaterial), und für Untersuchungen in hoher räumlicher Auflösung der Ansatz verkleinert werden sollte, wurde geprüft, ob das H₂O : H₂SO₄ - Verhältnis einen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Methode hat. Dazu wurden zu 20 µL Galakturonsäure-Standardreihe (in demineralisiertem Wasser) ein unterschiedliches Volumen an demineralisiertem Wasser sowie an konzentrierter Schwefelsäure (mit 0,0125 M Na₂B₄O₇) zugegeben, so daß ein Volumen von 1200 µL

sowie von 1400 μL erreicht wurde. Die Zugabe von Hydroxybiphenyl betrug jeweils 20 μL . Bei beiden Gesamtvolumina (1200 μL und 1400 μL) ergab sich eine Optimumskurve zwischen dem $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4$ -Verhältnis und der Meßempfindlichkeit. Bei dem Gesamtvolumen von 1400 μL lieferte ein $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4$ -Verhältnis von 1:6,8 die höchste Meßempfindlichkeit (Abb. 11A); bei dem Gesamtvolumen von 1200 μL war dieses bei einem Verhältnis von 1:6,5 der Fall (Abb. 11B). Die Meßempfindlichkeit war bei einem $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4$ -Verhältnis von 1:9 (1400 μL Gesamtvolumen) bzw. 1:11 (1200 μL Gesamtvolumen) signifikant vermindert gegenüber der jeweiligen maximalen Empfindlichkeit (Abb. 11A, B).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde darauf geachtet, daß die Uronsäure-Bestimmung stets bei einem

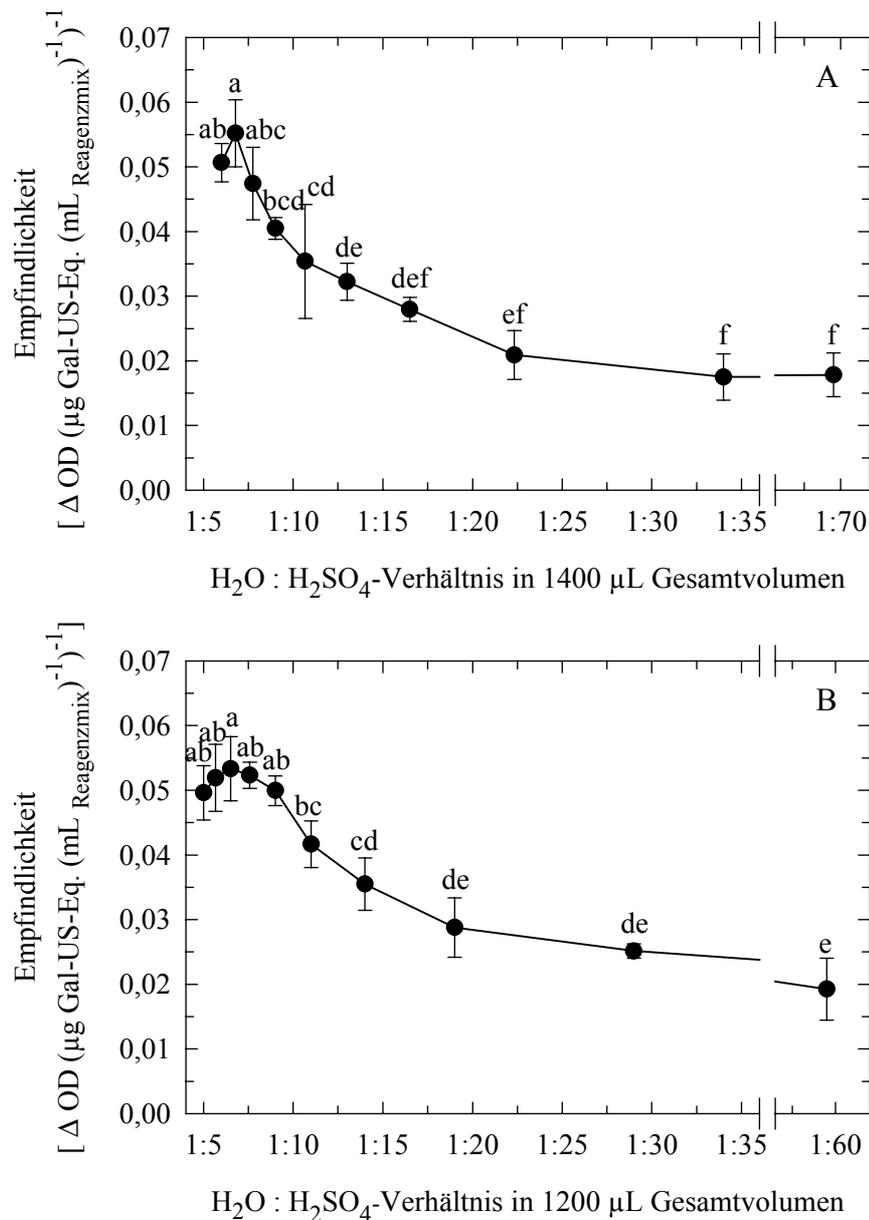


Abb. 11: Einfluß des Verhältnisses von Wasser zu konzentrierter Schwefelsäure auf die Empfindlichkeit der Uronsäure-Bestimmung bei einem Gesamtvolumen des Reagenzmix von (A) 1400 μL und (B) 1200 μL ($n = 3$; Mittelwertvergleich innerhalb eines Gesamtvolumens mittels Tukey-Test bei $p < 0,05$)

H₂O : H₂SO₄ - Verhältnis im Bereich von 1: 6,5 und 1:7 durchgeführt wurde. Im Vergleich entspricht der Ansatz von BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973) bei einem Volumen von 1400 µL einem H₂O : H₂SO₄ - Verhältnis von 1 : 6.

Nach BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973) soll eine Verlängerung der Zeitdauer (> 5 min) des Kochens im Wasserbad zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit der Methode führen. MACDOUGALL et al. (1995) erwähnten, daß durch eine Verlängerung der Kochdauer auf 1 h die Reproduzierbarkeit wesentlich verbessert wurde, wohingegen eine weitere Verlängerung der Kochdauer eine geringere Wiederfindungsrate zur Folge hat.

In eigenen Untersuchungen wurde die höchste Empfindlichkeit bei einer Zeitdauer von 5 min bei 100 °C im Wasserbad erreicht (Abb. 12). Eine Verlängerung der Kochzeit um weitere 5 min führte jedoch schon zu einer Verminderung der Empfindlichkeit um 20 %. Nach einer Kochdauer von 160 min wurden nur noch 3 % der Empfindlichkeit nach 5 min Kochdauer erreicht (Abb. 12). Aufgrund dieses drastischen Einflusses der Zeitdauer im Wasserbad bei 100 °C auf die Empfindlichkeit der Methode, erschien eine Verlängerung der Kochdauer, wie sie von MACDOUGALL et al. (1995) empfohlen wurde, nicht als sinnvoll. Des weiteren ließ sich keine eindeutige Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Meßwerte durch eine Verlängerung der Kochdauer feststellen. Der Variationskoeffizient zwischen den Wiederholungen lag stets im Bereich von 4 bis 20 % (nicht dargestellt).

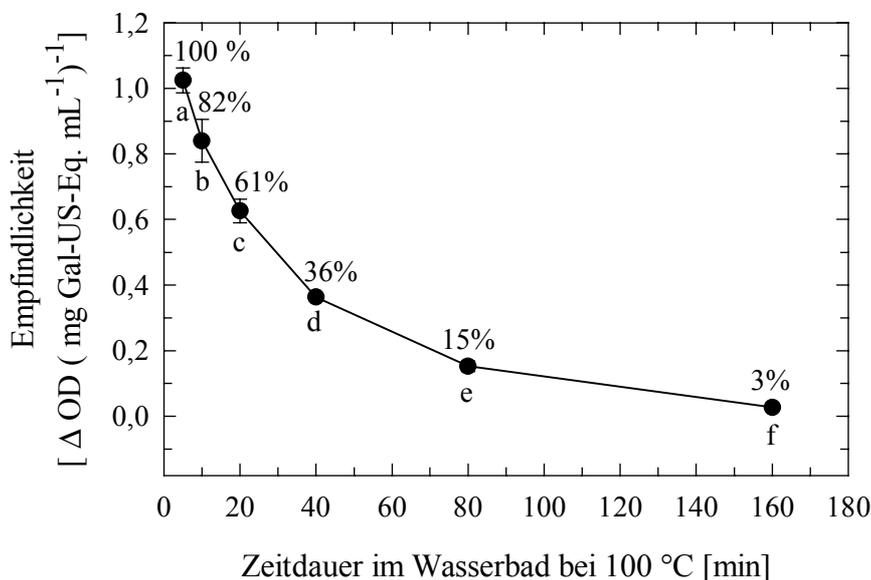


Abb. 12: Einfluß der Zeitdauer im Wasserbad bei 100 °C auf die (absolute und relative) Empfindlichkeit der quantitativen Uronsäure-Bestimmung (Reagenzmix: 20 µL Galakturonsäure-Standard bei einem Volumen von 1200 µL und einem H₂O : H₂SO₄-Verhältnis von 1:6,5; n = 3; Mittelwertvergleich mittels Tukey-Test bei p < 0,05)

Auch das Volumen an m-Hydroxybiphenyl hat einen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Methode. Dabei erwies sich die Zugabe von 20 µL m-Hydroxybiphenyl, wie von BLUMENKRANTZ & ASBOE-

HANSEN (1973) verwendet, sowohl bei 1400 μL wie auch bei 1200 μL Gesamtvolumen als optimal (nicht dargestellt), während bei einem Volumen von 840 μL 10 μL optimal sind (nicht dargestellt).

Interferenzen

Glukose-Konzentrationen bis zu 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ führten zu keiner Beeinträchtigung der Uronsäure-Bestimmung. Lediglich bei höheren Glukose-Konzentrationen (800 $\mu\text{g mL}^{-1}$) schien die Reproduzierbarkeit vermindert zu sein (Tab. 11). Die Empfindlichkeit der Methode gegenüber Glukose betrug nur maximal 0,5 % der Empfindlichkeit gegenüber Galakturonsäure (Tab. 11), d.h. Glukose selbst wurde durch diese Methode nicht nennenswert erfaßt.

Tab. 11: Empfindlichkeit der quantitativen Uronsäure-Bestimmung (nach BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973) in Gegenwart von Galakturonsäure (Gal-US) und / oder Glukose (Glc) (n = 3)

Lösung	Empfindlichkeit [$\Delta \text{OD (mg Gal-US mL}^{-1}\text{)}^{-1}$]
Gal-US (0,1 bis 1,0 mg mL^{-1})	0,818 \pm 0,035
Gal-US (0,1 bis 1,0 mg mL^{-1}) + 0,2 mg mL^{-1} Glc	0,796 \pm 0,011
Gal-US (0,1 bis 1,0 mg mL^{-1}) + 0,4 mg mL^{-1} Glc	0,831 \pm 0,032
Gal-US (0,1 bis 1,0 mg mL^{-1}) + 0,8 mg mL^{-1} Glc	0,713 \pm 0,235
	[$\Delta \text{OD (mg Glc mL}^{-1}\text{)}^{-1}$]
Glc (0,1 bis 0,8 mg mL^{-1})	0,004 \pm 0,003

2.7 Qualitative Charakterisierung der Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit

Es wurden verschiedene Methoden auf ihre Eignung untersucht, die Oligogalakturonide der AWF hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades zu charakterisieren. Zum Einsatz kamen immunologische Untersuchungen mittels dot-blot Test sowie Untersuchungen mittels DC (Dünnschichtchromatographie), PAGE (Polyacrylgelelektrophorese), MALDI-TOF-MS (Matrix-unterstützte Laser Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) und HPAEC-PAD (Hochauflösende Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion). Im weiteren dargestellt ist die Analytik mittels HPAEC-PAD. Eine kurze Beschreibung der methodischen Probleme mit den übrigen verwendeten Methoden findet sich im Anhang (7.2).

Die Charakterisierung der Oligogalakturonide in der AWF mittels HPAEC-PAD konnte im Labor von Prof. Van Cutsem (Namur, Belgien), gemäß der Methode von ROCKLIN & POHL (1983) und HOTCHKISS & HICKS (1990), durchgeführt werden.

Da, abgesehen von dem Monomer, die Konzentration an größeren Oligogalakturoniden in der AWF für die Detektion zu niedrig war, mußte die AWF um Faktor 10 mittels Lyophilisation auf-

konzentriert werden. Das für diese Aufkonzentrierung erforderliche Flüssigkeitsvolumen konnte nur erreicht werden, indem Mischproben aus der AWF physiologisch ähnlich junger Blätter von 5 - 6 Pflanzen verwendet wurden.

Die chromatographische Auftrennung der Oligogalakturonide erfolgte nach Lyophilisierung und Deesterifizierung (0,15 M NaOH) der Proben mittels einer Carbo-Pac PA-100-Säule (Dionex, Sunnyvale, CA) unter Verwendung eines linearen Gradienten von 200 – 800 mM NaOAc bei einer Flußrate von 1 mL min⁻¹ innerhalb von 50 min bei Raumtemperatur, wobei zur Erhöhung der Empfindlichkeit mit Nachsäulen-Derivatisierung (500 mM NaOH, 1 mL min⁻¹) gearbeitet wurde.

Die bei der amperometrischen Detektion verwendete dreifache Pulssequenz beinhaltete folgende Potentiale und Zeitdauer: E₁ = +0,05 V (t₁ = 480 ms), E₂ = +0,70 V (t₂ = 180 ms) und E₃ = -0,1 V (t₃ = 360 ms). Der elektrochemische Detektor (mit Gold-Arbeits Elektrode) arbeitete mit einer Empfindlichkeit von 10 µA (0 - 10 min) und 0,1 µA (10 - 50 min).

Der Polymerisationsgrad wurde bestimmt durch Vergleich der Retentionszeiten der Peaks der Proben mit denen einer Oligogalakturonid-Mischung, hergestellt durch Säure-Hydrolyse von Polygalakturonsäure (10 g L⁻¹; Sigma P1879) (GILLET et al., 1992). Beispielhaft zeigt Abb. 13 das HPAEC-PAD-Chromatogramm dieser Oligogalakturonid-Mischung.

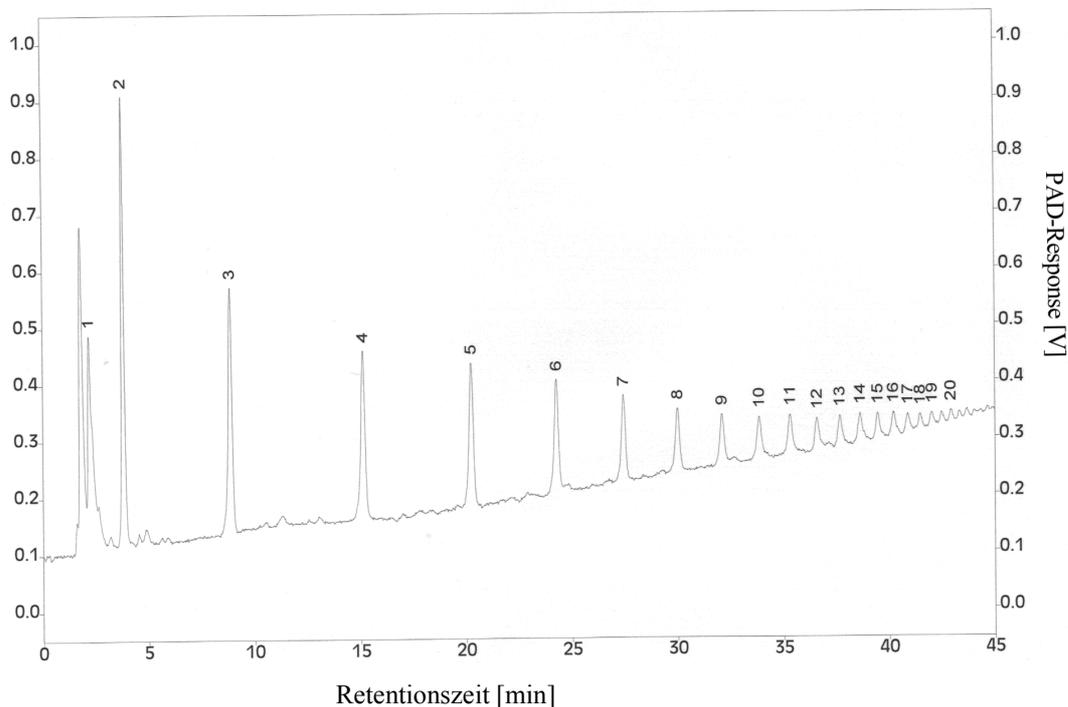


Abb. 13: HPAEC-PAD-Chromatogramm der Lösungen von Oligogalakturoniden mit einem Polymerisationsgrad von 1 bis 20

Die Konzentration des Monomers in den Proben wurde bestimmt anhand einer Standardreihe von D-Galakturonsäure (Fluka 48280). Eine absolute Bestimmung der Konzentration von Galakturonsäuren mit DP > 1 war nicht möglich, da keine entsprechenden Standards zur Verfügung standen

und die Detektionsempfindlichkeit eine Funktion des Polymerisationsgrades ist (HOTCHKISS & HICKS, 1990). Eine relative Auswertung wurde vorgenommen, indem das Verhältnis der Peak-Flächen bei niedrigem Ca-Angebot zu Peak-Flächen bei hohem Ca-Angebot sowie das Verhältnis der Peak-Flächen der beiden Sorten zueinander berechnet wurde.

2.8 Chemische Untersuchungen

2.8.1 Mineralstoffanalysen

Das Pflanzenmaterial wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 65 °C im Trockenschrank getrocknet. Die getrockneten Pflanzenproben wurden in Säure-gespülte Szintillationsgläschen eingewogen und im Muffelofen 8 h bei 450 °C verascht.

Für Ca-, K- und Mg-Analysen mit dem Atomabsorptionsspektrometer (Hitachi Z-8000) wurden die veraschten Proben in 6 M HCl und 1 : 5 verdünnter CsCl/LaCl₃-Lösung (Merck 116755) aufgenommen und mit demineralisiertem Wasser 1:10 verdünnt (nach SCHINKEL, 1984). Für Ca-, K-, Mg-Analysen mit dem Atomemissionsspektrometer (ICP, Spectro) wurden die Proben in 4,8 M HNO₃ aufgenommen und mit demineralisiertem Wasser 1:10 verdünnt.

2.8.2 Bestimmung der Konzentration reduzierender Zucker

Die Bestimmung reduzierender Zucker erfolgte nach der Methode von HONDA et al. (1980, 1982). Die Reaktionsmischung enthielt 300 µL der Probe, 700 µL 0,1 M Borat-Puffer (pH 9) und 350 µL 2-Cyanoacetamid (1% w/v). Nach dem Kochen (10 min) kann die Bestimmung der reduzierenden Zucker sowohl spektrophotometrisch ($\lambda = 276$ nm) als auch fluorometrisch (Anregung bei $\lambda = 331$ nm, Emission bei $\lambda = 383$ nm) erfolgen. Nach Angaben der Autoren unterscheiden sich die beiden Bestimmungsmethoden in der Empfindlichkeit für verschiedene reduzierende Zucker (HONDA et al., 1982). Wenngleich bei eigener Überprüfung die numerischen Angaben der Autoren nicht reproduziert werden konnten, so zeigte sich in Übereinstimmung mit der Angabe von HONDA et al. (1982), daß bei der spektrophotometrischen Bestimmung die Empfindlichkeit für Galakturonsäure höher war (um Faktor 2) als für Glukose, wohingegen bei der fluorometrischen Bestimmung die Empfindlichkeit für Galakturonsäure und Glukose ähnlich hoch war (Daten nicht dargestellt). Bei der Bestimmung der Gesamt-Konzentration an reduzierenden Zuckern in der AWF wurde daher die fluorometrische Bestimmung verwendet, während bei der Bestimmung der Aktivität der Polygalakturonase (siehe 2.9.4) die spektrophotometrische Bestimmung angewendet wurde.

2.8.3 Bestimmung der Glukose-Konzentration

Die Bestimmung der Glukose-Konzentration in der AWF erfolgte in Anlehnung an die Methode von BLAKENEY & MATHESON (1984). Dabei wird Glukose durch die Glukose-Oxidase (EC 1.1.3.4) oxidiert, wodurch H_2O_2 entsteht, welches spektralphotometrisch bestimmt wird.

Die Reaktionsmischung enthielt 0,02 % (w/v) Glukose-Oxidase (Sigma G6125), 0,036 % (v/v) Peroxidase (horse radish peroxidase; Boehringer 108073), 0,2 % (w/v) Benzoesäure (Sigma B3250), 0,15 % (w/v) p-Hydroxybenzoesäure (Sigma H5376), 0,01 % (w/v) Aminoantipyrin (Sigma A4382) in 50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,0). Nach Zugabe von 20 μL AWF, die zuvor 5 min gekocht wurde, und 130 μL Aqua demin. zu 750 μL der Reaktionsmischung, wurde der Reaktionsansatz 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die spektralphotometrische Messung der Absorption bei $\lambda = 510$ nm. Anhand einer Standardreihe mit Glukose (100 - 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$) wurde die jeweilige Absorption in eine Glukose-Konzentration umgerechnet.

2.8.4 Bestimmung der Konzentration organischer Säuren

Die Bestimmung der Konzentration einzelner organischer Säuren in der AWF erfolgte mittels HPLC (Kontron Instruments, HPLC System 30; Säule: BioRad Aminex HPX-87H). Eine detailliertere Beschreibung der Vorgehensweise findet sich bei MAIER (1997).

2.8.5 Bestimmung der Osmolalität

Für die Bestimmung der Osmolalität von Blatthomogenaten wurden Blätter (ca. 0,5 g FM) in demineralisiertem Wasser (2 mL) gemörsert, anschließend zentrifugiert (10 min bei 7000 x g) und im Überstand wurde mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Gonotec) die Osmolalität bei RT gegen NaCl-Lösungen definierter Osmolalität gemessen. Bei Blättern mit BPI < 4 betrug die Osmolalität des Homogenats im Mittel 280 (± 20) mosmol kg^{-1} .

2.9 Bestimmung der Aktivität von Enzymen

2.9.1 Malat-Dehydrogenase

Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) wurde für die Ermittlung der symplasmatischen Kontamination der AWF sowohl in der AWF als auch in dem Homogenat der Blätter bestimmt. Die AWF wurde direkt nach der Zentrifugation verwendet. Das Homogenat der zentrifugierten Blätter (0,5 g Frischmasse in 2,5 mL 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,5) wurde direkt nach der Zentrifugation hergestellt und anschließend verwendet.

Die Bestimmung der Aktivität der MDH erfolgte nach der Methode von BERGEMEYER & BERNT (1974). Da Oxalacetat in wäßriger Lösung nicht sehr stabil ist, wird das Substrat der MDH direkt in der Meßküvette gebildet, indem L-Asparaginsäure (1250 μL 42 mM L-Asparaginsäure in

100 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,4) und α -Ketoglutar säure (25 μ L 60 mM α -Ketoglutar säure in 13 mM NaOH) durch GOT (25 μ L Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ≥ 180 U mg^{-1} , EC 2.6.1.1 (Sigma G2751)) innerhalb von 5 min zu Oxalacetat umgesetzt werden. Anschließend werden NADH (25 μ L 12 mM β - Na_2 -NADH (ICN Biochemicals 160051) in 119 mM NaHCO_3) und Probe (25 μ L AWF oder 25 μ L 1:5 verdünntes Blattthomogenat) gleichzeitig zugegeben. Die Absorptionsabnahme, bedingt durch die Umsetzung von Oxalacetat durch MDH zu Malat unter NADH-Verbrauch, wird spektralphotometrisch bei $\lambda = 340$ nm über die ersten 3 min bei RT gemessen.

2.9.2 Pektinmethylesterase

Die Aktivität der Pektinmethylesterase (PME; E.C. 3.1.1.11) wurde nach der Methode von HAGERMAN & AUSTIN (1986) bestimmt, indem spektralphotometrisch die Absorptionsabnahme eines pH-Indikators nach der Zugabe des Blattextrakts in die Pektin-Lösung gemessen wurde.

Die PME wurde aus dem Blattmaterial extrahiert, indem 0,5 g Blattfrischmasse in 2,5 mL 3 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,1 M NaCl homogenisiert wurde. Nach 30 min wurde das Homogenat zentrifugiert (4000 x g für 10 min) und der Überstand (nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 10 min) für die Messung direkt (ohne weitere Aufreinigung) verwendet.

Für die Bestimmung der Aktivität wurden 1 mL einer 0,5% (w/v) Citrus Pektin-Lösung (gelöst in Wasser bei 35°C und innerhalb von 24 h mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt), 100 μ L 0,01 % (w/v) Bromothymolblau in 3 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,5) und 50 μ L demineralisiertes Wasser in einer Küvette pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 μ L Extrakt gestartet. Die Absorptionsabnahme wurde bei $\lambda = 620$ nm bei Raumtemperatur über 2 min aufgezeichnet. Die Aktivität des Enzyms wird in Form der Absorptionsänderung pro Minute auf Frischmassebasis angegeben.

2.9.3 β -Galaktosidase

Die Bestimmung der Aktivität der β -Galaktosidase (EC 3.2.1.23) erfolgte in Anlehnung an die Methoden von IANNETTA et al. (1999) und KONNO et al. (1984). Das Prinzip besteht in der Bestimmung des durch Hydrolyse von p-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid freigesetzten p-Nitrophenols. Der Reaktionsansatz enthielt 50 μ L des Blattextraktes (0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7, 0,1 M NaCl, 2 % (v/v) Mercaptoethanol,) und 600 μ L 5 mM p-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (Sigma N1252) in 50 mM Na-Citrat-Puffer (pH 4,8). Nach 30 min bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 600 μ L 0,4 M NaCO_3 gestoppt und spektralphotometrisch bei $\lambda = 400$ das freigesetzte p-Nitrophenol gegen eine Standardreihe aus p-Nitrophenol gemessen.

Als eine Einheit der Aktivität der β -Galaktosidase wurde die Menge definiert, die 1 μ mol p-Nitrophenol pro Stunde bei pH 4,8 und RT freisetzt. Die Protein-Bestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) unter Verwendung einer Standardreihe aus Rinderserum-Eiweiß (BSA).

2.9.4 Polygalakturonase

Die Extraktion der Polygalakturonase (PG) erfolgte in Anlehnung an die Methode von ANDREWS & LI (1995). Dabei wurde das Blattmaterial (0,5 g FM) mittels Ultra-Turrax zerkleinert und in 4 mL 40 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,2), 0,1 M NaCl, 2 % (v/v) Mercaptoethanol und 5 % (w/v) PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon; Sigma P6755) homogenisiert. Nach 30 min bei 4 °C wurden die Proben zentrifugiert (4000 x g für 10 min) und der Überstand (nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 10 min) für die Bestimmung der Aktivität der PG verwendet.

Die Bestimmung der Aktivität der PG erfolgte in Anlehnung an die Methode von GROSS (1982), die allerdings keine Unterscheidung zwischen der *endo*- und der *exo*-Form der PG ermöglicht. Das Blattextrakt (20 µL) wird mit 250 µL Polygalakturonsäure (0,1 % (w/v) (Sigma P1879) in 40 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,2) und 30 µL demineralisiertem Wasser für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Von jeder Probe wurde ein Blindwert angesetzt, in dem das Blattextrakt vor der Substratzugabe 10 min gekocht wurde. Nach der Inkubation wurde die Konzentration an reduzierenden Zuckern mittels der spektralphotometrischen Cyanoacetamid-Methode (siehe 2.8.2) unter Verwendung einer Standardreihe von D-Galakturonsäure (Fluka 48280) bestimmt. Nach Subtraktion des Blindwertes konnte die Konzentration an reduzierenden Enden ermittelt werden, die durch die hydrolytische Spaltung der Polygalakturonsäure durch die PG gebildet wurden.

Eine Aktivitäts-Einheit der PG wurde definiert als die Menge, die die Bildung von 1 µmol reduzierender Enden pro Stunde bei pH 5,2 und 37 °C katalysiert.

2.9.5 Polyphenoloxidase (Catechol-Oxidase)

Die Aktivität der Polyphenoloxidase (PPO, Catechol-Oxidase; EC 1.14.18.1) wurde nach der Methode von RETIG & CHET (1974) bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt 800 µL Catechol-Lösung (0,5 % (w/v) in 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6,5) und 20 µL Blattextrakt (0,5 g FM in 2,5 mL 10 mM K-Phosphat-Puffer, pH 6,5). Die Absorptionzunahme wurde bei $\lambda = 400$ nm über 90 s nach Extraktzugabe bei RT gemessen.

Die Aktivität des Enzyms wird in Form der Absorptionsänderung pro Minute auf Proteinbasis angegeben. Die Protein-Bestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) unter Verwendung einer Standardreihe aus Rinderserum-Eiweiß (BSA).

2.10 Statistik

Die Standardabweichung eines arithmetischen Mittelwertes wird in den Tabellen sowie im Text als \pm Wert, und als vertikaler Strich in den Linien- wie auch Säulendiagrammen angegeben. Die ein- und mehrfaktorielle varianzanalytische Verrechnung der Versuche erfolgte mit dem Programm SAS 6.11 (SAS Inst. Inc, North Carolina). Für Mittelwertvergleiche wurde in der Regel der Tukey-Test sowie in einigen Fällen der Dunnett-Test verwendet. Die in den Tabellen und Abbildungen

angegebenen Grenzdifferenzen (MSD) wurden nach Varianzanalyse mit dem Tukey-Test für eine Irrtums-wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ berechnet. In den meisten Tabellen und Abbildungen werden die Mittelwerte der Behandlungen oder Varianten mit Buchstaben gekennzeichnet, wobei gleiche Buchstaben auf Nichtsignifikanz hinweisen.

Die Prüfung auf Zusammenhänge zwischen Variablen erfolgte mit Hilfe von Korrelationsrechnungen, die mit den Programmen Excel (Microsoft) oder Sigma Plot 4.0 (Jandel) durchgeführt wurden. Bei der Angabe von Korrelationskoeffizienten oder Bestimmtheitsmaßen und ebenso bei der Angabe von Ergebnissen des F-Tests stehen *, ** und *** für signifikant auf dem 5, 1 bzw. 0,1 % Niveau.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluß des Ca-Angebots der Nährlösung auf Wachstum und Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei Kartoffelpflanzen

3.1.1 Einfluß des Ca-Angebots auf das Wachstum

Zur Ermittlung einer Ca-Konzentration in der Nährlösung, bei der die Pflanzen sichtbare Ca-Mangelsymptome an den Blättern aufweisen, wurden Pflanzen der Sorte 'Adelheid' für 35 Tage bei Ca-Konzentrationen zwischen 3 μM und 30 mM CaCl_2 kultiviert. Die größte Frischmasse erreichten die Pflanzen bei einem Ca-Angebot im Bereich von 300 bis 3000 μM (Abb. 14). Ein höheres CaCl_2 -Angebot führte zu einer geringeren Frischmassenbildung. Ob dieser Rückgang der Frischmasse bei einem CaCl_2 -Angebot von über 3000 μM auf ein Überangebot von Ca oder Cl oder beider Elemente zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht. In dem Angebotsbereich von 300 bis 10 μM Ca nahm die Frischmasse mit abnehmendem Ca-Angebot gegen den Logarithmus der Konzentration linear ab.

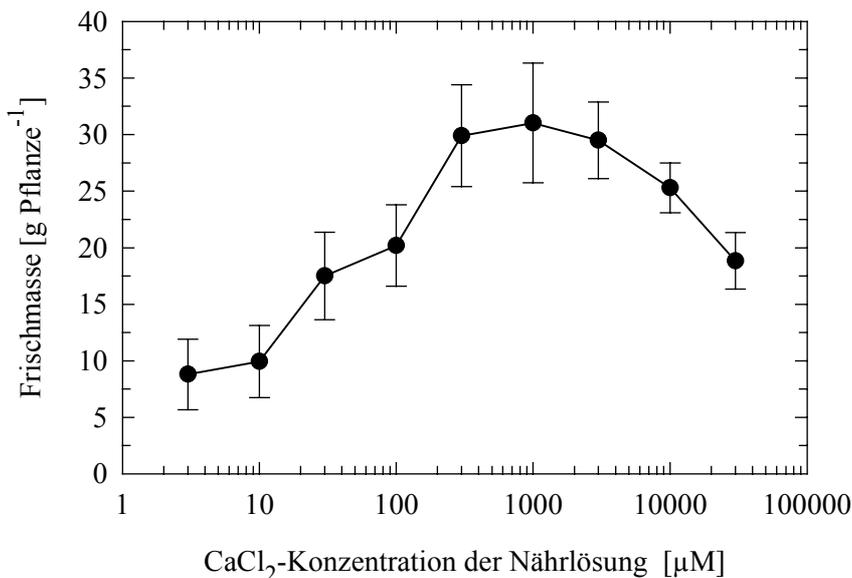


Abb. 14: Frischmasse von Kartoffelpflanzen der Sorte 'Adelheid' nach 35 d bei unterschiedlich hoher CaCl_2 -Konzentration in der Nährlösung ($n = 3$)

Ca-Mangelsymptome zeigten nur Pflanzen, die bei einem Ca-Angebot $\leq 30 \mu\text{M}$ kultiviert wurden (Abb. 15). Die geringere Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen der Pflanzen bei 3 μM Ca-Angebot im Vergleich zu 10 μM bei ähnlich hoher Frischmasse läßt sich dadurch erklären, daß im Gegensatz zu 10 μM Ca-Angebot bei 3 μM die Sproßspitze der Pflanzen nach ca. 20 Tagen deutlich geschädigt war, so daß an dem Haupttrieb keine weiteren Blätter, wohl aber verstärkt Seitentriebe ausgebildet wurden.

In den weiteren Versuchen wurde als Kontrollvariante stets ein Ca-Angebot von 1000 μM verwendet und als niedrigstes Ca-Angebot 30 μM .

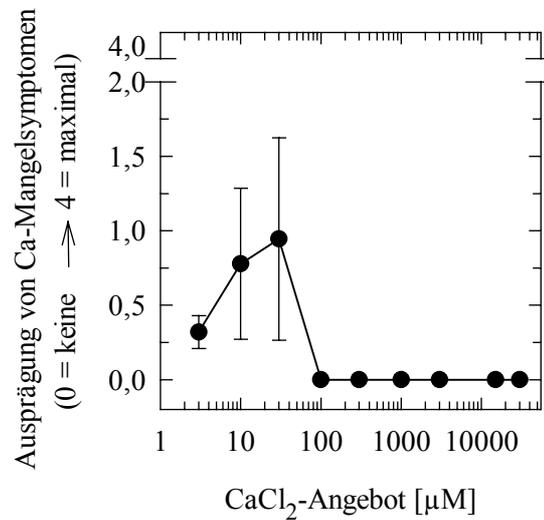


Abb. 15: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) an Blättern von Kartoffelpflanzen der Sorte 'Adelheid' nach 35 d bei unterschiedlich hoher CaCl_2 -Konzentration in der Nährlösung ($n = 3$)

3.1.2 Ausprägung von Ca-Mangelercheinungen

Erste makroskopische Unterschiede zwischen Blättern der Kontrollvariante und der Ca-Mangelvariante äußerten sich in Form von Blattrandaufhellungen der Mangelvariante. Diese Blattrandaufhellung war als wenige mm schmaler, gleichmäßig heller Saum, scharf vom grünen Gewebe abgesetzt, zu erkennen (Abb. 16).

Nach dem Auftreten von Blattrandaufhellungen ließ sich eine zunehmende Nekrotisierung dieses Gewebes beobachten, das dabei schwarz wurde (Abb. 17). Aufhellungen, Verschwärzungen und Nekrotisierung der Blattränder traten sowohl an der Blattunterseite wie auch an der Blattoberseite auf. Im weiteren Verlauf konnte auch eine Verbräunung und Verschwärzung der Adern vom Blattrand her beobachtet werden. Selten wurden auch im Interkostalbereich in der Nähe der Blattrippe punktförmige Nekrosen und Verschwärzungen beobachtet.

Zwischen der Stärke der Nekrotisierung der Blattränder und dem Trockensubstanzgehalt des Blattgewebes, ließ sich nicht bei Betrachtung der ganzen Blattpiedern, wohl aber bei größerer räumlicher Auflösung ein Zusammenhang feststellen. So korrelierte die mit Hilfe der verwendeten Bonitur eingeschätzte Stärke der Nekrotisierung der Blattränder bei dem niedrigsten Ca-Angebot (30 μM) sehr eng positiv mit dem Trockensubstanzgehalt dieser Blattränder (Abb. 18). Der Zusammenhang zwischen der Boniturnote und dem Trockensubstanzgehalt bei gemeinsamer Betrachtung aller verwendeten Ca-Stufen (1000 μM , 60 μM sowie 30 μM Ca) war wesentlich schwächer (nicht dargestellt). Der Grund für diese schlechtere Beziehung lag in der gegenläufigen Ten-

denz, da bei Blättern ohne Nekrosen mit abnehmendem Ca-Angebot geringere Trockensubstanzgehalte vorlagen. Im Vergleich zwischen 30 μM und 1000 μM Ca-Angebot waren diese Unterschiede im Trockensubstanzgehalt für physiologisch gleich alte Blätter in jedem Fall signifikant (Abb. 19).

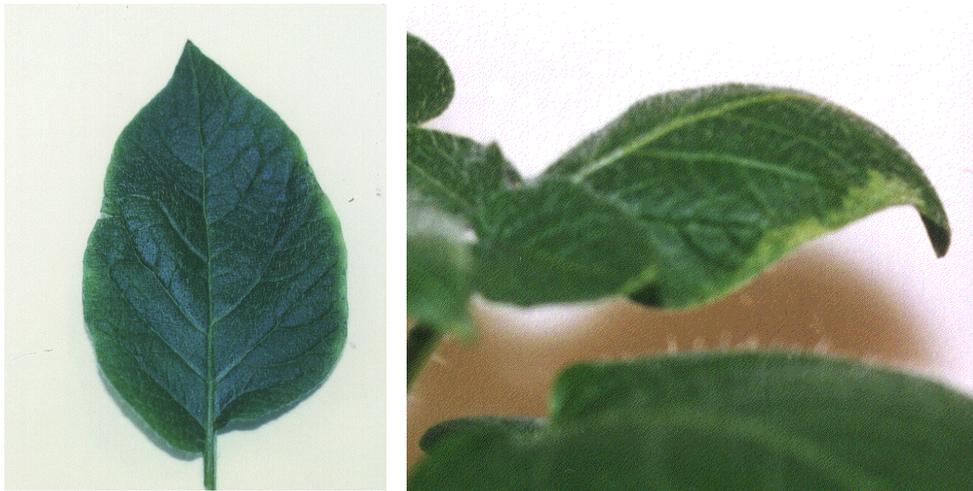


Abb. 16: Blattrandaufhellungen an terminaler Blattfieder von Kartoffelpflanzen der Sorte 'Adelheid' nach 18 - 20 d bei 30 μM Ca-Angebot der Nährlösung



Abb. 17: Ca-Mangelsymptome (Blattrandnekrosen) an Fiederblättern der Kartoffelsorte 'Adelheid' nach 28 - 32 d bei 30 μM Ca-Angebot der Nährlösung

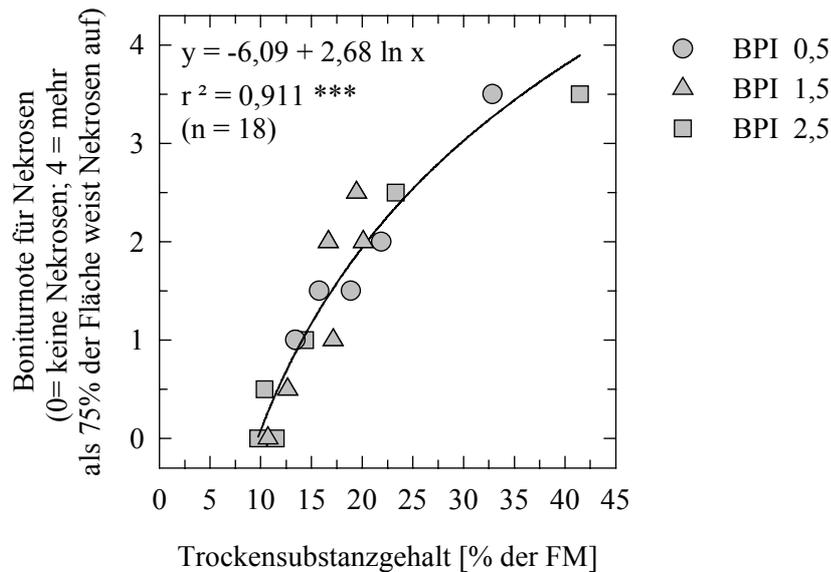
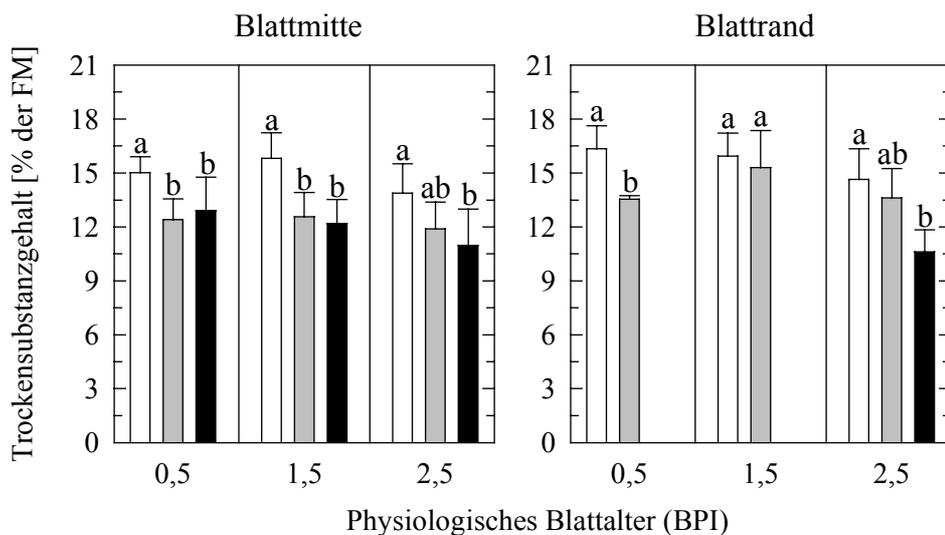


Abb. 18: Beziehung zwischen der Boniturnote für Ca-Mangel-Nekrosen der Ränder unterschiedlich alter Blätter und deren Trockensubstanzgehalt von Kartoffelpflanzen der Sorte 'Adelheid' bei 30 μM Ca-Angebot in der Nährlösung



Ca-Angebot der Nährlösung: 1000 μM 60 μM 30 μM

F-Test: Ca **, Blattbereich n.s., BPI **, Interaktionen n.s.

Abb. 19: Trockensubstanzgehalt symptomfreier Blattbereiche der Blattmitte (ohne Blattrippe) und des Blattrandes junger Kartoffelblätter (BPI 0,5, 1,5 sowie 2,5) der Sorte 'Adelheid' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung ($n = 6$, außer bei Blattrand BPI 2,5 30 μM Ca: $n = 2$; Mittelwertvergleich innerhalb eines physiologischen Blattalters eines Blattbereiches mit Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Bei einigen Pflanzen konnten Blattverformungen beobachtet werden. Dabei rollte sich der Blattrand zur Blattunterseite ein und der Bereich der Blattspitze bog sich nach unten (Abb. 17). In dem verformten Blatt war das Gewebe dunkelgrün, steif und von glänzender Oberfläche.

Ein Umknicken oder eine Erweichung des Stengels von Pflanzen bei niedrigem Ca-Angebot wurde während der gewählten Versuchszeiträume (bis zu 49 d) nie beobachtet.

Die Wurzeln von Ca-Mangelpflanzen waren meist bräunlich verfärbt und bestanden im Vergleich zu Wurzeln von Kontrollpflanzen zu einem größeren Anteil aus kurzen Wurzeln mit starker Seitenverzweigung.

3.2 Genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz

Mit dem Ziel Genotypen zu identifizieren, die sich deutlich in ihrer Ca-Effizienz unterscheiden, wurde in einem Versuch, dessen Ergebnisse im Anhang (7.3) dargestellt sind, ein weites Spektrum an *Solanum*-Genotypen (acht Wildarten, drei Primitivformen und fünf Kultursorten der Kartoffel) auf ihre Ca-Effizienz hin untersucht. Als Kriterien der Ca-Effizienz wurden, ähnlich wie in den Arbeiten von ENGLISH & MAYNARD (1981) und GIORDANO et al. (1982), das Wachstum und die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei niedrigem Ca-Angebot in der Nährlösung verwendet. Obwohl ein weites Spektrum an *Solanum*-Genotypen auf die Ca-Effizienz untersucht wurde, ließ sich in der Rangfolge der Ca-Effizienz sowohl am oberen Ende (hohe Ca-Effizienz: 'Bintje') als auch am unteren Ende (geringe Ca-Effizienz: 'Ijsselster') jeweils eine Kultursorte finden. Daher wurde in den weiteren Versuchen nur mit Kultursorten der Kartoffel gearbeitet. Bei den untersuchten *Solanum*-Genotypen zeigte sich, daß die genotypischen Unterschiede in der Nutzung des Ca-Angebots der Nährlösung zur Trockenmassen-Bildung im wesentlichen auf einer effizienten Aufnahme von Ca (Aufnahme-Effizienz) und weniger auf einer effizienten Verwertung des aufgenommenen Ca (Verwertungs-Effizienz) beruhten (Tab. 23).

3.2.1 Vergleich der Ca-Effizienz von sechs Kartoffelsorten bei unterschiedlichen klimatischen Bedingungen

Die dem folgenden Versuch zugrunde liegende Frage war, inwiefern unterschiedliche klimatische Bedingungen einen Einfluß auf die Ca-Effizienz von Kartoffelsorten haben und ob Interaktionen zwischen Sorten und Umwelt festgestellt werden können. Die im vorherigen Versuch (7.3) schon untersuchten Sorten 'Bintje' (Ca-effizient), 'San Michele' und 'Ijsselster' (Ca-ineffizient) wurden mit drei weiteren Sorten ('Adelheid', 'Arnika', 'Ultimus') in parallelen Nährlösungsversuchen unter Gewächshaus- sowie Klimakammer-Bedingungen auf ihre Ca-Effizienz untersucht. Als Kriterien für die Ca-Effizienz wurden, wie in den Arbeiten von ENGLISH & MAYNARD (1981) und GIORDANO et al. (1982), die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und das Wachstum bei niedrigem Ca-Angebot in der Nährlösung in gleicher Weise gewichtet.

Die Gewächshauspflanzen bildeten innerhalb der Kulturdauer von 30 Tagen im Sortenmittel bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) 3 % mehr, hingegen bei niedrigem Ca-Angebot (30 μM) 20 % weniger Trockenmasse als die Klimakammerpflanzen. Allerdings war für die einzelnen Sorte weder bei hohem noch bei niedrigem Ca-Angebot dieser Unterschied in der gebildeten Trockenmasse zwischen den beiden Umwelten absicherbar.

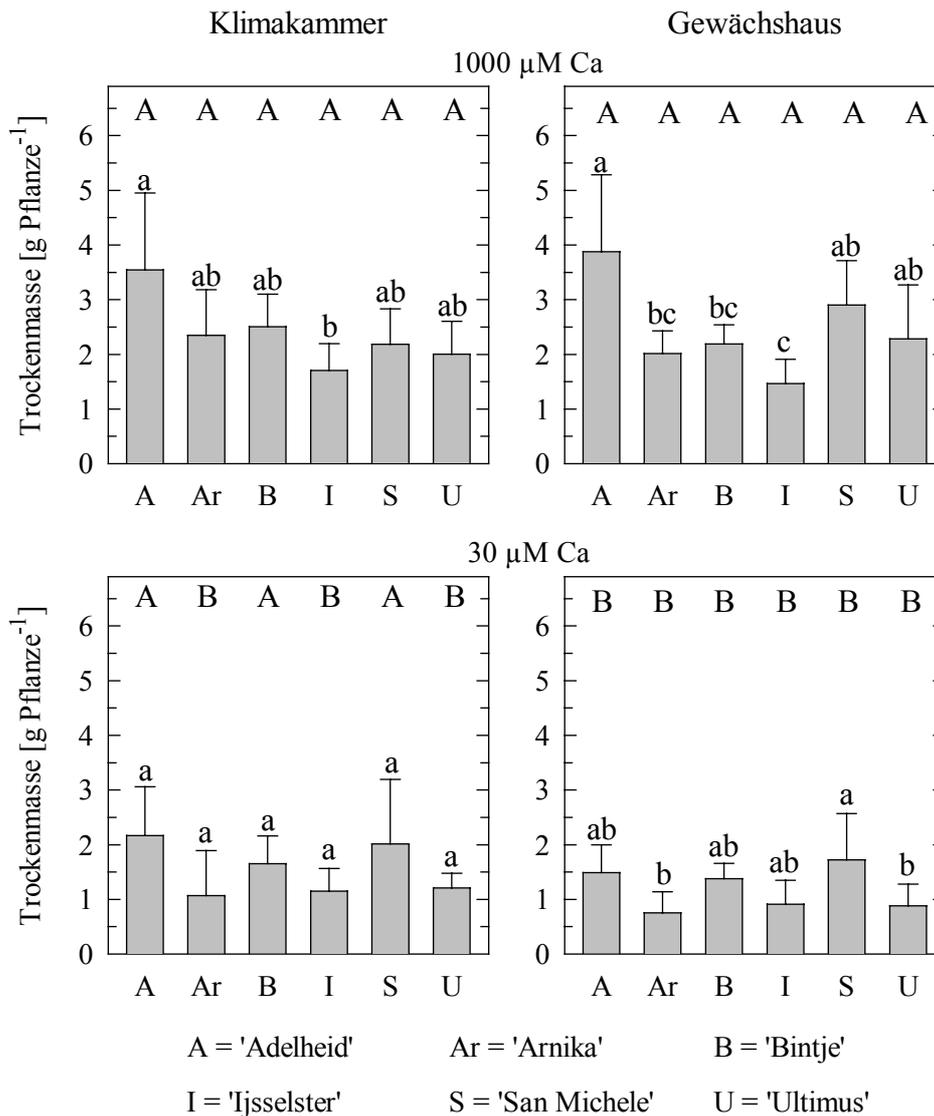
Sowohl unter Gewächshaus-Bedingungen als auch unter Klimakammer-Bedingungen bildeten die Sorten bei 30 μM Ca-Angebot im Vergleich zu 1000 μM eine signifikant oder tendenziell niedrigere Trockenmasse (Abb. 20). Im Sortenmittel erreichten bei niedrigem Ca-Angebot die Klimakammerpflanzen 65 % und die Gewächshauspflanzen 52 % der Trockenmasse, die jeweils bei hohem Ca-Angebot gebildet wurde.

Bei hohem Ca-Angebot erreichte unter beiden Umweltbedingungen die Sorte 'Adelheid' jeweils die größte Trockenmasse und die Sorte 'Ijsselster' die niedrigste (Abb. 20). Bei niedrigem Ca-Angebot bildeten die Sorten 'Adelheid', 'Bintje' und 'San Michele' eine ähnlich hohe Trockenmasse, und zwar sowohl unter Gewächshaus-Bedingungen als auch unter Klimakammer-Bedingungen (Abb. 20). Unter beiden Umweltbedingungen erreichten auch die Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' bei niedrigem Ca-Angebot eine ähnlich hohe Trockenmasse, die aber signifikant oder tendenziell niedriger war als die Trockenmasse der drei anderen Sorten 'Adelheid', 'Bintje' und 'San Michele' (Abb. 20).

Die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) bei 30 μM Ca-Angebot der Nährlösung war, mit Ausnahme der Sorten 'Bintje' und 'San Michele', bei den Klimakammerpflanzen signifikant ('Arnika', 'Ijsselster', 'Ultimus') oder tendenziell ('Adelheid') stärker als bei den Gewächshauspflanzen (Abb. 21). Die Sorten 'Bintje' und 'San Michele' zeigten unter beiden Umweltbedingungen annähernd die gleiche Stärke von Ca-Mangelsymptomen.

In der Klimakammer zeigte die Sorte 'Adelheid', gefolgt von der Sorte 'San Michele', die stärkste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und die Sorte 'Bintje' die geringste (Abb. 21). Im Gewächshaus wies 'San Michele', gefolgt von der 'Adelheid', die stärkste Ausprägung auf und die Sorte 'Arnika' zeigte die geringste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 21). Die Reihenfolge der Sorten hinsichtlich der Ausprägungsstärke von Ca-Mangelsymptomen war somit unter den beiden Umweltbedingungen nicht gleich.

Wurde nun anhand des absoluten Wachstums bei niedrigem Ca-Angebot (Abb. 20) und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 21) eine Einschätzung der Ca-Effizienz der Sorten vorgenommen, so konnte unter Klimakammer-Bedingungen 'Bintje' als die Sorte mit der höchsten Ca-Effizienz identifiziert werden. Unter Gewächshaus-Bedingungen zeigte die Sorte 'Bintje' zumindest eine höhere Ca-Effizienz als die beiden Sorten 'Adelheid' und 'San Michele'. Die Ca-



F-Test: Umwelt n.s., Ca-Angebot ***, Sorte ***,
 Ca-Angebot x Sorte *, weitere Interaktionen n.s.

Abb. 20: Trockenmasse von sechs Kartoffelsorten nach 30 d Kultur in der Klimakammer oder im Gewächshaus bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot (n = 6; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb einer Umwelt und eines Ca-Angebots und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angebotsstufen innerhalb einer Umwelt und einer Sorte jeweils nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Effizienz der Sorte 'Bintje' im Vergleich zu den Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' konnte unter Gewächshaus-Bedingungen nicht eingeschätzt werden, da hier eine Sorte mit hohem Wachstum und vergleichsweise starker Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen mit Sorten verglichen wird, die ein geringeres Wachstum und eine geringere Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen aufwiesen. Aus dem gleichen Grund konnte keine Aussage zu der Ca-Effizienz der Sorten 'Adelheid' und 'San Michele' im Vergleich zu den Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' unter Gewächshaus-Bedingungen gemacht werden.

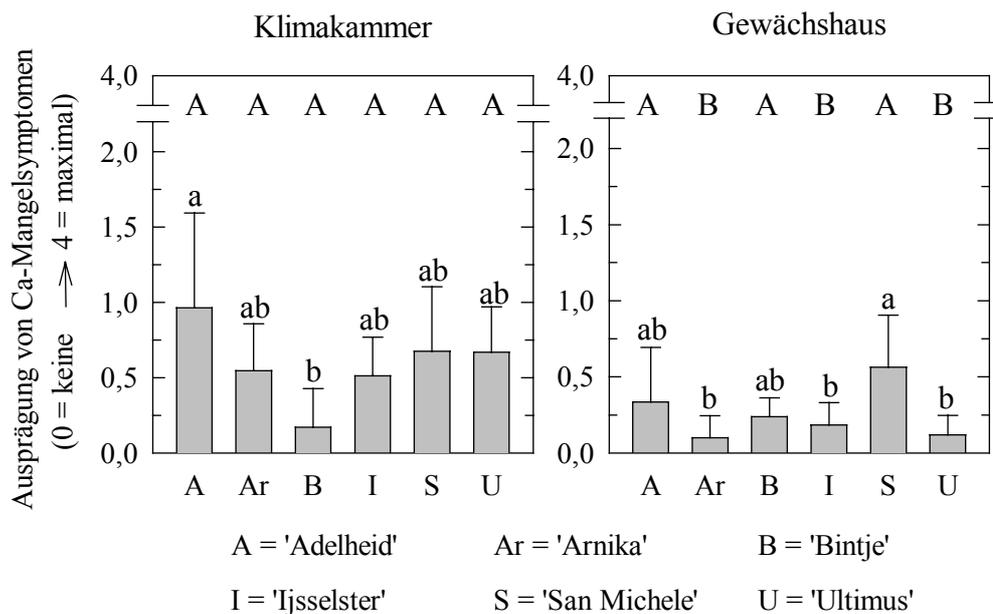
Wurde die Ca-Effizienz jeweils von den Sorten mit ähnlich hohem Wachstum eingeschätzt, so ergaben sich in der Klimakammer folgende Reihenfolgen abnehmender Ca-Effizienz:

'Bintje' > 'San Michele' > 'Adelheid' sowie 'Ijsselster' > 'Arnika' > 'Ultimus'

Im Gewächshaus ergab sich die entsprechende Reihenfolgen wie folgt :

'Bintje' > 'Adelheid' > 'San Michele' sowie 'Arnika' > 'Ultimus' > 'Ijsselster'.

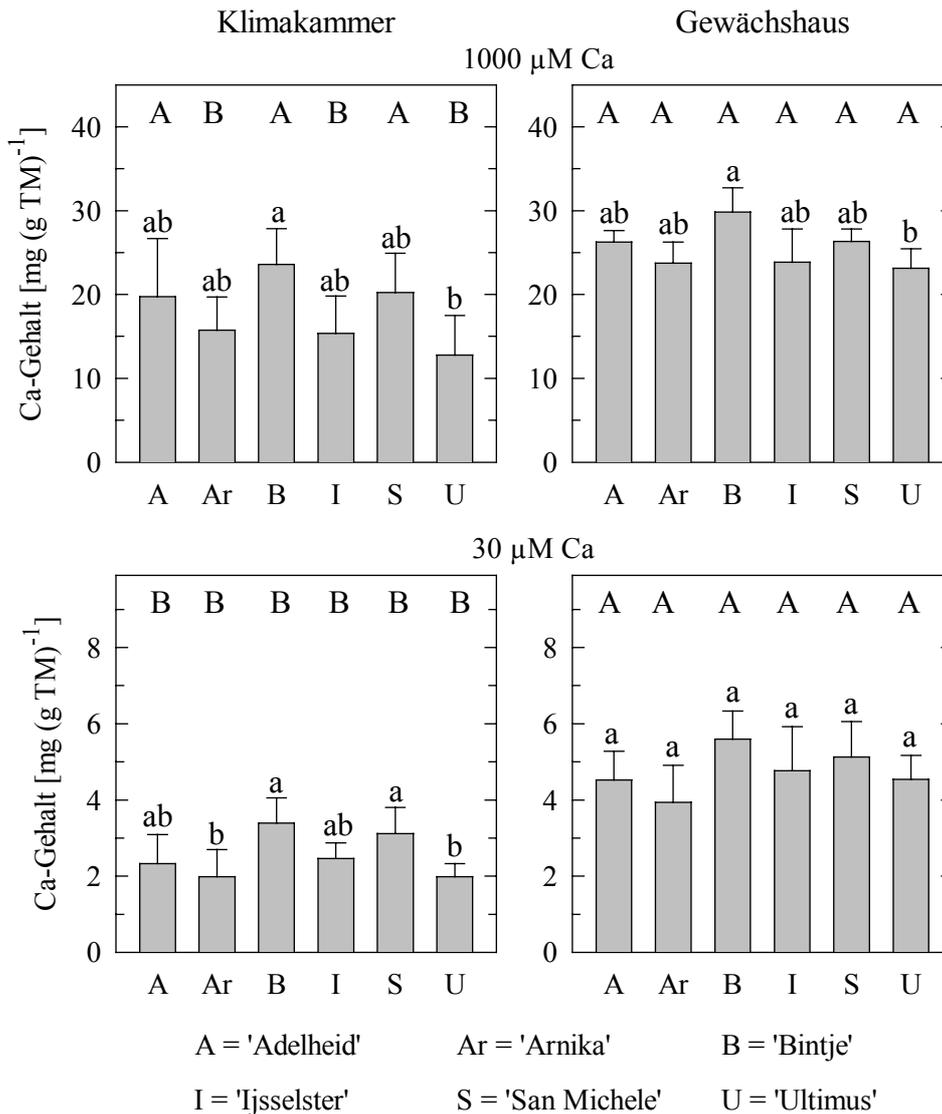
Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' absolut gesehen nur sehr gering.



F-Test: Umwelt ***, Sorte **, Interaktionen n.s.

Abb. 21: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) von sechs Kartoffelsorten nach 30 d Kultur in der Klimakammer oder im Gewächshaus bei 30 μM Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 6; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Umwelt zwischen den Sorten und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Sorte zwischen den beiden Umwelten jeweils nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Im Anbetracht der deutlichen Unterschiede in der Stärke der Symptomausprägung zwischen Gewächshauspflanzen und Klimakammerpflanzen (Abb. 21) waren die Ca-Gehalte der Blätter von besonderem Interesse. Bei 1000 μM Ca-Angebot wiesen die Blätter der Gewächshauspflanzen signifikant ('Arnika', 'Ijsselster', 'Ultimus') oder tendenziell ('Adelheid', 'Bintje', 'San Michele') höhere Ca-Gehalte auf als die der Klimakammerpflanzen (Abb. 22). Im Mittel über alle Sorten waren die Blatt-Ca-Gehalte unter Gewächshaus-Bedingungen um 46 % höher als unter Klimakammer-Bedingungen. Bei 30 μM Ca-Angebot wiesen die Blätter der Gewächshauspflanzen aller Sorten signifikant höhere Ca-Gehalte auf als die Blätter der Klimakammerpflanzen (Abb. 22). Im



F-Test: Umwelt ***, Ca-Angebot ***, Sorte ***, Umwelt x Ca-Angebot ***,
 Sorte x Ca-Angebot ***, andere Interaktionen n.s.

Abb. 22: Ca-Gehalte der Blätter von sechs Kartoffelsorten nach 30 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung bei Kultur in der Klimakammer oder im Gewächshaus (n = 6; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb einer Umwelt und eines Ca-Angebots und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Umwelten innerhalb einer Sorte und eines Ca-Angebots jeweils nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Sortenmittel waren die Blatt-Ca-Gehalte im Gewächshaus um 90 % erhöht. Im Gegensatz zu den Unterschieden in den Ca-Gehalten der Blätter waren die Unterschiede in den durchschnittlichen Ca-Gehalten der gesamten Pflanzen unter den beiden Umweltbedingungen wesentlich geringer. So waren bei hohem Ca-Angebot (1000 µM) die Ca-Gehalte der Gesamtpflanzen unter Gewächshaus-Bedingungen tendenziell sogar niedriger als unter Klimakammer-Bedingungen (Tab. 12). Bei niedrigem Ca-Angebot waren die Ca-Gehalte der Gesamtpflanzen unter Gewächshaus-Bedingungen im Sortenmittel nur 26 % höher als unter Klimakammer-Bedingungen. Unter Be-

rücksichtigung der gebildeten Trockenmasse (Abb. 20) und der Ca-Gehalte der Gesamtpflanze (Tab. 12) ergab sich, daß die Ca-Aufnahme (mg pro Pflanze) der Gewächshauspflanzen bei hohem Ca-Angebot tendenziell niedriger (im Sortenmittel 25 % niedriger) und bei niedrigem Ca-Angebot ähnlich hoch (im Sortenmittel 3 % höher) war wie die der Klimakammerpflanzen (Daten nicht dargestellt). Die unter Gewächshaus-Bedingungen erhöhten Blatt-Ca-Gehalte resultierten somit nicht aus einer entsprechend erhöhten Ca-Aufnahme. Vielmehr zeigte sich unter den beiden Umweltbedingungen eine unterschiedliche Verteilung des aufgenommenen Ca innerhalb der Pflanze sowohl bei hohem wie bei niedrigem Ca-Angebot (Abb. 23).

Tab. 12: Ca-Gehalt der Gesamtpflanze von sechs Kartoffelsorten nach 30 d Kultur in der Klimakammer (KK) oder im Gewächshaus (GH) bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung (n = 6; MSD-Werte jeweils nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Ca-Angebot	Umwelt	Ca-Gehalt der Pflanzen [mg Ca (g TM) ⁻¹]						MSD
		'Adelheid'	'Arnika'	'Bintje'	'Ijsselster'	'San Michele'	'Ultimus'	
1000 µM	KK	14,91	13,36	18,14	13,06	14,88	11,30	7,30
	GH	12,96	12,05	12,79	11,50	12,05	10,55	1,95
	MSD	3,77	2,30	5,63	3,36	2,54	2,91	
30 µM	KK	1,98	1,65	2,27	1,88	2,25	2,10	0,99
	GH	2,62	2,12	2,95	2,22	2,93	2,47	0,78
	MSD	0,54	0,67	0,47	0,82	0,42	0,93	

Aus Abb. 23 geht hervor, daß bei 30 µM Ca-Angebot bei den Gewächshauspflanzen im Vergleich zu den Klimakammerpflanzen von der aufgenommenen Ca-Menge ein größerer Anteil in den Blättern (72 - 82 % gegenüber 41 - 61 %) und ein geringerer Anteil in den Stengeln (16 - 23 % gegenüber 34 - 54 %) lokalisiert war. Hingegen war der Anteil der Blatt-Trockenmasse an der Gesamt-Trockenmasse bei den Gewächshauspflanzen mit 41 - 46 % ähnlich hoch wie bei den Klimakammerpflanzen mit 38 - 50 % (Abb. 24). Die unterschiedliche Verteilung des aufgenommenen Ca in die verschiedenen Pflanzenfraktionen von Gewächshauspflanzen und Klimakammerpflanzen kann daher nicht auf eine entsprechend unterschiedliche Verteilung der Trockenmasse der Pflanzenfraktionen zurückgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen vielmehr eine höhere Translokation des aufgenommenen Ca in die Blätter unter Gewächshaus-Bedingungen im Vergleich zu Klimakammer-Bedingungen. Dabei wurde unter Gewächshaus-Bedingungen im Sortenmittel bei hohem Ca-Angebot mit 85 % ein größerer Anteil der aufgenommenen Ca-Mengen in die Blätter verlagert als bei niedrigem Ca-

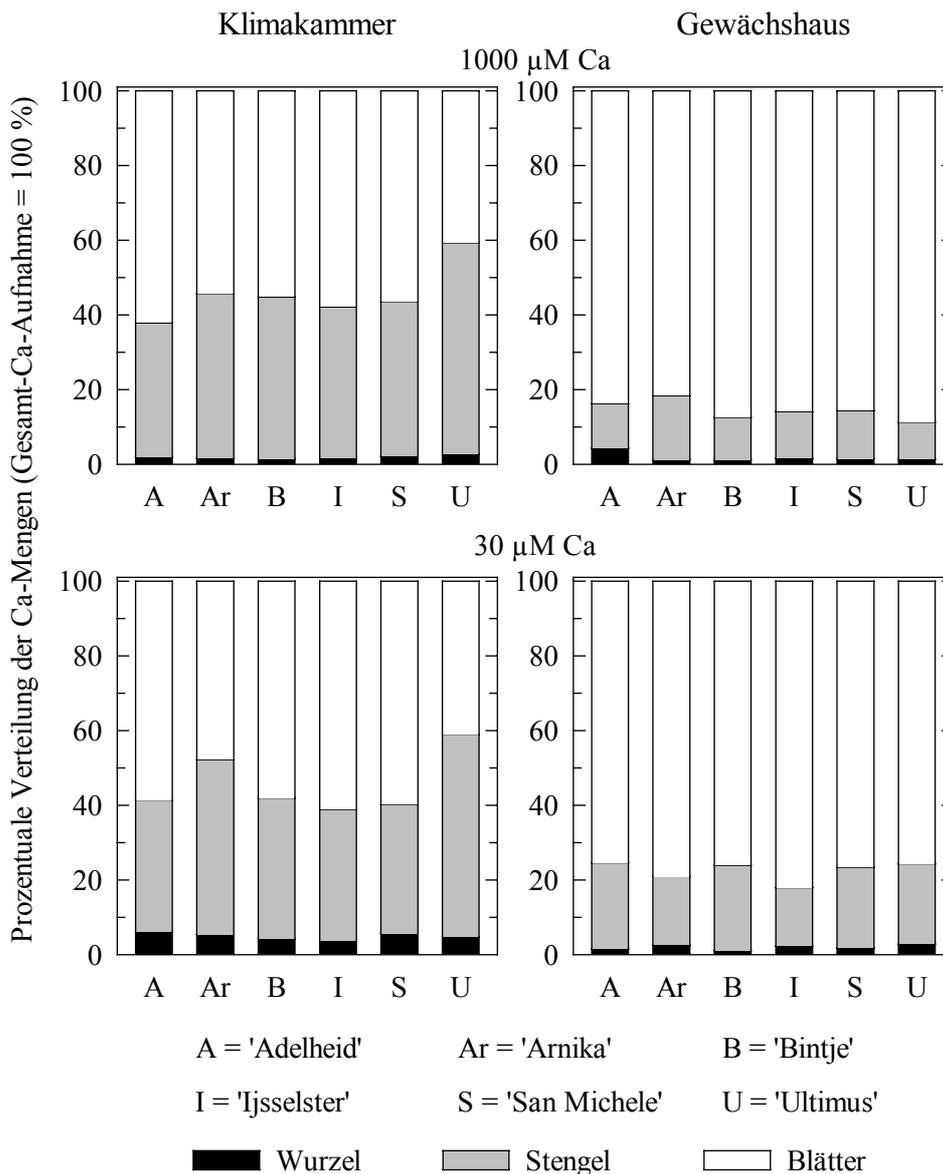


Abb. 23: Prozentuale Verteilung der aufgenommenen Ca-Mengen in Blättern, Stengel und Wurzeln bei sechs Kartoffelsorten nach 30 d Kultur im Gewächshaus oder in der Klimakammer bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung (n = 6)

Angebot mit 77 % (bei gleich hohem prozentualen Anteil der Blatt-Trockenmasse an der Gesamt-Trockenmasse) (Abb. 23, Abb. 24). Unter Klimakammer-Bedingungen war der prozentuale Anteil der Blatt-Ca-Mengen an der Gesamt-Menge bei hohem und niedrigem Ca-Angebot mit jeweils 54 % (im Sortenmittel) gleich hoch (Abb. 23, Abb. 24). Bei den Sorten 'Adelheid', 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' gingen die höheren Blatt-Ca-Gehalte der Gewächshauspflanzen im Vergleich zu den Klimakammerpflanzen (Abb. 22) einher mit einer verminderten Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 21). Beispielhaft ist in Abb. 25 für die Sorte 'Adelheid' die negative Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und den Blatt-Ca-Gehalten bei 30 µM Ca-Angebot unter beiden Umweltbedingungen wiedergegeben. Signifikante, lineare Bezie-

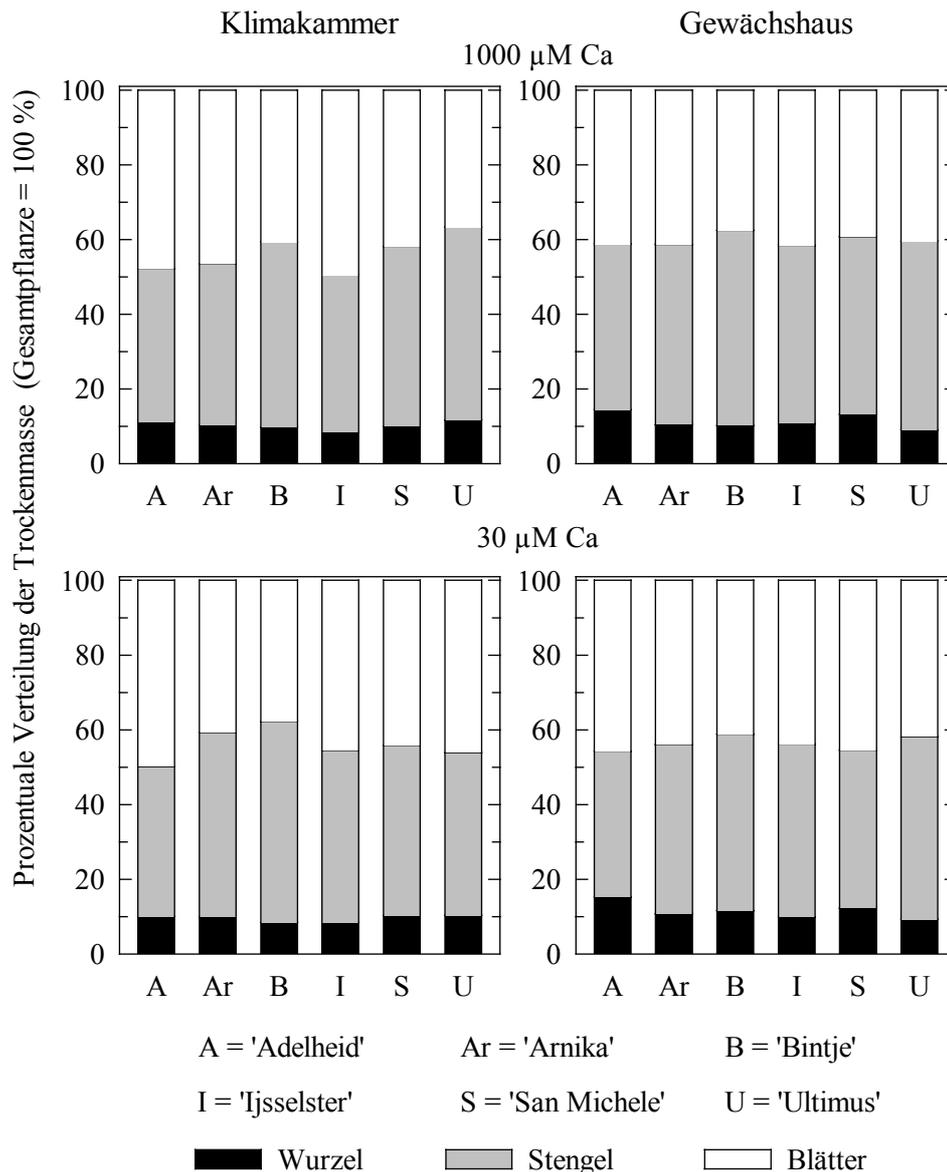


Abb. 24: Prozentuale Verteilung der gebildeten Trockenmasse in Blättern, Stengel und Wurzeln bei sechs Kartoffelsorten nach 30 d Kultur im Gewächshaus oder in der Klimakammer bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung (n = 6)

hungen zwischen der Symptomausprägung und den Blatt-Ca-Gehalten unter beiden Umweltbedingungen bestanden auch bei den Sorten 'Arnika' ($r^2=0,375$ *), 'Ijsselster' ($r^2=0,416$ *), und 'Ultimus' ($r^2=0,656$ ***) (nicht dargestellt). Demgegenüber bestand zwischen der Symptomausprägung und den Ca-Gehalten der Blätter bei den Sorten 'Bintje' ($r^2=0,011$ n.s.) und 'San Michele' ($r^2=0,031$ n.s.) keine enge Beziehung, wie beispielhaft für die Sorte 'Bintje' in Abb. 25 wiedergegeben. Bei diesen beiden Sorten zeigten die Pflanzen trotz unterschiedlicher Blatt-Ca-Gehalte (Abb. 22) unter beiden Umweltbedingungen eine ähnliche Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 21). Zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und den Blatt-Gehalten aller sechs Sorten bestand bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Umweltbedingungen eine negative, signifikante Beziehung

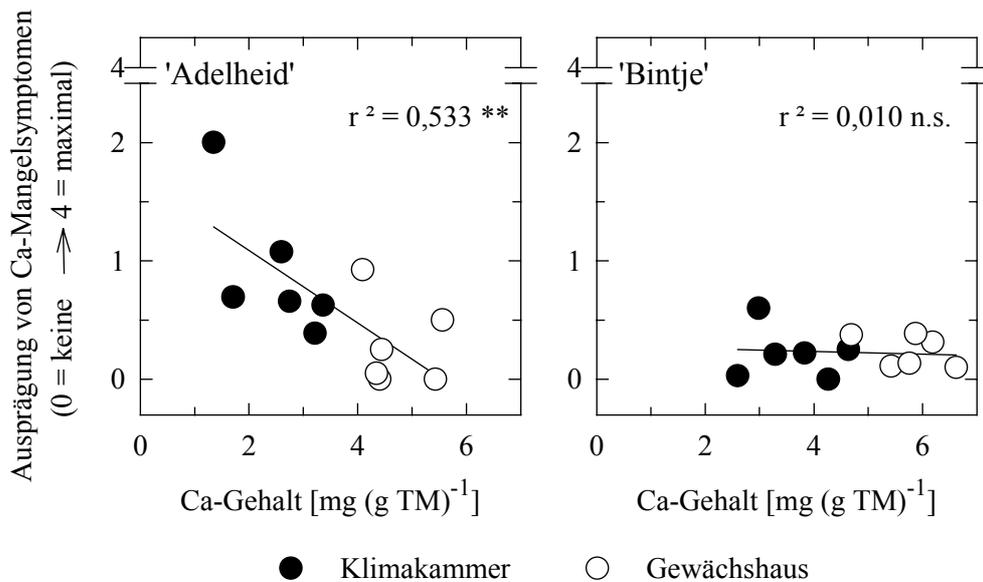


Abb. 25: Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und den Ca-Gehalten der Blätter der Kartoffelsorte 'Adelheid' und 'Bintje' nach 30 d Kultur im Gewächshaus oder in der Klimakammer bei 30 μM Ca-Angebot in der Nährlösung ($n = 12$)

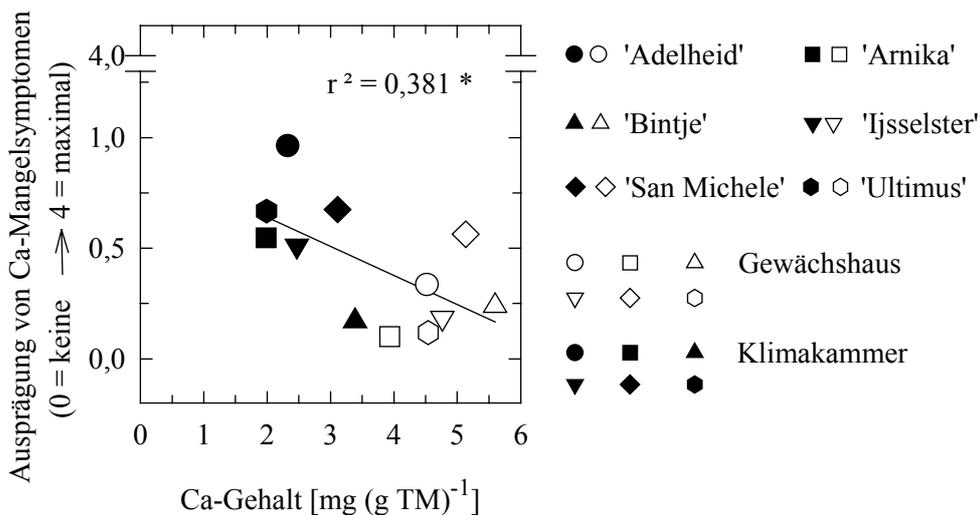


Abb. 26: Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und den Ca-Gehalten der Blätter von sechs Kartoffelsorten nach 30 d Kultur im Gewächshaus oder in der Klimakammer bei 30 μM Ca-Angebot in der Nährlösung ($n = 12$)

(Abb. 26), wobei der Erklärungswert für die unterschiedliche Symptomausprägung durch die Ca-Gehalte der Blätter aber nur 38 % betrug.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

- Bei niedrigem Ca-Angebot (30 μM) ergab sich hinsichtlich der Höhe der gebildeten Trockenmasse die gleiche Reihenfolge der Sorten im Gewächshaus wie in der Klimakammer. Dabei bildeten die Sorten 'Adelheid', 'Bintje' und 'San Michele' eine höhere Trockenmasse als die Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus'.
- Die Stärke der Ca-Mangelsymptome war bei 30 μM Ca-Angebot im Gewächshaus, mit Ausnahme der Sorten 'Bintje' und 'San Michele' signifikant oder tendenziell geringer als in der Kli-

makammer. Die Reihenfolge der Sorten hinsichtlich der Stärke der Ca-Mangelsymptome war unter den beiden Klimabedingungen verschieden.

- Die Ca-Gehalte der Blätter waren bei den Gewächshauspflanzen sowohl bei hohem als auch bei niedrigem Ca-Angebot in der Nährlösung signifikant oder tendenziell höher als bei den Klimakammerpflanzen. Ein wesentlicher Grund lag in der größeren Translokation der aufgenommenen Ca-Mengen in die Blätter unter Gewächshaus-Bedingungen im Vergleich zu Klimakammer-Bedingungen.
- Die Frage, ob Sortenunterschiede in der Ca-Effizienz unter verschiedenen klimatischen Bedingungen stabil sind, ließ sich für die Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' positiv und für die Sorte 'San Michele' negativ beantworten. Eine diesbezüglich eindeutige Aussage ließ sich für die Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' nicht machen, wenngleich sich andeutete, daß auch hier die Klimabedingungen einen Einfluß auf die genotypische Ca-Effizienz haben.
- Der Unterschied in der Ca-Effizienz zwischen 'Adelheid' und 'Bintje' wurde von den klimatischen Gegebenheiten nur in sofern beeinflusst, als der Unterschied in der Klimakammer stärker als im Gewächshaus ausgeprägt war.

3.2.2 Untersuchung der Ca-Effizienz von vier Kartoffelsorten

In einem weiteren Versuch wurde die unterschiedliche Ca-Effizienz der Sorten 'Adelheid', 'Bintje', 'San Michele' und 'Ultimus' bei vier Ca-Angeboten in Nährlösung (1000 μM (Kontrolle), 90 μM , 60 μM und 30 μM) unter Klimakammer-Bedingungen untersucht. Aus dem in Abb. 27 dargestellten Wachstumsverlauf der Pflanzen bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot geht hervor, daß bei keiner Sorte die Pflanzen nach 8 Tagen sowie nach 13 Tagen bei niedrigem Ca-Angebot (90, 60, 30 μM) eine signifikant niedrigere Frischmasse im Vergleich zur Kontrolle (1000 μM) aufwiesen. Nach 28 Tagen wurden bei 90 μM Ca-Angebot von allen vier Sorten eine ähnliche hohe Frischmasse wie bei der Kontrollvariante von 1000 μM Ca erreicht. Bei der Sorte 'San Michele' deutet sich an, daß die Pflanzen bei 90 μM eine größere Frischmasse als bei 1000 μM Ca erreichten. Allerdings besaßen zu Versuchsbeginn die Pflanzen der Sorte 'San Michele' der 90 μM Variante mit durchschnittlich 1,6 g Pflanze⁻¹ eine deutlich höhere Frischmasse als die Pflanzen bei 1000 μM (1,1 g Pflanze⁻¹) (Abb. 27). Betrachtet man statt der Frischmasse die mittlere relative Wachstumsrate, die der Steigung eines dargestellten Zeitverlaufs der Frischmassenbildung entspricht (unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Basis des Logarithmus), so bestand auch bei der Sorte 'San Michele' kein Unterschied mehr zwischen den Pflanzen bei 90 μM und bei 1000 μM Ca (nicht dargestellt). Bei 60 μM erreichten die Sorten eine Frischmasse, die 60 % ('Adelheid') bis 93 % ('San Michele') der Frischmasse der jeweiligen Kontrollvariante entsprach. Ein Ca-Angebot von 30 μM führte nach 28 Tagen je nach Sorte zu signifikant ('Adelheid') oder tendenziell ('Bintje'),

'San Michele', 'Ultimus') niedrigeren Frischmassen-Erträgen im Vergleich zur Kontrolle. Dabei erreichten 'Adelheid' und 'San Michele' 43 bzw. 48 % der Frischmasse bei 1000 μM , während bei 'Bintje' und 'Ultimus' noch 66 bzw. 62 % der Frischmasse der Kontrolle erreicht wurden.

Signifikante Unterschiede in der Frischmasse nach 28 Tagen bestanden zwischen den Sorten nur bei einem Ca-Angebot von 30 μM . Dabei war die Frischmasse der Sorte 'Bintje' signifikant größer als die der Sorten 'San Michele' und 'Ultimus'. Die Sorte 'Adelheid' unterschied sich bei gegebenem Ca-Angebot in der gebildeten Frischmasse von keiner der anderen Sorten signifikant.

Noch bevor tendenzielle oder signifikante Wachstumsbeeinträchtigungen durch ein niedriges Ca-Angebot in der Nährlösung festgestellt werden konnten, traten Ca-Mangelsymptome an den Blättern auf. Obwohl zwischen 1000 μM Ca und 90 μM bei keiner Sorte Unterschiede im Wachstum festgestellt wurden (Abb. 27), zeigten sich bei 'Adelheid' und 'San Michele', nicht jedoch bei

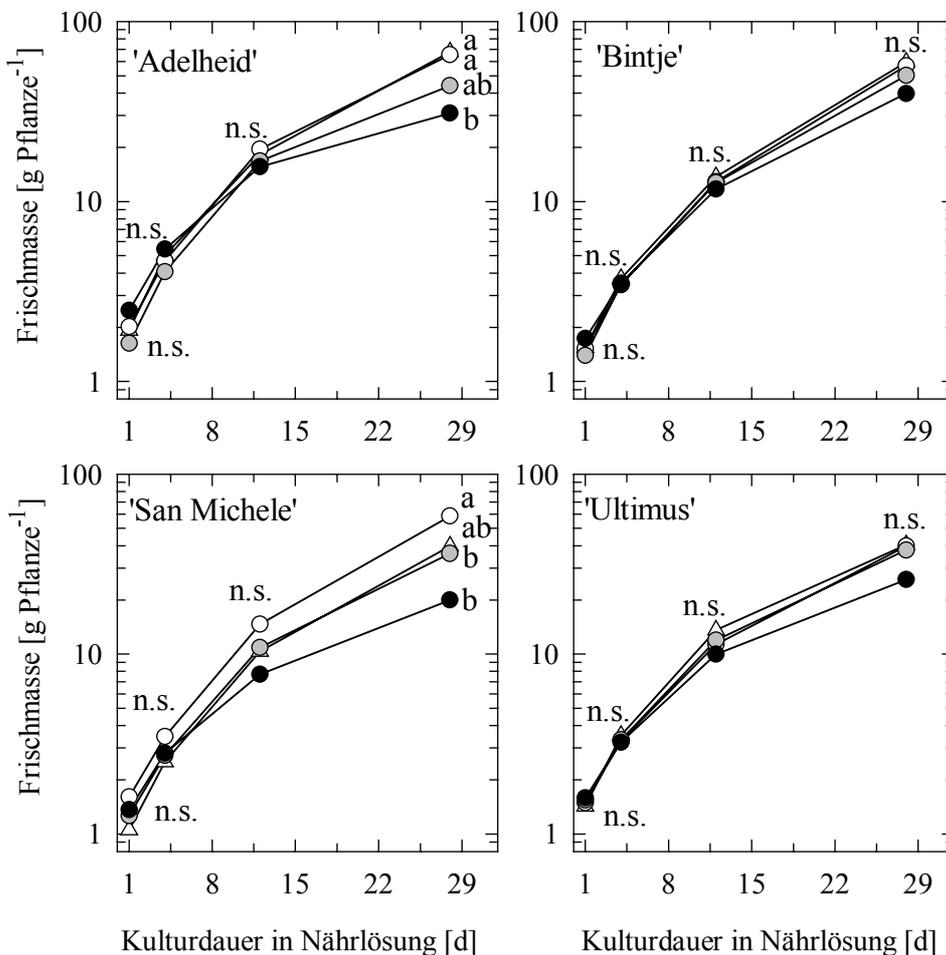
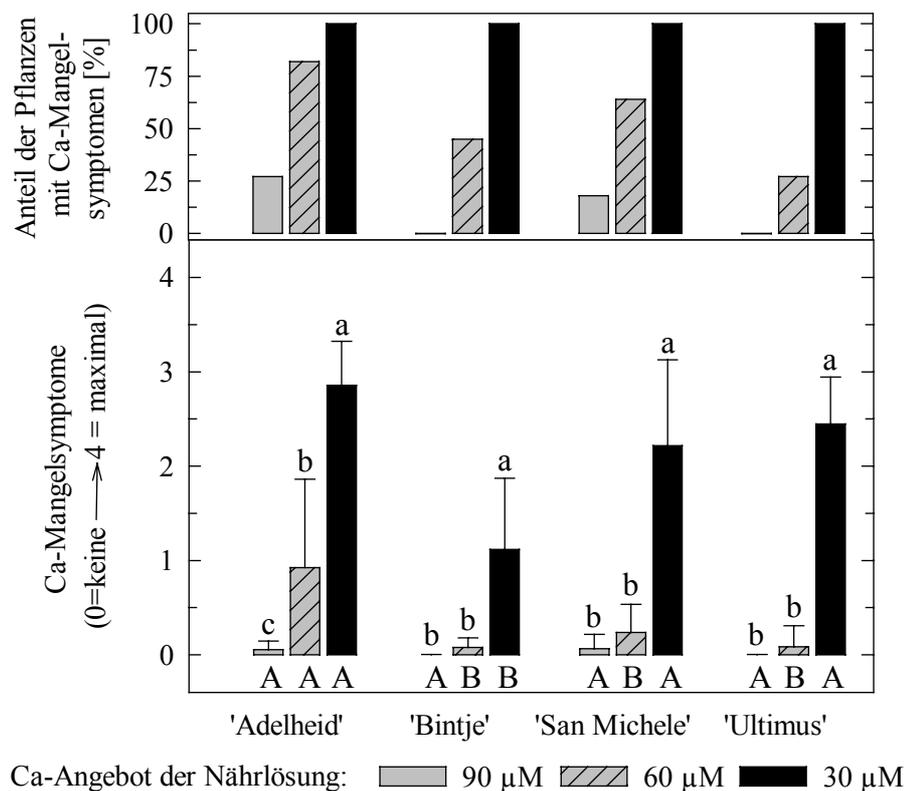


Abb. 27: Verlauf der Frischmassen-Bildung von vier Kartoffelsorten während 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 10 - 11; verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte zu einem Zeitpunkt nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

'Ultimus' und 'Bintje', Ca-Mangelsymptome (Abb. 28). Bei 60 μM wiesen bei allen Sorten einige Pflanzen Ca-Mangelsymptome auf, wobei 'Adelheid' die stärkste Ausprägung zeigte, sowohl in absolute Werten wie gemessen anhand des Anteils betroffener Pflanzen. Bei 30 μM Ca in der Nährlösung traten bei allen Pflanzen der vier Sorten Ca-Mangelsymptome auf, die bei 'Bintje' am geringsten ausgeprägt waren. Wurde bei der Beurteilung der Ca-Effizienz das Wachstum (Abb. 27) bei niedrigem Ca-Angebot in gleicher Weise gewichtet wie die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 28), so konnte die Sorte 'Ultimus' aufgrund des (tendenziell) größeren Wachstums bei niedrigem Ca-Angebot bei gleicher Stärke der Symptomausprägung als Ca-effizient gegenüber der Sorte 'San Michele' eingeschätzt werden. Eine Einschätzung der Sorten 'Ultimus' und 'Adelheid' war hingegen problematisch, da 'Adelheid' zwar bei niedrigem Ca-Angebot (tendenziell) ein größeres Wachstum als 'Ultimus' aufwies, aber auch tendenziell mehr Ca-Mangelsymptome zeigte.



F-Test: Sorte ***, Ca-Angebot ***, Sorte x Ca-Angebot ***

Abb. 28: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (absolut und als Prozentsatz der betroffenen Pflanzen) junger Blätter (BPI 2 - 4) von vier Kartoffelsorten nach 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 10 - 11; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Stufen innerhalb einer Sorte und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb einer Ca-Stufe jeweils nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Die Sorte 'Bintje' hingegen konnte im Vergleich zu den Sorten 'San Michele' und 'Ultimus' aufgrund des größeren absoluten Wachstums bei niedrigem Ca-Angebot und der geringeren Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen als Ca-effizient angesprochen werden. Zwischen den Sorten 'Bintje' und 'Adelheid' bestanden bei 30 μM Ca keine signifikanten Unterschiede in der Frischmasse, aber die Sorte 'Bintje' zeigte eine deutlich geringere Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und konnte auf Grund dessen auch als Ca-effizient gegenüber der Sorte 'Adelheid' eingestuft werden.

Die Ca-Gehalte der jungen Blätter verringerten sich mit verringertem Ca-Angebot und waren bei niedrigem Ca-Angebot (90 μM , 60 μM , 30 μM) stets signifikant niedriger als bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) (Abb. 29). Signifikante Unterschiede zwischen den Sorten in den Ca-Gehalten der jungen Blätter (BPI 2 - 4) bestanden nur bei dem höchsten Ca-Angebot der Nährlösung (1000 μM), wobei hier im Durchschnitt die Sorte 'Ultimus' den höchsten Gehalt aufwies (Abb. 29).

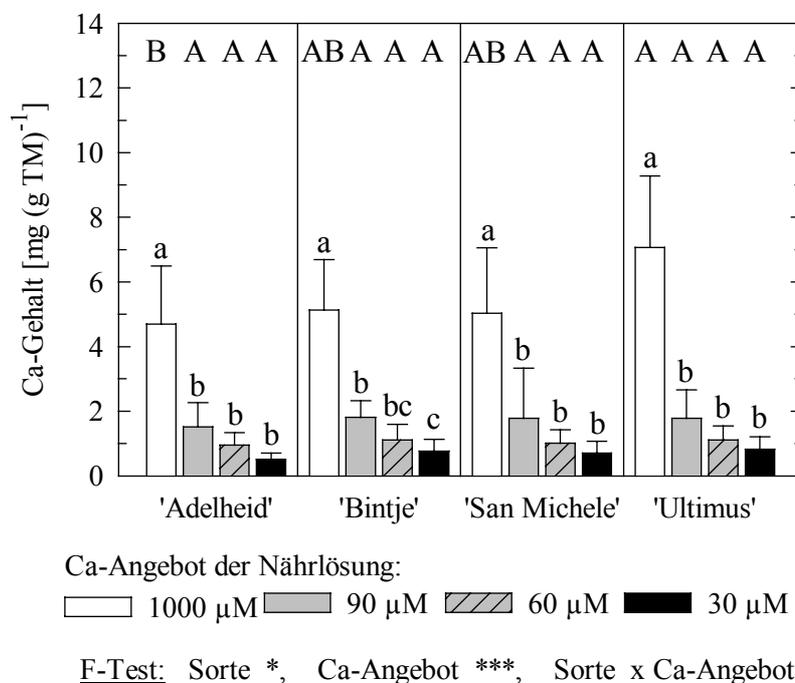


Abb. 29: Ca-Gehalte junger Blätter (BPI 2 - 4) von vier Kartoffelsorten nach 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 10 - 11; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angebotsstufen innerhalb einer Sorte und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebots jeweils nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Die Darstellung der Stärke der Ca-Mangelsymptome der jungen Blätter in Abhängigkeit von den Blatt-Ca-Gehalten zeigt deutlich, daß bei Berücksichtigung aller Ca-Angebotsstufen bei jeder Sorte eine signifikante Beziehung zwischen den Ca-Gehalten und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bestand (Abb. 30). Der Erklärungswert nach Regressionsrechnungen der allgemeinen Formel $y = a * e^{-bx}$ für die Symptomausprägung durch die Ca-Gehalte lag dabei sortenabhängig im Bereich von 32 % ('Bintje') bis 61 % ('Adelheid').

Bei allen Sorten war ein Auftreten von Ca-Mangelsymptomen bei einem Ca-Gehalt junger Blätter von weniger als $1,9 \text{ mg (g TM)}^{-1}$ möglich (Abb. 30). Der Grenzwert für das sichere Auftreten von Ca-Mangelsymptomen lag aber sortenabhängig im Bereich von $0,96 \text{ mg Ca (g TM)}^{-1}$ ('Adelheid') bis $0,42 \text{ mg Ca (g TM)}^{-1}$ ('Bintje') (Abb. 30).

Daraus leitet sich ab, daß die Ca-Gehalte junger Blätter zwar innerhalb einer Sorte einen substantiellen Erklärungswert für die Stärke der Ca-Mangelsymptome haben, aber die unterschiedliche Symptomausprägung zwischen den Sorten weniger gut erklären können.

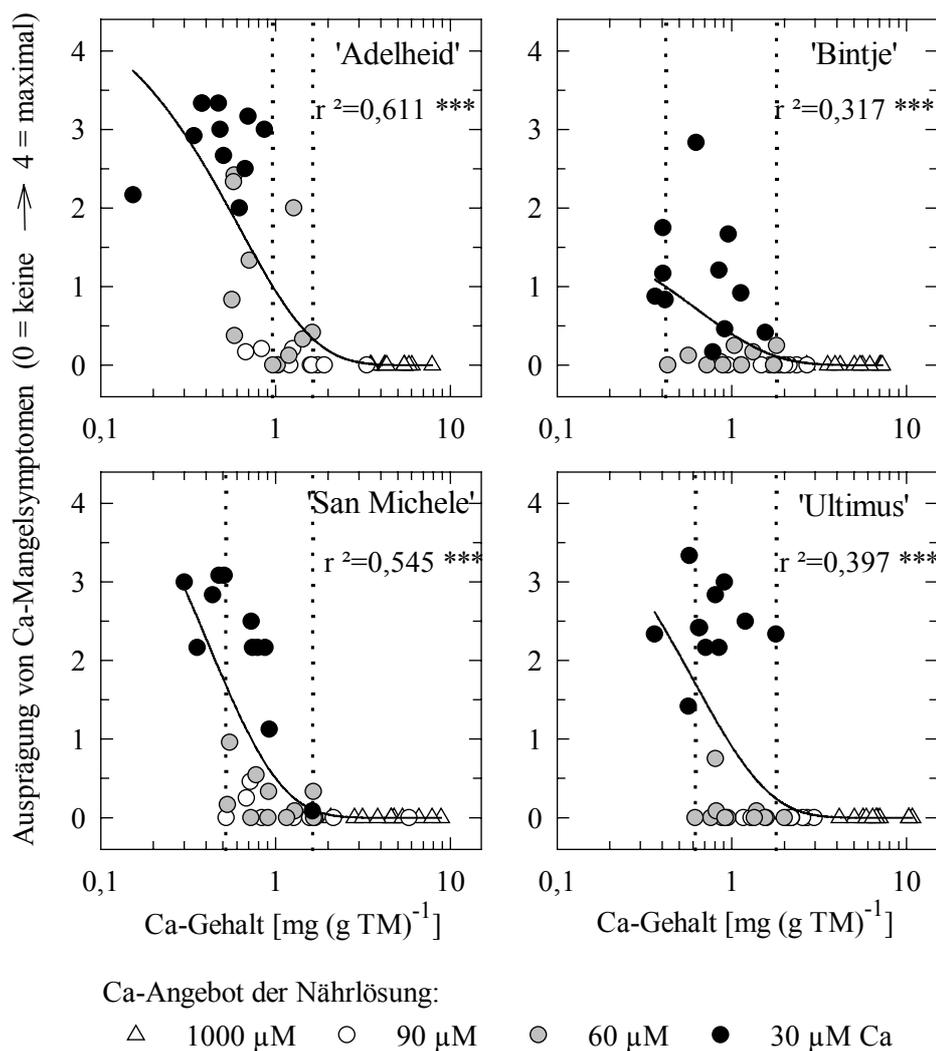


Abb. 30: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen junger Blätter (BPI 2 - 4) in Abhängigkeit von deren Ca-Gehalte bei vier Kartoffelsorten nach 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 40 - 44)

Zusammenfassen lassen sich die Ergebnisse wie folgt:

- Bei einem Ca-Angebot von 90 μM wurden, unabhängig von der Sorte, nach 28 Tagen in Nährlösung noch keine signifikant niedrigeren Frischmassen als bei dem Kontrollangebot von 1000 μM erreicht. Dagegen ließen sich sortenspezifische Unterschiede in der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen an Blättern bei 90 μM Ca feststellen, woraus folgt, daß das Auftreten von Symptomen ein empfindlicheres Maß für Ca-Mangel ist als eine verminderte Bildung an Frischmasse. Die vier untersuchten Sorten unterschieden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigen Ca-Angebot. Dabei erwies sich die Sorte 'Bintje' gegenüber den anderen drei Sorten, gemessen am Wachstum und an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen, als Ca-effizient.
- Zwischen der Stärke der Ca-Mangelsymptome und den jeweiligen Ca-Gehalten der jüngeren Blätter (BPI 2 - 4) bestanden bei allen Sorten signifikante negative Beziehungen, wobei die Ca-Gehalte je nach Sorte einen Erklärungswert für die Stärke der Ca-Mangelsymptome von 32 % bis 61 % lieferten.
- Allerdings ließen sich durch die Ca-Gehalte junger Blätter nicht die Unterschiede in der Stärke der Ca-Mangelsymptome zwischen den Sorten erklären. Damit weisen diese Ergebnisse auf Unterschiede zwischen den Sorten in der Nutzung von Ca auf Gewebeebene hin.

3.2.3 Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Ca-Effizienz von zwei Kartoffelsorten

Ausgangspunkt war die Frage, ob die Ca-Effizienz von Kartoffelsorten durch die N-Form der Nährlösung beeinflusst wird. In diesem Versuch wurden die beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' untersucht, da ihre Ca-Effizienz sich in mehreren unabhängigen Versuchen als stabil voneinander verschieden erwiesen hatte, wenngleich das Ausmaß des Effizienzunterschiedes von den Umweltbedingungen modifiziert wurden (vgl. 3.2.1).

Als N-Formen der Nährlösung wurden reines Nitrat-Angebot, reines Ammonium-Angebot und eine gemischte Variante aus jeweils 50 % Ammonium und Nitrat verglichen.

Bei 1000 μM Ca-Angebot erreichten beide Kartoffelsorten bei NH_4NO_3 -Ernährung eine deutlich höhere Frischmasse als bei reiner NO_3^- - oder NH_4^- -Ernährung (Abb. 31). Die Sorte 'Adelheid' wies 121 % und die Sorte 'Bintje' 66 % mehr Frischmasse bei NH_4NO_3 - als bei NO_3^- -Angebot auf. Beide Sorten zeigten bei NH_4NO_3 -Ernährung sowohl größere Wurzel-, Stengel- und signifikant oder tendenziell größere Blatt-Frischmassen als bei reiner NH_4^- - und bei reiner NO_3^- -Ernährung (Abb. 31). Beide Sorten erreichten bei NO_3^- - und bei NH_4^- -Ernährung jeweils eine ähnlich hohe Frischmasse.

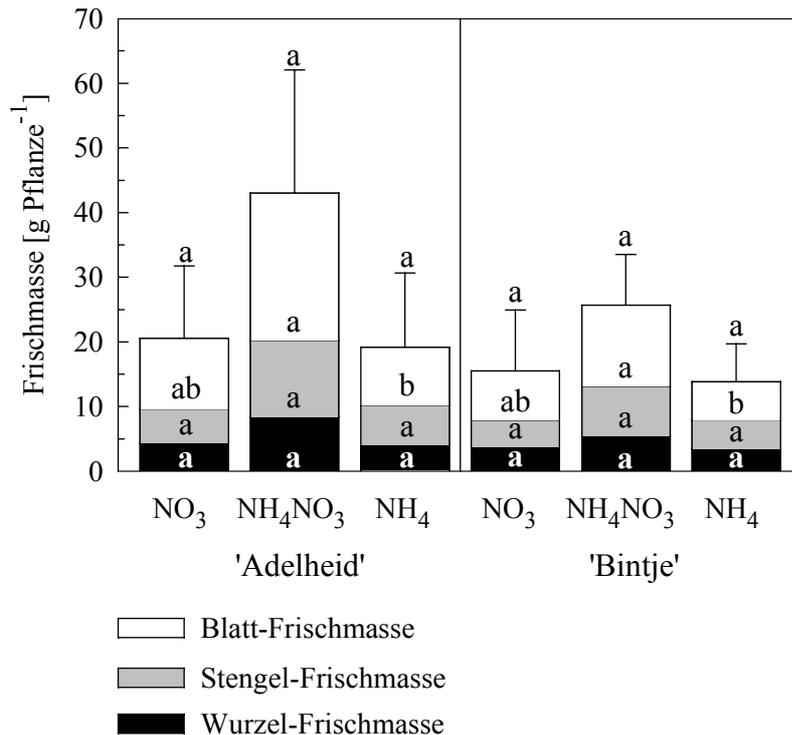
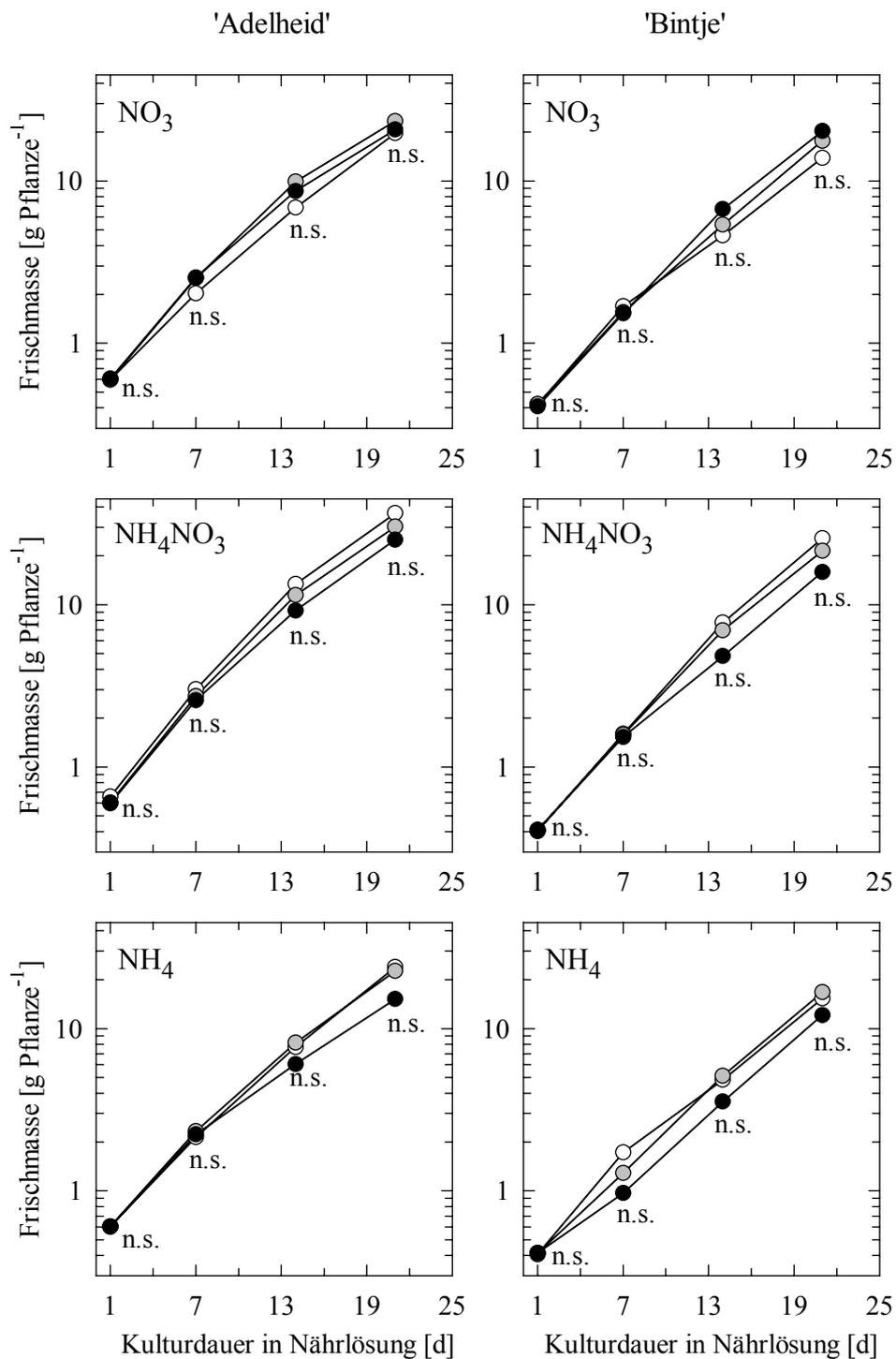


Abb. 31: Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Gesamt-, Blatt-, Stengel- und Wurzel-Frischmasse der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 21 d bei 1000 μM Ca-Angebot der Nährlösung ($n = 6$; Mittelwertvergleich innerhalb einer Sorte nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Bei keiner Form der N-Ernährung führte das unterschiedlich hohe Ca-Angebot der Nährlösung nach 21 Tagen Versuchsdauer zu einer signifikant unterschiedlichen Frischmasse (Abb. 32). Der – im Vergleich zu den übrigen Versuchen – frühe Erntetermin nach 21 d Versuchsdauer ergab sich auf Grund der schon zu diesem Zeitpunkt deutlichen Unterschiede in der Stärke der Ca-Mangelsymptome (Abb. 33). Bei 60 μM wiesen nur die Pflanzen der Sorte 'Adelheid' bei ausschließlichem NH_4 -Angebot Ca-Mangelsymptome auf. Bei 30 μM zeigten nur die Pflanzen der Sorte 'Bintje' bei NO_3 -Angebot keine Ca-Mangelsymptome. Bei jeder Form der N-Ernährung war die Ausprägung der Ca-Mangelsymptome bei 'Bintje' geringer als bei 'Adelheid'. Unterschiede in der Stärke der Ca-Mangelsymptome zwischen NH_4NO_3 - und NH_4 -Angebot bestanden bei 30 μM Ca-Angebot bei keiner der beiden Sorten. In Übereinstimmung mit vorausgegangenen Ergebnissen wies die Sorte 'Adelheid' bei reiner NO_3 -Ernährung bei niedrigem Ca-Angebot deutlich mehr Ca-Mangelsymptome an Blättern auf als die Sorte 'Bintje'. Diese Unterschiede bestanden bei NH_4NO_3 - und reiner NH_4 -Ernährung weiter fort. Eine N-Formen \times Genotyp Interaktion in der Ca-Effizienz der untersuchten Sorten lag somit nicht vor.



Ca-Angebot der Nährlösung: ○ 1000 μM ● 60 μM ● 30 μM

Abb. 32: Verlauf der Frischmassen-Bildung der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher Form der N-Ernährung und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung während 21 d ($n = 6$; Mittelwertvergleich jeweils zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte und einer N-Form nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

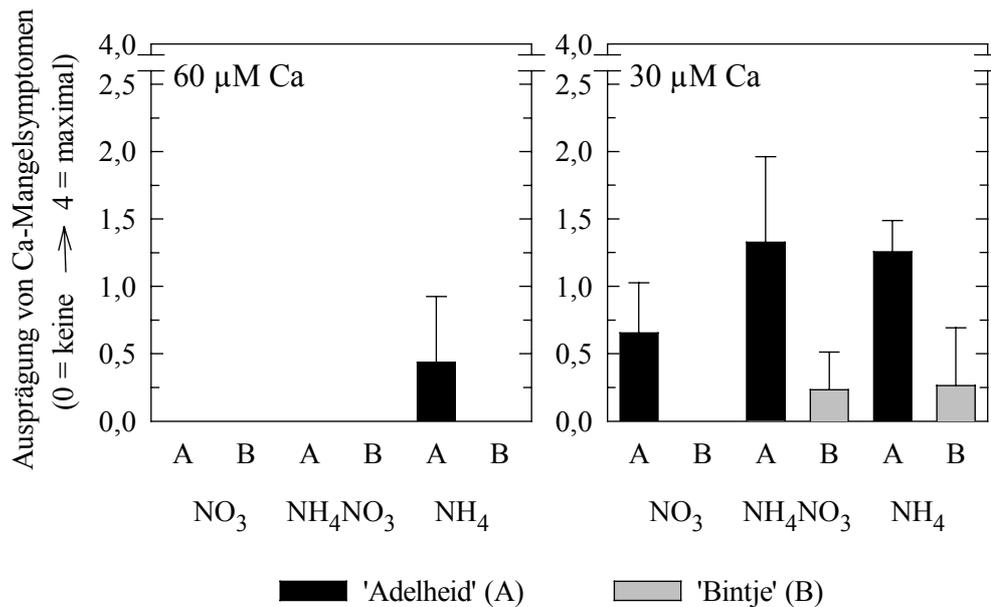


Abb. 33: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) der Kartoffelpflanzen der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 21 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot und unterschiedlicher N-Form in der Nährlösung (n = 6)

Die Ca-Gehalte junger Blätter waren bei NO₃-Ernährung höher als bei NH₄NO₃- und NH₄-Ernährung. Signifikante Beziehung zwischen den Ca-Gehalten und der jeweiligen Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen ließen sich in diesem Versuch feststellen, wobei der Erklärungswert abhängig von dem physiologischen Blatalters und der Sorte höchstens 37 % betrug (Abb. 34).

Signifikante Unterschiede in den Ca-Gehalten physiologisch gleich alter Blätter ließen sich zwischen den Sorten bei niedrigem Ca-Angebot nicht feststellen. Auch in diesem Versuch zeigten somit die Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' eine unterschiedliche Ausprägungsstärke der Ca-Mangelsymptome, die nicht durch die Gesamt-Ca-Gehalte der Blätter erklärt werden konnte.

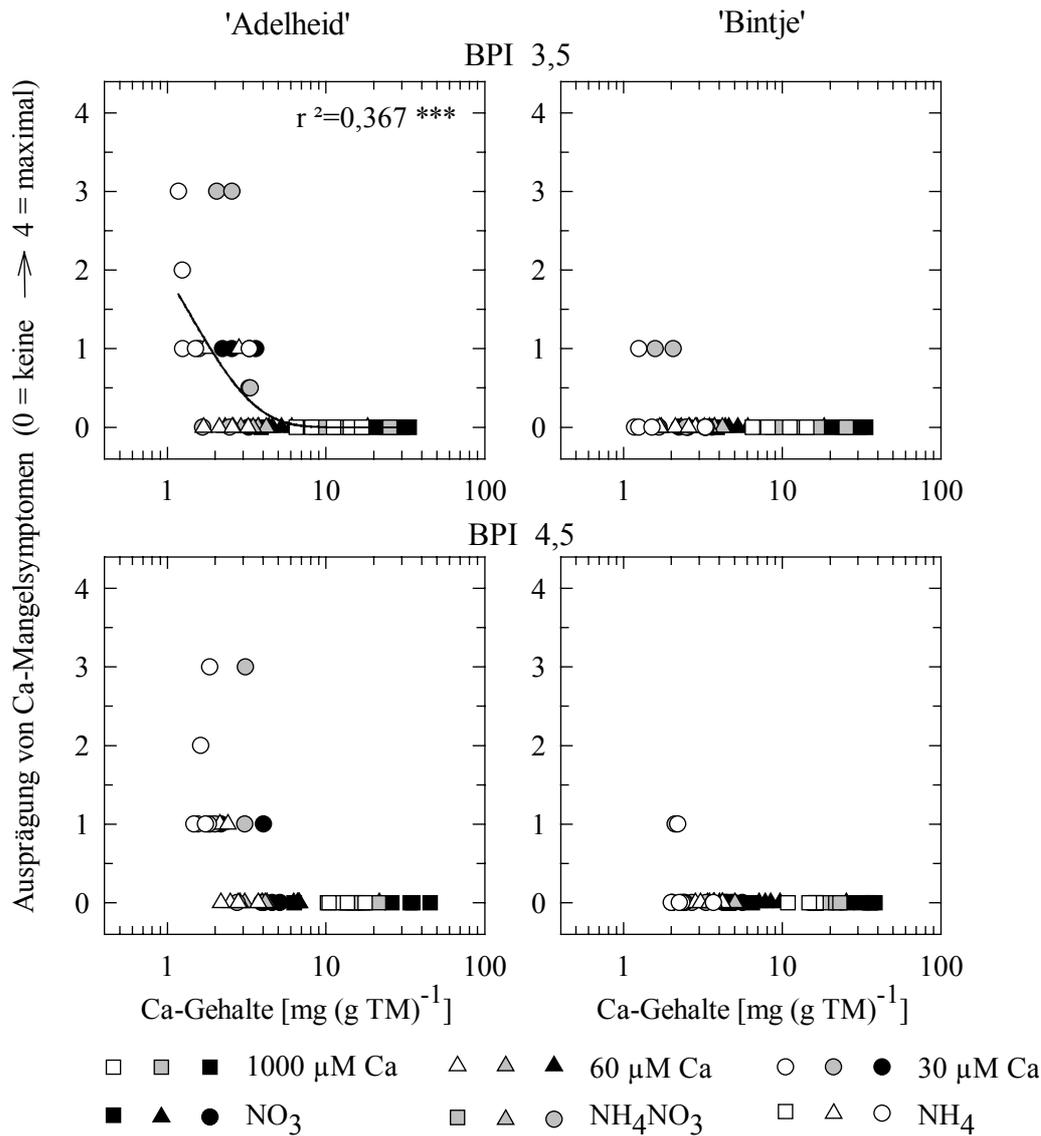


Abb. 34: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen in Abhängigkeit der Ca-Gehalte der Blätter unterschiedlichen physiologischen Alters von Kartoffelpflanzen der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 21 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot und unterschiedlicher N-Form in der Nährlösung

Zusammenfassend zu genotypischen Unterschieden in der Ca-Effizienz kann festgestellt werden, daß mit der Sorte 'Adelheid' eine Ca-ineffiziente und mit 'Bintje' ein Ca-effiziente Kartoffelsorte identifiziert werden konnte, deren unterschiedliche Effizienz sich in verschiedenen Versuchen über verschiedene Umwelten hinweg gleichgerichtet bestätigte. Alle weiteren Untersuchungen zu genotypischen Unterschiede im Pektinhaushalt wurden daher mit den Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' durchgeführt.

3.3 Uronsäuren im Apoplasten junger Kartoffelblätter

Die Frage, ob sich in Blättern von Kartoffelpflanzen mit unterschiedlichem Ca-Status Hinweise auf eine Degradation der Pektinsubstanz finden lassen, und ob diesbezüglich sorten-spezifische Unterschiede bestehen, wurde zunächst untersucht.

3.3.1 Quantitative Charakterisierung der Uronsäuren im Blattapoplasten

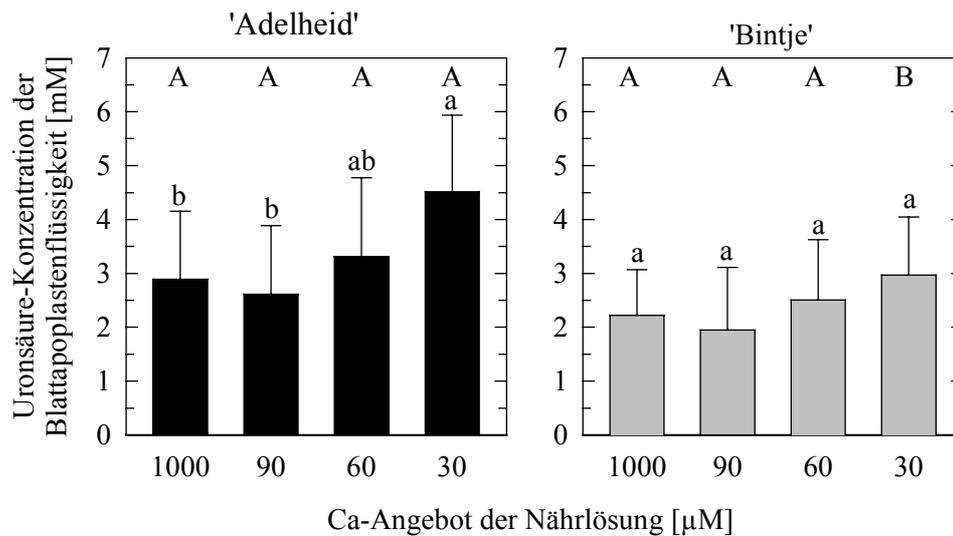
Zur Untersuchung der Beziehung zwischen Ca-Versorgungsgrad des Gewebes und der Integrität der Pektinsubstanz erfolgte eine Quantifizierung der Uronsäuren sowohl in der wässrigen Phase des Apoplasten als auch in isoliertem Zellwandmaterial junger Blätter.

Über die Bestimmung der Uronsäure-Konzentration in der Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF) und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors durch die Blattinfiltration (vgl. 2.4.1.3) wurde die Uronsäure-Konzentration für die wässrige Phase des Apoplasten (Apoplastenflüssigkeit) hochgerechnet (Abb. 35).

Bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' war die Uronsäure-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit, der bei 90 μM Ca-Angebot kultivierten Pflanzen, mit 2,6 mM ähnlich hoch wie Konzentration bei den Kontrollpflanzen (1000 μM Ca) mit 2,9 mM. Bei 60 μM Ca-Angebot war die Uronsäure-Konzentration mit 3,3 mM zwar tendenziell, aber nicht statistisch absicherbar, höher als bei 90 μM und bei 1000 μM Ca-Angebot. Nur bei dem niedrigsten Ca-Angebot von 30 μM war die Uronsäure-Konzentration mit 4,5 mM signifikant höher als bei 90 μM und bei 1000 μM Ca-Angebot. Demgegenüber konnten bei der Ca-effizienten Sorte ' Bintje ' statistisch keine absicherbaren Unterschiede in der Uronsäure-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit in Abhängigkeit von dem Ca-Angebot festgestellt werden. Allerdings lag auch bei dieser Sorte bei dem niedrigsten Ca-Angebot die höchste Uronsäure-Konzentration (3,0 mM) in der Apoplastenflüssigkeit vor.

Tendenziell war die Uronsäure-Konzentration bei der Sorte 'Adelheid' bei allen vier Ca-Angeboten höher als bei der Sorte 'Bintje', statistisch absicherbar war dieser Unterschied aber nur bei niedrigsten Ca-Angebot.

Bei beiden Sorten bestand eine signifikante Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und der Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit. Allerdings betrug der Erklärungswert bei Verwendung des linearen Regressionsmodells höchstens 31 % (Abb. 36).



F-Test: Ca-Angebot **, Sorte ***, Interaktion n.s.

Abb. 35: Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 30 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 9 - 11; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten bei einem Ca-Angebot nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

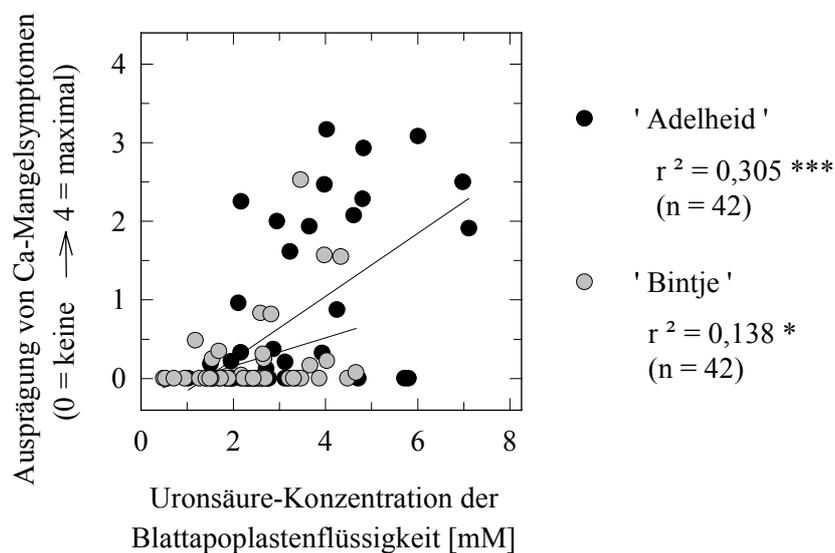


Abb. 36: Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und der Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 30 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung

Im Gegensatz zu der Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit konnte kein Einfluß des Ca-Angebotes der Nährlösung auf den Uronsäure-Gehalt isolierter Zellwände festgestellt werden (Tab. 13). Weder bei der Sorte 'Adelheid' noch bei der Sorte 'Bintje' war der Uronsäure-Gehalt

isolierter Zellwände bei niedrigem Ca-Angebot signifikant gegenüber hohem Ca-Angebot erniedrigt; und des weiteren bestanden zwischen den beiden Sorten bei keinem Ca-Angebot signifikante Unterschiede. Im Mittel über alle Ca-Stufen und beide Sorten hinweg betrug der Uronsäure-Gehalt des isolierten Zellwandmaterials junger Blätter $154 \text{ mg Gal-US-Eq (g AIR)}^{-1}$. Dies entsprach bezogen auf die Blatt-Frischmasse einem Uronsäure-Gehalt von $4,6 \text{ mg Gal-US-Eq (g FM)}^{-1}$ (bei einem durchschnittlichen Ertrag an isoliertem Zellwandmaterial (AIR) von 3 % der Frischmasse) (Daten nicht dargestellt). Für einen Vergleich der Größenordnungen kann die Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit von $2,2 - 4,5 \text{ mM}$ (Abb. 35) als Gehalt bezogen auf die Frischmasse mit $0,02 - 0,05 \text{ mg Gal-US-Eq (g FM)}^{-1}$ angegeben werden. Die in der Apoplastenflüssigkeit vorhandenen Uronsäure-Mengen entsprachen somit nur 0,5 bis 1,1 % der Uronsäure-Mengen isolierter Zellwände.

Festzuhalten bleibt, daß bei dem niedrigsten Ca-Angebot der Nährlösung ($30 \mu\text{M}$) ein verstärktes Auftreten von Uronsäuren in der Blattapoplastenflüssigkeit festgestellt wurde, wobei signifikant höhere Konzentrationen bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' im Vergleich zu der Ca-effizienten Sorte 'Bintje' auftraten. Diese Zunahme in der Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit spiegelte sich nicht in veränderten Uronsäure-Gehalten isolierter Zellwände wider.

Tab. 13: Uronsäure-Gehalt isolierter Zellwände (AIR) junger Kartoffelblätter (BPI 2-4) der Kartoffelsorten 'Adelheid' und Sorte 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 30 d ($n= 5 - 6$; keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Sorte zwischen den Ca-Angeboten sowie zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Sorte	Ca-Angebot	Uronsäure-Gehalt [mg Gal-US-Eq. (g AIR) ⁻¹]	
		Mw	sd
'Adelheid'	1000 μM	149,4	$\pm 29,12$
	60 μM	141,8	$\pm 29,09$
	30 μM	149,3	$\pm 11,72$
'Bintje'	1000 μM	142,8	$\pm 48,12$
	60 μM	173,1	$\pm 22,18$
	30 μM	169,1	$\pm 31,38$

3.3.2 Qualitative Charakterisierung der Oligogalakturonide der Blattapoplastenflüssigkeit

Wenn spezifisch die Pektin-Fragmente (Oligogalakturonide) mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 9 - 16 ursächlich an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen beteiligt sind, dann ist weniger die Gesamt-Konzentration an Uronsäuren, sondern vielmehr die Konzentration dieser Oligogalakturonide in der Blattapoplastenflüssigkeit von Bedeutung. Es wurden verschiedene Methode auf ihre Eignung untersucht, die Oligogalakturonide der Blattapoplastenflüssigkeit hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades (DP) zu charakterisieren. Dabei erwies sich die HPAEC-PAD-Analytik am geeignetsten. Bei den ersten Untersuchungen aufkonzentrierter AWF-Proben wurde lediglich das Monomer detektiert. Durch Erhöhung der Detektor-Empfindlichkeit war es möglich neben dem Monomer auch Oligogalakturonide bis zu einem DP von etwa 5 zu detektieren. Eine weitere Erhöhung der Detektor-Empfindlichkeit hatte zur Folge, daß das Signal, hervorgerufen durch das Monomer, alle weiteren möglichen Signale überdeckte. Aus diesem Grunde wurde die Detektor-Empfindlichkeit während des Laufes erhöht. Auf diese Weise konnte eine Detektion von Oligogalakturoniden von dem Monomer bis hin zu einem DP 16-20 in den AWF-Proben erreicht werden. Eine weitere chromatographische Auftrennung der Oligogalakturonide mit einem DP zwischen 16 und 20 war allerdings nicht mehr möglich.

Beispielhaft dargestellt sind in Abb. 37 Chromatogramme aufkonzentrierter AWF-Proben junger Blätter der Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) von Pflanzen, die 30 Tage bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot kultiviert wurden.

Auffällig war zum einen, dass in den AWF-Proben nicht alle DPs von 1 bis 20 vertreten waren. Zum zweiten traten Peaks auf, die keinem definiertem DP zugeordnet werden konnten, da die Retentionszeit genau zwischen zwei aufeinanderfolgenden DPs lag.

Da keine Standards einzelner Oligogalakturonide mit definiertem Polymerisationsgrad verfügbar waren, die eine absolute Kalibrierung ermöglichen würden, erfolgte die Auswertung relativ innerhalb der Größen-Klassen der Oligogalakturonide (DP-Klassen) zwischen den Ca-Angebotsstufen sowie zwischen den Sorten.

Die Peak-Flächen bestimmter Größen-Klassen (DP-Klassen) bei niedrigem und hohem Ca-Angebot wurden verglichen, indem jeweils das Verhältnis zueinander berechnet wurde. Dieses Verhältnis zeigt damit die Veränderung an, die bei niedrigem Ca-Angebot im Vergleich zu hohem Ca-Angebot (Kontrollbehandlung) in der Peak-Fläche (und damit der Konzentration) der betrachteten Pektinfragment-Größenklasse auftritt.

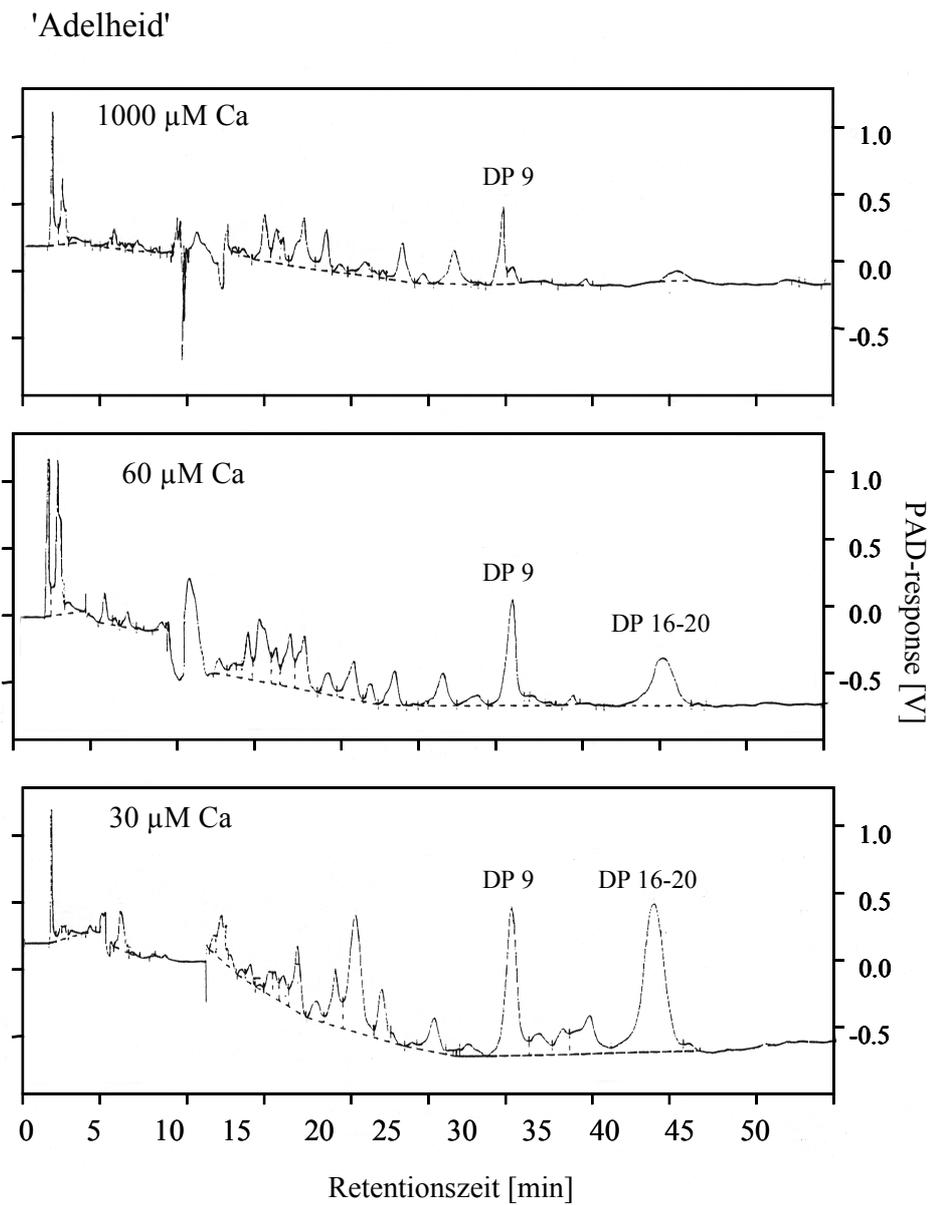


Abb. 37A: HPAEC-PAD-Chromatogramme der aufkonzentrierten Apoplastenwaschflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorte 'Adelheid' nach 30 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung

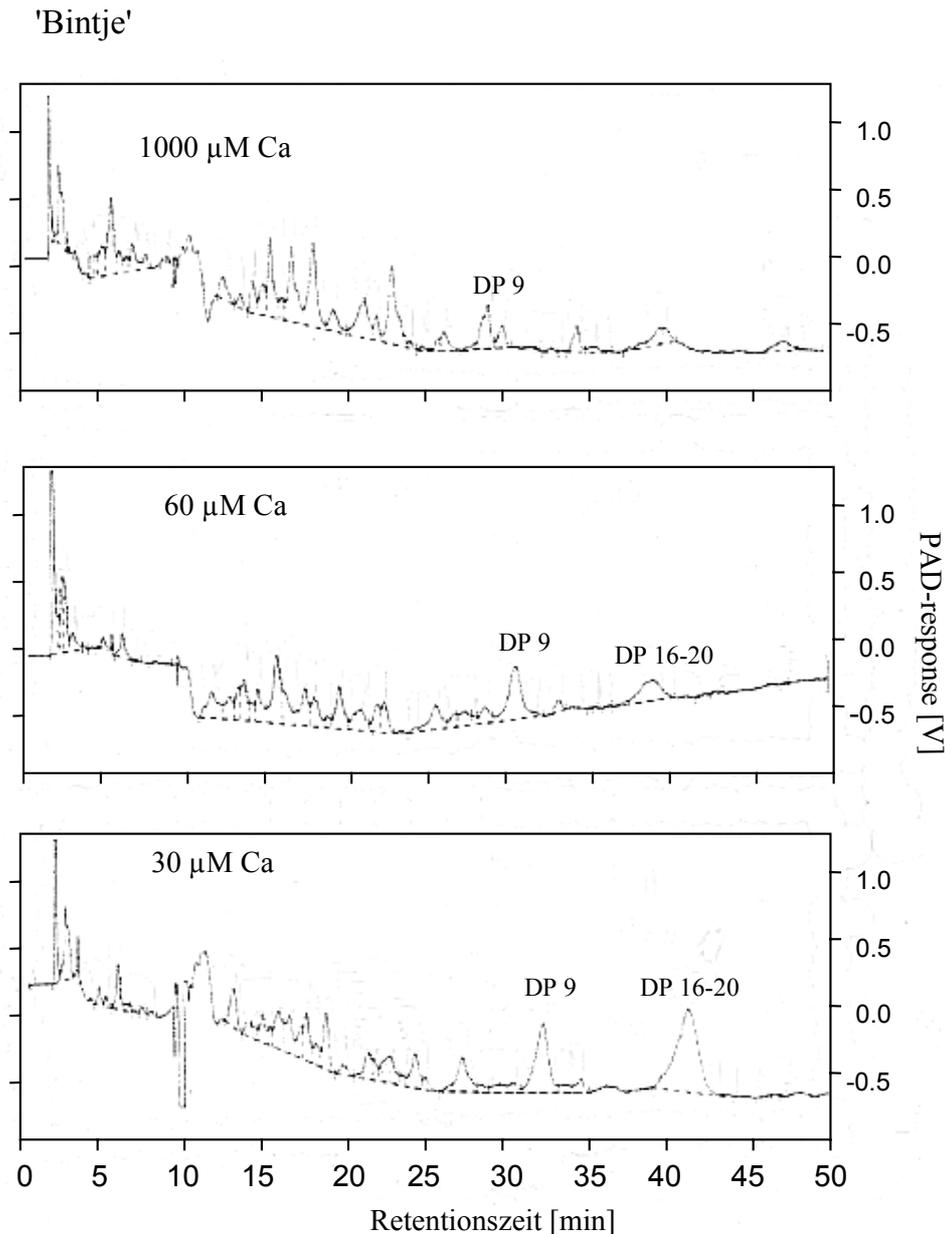


Abb. 37B: HPAEC-PAD-Chromatogramme der aufkonzentrierten Apoplastenwaschflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorte 'Bintje' nach 30 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung

Bei 60 µM Ca-Angebot der Nährlösung ließen sich bei der Sorte 'Adelheid' keine deutlichen Unterschiede zu der Kontrolle (1000 µM) in der Zusammensetzung der Oligogalacturonide hinsichtlich ihrer Größe feststellen (Abb. 38), obwohl die Blätter dieser Pflanzen schon Ca-Mangelsymptome aufwiesen. Bei der Sorte 'Bintje', deren Pflanzen bei 60 µM Ca-Angebot noch keine Ca-Mangelsymptome aufwiesen, wurden ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zu der Kontrolle (1000 µM) in der Zusammensetzung des Oligogalacturonide hinsichtlich ihrer Größe festgestellt (Abb. 38).

Bei 30 μM Ca-Angebot traten im Vergleich zur Kontrolle bei der Sorte 'Adelheid' deutlich weniger Monomere auf. Dagegen traten bei 30 μM um Faktor 7 mehr Oligogalakturonide mit einem DP 9 - 20 auf als bei 1000 μM Ca-Angebot. Im Vergleich dazu betrug dieser Unterschied bei der Sorte 'Bintje' nur Faktor 3 (Abb. 38)

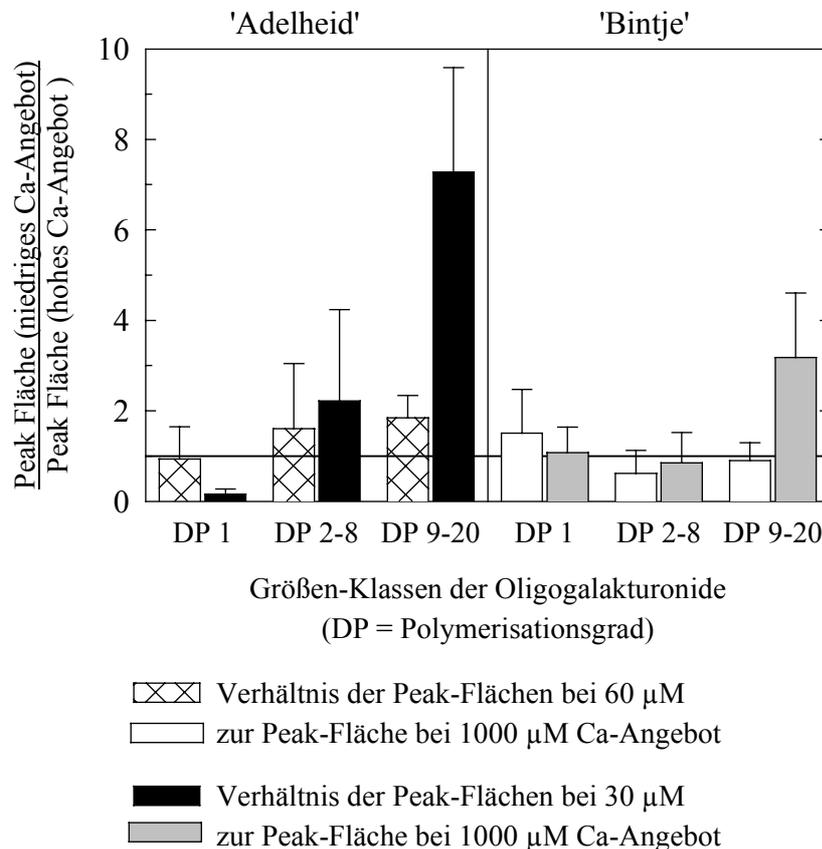


Abb. 38: Verhältnis der Größen-Klassen der Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei niedrigem Ca-Angebot zu denen bei hohem Ca-Angebot in der Nährlösung nach 30 d Kultur (n = 6)

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß bei beiden Sorten bei dem niedrigsten Ca-Angebot (30 μM), bei dem die Pflanzen beider Sorten die stärkste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen aufwiesen, in der Blattapoplastenflüssigkeit deutlich mehr Oligogalakturonide mit einem DP 9 - 20 auftraten als bei hohem Ca-Angebot (1000 μM). Dabei war diese Zunahme bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' stärker ausgeprägt als bei der Ca-effizienten Sorte 'Bintje'.

Festzuhalten bleibt aber auch, daß bei 60 μM Ca-Angebot bei der Sorte 'Adelheid', deren Blätter bei diesem Ca-Angebot schon Ca-Mangelsymptome aufwiesen, noch keine deutliche Zunahme gegenüber der Kontrolle in der Konzentration der Oligogalakturonide mit DP 9 - 20 in der Apoplastenflüssigkeit festgestellt wurde.

Im weiteren wurden die beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' miteinander hinsichtlich der Peak-Flächen bestimmter Größen-Klassen der Oligogalakturonide (DP-Klassen) in der AWF verglichen,

indem jeweils das Verhältnis der Sorten zueinander berechnet wurde. Das für die drei Ca-Angebotsstufen jeweils berechnete Verhältnis (Abb. 39) zeigt damit die Veränderung in der Peak-Fläche (und damit der Konzentration) der betrachteten Größen-Klasse der Oligogalakturonide bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' in Relation zu der Ca-effizienten Sorte 'Bintje'.

Bei der Sorte 'Adelheid' traten im Vergleich zu der Ca-effizienten Sorte 'Bintje' in der AWF bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) in der Nährlösung 52 % mehr Monomere auf. Bei 60 μM Ca enthielt die AWF beider Sorten annähernd die gleiche Konzentration an Monomeren. Demgegenüber war bei dem niedrigsten Ca-Angebot in der Nährlösung (30 μM Ca) die Konzentration an Monomeren in der AWF der Sorte 'Adelheid' geringer als bei der Sorte 'Bintje'.

Während bei der Kontrollbehandlung (1000 μM Ca) die AWF beider Sorten annähernd die gleiche Konzentration an Oligogalakturoniden mit DP von 2 bis 8 enthielt, traten bei niedrigem Ca-Angebot (60, 30 μM Ca) in der AWF der Sorte 'Adelheid' um Faktor 2,8 mehr Oligogalakturonide dieser Größe auf als in der AWF der Sorte 'Bintje'.

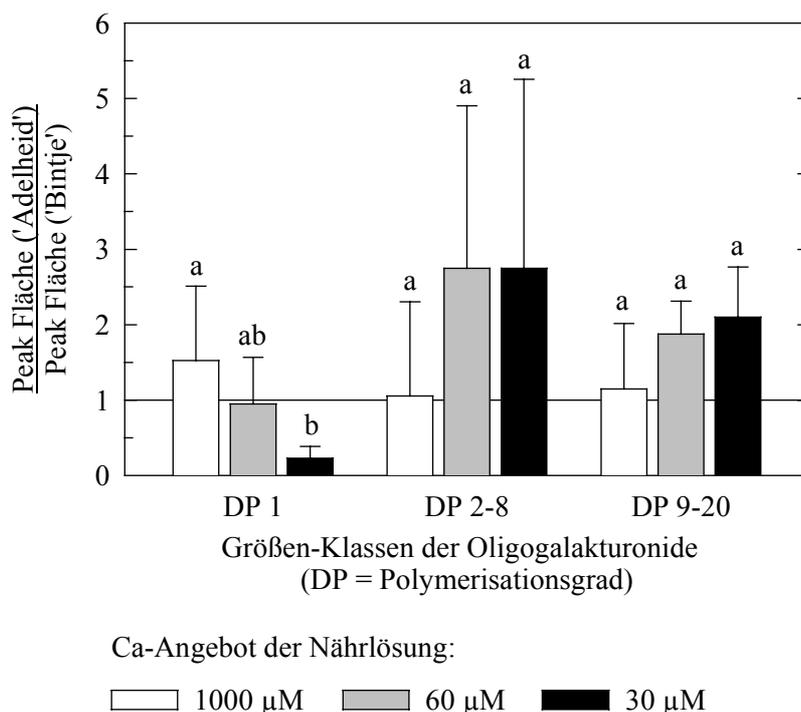


Abb. 39: Verhältnis der Größen-Klassen der Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorte 'Adelheid' zu denen der Sorte 'Bintje' nach 30 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 6; Mittelwertvergleich zwischen den Ca-Angebotsstufen innerhalb einer Größen-Klasse mit Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Bei hohem Ca-Angebot der Nährlösung (1000 μM Ca) war auch die Konzentration der Oligogalakturonide mit DP 9 - 20 in der AWF beider Sorten annähernd gleich. Demgegenüber enthielt bei

einem niedrigen Ca-Angebot (60, 30 μM Ca) die AWF der Ca-ineffizienten Sorten 'Adelheid' um Faktor 1,9 – 2,1 mehr Oligogalakturonide mit DP 9 - 20.

Somit traten in der Blattapoplastenflüssigkeit der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' bei niedrigem Ca-Angebot im Mittel deutlich mehr potentiell biologisch aktive Oligogalakturonide auf als bei der Ca-effizienten Sorten 'Bintje', wenn auch dieser Unterschied im Mittelwert auf Grund der hohen Streuung statistisch nicht abgesichert werden konnte.

3.3.3 Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Uronsäure-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit

Da die Form der N-Ernährung einen Einfluß auf die Stärke der Ca-Mangelsymptome von Kartoffelpflanzen der beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei niedrigem Ca-Angebot der Nährlösung hatte (vgl. 3.2.3), wurde untersucht, ob in ähnlicher Weise ein Einfluß auf die Uronsäure-Konzentration der AWF bestand.

Die Ca-Mangelsymptome an den Blätter (BPI 4,5) nach 21 d Kultur der Pflanzen bei niedrigem Ca-Angebot waren abhängig von der Sorte und der Form der N-Ernährung unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei 60 μM Ca-Angebot wiesen nur die Blätter der Sorte 'Adelheid' bei NH_4 -Ernährung Ca-Mangelsymptome auf. Bei 30 μM Ca-Angebot war die Stärke der Ca-Mangelsymptome bei Blättern der Sorte 'Adelheid' bei $\text{NH}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{NO}_3$. Die Blätter der Sorte 'Bintje' zeigten nur bei NH_4 -Ernährung Ca-Mangelsymptome, und diese waren weniger stark ausgeprägt als bei der Sorte 'Adelheid'. Ein Einfluß des Ca-Angebotes der Nährlösung auf die Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit der Blätter (BPI 4,5) (Abb. 40) ließ sich bei beiden Sorten weder bei reiner NO_3 -Ernährung noch bei reiner NH_4 -Ernährung feststellen. Nur bei NH_4NO_3 -Ernährung war die Uronsäure-Konzentration bei der Sorte 'Adelheid' bei dem niedrigsten Ca-Angebot (30 μM) signifikant gegenüber der Kontrolle (1000 μM) erhöht. Des weiteren wurden in keinem Fall signifikante Unterschiede in der Uronsäure-Konzentrationen der Apoplastenflüssigkeit zwischen den beiden Sorten festgestellt.

Damit befinden sich diese Ergebnisse nicht in Übereinstimmung mit den im vorherigen Abschnitt dargestellten Untersuchungen an NO_3 -ernährten Pflanzen (vgl. Abb. 35), die einen Einfluß des Ca-Angebotes auf die Uronsäure-Konzentration erbrachten und außerdem einen Unterschied zwischen den beiden unterschiedlich Ca-effizienten Sorten zeigten. Auch konnte hier kein Zusammenhang zwischen der Stärke der Ca-Mangelsymptome und der Uronsäure-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit festgestellt werden (Abb. 41).

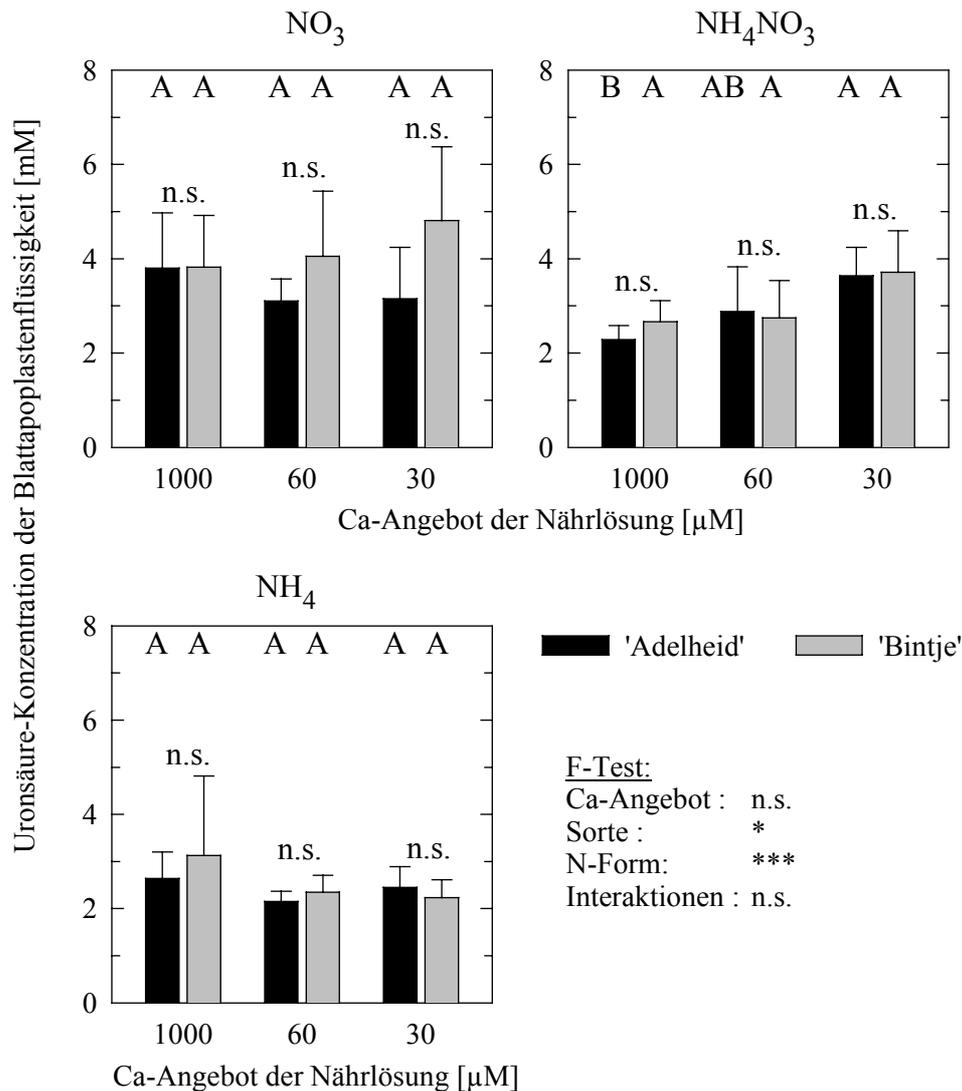


Abb. 40: Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 4,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher N-Form und unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung für 21 d (n = 5 - 6; die Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes waren nicht signifikant und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angebotsstufen innerhalb einer Sorte und Form der N-Ernährung nach Tukey-Test bei p < 0,05)

Allerdings ist bei gleicher Gesamt-Uronsäure-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit eine Änderung der Größe der Oligogalakturonide nicht auszuschließen. Da bei diesen Proben keine Analysen mittels HPAEC-PAD durchgeführt werden konnten, wurde versucht, den durchschnittlichen Polymerisationsgrad (DP) der Oligogalakturonide zu bestimmen. Dieser durchschnittliche DP der Oligogalakturonide ergibt sich aus der Division der molaren Uronsäure-Konzentration durch die molare Konzentration an reduzierenden Enden der Oligogalakturonide. Das Problem ist aber, daß Methoden existieren, die die Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Enden ermöglichen, jedoch nicht spezifisch in der Lage sind nur die reduzierenden Enden der Oligogalak

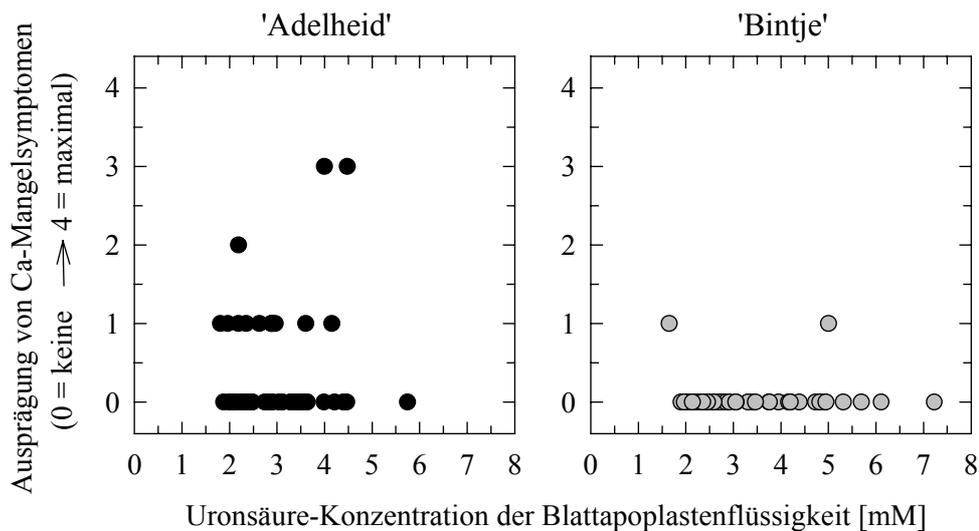


Abb. 41: Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und der Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 4,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 21 d bei unterschiedlicher Form der N-Ernährung und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung

turonide zu erfassen. Da aus der Literatur (TERRY & JONES, 1981; TERRY et al., 1981) hervorgeht, daß in der AWF von pflanzlichem Gewebe auch reduzierende Neutralzucker wie Glukose nachweisbar sind, wurde zunächst in der AWF von Kartoffelblättern die Glukose-Konzentration bestimmt. Die Glukose-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit lag zwischen 1,0 und 4,5 mM und wurde von dem Ca-Angebot der Nährlösung beeinflusst. Bei Pflanzen mit niedrigem Ca-Versorgungsgrad war die Glukose-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit signifikant oder tendenziell niedriger als bei den Pflanzen mit hohem Ca-Versorgungsgrad (Abb. 42).

Aufgrund der Höhe der Glukose-Konzentration, die in Relation zu der Uronsäure-Konzentration nicht als vernachlässigbar gering anzusehen ist, wurde die ermittelte Konzentration an reduzierenden Enden um den Beitrag, den die Glukose leistet, korrigiert. Der berechnete durchschnittliche DP der Oligogalakturonide der Apoplastenflüssigkeit in Abhängigkeit von der Form der N-Ernährung und dem Ca-Angebot der Nährlösung ist in Abb. 43 dargestellt. Varianzanalytisch ließ sich ein Einfluß des Ca-Angebotes, der Form der N-Ernährung und der Kartoffelsorte feststellen. Auffällig ist allerdings die Größenordnung des berechneten Polymerisationsgrades. Bei NO_3 -Ernährung und NH_4NO_3 -Ernährung lag der durchschnittliche Polymerisationsgrad im Bereich von 0,72 bis 1,50. Bei NH_4 -Ernährung lag bei der Sorte 'Adelheid' der durchschnittliche Polymerisationsgrad im Bereich von 0,47 – 0,57. Dieses deutet darauf hin, daß in der Apoplastenflüssigkeit noch mindestens eine weitere reduzierende Zuckerform vorhanden sein muß, deren Konzentration mindestens der Konzentration der Glukose entspricht. Die Frage ob die Konzentration dieser unbekanntem Zuckerform sich in Abhängigkeit von der Sorte, dem Ca-Angebot und / oder der

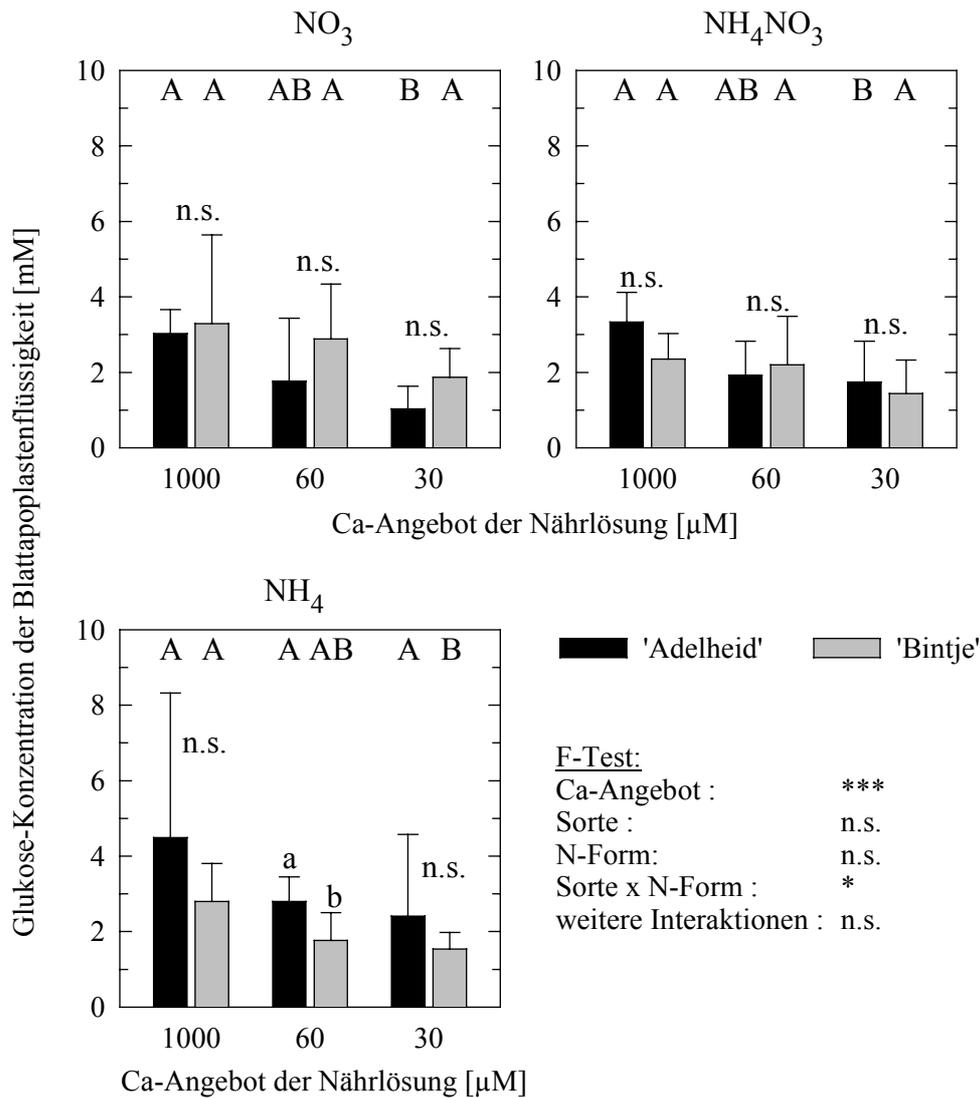


Abb. 42: Glukose-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 4,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher N-Form und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 21 d ($n = 5 - 6$; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angebotsstufen innerhalb einer Sorte und Form der N-Ernährung nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Form der N-Ernährung ändert, muss offen bleiben. Ohne Kenntnis der Antwort dieser Frage haben die Ergebnisse des durchschnittlichen DP's keine Aussagekraft.

Festzuhalten bleibt aber, daß durch eine unterschiedliche Form der N-Ernährung (NO₃, NH₄NO₃, NH₄) nach 21 d die Stärke der Ca-Mangelsymptome bei beiden Kartoffelsorten beeinflusst wurde, aber eine damit in Übereinstimmung stehende Veränderung der Uronsäure-Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit nicht festgestellt werden konnte.

Ein wesentlicher Unterschied zu anderen Versuchen bestand hier in der mit 21 d im Vergleich zu 30 d kurzen Versuchsdauer und der im Vergleich zu anderen Versuchen geringeren Ausprägung

von Ca-Mangelsymptomen. Die schon *a priori* vorhandene Frage, in welcher zeitlichen Reihenfolge ein verstärktes Auftreten von Oligogalakturoniden in der Apoplastenflüssigkeit von Blättern bei niedrigem Ca-Angebot im Verhältnis zur zeitlichen Entstehung der Ca-Mangelsymptome steht, wurde daher nachfolgend näher untersucht.

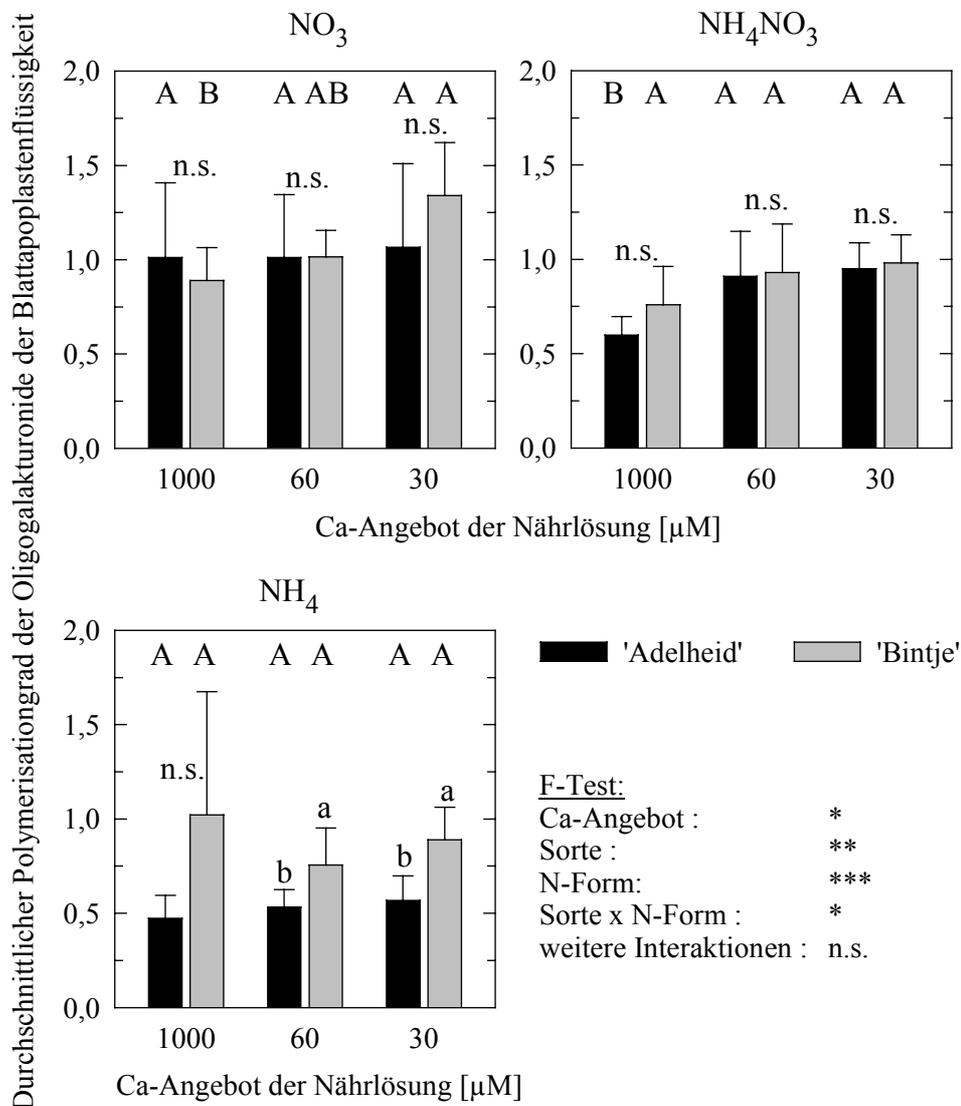


Abb. 43: Berechneter durchschnittlicher Polymerisationsgrad der Oligogalakturonide der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 4,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher Form der N-Ernährung und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 21 d ($n = 5 - 6$; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angebotsstufen innerhalb einer Sorte und Form der N-Ernährung nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

3.3.4 Diffusible Uronsäuren des Blattapoplasten in zeitlicher und räumlicher Auflösung

Für die Beantwortung der Frage, zu welchem Zeitpunkt ein Anstieg in der Uronsäure-Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit festzustellen ist, wurden physiologisch ähnlich junge Blätter (BPI 1,5 und 2,5) von Pflanzen der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Ca-Differenzbehandlung untersucht.

Da, wie unter 3.1.2 beschrieben, Ca-Mangelsymptome bei Kartoffelblättern zunächst am Blattrand makroskopisch sichtbar werden, und das Gewebe des Blattrandes nur einen kleinen Anteil eines Blattes darstellt, könnten Veränderungen spezifisch im Bereich des Blattrandes bei Verwendung ganzer Blattpflücken überlagert und damit unentdeckt bleiben. Daher wurde in dem folgenden Versuch mit Blattscheiben gearbeitet, die getrennt nahe des Blattrandes und aus der Blattmitte ausgestanzt wurden. Auf diese Weise sollte eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung von Veränderungen im Blattapoplasten erreicht werden.

Die Blattscheiben wurden mit demineralisiertem Wasser infiltriert, dann 1 h in demineralisiertem Wasser inkubiert und anschließend wurde in der Aussenlösung die Konzentration der diffundierten Uronsäuren bestimmt.

Die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Nekrosen) an den untersuchten Blattscheiben des

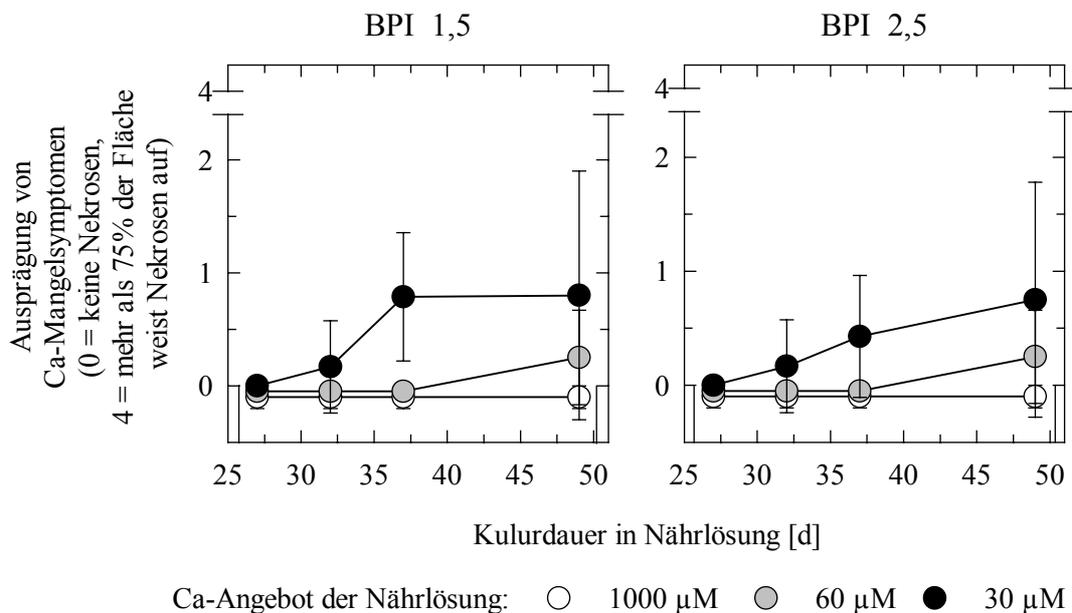
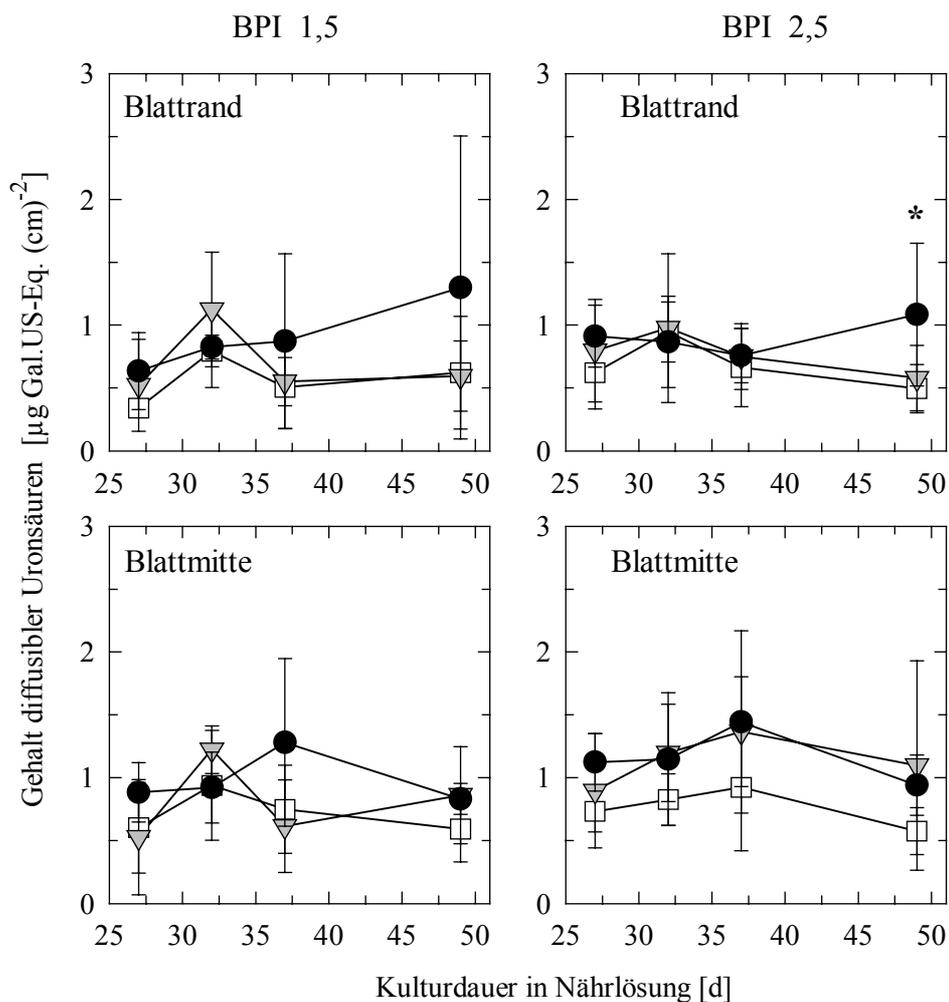


Abb. 44: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Nekrosen) am Blattrand junger Kartoffelblätter (BPI 1,5 und 2,5) der Sorte 'Adelheid' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung in Verlauf der Kultur (n = 6)

Blattrandes ist Abb. 44 dargestellt. Der erste Erntetermin nach 25 d stellte einen Zeitpunkt dar, bei dem in diesem Versuch weder bei 60 μM noch bei 30 μM Ca-Angebot Ca-Mangelsymptome sichtbar waren. Bei den beiden darauffolgenden Terminen (32 d, 37 d) wurden bei 60 μM Ca-Angebot keine Ca-Mangelsymptome festgestellt, wohl aber bei 30 μM . Bei dem letzten Erntetermin wiesen die Pflanzen, die bei 60 μM Ca-Angebot kultiviert wurden, wie auch die Pflanzen der 30 μM -Variante, Ca-Mangelsymptome auf. Erst bei diesem Erntetermin wurden auch Ca-Mangelsymptome im Bereich der Blattmitte festgestellt, allerdings nur bei den Pflanzen, die bei dem niedrigsten Ca-Angebot kultiviert wurden (Daten nicht dargestellt). Die diffusiblen Uronsäuren



<u>F-Test:</u>		□ 1000 μM Ca-Angebot
Ca-Angebot:	*	▽ 60 μM
Zeitpunkt:	n.s.	● 30 μM
Blattalter:	*	
Blattrand / Blattmitte:	n.s.	
Ca-Mangelsymptome:	n.s.	
Interaktionen:	n.s.	

Abb. 45: Gehalt diffusibler Uronsäuren von Blattscheiben des Blattrandes sowie der Blattmitte junger Kartoffelblätter (BPI 1,5 und 2,5) der Sorte 'Adelheid' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung im Verlauf der Kultur (n = 6; * = signifikanter Unterschied nach Dunnett-Test jeweils gegenüber der die Kontrolle bei $p < 0,05$)

re-Gehalte der Blattscheiben der beiden untersuchten Blattalter sind in Abhängigkeit von Dauer der Ca-Differenzbehandlung in Abb. 45 dargestellt. Im Bereich der Blattmitte bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den Gehalten an diffusiblen Uronsäuren zwischen Blättern unterschiedlichen Ca-Versorgungsgrades. Im Bereich des Blattrandes waren erst bei dem letzten Erntetermin die Gehalte an diffusiblen Uronsäuren bei den bei 30 μM Ca kultivierten Pflanzen signifikant (BPI 2,5) oder tendenziell (BPI 1,5) höher als die der Kontroll-Variante (1000 μM Ca-Angebot). Im Vergleich zu den Uronsäure-Gehalten zu früheren Terminen wurden hier auch die höchsten Gehalte erreicht.

Festzuhalten bleibt, daß sich, trotz dieser vergleichsweise hohen räumlichen Auflösung, ein deutlicher Anstieg in den Gehalten diffusibler Uronsäuren erst feststellen ließ, als fast 25 % der untersuchten Blattfläche (= Boniturnote 1) nekrotische Veränderungen aufwies. Der Zunahme an diffusiblen Uronsäuren im Blattapoplasten erscheint somit als eine vergleichsweise späte Veränderung bei Ca-Mangel. Eine im Gegensatz dazu frühere Veränderung zeigte die Polyphenoloxidase, deren Aktivität im gleichen Versuch in den Extrakten der Blattscheiben bestimmt wurde (Abb. 46). Parallel mit dem Auftreten deutlicher Ca-Mangelsymptome am Blattrand bei 30 μM Ca-Angebot nach 37 d nahm die Aktivität der Polyphenoloxidase vor allem am Blattrand deutlich zu.

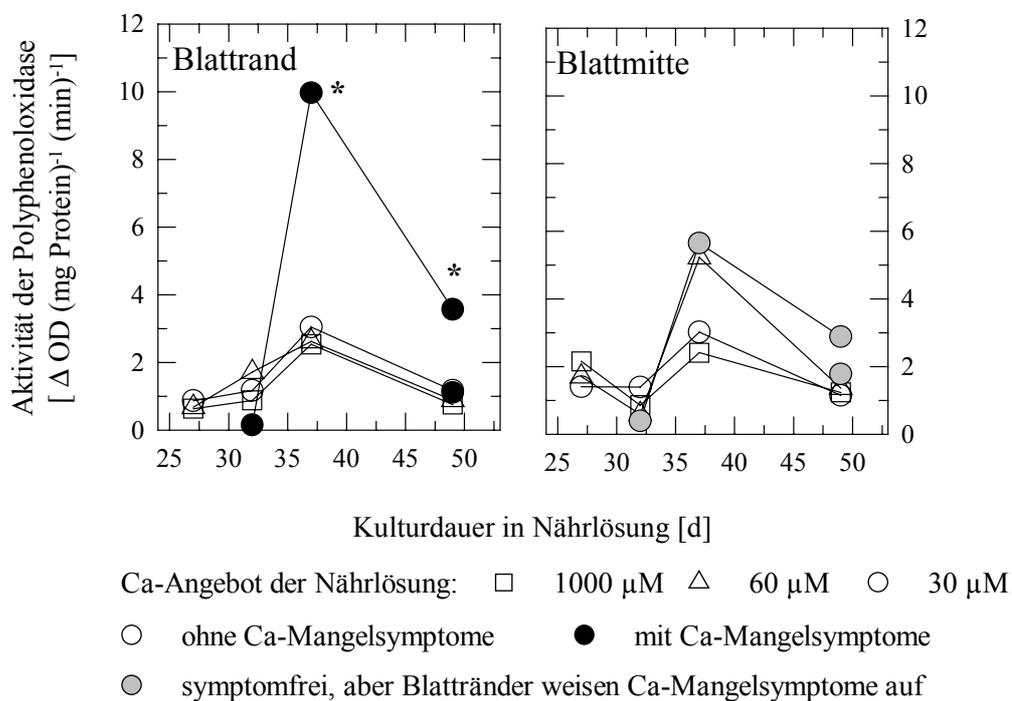


Abb. 46: Aktivität der Polyphenoloxidase von Blattscheiben des Blattrandes sowie der Blattmitte junger Kartoffelblätter (BPI 2,5) der Sorte 'Adelheid' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung im Verlauf der Kultur (n = 6; * = signifikanter Unterschied nach Dunnett-Test jeweils gegen die Kontrolle bei p < 0,05)

3.3.5 Induktion von Ca-Mangelsymptomen durch Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit ?

In einem kleinen Ansatz wurde untersucht, ob durch die Injektion der AWF von Ca-Mangelpflanzen der Sorte 'Adelheid' in Blätter von Kontrollpflanzen, die Ausbildung von Ca-Mangelsymptomen induziert werden können. Die AWF wurde zuvor um Faktor 5 mittels Lyophilisation aufkonzentriert (und anschließend in Wasser wieder aufgenommen), damit in etwa die Konzentration erreicht wird, die in der Blattapoplastenflüssigkeit *in vivo* vorliegt.

In junge Blätter (BPI 2 – 4) von Kartoffelpflanzen der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje', die bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) sowie bei niedrigem Ca-Angebot (30 μM) in Nährlösung in der Klimakammer kultiviert wurden, wurde mittels Einweg-Spritzen 10 bis 20 μL aufkonzentrierter AWF in die Hauptblattader injiziert, so daß die injizierte Flüssigkeit direkt in das Blattgewebe nahe der Blattader eintrat. Erkennbar war das an einer dunkel-grünen Färbung des Blattgewebes. Neben der Injektion von AWF wurde auch die Wirkung der Injektion von Oligogalakturonide mit $\text{DP} > 9$ (durch Säure-Hydrolyse von Polygalakturonsäure und wiederholtes chromatographisches Aufreinen von der Arbeitsgruppe von Prof. Van Cutsem hergestellt) untersucht. Als Kontrolle diente demineralisiertes Wasser, das in Blätter von Parallelpflanzen injiziert wurde.

Die behandelten Blätter wurden in den darauffolgenden 5 Tagen täglich auf makroskopisch sichtbare Gewebeveränderungen hin untersucht. In fast allen Fällen, d.h. unabhängig davon ob AWF oder Wasser in das Gewebe injiziert worden ist, wurde eine Verbräunung der Injektionsstelle innerhalb eines Tages beobachtet.

Weder nach Injektion aufkonzentrierter AWF von Ca-Mangelpflanzen noch nach Injektion von Oligogalakturonide mit $\text{DP} > 9$ in junge Blätter von Kartoffelpflanzen, die in Nährlösung kultiviert wurden, wurden Gewebeveränderungen, ähnlich denen von Ca-Mangelsymptomen, beobachtet. Nur in einigen Fällen wurden eine unspezifische Bleichung des Gewebes festgestellt (Abb. 47A). Allerdings war diese Beobachtung ein Einzelfall, der nicht reproduzierbar war.

Festzuhalten bleibt somit, daß die Induktion der Ausbildung von Ca-Mangelercheinungen durch die Injektion von (aufkonzentrierter) AWF von Ca-Mangelpflanzen der Sorte 'Adelheid' in Blätter von Kontrollpflanzen nicht erreicht werden konnte.

Einzig durch Injektion von käuflicher *endo*-Polygalakturonase pilzlichen Ursprungs wurde ein Nekrotisierung und Verschwärzung sowie ein Stabilitätsverlust der Blattnerven an der Injektionsstelle erreicht (Abb. 47B). Diese Beobachtungen konnten an Pflanzen gemacht werden, die sowohl bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) wie auch die bei niedrigem Ca-Angebot kultiviert wurden. Des weiteren wurde kein Unterschied dazwischen festgestellt, ob Injektion der *endo*-Polygalakturonase in Blätter der Sorte 'Adelheid' oder der Sorte 'Bintje' erfolgte.

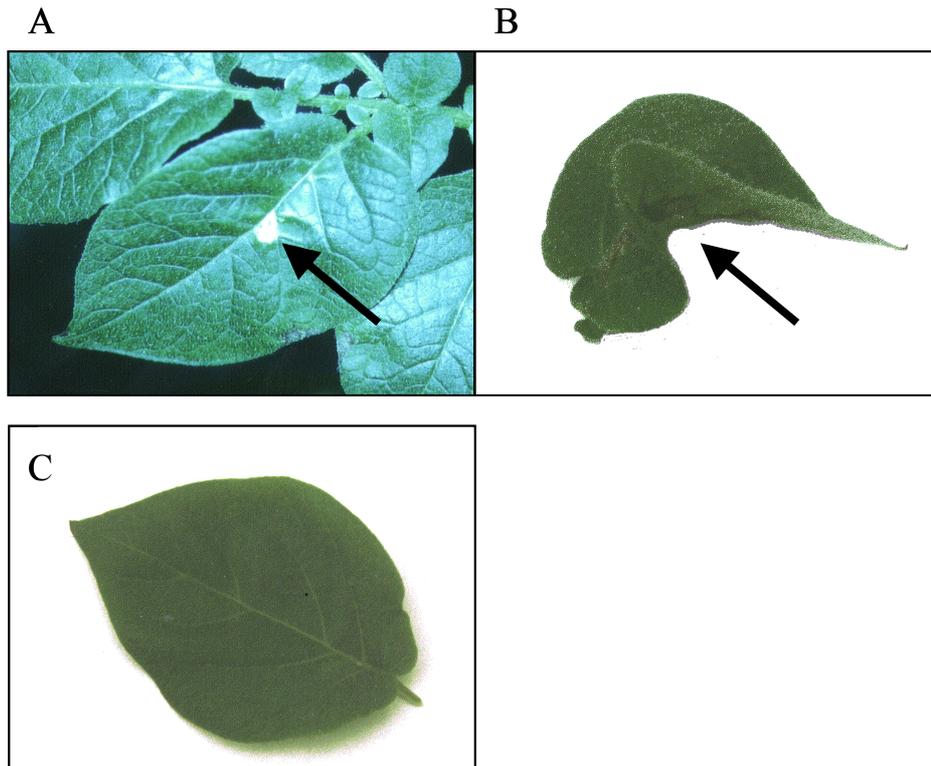


Abb. 47: Kartoffelblätter zwei Tage nach Injektion von (A) aufkonzentrierter Apoplastenwaschflüssigkeit von Ca-Mangelblättern der Sorte 'Adelheid', (B) Polygalakturonase (*Aspergillus niger*; 10-20 μL mit 10 U mL^{-1}) sowie (C) für 20 min gekochte Polygalakturonase (*Aspergillus niger*; 10-20 μL mit 10 U mL^{-1})

3.4 Ca-Konzentration im Zellwandbereich

3.4.1 Methodische Voruntersuchungen

Ein wesentliches Problem bei der Ermittlung der Ionenzusammensetzung der Apoplastenflüssigkeit von Blättern liegt in der Zugänglichkeit zu diesem Kompartiment. Die Auszentrifugation der reinen Apoplastenflüssigkeit aus Kartoffelblättern ließ sich nicht durchführen, ohne daß makroskopisch sichtbare Blattschädigungen auftraten. Die Abschätzung der Konzentration des in der Apoplastenflüssigkeit gelösten Ca erfolgte daher mit zwei anderen methodischen Ansätzen: der Infiltration-Zentrifugations-Methode (IZ-Methode) und der Infiltrations-Diffusions-Methode (ID-Methode).

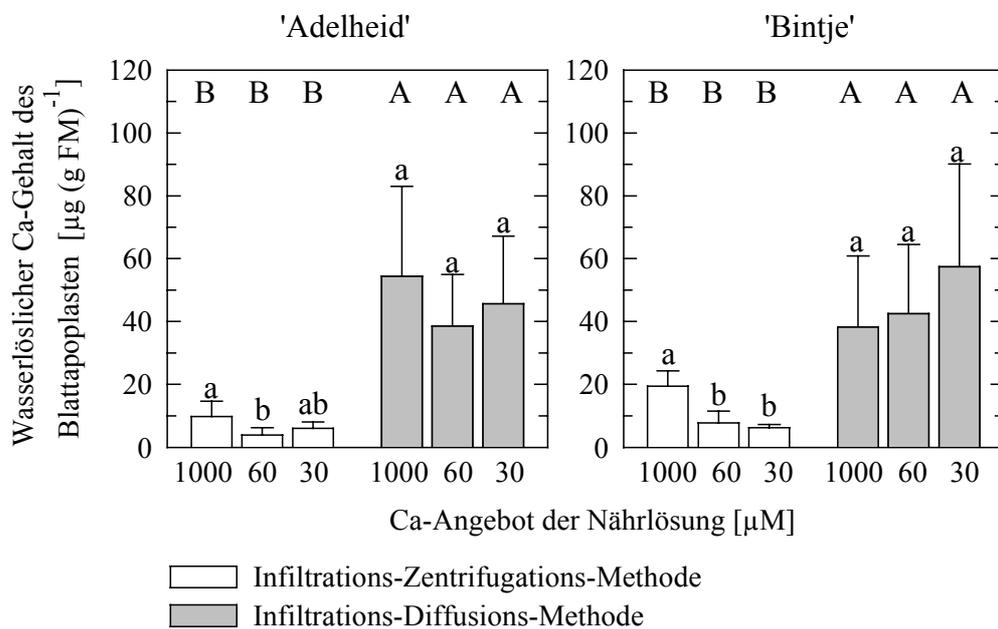
Die Ca-Gehalte des Blattapoplasten junger Blätter (BPI = 2,5) wurden mit der IZ-Methode und mit der ID-Methode von verschiedenen Pflanzen eines Versuches mit den Sorte 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) bei drei Ca-Angeboten ermittelt und in Abb. 48 einander gegenübergestellt.

Bei beiden Sorten und allen drei untersuchten Ca-Stufen wurden durch die ID-Methode signifikant höhere lösliche Ca-Gehalte im Blattapoplasten im Vergleich zur IZ-Methode gemessen. Abhängig von Sorte und Ca-Angebot waren die mit der ID-Methode ermittelten Ca-Gehalte um Faktor 2 bis 10 höher als bei der IZ-Methode (Abb. 48). Des weiteren wurden bei den mit der ID-Methode ermittelten Ca-Gehalten statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Ca-Angeboten festgestellt. Demgegenüber ließ sich bei den mit der IZ-Methode ermittelten Ca-Gehalten ein Einfluß des Ca-Angebotes erkennen. Hier waren die Ca-Gehalte bei 1000 µM Ca-Angebot signifikant größer als bei niedrigem Ca-Angebot, wobei der Unterschied zu den Ca-Gehalten bei 60 und 30 µM Faktor 2 bis 3 betrug. Die statistische Auswertung des Sortenvergleichs ist der Übersichtlichkeit wegen in Abb. 48 nicht wiedergegeben, wurde aber durchgeführt. Demnach ließ sich bei keinem Ca-Angebot und keiner Methode ein signifikanter Unterschied in den wasserlöslichen Ca-Gehalten des Blattapoplasten zwischen den beiden unterschiedlich Ca-effizienten Sorten festgestellt.

Es bleibt die Frage, mit welcher Methode am ehesten die Ionenverhältnisse im Blattapoplasten *in situ* beschrieben werden und aus welchen Gründen die Methoden zu so unterschiedlichen Ca-Gehalten im Blattapoplasten führten.

Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den beiden Methoden bestand in der Zeitdauer des infiltrierten Zustandes des Blattgewebes. Bei der IZ-Methode beträgt die Dauer im infiltrierten Zustand des Blattgewebes ca. 5 min, bei der ID-Methode hingegen 60 min. Wurde bei der IZ-Methode diese Zeitdauer verlängert, indem infiltrierte Blätter bis zur Zentrifugation in wasser-

dampfgesättigter Atmosphäre zwischengelagert wurden, ließen sich in der AWF keine erhöhten Ca-Gehalte feststellen (Tab. 14).



F-Test:

Methode ***, Ca-Angebot n.s., Sorte n.s., Interaktionen n.s.

Abb. 48: Einfluß der Methode (Infiltrations-Zentrifugations- und Infiltrations-Diffusions-Methode) auf die wasserlöslichen Ca-Gehalte des Blattapoplasten junger Kartoffelblätter (BPI 2,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung für 30 d (n = 6; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Stufe innerhalb einer Sorte und Methode und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Methoden innerhalb einer Sorte und eines Ca-Angebotes nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Tab. 14: Einfluß der Infiltrationsdauer des Blattgewebes auf die Ca-Gehalte der Apoplastenwaschflüssigkeit (n = 4; keine signifikanten Unterschiede nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Zeitdauer	Ca-Gehalt der AWF	
[min]	[$\mu\text{g (g FM)}^{-1}$]	
5	12,5	$\pm 3,8$
30	18,3	$\pm 5,9$
60	14,9	$\pm 7,5$

Wurden hingegen Blattscheiben für einen längeren Zeitraum in demineralisiertem Wasser inkubiert, so läßt sich feststellen, daß auch nach 1 h Inkubation weiterhin noch Ca in die Aussenlösung diffundiert (Abb. 49). Über den gesamten Inkubationszeitraum von 20 h betrachtet, bestand eine enge logarithmische Beziehung zwischen der Ca-Freisetzung und der Inkubationszeit. Der zeitliche Verlauf der Ca-Wiederfindung in der Aussenlösung bei der ID-Methode (Abb. 49) folgt dem

Verlauf einer stark behinderten Diffusion sein. Es ist aber auch möglich diesen Verlauf dadurch zu erklären, daß bei dieser Ca-Freisetzung nicht nur Ca aus der Apoplastenflüssigkeit in die Aussenlösung diffundiert, sondern auch von der Zellwand adsorbiertes Ca "nachgeliefert" wird. Wird die Zellwand als polyfunktioneller Austauscher betrachtet, an dessen negativen Ladungsstellen Ca-Ionen mit unterschiedlicher Intensität gebunden sind, so ist denkbar, daß indem der Austauscher mit einem größeren Flüssigkeitsvolumen in Kontakt gebracht wird, zusätzlich – schwach adsorbierte - Ca-Ionen von den Ladungsstellen desorbiert werden. Eine Rolle mag hierbei auch spielen, daß durch fortgesetzten K-Efflux aus der Zelle in gewissem Maß ein Kationenaustausch zwischen K und Ca erfolgt. Die in der Inkubationsflüssigkeit nachweisbaren Ca-Ionen würden demzufolge nicht nur das Ca aus der wäßrigen Phase des Blattapoplasten widerspiegeln, sondern auch ehemals an der Zellwand sorbiertes Ca. Dadurch ließe sich der Unterschied in dem Niveau der "wasserlöslichen Ca-Gehalte des Blattapoplasten" zwischen den beiden Methoden erklären.

Da dementsprechend die Infiltrations-Diffusions-Methode für die Charakterisierung der Ca-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit *in situ* weniger geeignet erschien, wurde in den weiteren Untersuchungen die Infiltrations-Zentrifugations-Methode verwendet.

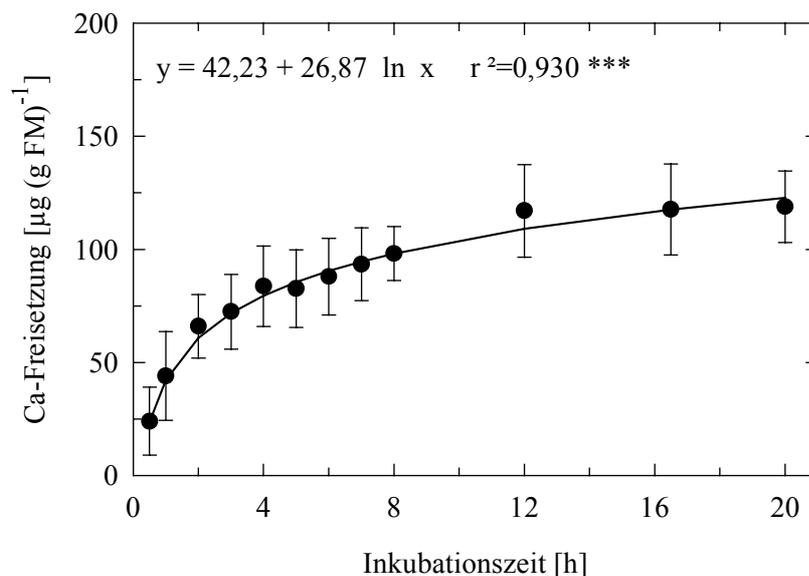


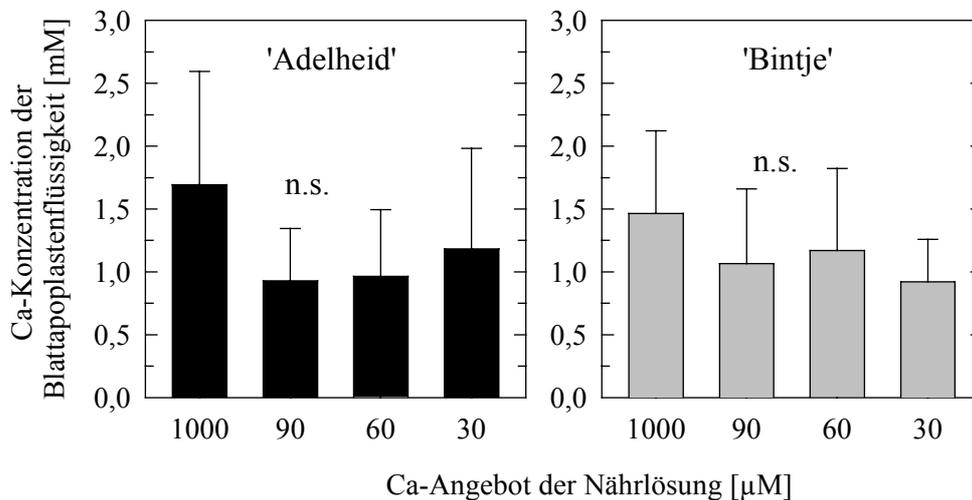
Abb. 49: Kumulierte Freisetzung von Ca in die Aussenlösung aus sechs mit demineralisiertem Wasser infiltrierten Blattscheiben (6 mm Durchmesser) junger Kartoffelblätter der Sorte 'Bintje' bei 1000 μM Ca-Angebot der Pflanzen in Nährlösung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in 10 mL demineralisiertem Wasser (Infiltrations-Diffusions-Methode) ($n = 8$)

3.4.2 Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit

Die Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit läßt sich unter Berücksichtigung des Interzellularvolumens und des Apoplastenwassergehaltes aus der Ca-Konzentration der Apoplastenwaschflüs-

sigkeit (AWF) ermitteln. In Abb. 50 sind die Ca-Konzentrationen der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der beiden unterschiedlich Ca-effizienten Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) bei vier Ca-Angeboten dargestellt. Varianzanalytisch ließ sich ein Einfluß des Ca-Angebotes auf die Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit absichern. Die Ca-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit zwischen hohem und niedrigem Ca-Angebot unterschied sich hier bei beiden Sorten um Faktor 1,5. Im Vergleich dazu sei erwähnt, daß dieser Unterschied bei Gesamt-Ca-Gehalten derselben Blätter Faktor 6 ('Bintje') bzw. 9 ('Adelheid') betrug (Daten nicht dargestellt). Signifikante Unterschiede in der Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit zwischen den unterschiedlich Ca-effizienten Sorten waren bei keinem Ca-Angebot absicherbar (Abb. 50). Die in der Blattapoplastenflüssigkeit gelösten Ca-Mengen entsprachen im Mittel über beide Sorten bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) 1 % und bei niedrigem Ca-Angebot (30 μM) 3 % der Gesamt-Ca-Mengen der Blätter (Daten nicht dargestellt). Zwischen der Stärke der Ca-Mangelsymptome und der Ca-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit bestand bei keiner der beiden Sorten ein Zusammenhang (Abb. 51). Ebenfalls bestand keine Beziehung zwischen der Ca-Konzentration und der Uronsäure-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit (nicht dargestellt).

Festzuhalten bleibt, daß sich die beiden unterschiedlich Ca-effizienten Sorten bei niedrigem Ca-Angebot der Nährlösung nicht in der Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Blätter unterschieden.



F-Test: Ca-Angebot *, Sorte n.s., Ca-Angebot x Sorte n.s.

Abb. 50: Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung (n = 10 - 11; keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten sowie zwischen den Ca-Stufen nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

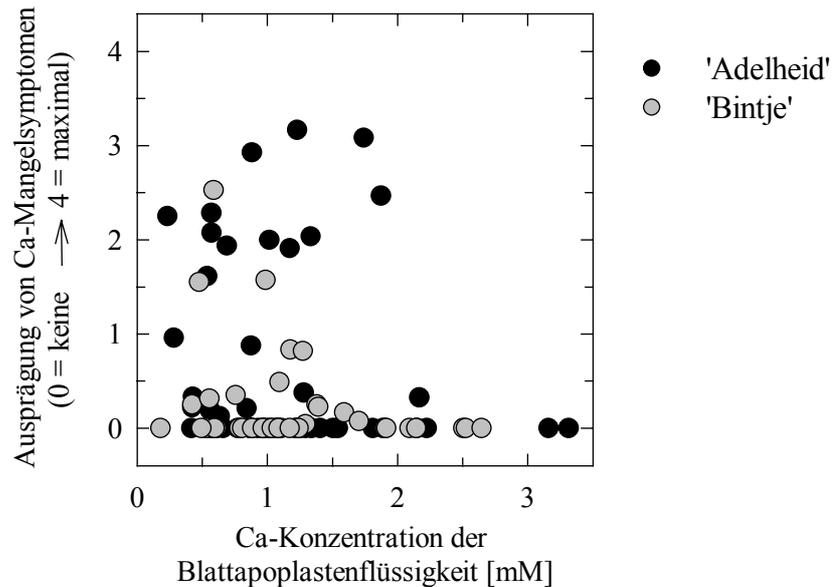


Abb. 51: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen in Abhängigkeit der Ca-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' nach 28 d bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung

3.4.3 Konzentration an ionischem Ca^{2+} und organischen Säuren in der Apoplastenflüssigkeit

Physiologisch betrachtet kann der Konzentration an ionischem Ca^{2+} in der Apoplastenflüssigkeit eine größere Bedeutung zukommen als der Konzentration des in ionischer und komplexierter Form vorliegenden Ca. Daher wurde die Frage untersucht, ob die Konzentration des in ionischer Form vorliegenden Ca in einer engeren Beziehung zur Ca-Effizienz steht als die Gesamt-Konzentration an Ca, wie sie ohne Unterscheidung einer möglichen Komplexierung mit dem Atomabsorptionsspektrometer bestimmt wird. In diesem Zusammenhang könnten organischen Säure-Anionen, insbesondere Oxalat und Citrat, in der Apoplastenflüssigkeit aufgrund ihres hohen Komplexierungsvermögens für Ca-Ionen eine große Bedeutung zukommen. Mit dem Ziel die Konzentration organischer Säure-Anionen im Blattapoplasten zu beeinflussen, wurde ein Versuch mit unterschiedlichen N-Angebotsformen durchgeführt. Pflanzen der Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) wurden bei reiner NO_3 -Ernährung, sowie reiner NH_4 -Ernährung und NH_4NO_3 -Ernährung bei jeweils drei unterschiedlich hohen Ca-Angeboten kultiviert.

Bei allen drei N-Ernährungsformen zeigte die Sorte 'Adelheid' bei dem hier betrachteten Blattalter (BPI 3,5) eine deutliche stärkere Ausprägung an Ca-Mangelsymptomen (Abb. 52). Beiden Sorten war gemeinsam, daß bei NH_4 - und NH_4NO_3 -Ernährung die Blattrandnekrosen stärker ausgeprägt waren als bei NO_3 -Ernährung (Abb. 52).

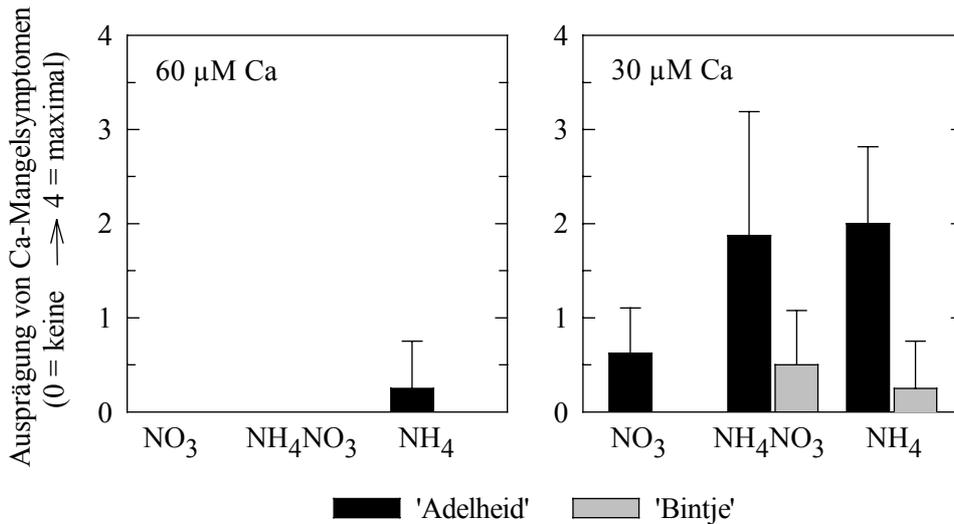


Abb. 52: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) junger Kartoffelblätter (BPI 3,5) der Sorte 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher Form der N-Ernährung und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 21 d (n = 6)

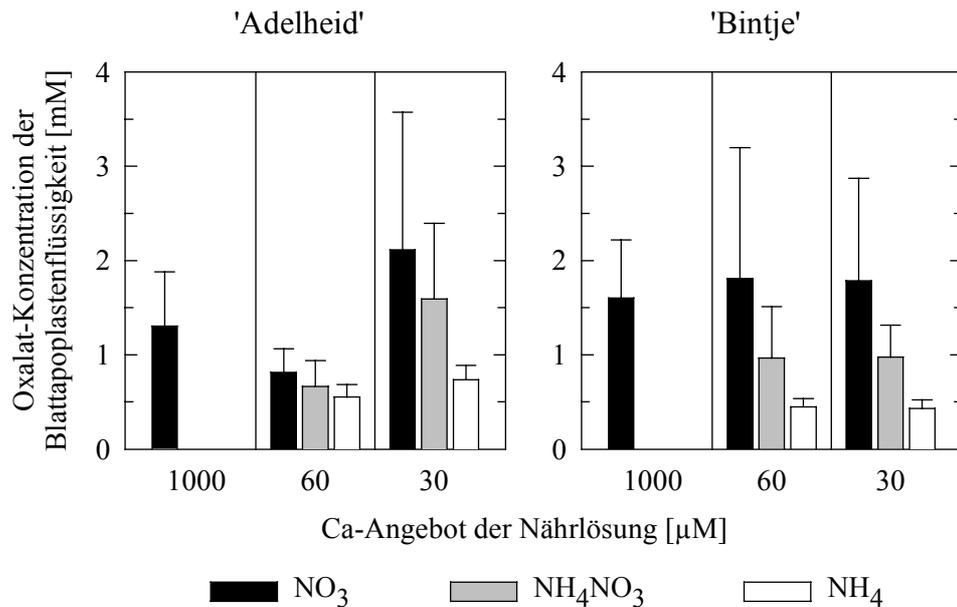
Unabhängig von der Form der N-Ernährung und dem Ca-Angebot konnte bei allen Pflanzen in der AWF der Blätter mit BPI 3,5 Succinat und Fumarat nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Citrat und Malat ließen sich nur bei einigen NO₃-ernährten Pflanzen in der AWF nachweisen. Hingegen konnte bei allen NO₃-ernährten Pflanzen Oxalat in der AWF nachgewiesen werden (Abb. 53). Demgegenüber ließ sich bei den NH₄NO₃- sowie den NH₄-ernährten Pflanzen Oxalat nur bei Pflanzen mit niedrigem Ca-Angebot (60, 30 μM) nachweisen, nicht jedoch bei allen Pflanzen mit hohem Ca-Angebot (1000 μM). Ein Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Höhe der Oxalat-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit ließ sich varianzanalytisch absichern (Abb. 53). Über alle Ca-Angebotsstufen betrachtet war die Oxalat-Konzentration im Blatt-apoplasten von NO₃-ernährten Pflanzen höher als bei NH₄NO₃- und bei NH₄-ernährten Pflanzen (Abb. 53).

Die beiden unterschiedlich Ca-effizienten Sorten unterschieden sich in der Oxalat-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit nicht signifikant voneinander und auch die Mittelwerte der Oxalat-Konzentrationen wiesen keinen eindeutigen Trend auf.

In der AWF wurde die Gesamt-Ca-Konzentration atomabsorptionsspektrometrisch und die Konzentration des in freien Ca²⁺, d.h. die Aktivität, potentiometrisch bestimmt. Die auf die Apoplastenflüssigkeit bezogene Ca-Konzentration und Ca²⁺-Aktivität sind in Abb. 54 dargestellt.

Bei keinem Ca-Angebot sowie bei keiner Form der N-Ernährung ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich Ca-effizienten Sorten in der Konzentration des Gesamt-Ca sowie des freien Ca²⁺ der Apoplastenflüssigkeit feststellen.

Das unterschiedlich hohe Ca-Angebot beeinflusste sowohl die Konzentrationen des Gesamt-Ca als auch die des ionischen Ca²⁺ der Apoplastenflüssigkeit. So waren bei NO₃-Ernährung die Konzentration des Gesamt-Ca sowie des ionischen Ca²⁺ der Apoplastenflüssigkeit bei 30 μM Ca-Angebot



F-Test: N-Form ***, Ca-Angebot n.s., Sorte n.s., Interaktionen n.s.

Abb. 53: Oxalat-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 3,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher Form der N-Ernährung und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 21 d (n = 5 - 6; nach Tukey-Test bei p < 0,05 bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb einer N-Form und eines Ca-Angebotes, sowie zwischen den N-Formen innerhalb einer Sorte und eines Ca-Angebotes des weiteren zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte und einer N-Form)

in der Nährlösung im Mittel jeweils um Faktor 5 niedriger als bei 1000 μM Ca. Bei NH₄- sowie bei NH₄NO₃-Ernährung lag dieser Faktor zwischen 2 und 4. Ein Vergleich der absoluten Größen der Konzentrationen des Gesamt-Ca und des ionischen Ca²⁺ der Apoplastenflüssigkeit zeigt, daß bei NO₃-Ernährung im Mittel nur 44 % des Ca der Apoplastenflüssigkeit in ionischer Form vorliegt. Bei NH₄-Ernährung beträgt dieser Anteil 49 % und bei NH₄NO₃-Ernährung 77 %.

Signifikante Unterschiede in der Ca²⁺-Aktivität zwischen den N-Ernährungsformen wurden nicht festgestellt. Bei dem niedrigsten Ca-Angebot deutete sich aber an, daß bei NO₃-Ernährung die Ca²⁺-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit niedriger war als bei NH₄NO₃- und bei NH₄-Ernährung (Abb. 54). In Zusammenhang mit der geringeren Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei NO₃-Ernährung im Vergleich zu NH₄NO₃- und NH₄-Ernährung betrachtet (Abb. 52), ergab sich keine negative Beziehung zwischen der Ca²⁺-Aktivität und der Symptomausprägung. Auch ein enger Zusammenhang zwischen der Ca²⁺-Aktivität und der genotypischen Ca-Effizienz ergab sich nicht. So zeigen die beiden Sorten bei reiner NH₄-Ernährung eine unterschiedliche Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 52) bei gleich hoher Ca²⁺-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit (Abb. 54). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die höhere Ca-Effizienz der Sorte 'Bintje' im Vergleich zu der Sorte 'Adelheid' nicht mit einer höheren Ca-Konzentration oder einer höheren Ca²⁺-Aktivität in der wässrigen Phase des Blattapoplasten junger Blätter erklärt werden konnte.

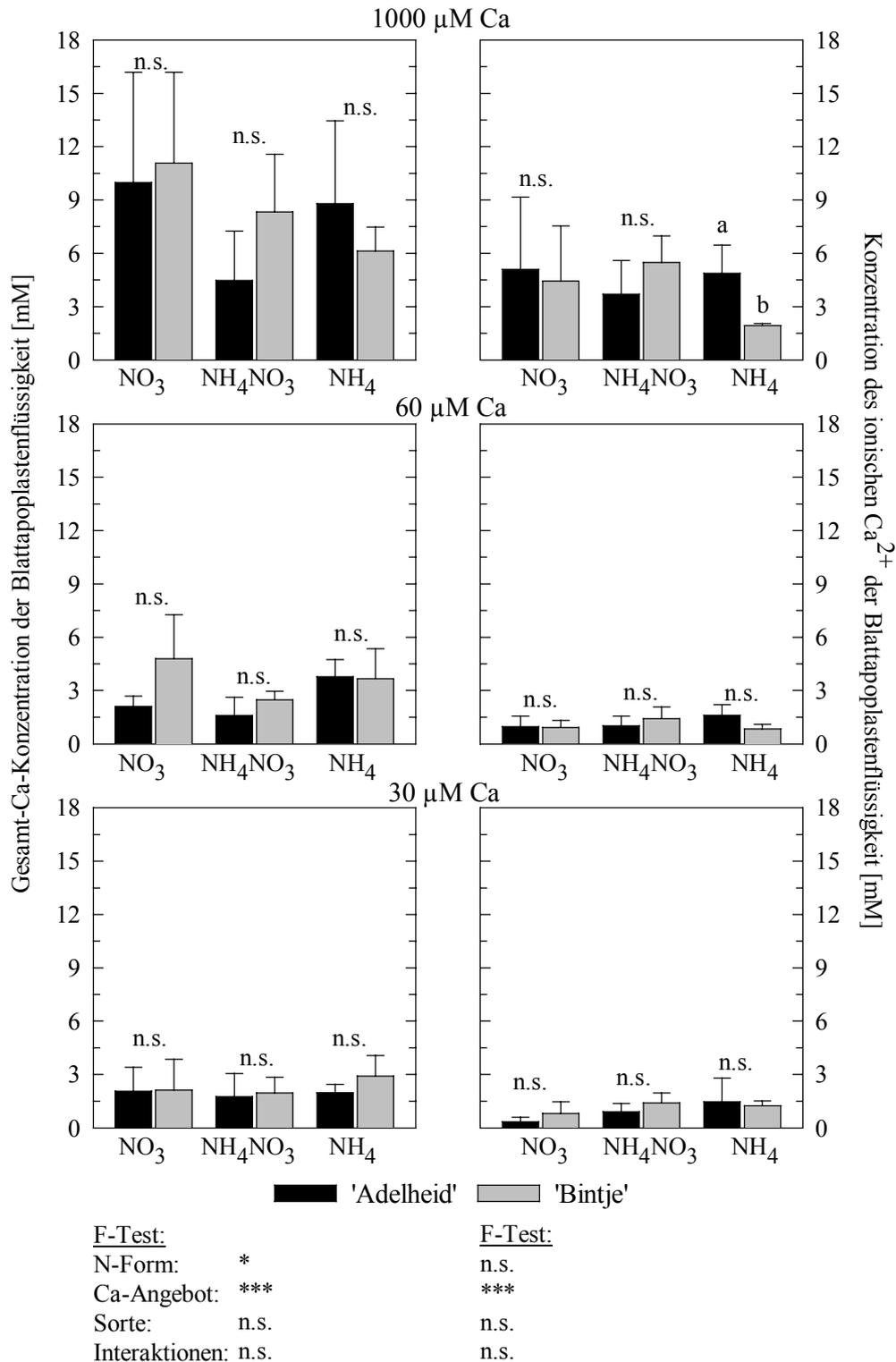


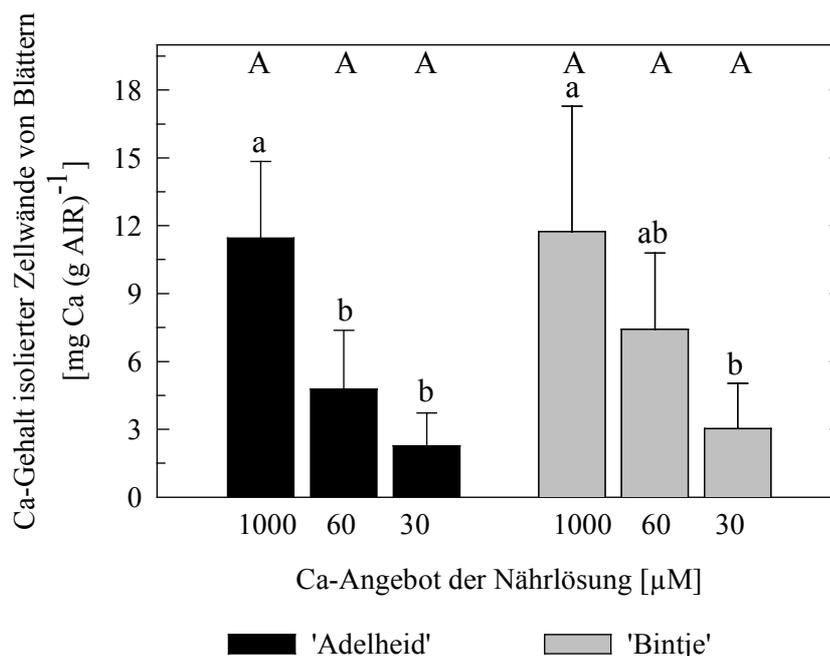
Abb. 54: Konzentration des Gesamt-Ca und des ionischen Ca^{2+} der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 3,5) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlicher Form der N-Ernährung und unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 21 d ($n = 5 - 6$; Mittelwertvergleich zwischen den Sorten nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

3.4.4 Ca-Gehalt der Zellwand

Während die Ca-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit keine Erklärungsansatz für die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen den Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bieten, könnte ein Erklärungsansatz in den Ca-Gehalten der Zellwand liegen. Insbesondere im Hinblick auf den Einfluß von Ca auf die Degradation der Pektinsubstanz könnte dem zellwandgebundenem Ca eine besondere Bedeutung zukommen.

Es konnten allerdings auch keine signifikanten Unterschiede in den Ca-Gehalten isolierter Zellwände (AIR) junger Blätter zwischen den unterschiedlich Ca-effizienten Sorten festgestellt werden (Abb. 55). Die Ca-Gehalte der Zellwand junger Kartoffelblätter der beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' wurden durch ein niedriges Ca-Angebot signifikant erniedrigt. Der Unterschied in den Ca-Gehalten zwischen hohem und niedrigem Ca-Angebot betrug bei der Sorte 'Adelheid' Faktor 4,4 und bei der Sorte 'Bintje' 3,7.

Zwischen den Ca-Gehalten der Zellwand und der Stärke der Symptomausprägung bestand bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' ein signifikanter Zusammenhang (Abb. 56).



F-Test:

Ca-Angebot der Nährlösung: ***, Sorte: n.s., Ca-Angebot x Sorte: n.s.

Abb. 55: Ca-Gehalt isolierter Zellwände (AIR) junger Blätter (BPI 2 - 4) der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 30 d (n = 4 - 5; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Allerdings war der Erklärungswert für die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen durch die Ca-Gehalte der Zellwand mit 68 % nur leicht höher als der entsprechende Erklärungswert der Gesamt-Ca-Gehalte der Blätter mit 59 %. Bei der Sorte 'Bintje' ergab sich zwischen den Ca-Gehalten der Zellwand und der Symptomausprägung ein deutlich schwächerer Zusammenhang als zwischen den Gesamt-Ca-Gehalten der Blätter und der Symptomausprägung (Abb. 56). Die Ca-Gehalte der Zellwand lieferten keinen hinreichenden Ansatz die unterschiedliche Ca-Effizienz der beiden untersuchten Kartoffelsorten kausal zu erklären, da keine Sortenunterschiede in diesem Parameter bestanden (Abb. 55, 56A).

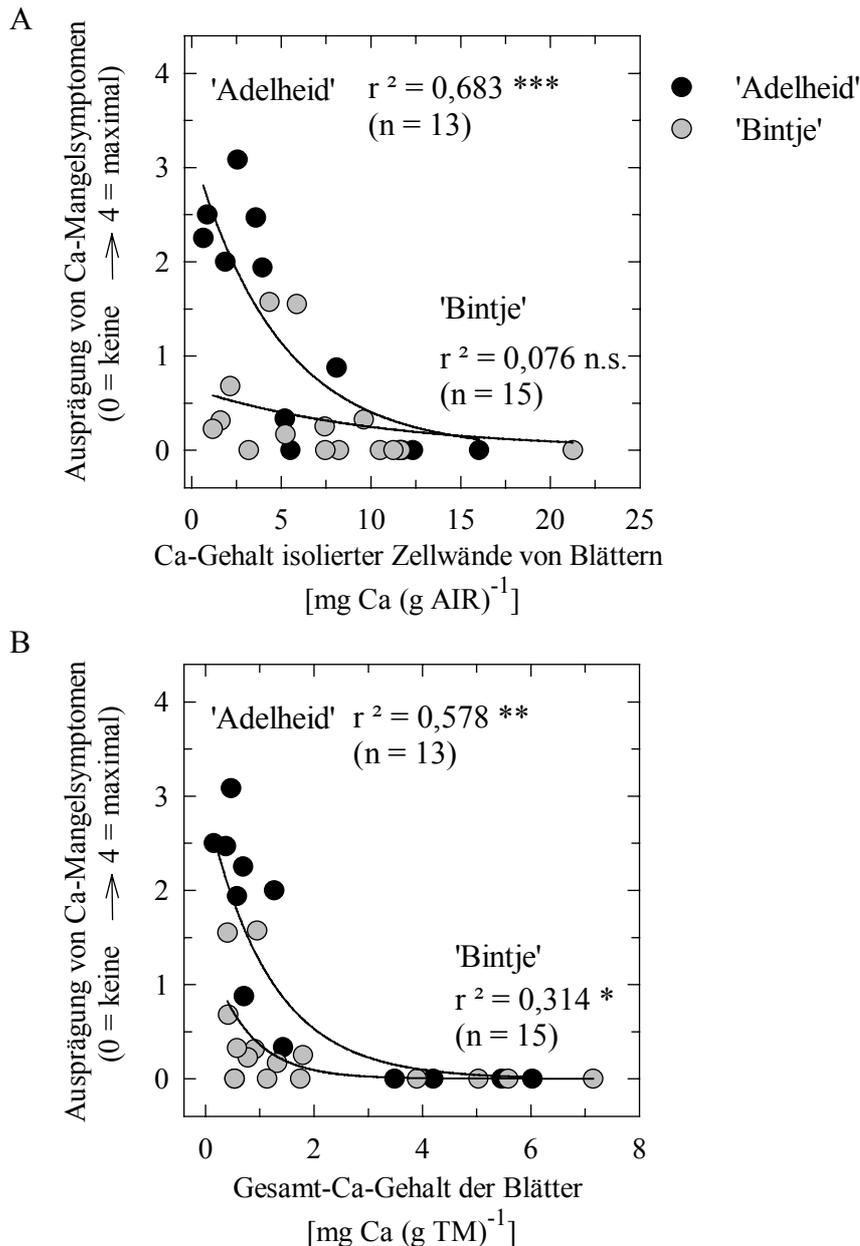


Abb. 56: Beziehung zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und (A) dem Ca-Gehalt isolierter Zellwände (AIR) und (B) dem Gesamt-Ca-Gehalte junger Blätter (BPI 2 - 4) der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 30 d

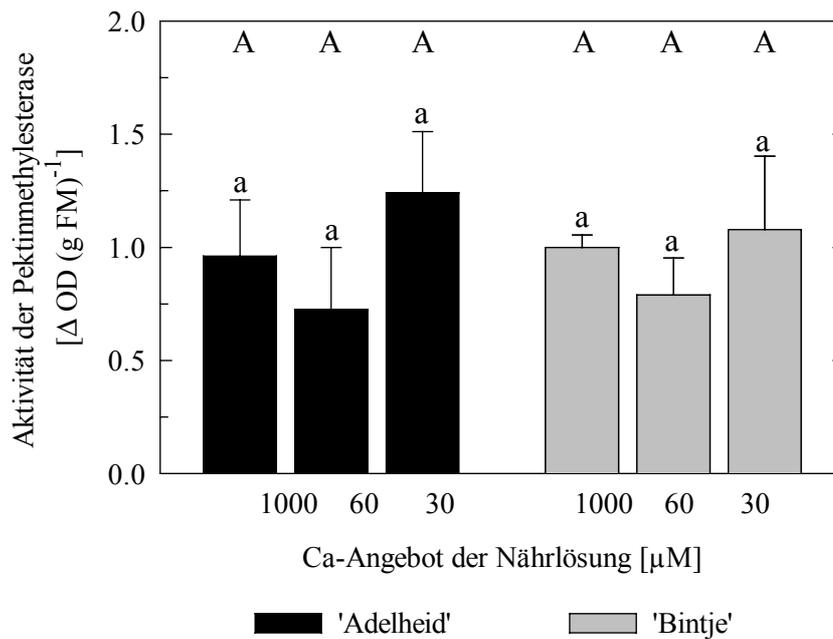
3.5 Untersuchung der Aktivität Pektin-modifizierender Enzyme

Da es Hinweise aus der Literatur gibt, daß der Ca-Versorgungsgrad des pflanzlichen Geweben einen Einfluß auf die Aktivität pektolytischer Enzyme hat, wurden diesbezüglich Untersuchungen vorgenommen. Dabei ist zum einen die Polygalakturonase (PG) interessant, die gering methyliertes Pektin degradieren kann, und des weiteren die Enzyme Pektinmethylesterase und β -Galaktosidase, die die Pektinsubstanz so verändern können, daß es leichter durch die PG degradiert werden kann.

Ein deutlicher Einfluß des Ca-Status der Blätter auf die Aktivität der Pektinmethylesterase (Abb. 57) junger Kartoffelblätter wurde nicht beobachtet. Auch die Sorten unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Aktivität der Pektinmethylesterase.

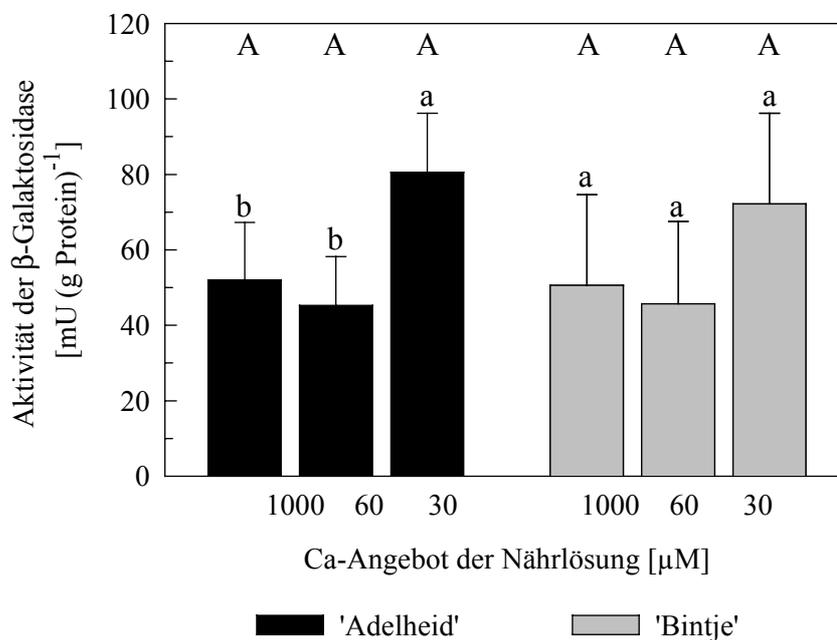
Die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase (Abb. 58) bei den Blattextrakten von Pflanzen der Sorte 'Adelheid' war bei dem niedrigsten Ca-Angebotes ($30\mu\text{M Ca}$) signifikant um Faktor 2 höher als bei $60\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M Ca}$ -Angebot. Bei der Sorte 'Bintje' war die Aktivität der β -Galaktosidase-Aktivität zumindest tendenziell bei $30\mu\text{M Ca}$ -Angebot um Faktor 1,5 erhöht gegenüber $60\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M Ca}$ -Angebot. Von der Aussage her ein ähnliches Ergebnis, allerdings mit größerer Streuung behaftet, zeigte sich, wenn statt dem Proteingehalt die Frischmasse als Bezugsbasis verwendet wurde (Daten nicht dargestellt).

Die Aktivität der Polygalakturonase (PG) (Abb. 59) im Homogenat junger Blätter der Sorte 'Adelheid' nahm mit abnehmendem Ca-Versorgungsgrad der Blätter um Faktor 2,5 zu. Ein ähnlicher Einfluß des Ca-Angebotes der Nährlösung auf die Aktivität der PG bei der Sorte 'Bintje' konnte nicht festgestellt werden. Auffällig war allerdings die etwa um Faktor 2 höhere Aktivität der PG bei Blattextrakten der Sorten 'Bintje' gegenüber der Sorte 'Adelheid'.



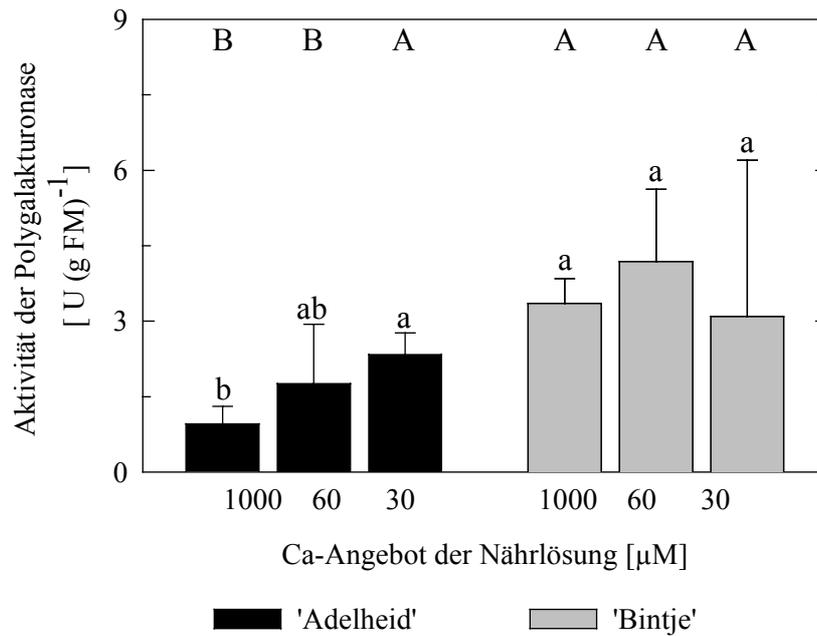
F-Test: Ca-Angebot n.s., Sorte n.s., Ca-Angebot x Sorte n.s.

Abb. 57: Aktivität der Pektinmethylesterase im Homogenat junger Blätter (BPI 3) der Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 30 d (n = 5 - 6)



F-Test: Ca-Angebot **, Sorte n.s., Ca-Angebot x Sorte n.s.

Abb. 58: Aktivität der β-Galaktosidase im Homogenat junger Blätter (BPI 3) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 30 d (n = 5 - 6; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)



F-Test: Ca-Angebot n.s., Sorte **, Ca-Angebot x Sorte n.s.

Abb. 59: Aktivität der Polygalakturonase junger Blätter (BPI 3) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung für 30 d (n=5 - 6; verschiedene kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb einer Sorte und verschiedene große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb eines Ca-Angebotes nach Tukey-Test bei $p < 0,05$)

4 DISKUSSION

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragen hinsichtlich der Beziehung zwischen Ca-Ernährung und Integrität der Pektinsubstanz sollten nicht nur an Kartoffelpflanzen mit unterschiedlichem Ca-Versorgungsgrad untersucht werden, sondern vielmehr unterstützt werden durch die Untersuchung von Kartoffelsorten, die sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigen Ca-Angebot in der Nährlösung, und damit in ihrer Ca-Effizienz unterscheiden. Daher wird im ersten Teil der Diskussion auf die Identifizierung Ca-effizienter Genotypen und die Stabilität genotypischer Unterschiede in der Ca-Effizienz eingegangen. Der zweite Teil setzt sich mit der wesentlichen Frage nach der möglichen ursächlichen Beteiligung biologisch aktiver Oligogalakturonide an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen auseinander.

Genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz

Für die Identifizierung unterschiedlich Ca-effizienter Genotypen wurden, ähnlich wie in den Arbeiten von ENGLISH & MAYNARD (1981) als auch GIORDANO et al. (1982), als Kriterien nicht nur das Wachstum bei niedrigem Ca-Angebot, sondern auch die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) herangezogen. Ein Ca-effizienter Genotyp sollte bei niedrigem Ca-Angebot sowohl ein größeres Wachstum als auch eine geringere Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen aufweisen als ein Ca-ineffizienter Genotyp.

Mit dem Ziel Genotypen zu identifizieren, die sich deutlich in ihrer Ca-Effizienz unterscheiden, wurde in einem Nährlösungsversuch (dessen Ergebnisse im Anhang 7.3 dargestellt wurden) unter kontrollierten Klimakammer-Bedingungen ein weites Spektrum an *Solanum*-Genotypen, das Wildarten, Primitivformen und Kultursorten der Kartoffel umfasste, auf ihre Ca-Effizienz untersucht. Die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen den untersuchten *Solanum*-Genotypen sind im Vergleich zu den Unterschieden in der Ca-Effizienz, die ENGLISH & MAYNARD (1981) für *Lycopersicon*-Genotypen beschrieben haben, als gering anzusehen. Bei Untersuchung der Ca-Effizienz von 44 *Lycopersicon*-Genotypen zeigte der Ca-effizienteste Genotyp keine Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und eine höhere Trockenmasse als die Ca-ineffizientesten Genotypen. Demgegenüber zeigten die hier untersuchten *Solanum*-Genotypen zwar auch Unterschiede im Wachstum bei dem niedrigsten Ca-Angebot (Tab. 19), aber alle Genotypen reagierten auf das niedrige Ca-Angebot der Nährlösung mit einer, wenn auch unterschiedlich starken, Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Abb. 67). Während in hier neben einem Wachstumsparameter auch die Stärke der Ca-Mangelsymptome für die Einschätzung der Ca-Effizienz herangezogen wurden, wird in der Literatur (GRAHAM, 1984; CLARK, 1990; GOURLEY et al., 1994) der Begriff der Nährstoff-Effizienz meist lediglich in Zusammenhang mit dem Wachstum oder Ertrag verwendet. Genotypische Unterschiede in der gebildeten Trockenmasse bei suboptimalem Nährstoff-Angebot, und damit die Unterschiede in der Nährstoff-Effizienz, können zum einen auf einer effizienten

Aufnahme des Nährstoffes (Aufnahme-Effizienz) und zum zweiten auf einer effizienten Nutzung des aufgenommenen Nährstoffes zur Trockenmassen-Bildung (Verwertungs-Effizienz) beruhen (SATTELMACHER et al., 1994). Bei den untersuchten *Solanum*-Genotypen zeigte sich, daß die genotypischen Unterschiede in der Nutzung des Ca-Angebotes der Nährlösung zur Trockenmassen-Bildung im wesentlichen auf einer effizienten Aufnahme von Ca (Aufnahme-Effizienz) und weniger auf einer effizienten Verwertung des aufgenommenen Ca (Verwertungs-Effizienz) (Tab. 23). Demgegenüber konnten GERLOFF und Mitarbeiter (GIORDANO et al., 1982; GABELMAN & GERLOFF, 1983) bei der Untersuchung der Ca-Effizienz von 138 *Lycopersicon*-Genotypen sowohl aufnahme-effiziente als auch verwertungs-effiziente Genotypen identifizieren und Genotypen mit einer hohen Aufnahme-Effizienz und gleichzeitig einer hohen Verwertungs-Effizienz. ENGLISH & MAYNARD (1981) führten die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen den untersuchten 44 *Lycopersicon*-Genotypen hauptsächlich auf Unterschiede in der Verwertungs-Effizienz zurück.

Innerhalb der untersuchten 16 *Solanum*-Genotypen stellten sich die Sorte 'Bintje' zusammen mit der Wildart *S. chacoense* als die Genotypen mit der höchsten Ca-Effizienz heraus und die Sorte 'Ijsselster' als der Ca-ineffizienteste Genotyp. Da als Ca-effizientester und Ca-ineffizientester Genotyp jeweils eine Kultursorte identifiziert wurde, konnte auf eine weitere Verwendung von Wildarten und Primitivformen der Kartoffel verzichtet werden.

Um zu prüfen, ob klimatische Bedingungen einen Einfluß auf die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen Kartoffelsorten haben, wurden sechs Kartoffelsorten parallel unter Gewächshaus-Bedingungen sowie unter kontrollierten Klimakammer-Bedingungen auf ihre Ca-Effizienz untersucht. Die Gewächshauspflanzen bildeten während der Kulturdauer von 30 Tagen bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) in der Nährlösung eine ähnlich hohe Trockenmasse wie die Klimakammerpflanzen (Abb. 20). Anhand der Arbeit von MIDMORE & PRANGE (1992) kann davon ausgegangen werden, daß der Lichtsättigungspunkt von Kartoffelpflanzen bei einer PAR von 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (entspricht der Klimakammer-Bedingung) noch nicht erreicht ist. Sofern nicht andere Faktoren wachstumsbegrenzend sind, kann erwartet werden, daß sich eine höhere PAR positiv auf die Trockenmassen-Bildung auswirkt. Die Lufttemperatur im Gewächshaus war mit durchschnittlich 27 °C am Tag höher als in der Klimakammer mit 20 °C. INGRAM & MCCLOUD (1984) ermittelten für das Sproß- und Wurzelwachstum von Kartoffelpflanzen eine optimale mittlere Lufttemperatur von 22 – 24 °C, wobei allerdings Unterschiede in der Hitzetoleranz zwischen Kartoffel-Genotypen dokumentiert sind (SATTELMACHER et al., 1990, MIDMORE & PRANGE, 1991). Da im Gewächshaus die Lufttemperatur nicht konstant 27 °C betrug, sondern an einigen Tagen in der Mittagszeit bei wolkenlosem Himmel die Lufttemperatur bis zu 33 °C erreichte, könnten diese größeren Abweichungen von der Optimaltemperatur dazu beitragen, daß in dieser Zeit der Trockenmasse-

Aufbau trotz höherer Lichtintensität im Gewächshaus nicht erhöht war. Hinzu kommt, daß die Tageslänge (Dauer der Lichtphase) in der Klimakammer mit 16 h länger war als die astronomische Tageslänge, welche die Gewächshauspflanzen erfahren haben, mit 15,3 h zu Versuchsbeginn und 13,4 h zu Versuchsende. Umgekehrt bedeutet die kürzere Lichtphase für die Gewächshauspflanzen eine längere Dunkelphase und damit einen längeren Zeitraum der Dunkelrespiration. Es kann vermutet werden, daß die längere Dunkelphase und die höhere Nacht-Temperatur im Gewächshaus (durchschnittlich 19 °C) im Vergleich zur Klimakammer (14 °C) zu einem größeren Abbau der tagsüber aufgebauten Assimilate führte. Der zuletzt genannte Aspekt dürfte von größerer Relevanz sein, insbesondere vor dem Hintergrund, daß innerhalb des physiologischen Temperaturbereiches bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C von einer Verdopplung der Atmungsrate ausgegangen wird (TAIZ & ZIEGLER, 2000).

Geht man unter Gewächshaus-Bedingungen tagsüber von einem größeren Aufbau an Trockenmasse (aufgrund der höheren Strahlungsintensität und trotz größerer Abweichungen von der Optimaltemperatur) und nachts von einem ebenfalls größeren Abbau an Trockenmasse (aufgrund der höheren Temperaturen) aus, so könnte das eine Erklärung für die ähnlich hohe Trockenmasse von Gewächshaus- und Klimakammerpflanzen bei hohem Ca-Angebot (1000 µM) liefern.

Bei niedrigem, wachstumsbegrenzendem Ca-Angebot (30 µM) kann vermutet werden, daß aufgrund des suboptimalen Ca-Angebotes die Gewächshauspflanzen tagsüber nicht mehr Trockenmasse bildeten als die Klimakammerpflanzen, aber da die Gewächshauspflanzen nachts mehr Assimilate wieder veratmen als die Klimakammerpflanzen, könnte sich anhand dessen die tendenziell niedrigere (Netto-) Trockenmasse der Gewächshauspflanzen im Vergleich zu den Klimakammerpflanzen (Abb. 20) erklären lassen.

Auffällig war bei dem dargestellten Versuch, daß die Ca-Gehalte der Blätter der Gewächshauspflanzen bei hohem Ca-Angebot durchschnittlich 40 % höher und bei niedrigem Ca-Angebot durchschnittlich 90 % höher waren als die der Klimakammerpflanzen (Abb. 22). Diese erhöhten Blatt-Ca-Gehalte konnten nicht über eine entsprechend höhere Ca-Aufnahme der Gewächshauspflanzen erklärt werden. Vielmehr wurde sowohl bei hohem Ca-Angebot als auch bei niedrigem Ca-Angebot ein deutlicher Einfluß der unterschiedlichen Umweltbedingungen auf die Verlagerung des aufgenommenen Ca in die Blätter festgestellt. Dabei war die Ca-Akkumulation in den Blättern unter Gewächshaus-Bedingungen im Vergleich zu den Klimakammer-Bedingungen erhöht (Abb. 23). Eine Erklärung für die größere Akkumulation von Ca in den Blättern könnte in der höheren Transpirationsbeanspruchung der Gewächshauspflanzen im Vergleich zu den Klimakammerpflanzen am Tag liegen. Die Transpirationsbeanspruchung von Blättern hängt ab von dem Wasserdampf-Sättigungsdefizit der Luft (WSD) und der Strahlungsenergie (AIKMAN & HOUTER, 1990). Übereinstimmend zeigen die Arbeiten von ARMSTRONG & KIRBY (1979) und HO (1989) an

Tomatenpflanzen, daß eine hohe Transpirationsbeanspruchung am Tag, bedingt durch ein hohes WSD, stärker die Verteilung des aufgenommenen Ca innerhalb der Pflanze beeinflusst als die Ca-Aufnahme der Pflanzen. Dabei führte ein hohes WSD im Vergleich zu einem niedrigen WSD zu einer Akkumulation von Ca in den Blättern und einem geringeren Anteil der Gesamt-Ca-Menge in den Stengeln (ARMSTRONG & KIRKBY, 1979; HO, 1989). Höhere Ca-Gehalte in Blättern bei hohem WSD im Vergleich zu niedrigem WSD stellten auch BAKKER & SONNEVELD (1988), ADAMS & HAND (1993) und ADAMS & HO (1995) an Tomaten- und Gurkenpflanzen fest.

Ca wird im Xylem nicht lediglich mit dem Transpirationsstrom weiterverlagert, sondern unterliegt Austauschadsorptionsvorgängen an den negativen Bindungsstellen des Xylems (BELL & BIDDULPH, 1963; ISERMANN, 1970). Die Retention von Ca an den Xylemzellwänden ist bei steigender Flußrate (EMMERT, 1969) sowie bei höherem im Vergleich zu niedrigerem Ca-Angebot (CHIU & BOULD, 1969) vermindert. Möglicherweise ist das der Grund dafür, daß unter Gewächshausbedingungen bei hohem Ca-Angebot der Anteil der Ca-Menge in den Blättern von der Gesamt-Ca-Menge durchschnittlich 80 % und bei niedrigem Ca-Angebot nur 70 % betrug.

Bisher wurden die unter Gewächshaus-Bedingungen im Vergleich zu Klimakammer-Bedingungen erhöhten Blatt-Ca-Gehalte mit den unterschiedlich hohen Transpirationsbeanspruchungen der Pflanzen am Tag in Zusammenhang gebracht. Das schließt eine Bedeutung des Wurzeldrucks nachts an der Translokation von Ca in die Blätter nicht aus. Allerdings wird dem nächtlichen Wurzeldruck eine größere Bedeutung für die Ca-Versorgung schwach transpirierender Organe, wie den jüngsten Blättern, beigemessen und weniger für die stärker transpirierenden jungen und alten Blättern (CLARKSON, 1984). Außerdem ist auch die Rolle des nächtlichen Wurzeldrucks für die Ca-Versorgung der jüngsten Blätter nicht zweifelsfrei geklärt, da diesbezüglich gegensätzliche Versuchsergebnisse existieren (BRADFIELD & GUTRIDGE, 1979; VAN DE GEIJN & SMEULDERS, 1981; HO, 1989; CHOI et al., 1997). Ob der nächtliche Wurzeldruck, und damit die transpirationsunabhängige Verteilung von Ca innerhalb der Pflanze, in dem durchgeführten Versuch eine Rolle spielte, ist fraglich, da aufgrund des nächtlichen WSD von 0,4-0,5 kPa der Wurzeldruck vermutlich von dem Sog bedingt durch die kutikuläre Transpiration überlagert wird.

Die höheren Blatt-Ca-Gehalte der Gewächshauspflanzen gingen bei 30 μM Ca-Angebot bei vier Sorten ('Adelheid', 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus') einher mit einer geringeren Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen im Gewächshaus im Vergleich zur Klimakammer (Abb. 21, Abb. 22). Hingegen zeigten zwei Sorten ('Bintje', 'San Michele') trotz höherer Blatt-Ca-Gehalte unter Gewächshaus-Bedingungen eine ähnliche Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen wie unter Klimakammer-Bedingungen. Die unter Gewächshaus-Bedingungen erreichte Erhöhung der Blatt-Ca-Gehalte hatte bei diesen beiden Sorten somit keine verminderte Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen zur Folge.

Aufgrund der geringeren Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und ähnlich hohem Wachstum bei niedrigem Ca-Angebot erwies sich unter beiden klimatischen Bedingungen die Sorte 'Bintje' als Ca-effizient gegenüber der Sorte 'Adelheid'. Hier bestanden genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz, die auch unter verschiedenen klimatischen Bedingungen stabil waren. Allerdings wurde auch deutlich, daß unter verschiedenen klimatischen Bedingungen die quantitativen Effizienzunterschiede zwischen den zwei Sorten unterschiedlich waren, mit größeren Unterschieden unter Klimakammer-Bedingungen. Bei dem Vergleich der Sorte 'San Michele' mit 'Adelheid' und 'Bintje' bestand eine Genotyp x Umwelt Interaktion. Bei den übrigen drei Sorten 'Arnika', 'Ijsselster' und 'Ultimus' deutete sich ebenfalls an, daß die Klimabedingungen einen Einfluß auf Ca-Effizienz der jeweiligen Sorte hatten, allerdings waren die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen diesen Sorten an sich sehr gering. Somit hatten die Klimabedingungen einen Einfluß auf die Rangfolge der sechs Sorten hinsichtlich ihrer Ca-Effizienz. Da die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen den beiden Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) im Vergleich zu anderen Sorten groß und stets gleichgerichtet waren, wurden die weiteren Arbeiten nur noch mit diesen beiden Sorten durchgeführt.

Da Stickstoff von allen Nährelementen in der Regel in der größten Menge aufgenommen wird, werden die Gehalte an den übrigen Ionen, so auch an Ca, in der Pflanzen davon beeinflusst, ob Stickstoff als Nitrat oder Ammonium angeboten wird (MARSCHNER, 1986). Es wurde daher untersucht, in wie weit die Form der N-Ernährung (NO_3 , NH_4NO_3 , NH_4) einen Einfluß auf die Unterschiede in der Ca-Effizienz der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' hat.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen an Kartoffeln (POLITZOTTO et al., 1975; CAO & TIBBITS, 1993) erreichten beide Kartoffelsorten bei NH_4NO_3 -Ernährung eine deutlich höhere Frischmasse als bei ausschließlicher NO_3 - oder NH_4 -Ernährung, wobei absicherbare Unterschiede in der gebildeten Blatt-Frischmasse bestanden (Abb. 31). Die Pflanzen erreichten bei ausschließlicher NO_3 -Ernährung eine ähnlich hohe Frischmasse wie bei ausschließlicher NH_4 -Ernährung, unabhängig von der Sorte. Im Vergleich zu dem hier dargestellten Versuch lassen sich in der Literatur größere Unterschiede im Wachstum von Kartoffelpflanzen bei ausschließlicher NO_3 - und NH_4 -Ernährung finden (DAVIS et al., 1986; CAO & TIBBITS, 1993). So stellten CAO & TIBBITS (1993) Unterschiede in der Sproßtrockenmasse von Faktor 3,5 zwischen ausschließlicher NO_3 - und ausschließlicher NH_4 -Ernährung von fünf Wochen alten Kartoffelpflanzen in NFT-Kultur bei pH 5,5 fest. Allerdings war das N-Angebot mit 4 mM deutlich höher als in dem hier durchgeführten Versuch mit 1 mM N. Neben dem Lichtangebot, der Temperatur und dem pH-Wert des Wurzelmediums kann die Wachstumsreaktion von Pflanzen auf eine unterschiedliche Form der N-Ernährung von der Höhe des N-Angebotes beeinflusst werden (GERANDAS et al., 1997; WIESLER, 1997; CAO & TIBBITS, 1998). Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenarten wie Kartoffel

(GERANDAS & SATTELMACHER, 1990), Tomate (WILCOX et al., 1985), Raps (MALHI et al., 1988) sowie Weizen (COX & REISENAUER, 1973) zeigen, daß das Wachstum im für maximales Wachstum suboptimalem Konzentrationsbereich an N bei ausschließlicher NH_4 -Ernährung im Vergleich zu ausschließlicher NO_3 -Ernährung verbessert oder zumindest nicht beeinträchtigt war. Nach den Ergebnissen von CAO & TIBBITS (1998) stellt ein N-Angebot von 1 mM für Kartoffelpflanzen in Wasserkulturen eine, hinsichtlich des Wachstums, sowohl bei NO_3 - wie auch bei NH_4 -Angebot suboptimale Konzentration dar. In dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,5 bis 12 mM N erreichten die Kartoffelpflanzen nach 5 - 6 Wochen das höchste Wachstum bei 2 - 4 mM NH_4 -Angebot sowie bei 4 bis 10 mM NO_3 -Angebot. Möglicherweise reagierten die Pflanzen in den Versuchen von CAO & TIBBITS (1993) empfindlicher auf ein ausschließliches NH_4 -Angebot, da hier die Pflanzen nach der *in vitro* Kultur direkt den unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt wurden. Dagegen wurden die Pflanzen, in dem hier dargestellten Versuch, zunächst 6 Tage bei ausschließlichem NO_3 -Angebot vorkultiviert. Da die Assimilation eines NH_4 -Ions energetisch weniger aufwendig ist als die Assimilation eines NO_3 -Ions (MARSCHNER, 1986) könnten NH_4 -ernährte Pflanzen einen gewissen energetischen Vorteil gegenüber NO_3 -ernährten Pflanzen besitzen. Aber die Aufnahme von NH_4 erfordert dessen vollständige Assimilation in den Wurzeln (GIVAN, 1979), während NO_3 in den Vakuolen gespeichert werden kann (MARSCHNER, 1986). Hinzu kommt, daß bei gleichzeitigem Angebot beider N-Formen bei vielen Pflanzenarten NH_4 bevorzugt aufgenommen wird (LEE & DREW, 1989; MACDUFF & JACKSON, 1991), und die Aufnahme von NH_4 höher als die von NO_3 ist (HAGEMANN, 1984; BLOOM, 1994). Die höhere Aufnahme und die Assimilation von NH_4 beanspruchen damit besonders bei jungen Pflanzen einen hohen Anteil der Assimilate, die nicht zu dem vegetativen Wachstum beitragen können. Wenn gleich vergleichende Untersuchungen dazu nicht vorliegen, so kann doch vermutet werden, daß die 6 Tage Vorkultur (und damit verbunden insbesondere eine starke Zunahme der Assimilationsfläche) der *in vitro* vermehrten Pflanzen bei NO_3 -Angebot sich vorteilhaft auswirkte auf das Vermögen der Pflanzen anschließend NH_4 als N-Quelle zu nutzen.

Nach 21 d Kultur wurden noch keine absicherbaren Wachstumsunterschiede zwischen den unterschiedlich hohen Ca-Angebotsstufen innerhalb der jeweiligen Form der N-Ernährung festgestellt (Abb. 32), wohingegen deutliche Unterschiede in der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen beobachtet wurden (Abb. 33). So zeigten die NO_3 -ernährten Pflanzen bei niedrigem Ca-Angebot die geringste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen, NH_4 -ernährten Pflanzen die stärkste Ausprägung und die NH_4NO_3 -ernährten Pflanzen nahmen eine Mittelstellung ein. In jedem Fall zeigte jedoch die Ca-ineffiziente Sorte 'Adelheid' eine stärkere Symptomausprägung als die Ca-effiziente Sorte 'Bintje', unabhängig von der Form der N-Ernährung. Im Gegensatz dazu stellten ENGLISH & BARKER (1983) einen Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Ca-Effizienz von fünf Tomaten-

Linien fest. Auch hier zeigten bei einer NH_4 -betonten Ernährung ($\text{NH}_4:\text{NO}_3$ -Verhältnis von 90 : 10) die Pflanzen die stärkste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen. Aber im Vergleich zu einer ausschließlichen NO_3 - sowie NH_4NO_3 -Ernährung änderte sich die Rangfolge der Tomatenlinien hinsichtlich ihrer Ca-Effizienz, die anhand des Wachstums und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen beurteilt wurde. Allerdings wurden in dem Versuch von ENGLISH & BARKER (1983) weder die Konzentration an Ca noch an anderen Nährstoffen noch der pH-Wert der Nährlösung konstant gehalten. Damit wuchsen die Pflanzen nicht nur bei einem niedrigem Ca-Angebot, welches sich in Verlauf der Kultur verminderte, sondern waren gleichzeitig einem zunehmendem Streß durch den niedrigen pH-Wert der Nährlösung bei der NH_4 -Ernährung ausgesetzt. Bei NH_4 -betonter Ernährung verminderte sich in diesem Versuch der pH-Wert auf 3,5.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (KIRKBY & MENGEL, 1967; MURTADHA et al., 1988; VAN BEUSICHEM et al., 1988; WIESLER, 1998) hatte die Form der N-Ernährung einen Einfluß auf die Ca-Gehalte der Blätter. Bei reiner NO_3 -Ernährung wurden unabhängig von dem Blattalter höhere Ca-Gehalte der Blätter festgestellt im Vergleich zu NH_4NO_3 - und ausschließlicher NH_4 -Ernährung. Tendenziell waren die Blatt-Ca-Gehalte der NH_4NO_3 -ernährten Pflanzen höher als die der NH_4 -ernährten Pflanzen. Diese Unterschiede waren aber gering im Vergleich zu jeweiligen Unterschieden zu den Blatt-Ca-Gehalten der NO_3 -ernährten Pflanzen. Innerhalb einer Sorte lieferten die Ca-Gehalte der jungen Blätter für die Stärke der Ca-Mangelsymptome bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot und unterschiedlicher Form der N-Ernährung einen Erklärungswert bis 37 % (Abb. 34). Zwischen den beiden Sorten bestanden in Ca-Gehalten der jüngeren Blätter bei niedrigem Ca-Angebot keine absicherbaren Unterschiede. Die Ca-Gehalte der jungen Blätter konnten somit die unterschiedliche Stärke der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen zwischen den Sorten nicht hinreichend erklären.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Versuche mit den beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' (3.2.2, 3.2.3) wiesen die jungen Blätter der Ca-effizienten Sorte 'Bintje' in keinem Fall absicherbare höhere oder niedrigere Ca-Gehalte auf als die der Sorte 'Adelheid'. Die unterschiedliche Empfindlichkeit dieser beiden Sorten gegenüber einem niedrigem Ca-Angebot in der Nährlösung, gemessen an Hand der Ausprägung der Ca-Mangelsymptomen, spiegelte sich somit nicht in deutlichen Unterschieden in den Gesamt-Ca-Gehalten junger Blätter wider. Vor diesem Hintergrund war interessant zu prüfen, ob sich, die von BEHLING et al. (1989) für unterschiedlich Ca-effiziente Tomatenlinien beschriebenen, Unterschiede in der Ca-Konzentration im Zellwandbereich bei diesen beiden unterschiedlich Ca-effizienten Kartoffelsorten feststellen lassen. Die Frage war, ob sich die Unterschiede in der Stärke der Ca-Mangelsymptome zwischen diesen beiden Sorten eher in Unterschieden in der Ca-Konzentration im Zellwandbereich als in den Gesamt-Ca-

Gehalten bemerkbar machen, und damit der Apoplast das Kompartiment ist, indem sich genotypische Unterschiede in der Ca-Effizienz manifestieren.

Ein wesentliches Problem bei der Charakterisierung der Zusammensetzung der Apoplastenflüssigkeit von Blättern liegt in der Zugänglichkeit zu diesem Kompartiment. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Methoden zur Gewinnung der apoplastischen Flüssigkeit verwendet: die Perfusions-Methode (BERNSTEIN, 1971), die Druck-Methode (HARTUNG et al., 1988, JACHETTA et al., 1986), die Elutions-Methode (LONG & WIDDERS, 1990), die Infiltrations-Zentrifugations-Methode (KLEMENT, 1965; ROHRINGER et al., 1983; SPEER & KAISER, 1991; THOMAS & RUNGE, 1988), die Infiltration-Diffusions-Methode (BEHLING et al., 1989), die Zentrifugations-Methode (MEINZER & MOORE 1988; DANNELL et al., 1995). Da die drei zuerst genannten Methoden sich aufgrund des methodischen Aufwandes für Reihenuntersuchungen nicht eignen, wurde sich mit den drei übrigen Methoden befaßt. Die Anwendung der Zentrifugations-Methode, d.h. die Auszentrifugation der reinen Blattapoplastenflüssigkeit ohne vorherige Infiltration, in ähnlicher Weise wie dieses von DANNELL et al. (1995) für Sonnenblumenblätter beschrieben wurde, war bei Kartoffelblättern ohne Beschädigungen nicht möglich. Die Ermittlung der Konzentration des in der Apoplastenflüssigkeit gelösten Ca erfolgte in dieser Arbeit mit zwei methodischen Ansätzen: die Infiltration-Zentrifugations-Methode und die von BEHLING et al. (1989) verwendete die Infiltrations-Diffusions-Methode. Die Infiltrations-Diffusions-Methode stellt ein äußerst attraktiven methodischen Ansatz dar, da durch die Verwendung von kleinen Blattscheiben die Möglichkeit der Bestimmung der apoplastischen Ca-Konzentration in hoher räumlicher Auflösung möglich sein sollte. Da Ca-Mangelsymptome bei Kartoffelblättern zuerst am Blattrand in Erscheinung traten, war die Bestimmung der apoplastischen Ca-Konzentration speziell in diesem Blattbereich von besonderem Interesse.

Ein Vergleich dieser beiden Methode zeigte (Abb. 48), daß bei Verwendung der Infiltrations-Diffusions-Methode um Faktor 2-10 höhere Ca-Gehalte des Blattapoplasten ermittelt werden als bei Verwendung der Infiltrations-Zentrifugations-Methode. Werden die ermittelten Ca-Gehalte des Blattapoplasten umgerechnet in die Ca-Konzentration der Blattapoplastenflüssigkeit, so würden diese bei Verwendung der Infiltrations-Zentrifugations-Methode im Bereich von 1,5 bis 7,5 mM liegen. Bei Verwendung der Infiltrations-Diffusions-Methode betrug die ermittelte Konzentration nach 1 h Inkubation im Mittel 15 mM. Nach 4 h Inkubation würde sich rein rechnerisch eine Konzentration von 30 mM ergeben. Ein Vergleich mit apoplastischen Ca-Konzentrationen, die von anderen Autoren mit unterschiedlichen oder gleichen Methoden ermittelt wurden, läßt die Ergebnisse mit der Infiltrations-Zentrifugations-Methode für wahrscheinlicher erscheinen. So ermittelten DANNELL et al. (1995) bei Sonnenblumen-Blättern mit der Zentrifugationsmethode apoplastische Ca-Konzentrationen von 1,7 – 2,6 mM. Bei Ackerbohne ermittelten MÜHLING & SATTELMACHER (1995) mittels der Infiltration-Zentrifugations-Methode eine Ca-Konzentration der Blatt-

apoplastenflüssigkeit im Bereich von 0,5 - 1 mM. Allerdings können pflanzenartspezifische Unterschiede in der apoplastischen Ca-Konzentration von Blättern nicht ausgeschlossen werden. Die höheren Konzentrationen durch die Infiltrations-Diffusions-Methode lassen sich eher erklären, wenn berücksichtigt wird, daß bei der Infiltrations-Zentrifugations-Methode die Apoplastenflüssigkeit im Mittel um Faktor 5 verdünnt wurde, während bei der Infiltrations-Diffusions-Methode die Apoplastenflüssigkeit mit einem Flüssigkeitsvolumen in Kontakt gebracht, daß um einen Faktor von ca. 440 größer ist. Wird die Zellwand als polyfunktioneller Austauscher betrachtet, an dessen negativen Ladungsstellen Ca-Ionen mit unterschiedlicher Intensität gebunden sind, so ist denkbar, daß indem der Austauscher mit einem größeren Flüssigkeitsvolumen in Kontakt gebracht wird, zusätzlich locker adsorbierte Ca-Ionen von den Ladungsstellen desorbiert werden. Die in der Inkubationsflüssigkeit nachweisbaren Ca-Ionen würden demzufolge nicht nur das Ca aus der wäßrigen Phase des Blattapoplasten widerspiegeln, sondern auch ehemals an der Zellwand sorbiertes Ca. Dadurch ließe sich der Unterschied in dem Niveau der Gehalte an wasserlöslichen Ca des Blattapoplasten zwischen den beiden Methoden erklären.

Für die Charakterisierung der Ca-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit ist damit die Infiltrations-Zentrifugations-Methode im Vergleich zu der Infiltrations-Diffusions-Methode als die geeignetere Methode anzusehen.

Da aber BEHLING et al. (1989) mit der Infiltrations-Diffusions-Methode Unterschiede zwischen unterschiedlich Ca-effizienten Tomatenlinien feststellen konnten, wurden in einem Versuch beide Methoden angewendet. Mit beiden Methoden zeigte sich übereinstimmend bei dem niedrigsten Ca-Angebot (30 μM Ca) der Nährlösung kein Unterschied in den Gehalten an wasserlöslichen Ca des Apoplasten junger Blätter zwischen den unterschiedlich Ca-effizienten Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' (Abb. 48). Bei Verwendung der Infiltrations-Zentrifugations-Methode deuteten sich übereinstimmend in unabhängigen Versuchen bei der Sorte 'Bintje' tendenziell höhere wasserlösliche Ca-Gehalte (Abb. 48) bzw. höhere Ca-Konzentrationen in der Blattapoplastenflüssigkeit (Abb. 50) bei 1000 μM Ca-Angebot an, die aber statistisch nicht absicherbar waren.

Da physiologisch betrachtet, der Ca-Aktivität in der Blattapoplastenflüssigkeit eine größere Bedeutung zukommen kann als der Gesamt-Konzentration, wurde mittels ionensensitiver Ca-Elektrode die Ca-Aktivität in der Apoplastenwaschflüssigkeit ermittelt. Da Ca in der Blattapoplastenflüssigkeit möglicherweise zum Teil in komplexierter Form vorliegt, könnten organischen Säureanionen und zwar insbesondere Oxalat und Citrat hierbei eine besondere Rolle zukommen. Interessant war es daher, die Untersuchung an Pflanzen vorzunehmen, die bei verschiedenen N-Formen (NO_3 , NH_4NO_3 , NH_4) in der Nährlösung kultiviert wurden, da die Ernährung mit verschiedenen N-Formen einen Einfluß auf den Auf- und Abbau organischer Säuren in den Pflanzen hat (MARSCHNER, 1986). So ist die Nitratreduktion mit einer Synthese organischer Säuren verbunden, wodurch einer Erhöhung des pH-Wertes im Cytoplasma und einem positiven Ladungsüberschuß

entgegengewirkt wird (RAVEN & SMITH, 1976). Umgekehrt kann der hohe Bedarf an Kohlenstoffgerüsten und die durch die NH_4 -Assimilation bewirkte Protonenfreisetzung zu einer Verarmung an organischen Säuren in den Wurzeln NH_4 -ernährter Pflanzen beitragen. Bei der Untersuchung der organischen Säuren in der AWF war von besonderem Interesse, ob durch die unterschiedliche Form der N-Ernährung die Konzentration an Oxalat und Citrat beeinflusst wird, da diese organischen Säureanionen ein hohes Komplexierungsvermögen für Ca besitzen. Während Citrat nur in der AWF einiger NO_3 -ernährter Pflanzen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich ein Einfluß der Form der N-Ernährung auf die Oxalat-Konzentration (Abb. 53). Die Pflanzen mit ausschließlicher NO_3 -Ernährung wiesen tendenziell höhere Oxalat-Konzentrationen in der Blattapoplastenflüssigkeit auf als die Pflanzen mit ausschließlicher NH_4 -Ernährung. Die NH_4NO_3 -ernährten Pflanzen nahmen diesbezüglich eine Mittelstellung ein.

Die Ca-Aktivität war im Vergleich zu der Ca-Konzentration wesentlich geringer (Abb. 54) und betrug bei ausschließlicher NO_3 -Ernährung 21 – 28 %, bei NH_4NO_3 -Ernährung 40 – 42 % und bei NH_4 -Ernährung 26 - 33 % der Ca-Konzentration. Da bei NH_4 -Ernährung die Oxalat-Konzentration in der AWF niedriger war als bei den NO_3 -ernährten Pflanzen, hätte hier ein größerer Prozentsatz erwartet werden können. Inwieweit dieses Ergebnis auf andere Ca-Komplexoren in der AWF und / oder auf Unterschiede in der Ionenstärke bei NH_4 -Ernährung im Vergleich zu NO_3 -Ernährung zurückzuführen ist, kann derzeit nicht beantwortet werden. Während die Form der N-Ernährung einen Einfluß auf die Ca-Konzentration hatte, bestand kein Einfluß auf die Ca-Aktivität. Ein Einfluß der untersuchten Kartoffelsorte ließ sich weder auf die Ca-Konzentration noch auf die Ca-Aktivität in der AWF feststellen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die Unterschiede zumindest zwischen den beiden untersuchten Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' in der Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigem Ca-Angebot und damit die genotypischen Unterschiede in der Stärke der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen sich nicht durch Unterschiede in der Ca-Konzentration oder in der Ca-Aktivität der Apoplastenflüssigkeit junger Blätter erklären lassen konnten. Die von BEHLING et al. (1989) für unterschiedlich Ca-effiziente Tomatenlinien beschriebenen Unterschiede in der diffusiblen Ca-Konzentration des Zellwandbereichs junger Blätter konnten bei den beiden untersuchten, unterschiedlich Ca-effizienten Kartoffelsorten nicht festgestellt werden.

Oligogalakturonide im Blattapoplasten

In der Literatur ist beschrieben, daß Oligogalakturonide bestimmten Polymerisationsgrades (DP) physiologische Reaktionen, wie Zellverbräunungen und Nekrosen auslösen können (CERVONE et al., 1987, VAN CUTSEM & MESSIAEN, 1993). Weiter gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Degradation der Pektinsubstanz bei Zellsuspensionkulturen sowie bei Wurzelgewebe unter Ca-

Mangelbedingungen (KONNO et al., 1984, 1999). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit am Modell der Kartoffelpflanze die Frage nach einer möglichen ursächlichen Beteiligung von Oligogalakturoniden an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen in Blättern untersucht.

Für die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der physiologischen Reaktionen, die durch Oligogalakturonide induziert werden können, wurden in der Regel *in vitro* Präparationen verwendet, d.h. die Oligogalakturonide wurden durch Hydrolyse von Pektin oder Zellwandmaterial durch Säure oder pektolytische Enzyme hergestellt (HAHN et al., 1981; NOTHNAGEL et al., 1983; DAVIS et al., 1984; BRANCA et al., 1988; MESSIAEN et al., 1993). Für die Klärung der biologischen Relevanz von Oligogalakturoniden als endogene Signalmoleküle sind aber das *in vivo* Auftreten dieser Oligogalakturonide sowie der Mechanismus und die Regulation der Freisetzung aus der Zellwand von Bedeutung (COTE & HAHN, 1994). Mittlerweile wurden zwar in der Fraktion der wasserlöslichen Pektine von isoliertem Zellwandmaterial biologisch aktive Oligogalakturonide mit DP 4 - 12 nachgewiesen (MELOTTO et al., 1996). Damit aber diese Oligogalakturonide als Signalmoleküle aktiv sein können, ist zuerst eine Freisetzung aus dem Pektin-Netzwerk in die wäßrige Phase des Apoplasten erforderlich, damit sie anschließend zu einem geeigneten Rezeptor an der Plasmamembran gelangen können. Aufschlußreicher als die Untersuchung der wasserlöslichen Pektinfraktion isolierter Zellwände sollte daher die Untersuchung der apoplastischen Flüssigkeit auf ihre qualitative Oligogalakturonid-Zusammensetzung sein. Überwiegend wurde in der hier vorliegenden Arbeit mit der Infiltrations-Zentrifugations-Methode gearbeitet. Bei der Verwendung von Blattscheiben, wodurch eine höhere räumliche Auflösung möglich war, wurde die Infiltrations-Diffusions-Methode angewendet. Beiden Methoden ist gemeinsam, daß die Apoplastenflüssigkeit verdünnt wird. Diese Verdünnung schließt nicht die Möglichkeit aus, daß beispielsweise von Zellwand schwach bzw. locker gebundene Ionen oder Komplexe in Lösung gebracht werden, die *in vivo* nicht in der Apoplastenflüssigkeit gelöst vorliegen. Aber trotz dieser großen, methodisch bedingten, Unterschiede in der Verdünnung der Apoplastenflüssigkeit, wurden mit beiden Methoden ähnliche Konzentrationen an Uronsäuren in der Apoplastenflüssigkeit ermittelt.

Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Methoden besteht darin, daß das pflanzliche Gewebe verletzt wird (Abschneiden der Fiederblätter, Ausstanzen der Blattscheiben). Die Arbeiten von RYAN und seinen Mitarbeitern zeigen, daß bei Tomatenpflanzen durch eine Verwundung von Blättern die Bildung des Enzyms Polygalakturonase (PG) systemisch induziert werden konnte (BERGEY et al., 1999; OROZCO-CARDENAS & RYAN, 1999). Es kann daher *a priori* die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die, in der verdünnten Apoplastenflüssigkeit nachgewiesenen, Oligogalakturonide durch die Aktivität einer, durch die Verwundung induzierten, PG gebildet bzw. aus der Zellwand freigesetzt wurden. Allerdings zeigen die Untersuchungen von BERGEY et al. (1999), daß durch das ledigliche Abschneiden der Blätter von der Pflanze die PG noch nicht induziert wurde. Erforderlich zur Induktion war vielmehr eine stärkere Verletzung der Blattlamina.

Außerdem wurde die erhöhte Aktivität der PG erst 1 – 2 h nach der Verwundung festgestellt und des weiteren vermuteten BERGEY et al. (1999) an Hand ihrer Untersuchungen, daß diese induzierte PG im Symplasten kompartimentiert ist. Diese genannten Aspekte sprechen daher gegen die Möglichkeit, daß die im Rahmen der Untersuchungen gefundenen Oligogalakturonide im Apoplasten der Kartoffelblätter auf die Aktivität einer wund-induzierbaren PG zurückzuführen sind.

Die Konzentration an Oligogalakturoniden in der Apoplastenflüssigkeit junger Blätter wurde über die Quantifizierung der Monomeren in der AWF bestimmt. Bei hohem Ca-Angebot der Nährlösung lag die Uronsäure-Konzentration der Apoplastenflüssigkeit im Bereich von 2,2 - 3,9 mM Gal-US-Eq. (im Mittel über verschiedene Versuche; Abb. 35, Abb. 40), dies entsprach auf Frischmassen-Basis einem Uronsäure-Gehalt von 33 - 44 $\mu\text{g Gal-US-Eq. (g FM)}^{-1}$. Größenordnungsmäßig liegen diese Gehalte nah bei dem von TERRY & JONES (1981) bei Erbsenstengeln (ebenfalls mit der Infiltrations-Zentrifugations-Methode) ermittelten Uronsäuren-Gehalten von 77 $\mu\text{g Gal-US-Eq. (g FM)}^{-1}$. Die bei hohem Ca-Angebot der Nährlösung in der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter auftretenden Uronsäure-Mengen entsprachen ca. 0,5 - 1 % der Uronsäure-Mengen isolierter Zellwände. Der Uronsäure-Gehalt isolierter Zellwände junger Kartoffelblätter (Tab. 13) liegt mit 15 % in dem Bereich von Angaben für Blätter anderer dikotyle Pflanzen (HU et al., 1996). Ein Einfluß des Ca-Angebotes der Nährlösung sowie der Kartoffelsorte auf den Uronsäure-Gehalt isolierter Zellwände nicht festgestellt werden. Die bei Ca-Mangel zusätzlich im Blattapoplasten auftretenden Uronsäure-Mengen entsprachen weniger als 1 % der Uronsäure-Mengen isolierter Zellwände und liegen damit im Bereich der Meßgenauigkeit der Bestimmungen der Uronsäure-Gehalte von isoliertem Zellwandmaterial. Bilanzüberlegungen können daher keinen Hinweis gegen, ob die bei Ca-Mangel, insbesondere bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid', verstärkt auftretenden Uronsäuren ihren Ursprung in einer Degradation der Pektinsubstanz oder einer beeinträchtigten Integration neu synthetisierter und sekretierter Pektin-Fragmente oder aber auf eine erhöhte Synthese und Sekretion von Pektin-Fragmenten bei Ca-Mangel zurückzuführen sind.

Hinweise auf eine Degradation der Pektinsubstanz in Blättern mit niedrigem Ca-Versorgungsgrad ließen sich, gemessen an Hand der Erhöhung der Uronsäure-Konzentration in der Blattapoplastenflüssigkeit, feststellen, aber nicht bei schwacher Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen, sondern erst bei stärkerer Symptomausprägung. Entscheidend für eine mögliche ursächliche Beteiligung biologisch aktiver Oligogalakturonide an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen ist die Größe, d.h. der Polymerisationsgrad der Oligogalakturonide.

Bei der qualitativen Charakterisierung der Oligogalakturonide der AWF hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades stellte sich als wesentliches Problem ihre niedrige Konzentration in der AWF dar, so daß Analysen mittels PAGE sowie MALDI-TOF-MS nicht dafür geeignet waren (7.2). Die

Ergebnisse der qualitativen Charakterisierung der Oligogalakturonide in der AWF mittels HPAEC-PAD-Analytik zeigten (Abb. 38, Abb. 39), daß in der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter potentiell biologisch aktive Oligogalakturonide mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 9 - 20 auftraten. Ein verstärktes Auftreten dieser Oligogalakturonide war bei beiden Sorten aber nicht bei schwacher Symptomausprägung (60 μM Ca-Angebot), sondern erst bei jeweils stärkerer Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (30 μM Ca-Angebot) feststellbar, wobei die Blattapoplastenflüssigkeit der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' etwa doppelt so viele Oligogalakturonide DP 9 - 20 enthielt wie die der Sorte 'Bintje'.

Die Frage, ob physiologisch relevante Konzentrationen von Oligogalakturoniden mit DP 9-20 in der Blattapoplastenflüssigkeit erreicht werden, kann nicht definitiv beantwortet werden, da entsprechende Eichstandards nicht zur Verfügung standen. Aber es können diesbezüglich folgende Überlegungen gemacht werden:

Die Uronsäure-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit lag, über die verschiedenen Versuche hinweg betrachtet, im Bereich von 2,8 bis 5,5 mM Gal-US-Eq.. Unter verschiedenen Annahmen läßt sich eine obere Konzentrationsgrenze der Oligogalakturonide mit DP 16-20 anhand der ermittelten Konzentration des Monomers angeben.

Bei der Ermittlung der molaren Konzentration der Oligogalakturonide mit DP 16 relativ zu der molaren Konzentration des Monomers ist zu berücksichtigen, daß die Detektorempfindlichkeit während des Laufes um Faktor 100 erhöht wurde. Außerdem muß bedacht werden, daß die Empfindlichkeit der HPAEC-PAD-Analytik mit zunehmendem Polymerisationsgrad der Oligogalakturonide abnimmt (HOTCHKISS & HICKS, 1990; DAAS et al., 1998). So weisen nach HOTCHKISS & HICKS (1990) Oligogalakturonidsäuren mit einem DP von 15 bis 19 bei HPAEC-PAD-Analytik einen molaren Responsefaktor von 40 bis 60 % des von DP 1 auf. Demnach bedeutet (bei gleicher Detektorempfindlichkeit während des gesamten Laufes) eine gleiche Peak-Fläche von DP 1 und DP 16, daß die molare Konzentration von DP 16 250 % bis 166 % der molaren Konzentration von DP 1 entspricht. Wird die Detektorempfindlichkeit um Faktor 100 während des Laufes erhöht, d.h. wird beispielsweise DP 1 bei einer Detektorempfindlichkeit von 10 μA und DP 16 bei 0,1 μA detektiert, dann bedeutet eine gleiche Peak-Fläche von DP 1 und DP 16, daß bei einem molaren Responsefaktor von 0,5 die molare Konzentration von DP 16 2 % der Konzentration von DP 1 entspricht.

In Tab. 19 sind für die beiden Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei den drei Ca-Angebotsstufen der Nährlösung sowohl die durchschnittlichen Peakflächen des DP 1 sowie die der Oligogalakturonide mit DP 16-20 (korrigiert um die Änderung der Detektor-Empfindlichkeit) aufgeführt. Unter Annahme eines molaren Responsefaktors von 0,5 wurde berechnet, wie groß die Peak-Fläche (und damit die molare Konzentration) der Oligogalakturonide mit DP 16-20 in Relation zu der Peak-Fläche des Monomers ist. Abhängig von der Sorte und dem Ca-Angebot entsprach die Peak-Fläche

der Oligogalakturonide mit DP 16-20 0,26 bis 82,20 % der Peak-Fläche von DP 1. Der höchste Wert (82,2 %) wurde von der Sorte 'Adelheid' bei dem niedrigsten Ca-Angebot (30 μM) erreicht. Allerdings wurde dieser vergleichsweise hohe Wert durch die vergleichsweise geringe Peak-Fläche des Monomers erreicht. Sieht man von diesem Wert ab, so betrug unter der Annahme eines molaren Responsefaktors von 0,5 die molare Konzentration von Oligogalakturoniden mit DP 16-20 maximal 9,9 % der Konzentration des Monomers.

Werden die Proben von Blättern der Sorte 'Adelheid' bei 30 μM Ca-Angebot nicht berücksichtigt, so lag die Konzentration des Monomers (DP 1) in der Apoplastenflüssigkeit im Bereich von 1 bis 1,5 mM und im Mittel 1,3 mM. Unter der Annahme eines molaren Responsefaktors von 0,5 errechnete sich, daß in der Apoplastenflüssigkeit von Kartoffelblättern bei dem niedrigsten Ca-Angebot der Nährlösung (30 μM) die Konzentration der Oligogalakturonide mit einem DP 16-20 maximal 108 μM ('Bintje') bis 248 μM ('Adelheid') betrug. Im Vergleich dazu, ergab sich, daß in der Apoplastenflüssigkeit von Kartoffelblättern bei hohem Ca-Angebot (1000 μM) die Konzentration der Oligogalakturonide mit DP 16-20 maximal 16 μM ('Adelheid') bis 28 μM ('Bintje') betrug und bei 60 μM Ca-Angebot maximal 4 μM ('Bintje') bis 80 μM ('Adelheid').

Tab. 19: Mittelwerte der Peakflächen des Monomers sowie der Oligogalakturonide mit DP 16-20 in der Apoplastenwaschflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 2 - 4) der Sorten 'Adelheid' und 'Bintje' bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot in der Nährlösung für 30 d (n = 6)

Sorte	Ca-Angebot [μM]	Peak-Fläche	Peak-Fläche (korrigiert um die Änderung der Detektor- Empfindlichkeit) DP 16-20	Berechnete Konzentration der Oligogalakturonide mit DP 16-20 in Prozent der Konzen- tration des DP 1 unter An- nahme eines molaren Re- sponsefaktor von 0,5 [%]
		DP 1		
'Adelheid'	1000	1,02 10^7	0,50 10^5	0,98
	60	0,96 10^7	2,72 10^5	5,67
	30	0,20 10^7	8,22 10^5	82,20
'Bintje'	1000	0,67 10^7	0,97 10^5	2,90
	60	1,01 10^7	0,13 10^5	0,26
	30	0,72 10^7	3,58 10^5	9,94

Festzuhalten bleibt somit, daß gemäß diesen Annahmen und Überlegungen die mittlere Konzentration der Oligogalakturonide mit DP 16-20 in der Blattapoplastenflüssigkeit in dem Bereich von 10^{-6} bis $2,5 \cdot 10^{-4}$ M liegen kann. Eine Konzentration von 10^{-4} M, die nach MESSIAEN et al. (1993) für die Induktion eines cytosolischen Ca-Influx und der Transkription der PAL erforderlich war und nach deren Applikation auch eine Verbräunung der Zellen beobachtet werden konnte, kann

somit in der Blattapoplastenflüssigkeit bei 30 μM Ca-Angebot erreicht werden und bei 60 μM nur wenn lokale Konzentrationsunterschiede im Blatt von Faktor 2 – 25 angenommen werden.

Mit lokalen Konzentrationsunterschieden hängt die Frage nach der Mobilität von Oligogalakturoniden im Blattgewebe zusammen. Bei Tomatenpflanzen konnten BAYDOUN & FRY (1985) mittels autoradiographischer Aufnahmen keine Mobilität der über Agar-Blocks auf eine Verwundungsstelle auf der Blattlamina applizierten Oligogalakturonide mit DP 6-14 von der Applikationsstelle feststellen. Wenn *in vivo* freigesetzte Oligogalakturonide in der Nähe des Entstehungsortes verbleiben, ist die Annahme von Konzentrationsgradienten nicht als unwahrscheinlich anzusehen. Allerdings konnten RIGBY et al. (1994) bei Rizinuspflanzen nach Injektion radioaktiv markierter Oligogalakturonide mit DP 6 in die Petiole einen basipetalen Transport der Oligogalakturonide nachweisen. Die Arbeit von MACDOUGALL et al. (1992) zeigt, daß Oligogalakturonide mit DP 6 im Xylem von Tomatenpflanzen mobil sind. Diese unterschiedlichen Versuchsergebnisse könnten rein methodische Ursachen haben, oder damit zusammenhängen, daß Oligogalakturonide zwar in Gefäßen größeren Durchmessern, aber nicht im apoplastischen Raum der Blattlamina, beweglich sind. Die Möglichkeit, das Konzentrationsgradienten von Oligogalakturoniden im Blattapoplasten vorhanden sind, kann daher weder ausgeschlossen werden noch mit Sicherheit angenommen werden.

Zusammenfassend bleibt somit festzuhalten, daß in der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter potentiell biologisch aktive Oligogalakturonide auftraten, bei Ca-Mangel ein verstärktes Auftreten festgestellt werden konnte und bei den niedrigsten Ca-Angebot die Ca-ineffiziente Sorte 'Adelheid' im Vergleich zu Ca-effizienten Sorte 'Bintje' eine höhere Konzentration aufweist. Aber es deutet sich auch an, daß physiologisch wirksame Konzentrationen nicht in einem frühen Stadium der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (60 μM Ca-Angebot), sondern erst in einem späteren Stadium bzw. stärkerer Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen in der Blattapoplastenflüssigkeit auftraten. Dieses Ergebnis spricht daher nicht für die ursächliche Beteiligung biologisch aktiver Oligogalakturonide an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen.

Es wurde weiterhin untersucht, ob durch Injektion aufkonzentrierter AWF von Ca-Mangelblättern in symptomfreie Blätter Ca-Mangelsymptome, wie Nekrosen, induziert werden können. Aber weder nach Injektion aufkonzentrierter AWF von Ca-Mangelpflanzen der Sorte 'Adelheid' noch nach Injektion von Oligogalakturonide mit DP > 9 in junge Blätter von Kartoffelpflanzen, die in Nährlösung kultiviert wurden, konnten Gewebeveränderungen, ähnlich denen von Ca-Mangelsymptomen, induziert werden. Nur in einigen Fällen wurde eine unspezifische "Bleichung" des Gewebes festgestellt. Diese Ergebnisse können verschiedene Ursachen haben:

Erstens könnte es daran liegen, daß die Oligogalakturonide der AWF von Ca-Mangelpflanzen überhaupt nicht ursächlich an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen beteiligt sind, und nur

eine Folgeerscheinung des Ca-Mangels darstellen. Daneben stellen sich aber die Fragen, ob Pflanzen über Mechanismen verfügen, die Konzentration an endogenen Signalmolekülen zu regulieren, und welche Faktoren die Induktion physiologischer Reaktionen wie den Zellverbräunungen und Nekrosen durch Oligogalakturonide beeinflussen können.

Um die Zellen vor einer Über-Stimulierung zu schützen sind Regulationsmechanismen zumindest naheliegend (COTE & HAHN, 1994). Aus der Literatur lassen sich drei Ansatzpunkte für eine Regulation finden.

Zum einen zeigt die Arbeit von HORN et al. (1989), daß Oligogalakturonide mittels Endocytose in den Symplasten aufgenommen werden können. Welche Bedeutung diese Aufnahme in den Symplasten für die pflanzliche Zelle hat, ist nicht geklärt. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß für die endocytotische Aufnahme eine intakte und funktionstüchtige Plasmamembran erforderlich ist. Bei starker Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen zeigte sich bei Kartoffelblattscheiben, anhand von K-Efflux-Untersuchungen, daß zumindest die Permeabilität der Plasmamembran deutlich erhöht war (Daten nicht dargestellt). Vor diesem Hintergrund ist es zumindest vorstellbar, daß die, bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad der Blätter, aus der Zellwand freigesetzten Oligogalakturonide anfangs noch von den Zellen in den Symplasten aufgenommen werden. Bei stärkerer Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen könnte diese Aufnahme, möglicherweise aufgrund der mittlerweile geschädigten Membranen, beeinträchtigt sein, so daß die freigesetzten Oligogalakturonide sich in der Apoplastenflüssigkeit akkumulieren. Eine Bestimmung der symplasmatischen Konzentration an Oligogalakturoniden in Blättern unterschiedlichen Ca-Versorgungsgrades ist allerdings nur dann aussagekräftig und sinnvoll, wenn dabei zwischen neu synthetisierten Oligogalakturoniden und den über Endocytose aufgenommenen Oligogalakturoniden unterschieden werden könnte.

Neben einem möglichen Regulationsweg über Endocytose könnte ein weiterer Regulationsmechanismus in der Degradation der Oligogalakturonide durch pflanzeneigene Polygalakturonasen (PG) bestehen. So zeigt die Arbeit von GARCIA-ROMERA & FRY (1995) die rasche Hydrolyse von Oligogalakturoniden mit DP 8 und 9 durch eine *exo*-PG in Zellsuspensionskulturen von Rosen. Die Halbwertszeit dieser Oligogalakturonide lag zwischen 2 und 4 h. Die Autoren vermuteten, daß die *exo*-PG eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Konzentration biologisch aktiver Oligogalakturonide in Geweben spielt, das nicht durch einen Pathogen infiziert ist. Auch die Arbeit von MACDOUGALL et al. (1992) zeigt, daß die applizierten Oligogalakturonide mit DP 6 im Xylem von Tomatenpflanzen degradiert werden, und zwar vermutlich durch eine *exo*-PG.

Neben einer möglichen Regulation durch eine *exo*-PG könnte noch ein weiterer Regulationsmechanismus vorhanden sein. Dazu sei auf die dargestellten Chromatogramme verwiesen, in denen, wie erwähnt, Peaks auftraten, die keinem definiertem DP zugeordnet werden konnten, da die Retentionszeit genau zwischen zwei aufeinanderfolgenden DPs lag. Möglicherweise handelt es sich

hierbei um Oligogalakturonide, die an ihrem reduzierenden Ende nicht Galakturonsäure tragen, sondern das am C1-oxidierte Derivat der Galakturonsäure ("galactaric acid") (SPIRO et al., 1993). Wenn es sich tatsächlich um Oligogalakturonide handelt, die am reduzierenden Ende oxidiert sind, dann besitzen diese Oligogalakturonide eine deutlich geringere biologische Aktivität (SPIRO et al., 1998). Die Oxidation von Oligogalakturonide kann durch eine Uronsäure-Oxidase katalysiert werden, die allerdings bisher nur in Früchten nachgewiesen wurde (PRESSEY, 1993). Auch ist bisher nicht gezeigt worden, ob diese Uronsäure-Oxidase im Apoplasten oder im Symplasten lokalisiert ist. Aber überlegenswert ist es dennoch, ob möglicherweise die Oxidation der Oligogalakturonide ein interner Mechanismus darstellt, die Konzentration an biologisch aktiven Elicitoren zu regulieren. Insgesamt wäre es aufschlußreich, wenn in Untersuchungen, die die Induktion physiologischer Reaktionen durch Oligogalakturonide beschreiben, die applizierten Oligogalakturonide nicht nur vor der Applikation charakterisiert werden, sondern auch nach Abschluß des Versuches, um zu prüfen, ob die Oligogalakturonide unverändert hinsichtlich Konzentration und Polymerisationsgrad vorliegen.

Wenn pflanzliche Zellen über solche Mechanismen (Endocytose, Depolymerisierung mittels einer *exo*-PG, Oxidation des reduzierenden Endes) oder andere Mechanismen zur Regulation der Konzentration biologisch aktiver Oligogalakturonide verfügen, dann müssen in Bioassays letztlich Konzentrationen an biologisch aktiven Oligogalakturoniden verwendet werden, die die Kapazität pflanzlicher Regulationsmechanismen überschreiten. In dem durchgeführten Test wurde Blattapoplastenwaschflüssigkeit verwendet, die um Faktor 5 aufkonzentriert wurde, und damit eine Konzentration an Oligogalakturonide aufwies, wie sie in der Blattapoplastenflüssigkeit vorherrscht. Aufgrund möglicher pflanzlicher Mechanismen zur Regulation der Konzentration biologisch aktiver Oligogalakturonide, ist daher denkbar, daß die injizierte Konzentration der Oligogalakturonide nicht hoch genug gewesen sind, um makroskopisch sichtbare Reaktionen im Blattgewebe von Kartoffelpflanzen auszulösen.

Nach der Frage nach möglichen Regulationsmechanismen stellt sich die Frage, wie Oligogalakturonide Verbräunungen von Zellen sowie den Zelltod auslösen können und welche weiteren Faktoren möglicherweise daran beteiligt sind oder störend wirken. In der Literatur ist gut dokumentiert, daß sowohl in Zellsuspensionskulturen (LEGRENDE et al., 1993; SVALHEIM & ROBERTSON, 1993; ROUET-MAYER et al., 1997) wie auch in abgeschnittenen Blättern (OROZCO-CARDENAS & RYAN, 1999) biologisch aktive Oligogalakturonide die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, einschließlich H_2O_2 , induzieren können ("oxidative burst"). Der Induktionsweg ist noch nicht detailliert aufgeklärt, aber es lassen sich in der Literatur zwei Ansatzpunkte finden. Einerseits können Oligogalakturonide einen vorübergehenden cytosolischen Ca-Influx bewirken (MATHIEU et al., 1991; MESSIAEN et al., 1993), und ein, mittels Ca-Ionophorer ausgelöster, cytosolischer Ca-Influx kann die Bildung von H_2O_2 induzieren (SCHWACKE & HAGER, 1992). Andererseits zeigt die Arbeit von

PRICE et al. (1994), daß H_2O_2 über eine Veränderung des Redoxstatus des Cytosols eine Erhöhung der cytosolischen Ca-Konzentration bewirkt. Aufschlußreich wäre hier eine Arbeit, in der, nach Applikation von Oligogalakturoniden, sowohl die Veränderung der cytosolischen Ca-Konzentration als auch die Bildung von H_2O_2 gemessen wird. Vermutet wird, daß die Bildung von H_2O_2 auf eine erhöhte Aktivität einer Oxidase zurückzuführen ist (LEGENDRE et al., 1993). Offen ist dabei, ob die Stimulierung dieser Oxidase direkt durch die Oligogalakturonide erfolgt oder indirekt über eine Erhöhung der cytosolischen Ca-Konzentration. Bei dieser Oxidase könnte es sich um eine NADPH-Oxidase der Plasmamembran handeln, die die Bildung von Sauerstoff-Radikalen katalysiert, welche anschließend über eine SOD (Superoxidismutase) zu H_2O_2 umgesetzt werden (LAMB & DIXON, 1997). Dem gebildeten H_2O_2 werden mehrere Funktionen zugeschrieben: so soll H_2O_2 lokal die oxidative Bindung von Proteinen an die Zellwand bewirken, systemisch die Transkription verschiedener Gene auslösen, und des weiteren soll H_2O_2 lokal den raschen Zelltod (Hypersensitivitätsreaktion) auslösen (TENHAKEN et al., 1995; LAMB & DIXON, 1997). Auch bei beiden zuletzt genannten Reaktionen wird der Störung der cytosolischen Ca-Homoestasis eine wichtige Rolle zugesprochen, da eine Erhöhung der cytosolischen Ca-Konzentration den, über Protein-Kinasen gesteuerten, Prozeß des Zelltods auslösen kann (LEVINE et al., 1996; PENNELL & LAMB, 1997). Zwar besitzt H_2O_2 selbst eine gewisse Cytotoxizität, wofür aber höhere Konzentrationen erforderlich sind, als für die Auslösung der Gen-Transkription (PRICE et al., 1994; TENHAKEN et al., 1995). So konnten LU & HIGGINS (1999) in Tomatenblättern nekrotische Gewebeveränderungen durch die Injektion von Lösungen mit einer Konzentration von mehr als 100 mM H_2O_2 induzieren. Allerdings kann Fe^{2+} (über die Fenton-Reaktion) die cytotoxische H_2O_2 -Konzentration drastisch vermindern, wie die Arbeit von LU & HIGGINS (1999) anschaulich zeigt. In Zellsuspensionkulturen wurde die Vitalität der Zellen ohne Fe^{2+} im Medium durch 50 mM H_2O_2 und in Gegenwart von 1 mM Fe^{2+} (als FeSO_4) schon durch 10 mM H_2O_2 deutlich reduziert. LEGRENDE et al. (1993) berechneten an Hand ihrer Ergebnisse, daß durch ein Oligogalakturonid-Molekül die Bildung von 100 H_2O_2 -Molekülen elicitiert wird. Wie oben dargelegt, kann die Konzentration von Oligogalakturoniden mit DP 16-20 in der Apoplastenflüssigkeit von Kartoffelblättern bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad 108 bis 248 μM betragen. Rechnerisch könnten diese Oligogalakturonide demnach zur Bildung von 10,8 bis 24,8 mM H_2O_2 führen. Diese Konzentration liegt nicht im Bereich der, oben genannten, direkten cytotoxischen Konzentration von H_2O_2 . Unter Berücksichtigung der Fe-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit junger Kartoffelblätter, die zwischen 0,3 und 0,5 mM lag (abhängig von dem Blattalter und der Form der N-Ernährung, aber unabhängig von der Höhe des Ca-Angebotes der Nährlösung sowie der Kartoffelsorte; Daten nicht dargestellt), kann eine mögliche cytotoxische H_2O_2 -Wirkung *a priori* zumindest nicht ausgeschlossen werden. Allerdings erscheint eine H_2O_2 -Akkumulation im Blattgewebe nicht sehr wahrscheinlich, wenn bedacht wird, daß in intakten Chloroplasten Systeme zur Detoxi-

fizierung von Sauerstoffradikalen wie auch des gut membranpermeablen H_2O_2 existieren (ALSCHER et al., 1997). Zudem weisen Untersuchungen von WISSEMEIER (1988) auf eine Katalase-Aktivität auch im Blattapoplasten hin.

Es stellt sich aber die interessante Frage, ob im Blattgewebe, daß nicht über funktionstüchtige Chloroplasten verfügt, wie es in den aufgehellten Randbereichen von Kartoffelblätter mit niedrigem Ca-Versorgungsgrad (Abb. 16) im Anfangsstadium vor der Ausprägung von Blattrandnekrosen zu vermuten ist, eine H_2O_2 -Akkumulation stattfinden kann. In diesem Fall wären die Blattrandaufhellungen sozusagen Voraussetzung dafür, daß die H_2O_2 -Moleküle stabil sind, zumindest für einen längeren Zeitraum als im restlichen, grünen Blattgewebe, und den Zelltod am Blattrand auslösen können. In diesem Fall können alle Faktoren, die zu der Bildung (NADP-Oxidase, SOD) wie zur der Degradation (Katalasen, H_2O_2 -Peroxidasen) von H_2O_2 beitragen, auch zu einer unterschiedlichen Ausprägung von Blattrandnekrosen bei Kartoffelblättern beitragen. Die Frage bleibt dann zum einen, was die Ausprägung der Randaufhellungen verursacht, und wie sich die, im späteren Stadium der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen sichtbaren, punktförmigen Nekrosen im Interkostalbereich nahe der Blattrippe erklären lassen, denen keine sichtbare Aufhellung des Blattgewebes vorausging. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, daß neben den Chloroplasten insbesondere die Peroxisomen Ort hoher Katalase-Aktivität sind (TAIZ & ZIEGLER, 2000) und somit vermutlich einer cytotoxischen Akkumulation von H_2O_2 stets entgegenwirken.

Neben der Signaltransduktion über H_2O_2 gibt es weitere Reaktionen, die durch biologisch aktive Oligogalakturonide ausgelöst werden können, aber nicht in gleicher Weise auch durch H_2O_2 induziert werden (TENHAKEN et al., 1995; LAMB & DIXON, 1997). Als Beispiel kann hier die Induktion der Transkription der Phenylammonium-Lyase (PAL) genannt werden. PAL katalysiert die oxidative Deaminierung von Phenylalanin unter Bildung von Zimtsäure, und gilt als wichtiger Regulator bei der Bildung phenolischer Verbindungen (TAIZ & ZIEGLER, 2000). Über eine Erhöhung der Aktivität der PAL und die Anreicherung von p-Hydroxybenzoesäure erklärten MESSIAEN & VAN CUTSEM (1994) die beobachtete Verbräunung von Zellsuspensionkulturen nach Applikation biologisch aktiver Oligogalakturonide. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von WALKER-SIMMONS et al. (1983), die nach der Applikation biologisch aktiver Oligogalakturonide eine Erhöhung der PAL-Aktivität in Erbsenschoten, nicht jedoch in Tomatenblättern feststellen konnten. Hingegen konnte sowohl in Samenhülsen von Erbsen als auch in Tomatenblättern eine Induktion von Proteinase-Inhibitoren nachgewiesen werden. Da die Induktion von Proteinase-Inhibitoren im Gegensatz zur H_2O_2 -Bildung schon durch Oligogalakturonide mit DP 2 erfolgen kann (MOLOSHOK et al., 1992; SVALHEIM & ROBERTSON, 1993) lassen sich für diese Ergebnisse zwei mögliche Erklärungen finden: in den Tomatenblättern wurden die applizierten Oligogalakturonide schneller depolymerisiert als in Erbsenschoten oder eine Induktion der PAL ist in Tomaten-

blättern durch Oligogalakturonide nicht möglich. Ob die zuletzt genannte Erklärung zutrifft und möglicherweise auch für andere Solanaceen oder überhaupt für Blätter (andere als Kotyledonenblätter) gilt, kann an Hand der Literatur zur Zeit nicht beantwortet werden. Zumindest deutet sich aber hier sowie aus der Arbeit von WEST et al. (1985) ein Einfluß der Gewebeart auf die Auswirkungen applizierter Oligogalakturonide an. Insgesamt beschäftigen sich nur wenige Arbeiten mit der Wirkung von Oligogalakturonide in Blättern; überwiegend ist die Induktion physiologischer Prozesse durch Oligogalakturonide in einfachen Systemen, d.h. Zellen mit geringem Differenzierungsgrad, wie Protoplasten, Zellsuspensionskulturen, Hypokotylgewebe und Kotyledonenblättern beschrieben.

Nicht unerwähnt soll die Arbeit von ROUET-MAYER et al. (1997) bleiben, die zeigt, daß die Zugabe von biologisch aktiven Oligogalakturonide ein anderes Signal darstellt als eine pilzliche Pectin-Lyase zu Zellsuspensionkulturen von Tabak. In beiden Fällen konnte zwar eine vorübergehende Alkalisierung des Aussenmediums sowie eine Bildung von H_2O_2 induziert werden, aber die Enzymzugabe bewirkte eine stärkere Alkalisierung und eine schwächere H_2O_2 -Bildung als die Zugabe von Oligogalakturoniden. Außerdem reagierten die Zellen nach der Zugabe der Pektin-Lyase innerhalb von 4 h nicht mehr auf eine weitere Applikation des Enzyms, wohl aber auf die Applikation von Oligogalakturoniden. Entsprechendes galt auch für den umgekehrten Fall, wo zuerst Oligogalakturonide und später Oligogalakturonide oder das Enzym zugegeben wurden. Der Ausgangspunkt der Untersuchungen physiologischer Reaktionen, die durch Oligogalakturonide induziert werden können, ist die Annahme, daß nach der Infektion mit einem Pathogen diese Oligogalakturonide durch die Aktivität pektolytischer Enzyme entstehen und in der Wirtspflanzen Abwehrreaktionen elicitieren können (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984; EBEL & COSIO, 1994; JOHN et al., 1997). Vor dem Hintergrund der Arbeit von ROUET-MAYER et al. (1997) wird eine ganz wesentlich Frage aufgeworfen, nämlich ob nicht vielmehr die Modifikationen in der Zellwandstruktur, bedingt durch die Aktivität pektolytischer Enzyme, über Veränderungen mechanosensorischer Kanäle die Elicitierung verschiedener Reaktionen bewirken (TREWAVAS & KNIGHT, 1994).

Damit stellt sich die Frage, wie die Oligogalakturonide in der Apoplastenflüssigkeit von Blättern mit niedrigem Ca-Versorgungsgrad entstehen bzw. freigesetzt werden und wie sich die festgestellten Sortenunterschiede möglicherweise erklären lassen können.

Ca trägt über die Vernetzung der Pektinmoleküle zur Stabilisierung des Pektinnetzwerkes bei. Eine Verringerung des Ca-Versorgungsgrades der Zellwand kann damit potentiell die Stabilität und Integrität verringern. So zeigen die Ergebnisse von SASAKI & NAGAHASHI (1989) an isolierten und mit EDTA-behandelten, und damit Ca-armen, Zellwänden von Kartoffeln eine nicht-enzymatisch bedingte Pektin-Freisetzung. Die Höhe dieser Freisetzung war abhängig von der Ca-Konzentration der Inkubationslösung und war maximal bei einer Ca-Konzentration $< 1 \mu M$ und wurde um 90%

reduziert in Gegenwart von 100 μM Ca. In der Literatur beschreiben einige Untersuchungen an pflanzlichem Material (Wurzeln, Stengeln) unterschiedlichen Ca-Versorgungsgrades Veränderungen in den Gehalten an wasserlöslichen sowie an chelatorlöslichen Pektinen des isolierten Zellwandmaterials. Übereinstimmend wurden in diesen Untersuchungen bei dem Gewebe mit niedrigem Ca-Status niedrigere Gehalte an chelatorlöslichen Pektinen der Zellwand festgestellt als bei dem Gewebe mit hohem Ca-Status (EDINGTON 1961, KONNO 1989). Die Untersuchung von KONNO et al. (1999) an Zellsuspensionen von *Daucus carota* zeigt dabei nicht nur eine Abnahme der Gehalte an chelatorlöslichen Pektinen der Zellwand, sondern auch eine Zunahme der Konzentration an Galakturonsäuren im Außenmedium der Zellsuspensionskultur mit niedrigem Ca-Status im Vergleich zu der Kultur mit hohem Ca-Versorgungsgrad. Dieses Ergebnis legt die Vermutung der Degradation der Pektinsubstanz bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad nahe. Allerdings fehlt auch in dieser Arbeit der Nachweis, daß die Oligogalakturonide im Nährmedium von der Zellwand stammten und nicht auf eine erhöhte Sekretion von synthetisiertem Pektinmaterial zurückzuführen war. Die gleichzeitig höhere Aktivitäten pektin-modifizierender sowie -degradierender Enzyme, wie Polygalakturonase (PG) und β -Galaktosidase, deuten allerdings darauf hin, daß die Ursache in der Degradation der Pektinsubstanz zu sehen ist.

Arbeiten mit pilzlichen Polygalakturonasen zeigen (EDINGTON et al., 1961, BATEMAN & LUMSDEN, 1965; CORDON, 1965; BATEMAN & MILLAR, 1966), daß ein verringerter Ca-Versorgungsgrad des pflanzlichen Gewebes die Maceration und Zellwand-Degradation durch pilzliche Polygalakturonase erhöhte.

Pflanzliche Polygalakturonasen, insbesondere die *endo*-Form, wurden hingegen vor allem bei Früchten in Zusammenhang mit der Fruchtreife untersucht (PRESSEY & AVANTS, 1973, 1976; TUCKER et al., 1980; HUBER, 1983). Die *exo*-PG, die gering methylierte Pektinmoleküle sowie Polygalakturonsäure von dem nicht-reduzierenden Ende her hydrolysiert, ist nicht in der Lage pflanzliches Zellwandmaterial zu degradieren (KONNO, 1988). Dagegen kann die *endo*-Form der PG isoliertes, pflanzliches Zellwandmaterial degradieren. Die Aktivität der *endo*-PG wird durch den pH-Wert, sowie durch die Art und Konzentration der Kationen beeinflusst. Das pH-Optimum liegt unterhalb von pH 6, und ist ebenfalls abhängig von der Art und Konzentration der Kationen sowie auch von der Art und der Molekülgröße des Substrates (PRESSEY & AVANTS, 1971, 1973, 1976; CHUN & HUBER, 1989). Die Freisetzung von Oligogalakturoniden aus dem Zellwandmaterial durch eine *endo*-PG kann durch die Gegenwart von Ca beeinflusst werden. Allerdings ist nicht immer eine eindeutige Aussage möglich, ob die Aktivität des Enzyms direkt durch Ca beeinflusst wird oder aber nur indirekt durch Interaktionen des Substrats mit Ca (NARI et al., 1991). Erwähnenswert ist hier die Arbeit von JAUNEAU et al. (1994), die bei *in vitro* Untersuchungen keinen Einfluß der Ca-Konzentration im Bereich von 0,1 bis 2,5 mM Ca auf die Aktivität einer *endo*-PG von *Linum usitatissimum* feststellten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten aber, daß

die Hydrolyse von CDTA-behandelten Epidermis-Zellwänden durch diese *endo*-PG nach der Zugabe von Ca stark vermindert wurde. Die Bedeutung der Ca-Konzentration im Zellwandbereich für die Aktivität der *endo*-PG kann daher nicht in einer direkten Beeinflussung der Aktivität des Enzyms sondern vielmehr in der Beeinflussung der Degradierbarkeit des Substrats und / oder der Mobilität des Enzyms gesehen werden.

Vor diesem Hintergrund kann unter Ca-Mangelbedingungen, aufgrund des niedrigeren Ca-Status der Zellwand, eine erleichterte Degradierbarkeit der Pektinsubstanz durch eine *endo*-PG vermutet werden. Die Arbeiten von KONNO (1984, 1999) mit Zellsuspensionkulturen und Wurzeln von Gurkensämlingen zeigten in der jeweiligen Ca-Mangel-Variante eine erhöhte Aktivität einer PG. Damit übereinstimmend konnte im Blatthomogenat der Sorte 'Adelheid' mit abnehmendem Ca-Versorgungsgrad der Blätter eine Zunahme der Aktivität der PG festgestellt werden (Abb. 59). Hingegen zeigte sich bei der Sorte 'Bintje' ein eindeutiger Einfluß des Ca-Status der Blätter auf die Aktivität der PG nicht. Außerdem war die Aktivität der PG bei der Sorte 'Bintje' höher als die höchste Aktivität der Sorte 'Adelheid'. Die verwendete Methode zur Bestimmung der Aktivität der PG läßt keine Aussage zu, ob es sich um eine *endo*- oder *exo*-Form der PG handelt. Sicher ist zumindest, daß es nicht nur um eine *endo*-PG handeln kann, da letztere Dimere nicht degradiert und die Monomere somit nur auf die Aktivität einer *exo*-PG zurückzuführen sind. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der PG können hier in der vorliegenden Arbeit somit nicht hinreichend die Unterschiede zwischen den Sorten sowie zwischen den Ca-Angebotsstufen in der Konzentration der Uronsäuren sowie der Oligogalakturonide in der Blattapoplastenflüssigkeit erklären.

Von besonderer Bedeutung für eine enzymatisch-bedingte Pektin-Degradation ist neben der PG auch die Pektinmethylesterase (PME), da dieses Enzym durch die Demethylierung der Pektinsubstanz diese einer Degradation durch die PG zugänglicher macht. Allerdings konnte ein Einfluß des Ca-Status der Blätter sowie sorten-spezifische Unterschiede in der Aktivität der PME nicht festgestellt werden (Abb. 57).

Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit den Ursachen für die Abnahme der Festigkeit des Fruchtgewebes im Verlauf der Reife. Es ist gut dokumentiert (PRESSEY, 1977; REDGEWELL et al., 1992), daß mit der Festigkeitsabnahme Veränderungen in der Zellwand, dabei insbesondere in der Löslichkeit der Pektine stattfinden. In Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fruchtfestigkeit und dem Pektinhaushalt wird in einigen Arbeiten die Aktivität pektolytischer Enzyme im Verlaufe der Reife untersucht. Bei einigen Früchten zeigte sich ein paralleler Verlauf der Abnahme der Fruchtfestigkeit und der Zunahme der Aktivität der PG (ANDREWS & LI, 1995; HUBER, 1983; KETSA & DAENKANIT, 1999). Andere Arbeiten zeigten, daß die Aktivität der PG erst zunahm, nachdem die Fruchtfestigkeit schon vermindert war, wohingegen die Aktivität der β -Galaktosidase schon früher zunahm (CHIN et al., 1999; PRESSEY, 1983) oder in einem engeren Zusammenhang mit der Abnahme der Fruchtfestigkeit stand als die PG (LAZAN et al., 1995; ALI et

al., 1995). Hier wird vermutet, daß die β -Galaktosidase die Bindungen zwischen dem Neutralzucker Galaktose der Seitenketten und dem Pektin-Grundgerüst hydrolytisch spaltet. Die β -Galaktosidase spaltet spezifisch Galaktose von einem anderen, glykosidisch gebundenem, Molekül ab, welches aber nicht unbedingt Pektin sein muß, sondern auch Hemicellulose sein kann.

Eine Abnahme des Galaktose-Gehaltes der Zellwände vor sowie gleichzeitig mit der Zunahme an löslichen Oligogalakturoniden wurde an reifenden Tomatenfrüchten schon beobachtet (GROSS & WALLNER, 1979; KIM et al., 1991). CaCl_2 -Spritzen auf Äpfel während der Fruchtentwicklung führte, nach 20-tägiger Lagerung der geernteten Früchte, nicht nur zu einer erhöhten Fruchtfestigkeit, sondern auch zu einer verminderten Aktivität der β -Galaktosidase (SIDDIQUI & BANGERTH, 1995). Auch KONNO et al. (1999) beobachten an Zellsuspensionkulturen von *Daucus carota*, die bei niedrigem Ca-Angebot kultiviert wurden, eine höhere Aktivität der β -Galaktosidase als bei den Kulturen, die bei hohem Ca-Angebot kultiviert wurden. Vor diesem Hintergrund war es interessant, in Blättern mit unterschiedlichem Ca-Versorgungsgrad die Aktivität der β -Galaktosidase zu bestimmen. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Sorten in der Aktivität der β -Galaktosidase festgestellt (Abb. 58). Aber es zeigte sich ein signifikanter Einfluß des Ca-Versorgungsgrades der Blätter. In Blättern von Pflanzen des niedrigsten Ca-Angebotes ($30 \mu\text{M}$) wurde eine signifikant höhere Aktivität der β -Galaktosidase festgestellt als bei Blättern der $60 \mu\text{M}$ und der $1000 \mu\text{M}$ Variante. Die Frage, was die Ursache für die deutliche Zunahme der Aktivität der β -Galaktosidase ist, kann zur Zeit nicht beantwortet werden. Durch die β -Galaktosidase können Pektine deutlich in ihrer Molekülgröße, durch Abspaltung der Seitenketten und nicht durch Depolymerisierung, vermindert werden. Dadurch wiederum kann sich ihr Löslichkeitsverhalten ändern. Möglicherweise sind sie dadurch leichter degradierbar durch eine *exo*-PG. Ähnliche Vorstellungen bestehen bei den Reifeprozessen von verschiedenen Früchten, bei denen zu Beginn der Reife eine erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase beobachtet wurde (siehe oben).

Durch die bei $30 \mu\text{M}$ Ca-Angebot erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase könnte sich eine deutliche Zunahme in der Uronsäure-Konzentration bei $30 \mu\text{M}$ Ca-Angebot erklären lassen. Berücksichtigt man nun die höhere Aktivität der PG bei der Sorte 'Bintje' im Vergleich zu der Sorte 'Adelheid', so kann vermutet werden, daß die Lebensdauer von Oligogalakturoniden mit größerem DP im Blattapoplasten kürzer ist als bei der Sorte 'Adelheid'. Bei $30 \mu\text{M}$ Ca-Angebot würden sich in der Blattapoplastenflüssigkeit der Sorte 'Adelheid' eine höhere Konzentration an Oligogalakturoniden mit größerem DP feststellen lassen, im Vergleich zu 'Bintje'. Durch diese modellhafte Vorstellung läßt sich somit die Erhöhung der Uronsäure-Konzentration bei $30 \mu\text{M}$, und nicht bei $60 \mu\text{M}$ Ca-Angebot, gegenüber $1000 \mu\text{M}$ Ca-Angebot erklären, sowie das stärkere Auftreten von Oligogalakturoniden mit größerem DP bei $30 \mu\text{M}$ Ca-Angebot bei der Sorte 'Adelheid' im Vergleich zu der Sorte 'Bintje'.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß bei Ca-Mangel in Kartoffelblättern eine verstärkte Freisetzung von Oligogalakturoniden aus der Zellwand in die Apoplastenflüssigkeit nicht anhand der Uronsäure-Gehalte der Zellwand, wohl aber anhand der Uronsäure-Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit festgestellt werden konnte. Bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' traten bei Ca-Mangel nicht nur höhere Uronsäure-Konzentrationen in der Blattapoplastenflüssigkeit auf als bei der Ca-effizienten Sorte 'Bintje', sondern auch verstärkt Oligogalakturonide mit DP 9-20. Bei Ca-Mangel könnten unter bestimmten Annahmen physiologisch relevante Konzentrationen an Oligogalakturoniden mit DP 16-20 in der Blattapoplastenflüssigkeit erreicht werden. Aber sowohl ein Anstieg in der Uronsäure-Konzentration als auch eine Zunahme an Oligogalakturonide mit DP 9-20 in der Blattapoplastenflüssigkeit konnte nur bei stärkerer Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und nicht in einem frühen Stadium der Entwicklung von Ca-Mangelsymptomen festgestellt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten deuten daher letztlich nicht auf eine primäre Beteiligung von Oligogalakturoniden an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen an Kartoffelblättern hin.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ein unzureichendes Calcium (Ca)-Angebot des Bodens bedingt sogenannten absoluten Ca-Mangel. Weltweit betrachtet kann dies vor allem ein Problem auf den stark verwitterten, sauren Böden der humiden Tropen und Subtropen sein. Für Kulturpflanzen auf den landwirtschaftlich genutzten Böden unserer Breitengrade stellt absoluter Ca-Mangel nur selten ein Problem dar. Hingegen kann physiologischer Ca-Mangel bei vielen gartenbaulichen Kulturen, sowohl an vegetativen (Innenblattnekrosen bei Salat und Kohlpflanzen) wie auch an generativen Organen (Stippigkeit von Äpfeln, Blütenendfäule von Tomaten), auftreten, wodurch die Qualität und daher der ökonomische Wert gemindert wird.

Genotypische Unterschiede sind sowohl in dem Auftreten von physiologischem Ca-Mangel als auch in der Empfindlichkeit gegenüber absolutem Ca-Mangel beschrieben. Nicht in jedem Fall können diese genotypischen Unterschiede durch die Gesamt-Ca-Gehalte des Gewebes erklärt werden. In diesen Fällen besteht die Vermutung, daß genotypische Unterschiede in der Nutzung oder Kompartimentierung von Ca auf Gewebe- bzw. Zellebene bestehen, die bei der Bestimmung des Gesamt-Ca-Gehaltes des Gewebes nicht erfasst werden.

Im Gegensatz zu anderen Makronährstoffen ist ein hoher Anteil des Ca im Apoplasten lokalisiert. Hier ist Ca von struktureller und funktioneller Bedeutung für die Plasmamembran und sorgt des weiteren durch die Vernetzung schwach methylierter Pektine für die Stabilität und Integrität des Pektin-Netzwerkes der Zellwand. Physiologisch bedeutsam ist eine mögliche Pektin-Degradation bei niedrigem Ca-Versorgungsgrad des Gewebes insbesondere vor dem Hintergrund, daß Oligogalakturonide bestimmter Größe, d.h. mit einem bestimmten Polymerisationsgrad, als Signalmoleküle verschiedene Reaktionen auslösen können, wie Verbräunungen von Zellen und Nekrotisierung von Geweben.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der Kartoffelpflanze untersucht, ob sich bei Ca-Mangel Hinweise auf eine Degradation der Pektinsubstanz in Blättern feststellen lassen, wobei biologisch aktive Oligogalakturonide in die Apoplastenflüssigkeit freigesetzt werden, die ursächlich an der Ausbildung von Ca-Mangelsymptomen beteiligt sind. Der Vergleich von Kartoffelsorten, die sich in der Intensität von Ca-Mangelsymptomen unterscheiden, sollte Hinweise zur der Physiologie dieser Unterschiede liefern.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung von Genotypen, die sich in der Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigem Ca-Angebot und damit in der Ca-Effizienz unterscheiden, sowie mit möglichen Einflußfaktoren (Klimabedingungen, Form der Stickstoff-Ernährung) auf die Ca-Effizienz.

Mit dem Ziel Genotypen zu identifizieren, die sich deutlich in ihrer Ca-Effizienz unterscheiden, wurde in einem Nährlösungsversuch unter kontrollierten Klimakammer-Bedingungen ein

weites Spektrum an *Solanum*-Genotypen (acht Wildarten, drei Primitivformen und fünf Kultursorten der Kartoffel) auf ihre Ca-Effizienz hin untersucht. Als Kriterien der Ca-Effizienz wurden das Wachstum und die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei niedrigem Ca-Angebot in der Nährlösung verwendet. Innerhalb der untersuchten Genotypen erwies sich als Ca-effizientester Genotyp die Sorte 'Bintje' und als Ca-ineffizientester Genotyp die Sorte 'Ijsselster'. Bei den untersuchten *Solanum*-Genotypen zeigte sich, daß die genotypischen Unterschiede in der Nutzung des Ca-Angebots der Nährlösung zur Trockenmassen-Bildung im wesentlichen auf einer effizienten Aufnahme von Ca (Aufnahme-Effizienz) und weniger auf einer effizienten Verwertung des aufgenommenen Ca (Verwertungs-Effizienz) beruhten.

Die Frage nach der Stabilität genotypischer Unterschiede in der Ca-Effizienz unter verschiedenen Umweltbedingungen wurde an sechs Kartoffelsorten in parallelen Nährlösungsversuchen unter Gewächshaus- sowie Klimakammer-Bedingungen untersucht. Die Unterschiede in der Ca-Effizienz zwischen den Sorte 'Bintje' (Ca-effizient) und 'Adelheid' (Ca-ineffizient) waren stets gleichgerichtet, wobei die Unterschiede unter Klimakammer-Bedingungen stärker ausgeprägt waren. Bei den übrigen vier Sorten 'Arnika', 'Ijsselster', 'San Michele' und 'Ultimus' deutete sich an, daß die unterschiedlichen Umweltbedingungen einen Einfluß auf die genotypische Ca-Effizienz haben.

Die Frage nach einem Einfluß der Form der N-Ernährung auf die genotypische Ca-Effizienz wurde in einem Nährlösungsversuch unter kontrollierten Klimakammer-Bedingungen bei den unterschiedlich Ca-effizienten Kartoffelsorten 'Adelheid' und 'Bintje' untersucht. Die Unterschiede in der Intensität von Ca-Mangelsymptomen zwischen diesen beiden Sorten bestanden sowohl bei Nitrat-, wie Ammoniumnitrat als auch bei Ammonium-Ernährung der Pflanzen. Eine N-Formen x Genotyp Interaktion in der Ca-Effizienz der beiden Sorten lag somit nicht vor.

Die zentrale Frage, ob bei Ca-Mangel in Blättern eine verstärkt biologisch aktive Oligogalakturonide aus der Zellwand freigesetzt werden, welche ursächlich an der Ausbildung von Ca-Mangelsymptomen beteiligt sind, wurde an zwei Kartoffelsorten untersucht, die sich möglichst deutlich und stabil in ihrer Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigem Ca-Angebot der Nährlösung voneinander unterscheiden. Pflanzen der Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) wurden unter kontrollierten Klimakammer-Bedingungen in Nährlösung bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot (1000 μM (Kontrolle), 60 μM sowie 30 μM) kultiviert. Mittels der Infiltrations-Zentrifugations-Methode wurde aus jungen Blättern Apoplastenwaschflüssigkeit gewonnen. In dieser verdünnten Blattapoplastenflüssigkeit wurde die Konzentration an Ca und Uronsäuren bestimmt und die Oligogalakturonide mittels HPAEC-PAD-Analytik hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Unterschiede in der Stärke der Ca-Mangelsymptome bei niedrigem Ca-Angebot der Nährlösung zwischen den unterschiedlich Ca-effizienten Sorten 'Adelheid' (Ca-ineffizient) und 'Bintje' (Ca-effizient) ließen sich nicht hinreichend durch die Gesamt-Ca-Gehalte junger Blätter erklären. Die höhere Ca-Effizienz der Sorte 'Bintje' im Vergleich zu der Sorte 'Adelheid' konnte aber auch nicht über den Ca-Gehalt isolierter Zellwände sowie durch eine höhere Ca-Konzentration oder eine höhere Ca^{2+} -Aktivität in der wäßrigen Phase des Blattapoplasten junger Blätter erklärt werden.

Der Uronsäure-Gehalt isolierter Zellwände junger Kartoffelblätter betrug 15 % und wurde durch das Ca-Angebot der Nährlösung nicht beeinflusst.

Die in der Blattapoplastenflüssigkeit gelösten Uronsäure-Mengen entsprachen weniger als 2 % der Uronsäure-Mengen der Zellwand junger Kartoffelblätter.

Bei der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' traten bei Ca-Mangel nicht nur höhere Uronsäure-Konzentrationen in der Blattapoplastenflüssigkeit auf als bei der Ca-effizienten Sorte 'Bintje', sondern auch verstärkt potentiell biologisch aktive Oligogalakturonide mit DP 9-20.

Aber sowohl ein Anstieg in der Uronsäure-Konzentration als auch eine Zunahme an Oligogalakturonide mit DP 9-20 in der Blattapoplastenflüssigkeit konnte nur bei stärkerer Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und nicht bei schwächerer Ausprägung festgestellt werden.

In eine mit der Ca-ineffizienten Sorte 'Adelheid' durchgeführten Zeitstudie konnte ein Anstieg in den diffusiblen Uronsäure-Gehalten des Blattapoplasten nicht vor, sondern vielmehr erst bei einer starken Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten deuten letztlich nicht auf eine ursächliche Beteiligung von Oligogalakturoniden an der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen an Kartoffelblättern hin.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, P. and HAND, D.J. (1993): Effects of humidity and Ca level on dry-matter and Ca accumulation by leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) J. Hort. Sci. 68, 767-774
- ADMAS, P. and HO, L.C. (1995): Differential effects of salinity and humidity on growth and Ca status of tomato and cucumber grown in hydroponic culture Acta Hort. 401, 357-363
- AIKMAN, D.P. and HOUTER, G. (1990): Influence of radiation and humidity on transpiration: Implications for calcium levels in tomato leaves J. Hort. Sci. 65, 245-253
- AL-HAKIM, A. and LINDHARDT, R.J. (1990): Isolation and recovery of acidic oligosaccharides from polyacrylamide gels by semi-dry electrotransfer. Electrophoresis 11, 23-28
- ALI, Z.M.; ARMUGAM, S. and LAZAN, H. (1995): Galactosidase and its significance in ripening mango fruit. Phytochem. 38, 1109-1114
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L. and CRAMER, C.L. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiol. Plant. 100, 224-233
- ANDREWS, P.K. and LI, S. (1995): Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimateric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. J. Hort. Sci. 70, 561-567
- APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P.F. and LOW, P.S. (1989): Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiol. 90, 109-116
- ARMSTRONG, M.J. and KIRKBY, E.A. (1979): The influence of humidity on the mineral composition of tomato plants with special reference to calcium distribution Plant Soil 52, 427-435
- BAKKER, J.C. and SONNEVELD, C. (1988): Calcium deficiency of glasshouse cucumber is affected by environmental humidity and mineral nutrition J. Hort. Sci. 63, 241-246
- BANGERTH, F. (1979): Calcium-related physiological disorders of plants. Ann. Rev. Phytopathol. 17, 97-122
- BATEMAN, D.F. and LUMSDEN, R.D. (1965): Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. Phytopath. 55, 734-738
- BATEMAN, D.F. and MILLAR, R.L. (1966): Pectic enzymes in tissue degradation. Ann. Rev. Phytopathol. 4, 119-146
- BATTEY, N.H. (1990): Calcium deficiency disorders of fruits and vegetables. Postharvest News and Information 1, 23-27
- BAYDOUN, E.A.H. and FRY, S.C. (1985): The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. Planta 165, 269-276
- BEHLING, J.P.; GABELMAN, W.H. and GERLOFF, G.C. (1989): The distribution and utilization of calcium by two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines differing in calcium efficiency when grown under low Ca-stress. Plant Soil 113, 189-196
- BELL, C.W. and BIDDULPH, O. (1963): Translocation of calcium. Exchange versus mass flow. Plant Physiol. 38, 610-614
- BELLINCAMPI, D.; SALVI, G.; LORENZO DE, G. and CERVONE, F. (1993): Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. Plant J. 4, 207-213
- BERGEY, D.R.; OROZCO-CARDENAS, M.; DE MOURA, D.S. and RYAN, C.A. (1999): A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 1756-1760
- BERGMANN, W. (1993): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Gustav Fischer Verlag (Jena). 3.te Aufl.

- BERGMEYER, H.U. und BERNT, E. (1974): Malat-Dehydrogenase – Bestimmung der Aktivität. In: BERGMEYER, H.U. (ed.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. 1. Verlag Chemie (Weinheim). 575-586
- BERNSTEIN, L. (1971): Methode for determining solutes in the cell wall of leaves. *Plant Physiol.* 47, 361-365
- BISHOP, P.D.; MAKUS, D.J.; PEARCE, G. and RYAN, C.A. (1981): Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3536-3540
- BLAKENEY, A.B. and MATHESON, N.K. (1984): Some properties of the stem and pollen starches of rice. *Stärke* 36, 265-269
- BLOOM, A.J. (1994): Crop acquisition of ammonium and nitrate. In: BOOTE, K.J.; BENNETT, J.M.; SINCLAIR, T.R. and PAULSEN, G.M. (eds.): Physiology and determination of crop yield. ASA (Madison), 303-309
- BLUMENKRANTZ, N. and ASBOE-HANSEN, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484-489
- BRADFIELD, E.G. and GUTTRIDGE, C.G. (1979): The dependence of calcium transport and leaf tipburn in strawberry on relative humidity and nutrient solution concentration *Ann. Bot.* 43, 363-372
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- BRANCA, C.; LORENZO DE, G. and CERVONE, F. (1988): Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiol. Plant.* 72, 499-504
- BRUCE, R.J. and WEST, C.A. (1989): Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 91, 889-897
- BRUMAGEN, D.M. and HIATT, A.J. (1966): The relationship of oxalic acid to the translocation and utilization of calcium in *Nicotiana tabacum*. *Plant Soil* 24, 239-249
- BURDON, J.N.; MOORE, K.G. and WAINWRIGHT, H. (1991): Mineral distribution in mango fruit susceptible to the physiological disorder soft-nose. *Sci. Hortic.* 48, 329-336
- CAMMANN, K. und GALSTER, H. (1996): Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden. Springer Verlag (Berlin), 3.te Aufl.
- CAMPBELL, A.D. and LABAVITCH, J.M. (1991): Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectic oligomers in tomato pericarp discs. *Plant Physiol.* 97, 706-713
- CAO, W. and TIBBITTS, T.W. (1993): Study of various NH₄⁺/NO₃⁻ mixtures for enhancing growth of potatoes. *J. Plant Nutr.* 16, 1691-1704
- CAO, W. and TIBBITTS, T.W. (1998): Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. *J. Plant Nutr.* 21, 615-623
- CERVONE, F.; DE LORENZO, G.; DEGRA, L. and SALVI, G. (1987): Elicitation of necrosis in *Vigna unguiculata* Walp. by homogeneous *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase and by α -D-galacturonate oligomers. *Plant Physiol.* 85, 626-630
- CERVONE, F.; LORENZO DE, G.; ARACI, B.; BELLINCAMPI, D.; CAPRARI, C.; CLARK, A.J.; DESIDERIO, A.; DEVOTO, A.; LECKIE, F.; MATTEI, B.; NUSS, L. and SALVI, G. (1996): The role of polygalacturonase, PGIP and pectic oligomers in fungal infection. In: VISSER, J. and VORAGEN, A.G.J. (eds): Pectines and pectinases. Elsevier Sciences (Amsterdam). 191-205
- CHANG, C.Y.; TSAI, Y.R. and CHANG, W.H. (1993): Models for the interactions between pectin molecules and other cell-wall constituents in vegetable tissues. *Food Chem.* 48, 145-157

- CHIN, L.H.; ALI, Z.M. and LAZAN, H. (1999): Cell wall modifications, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. *J. Exp. Bot.* 50, 767-775
- CHIU, T. and BOULD, C. (1976): Effects of shortage of calcium and other cations on ^{45}Ca mobility, growth and nutritional disorders of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 27, 969-977
- CHOI, J.H.; CHUNG, G.C. and SUH, S.R. (1997): Effect of night humidity on the vegetative growth and the mineral composition of tomato and strawberry plants *Sci. Hortic.* 70, 293-299
- CHUN, J.-P. and HUBER, D.J. (1998): Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. *Plant Physiol.* 117, 1293-1299
- CLARK, R.B. (1978): Differential response of corn inbreds to calcium. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 9, 729-744
- CLARK, R.B. (1990): Physiology of cereals for mineral nutrient uptake, use and efficiency. In: BALIGAR, V.C. and DUNCAN, R.R. (eds.): *Crops as enhancers of nutrient use*. Academic Press (San Diego, CA). 131-209
- CLARKSON, D.T. (1984): Calcium transport between tissues and its distribution in the plant *Plant Cell Env.* 7, 449-456
- CORDEN, M.E. (1965): Influence of calcium nutrition on *Fusarium* wilt of tomato and polygalacturonase activity. *Phytopath.* 55, 221-224
- COSGROVE, D.J. and CLELAND, R.E. (1983): Solutes in the free space of growing stem tissues. *Plant Physiol.* 72, 326-331
- COTE, F. and HAHN, M.G. (1994): Oligosaccharins: Structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 26, 1379-1411
- COX, W. and REISENAUER, H.M. (1973): Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate or ammonium or both. *Plant Soil* 38, 363-380
- DAAS, P.J.H.; ARISZ, P.W.; SCHOLS, H.A.; DE RUITER, G.A. and VORAGEN, A.G.J. (1998): Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry *Anal. Biochem.* 257, 195-202
- DALE, J.E. (1982): *The growth of leaves*. Studies in biology 137. Edward Arnold Publ. Ltd. (London)
- DANNELL, F.; PFEFFER, H. and MARSCHNER, H. (1995): Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH. *J. Plant Physiol.* 146, 273-278
- DARVILL, A.G. and ALBERSHEIM, P. (1984): Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 243-275
- DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; MCNEIL, M.; LAU, J.M.; YORK, W.S.; STEVENSON, T.T.; THOMAS, J.; DOARES, S.; GOLLIN, D.J.; CHELF, P. and DAVIS, K. (1985): Structure and function of plant cell wall polysaccharides. *J. Cell Sci. Suppl.* 2, 203-217
- DAVIS, J.M.; LOESCHER, W.H.; HAMMOND, M.W. and THORNTON, R.E. (1986a): Response of potatoes to nitrogen form and to change in nitrogen form at tuber initiation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111, 70-72
- DAVIS, K.R.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. and DELL, A. (1986b): Host-pathogen interactions: XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiol.* 80, 568-577
- DAVIS, K.R.; LYON, G.D.; DARVILL, A.G. and ALBERSHEIM, P. (1984): Host-Pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia cartovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* 74, 52-60

- DEMARTY, M.; MORVAN, C. and THELLIER, M. (1984): Calcium and the cell wall. *Plant Cell Env.* 7, 441-448
- DOHERTY, H.M.; SELVENDRAN, R.R. and BOWLES, D.J. (1988): The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxybenzoic acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33, 377-384
- DONER, L.W.; IRWIN, P.L. and KURANTZ (1988): High-performance thin-layer chromatographic resolution of oligogalacturonic acids. *Carbohydrate Res.* 172, 292-296
- DUFNER, J.; JENSEN, U. und SCHUMACHER, E. (1992): Statistik mit SAS. B.G. Teubner (Stuttgart). 357-371
- EBEL, J. and COSIO, E.G. (1994): Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148, 1-36
- EDINGTON, L.V.; CORDEN, M.E. and DIMOND, A.E. (1961): The role of pectic substances in chemically induced resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopath.* 51, 179-182
- EMMERT, F.H. (1969): Retention and passage of calcium and strontium in stems of *Phaseolus vulgaris* as mediated by xylem stream flow rate and dinitrophenol. *Physiol. Plant.* 22, 246-252
- ENGLISH, J.E. and BARKER, A.V. (1982): Water-soluble calcium in Ca-efficient and Ca-inefficient tomato strains. *Hort Sci.* 17, 929-931
- ENGLISH, J.E. and BARKER, A.V. (1983): Calcium efficiency among tomato strains depends on nitrogen regimes. *J. Plant Nutr.* 6, 725-734
- ENGLISH, J.E. and MAYNARD, D.N. (1981): Calcium efficiency among tomato strains. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106, 552-557
- ERICKSON, R.O. and MICHELINI, F.J. (1957): The plastochron index. *Am. J. Bot.* 44, 297-305
- FORREST, R.S. and LYON, G.D. (1990): Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls. *J. Exp. Bot.* 41, 481-488
- FRY, S.C. (1988): The growing plant cell wall. John Wiley & Sons Inc (New York)
- GABELMAN, W.H. and GERLOFF, G.C. (1983): The search for and interpretation of genetic controls that enhance plant growth under deficiency levels of macronutrient, In: SARIC, M.R. and LOUGHMAN (eds.): Genetic aspects of plant nutrition. Martinus Nijhoff (The Hague). 379-394
- GARCIA-ROMERA, I. and FRY, S.C. (1995): The longevity of biologically-active oligogalacturonides in rose cell cultures: Degradation by *exo*-polygalacturonase. *J. Exp. Bot.* 293, 1853-1857
- GERANDAS, J. and SATTELMACHER, B. (1990): Influence of nitrogen form and concentration on growth and ionic balance to tomato (*Lycopersicon esculentum*) and potato (*Solanum tuberosum*). In: VAN BEUSICHEM, M.L. (ed.): Plant nutrition – Physiology and applications. Kluwer Academic Publ.. 33-37
- GERANDAS, J.; ZHU, Z.; BENDIXEN, R.; RATCLIFFE, R.D. and SATTELMACHER B. (1997): Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z. Pflanzenähr. Bodenk.* 160, 239-251
- GILLET, C.; CAMBIER, P. and LINERS, F. (1992): Release of small polyuronides from *Nitella* cell walls during ionic exchange. *Plant Physiol.* 100, 846-852
- GIORDANO, DE L.B.; GABELMAN, W.H. and GERLOFF, G.C. (1982): Inheritance of differences in calcium utilization by tomatoes under low-calcium stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107, 664-669
- GIVAN, C.V. (1979): Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochem.* 18, 375-382
- GOURLEY, C.J.P.; ALLAN, D.L. and RUSSELLE, M.P. (1994): Plant nutrition efficiency: A comparison of definitions and suggested improvement. *Plant Soil* 158, 29-37

- GRAHAM, R.D. (1984): Breeding for nutritional characteristics in cereals. In: TINKER, P.B. and LÄUCHLI, A. (eds.): Advances in plant nutrition 1, 57-102
- GROSS, K.C. (1982): A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. HortSci. 17, 933-934
- GROSS, K.C. and WALLNER, S.J. (1979): Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. Plant Physiol. 63, 117-120
- HAGEMAN, R.H. (1984): Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In: HAUCK, R.D. (ed.): Nitrogen in crop production. ASA (Madison), 67-85
- HAGERMAN, A.E. and AUSTIN, P.J. (1986): Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. J. Agric. Food Chem. 34, 440-444
- HAHN, M.G.; DARVILL, A.G. and ALBERSHEIM, P. (1981): Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol. 68, 1161-1169
- HANSON, J.B. (1984): The functions of calcium in plant nutrition. TINKER, T.B. and LÄUCHLI, A. (eds.): Advances in plant nutrition 1, 149-208
- HARTUNG, W.; WEILER, E.W. and RADIN, J.W. (1992): Auxin and cytokinins in the apoplastic solution of dehydrated cotton leaves. J. Plant Physiol. 140, 324-327
- HAWKES, J.G. (1958): Potatoes: taxonomy, cytology and crossability. In: KAPPERT, H. and RUDOLF, W. (eds.): Handbuch der Pflanzenzüchtung. 2. Aufl., 1-43
- HAWKES, J.G. and HJERTING, J.P. (1989): The potato of bolivia. Their breeding value and evolutionary relationships. Clarendon Press (Oxford)
- HO, L.C. (1989): Environmental effects on the diurnal accumulation of Ca by young fruit and leaves of tomato plants Ann. Bot. 63, 281-288
- HOMBLÉ, F.; RICHTER, C. and DAINTY, J. (1989): Leakage of pectins from the cell wall for *Chara corallina* in the absence of divalent cations. Plant Physiol. Biochem. 27, 465-468
- HONDA, S.; MATSUDA, Y.; TAKAHASHI, M. and KAKEHI, K. (1980): Fluorimetric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide and application to automated analysis of carbohydrates as borate complexes. Anal. Chem. 52, 1079-1082
- HONDA, S.; NISHIMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; CHIBA, H. and KAKEHI, K. (1982): A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. Anal. Biochem. 119, 194-199
- HORN, M.A.; HEINSTEIN, P.F. and LOW, P.S. (1989): Receptor-mediated endocytosis in plant cells. Plant Cell 1, 1003-1009
- HORST, W.J.; CURRLE, C. and WISSEMEIER, A.H. (1992): Differences in calcium efficiency between cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars. Plant Soil 146, 45-54
- HOTCHKISS JR., A.T. and HICKS, K.B. (1990): Analysis of oligogalacturonic acids with 50 or fewer residues by high-performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection. Anal. Biochem. 184, 200-206
- HU, H.; BROWN, P.H. and LABAVITCH, J.M. (1996): Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. J. Exp. Bot. 47, 227-232
- HUBER, D.J. (1983): Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108, 405-409
- HUSTED, S. and SCHJOERRING, J.K. (1995): Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. Plant Physiol. 109, 1453-1460
- IANNETTA, P.P.M.; VAN DEN BERG, J. ; WHEATLEY, R. E. ; MCNICOL, R.J. and DAVIES, H.V. (1999): The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening. Physiol. Plant. 105, 338-347

- INGRAM, K.T. and MCCLLOUD, D.E. (1984): Simulation of potato crop growth and development. *Crop Sci.* 24, 21-27
- ISERMAN, K. (1970): Der Einfluß von Adsorptionsvorgängen im Xylem auf die Calcium-Verteilung bei höheren Pflanzen. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 126, 191-203
- JACHETTA, J.J.; APPLEBY, A.P. and BOERSMA, L. (1986): Use of the pressure vessel to measure concentrations of solutes in apoplastic and membrane-filtered symplastic sap in sunflower leaves. *Plant Physiol.* 82, 995-999
- JAUNEAU, A.; CABIN-FLAMAN, A.; VERDUS, M.C. and THELLIER, M. (1994): Involvement of calcium in the inhibition of endopolygalacturonase activity in epidermis cell wall of *Linum usitatissimum*. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 839-846
- JOHN, M.; RÖHRIG, H.; SCHMIDT, J.; WALDEN, R. and SCHELL, J. (1997): Cell signalling by oligosaccharins. *Trends Plant Sci.* 2, 111-115
- JOHNSON, J.R. (1991): Calcium accumulation, calcium distribution, and biomass partitioning in collards. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116, 991-994
- KETSA, S. and DAENKANIT, T. (1999): Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, β -galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. *Sci. Hortic.* 80, 181-188
- KIM, J.; GROSS, K.C. and SOLOMOS, T. (1991): Galactose metabolism and ethylene production during development and ripening of tomato fruit. *Postharvest Biol. Tech.* 1, 67-80
- KIRKBY, E.A. (1979): Maximizing calcium uptake by plants. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 10, 89-113
- KIRKBY, E.A. and MENGEL, K. (1967): Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea, or ammonium nutrition. *Plant Physiol.* 42, 6-14
- KLEMENT, Z. (1965): Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phyto-bacterial pathogens. *Phytopath.* 55, 1033-1034
- KONNO, H. (1988): Galacturonan 1,4- α -galacturonidase from carrot *Daucus carota* and liverwort *Marchantia polymorpha*. In: Wood, W.A. and Kellogg, S.T. (eds.): Biomass. Part B. Lignin, Pectin and Chitin. *Methods in Enzymology. Section II. Pectin. Vol. 161*. 373-381
- KONNO, H.; NAKASHIMA, S.; MAITANI, T. and KATOH, K. (1999): Alteration of pectic polysaccharides in cell walls, extracellular polysaccharides, and glycan-hydrolytic enzymes of growth-restricted carrot cells under calcium deficiency. *Physiol. Plant.* 107, 287-293
- KONNO, H.; YAMAYA, T.; YAMASAKI, Y. and MATSUMOTO, H. (1984): Pectic polysaccharides breakdown of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation. *Plant Physiol.* 76, 633-637
- LAMB, C. and DIXON, R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275
- LAZAN, H.; SELAMAT, M.K. and ALI, Z.M. (1995): β -Galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiol. Plant.* 95, 106-112
- LEE, R.B. & DREW, M.C. (1989): Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *J. Exp. Bot.* 40, 741-752
- LEE, S.; CHOI, H.; SUH, S.; DOO, I.-S.; OH, K.-Y.; CHOI, E.J.; SCHROEDER TAYLOR, A.T.; LOW, P.S. and LEE, Y. (1999): Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Com-melina communis*. *Plant Physiol.* 121, 147-152
- LEGRENDE, L.; RUETER, S.; HEINSTEIN, P.F. and LOW, P. (1993): Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.* 102, 233-240

- LEVINE, A.; PENNELL, R.I.; ALVAREZ, M.E.; PALMER, R. and LAMB, C. (1996): Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6, 427-437
- LINERS, F.; LETESSON, J.J.; DIDEMBOUG, C. and VAN CUSTEM, P. (1989): Monoclonal antibodies against pectin. *Plant Physiol.* 91, 1419-1424
- LINERS, F.; THIBAUT, J.F. and VAN CUSTEM, P. (1992): Influence of the degree of polymerization of oligagalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiol.* 99, 1099-1104
- LONG, J.M. and WIDDERS, I.E. (1990): Quantification of apoplastic potassium content by elution analysis of leaf lamina tissue from pea (*Pisum sativum* L. cv. *argenteum*). *Plant Physiol.* 94, 1040-1047
- LU, H. and HIGGINS, V.J. (1999): The effect of hydrogen peroxide on the viability of tomato cells and of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54, 131-143
- MAAS, E.V. and GRIEVE, C.M. (1987): Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell Environm.* 10, 559-564
- MACDOUGALL, A.J.; PARKER, R. and SELVENDRAN, R.R. (1995): Nonaqueous fractionation to assess the ionic composition of the apoplast during fruit ripening. *Plant Physiol.* 108, 1679-1689
- MACDOUGALL, A.J.; RIGBY, N.M.; NEEDS, P.W. and SELVENDRAN, R.R. (1992): Movement and metabolism of oligogalacturonide elicitors in tomato shoots. *Plant* 188, 566-574
- MACDUFF, J.C. & JACKSON, S.B. (1991): Growth and preference of ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. *J. Exp. Bot.* 42, 521-530
- MAIER, P. (1997): Bedeutung der Kompartimentierung von Mangan und organischen Säuren für die Mangantoleranz von Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Verlag Ulrich E. Grauer Verlag (Stuttgart)
- MALAVOLTA, E.; DANTAS, J.P.; MORIAS, R.S. and NOGUEIRA, F.D. (1979): Calcium problems in latin america. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 10, 29-40
- MALHI, S.S.; NYBORG, M.; JAHN, H.G. and PENNEY, D.C. (1988): Yield and nitrogen uptake of rapeseed (*Brassica campestris* L.) with ammonium and nitrate. *Plant Soil* 105, 231-239
- MARSCHNER, H. (1986): Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Ltd. (London)
- MATHIEU, Y.; KURKDJIAN, A.; XIA, H.; GUERN, J.; KOLLER, A.; SPIRO, M.S.M O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P. and DARVILL, A.G. (1991): Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco explants. *Plant J.* 1, 217-225
- MEINZER, F.C. and MOORE, P.H. (1988): Effect of apoplastic solutes on water potential in elongating sugarcane leaves. *Plant Physiol.* 86, 873-879
- MELOTTO, E.; GREVE, L.C. and LABAVITCH, J.M. (1996): Biologically active pectin oligomers in ripening tomato fruits. In: VISSER, J. and VORAGEN, A.G.J. (eds): *Pectines and pectinases*. Elsevier Sciences (Amsterdam). 207-217
- MENGEL, K. and KIRKBY, E.A. (1978): Calcium. In: MENGEL, K. and KIRKBY, E.A. (eds.): *Principles of plant nutrition*. Int. Potash Inst. (Bern)
- MESSIAEN, J. and VAN CUSTEM, P. (1994): Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol.* 35, 677-689
- MESSIAEN, J. and VAN CUTSEM, P. (1993): Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol.* 35, 677-689
- MESSIAEN, J.; READ, N.D.; VAN CUSTEM, P. and TREWAVAS, A.J. (1993): Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *J. Cell Sci.* 104, 365-371

- MIDMORE, D.J. and PRANGE, R.K. (1991): Sources of heat tolerance potato cultivars, breeding lines, and *Solanum* species. *Euphytica* 55, 235-245
- MIDMORE, D.J. and PRANGE, R.K. (1992): Growth responses of two *Solanum* species to contrasting temperatures and irradiance levels: Relations to photosynthesis, dark respiration and chlorophyll fluorescence *Ann. Bot.* 69, 13-20
- MIX-WAGNER, G. (1996): Management of the *in vitro* genebank for old potato cultivars at the Institute for Crop Science in Braunschweig. *Landbauforsch. Völkenrode* 46, 5-9
- MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.J. and JACKSON, W.A. (1982) Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agron. J.* 74, 562-564
- MOLOSHOK, T.; PEARCE, G. and RYAN, C.A. (1992): Oligouronic acid signaling of proteinase inhibitor genes in plants: Structure-activity relationships of di and trigalacturonic acids and their derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 731-734
- MÜHLING, K.H. and SATTELMACHER, B. (1995): Apoplastic ion concentration of intact leaves of field bean (*Vicia faba*) as influenced by ammonium and nitrate nutrition. *J. Plant Physiol.* 147, 81-86
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- MURTHADHA, H.M.; MARANVILLE, J.W. and CLARK, R.B. (1988): Calcium deficiency in sorghum grown in controlled environments in relation to nitrate/ammonium ratio and nitrogen source. *Agron. J.* 80, 125-130
- NARI, J.; NOAT, G. and 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
- NJOKU, B.O., ENWEZOR, W.O. and ONYENAKWE, B.I. (1987): Calcium deficiency identified as an important factor limiting maize growth in acid ultisols of eastern Nigeria. *Fertilizer Res.* 14, 113-123
- NOTHNAGEL, E.A.; MC NEIL, M.; ALBERSHEIM, P. and DELL, A. (1983): Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol.* 71, 916-926
- OROZCO-CARDENAS, M. and RYAN, C.A. (1999): Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6553-6557
- POLIZOTTO, K.R.; WILCOX, G.E. and JONES, C.M. (1975): Response to growth and mineral composition of potato nitrate and ammonium nitrogen. *J. Amer. Soc. Hort Sci.* 100, 165-168
- PRESSEY, R. (1983): β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 71, 132-135
- PRESSEY, R. (1993): Uronic acid oxidase in orange fruit and other plant tissues. *Phytochemis.* 32, 1375-1379
- PRESSEY, R. and AVANTS, J.K. (1971): Effect of substrate size on the activity of tomato polygalacturonase. *J. Food Sci.* 36, 486-489
- PRESSEY, R. and AVANTS, J.K. (1973): Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochim. Biophys. Acta* 309, 363-369
- PRESSEY, R. and AVANTS, J.K. (1976): Pear polygalacturonases. *Phytochem.* 15, 1349-1351
- PRICE, A.H.; TAYLOR, A.; RIPLEY, S.J.; GRIFFITHS, A.; TREWAVAS, A.J. and KNIGHT, M.R. (1994): Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301-1310
- RATHMELL, W.G. and SEQUEIRA, L. (1974): Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol.* 53, 317-318

- RAVEN, J.A. and SMITH, F.A. (1976): Nitrogen assimilation and transport in the vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76, 415-431
- REDGWELL, R.J.; MELTON, L.D. and BRASCH, D.J. (1992): Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiol.* 98, 71-81
- RETIG, N. and CHET, I. (1974): Catechol-induced resistance of tomato plant to *Fusarium* wilt. *Physiol. Plant Pathol.* 4, 469-475
- REYMOND, P.; GRÜNBERGER, S.; PAUL, K.; MÜLLER, M. and FARMER, E.E. (1995): Oligogalacturonide defense signals in plants: Large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4145-4149
- RIGBY, N.M.; MAC DOUGALL, A.J.; NEEDS, P.W. and SELVENDRAN, R.R. (1994): Phloem translocation of a reduced oligogalacturonide in *Ricinus communis* L. *Planta* 193, 536-541
- RITCHEY, K.D., SILVA, J.E. and COSTA, U.F. (1982): Calcium deficiency in clayey B horizons of savannah Oxisols. *Soil Sci.* 133, 378-382
- ROCKLIN, R.D. and POHL, C.A. (1983): Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.* 6, 1577-1592
- ROHRINGER, R.; EBRAHIM-NESBAT, F. and WOLF, G. (1983): Proteins in intercellular washing fluid from leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 34, 1589-1605
- ROUET-MAYER, M.A.; MATHIEU, Y.; CAZALÉ, A.-C.; GUERN, J. and LAURIÈRE, C. (1997): Extracellular alkalization and oxidative burst induced by fungal pectin lyase in tobacco cells are not due to the perception of oligogalacturonide fragments. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 321-330
- RYAN, C.A. (1978): Proteinase inhibitors in plant leaves: A biochemical model for pest-induced natural plant protection. *Trends Biol. Sci.* 3, 148-150
- RYAN, C.A. and FARMER, E.E. (1991): Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 651-674
- RYAN, C.A.; BISHOP, P.D.; WALKER-SIMMONS, M.; BROWN, W.E. and GRAHAM, J.S. (1985): Pectic fragments regulate the expression of proteinase inhibitor genes in plants. In: KEY, J.L. and KOSUGE, T. (eds): *Cellular and molecular biology of plant stress*. Alan R. Liss (New York). 319-334
- SAJJAANANTAKUL, T.; VAN BUREN, J.P. and DOWNING, D.L. (1989): Effect of methyl ester content on heat degradation of chelator-soluble carrot pectin. *J. Food Sci.* 54, 1272-1277
- SASAKI, K. and NAGAHASHI, G. (1989): Autolysis-like release of pectic polysaccharides from regions of cell walls other than the middle lamella. *Plant Cell Physiol.* 30, 1159-1169
- SATTELMACHER, B.; HORST, W.J. and BECKER, H.C. (1994): Factors that contribute to genetic variation for nutrient efficiency of crop plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157, 215-224
- SATTELMACHER, B.; MARSCHNER, H. and KÜHNE, R. (1990): Effects of the temperature of the rooting zone on the growth and development of roots of potato (*Solanum tuberosum*). *Ann. Bot.* 65, 27-36
- SCHINKEL, H. (1984): Bestimmung von Calcium, Magnesium, Strontium, Kalium, Natrium, Lithium, Eisen, Mangan, Chrom, Nickel, Kupfer, Cobalt, Zink und Cadmium. Eine Universalvorschrift zur Untersuchung, *Z. Anal. Chem.* 317, 10-26
- SCHWACKE, R. and HAGER, A. (1992): Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta* 187, 136-141
- SELVENDRAN, R.R.; STEVENS, B.J.H. and O'Neill, M.A. (1985): Development in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. In: Brett, C.T. and J.R. Hillman (eds.): *Biochemistry of plant cell walls*. Cambridge University Press (Cambridge). 39-78
- SHEAR, C.B. (1975): Calcium related disorders of fruits and vegetables. *HortSci.* 10, 361-365

- SIDDIQI, M.Y. and GLASS, A.D.M. (1981): Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *J. Plant Nutrition* 4, 289-302
- SIDDIQI, S. and BANGERTH, F. (1995): Differential effect of calcium and strontium on flesh firmness and properties of cell walls in apples. *J. Hortic. Sci.* 70, 949-953
- SIDDIQI, S. and BANGERTH, F. (1995): Effect of pre-harvest application of calcium on flesh firmness and cell-wall composition of apples - influence of fruit size. *J. Hortic. Sci.* 70, 263-269
- SIMON, E.W. (1978): The symptoms of calcium deficiency in plants. *New Phytol.* 80, 1-15
- SMYTH, T.J. and CRAVO, M.S. (1992): Aluminium and calcium constraints to continuous crop production in a Brazilian Amazon oxisol. *Agron. J.* 84, 843-850
- SPEER, M. and KAISER, W.M. (1991): Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity. *Plant Physiol.* 97, 990-997
- SPIRO, M.D.; KATES, K.A.; KOLLER, A.L.; O'NEILL, M.A.; ALBERSHEIM, P. and DARVILL, A.G. (1993): Purification and characterization of biologically active 1,4-linked α -D-oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. *Carbohydr. Res.* 247, 9-20
- SPIRO, M.D.; RIDLEY, B.L.; EBERHARD, S.; KATES, K.A.; MATHIEU, Y.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D.; GUERN, A.; DARVILL, A. and ALBERSHEIM, P. (1998): Biological activity of reducing-end derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 116, 1289-1298
- SVALHEIM, Ø and ROBERTSEN, B. (1993): Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Plant.* 88, 675-681
- TAIZ, L. und ZIEGLER, E. (2000): *Physiologie der Pflanze*. Spektrum Verlag (Heidelberg)
- TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L.F.; DIXON, R.A. and LAMB, C. (1995): Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4158-4163
- TERRY, M.E. and JONES, R.L. (1981): Soluble cell wall polysaccharides released from pea stems by centrifugation. I. Effect of auxin. *Plant Physiol.* 68, 531-537
- TERRY, M.E.; RUBINSTEIN, B. and JONES, R.L. (1981): Soluble cell wall polysaccharides released from pea stem by centrifugation. II. Effect of ethylene. *Plant Physiol.* 68, 538-542
- THOMAS, F.M. und RUNGE, M. (1988): Kationengehalte von Blattzellwänden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 151, 211-217
- TONG, C.B.; LABAVITCH, J.M. and FA YANG, S. (1986): The induction of ethylene production from pear cell culture by cell wall fragments. *Plant Physiol.* 81, 929-930
- TONG, C.B.S. and GROSS, K.C. (1991): Stimulation of ethylene production by a cell wall component from mature green tomato fruit. *Physiol. Plant.* 80, 500-506
- TREWAVAS, A. and KNIGHT, M. (1994): Mechanical signalling, calcium and plant form. *Plant. Mol. Biol.* 26, 1329-1341
- TUCKER, G.A.; ROBERTSON, N.G. and GRIERSON, D. (1980): Changes in polygalacturonase isoenzymes during the 'ripening' of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.* 112, 119-124
- VAN BEUSICHEM, M.L.; KIRKBY, E.A. and BAAS, R. (1988): Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 86, 914-921
- VAN CUTSEM, P. and MESSIAEN, J. (1993): Roles of pectins in cell walls. *Acta Hortic.* 326, 93-104

- VAN DE GEIJN, S.C. AND SMEULDERS, F. (1981): Diurnal changes in the flux of calcium toward meristems and transpiring leaves in tomato and maize plants. *Plant Physiol.* 151, 265-271
- WALKER SIMMONS, M; HADWIGER, L. and RYAN, C.A. (1983): Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 194-199
- WEBER, J; OLSON, O.; WEGENER, C. and VON WETTSTEIN, D. (1996): Digalaturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiol. Mol. Plant Patho.* 48, 389-401
- WEST, C.A.; MOESTA, P.; JIN, D.F.; LOIS, A.F. and WICKHAM, K.A. (1985): The role of pectic fragments of the plant cell wall in the response to biological stress. In: KEY, J.L. and KOSUGE, T. (eds): *Cellular and molecular biology of plant stress*. Alan R. Liss (New York). 335-349
- WIESLER, F. (1998): Agronomische und physiologische Aspekte der Ertragsbildung von Mais (*Zea mays* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Lein (*Linum usitatissimum*) bei einem in Zeit und Form variierten Stickstoffangebot. Verlag Ulrich E. Grauer (Stuttgart)
- WILCOX, G.E.; HOFF, J.E. and JONES, C.M. (1973): Ammonium reduction of calcium and magnesium content of tomato and sweet corn leaf tissue and influence on incidence of blossom end rot to tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 98, 86-89
- WILCOX, G.E.; MAGALHAES, JH.R. and SILVA, F.L.I.M. (1985): Ammonium and nitrate concentrations as factors in tomato growth and nutrient uptake. *J. Plant Nutr.* 8, 989-998
- WISSEMEIER, A.H. (1988): Beziehung zwischen Mangantoleranz und Oxidation von Mangan in Blättern von Cowpea-Genotypen (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Diss. Univ. Hohenheim. Ulrich E. Grauer Verlag (Stuttgart)
- WISSEMEIER, A.H. (1996): Calcium-Mangel bei Salat (*Lactuca sativa* L.) und Poinsettie (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch): Einfluß von Genotyp und Umwelt. Ulrich E. Grauer Verlag (Stuttgart)
- ZABOTINA, O.; IBRAGIMOVA, N.; AYUPOVA, D.; GURJANOV, O.; LOZOVAYA, V.; BELDMAN, G. and VORAGEN, A. (1996): Bioactive fragments from pea pectin. In: VISSER, J. and VORAGEN, A.G.J. (eds): *Pectines and pectinases*. Elsevier Sciences (Amsterdam). 693-701

7 ANHANG

7.1 Methodische Untersuchungen zur Präparation von Zellwandmaterial aus Blättern

In der Literatur sind unterschiedliche Präparationen von Zellwandmaterial, korrekter bezeichnet als alkohol-unlöslicher Rest des Materials (alcohol insoluble residue = AIR) beschrieben (SELVENDRAN et al., 1985). Ein wesentlicher Unterschied läßt sich in dem ersten Schritt der Aufreinigung finden: In einigen Arbeiten wird das Material zunächst in kochendem oder kaltem Wasser homogenisiert und anschließend mit Ethanol "gewaschen". In anderen Arbeiten erfolgt die Homogenisation in kochendem oder kaltem Ethanol.

Eine Homogenisation in kochenden Lösungen wurde von vornherein ausgeschlossen, da gerade das Kochen von pflanzlichem Gewebe dramatische Auswirkungen auf die Löslichkeitseigenschaften der Pektine haben kann (CHANG et al., 1993; SAJANANTAKUL et al., 1989).

In einem ersten Ansatz wurde daher nur die Homogenisation pflanzlichen Materials in kaltem Wasser mit der Homogenisation in kaltem Ethanol hinsichtlich des Ertrages und der Uronsäure-Gehalte des AIR verglichen. In einem zweiten, unabhängigen Ansatz, wurde zusätzlich untersucht, ob die Homogenisation bzw. die Aufreinigungsmethode einen Einfluß auf die Löslichkeitseigenschaften der Pektine und die Ca-Gehalte des AIRs hat.

Die Abfolge der AIR-Präparation ist in Abb. 60 dargestellt. Die Abkürzungen für die verschiedenen Methoden wurde in Anlehnung an die in der Aufreinigung verwendeten Lösungen gewählt. Die Durchführung der Aufreinigung wird im folgenden kurz beschrieben:

Das pflanzliche Material wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in Reagenzgläser eingewogen (ca. 0,5 g FM) und in 4 mL demineralisiertem Wasser (Methode: WECA, WECAW) oder in 4 mL 80 % Ethanol (Methode: ECA, ECAW) mittels Ultra-Turrax (1 min) und anschließendem Ultraschall (1 min) weiter zerkleinert und homogenisiert. Das Homogenat wurde quantitativ (unter Verbrauch von insgesamt 16 mL Wasser oder Ethanol) auf eine Filtrationseinheit mit 40 µM Gaze überführt und abgenutscht. Das auf der Gaze verbleibende Material wurde bei den Methoden WECA und WECAW anschließend mit insgesamt 20 mL 80 % Ethanol gewaschen. In jedem Fall wurde das Material dann mit 20 mL Chloroform : Methanol (1:1 v/v) und schließlich mit 20 mL Aceton gewaschen. Die Methoden WECAW und ECAW beinhalteten nach dem Aceton-Waschschritt noch einen Waschschritt mit 20 mL demineralisiertem Wasser. Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Die Aufarbeitungszeit betrug insgesamt ca. 90 min.

Die Bestimmung der Ca-Gehalte des AIRs erfolgte nach trockener Veraschung des AIRs und die wasserlöslichen Uronsäuren des AIRs wurden nach Inkubation des AIRs für 1 h in demineralisiertem Wasser bei 4 °C bestimmt.

AIR-Präparation

Blattmaterial (0,5 g Frischmasse)
in flüssigem Stickstoff mörsern

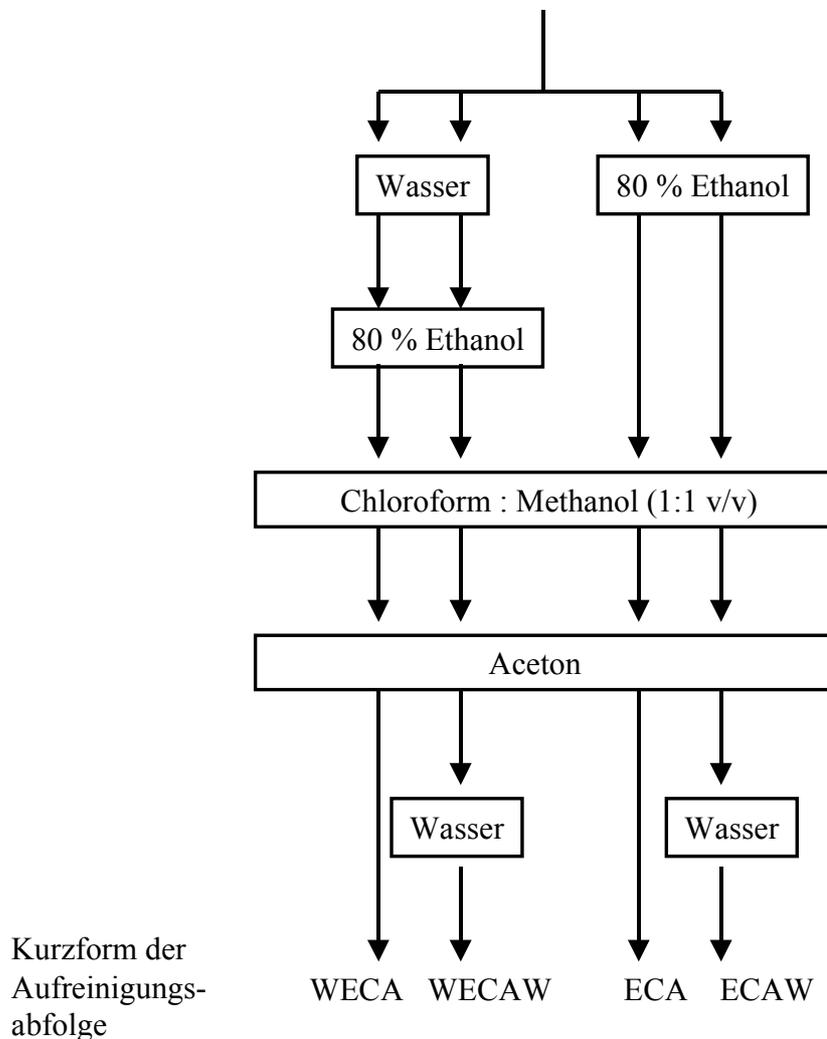


Abb. 60: Schematische Darstellung der AIR-Präparation mit verschiedenen Waschsrittenabfolgen (Kurzform wurde entsprechend der Waschschrirtabfolge gewählt: WECA = Wasser – Ethanol – Chloroform : Methanol - Aceton; WECAW = Wasser – Ethanol – Chloroform : Methanol – Aceton Wasser; ECA = Ethanol – Chloroform : Methanol – Aceton; ECAW = Ethanol – Chloroform : Methanol – Aceton – Wasser)

In zwei unabhängigen Durchführungen entsprach die Menge an trockenem AIR bei der H₂O-Homogenisation 2,5 bis 3,2 % der Frischmasse (Tab. 15, Tab. 16). Demgegenüber betrug bei der Ethanol-Homogenisation der AIR-Ertrag etwa 5,1 bis 6,2 % der Frischmasse (Tab. 15, Tab. 16). Eine Homogenisation in Ethanol führte somit im Vergleich zu einer Homogenisation in demineralisiertem Wasser zu signifikant höheren Erträgen an AIR.

Der Uronsäure-Gehalt des AIRs war bei der H₂O-Homogenisation deutlich höher als bei der Ethanol-Homogenisation (Tab. 15, Tab. 16), wobei allerdings dieser Unterschied nur bei der ersten

Durchführung statistisch absicherbar war (Tab. 15). Die Gesamt-Uronsäure-Menge des AIRs war bei beiden Präparationen gleich, so daß keine signifikanten Unterschiede in den Uronsäure-Gehalten, bezogen auf die Frischmasse, zwischen den beiden Homogenisation-Methoden bestand (Tab. 15).

Es ist naheliegend zu vermuten, daß der höhere AIR-Ertrag und niedrigere Uronsäure-Gehalt des AIRs bei der Homogenisation des pflanzlichen Materials in Ethanol auf Co-Präzipitation intrazellulärer Komponenten mit dem Zellwandmaterial zurückzuführen ist (SELVENDRAN et al., 1985).

Die Ca-Gehalte waren sowohl bei der Bezugsbasis AIR wie auch bei der Bezugsbasis Frischmasse bei einer Homogenisation in Wasser signifikant niedriger als bei einer Homogenisation in Ethanol (Tab. 17).

Unabhängig von der Präparationsmethode, d.h. unabhängig davon, ob das Material anfangs in Wasser oder Ethanol homogenisiert wurde, und unabhängig davon, ob das präparierte AIR-Material nach dem Aceton-Waschschritt mit demineralisiertem Wasser gewaschen wurde oder nicht, lag der Gehalt an wasserlöslichen Uronsäuren im Bereich von 19 bis 25 mg Gal-US-Eq (g FM)⁻¹ (Tab. 17), und entsprach 0,6 bis 1 % des Gesamt-Uronsäure-Gehaltes.

Zusammenfassen lassen sich die Ergebnisse wie folgt:

- Bei einer Homogenisation des Blattmaterials in 80 % Ethanol ist der AIR-Ertrag deutlich höher, und der Uronsäure-Gehalt des AIRs deutlich niedriger als bei einer Homogenisation in demineralisiertem Wasser. Wird als Bezugsbasis die Frischmasse verwendet, so ergeben sich keine unterschiedlichen Uronsäure-Gehalte.
- Eine Homogenisation in Ethanol führte im Vergleich zu einer Homogenisation in demineralisiertem Wasser zu deutlich höheren Ca-Gehalte der Zellwand.
- Ein Einfluß der Präparationsmethode auf die Fraktion der wasserlöslichen Pektine konnte statistisch nicht abgesichert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Bestimmung der Ca-Gehalte der Zellwand das Material in Wasser homogenisiert und anschließend mit Ethanol, Chloroform-Methanol und Aceton gewaschen (Methode WECA).

Tab. 15: Einfluß der Homogenisationslösung auf den Ertrag an trockenem AIR in Prozent der Frischmasse und die Uronsäure-Gehalte des AIR von Kartoffelblättern bei sonst gleicher weiterer Aufreinigung (n = 5; Tukey Test bei p < 0,05)

Abfolge der Reinigungsschritte	Relativer AIR-Ertrag [% der FM]		Uronsäure-Gehalt des AIR			
			[mg Gal-US-Eq. (g AIR) ⁻¹]		[mg Gal-US-Eq. (g FM) ⁻¹]	
WECA	2,46 ± 0,11	B	147,80 ± 10,05	A	3,64 ± 0,28	A
ECA	6,12 ± 0,64	A	67,96 ± 19,95	B	4,11 ± 1,13	A
MSD (5 %)	0,67		23,03		1,12	

Tab. 16: Ertrag an trockenem AIR in Prozent der Frischmasse und Uronsäure-Gehalte des AIR von unterschiedlich aufgereinigtem Blattmaterial von Kartoffeln (n = 5; Tukey-Test bei p < 0,05)

Abfolge der Reinigungsschritte	Relativer AIR-Ertrag [% der FM]		Uronsäure-Gehalt des AIR			
			[mg Gal-US-Eq. (g AIR) ⁻¹]		[mg Gal-US-Eq. (g FM) ⁻¹]	
WECA	3,18 ± 0,37	B	96,86 ± 15,59	A	3,65 ± 0,33	A
WECAW	2,96 ± 0,21	B	111,91 ± 27,63	A	3,29 ± 0,71	A
ECA	5,35 ± 0,44	A	80,47 ± 12,01	A	4,33 ± 0,88	A
ECAW	5,00 ± 0,33	A	70,35 ± 32,38	A	3,50 ± 1,52	A
MSD (5 %)	0,63		42,43		1,74	

Tab. 17: Gehalte an Ca und wasserlöslichen Uronsäuren des AIR von unterschiedlich aufgereinigtem Blattmaterial von Kartoffeln (n = 5; Tukey-Test bei p < 0,05)

Abfolge der Reinigungsschritte	Ca-Gehalt		Gehalt wasserlöslicher Uronsäuren					
	[mg (g AIR) ⁻¹]	[mg (g FM) ⁻¹]	[mg Gal-US-Eq. (g AIR) ⁻¹]		[mg Gal-US-Eq. (g FM) ⁻¹]			
WECA	18,48 ± 2,60	B	0,60 ± 0,14	B	0,78 ± 0,22	A	0,025 ± 0,010	A
WECAW	20,26 ± 0,88	B	0,60 ± 0,04	B	0,66 ± 0,21	A	0,019 ± 0,005	A
ECA	23,58 ± 0,84	A	1,26 ± 0,14	A	0,54 ± 0,20	A	0,029 ± 0,010	A
ECAW	24,78 ± 1,25	A	1,24 ± 0,10	A	0,73 ± 0,19	A	0,033 ± 0,011	A
MSD (5 %)	2,83		0,20		0,37		0,015	

7.2 Methodische Untersuchungen zur Charakterisierung der Oligogalakturonide der Apoplastenwaschflüssigkeit

7.2.1 Immunologische Untersuchungen der Apoplastenwaschflüssigkeit auf Oligogalakturonide

Da für die Fragestellung dieser Arbeit von besonderem Interesse Oligogalakturonide mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 9 bis 16 sind, wurde im Labor von Prof. Van Cutsem (Namur, Belgien) zunächst versucht, eine immunologische Charakterisierung durchzuführen, mit Hilfe des von LINERS et al. (1989) charakterisierten monoklonalen Antikörper 2F4, der spezifisch Oligogalakturonide mit einem DP > 9 erkennt (LINERS et al., 1992).

Bei den durchgeführten dot-blot Tests wurden allerdings weder in der AWF Oligogalakturonide mit einem DP > 9 nachgewiesen, noch in einer Oligogalakturonid-Mischung (hergestellt durch Säure-Hydrolyse von Polygalakturonsäure), die, nach HPAEC-PAD-Analysen, Oligogalakturonide mit DP > 9 enthielt. Eine mögliche Ursache könnte in veränderten Eigenschaften der im dot-blot-Test verwendeten Membran liegen, so daß die Oligogalakturonide nicht an der Nitrocellulose-Membran gebunden bzw. immobilisiert werden (Dr. Liners, pers. Mitt.).

Ein zusätzliches Problem bei einer Identifizierung von Oligogalakturoniden mit DP > 9 in AWF-Proben von Kartoffelblättern mittels des primären Antikörpers 2F4, und dem sekundären Antikörper HRP-SAM (horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin), besteht in der Aktivität der Peroxidase in der AWF. Da die Detektion des sekundären Antikörpers, der den primären Antikörper erkennt, durch die Zugabe von H₂O₂ und DAB (Diaminobenzidin) im dot-blot-Test bzw. ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoninsulfonat) im ELISA-Test erfolgt (LINERS et al., 1989), wird bei Verwendung von AWF-Proben gleichzeitig die Aktivität der Peroxidase miterfaßt. Beispielhaft zeigt das Ergebnis eines dot-blot Tests mit einer AWF-Probe (Abb. 62), daß bei Verwendung des primären und sekundären Antikörpers das gleiche Ergebnis ("Graufärbung" = oxidiertes DAB) erreicht wurde, wie bei alleiniger Zugabe von DAB und H₂O₂. Wurde hingegen H₂O₂ nicht zugegeben oder wurde AWF verwendet, die 20 min gekocht wurde, so war keine Graufärbung zu erkennen.

Somit war eine immunologische Charakterisierung der Oligogalakturonide der AWF von Kartoffelblättern weder mittels dot-blot Test noch mittels ELISA-Test möglich.

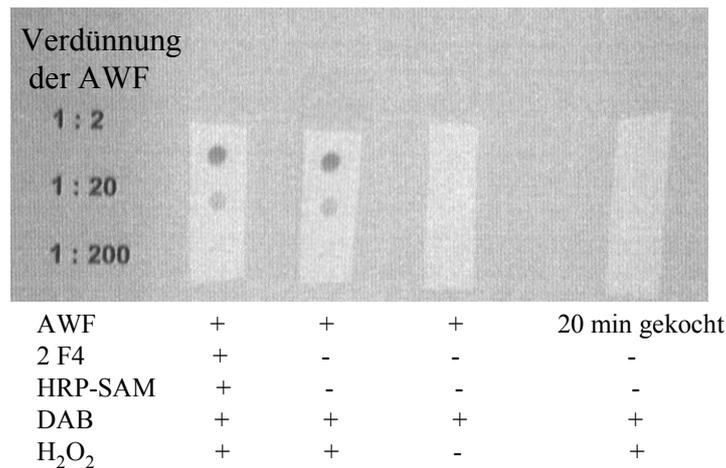


Abb. 61: Ergebnis eines dot-blot Test mit Apoplastenwaschflüssigkeit von Kartoffelblättern (AWF = Apoplastenwaschflüssigkeit; 2F4 = primärer Antikörper spezifisch für Oligogalakturonide mit DP > 9; HRP-SAM = sekundärer Antikörper spezifisch für 2F4; DAB = Diaminobenzidin)

7.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Auftrennung einer Lösung mit Oligogalakturoniden mit DP < 9 (hergestellt durch Säure-Hydrolyse von Polygalakturonsäure (Sigma P1879) (GILLET et al., 1992) unterschiedlicher Gesamt-Galakturonsäure-Konzentration mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurde nach der von DONER et al. (1988) beschriebenen Methode getestet. In einem einzigen Lauf konnten Oligogalakturonide bis DP 7 getrennt und detektiert werden, allerdings nur bei ausreichender Konzentration. So erwies sich eine Beladung des Chromatograms mit 1,4 µmol Gal.-US-Eq. (10 µL mit 0,14 mM Gal-US-Eq.) als unzureichend für eine Detektion. Bei Verwendung einer um Faktor 10 höher konzentrierten Lösung ließen sich nur Oligogalakturonide mit DP 1-3 sichtbar machen. Im Vergleich dazu sei erwähnt, daß die Uronsäure-Konzentration der AWF junger Kartoffelblätter, über die verschiedenen Versuche hinweg betrachtet, in dem Bereich von 0,6 bis 1,2 mM Gal-US-Eq. lag. Somit wäre eine Charakterisierung der Oligogalakturonide der AWF hinsichtlich ihres DPs mittels DC nach einer Aufkonzentrierung der Proben möglich gewesen, wobei allerdings nur eine Auftrennung bis zu DP 7 hätte erreicht werden können.

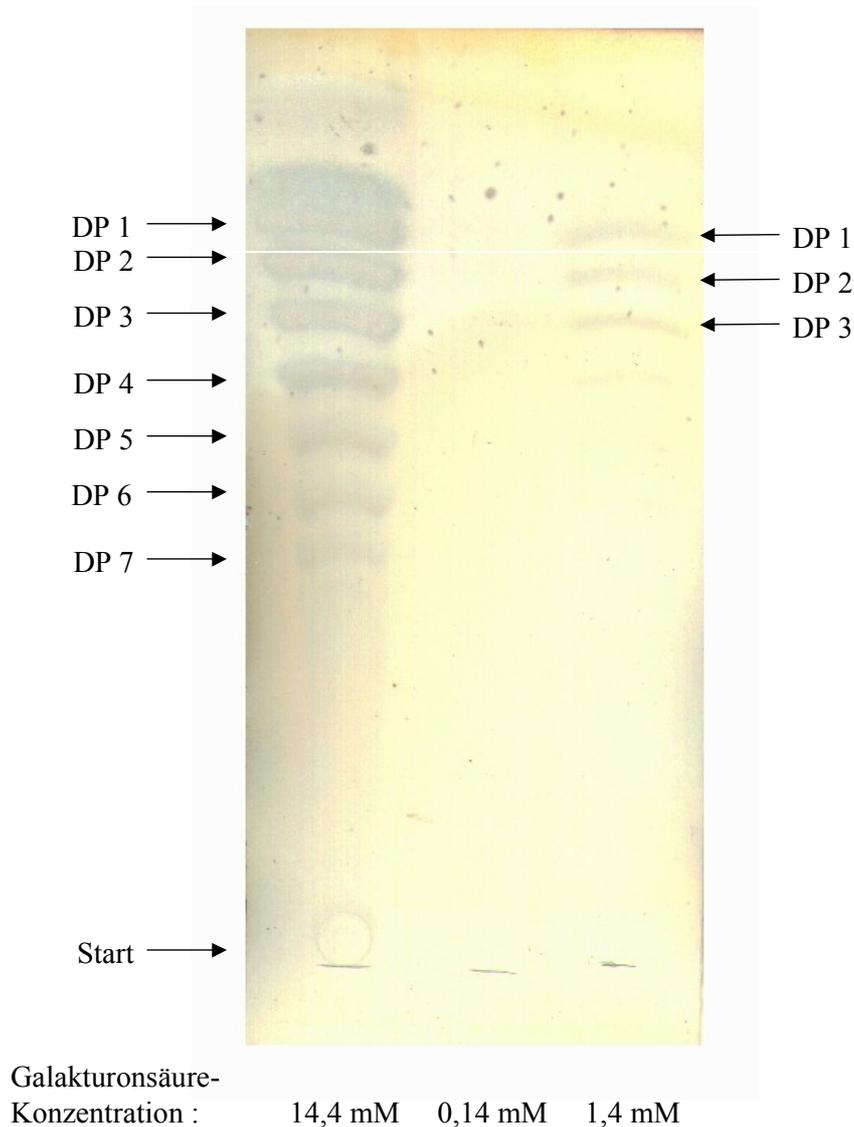


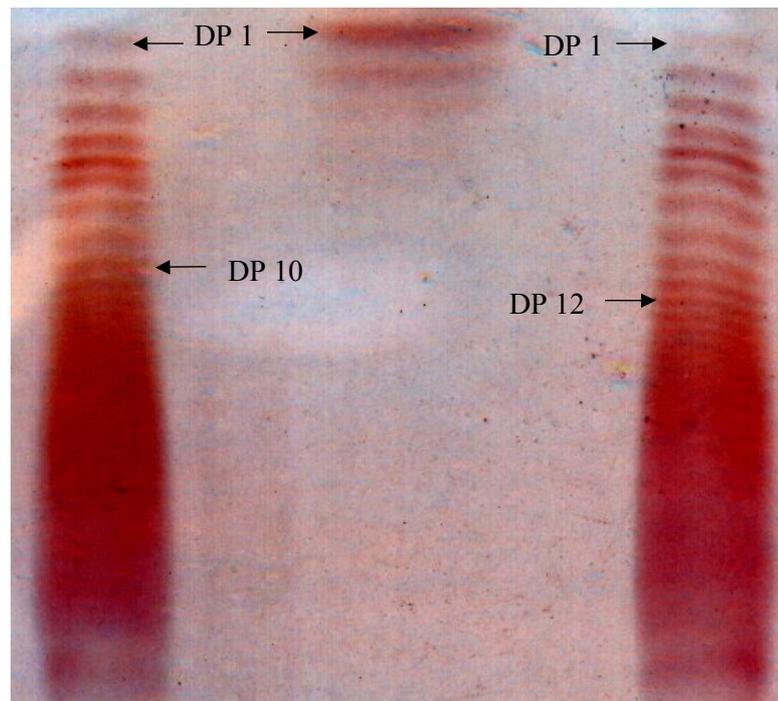
Abb. 62: Dünnschichtchromatographie einer Oligogalakturonid-Mischung mit Polymerisationsgrad (DP) von 1 bis 9 unterschiedlicher Gesamt-Galakturonsäure-Konzentration (Durchführung der Dünnschichtchromatographie nach DONER et al. (1988); Sprühreagenz 0,1 % (w/v) Orcinol in 70 %iger H_2SO_4 nach FRY (1988))

7.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Möglichkeit der Charakterisierung von Oligogalakturoniden hinsichtlich ihres DP durch eine Auftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Anfärbung mit Ruthenium Rot wurde geprüft. Da keine Arbeiten über eine PAGE von Oligogalakturoniden vorlagen, wurde sich an die Methode von AL-HAKIM & LINDHARDT (1990) zur elektrophoretischen Auftrennung von sauren Oligosacchariden, die sich vom Heparin (ein Glykosaminoglykan) ableiten, angelehnt.

Das Pherogramm von Lösungen mit Oligogalakturoniden mit DP 1 bis 20 (hergestellt durch Säure-Hydrolyse von Polygalakturonsäure (Sigma P1879) (GILLET et al., 1992)), zeigt, daß eine Auftrennung von Oligogalakturoniden zumindest bis zu DP 10-12 mittels PAGE möglich ist. Allerdings war bei der Lösung mit der niedrigsten untersuchten Gesamt-Galakturonsäure-Konzentration von

0,7 mM nur eine Detektion von Oligogalakturoniden bis zu DP 2-3 möglich. Im Vergleich dazu sei erwähnt, daß die Uronsäure-Konzentration der AWF junger Kartoffelblätter, über die verschiedenen Versuche hinweg betrachtet, in dem Bereich von 0,6 bis 1,2 mM Gal-US-Eq. lag. Somit wäre eine Charakterisierung der Oligogalakturonide der AWF hinsichtlich ihres DP's mittels PAGE nach einer Aufkonzentrierung der Proben möglich gewesen, wobei allerdings nur eine Auftrennung bis zu DP 10-12 hätte erreicht werden können.



Galakturonsäure-
Konzentration: 14,4 mM 0,7 mM 2,8 mM

Abb. 63: Pherogramm der Oligogalakturonid-Mischung mit Polymerisationsgrad (DP) von 1 bis 20 unterschiedlicher Gesamt-Galakturonsäure-Konzentration

(Polyacrylamid-Gel: Sammelgel: 500 μ L 1 M Tris-Puffer (pH 6,8), 4054 μ L H₂O, 402 μ L 50 % (w/v) Polyacrylamid (molares Verhältnis von Acrylamid zu N, N'-Methylenbisacrylamid 29 : 1), 40 μ L 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 4 μ L Temed; Trenngel: 500 μ L 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 3920 μ L H₂O, 6000 μ L 50 % (w/v) Polyacrylamid (molares Verhältnis von Acrylamid zu N, N'-Methylenbisacrylamid 29 : 1), 100 μ L 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 8 μ L Temed; Aufbereitung der Proben: 8,25 μ L Probe, 1,5 μ L H₂O, 3 μ L 50 % Glycerol, 1,5 μ L 1 % (w/v) Bromophenolblau, 0,75 μ L 50 mM Tris-Puffer (pH 6,8); elektrophoretische Auftrennung für 30 min bei 60 V und anschließend 6 h bei 120 V; Kammerpuffer: 25 mM Tris-Puffer, 250 mM Glycin, pH 8,3; Fixierung und Anfärbung: 30 min in Fixierungslösung mit 0,01 % (w/v) Ruthenium Rot (Sigma R2751) in Ethanol : Essigsäure : H₂O-Lösung (30 : 10 : 60); Entfernen des überschüssigen Farbstoffes durch wiederholtes tauchen in Fixierungslösung ohne Ruthenium Rot)

7.2.4 Matrix-unterstützte Laser Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

In Anlehnung an die Arbeit von DAAS et al. (1998) wurde die Möglichkeit der Charakterisierung von Oligogalakturoniden hinsichtlich ihres DP's mittels Matrix-unterstützter Laser Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Kuhn (FH Reutlingen) geprüft.

Das Massenspektrogramm einer Lösung von Oligogalakturoniden mit DP 1 bis 20 (hergestellt durch Säure-Hydrolyse von Polygalakturonsäure (Sigma P1879) (GILLET et al., 1992)), zeigt (Abb. 64), daß Oligogalakturonide mit einem DP von 2 bis 5-6 identifiziert werden konnten. Die Gesamt-Galakturonsäure-Konzentration dieser Lösung betrug 0,7 mM. Ebenfalls untersucht wurde Apoplastenwaschflüssigkeit (AWF; um Faktor 10 aufkonzentriert) junger Kartoffelblätter. Hier konnten Oligogalakturonide zumindest mit DP 2, 3 sowie 4 identifiziert werden. Auffällig war aber, daß genau zwischen den Massen definierter Oligogalakturonide (wie zwischen DP 3 und DP 4) Moleküle mit wesentlich stärkerer Intensität auftraten. Ähnliches wurde, wie erwähnt, auch bei der Analyse von AWF-Proben mittels HPAEC-PAD festgestellt.

Eine Charakterisierung der Oligogalakturonide der AWF hinsichtlich ihres DP's mittels MALDI-TOF-MS möglich gewesen, wobei allerdings nur eine Identifizierung bis zu DP 16-20 wie bei der HPAEC-PAD Analytik nicht hätte erreicht werden können. Auch DAAS et al. (1998) erreichten mittels MALDI-TOF-MS nur eine Identifizierung von Oligogalakturoniden mit DP 2-12.

Auch lassen sich die verschiedenen Massenspektrogramme nur qualitativ und nicht quantitativ hinsichtlich der Intensität vergleichen, da durch die Addition von Einzelspektren sehr unterschiedliche Spektren hinsichtlich der Intensität ergeben (wie bei dem Vergleich der kumulierten Intensität in Abb. 64 mit der in Abb. 65 deutlich wird).

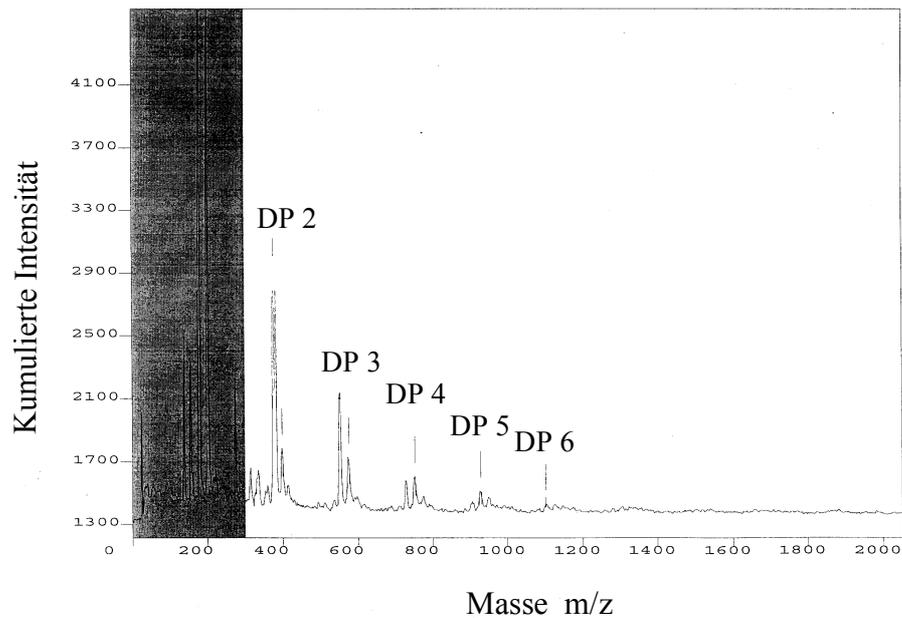


Abb. 64: MALDI-TOF-Massenspektrogramm einer Lösung von Oligogalakturoniden mit DP 1 bis 20 (Positiv-Modus; Matrix: 0,2 M 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril; Flugrohr 1m; Beschleunigungsspannung 28 kV; Verhältnis Probe zu Matrix 1:3; 0,8 μ L Probenvolumen; kumuliertes Spektrum aus 82 Einzellaserschüssen)

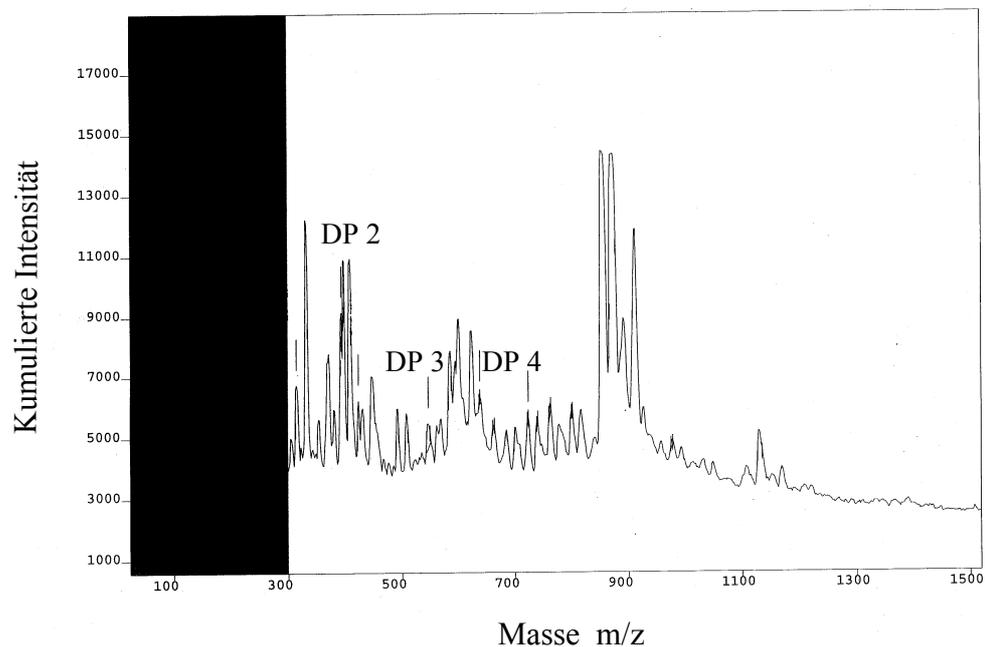


Abb. 65: MALDI-TOF-Massenspektrogramm von Apoplastenwaschflüssigkeit junger Kartoffelblätter (BPI 3) (Positiv-Modus; Matrix: 0,2 M 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril; Flugrohr 1m; Beschleunigungsspannung 28 kV; Verhältnis Probe zu Matrix 1:3; 0,8 μ L Probenvolumen; kumuliertes Spektrum aus 170 Einzellaserschüssen)

7.3 Screening von 16 *Solanum*-Genotypen auf Ca-Effizienz

Mit dem Ziel Genotypen zu identifizieren, die sich deutlich in ihrer Ca-Effizienz unterscheiden, wurde ein weites Spektrum an *Solanum*-Genotypen untersucht, das Wildarten, Primitivformen und Kultursorten der Kartoffel umfasste. In diesem Versuch wurden fünf Sorten ('Bintje', 'Ijsselster', 'Norchip', 'Peconic', 'San Michele') der Kulturkartoffel (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*), drei Primitivformen (*S. stenotomum*, *S. tuberosum* ssp. *andigena* 1, *S. tuberosum* ssp. *andigena* 2) sowie acht Wildarten (*Solanum chacoense*, *S. fendleri*, *S. hawkesii*, *S. pampasense*, *S. sparsipilum*, *S. spegazzini*, *S. tarijense*, *S. vernei*) bei unterschiedlichem Ca-Angebot in der Nährlösung auf ihre Ca-Effizienz hin untersucht. Die Pflanzen der Kontrollvariante wurden 21 d bei 1000 μM Ca kultiviert. Die Pflanzen der ersten Ca-Mangelstufe (60/30 μM) wurden in den zwei Wochen bei 60 μM Ca und in der dritten Versuchswoche bei 30 μM kultiviert. Das Ca-Angebot der zweiten Ca-Mangelstufe (30/15 μM) betrug die ersten zwei Wochen 30 μM und in der dritten Woche 15 μM .

7.3.1 Wahl des geeigneten Wachstumsparameters

Für die Charakterisierung des Wachstums der 16 *Solanum*-Genotypen bei unterschiedlich hohem Ca-Angebot der Nährlösung boten sich absolute Vergleiche der Frischmasse zwischen den Genotypen nicht an, da sich die Genotypen in der Frischmasse zu Versuchsbeginn stark voneinander unterschieden. Die Pflanzen der Kultursorten besaßen zu Versuchsbeginn durchschnittlich eine Frischmasse von 0,1 g Pflanze⁻¹ (Tab. 18), die damit nur 30-50 % der Frischmasse der Pflanzen von den Wildarten und Primitivformen entsprach. Bei Betrachtung der Standardabweichung in Relation zu dem jeweiligen Mittelwert der Frischmasse zu Versuchsbeginn der verschiedenen Genotypen, fällt auf, daß sich die Einzelpflanzen innerhalb einer Kultursorte in ihrer Frischmasse zu Versuchsbeginn weit weniger voneinander unterschieden, als die Einzelpflanzen der Wildarten und Primitivformen (Tab. 18). Die Pflanzen der Wildarten und Primitivformen wiesen somit zu Versuchsbeginn zum einen eine größere Frischmasse und zum anderen eine deutlich höhere Variabilität innerhalb einer jeden Art bzw. Form auf als die Kultursorten.

Für die Beantwortung der Frage, ob die Frischmasse zu Versuchsbeginn einen Einfluß auf die Frischmasse zu Versuchsende hat, wurden für jeden Genotyp bei 1000 μM Ca-Angebot Regressionsanalysen durchgeführt. Bei acht der 16 Genotypen bestand eine signifikante Beziehung zwischen der Frischmasse zu Versuchsbeginn und der zu Versuchsende. Die Frischmasse der Pflanzen zu Versuchsende für die Charakterisierung des Wachstums der Genotypen zu verwenden kann hier nicht als geeigneter Parameter angesehen werden, da Unterschiede in der Frischmasse der Pflanzen zu Versuchsende nur auf Unterschieden in der Frischmasse zu Versuchsbeginn beruhen könnten. Beispielhaft ist in Abb. 66A der Wachstumsverlauf von *S. chacoense* und der Sorte 'Bintje' bei 1000 μM Ca-Angebot der Nährlösung dargestellt. Bei logarithmischem Auftrag der Frischmasse

Tab. 18: Frischmasse von 16 *Solanum*-Genotypen nach 5 d Vorkultur bei 1000 μM Ca zu Beginn der Ca-Differenzbehandlung ($n = 6$; verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb eines Genotyps nach Tukey-Test mit $p < 0,05$)

Genotyp	Frischmasse zu Versuchsbeginn [g Pflanze ⁻¹]		
	1000 μM Ca	60/30 μM Ca	30/15 μM Ca
<i>S. chacoense</i>	0,2870 \pm 0,0881 a	0,2997 \pm 0,0896 a	0,4078 \pm 0,3065 a
<i>S. fendleri</i>	0,2685 \pm 0,1104 a	0,1753 \pm 0,1115 a	0,2136 \pm 0,1306 a
<i>S. hawkesii</i>	0,2108 \pm 0,1174 a	0,2190 \pm 0,1161 a	0,2395 \pm 0,0645 a
<i>S. pampasense</i>	0,2708 \pm 0,0581 a	0,2173 \pm 0,0782 a	0,2392 \pm 0,0777 a
<i>S. sparsipilum</i>	0,3158 \pm 0,1627 a	0,2515 \pm 0,1371 a	0,3722 \pm 0,1512 a
<i>S. spegazzini</i>	0,2533 \pm 0,2647 a	0,2723 \pm 0,3373 a	0,2215 \pm 0,0624 a
<i>S. tarijense</i>	0,2382 \pm 0,0851 a	0,2322 \pm 0,0824 a	0,1627 \pm 0,0291 a
<i>S. vernei</i>	0,2527 \pm 0,0579 a	0,3055 \pm 0,2198 a	0,3790 \pm 0,2188 a
<i>S. stenotomum</i>	0,2482 \pm 0,1164 a	0,1667 \pm 0,0757 a	0,2320 \pm 0,1530 a
<i>S.t. andigena 1</i>	0,3775 \pm 0,1465 a	0,2950 \pm 0,1115 a	0,3105 \pm 0,1213 a
<i>S.t. andigena 2</i>	0,2775 \pm 0,1157 a	0,1687 \pm 0,0481 a	0,2399 \pm 0,0838 a
'Bintje'	0,0758 \pm 0,0135 b	0,0843 \pm 0,0291 b	0,1265 \pm 0,0347 a
'Ijsselster'	0,0808 \pm 0,0147 a	0,0682 \pm 0,0173 a	0,0785 \pm 0,0231 a
'Norchip'	0,0795 \pm 0,0138 a	0,1092 \pm 0,0394 a	0,0753 \pm 0,0205 a
'Peconic'	0,1170 \pm 0,0433 a	0,0993 \pm 0,0329 a	0,1060 \pm 0,0272 a
'San Michele'	0,1105 \pm 0,0212 a	0,1255 \pm 0,0396 a	0,1273 \pm 0,0595 a
MSD	0,2258	0,2598	0,2559
Wildarten	0,2796 \pm 0,1381	0,2545 \pm 0,1637	0,2997 \pm 0,1677
Primitivformen	0,2546 \pm 0,1017	0,1866 \pm 0,0716	0,2115 \pm 0,1023
Kultursorten	0,0927 \pm 0,0285	0,0973 \pm 0,0364	0,1027 \pm 0,0404
MSD	0,0699	0,0801	0,0829

der Pflanzen gegen die Zeit ergab sich zwischen der Frischmasse der Einzelpflanzen zu Beginn und zu Ende des Versuches eine lineare Beziehung, deren Steigung der mittleren relativen Wachstumsrate (MRW) entspricht. Bei 1000 μM Ca-Angebot wies die Sorte 'Bintje' mit 0,2095 $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ eine um 2 % größere (aber statistisch nicht signifikant verschiedene) MRW auf als *S. chacoense* mit 0,2073 $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$. Demgegenüber wies die Sorte 'Bintje' aber zu jedem der vier Termine eine Frischmasse auf, die durchschnittlich 70 % niedriger als die von *S. chacoense* war. Die Vermutung liegt nahe, daß die Unterschiede in der Frischmasse zu Versuchsende zwischen der Wildart *S. chacoense* und der Kultursorte 'Bintje' weniger auf ein genetisch bedingtes, unterschiedliches Wachstumspotential zurückzuführen sind, als vielmehr ursächlich durch die unterschiedliche Frischmasse zu Versuchsbeginn bedingt waren.

Die Möglichkeit, mittels einer Kovarianzanalyse, den Einfluß der Frischmasse zu Versuchsbeginn (Kovariable) auf die Frischmasse zu Versuchsende auszuschalten, indem die Frischmasse zu Versuchsende um den Einfluß der Kovariable bereinigt (adjustiert) wird, wurde geprüft. Eine wesentli-

che Voraussetzung für die zulässige Durchführung einer Kovarianzanalyse sowie für die Berechnung adjustierter Mittelwerte, ist die Gleichheit des Regressionsparameters über die verschiedenen Gruppen hinweg (DUFNER et al., 1992). In dem vorliegenden Fall bedeutet das, daß der Einfluß der Frischmasse zu Versuchsbeginn auf die Frischmasse zu Versuchsende, über die verschiedenen Genotypen betrachtet, gleich ist. Die bei den 16 Genotypen ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden zwischen der Frischmasse zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende wurden auf ihre Gleichheit hin geprüft. Es bestanden jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Steigungen (Regressionsparametern) verschiedener Genotypen. Beispielhaft dazu ist in Abb. 66B der Wachstumsverlauf der Primitivform *S. tuberosum* ssp. *andigena 1* und der Sorte 'Peconic' dargestellt. Trotz signifikanter Unterschiede in der Frischmasse zu Versuchsbeginn erreichten die Pflanzen beider Genotypen zu Versuchsende eine ähnlich hohe Frischmasse.

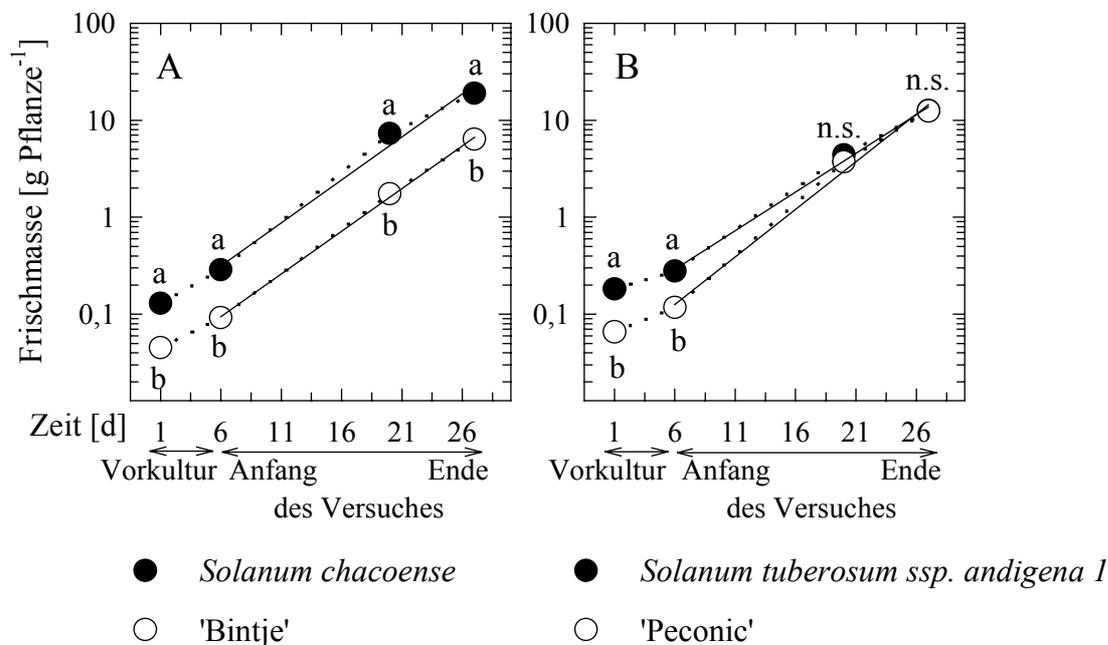


Abb. 66: Bildung der Frischmasse von Pflanzen (A) der Wildart *Solanum chacoense* und der Sorte 'Bintje' (B) der Primitivform *Solanum tuberosum* ssp. *andigena 1* und der Sorte 'Peconic' im Verlauf der Kulturdauer bei 1000 μM Ca-Angebot der Nährlösung ($n = 6$; Mittelwertvergleich innerhalb eines Termins mittels Tukey-Test bei $p < 0,05$)

Die Frischmasse zu Versuchsbeginn hatte somit einen Genotyp-abhängigen Einfluß auf die Frischmasse zu Versuchsende. Eine zulässige Durchführung der Kovarianzanalyse war daher nicht möglich.

Zusammenfassend kann aus diesen Betrachtungen gefolgert werden, daß das Wachstum der 16 *Solanum*-Genotypen an Hand ihrer mittleren relativen Wachstumsrate (MRW) miteinander verglichen werden sollte.

Tab. 19: Mittlere relative Wachstumsrate von 16 *Solanum*-Genotypen bei drei Ca-Angeboten für 21 d (n = 6; Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Ca-Angeboten innerhalb eines Genotyps nach Tukey-Test mit p < 0,05)

Genotyp	Mittlere relative Wachstumsrate			Relativ zu 1000 µM [%]
	1000 µM Ca [g g ⁻¹ d ⁻¹]	60/30 µM Ca [g g ⁻¹ d ⁻¹]	30/15 µM Ca [g g ⁻¹ d ⁻¹]	
<i>S. chacoense</i>	0,2073 ± 0,0103 a	0,1988 ± 0,0088 a	0,1629 ± 0,0104 b	78,6 ± 5,0
<i>S. fendleri</i>	0,1788 ± 0,0132 a	0,1661 ± 0,0140 a	0,1233 ± 0,0193 b	69,0 ± 10,8
<i>S. hawkesii</i>	0,1670 ± 0,0166 a	0,1653 ± 0,0120 a	0,1402 ± 0,0255 a	84,0 ± 15,3
<i>S. pampasense</i>	0,1611 ± 0,0115 a	0,1609 ± 0,0200 a	0,1445 ± 0,0190 a	89,7 ± 11,8
<i>S. sparsipilum</i>	0,1863 ± 0,0185 a	0,1896 ± 0,0246 a	0,1549 ± 0,0110 b	83,1 ± 5,9
<i>S. spegazzini</i>	0,2179 ± 0,0168 a	0,1812 ± 0,0147 b	0,1388 ± 0,0243 c	63,7 ± 11,1
<i>S. tarijense</i>	0,2135 ± 0,0154 a	0,2100 ± 0,0209 ab	0,1636 ± 0,0237 b	73,7 ± 9,0
<i>S. vernei</i>	0,1836 ± 0,0218 a	0,1620 ± 0,0155 ab	0,1423 ± 0,0084 b	77,5 ± 4,6
<i>S. stenotomum</i>	0,1747 ± 0,0134 a	0,1835 ± 0,0230 a	0,1622 ± 0,0119 a	92,8 ± 6,8
<i>S.t.andigena1</i>	0,1828 ± 0,0128 a	0,1623 ± 0,0343 a	0,1357 ± 0,0173 b	76,6 ± 11,1
<i>S.t.andigena2</i>	0,1723 ± 0,0115 a	0,1618 ± 0,0130 a	0,1270 ± 0,0155 b	74,2 ± 9,4
'Bintje'	0,2095 ± 0,0186 a	0,2113 ± 0,0054 a	0,1926 ± 0,0116 a	91,9 ± 5,5
'Ijsselster'	0,1657 ± 0,0131 a	0,1669 ± 0,0069 a	0,1289 ± 0,0138 b	77,8 ± 8,3
'Norchip'	0,2260 ± 0,0179 a	0,2275 ± 0,0166 a	0,1670 ± 0,0125 b	73,9 ± 5,5
'Peconic'	0,2234 ± 0,0107 a	0,2280 ± 0,0074 a	0,1861 ± 0,0057 b	83,3 ± 2,5
'San Michele'	0,2077 ± 0,0145 a	0,2153 ± 0,0064 a	0,1776 ± 0,0117 b	85,5 ± 5,6
MSD	0,0310	0,0351	0,0330	17,6
r zu 60/30 µM			0,878***	
r zu 1000 µM		0,868***	0,680**	
Wildarten	0,1895 ± 0,0250 a	0,1792 ± 0,0236 a	0,1469 ± 0,0212 b	77,8 ± 12,1
Primitivfor- men	0,1766 ± 0,0127 a	0,1696 ± 0,0262 a	0,1416 ± 0,0209 b	80,3 ± 12,1
Kultursorten	0,2064 ± 0,0261 a	0,2098 ± 0,0245 a	0,1704 ± 0,0252 b	82,5 ± 8,3
MSD	0,0153	0,0159	0,0146	17,6

7.3.2 Einfluß des Ca-Angebotes auf das Wachstum und die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen

Ein Ca-Angebot von 60/30 µM führte gegenüber der Kontrollbehandlung (1000 µM Ca) einzig bei *S. spegazzini* zu einer signifikant niedrigeren MRW (Tab. 19). Bei 30/15 µM Ca-Angebot war die MRW von allen Genotypen, mit Ausnahme von *S. hawkesii*, *S. pampasense*, *S. stenotomum* und der Sorte 'Bintje', signifikant niedriger als bei 1000 µM (Tab. 19). Im Mittel entsprach die MRW bei 30/15 µM Ca-Angebot 80 % der MRW der Kontrolle (1000 µM Ca) mit einer Spannweite von 64 bis 93 % (Tab. 19).

Bei einem Ca-Angebot von 60/30 μM wurden nach 21 d nur an 8 von 96 Pflanzen Ca-Mangelsymptome an den Blättern festgestellt, hingegen bei einem Ca-Angebot von 30/15 μM an 90 von 96 Pflanzen. Die durchschnittliche Stärke der Ca-Mangelsymptome (Blattrandnekrosen) bei den Pflanzen der 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot ist in Abb. 67 wiedergegeben. Auffällig ist, daß die Kultursorten und die Primitivformen eine stärkere Ausprägung von Symptomen als die Wildarten zeigten. Bei den Kultursorten und Primitivformen wies 'Bintje' die wenigsten und *S. stenotomum* die meisten Symptome auf. Innerhalb der Wildarten zeigten *S. hawkesii* und *S. pampasense* die geringste und *S. vernei* die stärkste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen.

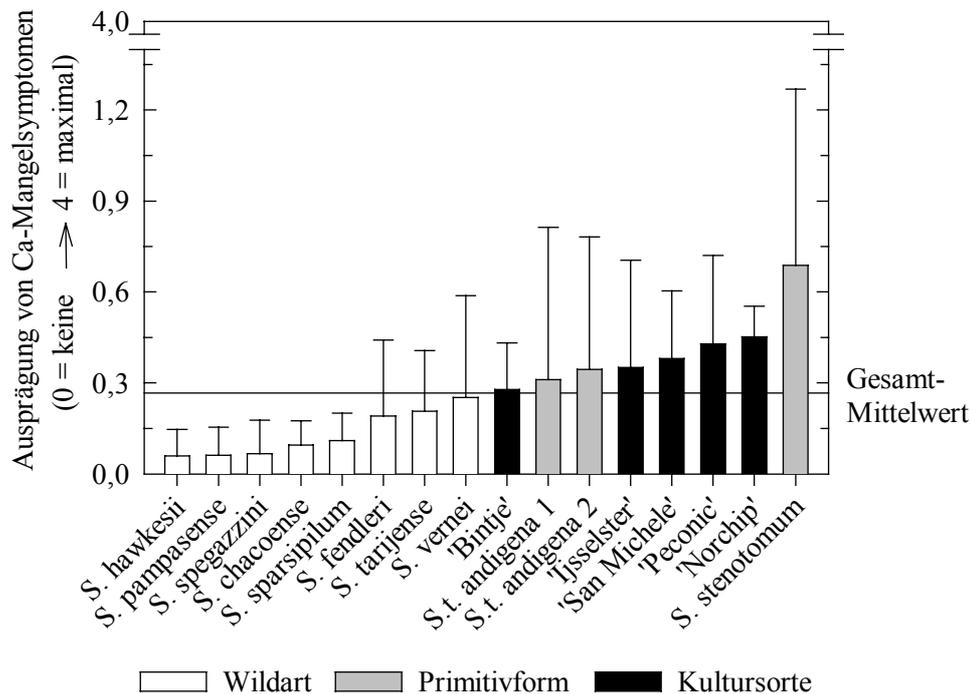


Abb. 67: Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen (Blattrandnekrosen) von 16 *Solanum*-Genotypen der 30/15- μM Ca-Angebotsstufe nach 21 d (n = 6)

7.3.3 Beziehung zwischen dem Wachstum und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei niedrigem Ca-Angebot

In diesem Versuch wurden verschiedene Wachstumsparameter ermittelt und auf einen möglichen Zusammenhang zu der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen hin untersucht (Tab. 20).

Einzig zwischen der Ausprägung der Ca-Mangelsymptome und der MRW der letzten Versuchswuche bestand mit $r = 0,598$ bei $p < 0,05$ eine signifikante Beziehung (Abb. 68; Tab. 20). Somit wiesen die Genotypen eine starke Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen auf, die in Relation zur schon vorhandenen Frischmasse viel Frischmasse in der letzte Woche bildeten. *S. pampasense* wich insofern deutlich von dieser Beziehung ab, als diese Wildart eine vergleichsweise hohe MRW in der letzten Versuchswuche, aber nur wenig Ca-Mangelsymptome aufwies. Ähnlich wich

die Sorte 'Bintje' von dieser Beziehung ab, da diese Sorte die höchste MRW aufwies und von den Kultursorten und Primitivformen die wenigsten Symptome zeigte. Die Beziehung zwischen der MRW der letzten Versuchswoche und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen war ohne *S. pampasense* und 'Bintje' mit $r = 0,852$ (signifikant mit $p < 0,001$) deutlich enger als die Beziehung einschließlich dieser beiden Genotypen (Abb. 68).

Tab. 20: Korrelationskoeffizienten zwischen Wachstumsparametern untereinander sowie zu der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot

	FM 1-21	MRW 1-21	Rel. FM 1-21	Rel. MRW 1-21	FM 1-14	MRW 1-14	FM 14-21	MRW 14-21	Symptom- ausprägung
Trockenmasse	*** 0,981	n.s. 0,343	n.s. 0,256	n.s. 0,203	*** 0,975	n.s. 0,486	*** 0,892	n.s. -0,221	n.s. -0,280
FM ₁₋₂₁		n.s. 0,409	n.s. 0,374	n.s. 0,320	*** 0,965	* 0,526	*** 0,941	n.s. -0,136	n.s. -0,255
MRW ₁₋₂₁			n.s. 0,442	* 0,592	n.s. 0,277	*** 0,929	* 0,564	* 0,501	n.s. 0,312
Rel. FM ₁₋₂₁				*** 0,861	n.s. 0,188	n.s. 0,319	* 0,528	n.s. 0,436	n.s. 0,010
Rel. MRW ₁₋₂₁					n.s. 0,117	n.s. 0,407	* 0,525	** 0,630	n.s. 0,271
FM ₁₋₁₄						n.s. 0,468	*** 0,822	n.s. -0,352	n.s. -0,359
MRW ₁₋₁₄							* 0,568	n.s. 0,144	n.s. 0,100
FM ₁₄₋₂₁								n.s. 0,179	n.s. -0,064
MRW ₁₄₋₂₁									* 0,598

FM₁₋₂₁ = Frischmassen-Zuwachs (1-21 d)

MRW₁₋₂₁ = Mittlere relative Wachstumsrate (1-21 d)

Rel. FM₁₋₂₁ = Frischmassen-Zuwachs (1-21 d) bei 30/15 μM in Prozent der Kontrolle (1000 μM)

Rel. MRW₁₋₂₁ = Mittlere relative Wachstumsrate (1-21 d) bei 30/15 μM in Prozent der Kontrolle (1000 μM)

FM₁₋₁₄ = Frischmassen-Zuwachs (1-14 d)

MRW₁₋₁₄ = Mittlere relative Wachstumsrate (1-14 d)

FM₁₄₋₂₁ = Frischmassen-Zuwachs (14-21 d)

MRW₁₄₋₂₁ = Mittlere relative Wachstumsrate (14-21 d)

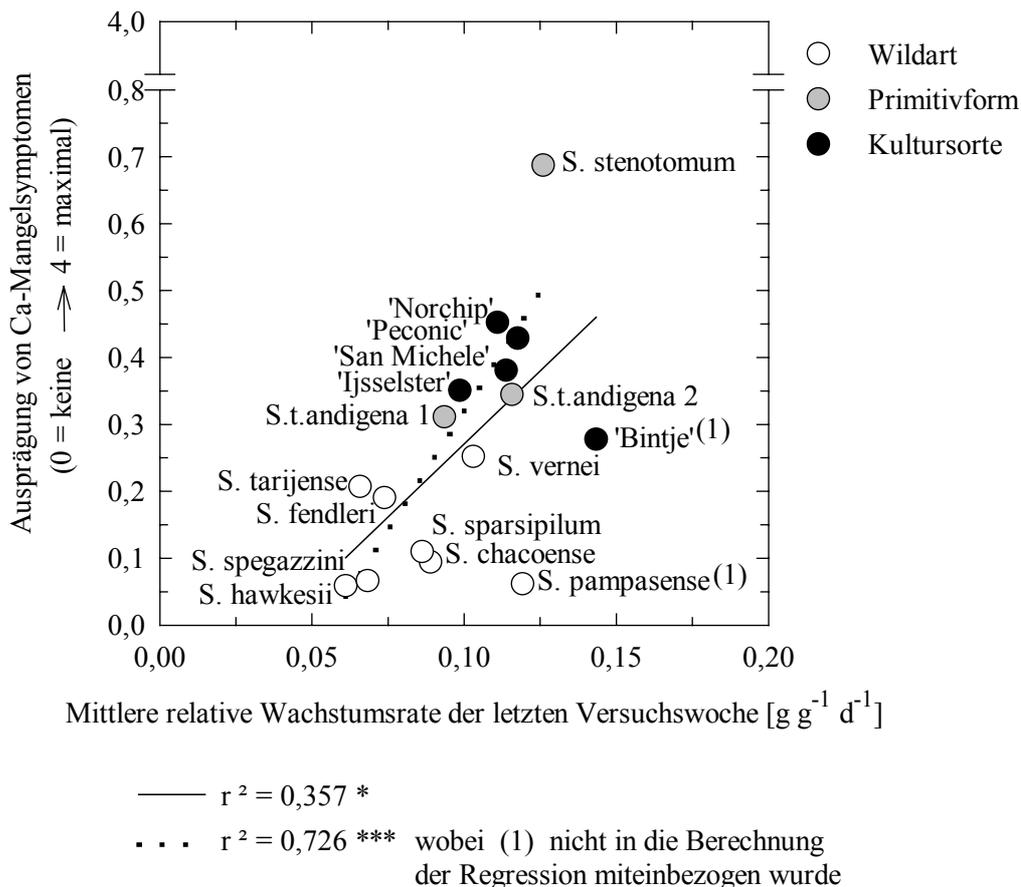


Abb. 68: Beziehung zwischen der Stärke der Ca-Mangelsymptome und der mittleren relativen Wachstumsrate der letzten Versuchswoche von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot

7.3.4 Charakterisierung der Ca-Effizienz

Eine geringe Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen kann auf einer hohen Ca-Effizienz des Genotyps beruhen, sie kann aber auch bedingt sein durch ein sehr geringes Wachstum der Pflanzen. Daher erfolgte die Charakterisierung der Ca-Effizienz der untersuchten Genotypen, indem gleichgewichtet die Ausprägung der Ca-Mangelsymptome und ein Wachstumsparameter berücksichtigt wurde.

Als Parameter für die Biomassen-Bildung eignete sich die MRW des ganzen Versuchszeitraumes, welche für alle 16 *Solanum*-Genotypen zwar nicht signifikant korrelierte mit der gebildeten Frischmasse, aber innerhalb der Gruppe der Kultursorten sowie innerhalb der Gruppe der Wildarten und Primitivformen stets signifikant mit der gebildeten Frisch- bzw. Trockenmasse korrelierte, wie beispielhaft in Abb. 69 für das niedrigste Ca-Angebot wiedergegeben.

Die zur Einschätzung der Ca-Effizienz verwendeten Parameter, Ausprägung der Ca-Mangelsymptome und die mittlere relative Wachstumsrate des gesamten Versuchszeitraumes, sind der Übersicht wegen in Form von Rangfolgen in Abb. 70 gegeneinander abgetragen. Ein Ca-effizienter Genotyp wird somit durch einen hohen Rang in der MRW und einen möglichst niedrigen

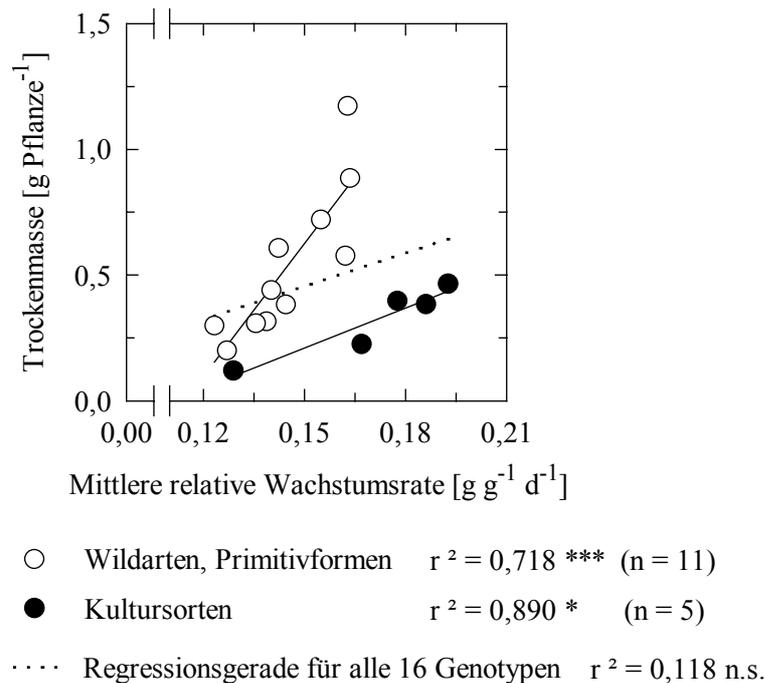


Abb. 69: Beziehung zwischen der mittleren relativen Wachstumsrate und der Trockenmasse von 16 *Solanum*-Genotypen nach 21 d Kultur bei 30/15 μM Ca-Angebot

Rang hinsichtlich der Ausprägung der Ca-Mangelsymptome charakterisiert. Anhand von Abb. 70 lassen sich einzelne Genotypen hinsichtlich ihrer Ca-Effizienz gut miteinander vergleichen. So ist deutlich zu sehen, daß die Sorte 'Bintje' Ca-effizienter ist als alle anderen Kultursorten und Primitivformen, bedingt durch die höchste MRW und, innerhalb der Gruppe der Kultursorten und Primitivformen, die geringste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen.

Anhand von Abb. 70 ist zwar ein Vergleich einzelner Genotypen, aber nicht aller Genotypen hinsichtlich ihrer Ca-Effizienz möglich. Die Einschätzung der Ca-Effizienz sollte gleichermaßen auf der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen wie auf der Biomassen-Bildung (in diesem Fall die MRW) beruhen. Für beide Parameter wurden daher Rangzahlen vergeben. Dabei erhielt die höchste MRW den höchsten Rang (wie in Abb. 70), und genau umgekehrt wie in Abb. 70 erhielt die geringste Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen den höchsten Rang. Für jeden Genotyp wurde jeweils aus den beiden Rangzahlen die Rangsumme gebildet. Die Reihenfolge abnehmender Rangsumme und damit abnehmender Ca-Effizienz ergibt sich wie folgt:

S. chacoense = 'Bintje' > *S. pampasense* > *S. hawkesii* = *S. tarijense* > *S. sparsipilum* > *S. spegazzini* > 'Peconic' = 'San Michele' > *S. vernei* > 'Norchip' > *S. fendleri* > *S. stenotomum* = *S.t. andigena 1* > *S.t. andigena 2* = 'Ijsselster'.

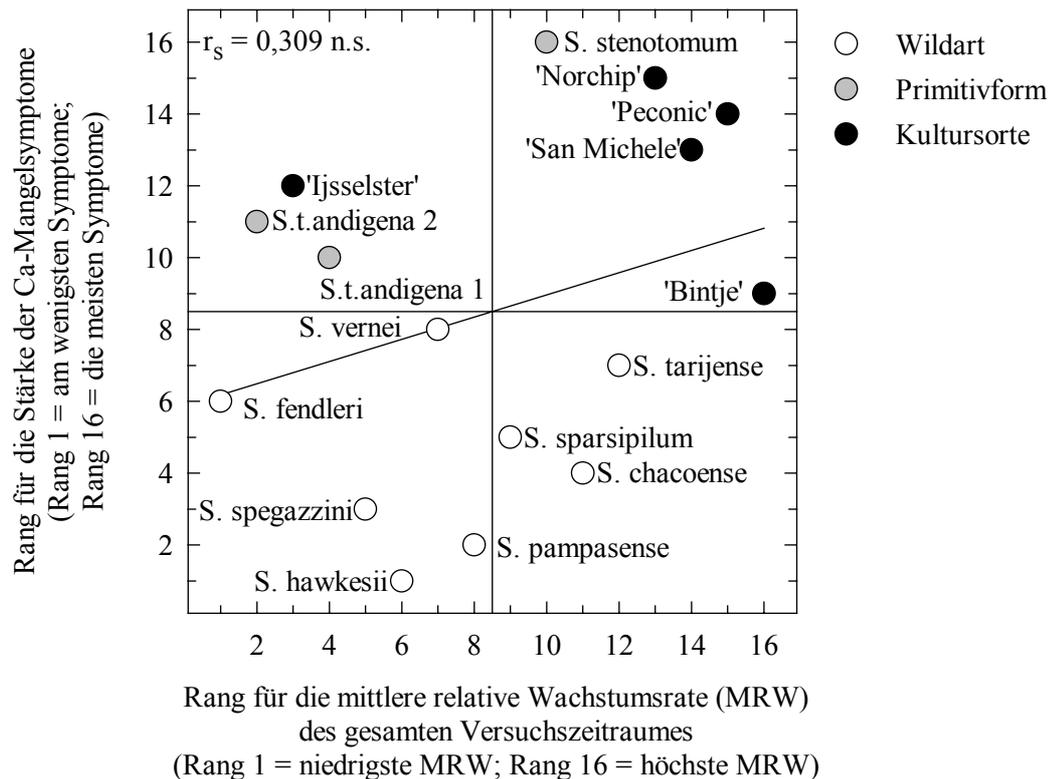


Abb. 70: Beziehung zwischen der Rangfolge der Stärke der Ca-Mangelsymptome und der Rangfolge der mittleren relativen Wachstumsrate des gesamten Versuchszeitraumes von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot

7.3.5 Beziehung zwischen morphologischen Parametern und der Ca-Effizienz

In dem Versuch wurde das Blatt-, Stengel-, sowie Wurzel-Trockenmassenverhältnis (BTMV, STMV, WTMV) der Pflanzen bestimmt, wodurch der prozentuale Anteil der Blatt-, Stengel-, sowie Wurzel-Trockenmasse an der Gesamt-Trockenmasse der Pflanzen angegeben wird (Daten nicht dargestellt). Es wurde geprüft, ob diese morphologischen Parameter mit der Einschätzung der Ca-Effizienz sowie ihrer Bestandteile, d.h. der Stärke der Symptomausprägung sowie dem Wachstumsverhalten bei 30/15 μM , gemessen an der MRW, in korrelativen Zusammenhang stehen. Weder das BTMV, noch das STMV der 16 *Solanum*-Genotypen, standen in engem korrelativen Zusammenhang weder zur Ca-Effizienz noch zu der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen oder zu der MRW (Tab. 21).

Demgegenüber korrelierten sowohl das WTMV wie auch das Sproß-Wurzel-Verhältnis signifikant mit der MRW. Demnach wiesen die Genotypen mit einem vergleichsweise hohen WTMV bzw. einem niedrigen Sproß-Wurzel-Verhältnis eine hohe MRW auf (Tab. 21). Ein signifikanter Zusammenhang zur Ca-Effizienz bestand nicht.

Tab. 21: Korrelationskoeffizienten (r) und Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient (rs) zwischen morphologischen Parametern und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen, der mittleren relativen Wachstumsrate sowie der Rangfolge der Ca-Effizienz von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot (BTMV = Blatttrockenmassenverhältnis [%]; STMV = Stengeltrockenmassenverhältnis [%]; WTMV = Wurzeltrockenmassenverhältnis [%])

Morphologische Parameter	Ca-Effizienz		Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen		Mittlere relative Wachstumsrate					
	rs		rs	r	rs	r				
BTMV	0,087	n.s.	-0,076	n.s.	-0,053	n.s.	0,000	n.s.	-0,052	n.s.
STMV	-0,157	n.s.	-0,224	n.s.	-0,127	n.s.	-0,368	n.s.	-0,351	n.s.
WTMV	0,204	n.s.	0,226	n.s.	0,260	n.s.	0,500	*	0,590	*
Sproß-Wurzel-Verhältnis	-0,254	n.s.	-0,253	n.s.	-0,117	n.s.	-0,600	**	-0,580	*

7.3.6 Beziehungen zwischen Mineralstoff-Gehalten und der Ca-Effizienz

Die Blätter, Stengel sowie Wurzeln der Pflanzen wurden auf ihre Ca-Gehalte hin untersucht (Daten nicht dargestellt). Ein niedrigeres Ca-Angebot (60/30 μM , 30/15 μM) führte bei allen Genotypen zu einer signifikanten Verminderung der Ca-Gehalte sowohl der Wurzeln, Stengel und Blätter. Signifikante Unterschiede in den Ca-Gehalten zwischen den beiden niedrigen Ca-Angeboten wurden bei den untersuchten Fraktionen bei keinem Genotyp in keinem Fall festgestellt. Es bestanden bei dem niedrigsten Ca-Angebot keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen in den Ca-Gehalten weder der Wurzeln, Stengel oder Blätter (Daten nicht dargestellt).

Die K-Gehalte der Blätter lagen unabhängig von dem Ca-Angebot im Bereich von 30 bis 67 mg (g TM)⁻¹. Dabei wiesen die Wildarten im Mittel signifikant niedrigere Blatt-K-Gehalte auf als die Primitivformen, während die K-Gehalte der Kultursorten zwischen denen der Wildarten und der Primitivformen lagen (Daten nicht dargestellt). Ein genereller Einfluß des Ca-Angebotes der Nährlösung auf die K-Gehalte der Blätter konnte nicht festgestellt werden.

Dagegen wurde ein deutlicher Einfluß des Ca-Angebotes auf die Mg-Gehalte der Blätter festgestellt. Bei niedrigem Ca-Angebot (60/30 μM , 30/15 μM) waren die Mg-Gehalte signifikant oder zumindest tendenziell höher als bei hohem Ca-Angebot (Daten nicht dargestellt).

In Tab. 22 sind die Korrelationskoeffizienten der Beziehungen bei 30/15 μM Ca-Angebot zwischen den Mineralstoff-Gehalten und berechneten Kationen-Verhältnissen, und der Ca-Effizienz sowie ihrer Bestandteile, d.h. die Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und die MRW, aufgeführt. In der Tendenz bestanden negative Zusammenhänge zwischen der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und den Ca-Gehalten, sowohl der Wurzeln, Stengel, Blätter wie auch der Gesamtpflanze. Da sich aber keine engen Korrelationen ergaben, ließ sich die genotypisch unterschiedliche Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen nicht hinreichend durch die Höhe der Ca-

Gehalte erklären. Demgegenüber korrelierten sowohl die Wurzel-Ca-Gehalte wie auch Stengel-Ca-Gehalte signifikant mit der MRW. Demnach wiesen die Genotypen mit niedrigen Ca-Gehalten in den Wurzeln oder Stengeln eine hohe MRW auf. Da zwischen den Stengel-Ca-Gehalten sowie den Wurzel-Ca-Gehalten und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen tendenziell ebenfalls ein negative Beziehung bestand, ergab sich kein enger korrelativer Zusammenhang zwischen der Rangfolge der Ca-Effizienz und der Rangfolge der Ca-Gehalte der Wurzeln oder Stengel.

Tab. 22: Korrelationskoeffizienten (r) und Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizienten (rs) zwischen Mineralstoffgehalten sowie Kationen-Verhältnissen und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und der mittleren relativen Wachstumsrate sowie der Rangfolge der Ca-Effizienz von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot

Parameter	Ca-Effizienz		Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen		Mittlere relative Wachstumsrate					
	rs		rs	R	rs	r				
Ca-Gehalte der										
Gesamt-Pflanze	0,251	n.s.	-0,324	n.s.	-0,235	n.s.	-0,018	n.s.	-0,086	n.s.
Wurzel	-0,372	n.s.	-0,176	n.s.	-0,082	n.s.	-0,691	**	-0,714	**
Stengel	-0,140	n.s.	-0,450	*	-0,397	n.s.	-0,674	**	-0,580	*
Blätter	0,125	n.s.	-0,174	n.s.	-0,093	n.s.	0,021	n.s.	0,085	n.s.
Blatt-K-Gehalte	-0,554	*	0,626	**	0,569	*	0,047	n.s.	0,076	n.s.
Blatt-Mg-Gehalte	0,419	n.s.	-0,150	n.s.	0,051	n.s.	0,344	n.s.	0,346	n.s.
Kationen-Verhältnisse in Blättern										
Ca/(K+Mg)	0,210	n.s.	-0,235	n.s.	-0,271	n.s.	0,029	n.s.	0,046	n.s.
K/(Ca+Mg)	-0,660	**	0,582	*	0,481	n.s.	-0,129	n.s.	-0,080	n.s.
Mg/(Ca+K)	0,596	*	-0,585	*	-0,447	n.s.	0,044	n.s.	0,162	n.s.
Ca/Mg	0,087	n.s.	-0,065	n.s.	-0,091	n.s.	0,068	n.s.	-0,009	n.s.
K/Ca	-0,451	*	0,321	n.s.	0,416	n.s.	-0,176	n.s.	-0,105	n.s.
K/Mg	-0,660	**	0,582	*	0,474	n.s.	-0,129	n.s.	-0,082	n.s.

Die K-Gehalte der Blätter korrelierten signifikant mit der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen, jedoch nicht mit der MRW (Tab. 22). Demnach wiesen gerade die Genotypen mit hohen K-Gehalte der Blätter auch viele Ca-Mangelsymptome auf. Da die Rangfolge der K-Gehalte auch signifikant mit der Rangfolge der Ca-Effizienz korrelierte, müsste sich ein Ca-effizienter Genotyp durch vergleichsweise niedrige K-Gehalte in den Blättern auszeichnen. Zwischen den K-Gehalten der 16 *Solanum*-Genotypen bestanden zwischen den drei Ca-Angeboten jeweils positive, signifikante Korrelationen (nicht dargestellt). Damit wiesen also die Genotypen, die bei hohem Ca-Angebot hohe K-Gehalte aufwiesen, auch bei niedrigem Ca-Angebot hohe K-Gehalte auf. Die K-

Gehalte der Blätter wiederum korrelierten signifikant positiv mit der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen. Zusammenfassend kann formuliert werden, daß die Genotypen, für die hohe Blatt-K-Gehalte charakteristisch waren, bei niedrigem Ca-Angebot viele Ca-Mangelsymptome aufwiesen.

In ähnlicher Weise wie bei den Blatt-K-Gehalten, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen und außerdem nicht signifikant, bestand ein schwacher Zusammenhang zwischen den Blatt-Mg-Gehalten und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen und der Ca-Effizienz (Tab. 22). Die Genotypen mit niedrigen Mg-Gehalten der Blätter wiesen in der Tendenz mehr Ca-Mangelsymptome auf. Die Bedeutung der Mg-Gehalte für die Ca-Effizienz wird bei Betrachtung der berechneten Kationen-Verhältnisse deutlicher.

Sobald K und Mg auf verschiedenen Seiten des jeweiligen Verhältnisses stehen, ergaben sich signifikante Zusammenhänge zur Ca-Effizienz. Dabei zeigte sich, daß die engsten Zusammenhänge Verhältnis in den Blättern aufwies, sei es bedingt durch niedrige K-Gehalte und / oder hohe Mg-Gehalte, als vergleichsweise Ca-effizient (vgl. Abb. 71) zwischen dem $K/(Ca+Mg)$ -Verhältnis sowie dem K/Mg-Verhältnis und der Ca-Effizienz bestanden. Demnach erwies sich der Genotyp, der bei niedrigem Ca-Angebot ein niedriges $K/(Ca+Mg)$ -Verhältnis in den Blättern aufwies, sei es bedingt durch niedrige K-Gehalte und / oder hohe Mg-Gehalte, als vergleichsweise Ca-effizient (vgl. Abb. 71).

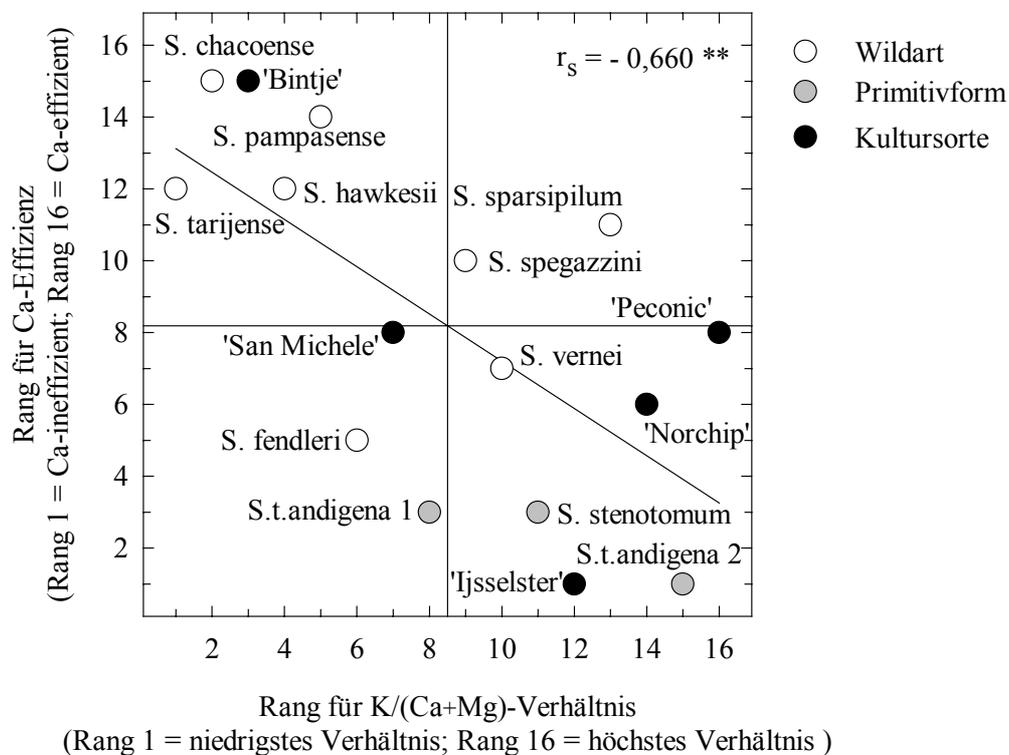


Abb. 71: Beziehung zwischen der Rangfolge der Ca-Effizienz und der Rangfolge des $K/(Ca+Mg)$ -Verhältnis der Blätter von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot

7.3.7 Aufnahme-Effizienz versus Verwertungs-Effizienz

Abschließend soll der Frage nachgegangen werden, ob die festgestellten Unterschiede in der Ca-Effizienz auf Unterschiede in der Ca-Aufnahme und / oder der Ca-Verwertung zurückzuführen waren.

MOLL et al. (1982) definierten eine sog. Nutzungs-Effizienz (Trockenmasse / Ca-Angebot), die sich aus dem Produkt der Aufnahme-Effizienz (Ca-Aufnahme / Ca-Angebot) und der Verwertungs-Effizienz (Trockenmasse / Ca-Aufnahme) ergibt. Die Anwendung dieses Konzepts erfordert die Einbeziehung der gebildeten Trockenmasse der Genotypen. Aus 7.3.1 ging hervor, daß für die Charakterisierung des Wachstums der 16 *Solanum*-Genotypen eher die MRW als die gebildete Frischmasse, und damit auch die Trockenmasse, geeignet war. Wie in Abb. 69 dargestellt bestand zwischen der MRW und der Trockenmasse bei Betrachtung aller 16 Genotypen nur eine tendenziell positive Beziehung, wohingegen innerhalb der Gruppe der Kultursorten sowie innerhalb der Gruppe der Primitivformen und Wildarten eine sehr enge Beziehung zwischen der MRW und der gebildeten Trockenmasse bestand. Somit kann innerhalb dieser beiden Gruppen das Wachstum gleichermaßen durch die MRW wie auch durch die Trockenmasse charakterisiert werden. Das von MOLL et al. (1982) vorgeschlagene Konzept zur Ermittlung des Beitrages der Aufnahme-Effizienz und des Beitrages der Verwertungs-Effizienz zu der Nutzungs-Effizienz, und damit zur Trockenmassen-Bildung, wurde daher getrennt auf die Gruppe der Kultursorten und die Gruppe der Primitivformen und Wildarten angewendet.

Aus Tab. 23 geht hervor, daß die Ca-Nutzungs-Effizienz, und damit Effizienz der Nutzung des Ca-Angebotes der Nährlösung zur Trockenmassen-Bildung, bei gegebenem Ca-Angebot sowohl bei den Kultursorten als auch innerhalb der Gruppe der Primitivformen und Wildarten bei allen drei Ca-Angebotsstufen hauptsächlich auf der Ca-Aufnahme und nicht auf der Ca-Verwertung beruhte.

Tab. 23: Beitrag der Varianz der Effizienz-Komponenten (Ca-Aufnahme, Ca-Verwertung) zur Varianz der Ca-Nutzungs-Effizienz berechnet nach MOLL et al. (1982)

Ca-Angebot [µM]	Kultursorten		Wildarten & Primitivformen	
	Ca-Aufnahme	Ca-Verwertung	Ca-Aufnahme	Ca-Verwertung
1000	0,890	0,110	0,996	0,004
60/30	0,902	0,098	1,033	-0,033
30/15	0,832	0,177	1,145	-0,145

Daraus ergibt sich, daß die genotypischen Unterschiede in der Nutzung des Ca-Angebotes der Nährlösung zur Trockenmassenbildung im wesentlichen auf genotypischen Unterschieden in der Aufnahme-Effizienz und nicht auf der Verwertungs-Effizienz beruhten.

ENGLISH & MAYNARD (1981) verwendeten zur Identifizierung von Ca-verwertungs-effizienten *Lycopersicon*-Genotypen sog. Effizienz-Verhältnisse (EV), welche sich aus der gebildeten Trok-

kenmasse pro aufgenommener Ca-Menge berechnen. Aus den oben dargestellten Ergebnissen ging hervor, daß bei den hier untersuchten Genotypen die Verwertungs-Effizienz im Prinzip keinen Beitrag zur Ca-Effizienz leistet. Demzufolge sollten sich bei Anwendung des von ENGLISH & MAYNARD (1981) verwendeten Konzeptes der EV keine Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen lassen. In Abb. 72 sind die zur Ermittlung, des von ENGLISH & MAYNARD (1981) vorgeschlagenen EV, erforderlichen Größen, die gebildete Pflanzen-Trockenmassen sowie die aufgenommenen Ca-Mengen dargestellt. Verwertungs-effiziente Genotypen, die bei geringer Ca-Aufnahme eine hohe Trockenmasse bilden, würden sich im linken, oberen Quadranten befinden. Verwertungs-ineffiziente Arten, die bei einer vergleichsweise hohen Ca-Aufnahme nur eine geringe Trockenmasse bilden, wären im rechten, unteren Quadranten zu finden. In diesem Quadranten befindet sich jedoch kein Genotyp. Vielmehr ging mit einer höheren Aufnahme von Ca stets gleichermaßen auch eine größere Trockenmassen-Bildung einher, so daß keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Verwertung des aufgenommenen Ca zur Trockenmassen-Bildung zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten. Somit läßt sich mit dem von ENGLISH & MAYNARD (1981) vorgeschlagenem Konzept tatsächlich kein verwertungs-effizienter Genotyp innerhalb des untersuchten Spektrums an Genotypen identifizieren.

SIDDIQI & GLASS (1981) schlugen ein Konzept zur Identifizierung verwertungs-effizienter Arten vor, bei dem die gebildete Trockenmasse eine stärkere Gewichtung erfährt. Der von SIDDIQI & GLASS (1981) formulierte Verwertungs-Index ("utilization index") berechnet sich aus der gebildeten Trockenmasse dividiert durch den Mineralstoffgehalt. Anders formuliert, entspricht dieser Verwertungs-Index dem Quotienten aus der gebildeten Trockenmasse in zweiter Potenz und der Ca-Aufnahme. In Abb. 72 sind die zur Ermittlung, des von SIDDIQI & GLASS (1981) formulierten Index, erforderlichen Größen gegeneinander abgetragen. Verwertungs-effiziente Genotypen müssten sich auch hier im linken, oberen Quadranten finden lassen.

Auch bei Anwendung dieses Konzepts ließen sich keine verwertungs-effizienten Genotypen identifizieren. Allerdings fällt hier die Sorte 'Ijsselster' auf, die damit im Vergleich zu den anderen Genotypen als verwertungs-ineffizient bezeichnet werden kann.

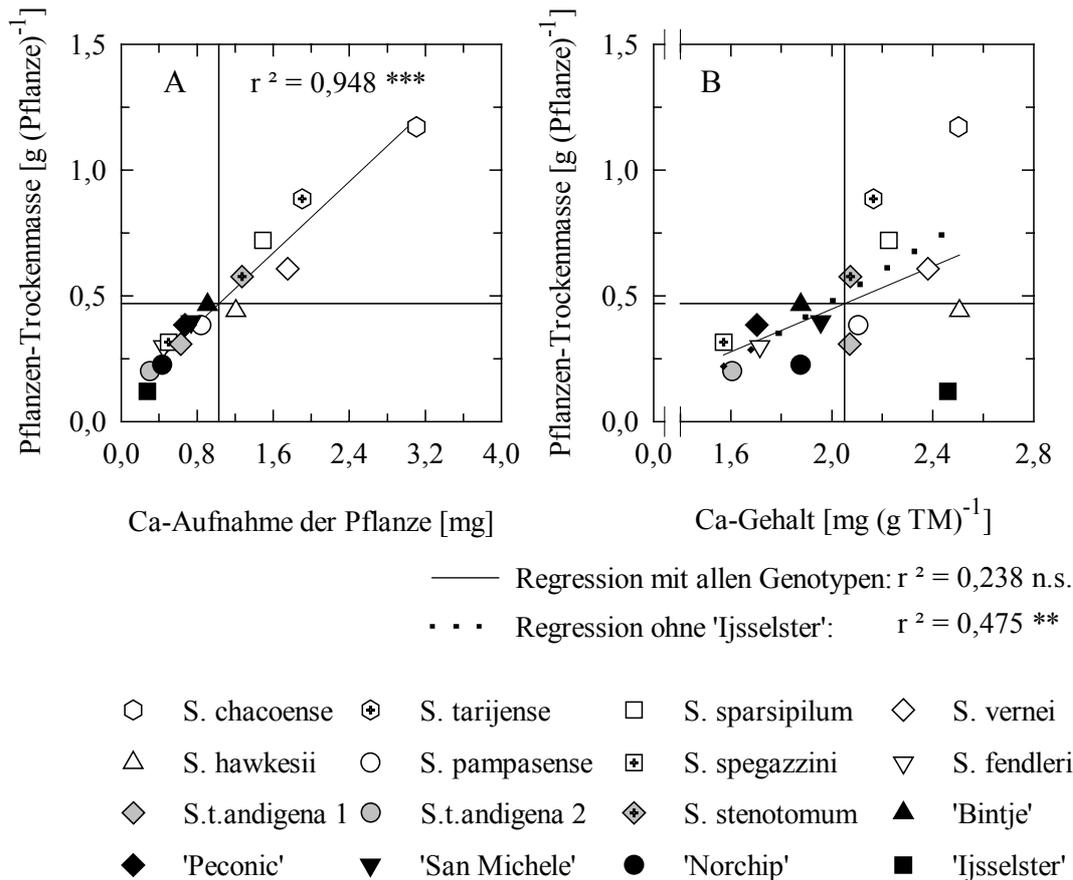


Abb. 72: Beziehung zwischen der gebildeten Pflanzentrockenmasse und (A) der Ca-Aufnahme sowie (B) den Ca-Gehalten der Pflanzen von 16 *Solanum*-Genotypen bei 30/15 μM Ca-Angebot

Zusammenfassen lassen sich die Ergebnisse wie folgt:

- Zwischen den 16 *Solanum*-Genotypen bestanden große Unterschiede in der Wüchsigkeit, die gemessen an der MRW, bei optimalem Ca-Angebot von 1000 μM bis zu 40 % ausmachten.
- Ein Ca-Angebot von 60/30 μM führte im Vergleich zu 1000 μM Ca nur bei *S. spegazzini* zu einer signifikant niedrigeren MRW.
- Ein Ca-Angebot von 30/15 μM führte dagegen bei allen *Solanum*-Genotypen zu einer tendenziellen Verminderung der MRW, wobei die MRW nur bei 'Bintje', *S. pampasense*, *S. hawkesii* und *S. stenotomum* nicht signifikant niedriger war als bei der Kontrolle war.
- Bei 60/30 μM waren nach 21 d nur an 6 der insgesamt 96 Pflanzen Ca-Mangelsymptome feststellbar. Bei dem niedrigsten Ca-Angebot zeigten nach 21 d Behandlung alle Genotypen Ca-Mangelsymptome, wobei die Primitivformen und Kultursorten mehr Symptome aufwiesen als die Wildarten.
- Die Ca-Effizienz der Genotypen wurde gleichermaßen anhand der MRW sowie der Stärke der Symptomausprägung bei dem niedrigsten Ca-Angebot eingeschätzt, so daß sich folgende Reihenfolge abnehmender Ca-Effizienz ergab:

S. chacoense = 'Bintje' > *S. pampasense* > *S. hawkesii* = *S. tarijense* > *S. sparsipilum* > *S. spagazzini* > 'Peconic' = 'San Michele' > *S. vernei* > 'Norchip' > *S. fendleri* > *S. stenotomum* = *S.t.andigena 1* > *S.t.andigena 2* = 'Ijsselster'.

- Keiner der erfassten morphologischen Parameter (BTMV, STMV, WTMV, Sproß-Wurzel-Verhältnis) korrelierte signifikant mit der Ca-Effizienz.
- Ein niedrigeres Ca-Angebot führte bei allen Genotypen zu einer signifikanten Verminderung der Ca-Gehalte in den Wurzeln, Stengeln und Blättern. Signifikante Unterschiede in den Ca-Gehalten zwischen den beiden niedrigen Ca-Angeboten bei den drei Fraktionen bei keinem Genotyp festgestellt. Es bestanden bei keiner Fraktion signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen in den Ca-Gehalten bei dem niedrigsten Ca-Angebot.
- Tendenziell bestanden negative Beziehungen zwischen den Ca-Gehalten der verschiedenen Fraktionen (Blätter, Stengel, Wurzel) und der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen bei 30/15 µM Ca-Angebot, aber in keinem Fall bestand ein enger Zusammenhang.
- Von allen in diesem Versuch ermittelten Wachstumsparametern korrelierte signifikant mit der Ausprägung von Ca-Mangelsymptomen nur die MRW der letzten Versuchswoche (in der sich auch hauptsächlich die Symptome entwickelten).
- Die genotypischen Unterschiede in der Nutzung des Ca-Angebotes der Nährlösung zur Trockenmassenbildung beruhten im wesentlichen auf genotypischen Unterschieden in der Aufnahme-Effizienz und nicht auf Unterschieden in der Verwertungs-Effizienz.
- Obwohl ein weites Spektrum an Genotypen auf deren Ca-Effizienz untersucht wurde, ließ sich in der Rangfolge der Ca-Effizienz sowohl am oberen Ende (hohe Ca-Effizienz: 'Bintje') als auch am unteren Ende (geringe Ca-Effizienz: 'Ijsselster') eine Kultursorte finden.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

Herrn Prof. Dr. A.H. Wissemeier für die Überlassung des Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. G. Scherer für die Übernahme des Korreferats,

Herrn Prof. Dr. W.J. Horst für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes,

allen Mitgliedern des Instituts für Pflanzenernährung der Universität Hannover, insbesondere Dr. Lutz Collet,

sowie Olaf Maschmeier für die „Datenrettung“ kurz vor Schluß.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. P. Van Cutsem, Prof. J. Messiaen, P. Cambier und F. Liners bedanken, nicht nur aber insbesondere für ihre Unterstützung bei der Charakterisierung der Oligogalakturonide hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades.

Dank gebührt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung des Forschungsvorhabens im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms 717: „Der Apoplast der höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum“.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Nikolas Jarzyna für die vielfältige Unterstützung in dieser nicht ganz einfachen Zeit bedanken.